ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)

ปริญญา

พืชไร่	พืชไร่นา
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูก (*Curcuma* sp.) ในประเทศไทย ที่ตรวจสอบโดยเอเอฟแอลพี

Genetic Diversity of Waan Chak Mod Look (*Curcuma* sp.) in Thailand Revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

นามผู้วิจัย นางสาวกุหลาบ เหล่าสาธิต

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกวิทยานิพนธ์หลัก ....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิเชียร กีรตินิจกาล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ....

(รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, D.Agr.)

หัวหน้าภาควิชา ....

(รองศาสตราจารย์รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.......... **เดือน**.......... **พ.ศ.** ....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูก (*Curcuma* sp.) ในประเทศไทย ที่ตรวจสอบโดยเอเอฟแอลพี

Genetic Diversity of Waan Chak Modlook (*Curcuma* sp.) in Thailand Revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

โดย

นางสาวกุหลาบ เหล่าสาธิต

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่)
พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กุหลาบ เหล่าสาธิต 2553: ความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชัดมดลูก (*Curcuma* sp.) ในประเทศไทยที่ตรวจสอบโดยเอเอฟแอลพี ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พืชไร่) สาขาพืชไร่ ภาควิชาพืชไร่นา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิเชียร กีรตินิจกาล, Ph.D. 103 หน้า

ว่านชักมดลูกเป็นพืชสมุนไพรไทยในสกุล *Curcuma* ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย แต่เนื่องจากพืชในสกุลนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก จึงอาจเกิดความสับสนในการนำไปใช้ประโยชน์ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิด และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูก และพืชบางชนิดในสกุล *Curcuma* จำนวนทั้งสิ้น 95 ตัวอย่าง ซึ่งรวบรวมจากแหล่งปลูกต่าง ๆ รวม 38 จังหวัด ครอบคลุมทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่า ไพรเมอร์ *Eco*RI–*Mse*I จำนวน 9 คู่ สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างได้ทั้งหมด โดยให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 202 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง 152 แถบ (75.25%) ค่า polymorphic information contents (PICs) มีค่าอยู่ในช่วง 0.00-0.50 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.25 แผนภูมิทางพันธุกรรมจากข้อมูลเอเอฟแอลพี สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม โดยตัวอย่างกลุ่มที่ 1, 3 และ 4 จัดเป็นกลุ่มของว่านชักมดลูก และตัวอย่างกลุ่มที่ 2 จัดเป็นพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma* โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของตัวอย่างทั้งหมดอยู่ในช่วง 0.57-1.00 ผลการวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี principal coordinates analysis (PCoA) ให้ผลสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยการสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรม

เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมด้วย พบว่าสามารถระบุชนิดของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 3 และ 4 ได้เป็น *Curcuma comosa* Roxb. ส่วนว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 และกลุ่มของพืชชนิดอื่นที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูก สามารถระบุชนิดได้เป็น *Curcuma* sp. แสดงให้เห็นว่าข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม แยกความแตกต่างและจำแนกชนิดของว่านชักมดลูกได้

____________________ __________________________________ ____/____/____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kularb Laosatit 2010: Genetic Diversity of Waan Chak Modlook (*Curcuma* sp.) in Thailand Revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Master of Science (Agronomy), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy.
Thesis Advisor: Assistant Professor Vichien Keeratinijakal, Ph.D. 103 pages.

Waan Chak Modlook (*Curcuma* sp.) is an indigenous medicinal plant of Thailand. High similarity in morphological characteristics observed among *Curcuma* spp. may caused confusion in utilization. The purposes of this research were to identify species and study genetic diversity among Waan Chak Modlook. Ninety-five accessions of Waan Chak Modlook and other *Curcuma* spp. collected from 38 provinces throughout Thailand were analyzed using AFLP technique. Nine *Eco*RI–*Mse*I primer combinations produced a total of 202 bands, 152 of them were polymorphic (75.25%). Polymorphic information contents (PICs) values ranged from 0.00 to 0.50 with average PICs score of 0.25. Dendrogram derived from AFLP showed that all samples could be classified into four major clusters. The Waan Chak Modlook samples were grouped into cluster I, III and IV while the other *Curcuma* spp. samples were grouped together into cluster II. The values of similarity coefficient ranged from 0.57 to 1.00. The result from principal coordinates analysis (PCoA) methods corresponded to the UPGMA clustering analysis.

The morphological data along with AFLP data indicated that Waan Chak Modlook samples in cluster III and IV could be identified to *Curcuma comosa* Roxb. but Waan Chak Modlook samples in cluster I and others in cluster II could be identified to *Curcuma* sp. This study indicated that AFLP technique is useful for studying genetic diversity and identifying species of Wan Chak Modlook.

______________________ ______________________________________ ____/____/____

Student’s signature Thesis Advisor’s signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิเชียร กีรตินิจกาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รศ.ดร.สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ ตลอดจนคำแนะนำต่าง ๆ รวมถึงการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ธานี ศรีวงศ์ชัย ประธานกรรมการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย ผศ.ดร.สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกที่ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่กรุณาสั่งสอนอบรม ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และถ่ายทอดความรู้ให้เป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ คุณโสภิดา ชิดชื่นเชย คุณชัยมงคล ตะนะสอน คุณสุพัฒนา บุรีรัตน์ คุณนันทวรรณ ฉิมพลี คุณวัฒนา อาจวิชัย คุณฐนิตา บุญสร้างสม คุณเมทินี กลัดมุข คุณอารีย์รัตน์ ขุนภิบาล คุณวิภารัตน์ อัดแอ คุณแก้วตา รัตนประสิทธิ์ สมาชิกห้องปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมและวิเคราะห์จีโนม ภาควิชาพันธุศาสตร์ เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ภาควิชาพืชไร่นา ตลอดจนผู้มีส่วนเกี่ยวข้องที่มิได้เอ่ยนาม ที่คอยให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และเป็นกำลังใจ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์นี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และศูนย์วิทยาการเทคโนโลยีชีวภาพทางทางการเกษตรแห่งชาติที่ให้ความอนุเคราะห์ทุนสนับสนุนงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณยาย คุณแม่ พี่ น้องและครอบครัว อันเป็นที่รักยิ่ง ที่คอยสนับสนุน คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ คำปรึกษา และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

กุหลาบ เหล่าสาธิต

เมษายน 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
อุปกรณ์	19
วิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	35
สรุปและข้อเสนอแนะ	63
สรุป	63
ข้อเสนอแนะ	69
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	70
ภาคผนวก	77
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	103

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 ตัวอย่างว่านชักมดลูกและพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma* ที่ใช้ในการศึกษา 19

2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter 26

3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 29

4 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี 36

5 ร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงพอลิมอร์ฟีซึม และจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อไพรเมอร์ 42

6 เปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาที่เด่นชัดของตัวอย่างแต่ละกลุ่ม 67

ตารางผนวกที่

1 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของตัวอย่างจำนวน 95 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี คำนวณด้วยวิธี Dice's coefficient โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.20k 78

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ใบอ่อนของตัวอย่างที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ	21
2	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างจำนวน 14 ตัวอย่างที่ใช้คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม	37
3	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 1-29 ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ E-AGG และ M-CAT	38
4	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 30-58 ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ E-AGG และ M-CAT	39
5	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 59-88 ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ E-AGG และ M-CAT	40
6	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 89-95 ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ E-AGG และ M-CAT	41
7	แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูก และพืชบางชนิดในสกุล *Curcuma* สร้างด้วยวิธี UPGMA คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมด้วยวิธี Dice’s coefficient และวิเคราะห์ความเชื่อมั่นของการจัดกลุ่มด้วยค่า bootstrap	46
8	แผนภาพการจัดกลุ่มว่านชักมดลูก และพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma* ด้วยวิธี principal coordinates analysis (PCoA)	47
9	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของตัวอย่าง	48
10	ลักษณะหัวของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1	49
11	สีของเส้นกลางใบว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1	52
12	ลักษณะช่อดอกของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1	52
13	ลักษณะหัวของพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma* sp. ที่คล้ายว่านชักมดลูก	54

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ลักษณะช่อดอกของพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma* sp. ที่คล้ายว่านชักมดลูก	55
15	ลักษณะหัวของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 3	56
16	สีของเส้นกลางใบว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 3	57
17	ลักษณะช่อดอกของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 3	58
18	ลักษณะหัวของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 4	59
19	ลักษณะช่อดอกของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 4	59
20	ลักษณะหัวของตัวอย่าง 4 กลุ่ม	65
21	ลักษณะช่อดอกของตัวอย่าง 4 กลุ่ม	66
22	ลักษณะดอก (flower) ที่อยู่ภายในกลีบประดับตอนล่าง	66

ภาพผนวกที่		
1	แผนภูมิทางพันธุกรรมของตัวอย่างกลุ่มที่ 1 สร้างด้วยวิธี UPGMA คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ด้วย วิธี Dice’s coefficient	99
2	แผนภูมิทางพันธุกรรมของตัวอย่างกลุ่มที่ 2 สร้างด้วยวิธี UPGMA คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ด้วย วิธี Dice’s coefficient	100
3	แผนภูมิทางพันธุกรรมของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 สร้างด้วยวิธี UPGMA คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ด้วย วิธี Dice’s coefficient	101
4	แผนภูมิทางพันธุกรรมของตัวอย่างกลุ่มที่ 4 สร้างด้วยวิธี UPGMA คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ด้วย วิธี Dice’s coefficient	102

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFLP	=	amplified fragment length polymorphism
APS	=	ammonium persulfate
CTAB	=	cetyl trimethyl ammonium bromide
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
NTSYS	=	numerical taxonomy and multivariate analysis system
PCoA	=	principal coordinates analysis
PICs	=	polymorphic information contents
r	=	cophenetic correlation coefficient
RNase	=	ribonuclease
TAE	=	Tris-acetate, EDTA
TBE	=	Tris-borate, EDTA
TEMED	=	N,N,N’,N’-tetramethylethylenediamine
UPGMA	=	unweighted pair group method of arithmetic average

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูก (*Curcuma* sp.) ในประเทศไทย ที่ตรวจสอบโดยเอเอฟแอลพี

Genetic Diversity of Wan Chak Modlook (*Curcuma* sp.) in Thailand Revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

คำนำ

ปัจจุบันมีกลุ่มคนที่หันมาให้ความสำคัญกับการดูแลสุขภาพ ด้วยวิธีทางธรรมชาติมากขึ้น ทำให้สมุนไพรเริ่มมีบทบาทเพิ่มขึ้นทั้งในและต่างประเทศ ว่านชักมดลูกเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่อยู่ในสกุลเดียวกับขมิ้นชัน ส่วนของรากใช้แก้อาการท้องอืดท้องเฟ้อ หัวหรือเหง้าใช้รักษาและบำรุงอาการต่าง ๆ ในสตรี เช่น ช่วยให้มดลูกเข้าอู่ แก้ปวดมดลูก แก้ประจำเดือนมาไม่ปกติ (สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนวิมลมังคลาราม, 2520; เลื่อน, 2523; สุนทรี, 2535; บุญค้ำ, ม.ป.ป.) แก้ริดสีดวงทวาร (เลื่อน, 2523; อภิชาติ, 2550; บุญค้ำ, ม.ป.ป.) เป็นต้น ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว จึงมีการใช้ว่านชักมดลูกเป็นองค์ประกอบสำคัญในยาน้ำสตรีชนิดต่าง ๆ ที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย นอกจากนี้ว่านชักมดลูกยังมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่มีฤทธิ์อ่อนกว่า ช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด เยื่อบุช่องมดลูก และช่วยเสริมสร้างความหนาแน่นของกระดูก (Piyachaturawat *et al*., 1995b, 1995c, 1998, 1999a; Suksamrarn, 2008) ต้านอนุมูลอิสระ (Niumsakul *et al*., 2007) ลดคอเลสเทอรอล กระตุ้นการหลั่งน้ำดี (Piyachaturawat *et al*., 1995a, 1999b; Suksamrarn *et al*., 1997) ลดการอักเสบ (Jantaratnotai, 2006; Sodsai, 2007) เป็นต้น ว่านชักมดลูกจึงจัดเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพสูงและน่าสนใจอีกชนิดหนึ่ง แต่เนื่องจากว่านชักมดลูกและพืชในสกุล *Curcuma* บางชนิด มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก (Apavatjrut *et al*., 1999) จึงอาจเกิดความสับสนแล้วนำพืชต่างชนิดที่คล้ายว่านชักมดลูกไปใช้ ซึ่งในบางกรณีพืชชนิดนั้นอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ ซึ่งนับเป็นปัญหาสำคัญที่ควรเร่งแก้ไข ในปัจจุบันข้อมูลทางด้านสายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูกมีอยู่น้อยมาก และยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกสายพันธุ์ว่านชักมดลูก เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกสายพันธุ์ว่านชักมดลูก โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาถือเป็นแนวทางแก้ปัญหาอีกทางหนึ่ง แต่พบว่ายังคงมีข้อกำจัด เนื่องจากว่านชักมดลูกเป็นพืชที่ออกดอกยาก ทำให้ขาดข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอก ซึ่งถือเป็นลักษณะสำคัญประการหนึ่งที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนก ด้วยเหตุผลดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้ ในปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าสามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกสิ่งมีชีวิตได้แม่นยำ มีความจำเพาะสูง รวมทั้งมีการประยุกต์ใช้กับพืชหลายชนิด (Powell *et al.*, 1996b) โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นำมาใช้ คือ เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism; AFLP) เนื่องจากเครื่องหมายนี้ได้นำเทคนิคขั้นพื้นฐานหลายเทคนิคมาประยุกต์รวมกัน ทำให้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น สามารถทำซ้ำแล้วได้ผลเช่นเดิม ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย ตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน และไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบส (สุรินทร์, 2552) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกสายพันธุ์ของว่านชักมดลูกในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี เพื่อแก้ปัญหาความสับสน และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกสายพันธุ์ของว่านชักมดลูกในประเทศไทย โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพีร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และใช้ข้อมูลดังกล่าวเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของว่านชักมดลูก

ว่านชักมดลูกเป็นสมุนไพรพื้นบ้านของประเทศไทย อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae สกุล *Curcuma* จัดเป็นไม้ล้มลุก ประเภทปีเดียว (annual herb) ออกดอกก่อนออกใบ โดยจะเริ่มออกดอกและใบช่วงต้นฤดูฝน คือประมาณปลายเดือนมีนาคม - ต้นเดือนเมษายน จากนั้นต้นก็จะเจริญเติบโตไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งช่วงฤดูหนาว หรือประมาณเดือนพฤศจิกายน - เดือนธันวาคม ต้นจะเริ่มโทรมและฟุบตัวเหลือเพียงส่วนหัวอยู่ใต้ดิน ส่วนใหญ่นิยมขุดหัวช่วงนี้มาใช้ เนื่องจากจะมีปริมาณสารสำคัญปริมาณสูง ว่านชักมดลูกสามารถเจริญเติบโตได้ในดินทุกประเภท แต่จะเจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนหรือดินร่วนปนทราย (ชมรมว่านมหาเศรษฐี, 2549; โชติอนันต์, 2550)

2. ประโยชน์และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ว่านชักมดลูกเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่ใช้หัวหรือเหง้ารักษาและบำรุงอาการต่าง ๆ ในสตรี อาจใช้ว่านชักมดลูกเพียงชนิดเดียว หรือใช้ร่วมกับสมุนไพรตัวอื่นในรูปตำหรับยาในการรักษา ว่านชักมดลูกมีสรรพคุณช่วยลดการอักเสบ อาการปวดมดลูก ปวดประจำเดือน ชักมดลูกเข้าอู่ และแก้มดลูกพิการ วิธีใช้ให้นำหัวว่านชักมดลูกมาฝานแล้วย่างไฟ จากนั้นนำไปดองเหล้ากิน (สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนวิมลมังคลาราม, 2520; เลื่อน, 2523; สุนทรี, 2535; บุญค้ำ, ม.ป.ป.) หรือจะนำว่านมาตำเป็นผงกินกับน้ำร้อน หรือผสมกับน้ำผึ้งปั้นลูกกลอน หรือกินสดช่วยรักษาโรคริดสีดวงทวารและโรคลำไส้ (เลื่อน, 2523; อภิชาติ, 2550; บุญค้ำ, ม.ป.ป.) นำหัวว่านมาโขลกกับเหล้าขาว กรองเอาแต่น้ำดื่มรักษาโรคไส้เลื่อน และกระบังลมเคลื่อนในผู้ชายได้ (สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนวิมลมังคลาราม, 2520; บุญค้ำ, ม.ป.ป.) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของว่านชักมดลูก พบว่าในหัวของว่านชักมดลูกมีสารสำคัญหลายชนิด เช่น phloracetophenone glucoside ซึ่งมีฤทธิ์ช่วยลดคอเลสเทอรอล กระตุ้นการหลั่งน้ำดี (Piyachaturawat *et al*., 1995a, 1999b; Suksamrarn *et al.*, 1997) สาร diarylheptanoids ซึ่งเป็น phytoestrogen ชนิดหนึ่งที่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่มีฤทธิ์อ่อนกว่า ช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด เยื่อบุช่องมดลูก และช่วยเสริมสร้างความหนาแน่นของกระดูก (Piyachaturawat *et al*., 1995b, 1995c, 1998, 1999a; Suksamrarn, 2008) ต้านอนุมูลอิสระ (Niumsakul, 2007) สาร 5-hydroxy-7-(4-hydroxyphenyl)-1-1 phenyl-(1*E*)-1-heptene และ 7-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-1-phenyl-(1*E*)-1-heptene ช่วยลด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การอักเสบ (Jantaratnotai, 2006; Sodsai, 2007) สาร diarylheptanoids ที่แยกได้จากสารสกัดส่วนที่มีขั้วน้อยมีฤทธิ์ฆ่าไส้เดือนตัวกลม (nematodes) (Jurgens, 1994) เป็นต้น

3. การจำแนกสายพันธุ์ว่านชักมดลูก

การจำแนกสายพันธุ์ว่านชักมดลูกเดิม สามารถแบ่งว่านชักมดลูกออกเป็น 2 ชนิด ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและที่มา ซึ่งแบ่งเป็น *Curcuma comosa* Roxb. และ *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. (เต็ม, 2544) โดยว่านชักมดลูกชนิด *Curcuma comosa* Roxb. เป็นพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย บางท้องถิ่นเรียกว่า ว่านชักมดลูกตัวเมีย ส่วนชนิด *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. เป็นชนิดที่นำเข้าจากประเทศอินโดนีเซีย บางแห่งเรียกว่า ว่านชักมดลูกตัวผู้ พืชทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก คือ เป็นพืชล้มลุก ต้นมีความสูงประมาณ 1-2 เมตร มีหัวหรือเหง้าใต้ดินขนาดใหญ่ รูปร่างค่อนข้างกลม ไม่มีแง่งยื่นออกมาด้านข้าง เนื้อในหัวมีสีเหลือง ถ้าเปรียบเทียบสีเนื้อในหัวของว่านชักมดลูกทั้ง 2 ชนิด *Curcuma comosa* Roxb. จะมีสีเหลืองอ่อนส่วน *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. จะมีสีเหลืองเข้ม มีกลิ่นฉุน *Curcuma comosa* Roxb. เส้นกลางใบมีสีเขียว ไม่พบขนที่ใต้แผ่นใบ ก้านใบยาว ดอกออกเป็นช่อแบบช่อเชิงลดแทงจากพื้นดิน เกสรตัวผู้เป็นหมันมีสีขาว ส่วน *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. เส้นกลางใบมีสีน้ำตาลอมแดง ใต้แผ่นใบมีขน ก้านใบสั้น (สนั่น และ ฉัตรชัย, 2546)

ภาณี และคณะ (2548) ได้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูกจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA) สามารถแบ่งกลุ่มว่านชักมดลูกออกเป็น 3 กลุ่ม และพบว่าว่านชักมดลูกในกลุ่มเดียวกันไม่มีความสัมพันธ์กันตามภูมิภาค และลักษณะสีแดงบริเวณเส้นกลางใบที่ใช้ในการจำแนกชนิดของว่านชักมดลูกเพียงลักษณะเดียว ไม่สามารถใช้ในการจำแนกชนิดได้ ควรใช้ลักษณะหลาย ๆ ลักษณะในการจำแนกโดยเฉพาะลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกร่วมด้วย

วิชุดา (2550) ได้พิสูจน์เอกลักษณ์และจัดทำข้อกำหนดของว่านชักมดลูก จำนวน 13 ตัวอย่าง โดยศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานร่วมกับการทดสอบองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธีรงคเลขผิวบาง (thin-layer chromatography) และฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสามารถจำแนกตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่ม โดยพบความแตกต่างของลักษณะช่อดอกและดอกย่อย ระบุได้เป็น *Curcuma comosa* Roxb. และ *Curcuma* sp. เมื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยวิธีรงคเลขผิวบาง สามารถแยกตัวอย่างออกเป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2 กลุ่มชัดเจน สอดคล้องกับการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดแอลกอฮอล์ของว่านชักมดลูก โดย *Curcuma comosa* Roxb. แสดงฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้มดลูกของหนูทดลองหนาขึ้น ส่วน *Curcuma* sp. แสดงฤทธิ์ต่อมดลูกไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ส่วนลักษณะทางสัณฐานวิทยาลักษณะอื่น ๆ มีความใกล้เคียงกันมากไม่สามารถแยกความแตกต่างได้

Soontornchainaksaeng and Jenjittikul (2010) ได้ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานและความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูก 24 ตัวอย่าง โดยใช้จำนวนโครโมโซม และ reproductive part คือ ลักษณะช่อดอก, ดอก และลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ พบว่ามีว่านชักมดลูก 3 ชนิด คือ ชนิด *Curcuma comosa* Roxb., *Curcuma elata* และ *Curcuma latifolia* โดยว่านชักมดลูกชนิด *Curcuma comosa* Roxb. จะมีก้านช่อดอกสั้น (2-5 ซม.) ไม่มีขนใต้แผ่นใบ แบ่งเป็น 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ที่มีลักษณะช่อดอกรูปทรงกระบอกแคบ มีจำนวนโครโมโซม 2n = 42 และพันธุ์ที่มีช่อดอกรูปทรงกระบอกกว้าง มีจำนวนโครโมโซม 2n = 62 และ 2n = 63 ส่วน *Curcuma elata* และ *Curcuma latifolia* มีลักษณะที่เหมือนกัน คือ มีก้านช่อดอกยาว 10-25 เซนติเมตร มีขนใต้แผ่นใบ ส่วนที่ต่างกัน คือ *Curcuma latifolia* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 63 และ 2n = 84 มีเส้นกลางใบสีแดง ส่วน *Curcuma elata* มีจำนวนโครโมโซม 2n = 63 แต่ไม่พบสีแดงที่เส้นกลางใบ

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า การจำแนกสายพันธุ์ว่านชักมดลูกยังมีข้อมูลอยู่น้อยมาก อีกทั้งข้อมูลที่ได้ยังไม่ชัดเจน จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาและจำแนกสายพันธุ์ว่านชักมดลูกให้ถูกต้องชัดเจนต่อไป เนื่องจากว่านชักมดลูกและพืชในสกุล *Curcuma* บางชนิด มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก (Apavatjrut *et al*., 1999) จึงอาจเกิดความสับสนแล้วนำพืชต่างชนิดที่คล้ายว่านชักมดลูกไปใช้ ซึ่งในบางกรณีพืชชนิดนั้นอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้

4. ลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชในสกุล *Curcuma* บางชนิด

ลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชในสกุล *Curcuma* บางชนิดที่ระบุใน Flora of British India (Hooker, 1984), Flora of Java (Backer and Bakhuizen Van Den Brink, 1968) และ Taxonomy and Phylogeny of the Genus *Curcuma* L. (Zingiberaceae) with Particular Reference to Its Occurrence in Thailand (Maknoi, 2006) เป็นดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Curcuma comosa Roxb. หัวหลัก (rootstock) มีขนาดใหญ่ เนื้อในหัวมีสีเหลืองซีด ก้านใบสีเขียว รูปร่างใบแบบขอบขนาน (oblong) ใบอ่อนมีเส้นกลางใบสีแดง ใบแก่มีเส้นกลางใบสีเขียว กลีบประดับตอนบน (coma bract) มีสีชมพู จำนวนชั้นประมาณ 2-4 ชั้น กลีบประดับตอนล่าง (flower bract) มีสีขาวแต้มสีชมพู ดอก (flower) มีสีเหลืองอยู่ภายในกลีบประดับตอนล่าง

Curcuma latifolia หัวหลักมีขนาดใหญ่ เนื้อในหัวมีสีเหลืองซีด ลำต้นสูง ก้านใบมีสีเขียว รูปร่างใบเป็นแบบขอบขนาน เส้นกลางใบมีสีแดง มีขนใต้แผ่นใบ กลีบประดับตอนบนมีสีชมพู กลีบประดับตอนล่างมีสีเขียว รูปร่างกลีบประดับตอนบนมีลักษณะรี ยาวกว่ากลีบประดับตอนล่าง ดอกมีสีเหลืองอยู่ภายในกลีบประดับตอนล่างแต่มีขนาดสั้นกว่ากลีบประดับ

Curcuma elata หัวหลักมีขนาดใหญ่ เนื้อในหัวมีสีเหลืองซีด ก้านใบมีสีเขียว รูปร่างใบเป็นแบบขอบขนาน เส้นกลางใบมีสีเขียว มีขนใต้แผ่นใบ กลีบประดับตอนบนมีสีชมพู รูปร่างแบบ ovate-oblong กลีบประดับตอนล่างมีสีเขียว ดอกมีสีเหลืองอยู่ภายในกลีบประดับตอนล่าง แต่ขนาดสั้นกว่ากลีบประดับ

Curcuma xanthorrhiza Roxb. เนื้อในหัวมีสีเหลืองเข้มหรือสีส้มเข้ม ก้านใบสั้นมีสีเขียว ใบรูปร่างแบบขอบขนาน มีขนใต้แผ่นใบ กลีบประดับตอนบนมีสีชมพู กลีบประดับตอนล่างมีสีเขียว ดอกมีสีเหลืองอยู่ภายในกลีบประดับตอนล่าง

5. เครื่องหมายที่ใช้บ่งชี้ความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรม

เครื่องหมายที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างหรือความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณและคุณภาพ อาจเป็นการจำแนกความแตกต่างระหว่างและภายในสปีชีส์ (between and within species) ระหว่างและภายในประชากร (between and within populations) หรือระหว่างแต่ละตัว (between individuals) ก็ได้ เครื่องหมายที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างมี 2 ประเภท (สุรินทร์, 2552) คือ

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker)

เป็นเครื่องหมายที่ใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยวิธีเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยาหรือทางสรีรวิทยา เป็นเครื่องหมายที่นิยมใช้ตรวจสอบความแตกต่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของสิ่งมีชีวิตเป็นอันดับแรก เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้ง่าย ไม่ต้องใช้อุปกรณ์หรือเครื่องมือเฉพาะ แต่ลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักจะขึ้นกับสภาพแวดล้อม ทำให้การตรวจสอบอาจผิดพลาดได้ จึงต้องใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น (สุรินทร์, 2552)

2. เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) สามารถแบ่งออกเป็น 2 ระดับ คือ

2.1 เครื่องหมายโปรตีน (protein marker)

การตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลโปรตีน โดยแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม หรืออาจจะตรวจสอบรูปแบบของเอนไซม์ หรือไอโซไซม์ต่าง ๆ ข้อดีของการตรวจสอบโปรตีน คือ สามารถตรวจสอบได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก แถบของโปรตีนหรือไอโซไซม์ที่ตรวจสอบได้มีการแสดงออกแบบการข่มร่วม (codominance) ช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ แต่ข้อจำกัดของเครื่องหมายนี้ คือ สามารถตรวจสอบได้เฉพาะส่วนที่มีการแสดงออกของยีนเท่านั้น จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังมีไม่มาก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม จึงต้องเลือกชนิดเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ อีกทั้งโปรตีนยังเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย ต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัดและไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้นาน นอกจากนี้การตรวจพบความแตกต่างในระดับโปรตีนยังมีค่าต่ำเมื่อเทียบกับการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2552)

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิต การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้ เนื่องจากการเกิดความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเกิดพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ ข้อได้เปรียบของเครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ โมเลกุลดีเอ็นเอนั้นมีความเสถียรมากกว่า จึงสามารถเก็บไว้ได้นาน สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใด ๆ ระยะการเจริญเติบโตหรือสภาพทางสรีรวิทยาใด ๆ ก็ได้ไม่ขึ้นกับสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้จากทั้งส่วนที่เป็นยีนและไม่ใช่ยีน ทำให้สามารถตรวจสอบได้โดยไม่มีข้อจำกัด นอกจากนี้วิธีการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอยังมีให้เลือกหลายวิธี และสามารถประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้ไม่จำกัด (สุรินทร์, 2552; Powell *et al*., 1996b)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เครื่องหมายดีเอ็นเอแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. เครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทที่ใช้วิธีไฮบริไดเซชัน เช่น เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism; RFLP) (Tankslay *et al.*, 1989; McCouch and Tankslay, 1991)

2. เครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทที่ใช้วิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เช่น เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism; AFLP) (Vos *et al.*, 1995) เครื่องหมายอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA; RAPD) (Williams *et al.*, 1990) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (simple sequence repeat; SSR) (Brown *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 1996a) เครื่องหมายเอสอาร์เอพี (sequence related amplified polymorphism; SRAP) (Li and Quiros, 2001) และเครื่องหมายทีอาร์เอพี (target region amplification polymorphism; TRAP) (Hu and Vick, 2003) เป็นต้น

เครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละชนิดมีวิธีการ หลักการ ข้อดีและข้อจำกัดแตกต่างกันออกไป รวมทั้งมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบใหม่ออกมาอีกมากมาย ดังนั้นการเลือกใช้เครื่องหมายชนิดใดจึงต้องพิจารณาจากองค์ประกอบหลาย ๆ อย่าง เช่น วัตถุประสงค์ของการศึกษา ความยากง่ายของเทคนิค ความชำนาญ เครื่องมือที่ใช้ ค่าใช้จ่าย ปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างที่มี ความน่าเชื่อถือ เป็นต้น (สุรินทร์, 2552)

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับพันธุ์ภายในชนิดเดียวกัน ควรเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีพอลิมอร์ฟิซึมสูง ซึ่งอาจจะเป็นเครื่องหมายแบบที่มีการข่มร่วมกันหรือข่มแบบสมบูรณ์ก็ได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบที่มีการข่มร่วมกัน มักจะมีพอลิมอร์ฟิซึมสูงกว่า เช่น เครื่องหมายเอสเอสอาร์ หรืออาร์เอฟแอลพี แต่ข้อจำกัดของเครื่องหมายแบบนี้ คือ สามารถตรวจสอบได้ครั้งละ 1 ตำแหน่งเท่านั้น ทำให้ต้องใช้เครื่องหมายจำนวนมากจึงจะได้ข้อมูลที่ถูกต้องน่าเชื่อถือ ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นแบบสุ่มแม้ว่าจะมีพอลิมอร์ฟิซึมต่ำ แต่สามารถตรวจได้ครั้งละหลายตำแหน่ง จึงทดแทนการที่แต่ละตำแหน่งมีพอลิมอร์ฟิซึมต่ำไปได้ นอกจากนี้การตรวจสอบที่ใช้เทคนิคพีซีอาร์ สามารถทำได้รวดเร็ว การตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์เพียงไม่กี่ชนิดก็ครอบคลุมส่วนของจีโนมได้เพียงพอ ผลที่ได้จึงถูกต้องน่าเชื่อถือ ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ถ้ามีข้อมูลไพรเมอร์ของเครื่องหมายเอสเอสอาร์ ที่พัฒนาไว้แล้วจำนวนมากพอ ก็สามารถนำมาใช้ได้เป็นอย่างดี แต่ถ้าต้องพัฒนาเครื่องหมายขึ้นใหม่ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุ่มชนิดที่ตรวจสอบได้ครั้งละหลายตำแหน่ง เช่น เครื่องหมายอาร์เอพีดี หรือเอเอฟแอลพี จะเป็นทางเลือกที่ดีกว่า (สุรินทร์, 2552) แต่เนื่องจากเครื่องหมายอาร์เอพีดีมีข้อจำกัดในเรื่องการทำซ้ำ เนื่องจากมีความไวต่อการเปลี่ยนสภาวะค่อนข้างสูง (สุรินทร์, 2552; Techaprasan *et al*., 2008) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมส่วนใหญ่จึงนิยมใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีมากกว่า ดังตัวอย่างเช่น การจำแนกสายพันธุ์ของไผ่ (รังสัน และสุจิตรา, 2547) ข่า (กฤษณา, 2548) และกระชาย (Techaprasan *et al*., 2008) เป็นต้น

6. เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism; AFLP)

พื้นฐานของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี คือ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ หลักการทำเอเอฟแอลพี สามารถแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิด เลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนด้วยเอเอฟแอลพีไพรเมอร์ และวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (สุรินทร์, 2552)

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ นิยมใช้เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส หรือที่เรียกว่า rare cutter ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส หรือที่เรียกว่า frequent cutter โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น frequent cutter จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นขนาดเล็ก ซึ่งจะเพิ่มปริมาณได้ดีในการทำพีซีอาร์ และอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับแยกด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ denaturing polyacrylamide gel ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น rare cutter มีตำแหน่งที่จะตัดดีเอ็นเอได้น้อย จึงช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจากการทำพีซีอาร์ลงได้ จากนั้นจึงเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ adapter ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด เพื่อให้เป็นที่จับของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในขั้นตอนต่อไป เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้มีหลายชนิด เช่น *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Bgl*II, *Xba*I (6-cutter) และ *Sse* 83871 (8-cutter) ร่วมกับ *Mse*I หรือ *Taq*I (4-cutter) แต่ส่วนใหญ่นิยมใช้ *Mse*I เพราะตัดดีเอ็นเอได้ขนาดพอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการแยกโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel ส่วนเอนไซม์ที่เป็น rare cutter นิยมใช้ *Eco*RI เนื่องจากมีราคาถูก สามารถตัดดีเอ็นเอได้มีประสิทธิภาพ และพบโอกาสที่ตัดดีเอ็นเอไม่สมบูรณ์น้อย

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสทางปลาย 5’ เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3’ อีกส่วนหนึ่ง เพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บางชิ้น ส่วนของไพรเมอร์ที่เหมือนกับ adapter และบริเวณจดจำของเอนไซม์ เรียกว่า common part ส่วนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' เรียก selective part จำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณลง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณได้ ต้องมีลำดับเบสที่อยู่ต่อกับตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไป ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกมากขึ้น จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณได้ก็จะลดลง โดยปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จะเหลือเพียง 1 ใน 4 ของชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 2 เบส จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้จะลดลงเหลือ $(1/4)^2$ หรือ 1 ใน 16 ของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ทั้งหมด ดังนั้น จึงสามารถควบคุมให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในจำนวนที่เหมาะสมได้ โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปแต่ละเบสจะลดปริมาณชิ้นดีเอ็นเอลงเหลือ $(1/4)^n$ ของชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด (n คือ จำนวนเบสคัดเลือกที่เพิ่มเข้าไป) การทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3' มากกว่า 2 เบส จะต้องทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่า preselective amplification ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification ซึ่งการทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้งจะช่วยให้การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของไพรเมอร์เป็นไปอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงสุด

การวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ใน denaturing polyacrylamide gel จะทำให้ได้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอในช่วง 50-100 แถบ การตรวจสอบดีเอ็นเอทำได้ 2 วิธี คือ วิธีที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี แล้วติดตามโดยการทำออโตเรดิโอกราฟ หรือติดฉลากด้วยสารเรืองแสง แล้วติดตามโดยเครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ วิธีที่สองคือ การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท หรือการไฮบริไดเซชันโดยใช้โพรบที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำเอเอฟแอลพีมีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใด ๆ ก็ได้ ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม แม้ว่าวิธีการทำเอเอฟแอลพีจะค่อนข้างยุ่งยาก แต่ผลที่ได้สามารถทำซ้ำ และให้ผลคงเดิม (reproducible) สามารถเลือกคู่ผสมของไพรเมอร์ได้หลายแบบ ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์คู่หนึ่งนั้นจะเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างหรือพอลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้น มาจากการเปลี่ยนแปลงเบส (point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไป หรือเกิดขึ้นใหม่ หรือการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตรงส่วนที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกของไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวแล้วแต่กรณี หรืออาจเกิดจากการมีชิ้นดีเอ็นเอสั้น ๆ ขาดหายไป หรือสอดแทรกเข้ามาในระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ก็ได้ ผลที่เกิดขึ้น คือ การมีแถบดีเอ็นเอ หรือ ไม่มีแถบดีเอ็นเอที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตำแหน่งนั้น ๆ หรือชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเปลี่ยนไป การถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากการทำเอเอฟแอลพี จึงมีทั้งแบบที่แสดงลักษณะข่ม (dominance) โดยปรากฏเป็นการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ และแบบที่แสดงลักษณะข่มร่วมกัน (codominance) โดยปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยทั่วไปจะพบเครื่องหมายเอเอฟแอลพีแบบที่เป็นลักษณะข่มมากกว่า ข้อดีของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี คือ ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษามาก่อน และด้วยประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์จึงทำให้การศึกษาทำได้รวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย นอกจากนี้ ในการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่ง ๆ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (multilocus) พร้อมกัน ในหนึ่งปฏิกิริยาจะให้แถบดีเอ็นเอมากกว่าเครื่องหมายอาร์เอพีดีประมาณ 4 เท่า ทำให้เกิดพอลิมอร์ฟิซึมจำนวนมาก จึงสามารถใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง หรือศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตได้อย่างละเอียด (สุรินทร์, 2552)

จากที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่า เครื่องหมายเอเอฟแอลพีเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพมาก จึงนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ หรือใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตเพื่อบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง รวมถึงนำไปจำแนกสายพันธุ์พืชได้ด้วย

7. การจัดกลุ่มตามความหลากหลายทางพันธุกรรม

การจัดกลุ่มมีหลายชนิด ในที่นี้จะกล่าวถึงการจัดกลุ่ม 2 แบบใหญ่ ๆ คือ

7.1 การจัดกลุ่มตัวแปร

เป็นการจัดกลุ่มตัวแปรหลาย ๆ ตัวที่มีความสัมพันธ์ออกเป็นกลุ่มย่อย ๆ โดยตัวแปรที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันจะต้องมีส่วนร่วมกันหรือสัมพันธ์กัน เช่น การวิเคราะห์ principal coordinates analysis (PCoA)

PCoA เป็นเทคนิคการลดจำนวนตัวแปรเทคนิคหนึ่ง โดยการสร้างเซตของตัวแปรใหม่ให้เป็นฟังก์ชันเชิงเส้นของตัวแปรเดิม และเซตของตัวแปรใหม่จะรวมค่าความแปรปรวนของตัวแปรเดิมไว้ให้มากที่สุด โดยจำนวนตัวแปรใหม่จะต้องไม่เกินจำนวนตัวแปรเดิม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตัวประกอบหลักที่ 1 เป็นฟังก์ชันเชิงเส้นของตัวแปรเดิมทั้งหมด และจะดึงค่าความแปรปรวนจากตัวแปรทั้งหมดมาไว้ในตัวประกอบหลักที่ 1 ให้มากที่สุด จึงทำให้ตัวประกอบหลักที่ 1 มีค่าความแปรปรวนมากที่สุด เมื่อเทียบกับตัวประกอบหลักอื่น ๆ ที่เหลือ (ตัวประกอบหลักที่ 2, 3, 4, …) โดยที่ความแปรปรวนของตัวประกอบหลักจะลดลงเรื่อย ๆ จนทำให้ค่าความแปรปรวนของตัวประกอบหลักต่ำสุด และไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างตัวประกอบหลักต่าง ๆ

ค่าความแปรปรวนจะบอกถึงการกระจายตัวของตัวแปร โดยค่าความแปรปรวนที่สูงจะสามารถจัดกลุ่มตัวแปรได้ดีกว่า ค่าความแปรปรวนที่มีค่าน้อย

7.2 การจัดกลุ่มข้อมูล

เป็นเทคนิคที่ใช้แบ่งกลุ่มข้อมูลที่เหมือนกันหรือคล้ายกันไว้ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนข้อมูลที่ต่างกันจะถูกจัดให้อยู่คนละกลุ่ม การศึกษาความเหมือนหรือความต่าง พิจารณาจากตัวแปรที่ใช้ในการแบ่งกลุ่ม เช่น การวิเคราะห์กลุ่ม (cluster analysis)

การวิเคราะห์กลุ่ม เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ทางสถิติวิธีหนึ่ง หลักการคือ การจัดสิ่งที่เหมือนกัน หรือแตกต่างกันน้อยให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ดังนั้นตัวอย่างคู่หนึ่ง ๆ ที่ต้องการตรวจสอบหากอยู่ภายในกลุ่มเดียวกันจะมีความเหมือนกันมากกว่าตัวอย่างที่อยู่นอกกลุ่ม การตรวจสอบว่าตัวอย่างคู่หนึ่ง ๆ จะเหมือนหรือแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด จะพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ ซึ่งเป็นไปได้ 2 แบบ คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนหรือความคล้าย (similarity coefficient) เป็นการพิจารณาความเหมือนกันของตัวอย่าง ส่วนอีกแบบ คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง (dissimilarity coefficient) หรือความห่าง (distance) ซึ่งเป็นการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง

8. การวัดค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนและความต่างทางพันธุกรรม

การวัดค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนและความต่างทางพันธุกรรมจะขึ้นอยู่กับชนิดข้อมูล ข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์สามารถแยกออกเป็น 3 ประเภท (Anonymous, 2003) คือ

1. ข้อมูลไบนารี (binary data) เป็นข้อมูลที่เกิดได้ 2 ลักษณะ คือ “มี” หรือ “ไม่มี” เช่น ข้อมูลจากเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่าง ๆ ข้อมูลประเภทนี้นิยมใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนในการวัด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ข้อมูลเชิงคุณภาพ (qualitative data) เป็นข้อมูลที่เกี่ยวกับลักษณะคุณภาพ เช่น รูปร่างกลีบดอก สีเมล็ด เป็นต้น ข้อมูลประเภทนี้บันทึกข้อมูลแบบมาตรวัดอันตรภาคชั้น (intetval data) ข้อมูลประเภทนี้ใช้ได้ทั้งค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนและความต่างในการวัด

3. ข้อมูลเชิงปริมาณ (quantitative data) เป็นข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สามารถชั่ง ตวง วัด เช่น ผลผลิต ความสูง เป็นต้น ข้อมูลประเภทนี้จะมีหน่วยวัดที่แตกต่างกัน ทำให้การจัดกลุ่มจะต้องมีการแปลงข้อมูลที่มีหน่วยวัดที่ไม่เท่ากันให้มีหน่วยวัดเท่ากัน โดยแปลงเป็นข้อมูลมาตรฐาน ก่อนนำไปวิเคราะห์จัดกลุ่ม ข้อมูลประเภทนี้นิยมใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความต่างในการวัด

การวัดค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนหรือความต่างระหว่างตัวแปร สามารถทำได้หลายวิธี มีสูตรที่ใช้ในการคำนวณแตกต่างกันไปในที่นี้จะขอกล่าวเฉพาะวิธีการหาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนหรือความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเท่านั้น

วิธีการวัดความเหมือนหรือความคล้ายในลักษณะข้อมูลไบนารี โดยยึดหลักการ “มี” หรือ “ไม่มี” สามารถจำแนกเหตุการณ์ได้เป็น 4 แบบ จากตารางสองทิศทาง

		ตัวแปรที่ 1 (i)	
		มี	ไม่มี
ตัวแปรที่ 2 (j)	มี	a	b
	ไม่มี	c	d

ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนหรือความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม มีวิธีคำนวณหลายวิธี (Anonymous, 2003) ดังนี้

1. Simple matching coefficient (Sokal and Michener, 1958) เป็นการคำนวณโดยพิจารณาการนับแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏในตำแหน่งที่เป็นโฮโมไซกัส ซึ่งสามารถใช้ได้กับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด dominant เพราะลักษณะการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเครื่องหมายนั้น ๆ เป็นลักษณะจีโนไทป์ แบบ homozygous recessive

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$\text{Simple matching coefficient (SM)} = \frac{(a + d)}{(a + b + c + d)}$$

2. Jaccard coefficient (Jaccard, 1908) เป็นการคำนวณโดยพิจารณาการนับเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ส่วนที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอไม่นับ ให้เป็นข้อมูลสูญหาย เพราะถ้าข้อมูลของแถบดีเอ็นเอเกิด false-positive หรือ false-negative จะทำให้การประเมินค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง การคำนวณด้วยวิธีนี้สามารถใช้ได้กับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด codominant หรือใช้กับข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตชนิดโพลีพลอยด์

$$\text{Jaccard coefficient (J)} = \frac{a}{(a + b + c)}$$

3. Nei-Li coefficient (Nei and Li, 1979) หรือ Dice coefficient (Dice, 1945) เป็นการคำนวณโดยพิจารณาการนับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ โดยให้น้ำหนักของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมากกว่าแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏ การคำนวณด้วยวิธีนี้สามารถใช้ได้กับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด codominant และ dominant

$$\text{Nei-Li coefficient หรือ Dice coefficient} = \frac{2a}{(2a + b + c)}$$

การเลือกค่าสัมประสิทธิ์เพื่อวิเคราะห์ค่าความเหมือน ผลลัพธ์ที่ได้ก็จะแตกต่างกันขึ้นกับสูตรที่เลือกใช้ เนื่องจากการพิจารณาแต่ละค่าสัมประสิทธิ์จะให้น้ำหนักกับการปรากฏแถบดีเอ็นเอและการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกใช้ค่าสัมประสิทธิ์ในการจัดกลุ่มจึงมีความสำคัญต่อรูปแบบของแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree)

เมื่อคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนหรือความคล้ายคลึงระหว่างตัวแปรแล้ว จำเป็นต้องจัดตัวแปรเข้ากลุ่มซึ่งมีหลายวิธีแต่ในที่นี้จะกล่าวเฉพาะวิธีที่นิยมใช้ คือ agglomerative method ซึ่งเป็นวิธีการจัดกลุ่มโดยเริ่มด้วยการถือว่า 1 หน่วยเป็น 1 กลุ่ม ถ้ามี n หน่วย ก็จะมี n กลุ่ม จากนั้นพิจารณาว่าจะรวมหน่วยคู่ใดเข้าด้วยกัน โดยพิจารณาจากความเหมือนหรือความต่าง ถ้าเป็นความเหมือนก็จะรวมหน่วยคู่ที่มีความเหมือนมากที่สุดไว้ด้วยกัน แต่ถ้าใช้ความต่างก็จะรวมหน่วยคู่ที่มี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความต่างกันน้อยที่สุดไว้ในกลุ่มเดียวกัน หลังจากนั้นเลือกวิธีการรวมกลุ่มซึ่งมีหลายวิธี ทำการรวมกลุ่มต่าง ๆ เข้าด้วยกัน จนกระทั่งเหลือเพียง 1 กลุ่ม (ทุกหน่วยอยู่ในกลุ่มเดียวกัน)

ตัวอย่างวิธีการรวมกลุ่มแบบขั้นตอนของ agglomerative method (Anonymous, 2003)

1. nearest neighbor หรือ simple linkage เป็นการนำเอาตัวแปรที่มีความต่างกันน้อยที่สุดมาเข้าเป็นกลุ่มก่อน และความต่างระหว่างกลุ่มตัวแปรใช้ค่าที่ต่างกันน้อยที่สุดมาเป็นตัวแทนเปรียบเทียบกับความต่างระหว่างคู่ของตัวแปรอื่น ๆ ที่ยังไม่ได้จัดเข้ากลุ่ม ในทุกขั้นตอนความต่างระหว่างกลุ่มสองกลุ่ม คือ ความต่างระหว่างจุดสองจุดที่ใกล้กันที่สุด

2. between groups linkage หรือเรียกว่าวิธี average linkage between groups หรือ UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic average) เป็นวิธีการสร้างกลุ่มตัวแปร โดยการหาความต่างระหว่างกลุ่มตัวแปรที่ได้จากค่าเฉลี่ยของความต่างระหว่างกลุ่มตัวแปรทุกคู่ของตัวแปร วิธีการนี้ใช้ข้อมูลจากทุกตัวแปรภายในกลุ่ม

3. farthest neighbor หรือ complete linkage เป็นวิธีวัดตัวแปรที่ต่างกันน้อยที่สุดเข้ากลุ่มก่อน ขั้นต่อไปหาตัวแทนของความต่างระหว่างกลุ่มตัวแปรที่มีค่าต่างกันมากที่สุด เมื่อได้ตัวแทนแล้วก็นำไปเปรียบเทียบกับความต่างระหว่างตัวแปร ค่าที่มีความต่างกันน้อยที่สุดนำมาจัดกลุ่มใหม่ต่อไป ดังนั้น ความต่างระหว่างกลุ่มสองกลุ่ม คือ ความต่างโดยเฉลี่ยระหว่างคู่ทุกคู่ที่เป็นไปได้ของหน่วยที่ก่อให้เกิดกลุ่ม

9. การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree)

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม มีวิธีหลัก 2 วิธี คือ วิธีที่อาศัยลักษณะที่แตกต่างกัน (character base method) กับวิธีที่อาศัยระยะความห่างไกลกัน (distance base method) (สุรินทร์, 2552)

1. character-base method เป็นการสร้างแผนภูมิโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือลำดับกรดอะมิโน มี 2 วิธี คือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1 maximum parsimony เป็นการเปรียบเทียบและหา tree ที่สั้นที่สุด นั่นคือ จำนวน mutation เกิดขึ้นน้อยที่สุดในบรรดากลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา ซึ่งต่างจากวิธี distance base method คือ จะทำการพิจารณาจากข้อมูลทุกค่าร่วมกันเพื่อค้นหา evolution tree ที่สั้นที่สุด วิธี maximum parsimony จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสำหรับข้อมูลที่เกี่ยวกับวิวัฒนาการ เช่น ข้อมูลลักษณะที่ถ่ายทอดจากบรรพบุรุษ ข้อมูลที่เป็นลำดับเบส

1.2 maximum likelihood เป็นการคำนวณหาความน่าจะเป็นหรือโอกาสที่ตัวอย่างหรือข้อมูลนั้นจะอยู่ในกลุ่มที่ i, i = 1,2,3,…k กลุ่ม แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน ซึ่งก็คือการหาค่าความน่าจะเป็นที่ตัวอย่างจะอยู่ในกลุ่ม i เช่น ถ้ามี 2 กลุ่ม ค่าความน่าจะเป็นของตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 มากกว่าค่าความน่าจะเป็นของตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 ก็จะจัดตัวอย่างนั้นอยู่ในกลุ่มที่ 1

2. distance-base method เป็นวิธีการคำนวณหาค่าความเหมือน หรือค่าความต่างของตัวอย่างแต่ละคู่ที่ทำการศึกษาไปยังค่ากลางของกลุ่ม (group centroid) จากนั้นนำมาวิเคราะห์การจัดกลุ่ม โดยเริ่มจากคู่ที่มีค่าความเหมือนสูงที่สุด หรือมีค่าความต่างต่ำที่สุด ผลลัพธ์จะได้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมออกมา

แผนภูมิทางพันธุกรรม นิยมใช้ศึกษา 2 ทาง (จินตนา, 2549) คือ

1. cladistic เป็นการศึกษาที่เน้นความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ มีการอ้างถึงบรรพบุรุษร่วม (ancestor) ซึ่งการแสดงความสัมพันธ์ เรียกว่า cladogram ที่เป็น tree ที่สั้นที่สุด คือ ภาพแสดงความสัมพันธ์ที่มีวิวัฒนาการหรือการกลายพันธุ์ของลักษณะนั้นน้อยที่สุด วิธีการจัดกลุ่มที่ใช้ในการวิเคราะห์แบบนี้ คือ maximum parsimony และ maximum likelihood ข้อมูลที่นำมาใช้ในการจัดกลุ่มจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา หรือข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ

2. similarity / distance เป็นการประเมินความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยค่าสหสัมพันธ์ (correlation) และความน่าจะเป็นในการจัดกลุ่ม โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ distance base method ที่จะคำนวณความเหมือน หรือความต่างของตัวอย่างที่ศึกษา แล้วนำค่าที่ได้นั้นมาจัดกลุ่ม โดยตัวอย่างที่คล้ายกันมากที่สุดจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนตัวอย่างที่คล้ายกันน้อยหรือมีความต่างมากจะถูกจัดแยกกลุ่มออกไป โดยไม่สามารถอ้างอิงถึงบรรพบุรุษได้ ลักษณะที่ใช้ในการจัดกลุ่มสามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลลักษณะการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่าง ๆ การแสดงความสัมพันธ์ของตัวอย่างที่ได้จากการจัด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลุ่ม สามารถแสดงผ่านทางแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยบ่งบอกถึงระดับความเหมือนหรือความต่างกันของแต่ละตัวอย่าง

10. ค่าที่ใช้ตรวจสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

1. ค่า cophenetic correlation coefficient (r) เป็นค่าที่บ่งถึงว่าการจัดกลุ่มที่ได้ มีความเหมาะสม และถูกต้องมากน้อยเพียงใด โดยพิจารณาที่ค่า r ถ้ามีค่าสูงแสดงว่าการจัดกลุ่มมีความถูกต้องมาก (Sokal and Rohlf, 1994) โดยค่า r ที่ต่ำกว่า 0.7 ถือว่าการจัดกลุ่มนั้นไม่ดี ค่าระหว่าง 0.7-0.8 ถือเป็นการจัดกลุ่มได้ปานกลาง ค่าระหว่าง 0.8-0.9 ถือเป็นการจัดกลุ่มที่ดี และค่าตั้งแต่ 0.9 ขึ้นไป ถือเป็นการจัดกลุ่มที่ดีมาก (Sirithunya *et al*., 2001)

2. ค่า bootstrap เป็นการทดสอบความเชื่อมั่นของแผนภูมิทางพันธุกรรมที่ได้ โดยวิธีการสุ่มข้อมูลซ้ำ (resampling) จากข้อมูลเริ่มต้นหลาย ๆ ครั้ง การสุ่มอาจมีการตัดข้อมูลบางส่วนออก และข้อมูลที่เหลือบางส่วนอาจนำมาพิจารณามากกว่า 1 ครั้ง โดยค่า bootstrap จะบอกค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของโอกาสที่จะสร้างแผนภูมิขึ้นใหม่ได้เหมือนเดิมเท่าไร ถ้าค่าที่ได้มีค่าสูง (80-100 %) แสดงว่าการจัดกลุ่มที่ได้มีความน่าเชื่อถือ หรือมีความเป็นไปได้มาก ถ้าค่าที่ได้ต่ำ (น้อยกว่า 50 %) แสดงว่าการจัดกลุ่มที่รวมอยู่ในกลุ่มนั้นอาจยังไม่ถูกต้อง หรือข้อมูลไม่เพียงพอ ควรศึกษาเพิ่มเติม หรือหาข้อมูลอื่นประกอบ (สุรินทร์, 2552)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างว่านชักมดลูก

รวบรวมตัวอย่างว่านชักมดลูกจำนวน 90 ตัวอย่าง และพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma* ที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูก จำนวน 5 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) โดยรวบรวมจากแหล่งปลูก และแหล่งขายต่าง ๆ 38 จังหวัด ครอบคลุมทุกภูมิภาคของประเทศไทย จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวปลูกที่แปลงรวบรวมพันธุกรรม ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จ.นครราชสีมา เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและใช้ใบอ่อนสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

ตารางที่ 1 ตัวอย่างว่านชักมดลูกและพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma* ที่ใช้ในการศึกษา

หมายเลข	แหล่งที่มา	หมายเลข	แหล่งที่มา	หมายเลข	แหล่งที่มา
1	พิษณุโลก	18	เพชรบูรณ์	35	หนองคาย
2	พิจิตร	19	หนองคาย	36	เพชรบูรณ์
3	ลำปาง	20	มหาสารคาม	37	นครปฐม
4	นครนายก	21	หนองคาย	38	สุรินทร์
5	พิจิตร	22	มหาสารคาม	39*	พิษณุโลก
6	พิษณุโลก	23	กำแพงเพชร	40	มหาสารคาม
7	พระนครศรีอยุธยา	24	ราชบุรี	41	เพชรบูรณ์
8	มหาสารคาม	25	ราชบุรี	42	เพชรบูรณ์
9	พิจิตร	26	กำแพงเพชร	43	อำนาจเจริญ
10	พิษณุโลก	27	กำแพงเพชร	44	กระบี่
11	ประจวบคีรีขันธ์	28	ลพบุรี	45	สุรินทร์
12	พะเยา	29	นครสวรรค์	46	บุรีรัมย์
13	สงขลา	30	นครพนม	47	เพชรบูรณ์
14	unknown	31	ปราจีนบุรี	48*	ปราจีนบุรี
15	หนองคาย	32	ฉะเชิงเทรา	49*	ปราจีนบุรี
16	มหาสารคาม	33	เชียงใหม่	50	นครปฐม
17	พระนครศรีอยุธยา	34	หนองคาย	51	กาญจนบุรี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

หมายเลข	แหล่งที่มา	หมายเลข	แหล่งที่มา	หมายเลข	แหล่งที่มา
52	จันทบุรี	67	นครสวรรค์	82	มุกดาหาร
53	เลย	68	พะเยา	83	อำนาจเจริญ
54	กาญจนบุรี	69	บุรีรัมย์	84	กำแพงเพชร
55	สุรินทร์	70	นครพนม	85	ศรีสะเกษ
56**	นครสวรรค์	71	ลพบุรี	86	เชียงราย
57	ชัยนาท	72	อุบลราชธานี	87	เพชรบูรณ์
58	ฉะเชิงเทรา	73	นครศรีธรรมราช	88	ระยอง
59*	สุรินทร์	74	เชียงใหม่	89	ปราจีนบุรี
60	สระแก้ว	75	มุกดาหาร	90	เชียงใหม่
61	สงขลา	76	unknown	91	ลพบุรี
62	ปราจีนบุรี	77	unknown	92	น่าน
63	ระยอง	78	สุราษฎร์ธานี	93	ชลบุรี
64	เชียงใหม่	79	นครพนม	94	สระแก้ว
65	นครสวรรค์	80	กาญจนบุรี	95	พระนครศรีอยุธยา
66	ชลบุรี	81	พระนครศรีอยุธยา		

หมายเหตุ * พืชชนิดอื่นที่อยู่ในสกุล *Curcuma* ที่คล้ายว่านชักมดลูก

** ว่านหัวใหญ่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การปลูกตัวอย่างที่แปลงรวบรวมพันธุกรรม

นำว่านชักมดลูกและพืชชนิดอื่นที่อยู่ในสกุล *Curcuma* ที่คล้ายว่านชักมดลูก ที่รวบรวมได้มาปลูกในแปลงรวบรวมเชื้อพันธุกรรม ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จ.นครราชสีมา โดยใช้ระยะปลูกระหว่างต้น 75 เซนติเมตร และระหว่างแถว 75 เซนติเมตร ก่อนปลูกรองก้นหลุมด้วยปุ๋ยมูลไก่ 250 กรัมต่อหลุม ให้น้ำสม่ำเสมอ

2. การเก็บใบอ่อนของตัวอย่างเพื่อใช้สกัดดีเอ็นเอและวิธีสกัดดีเอ็นเอ

2.1 การเก็บใบอ่อนของตัวอย่างเพื่อใช้สกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างใบอ่อนที่มีลักษณะม้วนงอ (ภาพที่ 1) ของว่านชักมดลูกและพืชชนิดอื่นที่อยู่ในสกุล *Curcuma* ที่คล้ายว่านชักมดลูก มาสกัดดีเอ็นเอ เนื่องจากมีปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอสูง ทำการตัดใบดังกล่าวใส่ในถุงพลาสติกมัดปากถุงให้แน่นสนิทแช่ในน้ำแข็งทันที แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอ

ภาพที่ 1 ใบอ่อนของตัวอย่างที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนของตัวอย่างที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีที่ประยุกต์จาก Agrawal *et al.* (1992) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.2.1 นำใบอ่อนของตัวอย่างมาล้างทำความสะอาด แล้วซับให้แห้ง

2.2.2 เตรียม DNA extraction buffer (1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5M EDTA pH 8.0, NaCl 65.44 g, CTAB 166 g) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

2.2.3 นำใบอ่อนของตัวอย่างตัดเฉพาะส่วนใบไม่เอาส่วนที่เป็นเส้นกลางใบ ใส่ลงในโกร่งที่เย็น เติมไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ให้ท่วมแล้วบดตัวอย่างให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง ปล่อยให้ไนโตรเจนเหลวระเหยไปจนหมด แล้วจึงถ่ายผงใบลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มี DNA extraction buffer อยู่ ผสมให้เข้ากัน

2.2.4 นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 60 นาที คอยพลิกหลอดไปมาทุก ๆ 10 นาที

2.2.5 นำมาตั้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม chloroform : isoamylalcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบา ๆ ให้เข้ากัน

2.2.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที (rpm) 10 นาที

2.2.7 ดูดสารละลายใสด้านบนใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรที่ได้ พลิกหลอดไปมาเบา ๆ จะเริ่มเห็นสายดีเอ็นเอปรากฏขึ้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 30 นาที

2.2.8 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที

2.2.9 เทสารละลายทิ้งเติม washing buffer (absolute ethanol, 10 mM NaOAc) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

2.2.10 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที

2.2.11 เทสารละลายทิ้ง ระวังตะกอนดีเอ็นเอหลุด เติม 70 % ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตรลงไปเพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ

2.2.12 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที

2.2.13 เทสารละลายทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง

2.2.14 เติม RNase buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 15 mM NaCl) ลงไปปริมาตร 500 ไมโครลิตร ละลายตะกอนให้หมด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.15 เติม RNase-A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ลงไป 8 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2.2.16 เติม phenol : chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบา ๆ

2.2.17 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 10 นาที

2.2.18 ดูดสารละลายใสด้านบนใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม chloroform : isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรที่ได้ พลิกหลอดไปมาเบา ๆ

2.2.19 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 10 นาที

2.2.20 ดูดสารละลายใสด้านบนใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม 3M NaOAc ปริมาตร 1/10 เท่า และ absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรที่ได้ลงไป พลิกหลอดไปมาเบา ๆ จะเห็นสายดีเอ็นเอปรากฏขึ้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 30 นาที

2.2.21 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที

2.2.22 เทสารละลายทิ้ง ระวังตะกอนดีเอ็นเอหลุด เติม 70 % ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตรลงไป เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ

2.2.23 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที

2.2.24 เทสารละลายทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง

2.2.25 ละลายตะกอนด้วย TE buffer (1 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

3. การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 % และวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้สเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (spectrophotometer) โดยมีขั้นตอนดังนี้

3.1 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

3.1.1 เตรียมเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 % โดยใช้ผงอะกาโรส 0.8 กรัม ใน 1x TAE buffer (1x TAE : Tris Base 4.84 g, glacial acetic acid 1.142 ml, 0.5M EDTA pH 8.0 2 ml) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1.2 นำไปละลายด้วยเตาไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวจนกระทั่งผงอะกาโรส ละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60 องศาเซลเซียส (ทดสอบได้โดยใช้ท้องแขนแตะที่ขวดเจล ถ้าสามารถทนความร้อนได้แสดงว่าเจลใช้ได้แล้ว)

3.1.3 เทเจลลงในถาดเจลที่เสียบหวี (comb) ลงไปตรงตำแหน่งที่ทำให้เกิดร่องสำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ เทให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ

3.1.4 ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อย ๆ ดึงหวีออก

3.1.5 ย้ายเจลใส่ลงใน chamber สำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยให้ด้านที่มีช่องหวีอยู่ด้านขั้วลบ แล้วเท 0.5x TAE buffer ลงจนท่วมเจล

3.1.6 ผสมสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างกับโหลดดิงบัฟเฟอร์ (6x loading buffer : 0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol) ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1

3.1.7 หยอดตัวอย่างลงในช่องหวีปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานไว้ที่ช่องแรกของเจล

3.1.8 ปิดฝาเครื่องแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนไปพอประมาณ (15 นาที) โดยสังเกตจากการเคลื่อนที่ของโหลดดิงบัฟเฟอร์ (loading buffer) ได้ระยะทางที่เหมาะสม

3.1.9 ปิดเครื่อง นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 10 นาที

3.1.10 ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกด้วยน้ำสะอาดประมาณ 5 นาที นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพด้วยเครื่อง gel documentation system

3.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้สเปกโทรโฟโทมิเตอร์

3.2.1 ดูดสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อลงไป 147 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.2.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์

3.2.3 คำนวณความเข้มข้นของ DNA ดังนี้

OD_{260} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (Abs 260) x 50 (dilution factor)

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (μg/ml) = OD_{260} x 50

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2.4 ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ โดยดูค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 กับ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) ถ้ามีค่าประมาณ 1.8 แสดงว่า สารละลายดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ถ้ามีค่ามากกว่า แสดงว่า อาจมีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน และถ้าต่ำกว่า แสดงว่า มีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอล (สุรินทร์, 2552)

3.2.5 ปรับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วย TE buffer

4. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี

4.1 การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อกับ adapter

4.1.1 นำสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตรใส่ในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร

4.1.2 เติมสารต่าง ๆ แล้วผสมให้เข้ากัน ดังนี้

10x reaction buffer	5	ไมโครลิตร
100x BSA	0.25	ไมโครลิตร
เอนไซม์ *Eco*RI (20 U/µl)	0.125	ไมโครลิตร
เอนไซม์ *Mse*I (10 U/µl)	0.25	ไมโครลิตร
*Eco*RI adapter (5 pmole/µl) (ตารางที่ 2)	4	ไมโครลิตร
*Mse*I adapter (12.5 pmole/µl) (ตารางที่ 2)	4	ไมโครลิตร
10x T4 DNA ligase buffer	5	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (1 U/µl)	1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	25.375	ไมโครลิตร

ปริมาตรสารละลายรวม 50 ไมโครลิตร

4.1.3 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter

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

4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

4.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จะทำ 2 ครั้ง ครั้งแรก เรียกว่า preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบส 1 เบสที่ปลาย 3' คือ E-A และ M-C (ตารางที่ 3) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.2.1.1 นำสารละลายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ adapter เรียบร้อยแล้วปริมาตร 2 ไมโครลิตร

4.2.1.2 เติมสารต่าง ๆ ดังนี้

*Eco*RI primer +1 (E-A) (5 pmole/μl)	1	ไมโครลิตร
*Mse*I primer +1 (M-C) (5 pmole/μl)	1	ไมโครลิตร
dNTP mix (2 mM)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2.5	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (50 mM)	0.75	ไมโครลิตร
Taq polymerase (5 U/μl)	0.1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	15.15	ไมโครลิตร

ปริมาตรสารละลายรวม 25 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2.1.3 ผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้โปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1	อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	เวลา	30	วินาที	25 รอบ
ขั้นที่ 2	อุณหภูมิ	56	องศาเซลเซียส	เวลา	60	วินาที	
ขั้นที่ 3	อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	เวลา	60	วินาที	

4.2.1.4 แบ่งสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 % โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับสี 6x loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อตรวจสอบว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะและต่อด้วย adapter สมบูรณ์แล้ว โดยเมื่อย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์จะพบรอยยาว (smear) ขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส

4.2.1.5 เจือจางสารละลายดีเอ็นเอที่เหลือ 20 เท่า ใน TE buffer

4.2.2 นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification โดยใช้ไพร์เมอร์ที่เพิ่มเบสอีก 2 เบสที่ปลาย 3’ คือ E-ANN และ M-CNN (ตารางที่ 3) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.2.2.1 นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

4.2.2.2 เติมสารต่าง ๆ ดังนี้

*Eco*RI primer +3 (E-ANN) (5 pmole/µl)	1	ไมโครลิตร
*Mse*I primer +3 (M-CNN) (5 pmole/µl)	1	ไมโครลิตร
dNTP mix (2 mM)	2	ไมโครลิตร
10x PCR buffer	2	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (50 mM)	0.6	ไมโครลิตร
Taq polymerase (5 U/µl)	0.1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	8.3	ไมโครลิตร
ปริมาตรสารละลายรวม	20	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2.2.3 ผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้โปรแกรม touch down ดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 60 วินาที	1 รอบ

ลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 60 วินาที	23 รอบ

4.2.2.4 นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบผล โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 % ก่อนนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในโพลีอะคริลาไมด์เจล ความเข้มข้น 6 % ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สัญลักษณ์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
primer E-A	5’-GACTGCGTACCAATTCA-3’
primer M-C	5’-GATGAGTCCTGAGTAAC-3’
primer E-ANN	
E-AAC	5’-GACTGCGTACCAATTCAAC-3’
E-AAG	5’-GACTGCGTACCAATTCAAG-3’
E-ACA	5’-GACTGCGTACCAATTCACA-3’
E-ACT	5’-GACTGCGTACCAATTCACT-3’
E-ACC	5’-GACTGCGTACCAATTCACC-3’
E-ACG	5’-GACTGCGTACCAATTCACG-3’
E-AGC	5’-GACTGCGTACCAATTCAGC-3’
E-AGG	5’-GACTGCGTACCAATTCAGG-3’
primer M-CNN	
M-CAA	5’-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3’
M-CAC	5’-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3’
M-CAG	5’-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3’
M-CAT	5’-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3’
M-CTA	5’-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3’
M-CTC	5’-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3’
M-CTG	5’-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3’
M-CTT	5’-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3’

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel

4.3.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทโพลีอะคริลาไมด์เจล

4.3.1.1 นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 % ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น

4.3.1.2 เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1.5 ไมโครลิตร, glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และเอทานอล 496 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก

4.3.1.3 เช็ดกระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหูกระต่ายด้วย repel silane เพื่อไม่ให้เจลติดกระจก

4.3.1.4 ปล่อยให้กระจกทั้งสองแผ่นแห้งประมาณ 5-10 นาที

4.3.1.5 นำกระจกทั้งสองแผ่นมาประกอบเข้าชุดโดยวาง spacer ขนาด 0.35 - 0.40 มิลลิเมตร ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทา bind silane และ repel silane เข้าหากันแล้วใช้คลิปหนีบ

4.3.2 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 6 %

4.3.2.1 ชั่งยูเรีย 6.75 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร

4.3.2.2 เติม 5x TBE (89 mM Tris-borate, 2.5 mM EDTA) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 4.5 มิลลิลิตร

4.3.2.3 นำไปอุ่นไฟอ่อน ๆ ให้ยูเรียละลายจนหมด

4.3.2.4 นำบีกเกอร์มาแช่น้ำให้อุณหภูมิลดลงเท่าอุณหภูมิห้อง

4.3.2.5 เติม 40 % acrylamide (19 : 1) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร 10 % APS ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 7 ไมโครลิตร

4.3.2.6 เขย่าให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เทเจลใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกจนเต็มระวังอย่าให้มีฟองอากาศ แล้วใส่หวีลงด้านบน ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3.3 การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

4.3.3.1 นำกระจกที่เจลแข็งตัวดีแล้วมาล้างทำความสะอาดกระจกด้านนอกด้วยน้ำประปา แล้วค่อย ๆ ถอดหวีออกประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส

4.3.3.2 เติมบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ลงในช่องขั้วบวกและขั้วลบ ต่อสายไฟเข้ากับเครื่อง power supply ทำการ pre-run 20-30 นาที ที่แรงเคลื่อนไฟฟ้าคงที่ 300 โวลต์

4.3.3.3 ผสม AFLP loading dye (98 % formamide, 10 mM EDTA, 0.1 % bromphenol blue, 0.1 % xylene cyanol) ปริมาตร 2 ไมโครลิตรกับดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตรในหลอดเซ็นตริฟิวจ์

4.3.3.4 นำไปบ่มใน heating box ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยวแล้วแช่น้ำแข็งทันที

4.3.3.5 เตรียม DNA marker (25 bp) โดยดูด DNA marker มา 1 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 3 ไมโครลิตร และ AFLP loading dye 2 ไมโครลิตร

4.3.3.6 นำไปบ่มใน heating box ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส แล้วแช่น้ำแข็งทันทีเช่นกัน

4.3.3.7 ปิดเครื่อง power supply ใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์เพื่อไล่ยูเรียตามช่องหวีของเจลออกให้หมด

4.3.3.8 หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอใส่ลงไปในแต่ละช่องหวีของเจล และหยอด DNA marker ที่เตรียมไว้ลงไปที่ช่องแรกและช่องสุดท้ายเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอ

4.3.3.9 เปิดเครื่องที่แรงเคลื่อนไฟฟ้าเท่าเดิม เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือจนกว่าสี xylene cyanol (สีบน) เคลื่อนตัวลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล

4.3.3.10 ปิดเครื่องนำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกัน เจลจะติดอยู่กับกระจกแผ่นที่เป็นสี่เหลี่ยม นำเจลไปย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทเพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอต่อไป

4.3.4 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

4.3.4.1 นำกระจกที่มีเจลติดอยู่มาแช่สารละลาย fixative ที่เย็น (glacial acetic acid 1.5 มิลลิลิตร, 95 % ethanol 32 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 265 มิลลิลิตร) เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า 5 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3.4.2 นำแผ่นกระจกที่ได้แช่ลงในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate 0.38 กรัม, น้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร) เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า 8 นาที

4.3.4.3 นำกระจกมาล้างสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทส่วนเกินออก โดยจุ่มแผ่นกระจกลงในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว ไม่ควรเกิน 5 วินาที เพราะถ้านานซิลเวอร์จะหลุดหมด

4.3.4.4 นำแผ่นกระจกแช่ลงในสารละลาย developer (NaOH 3.75 กรัม, น้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร, 40 % formaldehyde 680 ไมโครลิตร) จนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน

4.3.4.5 หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในสารละลาย fixative ที่เย็น 5 นาที

4.3.4.6 นำแผ่นกระจกที่ได้ผึ่งให้แห้งในอากาศก่อนนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป

5. การวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี

5.1 คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยเลือกเฉพาะคู่ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ชัดเจน และแสดงความแตกต่างของตัวอย่างแต่ละชนิดได้ จากคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 35 คู่ไพรเมอร์

5.2 คำนวณหาร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึม (percentage of polymorphism) และจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ไพรเมอร์ โดยคำนวณจาก

$$\text{percentage of polymorphism} = \frac{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึม} \times 100}{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด}}$$

5.3 คำนวณค่า polymorphic information contents (PICs) (Anderson *et al.*, 1993) โดยคำนวณจาก

$$\text{PICs} = 1 - \sum_{i=1}^{k} Pi^{2}$$

โดย Pi คือ ความถี่ของแอลลีลที่ i ซึ่ง Pi ประกอบด้วย Pa (absent allele) และ Pp (present allele) ค่า PICs เป็นค่าที่บอกโอกาสที่จะพบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง ที่เลือกมาแบบสุ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ค่า PICs สูงสุด มี 2 ค่า ขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ กล่าวคือ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดข่มสมบูรณ์ (dominant marker) ค่า PICs สูงสุด เท่ากับ 0.5 ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดข่มร่วมกัน (codominant marker) ค่า PICs สูงสุด เท่ากับ 1.0 สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี ซึ่งเป็นเครื่องหมายแบบข่มสมบูรณ์ ฉะนั้นค่า PICs สูงสุด ที่เป็นไปได้มีค่าเท่ากับ 0.5

5.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยแปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ได้ โดยให้สัญลักษณ์เป็น “1” เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้สัญลักษณ์เป็น “0” เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ numerical taxonomy and multivariate analysis system (NTSYS)pc version 2.20k (Rohlf, 2009) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมด้วยวิธี Dice’s coefficient (Dice, 1945) จากสูตร

$$\text{Dice coefficient} = \frac{2a}{(2a + b + c)}$$

เมื่อ a = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้ง 2 พันธุ์
b = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์ i แต่ไม่พบในพันธุ์ j
c = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์ j แต่ไม่พบในพันธุ์ i

สร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมด้วยวิธี unweighted pair group method of arithmetic average (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) จัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี principal coordinates analysis (PCoA) คำนวณค่า cophenetic correlation coefficient (r) เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมในการจัดกลุ่ม (Mantel, 1967; Sokal and Rohlf, 1994) วิเคราะห์ความเชื่อมั่นของการจัดกลุ่มด้วยค่า bootstrap ซึ่งทำซ้ำจำนวน 1000 ครั้ง ค่าที่ได้จะแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของโอกาสที่การจัดกลุ่มไม่เปลี่ยนแปลงหรือให้ผลคงเดิม โดยใช้โปรแกรม winboot (Yap and Nelson, 1996)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของตัวอย่าง เช่น รูปร่างลักษณะหัว และการแตกเหง้าแขนง สีเนื้อในหัว รูปร่างลักษณะใบ สีของเส้นกลางใบ การมีขนที่แผ่นใบด้านล่าง ลักษณะช่อดอก โดยบันทึกลักษณะเมื่อดอก (flower) ที่อยู่ภายกลีบใบประดับตอนล่าง (flower bract) บาน ความสูงวัดจากพื้นดินถึงคอใบบนสุด เป็นต้น

7. สถานที่ทำการทดลอง

7.1 ห้องปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมและวิเคราะห์จีโนม ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.2 ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

8. ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

เริ่มการทดลองตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2551 สิ้นสุดการทดลองเดือนมกราคม 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่าง

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างว่านชักมดลูกจากแหล่งต่าง ๆ เช่น สถานีอนามัย บ้านเกษตรกร ชมรมผู้สนใจสมุนไพร กลุ่มผู้ปลูกสมุนไพรเพื่อค้าส่ง เป็นต้น รวมทั้งสิ้น 38 จังหวัด ครอบคลุมทุกภูมิภาคของประเทศไทย จำนวน 95 ตัวอย่าง แบ่งเป็นว่านชักมดลูก 90 ตัวอย่าง และพืชชนิดอื่นที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูก 5 ตัวอย่าง พบว่า ว่านชักมดลูกมีชื่อเรียกแตกต่างกัน เช่น ว่านชักมดลูก ว่านชักมดลูกตัวผู้ ว่านชักมดลูกตัวเมีย ว่านทรหด การใช้ประโยชน์ นิยมใช้ดองเหล้ากิน หรือตากให้แห้งแล้วบดเป็นผงใส่แคปซูล สรรพคุณช่วยกระชับมดลูกหลังคลอด ชักมดลูกเข้าอู่ บำรุงกำลัง ทำให้เลือดลมหมุนเวียนดี บางรายใช้รักษาโรคริดสีดวงทวาร ส่วนพืชชนิดอื่นที่รวบรวมได้นั้น เช่น ว่านหัวใหญ่ (*Curcuma* sp.) เป็นพืชที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูกมาก พ่อค้าบางรายนิยมนำมาขายโดยอ้างว่าเป็นว่านชักมดลูกเนื่องจากได้ราคาดีกว่า ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะใช้เป็นตัวอย่างเพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่างที่เรียกว่าว่านชักมดลูก

2. การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของตัวอย่าง

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของตัวอย่างจำนวน 95 ตัวอย่าง ด้วยวิธีประยุกต์จาก Agrawal *et al.* (1992) แล้ววิเคราะห์คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 % และวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้สเปกโทรโฟโทมิเตอร์ พบว่าได้ดีเอ็นเอคุณภาพค่อนข้างดี โดยมีค่า (A_{260}/A_{280}) อยู่ระหว่าง 1.8-1.9 คำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้แต่ละตัวอย่าง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง มีความเข้มข้นเฉลี่ยประมาณ 816.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

3. การวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี

3.1 การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

จากการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมระหว่าง *Eco*RI primer +3 (E-ANN) และ *Mse*I primer +3 (M-CNN) ทั้งหมด 35 คู่ไพรเมอร์ กับตัวอย่างดีเอ็นเอ 14 ตัวอย่าง คัดเลือกเฉพาะคู่ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ชัดเจน และแสดงความแตกต่างของตัวอย่างแต่ละชนิดได้ พบว่า มีคู่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 4) ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ชัดเจน และแสดงความแตกต่างของตัวอย่างแต่ละชนิดได้ (ภาพที่ 2) เพื่อนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมกับตัวอย่างทั้ง 95 ตัวอย่าง

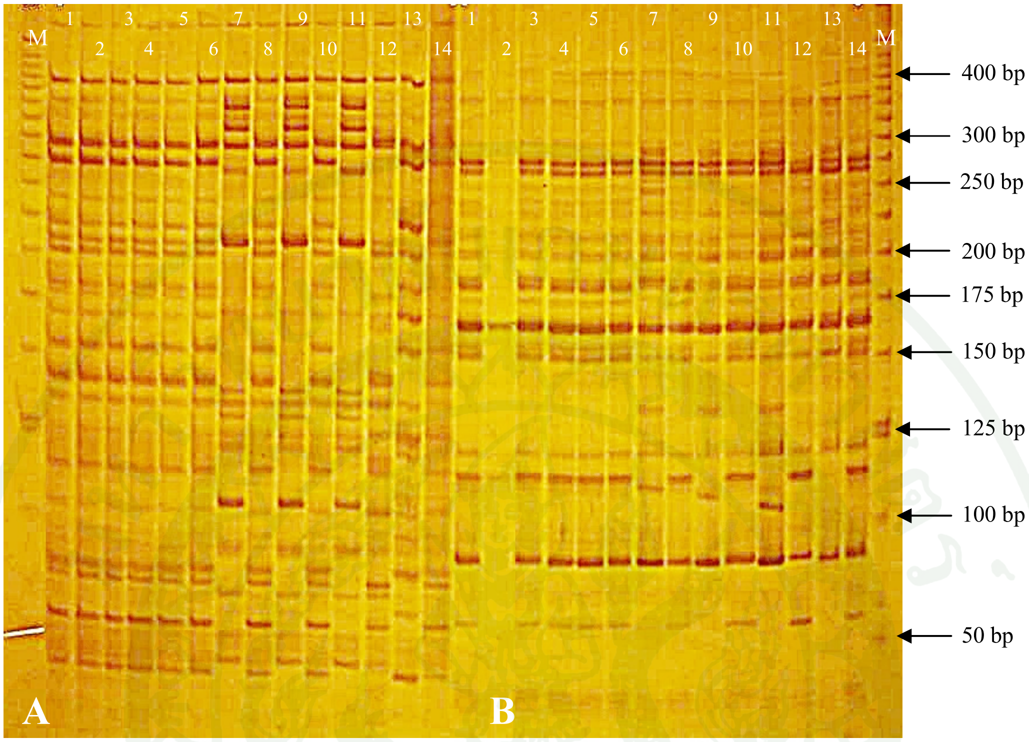
ตารางที่ 4 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

คู่ไพรเมอร์	E-AAC	E-AAG	E-ACA	E-ACT	E-ACC	E-ACG	E-AGC	E-AGG
M-CAA	/		/		/		/	/
M-CAC	/	/	/		*		/	/
M-CAG	*	*	/		*	/	*	
M-CAT	/	/		/	/			*
M-CTA		/	/	*	/			
M-CTC			/			/		
M-CTG		/			*	/	/	
M-CTT	/					*		/

หมายเหตุ / คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนน้อย หรือไม่ชัดเจน หรือแสดงความแตกต่างของตัวอย่างแต่ละชนิดได้น้อย

* คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ชัดเจน และแสดงความแตกต่างของตัวอย่างแต่ละชนิดได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

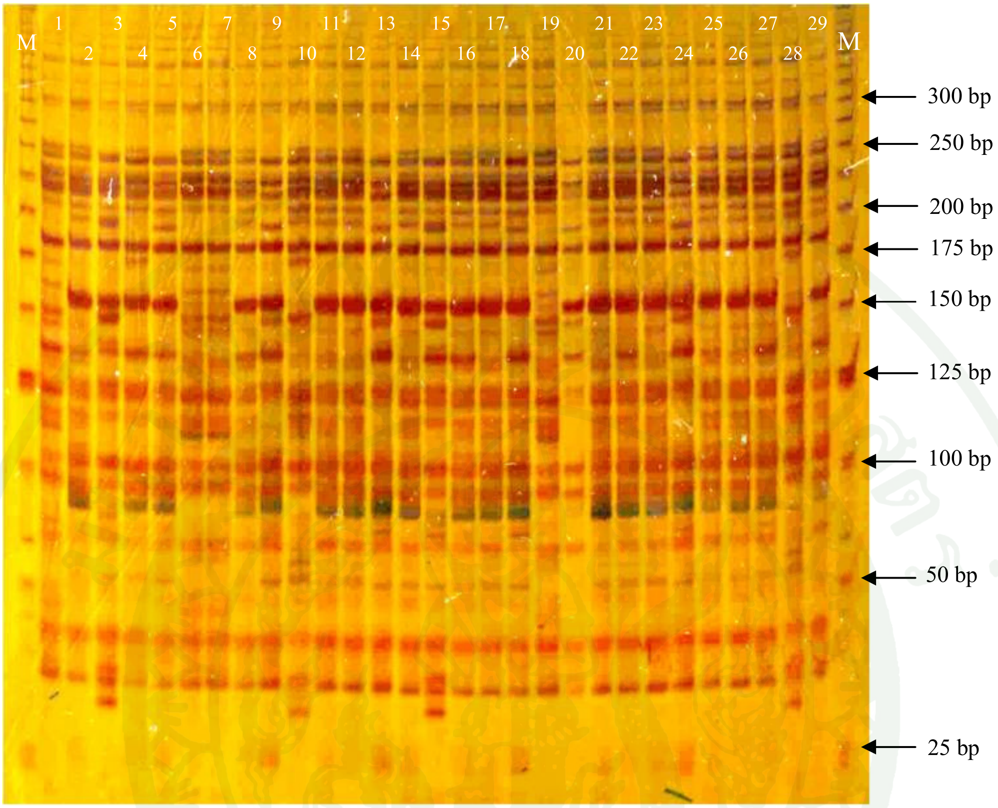


ภาพที่ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างจำนวน 14 ตัวอย่างที่ใช้คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม
(A) ไพรเมอร์ E-ACC/M-CAC เป็นคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ชัดเจน แสดงความแตกต่างของตัวอย่างแต่ละชนิดได้
(B) ไพรเมอร์ E-AGC/M-CAA เป็นคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนน้อย หรือไม่ชัดเจน หรือแสดงความแตกต่างของตัวอย่างแต่ละชนิดได้น้อย

3.2 ร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึม และจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อไพรเมอร์

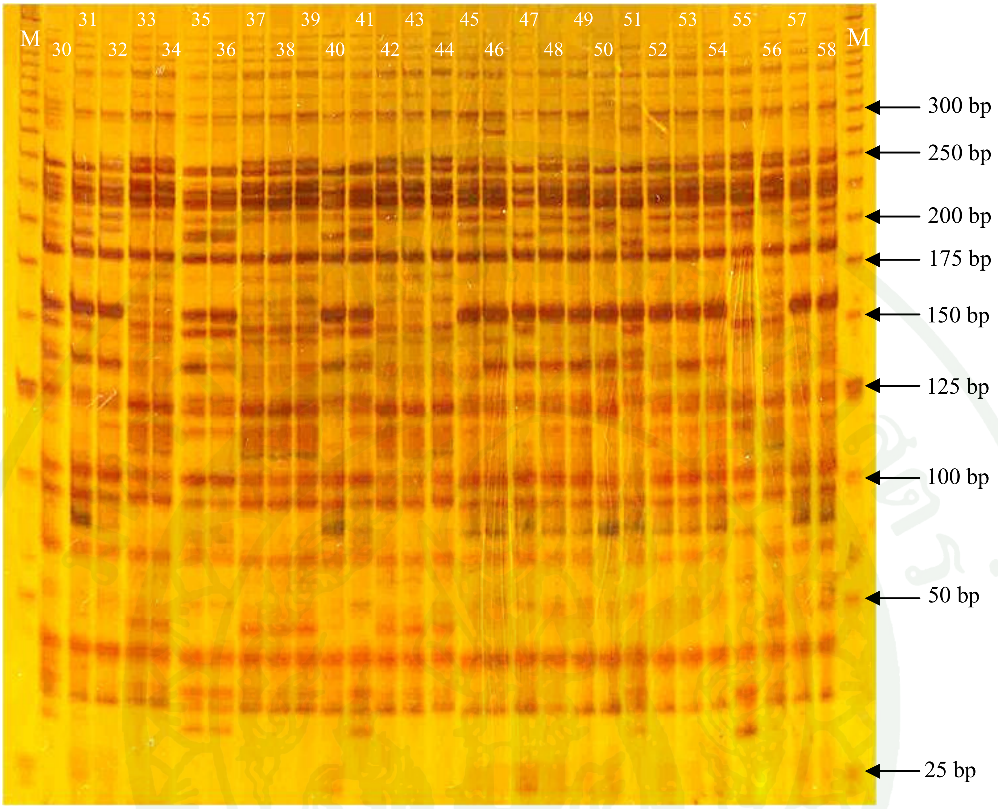
เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบรูปแบบและจำนวนแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างทั้ง 95 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ พบว่า ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เข้มชัดเจน (ภาพที่ 3-6) ทั้งสิ้น 202 แถบ เฉลี่ย 22.44 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้พอลิมอร์ฟิซึม 152 แถบ คิดเป็น 75.25 % ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด โดยไพรเมอร์ E-ACC/M-CAC ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด 31 แถบ และไพรเมอร์ E-ACG/M-CTT ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด 16 แถบ ไพรเมอร์ที่ให้ค่าพอลิมอร์ฟิซึมมากที่สุด 96.30 % คือ ไพรเมอร์ E-ACC/M-CTG (ตารางที่ 5)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



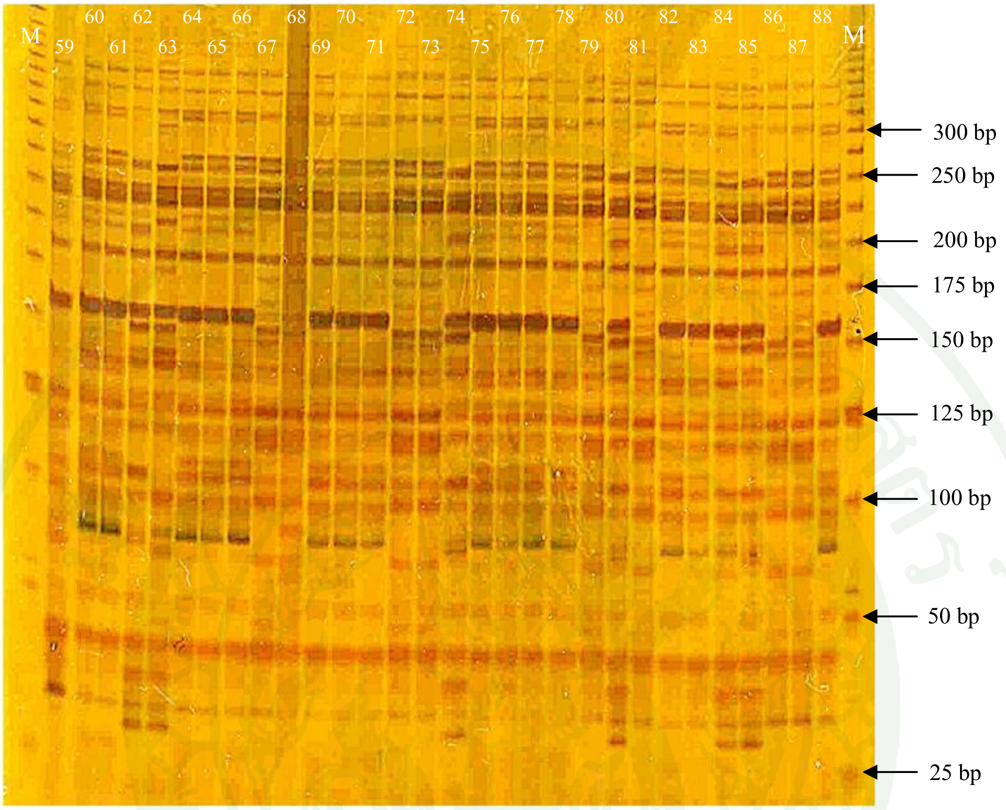
ภาพที่ 3 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 1-29 ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ E-AGG และ M-CAT
(M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ตัวเลขที่ปรากฏ คือ เลขที่ตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



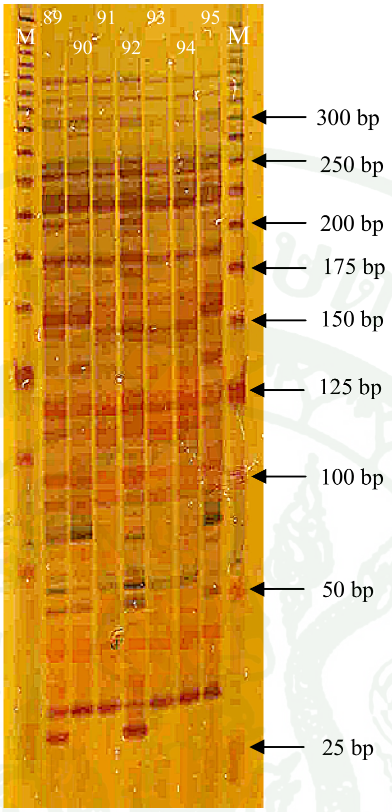
ภาพที่ 4 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 30-58 ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ E-AGG และ M-CAT
(M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ตัวเลขที่ปรากฏ คือ เลขที่ตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 59-88 ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ E-AGG และ M-CAT
(M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ตัวเลขที่ปรากฏ คือ เลขที่ตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ 89-95 ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ E-AGG และ M-CAT
(M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ตัวเลขที่ปรากฏ คือ เลขที่ตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 ร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึม และจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อไพรเมอร์

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวน polymorphic band	จำนวน monomorphic band	% polymorphism
E-ACC/M-CAC	31	25	6	80.65
E-AAG/M-CAG	24	14	10	58.33
E-ACC/M-CAG	19	15	4	78.95
E-AAC/M-CAG	17	12	5	70.59
E-AGC/M-CAG	20	14	6	70.00
E-AGG/M-CAT	27	16	11	59.26
E-ACC/M-CTG	27	26	1	96.30
E-ACG/M-CTT	16	10	6	62.50
E-ACT/M-CTA	21	20	1	95.24
รวม	202	152	50	-
เฉลี่ย	22.44	16.89	5.56	75.25

จากค่าพอลิมอร์ฟิซึมเฉลี่ยที่ได้ 75.25 % แสดงให้เห็นว่าข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ศึกษา มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับปานกลาง ซึ่งรูปแบบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น อาจเกิดจากการกลายของเบสที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการเปลี่ยนแปลง ขาดหายไป หรือเกิดตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะตำแหน่งใหม่ หรือการมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไป และมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลดีเอ็นเอใหม่ในช่วงระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะเดิม ทำให้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป (สุรินทร์, 2552; Kokotovic *et al.*, 1999; Saliba *et al.*, 2000)

3.3 ค่า polymorphism information content (PICs)

จากข้อมูลแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 202 แถบที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวน 95 ตัวอย่างด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี เมื่อนำมาคำนวณค่า PICs ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงโอกาสที่จะพบตัวอย่างที่สุ่มมา 2 ตัวอย่างว่ามีความแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด พบว่าค่าที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.00-0.50 โดยมีค่าเฉลี่ย 0.25 แสดงว่าโอกาสที่จะพบตัวอย่างที่สุ่มมาแบบสุ่ม 2 ตัวอย่างมีความแตกต่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กัน หรือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับปานกลาง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์พอลิมอร์ฟิซึมเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอที่กล่าวมาข้างต้น

3.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างทั้ง 95 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากการนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ มาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Dice's coefficient (Dice, 1945) พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.57-1.00 (ตารางผนวกที่ 1) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.79 แสดงให้เห็นว่า ข้อมูลจากเครื่องหมายเอเอฟแอลพีของตัวอย่างที่ศึกษา มีความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับปานกลาง และเมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) พบว่า สามารถจำแนกตัวอย่างที่ระดับความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมประมาณ 0.8 ออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ (ภาพที่ 7) ซึ่งแบ่งเป็นกลุ่มของพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma* 1 กลุ่ม และกลุ่มว่านชักมดลูก 3 กลุ่ม โดยตัวอย่างกลุ่มที่ 1, 3 และ 4 จัดเป็นกลุ่มของว่านชักมดลูก ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 2 จัดเป็นพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma* โดยมีรายละเอียดของตัวอย่างแต่ละกลุ่มเป็นดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของว่านชักมดลูก ประกอบด้วย 57 ตัวอย่าง (ภาพผนวกที่ 1) มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.92-1.00 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.97 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 40, 41, 42, 43, 46, 47, 52, 53, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 72, 73, 75, 76, 79, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 88, 89, 90, 91, 92, 93 และ 95 ซึ่งรวบรวมจากจังหวัดเพชรบูรณ์ และแหล่งที่มาไม่แน่ชัด จังหวัดละ 4 ตัวอย่าง จังหวัดพิษณุโลก พระนครศรีอยุธยา หนองคาย กำแพงเพชร นครสวรรค์ และมหาสารคาม จังหวัดละ 3 ตัวอย่าง จังหวัดพิจิตร พะเยา ลพบุรี นครพนม ปราจีนบุรี อำนาจเจริญ เชียงใหม่ ระยอง และชลบุรี จังหวัดละ 2 ตัวอย่าง จังหวัดลำปาง นครนายก ฉะเชิงเทรา บุรีรัมย์ จันทบุรี เลย อุบลราชธานี นครศรีธรรมราช มุกดาหาร ศรีสะเกษ เชียงราย และน่าน จังหวัดละ 1 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 16, 17, 18, 19, 21, 31, 36, 40, 41, 42, 43, 46, 47, 64, 68, 81, 82, 88, 89, 90 และ 92 มีลายพิมพ์เอเอฟแอลพีเหมือนกัน ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม เท่ากับ 1 แสดงว่าตัวอย่างดังกล่าว น่าจะเป็นพันธุ์เดียวกันที่มีการนำไปปลูกในที่ต่าง ๆ ซึ่งพบว่ากระจายครอบคลุมทุกภูมิภาค ยกเว้นภาคใต้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของพืชชนิดอื่นที่อยู่ในสกุล *Curcuma* ที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูก ประกอบด้วย 5 ตัวอย่าง (ภาพผนวกที่ 2) มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.89-1.00 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.96 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 39 จากจังหวัดพิษณุโลก ตัวอย่างที่ 48 และ 49 จากจังหวัด ปราจีนบุรี ตัวอย่างที่ 56 จากจังหวัดนครสวรรค์ และตัวอย่างที่ 59 จากจังหวัดสุรินทร์ โดยตัวอย่างที่ 56 คือตัวอย่างที่เรียกว่า ว่านหัวใหญ่ ซึ่งเป็นว่านที่พ่อค้าบางรายนิยมนำมาอ้างว่าเป็นว่านชักมดลูกเนื่องจากมีลักษณะคล้ายคลึงกับว่านชักมดลูกมาก และพบว่าตัวอย่างที่ 56 กับตัวอย่างที่ 59 มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.996

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของว่านชักมดลูก ประกอบด้วย 29 ตัวอย่าง (ภาพผนวกที่ 3) มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.88-1.00 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.94 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 7, 9, 11, 13, 15, 20, 24, 25, 26, 33, 34, 37, 38, 44, 45, 50, 51, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 71, 74, 77, 78 และ 87 ซึ่งรวบรวมจากแหล่งที่มาไม่แน่ชัด 5 ตัวอย่าง จังหวัดสงขลา ราชบุรี เชียงใหม่ นครปฐม และสุรินทร์ จังหวัดละ 2 ตัวอย่าง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา พิจิตร หนองคาย ประจวบคีรีขันธ์ กำแพงเพชร กระบี่ กาญจนบุรี ชัยนาท ฉะเชิงเทรา สระแก้ว ปราจีนบุรี ลพบุรี สุราษฎร์ธานี และเพชรบูรณ์ จังหวัดละ 1 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ 37, 38, 50, 51, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 77 และ 78 มีลายพิมพ์เอเอฟแอลพีเหมือนกัน ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม เท่ากับ 1 แสดงว่าตัวอย่างน่าจะเป็นพันธุ์เดียวกันที่มีการนำไปปลูกในที่ต่าง ๆ ซึ่งพบว่ากระจายครอบคลุมภาคกลางตอนล่าง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ แต่ส่วนใหญ่พบมากที่ภาคกลางตอนล่าง และภาคตะวันออก

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของว่านชักมดลูก ประกอบด้วย 4 ตัวอย่าง (ภาพผนวกที่ 4) มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.88-1.00 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.95 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 14 จากแหล่งที่มาไม่แน่ชัด ตัวอย่างที่ 70 จากจังหวัดนครพนม ตัวอย่างที่ 80 จากจังหวัดกาญจนบุรี และตัวอย่างที่ 94 จากจังหวัดสระแก้ว โดยตัวอย่างที่ 70 กับตัวอย่างที่ 80 มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.93

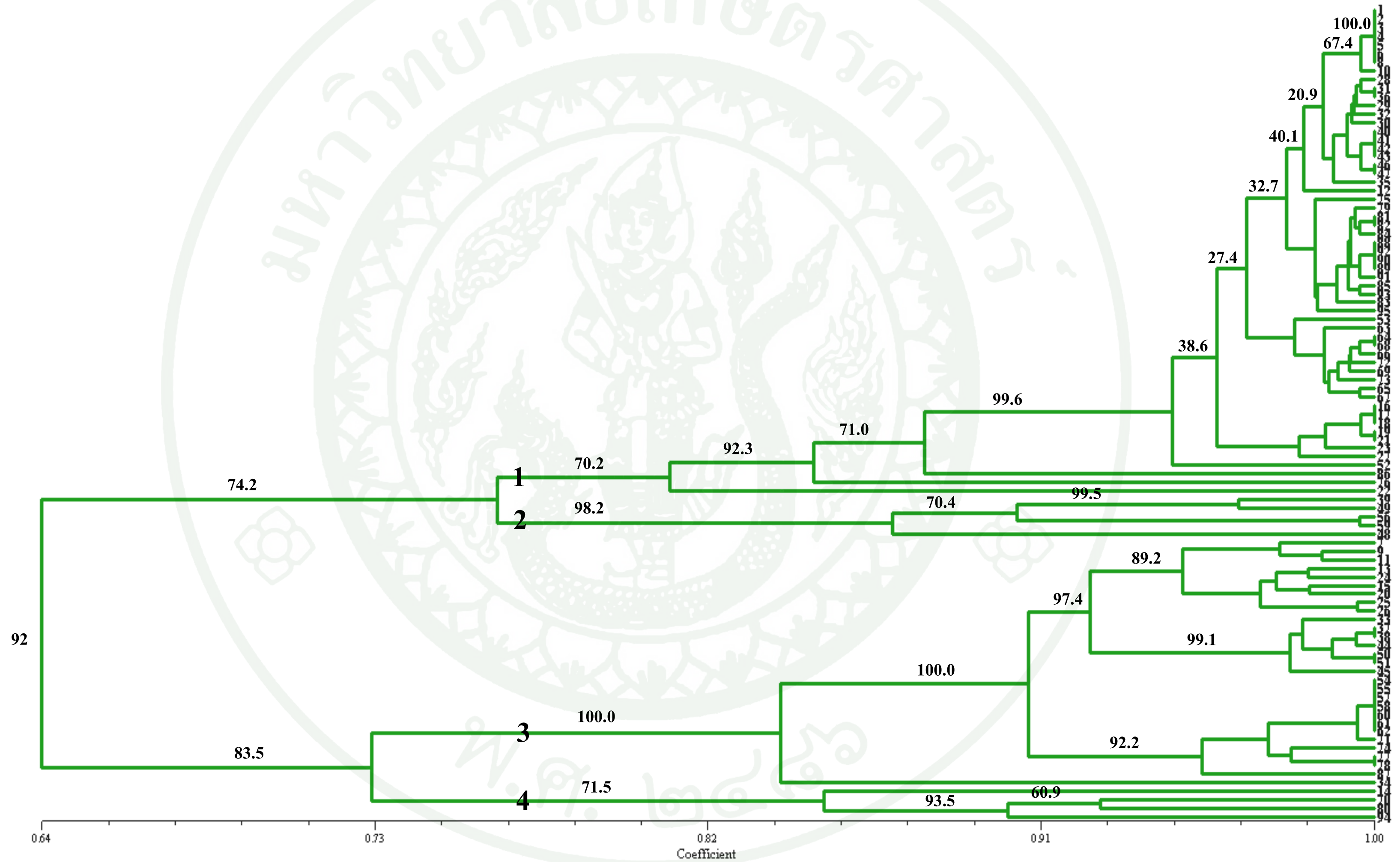
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างทั้ง 95 ตัวอย่างดังกล่าวข้างต้น พบว่ามีค่า cophenetic correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9828 ซึ่งถือว่าเป็นการจัดกลุ่มที่ดี (Mantel, 1967; Sokal and Rohlf, 1994) ส่วนผลการวิเคราะห์ค่า bootstrap ด้วยโปรแกรม winboot พบว่าส่วนใหญ่มีค่า bootstrap สูงกว่า 50 % แสดงว่าการจัดกลุ่มแต่ละครั้งมีการจัดกลุ่มได้เหมือนเดิมสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำให้การจัดกลุ่มมีความน่าเชื่อถือ ส่วนค่า bootstrap ที่มีค่าต่ำกว่า 50 % ที่มักพบในกลุ่มย่อย อาจเป็นเพราะมีการสลับที่การจัดกลุ่มภายในกลุ่มย่อยเกิดขึ้นจึงทำให้ค่า bootstrap ที่ได้มีค่าต่ำ (ภาพที่ 7)

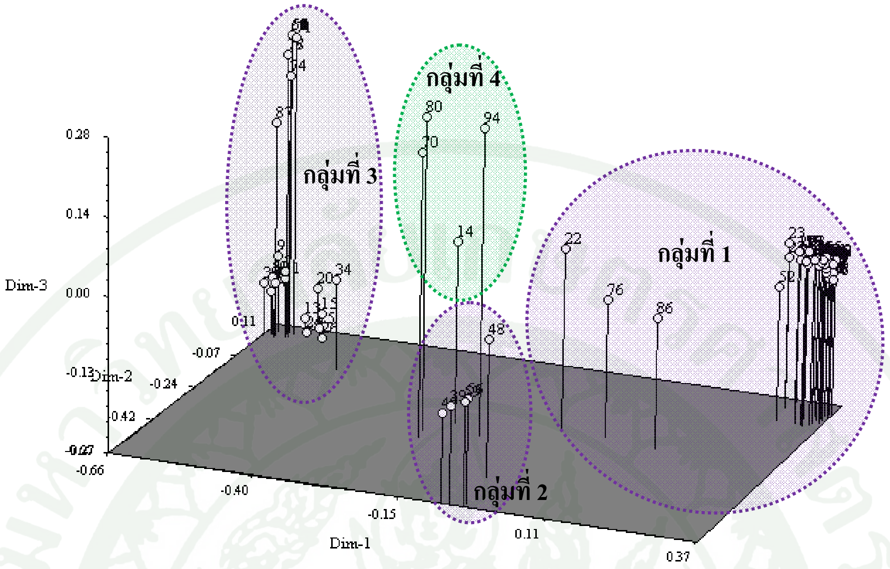
การวิเคราะห์จัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี principal coordinates analysis (PCoA) เพื่อเปรียบเทียบกับผลการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA พบว่าการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี PCoA (ภาพที่ 8) ให้ผลสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA คือ สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกได้เป็น 4 กลุ่ม เช่นกันโดยมีองค์ประกอบหลักที่ 1, 2 และ 3 ครอบคลุมความแปรปรวน 63.74% , 7.53% และ 5.05% ของความแปรปรวนทั้งหมดตามลำดับ มีความแปรปรวนรวม เท่ากับ 76.32% ซึ่งถือเป็นค่าที่สูง แสดงว่าการจัดกลุ่มที่ได้ กระจายครอบคลุมตัวแปร ทำให้การจัดกลุ่มมีความน่าเชื่อถือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูก และพืชบางชนิดในสกุล *Curcuma* สร้างด้วยวิธี UPGMA คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ด้วยวิธี Dice's coefficient และวิเคราะห์ความเชื่อมั่นของการจัดกลุ่มด้วยค่า bootstrap

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

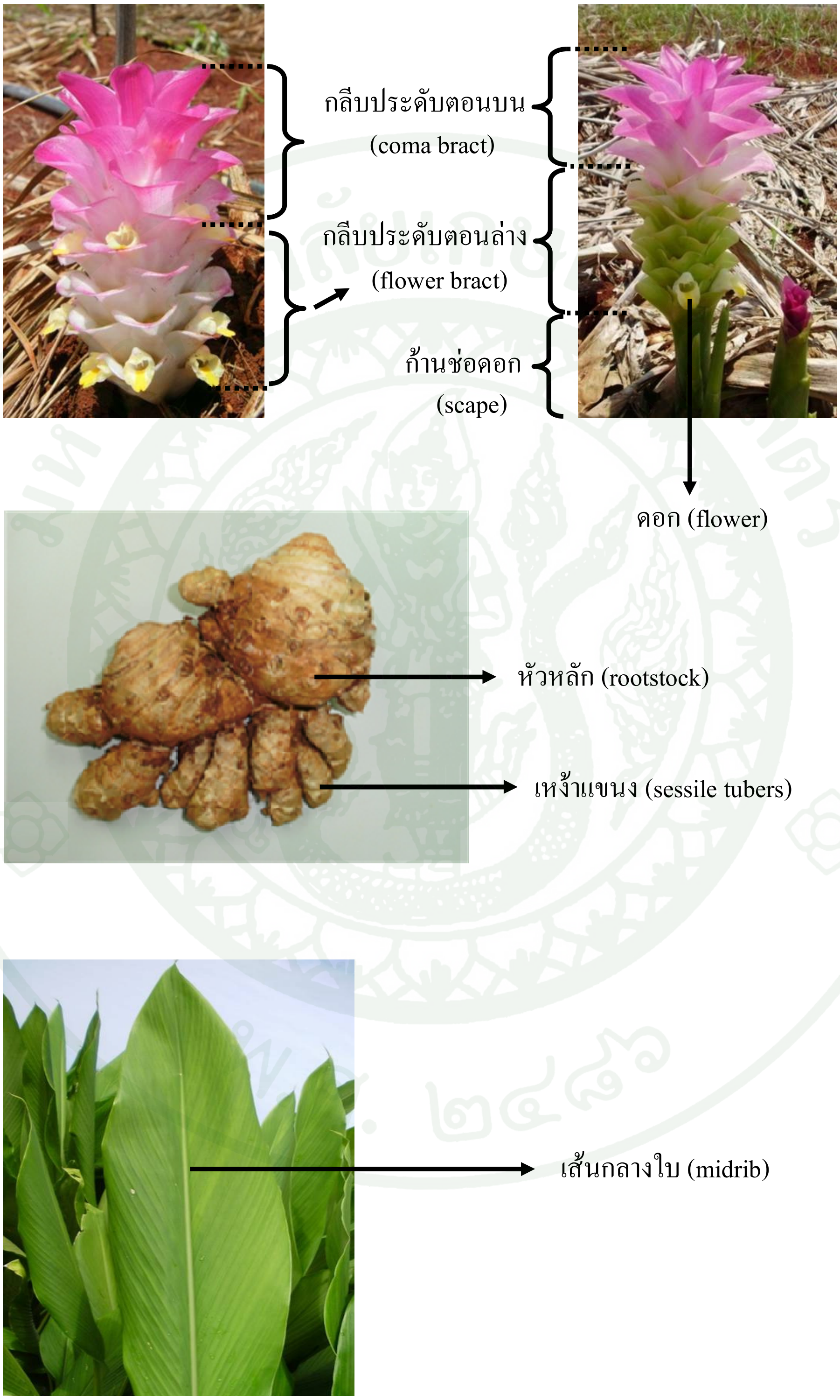


ภาพที่ 8 แผนภาพการจัดกลุ่มว่านชักมดลูก และพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma* ด้วยวิธี principal coordinates analysis (PCoA)

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของตัวอย่าง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของตัวอย่าง (ภาพที่ 9) เช่น ความสูง รูปร่างลักษณะหัว การแตกเหง้าแขนง สีเนื้อในหัว รูปร่างลักษณะใบ สีของเส้นกลางใบ การมีขนที่แผ่นใบด้านล่าง ลักษณะช่อดอกของตัวอย่างทั้ง 95 ตัวอย่าง พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ศึกษาสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม สอดคล้องกับข้อมูลลายพิมพ์เอเอฟแอลพี โดยมีรายละเอียดดังนี้

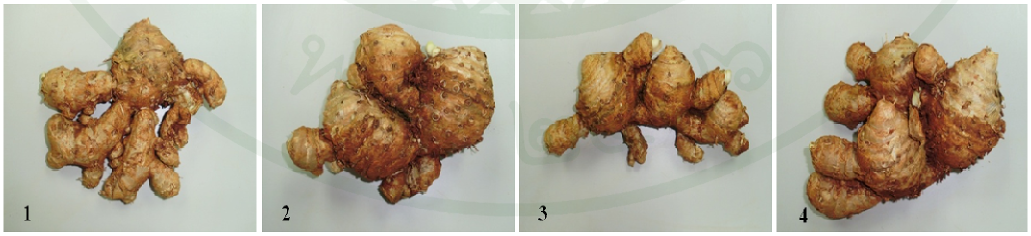
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของตัวอย่าง

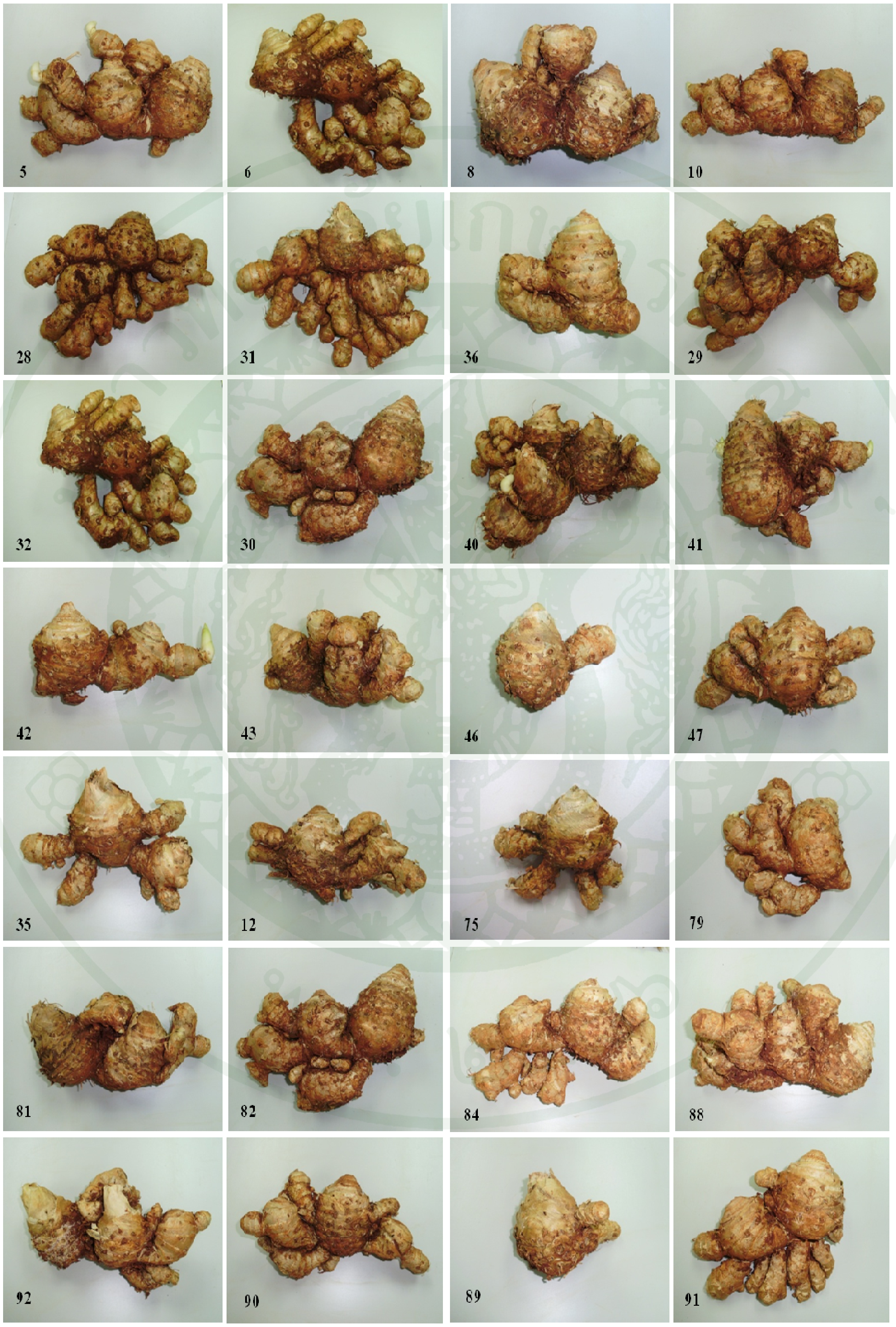
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของว่านชักมดลูก ลักษณะโดยรวมส่วนใหญ่จะมีหัวหลักลักษณะกลม มีการแตกเหง้าแขนงทางด้านข้าง (ภาพที่ 10) เนื้อในหัวมีสีเหลืองซีด กลิ่นฉุน เมื่อฝานเนื้อในหัวหลักหรือเหง้าแขนงจะพบเส้นใยบาง ๆ หน่อที่เกิดใหม่จะมีสีเขียวอ่อน ต้นและใบเหมือนต้นขมิ้น แต่ว่านชักมดลูกจะมีขนาดใหญ่และสูงกว่า ก้านใบมีสีเขียว ลักษณะก้านด้านในเป็นร่อง ด้านนอกกลมนูน บริเวณโคนของก้านใบแผ่ออกเป็นกาบโอบหุ้มกันเป็นลำต้นเทียม สูงประมาณ 66-75 เซนติเมตร ใบรูปรียาว กว้าง 24-27 เซนติเมตร ยาว 86-91 เซนติเมตร สีเส้นกลางใบของใบอ่อนมีสีแดง เมื่อแก่สีแดงจะซีดจางลงมาก บางใบไม่ปรากฏสีแดง (ภาพที่ 11) สีของแผ่นใบด้านบนมีสีเขียวเข้มกว่าทางด้านล่าง ไม่พบขนที่แผ่นใบ ลักษณะดอกออกเป็นช่อแทงจากพื้นดิน โดยจะออกดอกก่อนออกใบ ช่อดอกยาวประมาณ 25-40 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาวประมาณ 8-15 เซนติเมตร ขณะนี้ช่อดอกที่พบ มีลักษณะแตกต่างดังนี้ ช่อดอกแบบที่ 1 พบทั้งหมด 22 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 2, 8, 16, 17, 21, 23, 30, 42, 47, 52, 68, 69, 73, 75, 76, 79, 81, 84 89, 90, 91 และ 93 ลักษณะกลีบประดับตอนบนมีสีชมพูทั้งกลีบ หรือสีขาวแต้มสีชมพู ส่วนกลีบประดับตอนล่างมีสีเขียวอ่อนแต้มสีขาว หรือสีเขียวอ่อนแต้มสีชมพูแต้มสีขาว หรือสีเขียวอ่อนทั้งกลีบ มีดอกสีเหลืองอ่อนแถบตรงกลางสีเหลืองเข้มอยู่ภายใน ปลายกลีบประดับมน กลีบประดับตอนบนมีขนาดใหญ่กว่ากลีบประดับตอนล่าง จำนวนชั้นของกลีบประดับ มีประมาณ 12-15 ชั้น (ภาพที่ 12) ส่วนช่อดอกแบบที่ 2 พบ 1 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 22 ลักษณะกลีบประดับตอนบนมีสีชมพูทั้งกลีบ หรือสีขาวแต้มสีชมพู ส่วนกลีบประดับตอนล่างมีสีขาวแต้มสีชมพู หรือสีขาวทั้งกลีบ มีดอกสีเหลืองอ่อนแถบตรงกลางสีเหลืองเข้มอยู่ภายใน ปลายกลีบประดับมน กลีบประดับตอนบนมีขนาดใหญ่กว่ากลีบประดับตอนล่าง จำนวนชั้นของใบประดับ มีประมาณ 10-15 ชั้น (ภาพที่ 12)



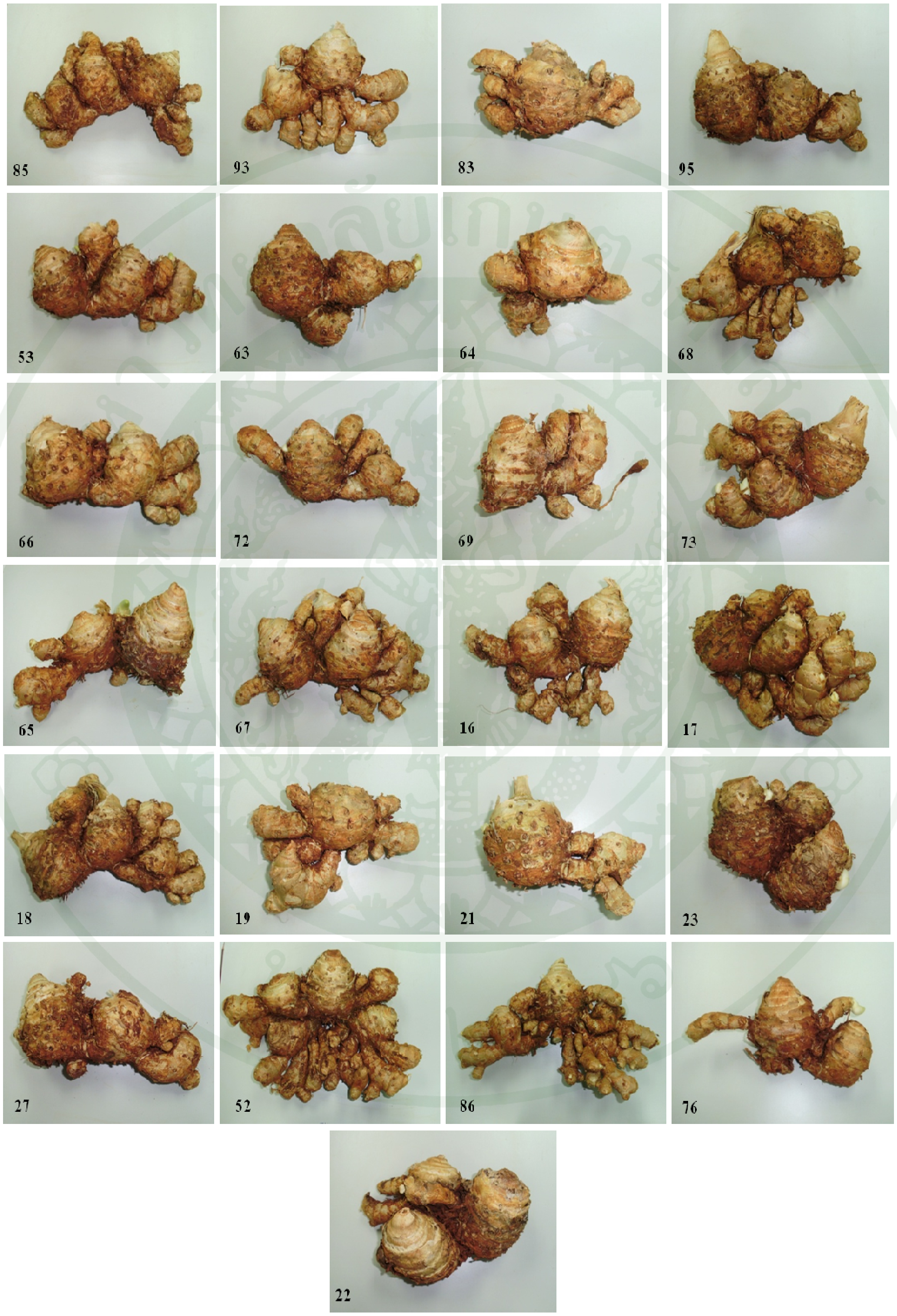
ภาพที่ 10 ลักษณะหัวของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1
(ตัวเลข คือ เลขที่ตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



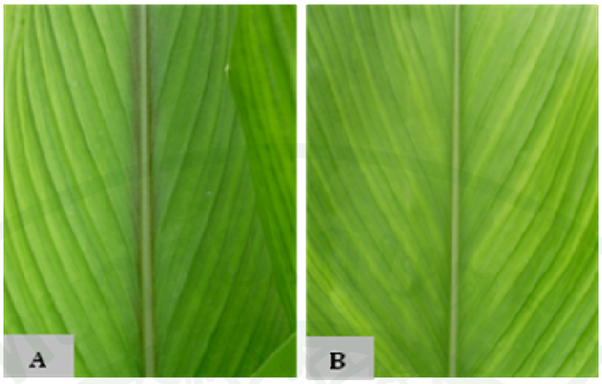
ภาพที่ 10 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 สีของเส้นกลางใบว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1

(A) สีเส้นกลางใบของใบอ่อน

(B) สีเส้นกลางใบของใบแก่

ภาพที่ 12 ลักษณะช่อดอกของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1

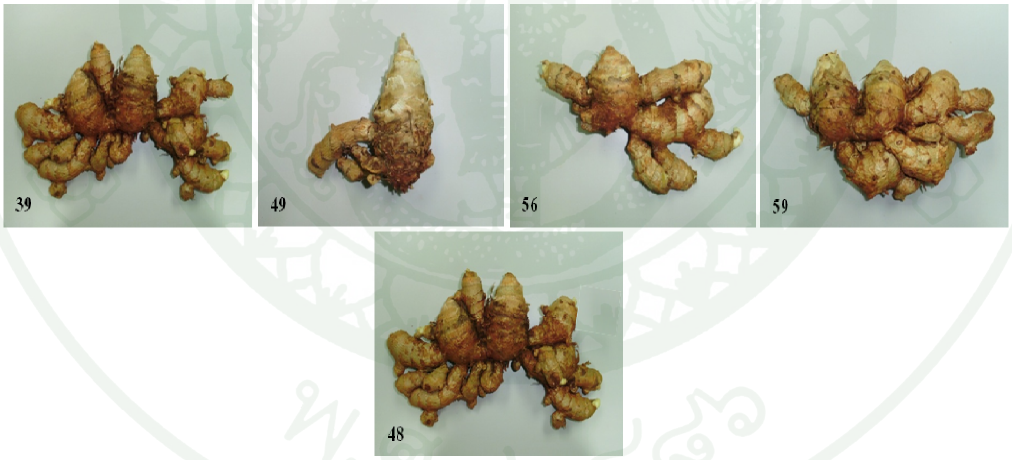
(ตัวเลข คือ เลขที่ตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 12 (ต่อ)

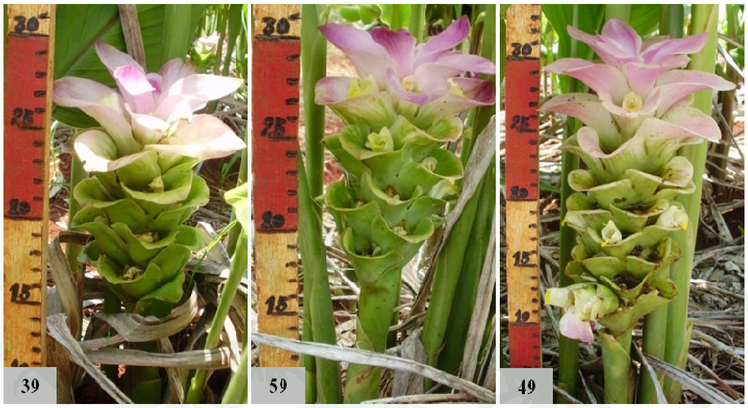
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของพืชชนิดอื่นที่อยู่ในสกุล *Curcuma* ที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูก โดยรวมส่วนใหญ่จะมีหัวหลักลักษณะกลมยาว ปลายแหลม มีการแตกเหง้าแขนงทางด้านข้าง (ภาพที่ 13) เนื้อในหัวมีสีเหลืองซีด กลิ่นฉุนร้อน เมื่อฝานเนื้อในหัวหลักหรือเหง้าแขนงจะพบเส้นใยบาง ๆ หน่อที่เกิดใหม่จะมีสีเขียวอ่อน ต้นและใบเหมือนต้นขมิ้นอ้อย บริเวณโคนของก้านใบแผ่ออกเป็นกาบโอบหุ้มกันเป็นลำต้นเทียม สูงประมาณ 70-87 เซนติเมตร ใบรูปรียาว กว้าง 24-27 เซนติเมตร ยาว 70-85 เซนติเมตร เส้นกลางใบมีสีแดง สีของแผ่นใบด้านบนมีสีเขียวเข้มกว่าทางด้านล่าง พบขนที่แผ่นใบด้านล่าง ลักษณะดอกออกเป็นช่อแทงจากพื้นดิน ขณะนี้พบช่อดอก 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 39, 49 และ 59 ลักษณะช่อดอกยาวประมาณ 25-35 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาวประมาณ 10-17 เซนติเมตร กลีบประดับตอนบนมีสีชมพูทั้งกลีบ หรือสีขาวแต้มสีชมพู กลีบประดับตอนล่างสีเขียวอ่อนแต้มสีชมพู หรือสีเขียวอ่อนทั้งกลีบ มีดอกสีเหลืองอ่อนแถบตรงกลางสีเหลืองเข้มภายใน กลีบประดับตอนบน มีขนาดใหญ่กว่ากลีบใบประดับตอนล่าง ปลายกลีบประดับแหลม จำนวนชั้นของกลีบประดับมีประมาณ 10-13 ชั้น จำนวนชั้นกลีบประดับตอนบนน้อยกว่ากลีบประดับตอนล่าง (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 13 ลักษณะหัวของพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma* sp. ที่คล้ายว่านชักมดลูก (ตัวเลข คือ เลขที่ตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 1)

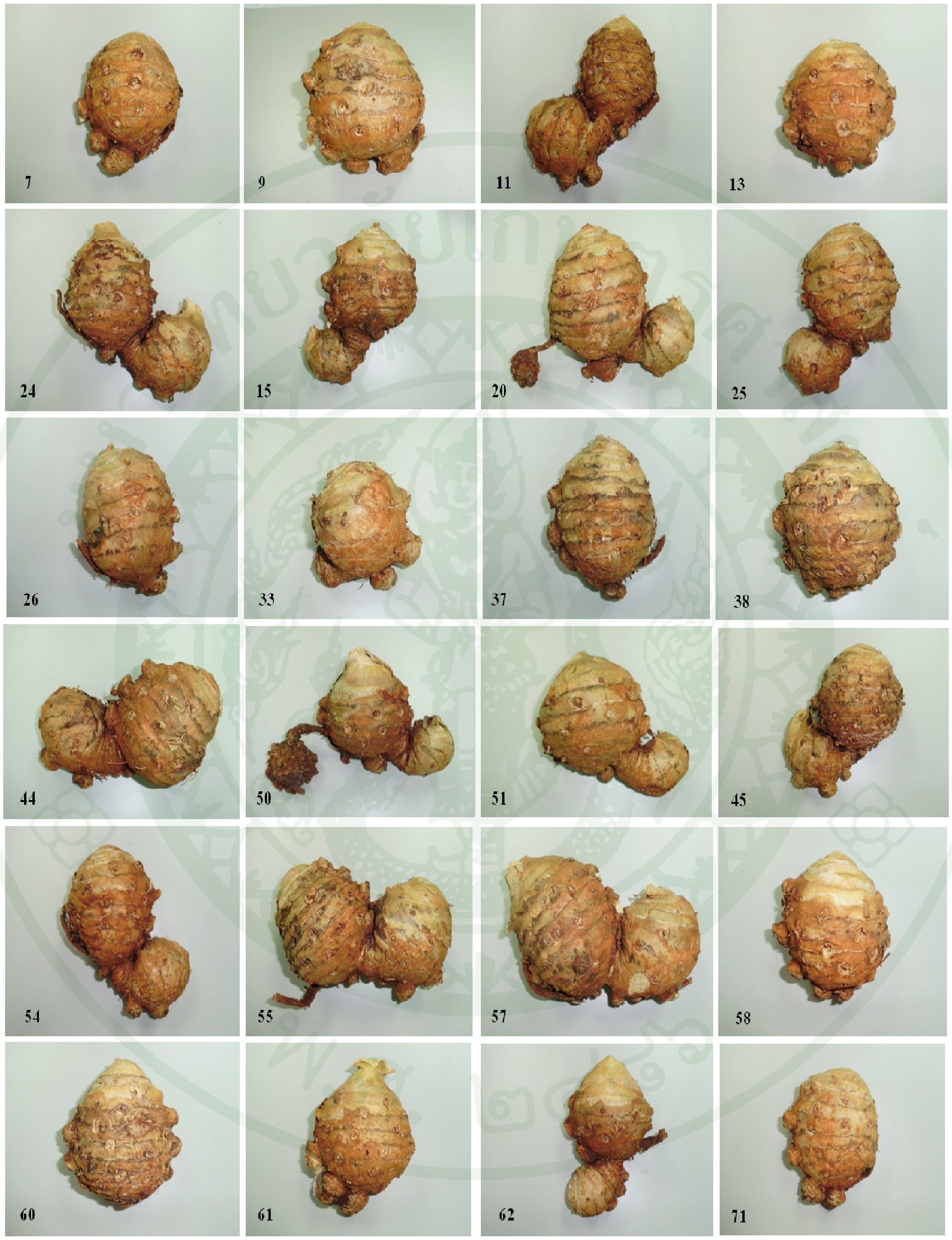
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 ลักษณะช่อดอกของพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma* sp. ที่คล้ายว่านชักมดลูก (ตัวเลข คือ เลขที่ตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 1)

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของว่านชักมดลูก ลักษณะโดยรวมส่วนใหญ่จะมีหัวหลักลักษณะกลม ไม่มีการแตกเหง้าแขนงทางด้านข้าง (ภาพที่ 15) เนื้อในหัวมีสีขาวนวล กลิ่นคล้ายมะม่วงอ่อน หน่อที่เกิดใหม่จะมีสีขาว ก้านใบมีสีเขียว ลักษณะก้านด้านในเป็นร่อง ด้านนอกกลมนูน บริเวณโคนของก้านใบแผ่ออกเป็นกาบ โอบหุ้มกันเป็นลำต้นเทียม เมื่อแก่กาบใบจะแผ่ออกคล้ายพัด ลำต้นเทียมสูงประมาณ 56-60 เซนติเมตร ใบรูปขอบขนานรียาว โคนใบสอบ แผ่นใบหนา เมื่อพับแผ่นใบเข้าหากันตามความยาวของเส้นกลางใบ พบว่า แผ่นใบทั้งสองข้างไม่สมมาตรกัน ใบกว้าง 19-21 เซนติเมตร ยาว 72-80 เซนติเมตร เส้นกลางใบส่วนใหญ่มีสีแดงเข้ม เมื่อแก่สีแดงจะซีดจางลง (ภาพที่ 16) จนกระทั่งบางใบไม่มีสีแดงปรากฏอยู่ สีของแผ่นใบด้านบนมีสีเขียวเข้มกว่าทางด้านล่าง ไม่พบขนที่แผ่นใบ ลักษณะดอกออกเป็นช่อแทงจากพื้นดิน โดยจะออกดอกก่อนออกใบ ขณะนี้พบช่อดอกทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 7, 9, 13, 20, 24, 25, 33, 34, 37, 38, 44, 50, 55, 58 และ 61 ลักษณะช่อดอกยาวประมาณ 15-20 เซนติเมตร ก้านช่อดอกสั้นประมาณ 2-5 เซนติเมตร ช่อดอกรูปทรงคล้ายทรงกระบอกกว้าง กลีบประดับตอนบนมีสีชมพูทั้งกลีบ หรือสีขาวแต้มสีชมพู กลีบประดับตอนล่างมีสีขาวแต้มสีชมพู หรือสีขาวทั้งกลีบ มีดอกสีเหลืองอ่อนแถบตรงกลางสีเหลืองเข้มอยู่ภายใน ปลายกลีบประดับมน กลีบประดับตอนบนมีขนาดใกล้เคียงกับกลีบประดับตอนล่าง จำนวนชั้นของกลีบประดับมีประมาณ 10-12 ชั้น (ภาพที่ 17)

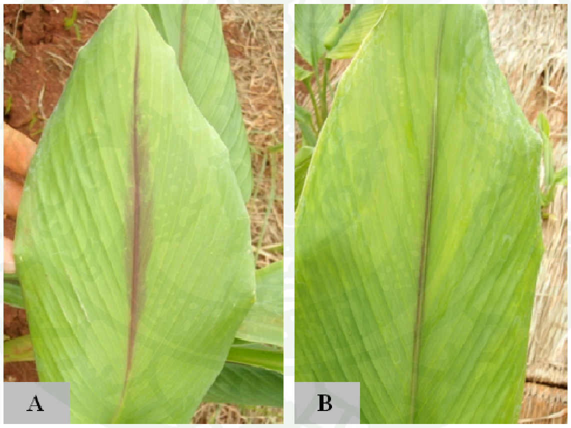
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 ลักษณะหัวของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 3
(ตัวเลข คือ เลขที่ตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 15 (ต่อ)



ภาพที่ 16 สีของเส้นกลางใบว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 3

(A) สีเส้นกลางใบของใบอ่อน

(B) สีเส้นกลางใบของใบแก่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 17 ลักษณะช่อดอกของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 3
(ตัวเลข คือ เลขที่ตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของว่านชักมดลูกอีกกลุ่มหนึ่ง (ภาพที่ 18) ลักษณะโดยรวมมีลักษณะคล้ายกับว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 3 มาก ส่วนที่แตกต่าง คือ ลักษณะของช่อดอก โดยลักษณะช่อดอกที่พบขณะนี้ พบทั้ง 4 ตัวอย่างได้แก่ ตัวอย่างที่ 14, 70, 80 และ 94 ลักษณะช่อดอกยาวประมาณ 15-20 เซนติเมตร ก้านช่อดอกสั้นประมาณ 2-5 เซนติเมตร ลักษณะรูปทรงช่อดอกคล้ายทรงกระบอกแคบ กลีบประดับตอนบนสีขาวแต้มสีชมพูอ่อน หรือสีชมพูอ่อนทั้งกลีบ กลีบประดับตอนล่างมีสีขาวแต้มสีชมพูอ่อน หรือสีขาวทั้งกลีบ มีดอกสีขาวแถบเหลืองเข้มอยู่ภายใน ขนาดของกลีบประดับตอนบนจะใหญ่กว่ากลีบประดับตอนล่าง จำนวนชั้นของกลีบประดับประมาณ 10-15 ชั้น (ภาพที่ 19)

ภาพที่ 18 ลักษณะหัวของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 4
(ตัวเลข คือ เลขที่ตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 1)

ภาพที่ 19 ลักษณะช่อดอกของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 4
(ตัวเลข คือ เลขที่ตัวอย่าง รายละเอียดดังตารางที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่ม พบว่า ตัวอย่างที่ใช้ศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับข้อมูลลายพิมพ์เอเอฟแอลพี โดยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่จะใช้แยกความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่าง ต้องใช้หลายลักษณะร่วมกันจึงจะแยกความแตกต่างได้ เช่น ใช้ลักษณะหัวร่วมกับลักษณะช่อดอก แยกความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างที่ 1 กับ 2 ออกจาก กลุ่มตัวอย่างที่ 3 กับ 4 เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ภาณี และคณะ (2548) ที่รายงานว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการปรากฏสีแดงบริเวณเส้นกลางใบ เพียงลักษณะเดียว ไม่สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างได้ ควรใช้ลักษณะหลาย ๆ ลักษณะในการจำแนก โดยเฉพาะลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอก

เมื่อนำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ศึกษาได้ในครั้งนี้ไปประบุชนิด โดยอ้างอิงจาก Flora of British India (Hooker, 1984), Flora of Java (Backer and Bakhuizen Van Den Brink, 1968) และ Taxonomy and Phylogeny of the Genus *Curcuma* L. (Zingiberaceae) with Particular Reference to Its Occurrence in Thailand (Maknoi, 2006) พบว่า สามารถระบุชนิดของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 3 และ 4 ได้เป็น *Curcuma comosa* Roxb. ส่วนว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ จึงระบุเป็น *Curcuma* sp. ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วิชุดา (2550) ที่ระบุชนิดของว่านชักมดลูกเป็น *Curcuma comosa* Roxb. และ *Curcuma* sp. เช่นกัน

ส่วนการศึกษาของ สนั่น และ ฉัตรชัย (2546) ที่รายงานว่า ว่านชักมดลูกมี 2 ชนิด คือ *Curcuma comosa* Roxb. และ *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. โดย *Curcuma comosa* Roxb. มีเนื้อในหัวสีเหลืองซีด เส้นกลางใบมีสีเขียว ไม่พบขนใต้แผ่นใบ ก้านใบยาว ช่อดอกเป็นแบบช่อเชิงลดแทงจากพื้นดิน ส่วน *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. เส้นกลางใบของหลังใบมีสีน้ำตาลอมแดง ใต้แผ่นใบมีขน ก้านใบสั้น ซึ่งพบว่าไม่สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ กล่าวคือ ว่านชักมดลูกกลุ่มที่สามารถระบุชนิดเป็น *Curcuma comosa* Roxb. ในการศึกษาครั้งนี้มีเส้นกลางใบสีแดงเมื่อตอนเป็นต้นอ่อน แต่เมื่อโตขึ้นสีแดงจะซีดจางลง ขณะที่ สนั่น และ ฉัตรชัย รายงานว่า *Curcuma comosa* Roxb. มีเส้นกลางใบสีเขียว ส่วน *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. ที่ สนั่น และ ฉัตรชัย ระบุว่าเป็นว่านชักมดลูกอีกชนิดหนึ่งนั้น พบว่าเมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างที่ศึกษาในครั้งนี้ไปเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิงที่ใช้ระบุชนิดของตัวอย่าง คือ Flora of British India (Hooker, 1984) และ Flora of Java (Backer and Bakhuizen Van Den Brink, 1968) และ Taxonomy and Phylogeny of the Genus *Curcuma* L. (Zingiberaceae) with Particular Reference to Its Occurrence in Thailand (Maknoi, 2006) พบว่า ข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างไม่สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. ที่ระบุในเอกสารดังกล่าว เช่น สีของเนื้อในหัว และการมีขนใต้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แผ่นใบ ในเอกสารระบุว่า *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. มีสีเนื้อในหัวสีเหลืองเข้มหรือสีส้มเข้ม มีขนใต้แผ่นใบ แต่ตัวอย่างที่ศึกษามีสีเนื้อในหัวสีเหลืองซีด และไม่มีขนใต้แผ่นใบ ฉะนั้นตัวอย่างที่ศึกษาในครั้งนี้จึงไม่น่าใช่ *Curcuma xanthorrhiza* Roxb.

ส่วนการศึกษาของ Soontornchainaksaeng and Jenjittikul (2010) ที่รายงานว่า ว่านชักมดลูกมี 3 ชนิด คือ ชนิด *Curcuma comosa* Roxb., *Curcuma elata* และ *Curcuma latifolia* โดยว่านชักมดลูกชนิด *Curcuma comosa* Roxb. จะมีก้านช่อดอกสั้น (2-5 ซม.) ไม่มีขนใต้แผ่นใบ แบ่งเป็น 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ที่มีลักษณะช่อดอกรูปทรงกระบอกแคบ และพันธุ์ที่มีช่อดอกรูปทรงกระบอกกว้าง ส่วน *Curcuma elata* และ *Curcuma latifolia* มีลักษณะที่เหมือนกัน คือ มีก้านช่อดอกยาว 10-25 เซนติเมตร มีขนใต้แผ่นใบ ส่วนที่ต่างกัน คือ *Curcuma latifolia* มีเส้นกลางใบสีแดง ส่วน *Curcuma elata* ไม่พบสีแดงที่เส้นกลางใบ ซึ่งพบว่าการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ เฉพาะส่วน *Curcuma comosa* Roxb. เท่านั้น ซึ่งคาดว่า *Curcuma comosa* Roxb.พันธุ์ที่มีช่อดอกรูปทรงกระบอกกว้างที่ Soontornchainaksaeng and Jenjittikul ระบุ น่าจะเป็นว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 3 ส่วน *Curcuma comosa* Roxb. พันธุ์ที่มีลักษณะช่อดอกรูปทรงกระบอกแคบ คาดว่าน่าจะเป็นว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 4 ของการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากมีลักษณะช่อดอกสอดคล้องกัน

ส่วน *Curcuma elata* และ *Curcuma latifolia* ที่ Soontornchainaksaeng and Jenjittikul รายงานว่าเป็นว่านชักมดลูกเช่นกันนั้น โดย *Curcuma elata* จะมีขนใต้แผ่นใบ แต่ไม่พบสีแดงที่เส้นกลางใบ ขณะที่ *Curcuma latifolia* มีขนใต้แผ่นใบ และพบสีแดงที่เส้นกลางใบ จะเห็นว่าลักษณะที่กล่าวมาทั้ง 2 สปีชีส์ ไม่สอดคล้องกับว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เพราะว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 ไม่พบขนที่ใต้แผ่นใบ จึงคาดว่าว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 น่าจะไม่ใช่ *Curcuma elata* และ *Curcuma latifolia* แต่พบว่าลักษณะของ *Curcuma latifolia* สอดคล้องกับลักษณะของตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งเป็นพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma* ที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูก จึงมีความเป็นไปได้ว่า Soontornchainaksaeng and Jenjittikul อาจเก็บรวบรวมตัวอย่างโดยพิจารณาจากการบริโภคเป็นหลัก เนื่องจากตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ของการศึกษาครั้งนี้ก็มีผู้บริโภคเช่นกัน แต่มีจำนวนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ก็อาจมีสรรพคุณทางยาคล้ายกับว่านชักมดลูกเช่นกัน ซึ่งควรจะศึกษาต่อไปในอนาคต ดังนั้น ขณะนี้จึงระบุชนิดของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 เป็น *Curcuma* sp. ไปก่อน เพื่อเก็บรวบรวมข้อมูลรายละเอียดและค้นคว้าเอกสารที่จะใช้ระบุชนิดเพิ่มเติมต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของช่อดอก ถึงแม้ว่าตัวอย่างแต่ละกลุ่มจะยังออกดอกไม่ครบ เนื่องจากว่านชักมดลูกเป็นพืชที่ออกดอกยาก ยกเว้นตัวอย่างกลุ่มที่ 4 ที่ออกดอกครบทุกตัวอย่างแล้ว จะพบว่าตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกันและถูกจัดให้อยู่ภายในกลุ่มเดียวกัน จะมีลักษณะช่อดอกใกล้เคียงหรือเหมือนกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่า ตัวอย่างที่เหลือที่ยังไม่ออกดอกจะมีลักษณะช่อดอกใกล้เคียงหรือเหมือนกับตัวอย่างที่ออกดอกแล้ว และมีความเป็นไปได้ว่าลักษณะช่อดอกที่ศึกษาได้ในแต่ละกลุ่ม อาจจะเป็นลักษณะประจำกลุ่มได้

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างที่ได้ทั้งหมดพบว่า กลุ่มตัวอย่างที่จำแนกได้ไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาที่รวบรวมตัวอย่าง กล่าวคือ ตัวอย่างที่เป็นว่านชักมดลูกทั้งกลุ่มที่ 1, 3 และ 4 พบกระจายทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย แต่ว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 ส่วนใหญ่จะพบมากที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางตอนบน ชี้ให้เห็นว่าผู้บริโภคว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 ส่วนใหญ่จะเป็นผู้บริโภคที่อาศัยอยู่ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางตอนบน ส่วนว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 3 และ 4 จะพบมากที่ภาคกลางตอนล่างและภาคใต้ สำหรับบางตัวอย่างที่มีลายพิมพ์เอเอฟแอลพีเหมือนกัน และมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม เท่ากับ 1 ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 16, 17, 18, 19, 21, 31, 36, 40, 41, 42, 43, 46, 47, 64, 68, 81, 82, 88, 89, 90 และ 92 ซึ่งเป็นตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 และตัวอย่างที่ 37, 38, 50, 51, 54, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 77 และ 78 ซึ่งเป็นตัวอย่างในกลุ่มที่ 3 พบว่าตัวอย่างดังกล่าวเก็บรวบรวมได้จากต่างพื้นที่ ต่างจังหวัด หรือต่างภูมิภาคกัน แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างดังกล่าว อาจเป็นพันธุ์ที่นิยมใช้และมีการซื้อขายทั่วไป ทำให้พบตัวอย่างดังกล่าวกระจายอยู่ในหลายพื้นที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างจำนวน 95 ตัวอย่าง จากแหล่งต่าง ๆ รวมทั้งสิ้น 38 จังหวัด ครอบคลุมทุกภูมิภาคของประเทศไทย พบว่ามี 90 ตัวอย่าง เป็นว่านชักมดลูก ซึ่งมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามแต่ละพื้นที่ เช่น ว่านชักมดลูก ว่านชักมดลูกตัวผู้ ว่านชักมดลูกตัวเมีย ว่านทรหด เป็นต้น การใช้ประโยชน์ก็แตกต่างกันไป เช่น ใช้ดองเหล้ากิน หรือตากให้แห้งแล้วบดเป็นผงใส่แคปซูล โดยนิยมใช้บำรุงรักษาอาการต่าง ๆ ในสตรีที่เกี่ยวกับมดลูก แต่บางรายใช้รักษาโรคริดสีดวงทวารด้วย ส่วนตัวอย่างอีก 5 ตัวอย่าง เป็นพืชที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูก เช่น ว่านหัวใหญ่ ซึ่งเป็นว่านที่พ่อค้าบางรายนิยมนำมาอ้างว่าเป็นว่านชักมดลูก เนื่องจากมีลักษณะคล้ายคลึงกับว่านชักมดลูกมาก

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่ามีไพรเมอร์ 9 คู่ไพร์เมอร์ จากจำนวน 35 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ชัดเจน และแสดงความแตกต่างของตัวอย่างแต่ละชนิดได้ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบรูปแบบและจำนวนแถบดีเอ็นเอ พบว่า ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เข้มชัดเจนทั้งสิ้น 202 แถบ เฉลี่ย 22.44 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้พอลิมอร์ฟิซึม 152 แถบ คิดเป็น 75.25% ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด มีค่า PICs อยู่ระหว่าง 0.00-0.50 โดยมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.25 เมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.20 k พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.57-1.00 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.79 เมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA และวิธี PCoA ที่มีองค์ประกอบหลักที่ 1, 2 และ 3 ครอบคลุมความแปรปรวน 63.74% , 7.53% และ 5.05% ของความแปรปรวนทั้งหมดตามลำดับ สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่สอดคล้องกัน โดยแบ่งเป็นว่านชักมดลูกได้ 3 กลุ่ม และพืชชนิดอื่นที่อยู่ในสกุล *Curcuma* ที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูก 1 กลุ่ม ซึ่งตัวอย่างกลุ่มที่ 1, 3 และ 4 จัดเป็นกลุ่มของว่านชักมดลูก ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 2 จัดเป็นพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma*

3. การวิเคราะห์ความน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่ม พบว่า การจัดกลุ่มที่ได้มีความน่าเชื่อถือสูง เนื่องจากมีค่า cophenetic correlation coefficient (r) เท่ากับ 0.9828 ซึ่งถือเป็นค่าที่สูง แสดงว่าการจัดกลุ่มอยู่ในเกณฑ์ดี และเมื่อวิเคราะห์ค่า bootstrap พบว่า ส่วนใหญ่มีค่า bootstrap สูงกว่า 50 % แสดงว่าข้อมูลลายพิมพ์เอเอฟแอลพีที่ได้ มีความน่าเชื่อถือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. จากข้อมูลลายพิมพ์เอแอฟแอลพี พบว่า สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจน สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการศึกษาในครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าเทคนิคเอเอฟแอลพี เป็นเทคนิคที่สามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม แยกความแตกต่างและจำแนกชนิดของว่านชักมดลูกได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว

5. การวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่า สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ สอดคล้องกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยลักษณะสัณฐานวิทยาที่เด่นชัดในแต่ละกลุ่มเป็นดังภาพที่ 20-22 และตารางที่ 6

6. จากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถใช้แยกความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 4 กลุ่มได้ดังนี้ ความแตกต่างของตัวอย่างกลุ่มที่ 1 และ 2 ต่างจากกลุ่มที่ 3 และ4 โดยพิจารณาจากลักษณะหัว ความสูงของลำต้นเทียม ซึ่งวัดจากพื้นดินถึงคอใบบนสุด และก้านช่อดอก โดยกลุ่มที่ 1 และ 2 หัวหลักจะมีเหง้าแขนงแตกออกทางด้านข้าง ลำต้นเทียมสูงประมาณ 60-80 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาวประมาณ 8-15 เซนติเมตร ส่วนกลุ่มที่ 3 และ 4 ไม่มีเหง้าแขนงแตกออกทางด้านข้าง ลำต้นเทียมสูงประมาณ 50-60 เซนติเมตร ก้านช่อดอกสั้นประมาณ 2-5 เซนติเมตร ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างกลุ่มที่ 1 กับ 2 ให้พิจารณาที่ขนใต้แผ่นใบ จำนวนชั้นกลีบประดับตอนบนเทียบกับกลีบประดับตอนล่าง และลักษณะปลายกลีบประดับ โดยกลุ่มที่ 1 จะไม่มีขนใต้แผ่นใบ จำนวนชั้นกลีบประดับตอนบนใกล้เคียง หรือน้อยกว่ากลีบประดับตอนล่าง ปลายกลีบประดับมน ส่วนกลุ่มที่ 2 มีขนใต้แผ่นใบ จำนวนชั้นกลีบประดับตอนบนน้อยกว่ากลีบประดับตอนล่าง ปลายกลีบประดับแหลม ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างกลุ่มที่ 3 กับ 4 พิจารณาได้จากลักษณะช่อดอก ขนาดกลีบประดับตอนบนเทียบกับกลีบประดับตอนล่าง และสีของดอกภายในกลีบประดับตอนล่าง โดยกลุ่มที่ 3 ช่อดอกมีลักษณะคล้ายทรงกระบอกกว้าง กลีบประดับตอนบนมีขนาดใกล้เคียงกับกลีบประดับตอนล่าง สีของดอกภายในกลีบประดับตอนล่างมีสีเหลืองอ่อนแถบตรงกลางสีเหลืองเข้ม ส่วนกลุ่มที่ 4 ช่อดอกมีลักษณะคล้ายทรงกระบอกแคบ กลีบประดับตอนบนใหญ่กว่ากลีบประดับตอนล่าง สีของดอกภายในกลีบประดับตอนล่างมีสีขาวแถบตรงกลางสีเหลืองเข้ม

7. เมื่อนำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ได้ไปประบุชนิด โดยอ้างอิงจาก The Flora Indica (Roxburgh, 1971), Flora of British India (Hooker, 1984), Flora of Java (Backer and Bakhuizen Van Den Brink, 1968) และ Taxonomy and Phylogeny of the Genus *Curcuma* L. (Zingiberaceae) with Particular Reference to Its Occurrence in Thailand (Maknoi, 2006) พบว่า สามารถระบุชนิดของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 3 และ 4 ได้เป็น *Curcuma comosa* Roxb. ส่วนว่าน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชักมดลูกกลุ่มที่ 1 ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ เนื่องจากเมื่อนำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 ไปเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Curcuma* ชนิดต่าง ๆ ที่ระบุอยู่ในเอกสารอ้างอิงที่ใช้ระบุชนิดดังกล่าวข้างต้น พบว่า ข้อมูลไม่สอดคล้องกับ *Curcuma* ชนิดใดเลยจึงระบุว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 เป็น *Curcuma* sp. ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 2 คาดว่าไม่จัดเป็นว่านชักมดลูก เนื่องจากตัวอย่างกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ และถูกจัดกลุ่มให้อยู่ในกลุ่มเดียวกับว่านหัวใหญ่ ซึ่งเป็นว่านที่ไม่ใช่ว่านชักมดลูก เนื่องจากมีสรรพคุณในการรักษาแตกต่างจากว่านชักมดลูก เพียงแต่ว่านหัวใหญ่มีลักษณะคล้ายคลึงกับว่านชักมดลูกมากเท่านั้น อีกทั้งตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ยังมีผู้บริโภคบริโภคน้อยกว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างกลุ่มที่ 1, 3 และ 4

ภาพที่ 20 ลักษณะหัวของตัวอย่าง 4 กลุ่ม

(A) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 1

(B) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 2

(C) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 3

(D) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 21 ลักษณะช่อดอกของตัวอย่าง 4 กลุ่ม

(A) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 1แบบที่ 1

(B) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 1แบบที่ 2

(C) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 2

(D) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 3

(E) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 4

ภาพที่ 22 ลักษณะดอก (flower) ที่อยู่ภายในกลีบประดับตอนล่าง

(A) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 1

(B) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 2

(C) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 3

(D) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาที่เด่นชัดของตัวอย่างแต่ละกลุ่ม

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2 (*Curcuma* sp.)	ว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 3	ว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 4
รูปร่างหัว	หัวหลักกลม มีการแตกเหง้าแขนงทางด้านข้าง	หัวหลักกลม มีการแตกเหง้าแขนงทางด้านข้าง	หัวหลักกลม ไม่มีการแตกเหง้าแขนงทางด้านข้าง	หัวหลักกลม ไม่มีการแตกเหง้าแขนงทางด้านข้าง
สีเนื้อในหัว	สีเหลืองซีด มีใย	สีเหลืองซีด มีใย	สีเหลืองซีด	สีเหลืองซีด
สีเส้นกลางใบ	สีแดง เมื่อใบแก่สีแดงจางลง	ไม่มีสี	สีแดง เมื่อใบแก่สีแดงจางลง	สีแดง เมื่อใบแก่สีแดงจางลง
ขนใต้แผ่นใบ	ไม่มีขน	มีขน	ไม่มีขน	ไม่มีขน
ช่อดอก	มีก้านช่อดอกยาวประมาณ 8-15 ซม.	มีก้านช่อดอกยาวประมาณ 10-13 ซม.	ก้านช่อดอกสั้นลักษณะช่อดอกคล้ายทรงกระบอกกว้าง	ก้านช่อดอกสั้นลักษณะช่อดอกคล้ายทรงกระบอกแคบ
กลีบประดับตอนบน (coma bract)	สีขาวแต้มสีชมพูหรือสีชมพูทั้งกลีบ ปลายกลีบประดับมน	สีขาวแต้มสีชมพู หรือสีชมพูทั้งกลีบ ปลายกลีบประดับแหลม	สีขาวแต้มสีชมพู หรือสีชมพูทั้งกลีบ ปลายกลีบประดับมน	สีขาวแต้มสีชมพูอ่อน หรือสีชมพูอ่อนทั้งกลีบปลายกลีบประดับมน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2 (*Curcuma* sp.)	ว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 3	ว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 4
กลีบประดับตอนล่าง (flower bract)	สีเขียวอ่อนแต้มสีชมพู หรือ สีเขียวอ่อน หรือสีขาวทั้งกลีบ	สีเขียวอ่อนแต้มสีชมพู หรือ สีเขียวอ่อนทั้งกลีบ	สีขาวแต้มสีชมพู หรือสีขาวทั้งกลีบ	สีขาวแต้มสีชมพูอ่อน หรือ สีขาวทั้งกลีบ
ดอก (flower)	ดอกสีเหลืองอ่อนแถบตรงกลางสีเหลืองเข้ม	ดอกสีเหลืองอ่อนแถบตรงกลางสีเหลืองเข้ม	ดอกสีเหลืองอ่อนแถบตรงกลางสีเหลืองเข้ม	ดอกสีขาวแถบตรงกลางสีเหลืองเข้ม
จำนวนชั้นกลีบประดับ	10-15 ชั้น จำนวนชั้นกลีบประดับตอนบนใกล้เคียงหรือน้อยกว่ากลีบประดับตอนล่าง	10-13 ชั้น จำนวนชั้นกลีบประดับตอนบนน้อยกว่ากลีบประดับตอนล่าง	10-12 ชั้น จำนวนชั้นกลีบประดับตอนบนใกล้เคียงกับกลีบประดับตอนล่าง	10-15 ชั้น จำนวนชั้นกลีบประดับตอนบนใกล้เคียงกับกลีบประดับตอนล่าง
ความสูง	66-75 ซม.	70-87 ซม.	56-60 ซม.	55-63 ซม.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. การระบุชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง และการระบุลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เป็นลักษณะเฉพาะประจำกลุ่มย่อย จำเป็นต้องศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเพิ่มเติม เช่น ลักษณะดอก เกสรตัวผู้ เกสรตัวเมีย รังไข่ เป็นต้น เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องชัดเจนมากขึ้น

2. ควรหาวิธีกระตุ้นให้ว่านชักมดลูกออกดอก เพื่อประโยชน์ในการจัดจำแนกชนิดของ ว่านชักมดลูก นอกจากนั้นดอกของว่านชักมดลูกยังมีลักษณะที่สวยงาม อาจส่งเสริมและพัฒนาไปเป็นไม้ดอกไม้ประดับเหมือนดอกปทุมมาได้เนื่องจากเป็นพืชในสกุลเดียวกัน

3. ควรศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างทุกกลุ่ม เพื่อใช้เป็นข้อมูลร่วมในการจัดจำแนกชนิดของตัวอย่างว่ามีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้หรือไม่

4. ว่านชักมดลูกมีความหลากหลายทางพันธุกรรมและสามารถแบ่งเป็นกลุ่มต่าง ๆ ได้ จึงมีความเป็นไปได้ว่า ตัวอย่างคนละกลุ่มอาจมีชนิดและปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกัน ดังนั้น จึงควรศึกษาหาปริมาณสารสำคัญ สารพิษ รวมทั้งฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ของว่านชักมดลูกทุกกลุ่ม เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ว่านชักมดลูกที่มีปริมาณสารสำคัญสูง ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และสรรพคุณในการรักษาที่ดี มีความเป็นพิษต่ำหรือไม่มีพิษเลย เพื่อความปลอดภัยและประโยชน์สูงสุดของผู้บริโภค

5. ควรศึกษาหาปริมาณสารสำคัญ สารพิษ รวมทั้งฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ของตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นพืชที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูก อีกทั้งมีบริโภคบางกลุ่มนำไปบริโภค จึงมีความเป็นไปได้ว่าพืชกลุ่มนี้อาจมีสรรพคุณทางยาที่ดีได้ จึงควรศึกษาหาปริมาณสารสำคัญ สารพิษ รวมทั้งฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา เพื่อประโยชน์และความปลอดภัยของผู้บริโภคเช่นกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษณา วงศ์ปัญญา. 2548. **การจำแนกสายพันธุ์ข่าโดยเทคนิค AFLP**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จินตนา อิงคนินันท์. 2549. **เอกสารประกอบคำสอนวิชาการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

ชมรมว่านมหาเศรษฐี. 2549. **ตำนานว่านไทย**. สำนักพิมพ์กู๊ดมอร์นิ่ง, กรุงเทพฯ.

โชติอนันต์ อินทุใสตระกูล. 2550. **ว่านสมุนไพร เพื่อสุขภาพ เสริมมงคลชีวิต**. สำนักพิมพ์อนิเมทกรุ๊ป, กรุงเทพฯ.

เต็ม สมิตินันท์. 2544. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย**. บริษัทประชาชนจำกัด, กรุงเทพฯ.

บุญค้ำ ไชยพรหมวงศา. ม.ป.ป. **คู่มือ เซียนว่าน**. สำนักพิมพ์อินทรีย์, กรุงเทพฯ.

ภาณี ทองพำนัก, อาสาฬหะ พัฒนธารา, บังอร ยิ้มแย้ม และ สุดใจ ล้อเจริญ. 2548. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมว่านชักมดลูก (พืชวงศ์ขิง) ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, น. 346-351. *ใน* **การประชุมวิชาการประจำปีทรัพยากรไทย: สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว ครั้งที่ 2**. อาคารประชุม 2 ศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ คลองไผ่, นครราชสีมา.

รังสัน หล้าพรมหม และ สุจิตรา จางตระกูล. 2547. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไผ่บางชนิดในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค AFLP, น. 166-172. *ใน* **การประชุมเชิงปฏิบัติการ: ความหลากหลายทางชีวภาพ งานวิจัยจากอดีตสู่อนาคต** วันที่ 30 สิงหาคม - 2 กันยายน 2547. โรงแรมเวียงอินทร์, เชียงราย.

เลื่อน กัณหะกาญจนะ. 2523. **ตำราคุณลักษณะว่าน และวิธีปลูกว่าน**. พิมพ์ครั้งที่ 5 สำนักพิมพ์แพร่วิทยา, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิชุดา พิพิธพิบูลย์สุข. 2550. **การพิสูจน์เอกลักษณ์และการจัดทำข้อกำหนดของว่านชักมดลูกในประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.

สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนวิมลมังคลาราม. 2520. **ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาคสาม) ว่าด้วยพฤกษชาติวัตถุธาตุและสัตว์วัตถุนานาชนิด**. ไพศิลป์การพิมพ์, กรุงเทพฯ.

สนั่น ศุภธีรสกุล และ ฉัตรชัย วัฒนาภิรมย์สกุล. 2546. **ว่านชักมดลูก**. บทความประจำเดือนกันยายน 2546 ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุนทรี สิงหบุตรา. 2535. **สรรพคุณสมุนไพร 200 ชนิด**. โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮ้าส์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อภิชาติ ศรีสอาด. 2550. **คู่มือ 'ว่านมงคล'**. สำนักพิมพ์นาคา อินเตอร์มีเดีย จำกัด, กรุงเทพฯ.

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

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

Anonymous. 2003. **Genetic diversity analysis with molecular marker data: Measures of genetic diversity**. IPGRI and Cornell University.

Apavatjrut, P., S. Anuntalabhochai, P. Sirirugsa and C. Alisi. 1999. Molecular marker in the identification of some early flowering *Curcuma* L. (Zingiberaceae) species. **Ann. Bot.** 84: 529-534.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Brown, S.M., A.K. Szewe-McFadden and S. Kresovish. 1996. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis, pp. 147-159. *In* P.P. Jauhar, ed. **Methods of Plant Genome Analysis: Their Merits and Pitfalls**. CRS Press, Bocaraton, FL.

Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology** 26: 297-302.

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

Hu, J. and B.A. Vick. 2003. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Mol. Biol. Rept**. 21: 289-294.

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

Jantaratnotai, N., P. Utaisincharoen, P. Piyachaturawat, S. Chongthammakun and Y. Sanvarinda. 2006. Inhibitory effect of *Curcuma comosa* on NO production and cytokine expression in LPS-activated microglia. **Life Sci**. 78: 571-577.

Jurgens, T.M., E.G. FraZier, J.M. Schaeffer, T.E. Jones, D.L. Zink, R.P. Borris, W. Nanakorn, H.T. Beck and M.J. Balick. 1994. Novel nematocidal agents from *Curcuma comosa*. **J. Nature Prod**. 57: 230-235.

Kokotovic, B., N.F. Friis, J.S. Jensen and P. Ahrens. 1999. Amplified fragment length polymorphism fingerprint of *Mycoplasma* species. **J. Clin. Microbiol**. 37: 3300-3307.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Li, G. and C.F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theor. Appl. Genet**. 103: 455-461.

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

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

McCouch, S. and S.D. Tankslay. 1991. Development and use of restriction fragment length poltmorphism in rice breeding and genetic, pp. 109-133. *In* G.S. Khush and G.H. Toennicssen, eds. **Rice Biotechnology**. CAB International, Wallingford, Oxon.

Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical mode for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 76: 5269-5237.

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

Piyachaturawat, P., N. Teeratagolpisal, C. Toskulkao and A. Suksamrarn. 1995a. Hypolipidemic effect of *Curcuma comosa* in mice. **Artery** 22: 233-241.

______, S. Ercharuporn and A. Suksamrarn. 1995b. An estrogenic activity of *Curcuma comosa* extract in rats. **Asia Pacific J. Pharmacol**. 10: 121-126.

______, ______ and ______. 1995c. An uterotropic effect of *Curcuma comosa* extract in rats. **Int. J. Pharmacog**. 33: 334-338.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Piyachaturawat, P., A. Timinkul, A. Chuncharunee and A. Suksamrarn. 1998. Growth suppressing effect of *Curcuma comosa* extract on male reproductive organs in immature rats. **Pharmaceutical Biolo**. 36: 44-49.

_______, _______, _______ and _______ . 1999a. Effect of *Curcuma comosa* extract on male fertility in rats. **Pharmaceutical Biolo**. 37: 22-27.

_______, J. Charoenpiboonsin, C. Toskulkao and A. Suksamrarn. 1999b. Reduction of plasma cholesterol by *Curcuma comosa* extract in hypercholesterolaemic hamsters. **J. Ethnopharmacol**. 66: 199-204.

Powell, W., C. Machray and J. Provan. 1996a. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Sci**. 1: 215-222.

_______, M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996b. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSRs markers for germplasm analysis. **Mol. Breed**. 2: 225-238.

Rohlf, F.I. 2009. **NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.2 Exeter Software**. Setauket, New York.

Roxburgh W. 1971. **Flora Indica: Descriptions of Indica Plants**. Today & Tomorrow's Printers & Publishers, New Delhi.

Saliba, V.C., M. Causse, L. Gervais and J. Philouze. 2000. Efficiency of RFLP, RAPD and AFLP makers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. **Genome** 43: 29-40.

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Sodsai, A., P. Piyachaturawat, S. Sophasan, A. Suksamrarn and M. Vongsakul. 2007. Suppression by *Curcuma comosa* Roxb. of pro-inflammatory cytokine secretion in phorbol-12-myristate-13-acetate stimulated human mononuclear cells. **Int. Immunopharmacol**. 7: 524-531.

Sokal, R.R. and C.D. Michener. 1958. A statistic method for evaluating systematic relationships. **Univ. Kansas Sci. Bul**. 28: 1409-1438.

_______ and J. Rohlf. 1994. **Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research**. 3rd ed. Freeman & Co, New York.

Soontronchainaksaeng, P. and T. Jenjittikul. 2010. Chromosome number variation of phytoestrogen-producing *Curcuma* (Zingiberaceae) from Thailand. **J. Nat. Med**. 10:1-8.

Suksamrarn, A., S. Eiamong, P. Piyachaturawat and L.T. Byrne. 1997. A phloracetophenone glucoside with choleretic activity from *Curcuma comosa*. **J. Phytochemistry** 45: 103-105.

_______ , M. Ponglikitmongkol, K. Wongkrajang, A. Chindaduang, S. Kittidanairak, A. Jankam, B. Yingyongnarongkul, N. Kittipanumat, R. Chokchaisiri, P. Khetkam and P. Piyachaturawat. 2008. Diarylheptanoid, new phytoestrogens from the rhizomes of *Curcuma comosa*: isolation, chemical modification and estrogenic activity evaluation. **Bioorg. Med. Chem**. 16: 6891-6902.

Tankslay, S.D., N.D. Young, A.H. Paterson and M.W. Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. **Biotechnology** 7: 257-264.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Techaprasan, J., S. Klinbunga and T. Jenjittikul. 2008. Genetic relationship and species authentication of *Boesenbergia* (Zingiberaceae) in Thailand based on AFLP and SSCP analyses. **Biochem. Syst. Ecol**. 36: 408-416.

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

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.U. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res**. 8: 6531-6535.

Yap, V. and R.J. Nelson. 1996. **Winboot: A Program for Performing Bootstrap Analysis of Binary Data to Determine the Confidence Limits of UPGMA-Based Dendrograms**. IRRI, Philippines.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของตัวอย่างจำนวน 95 ตัวอย่างที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี คำนวณด้วยวิธี Dice's coefficient โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc version 2.20k

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	1.0000															
2	1.0000	1.0000														
3	1.0000	1.0000	1.0000													
4	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000												
5	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000											
6	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000										
7	0.6116	0.6116	0.6116	0.6116	0.6116	0.6116	1.0000									
8	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	0.6116	1.0000								
9	0.6058	0.6058	0.6058	0.6058	0.6058	0.6058	0.9767	0.6058	1.0000							
10	0.9963	0.9963	0.9963	0.9963	0.9963	0.9963	0.6058	0.9963	0.6000	1.0000						
11	0.6083	0.6083	0.6083	0.6083	0.6083	0.6083	0.9720	0.6083	0.9859	0.6025	1.0000					
12	0.9850	0.9850	0.9850	0.9850	0.9850	0.9850	0.6083	0.9850	0.6025	0.9811	0.6050	1.0000				
13	0.6230	0.6230	0.6230	0.6230	0.6230	0.6230	0.9541	0.6230	0.9585	0.6173	0.9537	0.6281	1.0000			
14	0.7381	0.7381	0.7381	0.7381	0.7381	0.7381	0.7522	0.7381	0.7467	0.7331	0.7321	0.7440	0.7719	1.0000		
15	0.6452	0.6452	0.6452	0.6452	0.6452	0.6452	0.9459	0.6452	0.9593	0.6397	0.9636	0.6423	0.9732	0.7500	1.0000	
16	0.9779	0.9779	0.9779	0.9779	0.9779	0.9779	0.6341	0.9779	0.6286	0.9742	0.6311	0.9630	0.6452	0.7422	0.6667	1.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
17	0.9779	0.9779	0.9779	0.9779	0.9779	0.9779	0.6341	0.9779	0.6286	0.9742	0.6311	0.9630	0.6452	0.7422	0.6667	1.0000
18	0.9779	0.9779	0.9779	0.9779	0.9779	0.9779	0.6341	0.9779	0.6286	0.9742	0.6311	0.9630	0.6452	0.7422	0.6667	1.0000
19	0.9742	0.9742	0.9742	0.9742	0.9742	0.9742	0.6367	0.9742	0.6311	0.9704	0.6337	0.9591	0.6478	0.7451	0.6614	0.9964
20	0.6452	0.6452	0.6452	0.6452	0.6452	0.6452	0.9459	0.6452	0.9502	0.6397	0.9455	0.6423	0.9643	0.7672	0.9825	0.6667
21	0.9742	0.9742	0.9742	0.9742	0.9742	0.9742	0.6367	0.9742	0.6311	0.9704	0.6337	0.9591	0.6478	0.7451	0.6614	0.9964
22	0.8213	0.8213	0.8213	0.8213	0.8213	0.8213	0.6920	0.8213	0.6780	0.8168	0.6809	0.8199	0.6946	0.8340	0.6996	0.8165
23	0.9630	0.9630	0.9630	0.9630	0.9630	0.9630	0.6311	0.9630	0.6337	0.9591	0.6281	0.9552	0.6504	0.7559	0.6560	0.9854
24	0.6260	0.6260	0.6260	0.6260	0.6260	0.6260	0.9455	0.6260	0.9498	0.6204	0.9541	0.6311	0.9820	0.7652	0.9823	0.6480
25	0.6452	0.6452	0.6452	0.6452	0.6452	0.6452	0.9369	0.6452	0.9412	0.6397	0.9455	0.6423	0.9643	0.7672	0.9737	0.6667
26	0.6478	0.6478	0.6478	0.6478	0.6478	0.6478	0.9321	0.6478	0.9364	0.6423	0.9406	0.6449	0.9596	0.7619	0.9692	0.6693
27	0.9670	0.9670	0.9670	0.9670	0.9670	0.9670	0.6397	0.9670	0.6341	0.9632	0.6367	0.9520	0.6506	0.7549	0.6719	0.9819
28	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.6116	0.9851	0.6058	0.9813	0.6083	0.9774	0.6311	0.7460	0.6452	0.9632
29	0.9925	0.9925	0.9925	0.9925	0.9925	0.9925	0.6198	0.9925	0.6141	0.9888	0.6167	0.9774	0.6311	0.7381	0.6532	0.9706
30	0.9850	0.9850	0.9850	0.9850	0.9850	0.9850	0.6167	0.9850	0.6109	0.9811	0.6134	0.9773	0.6364	0.7440	0.6504	0.9630
31	0.9888	0.9888	0.9888	0.9888	0.9888	0.9888	0.6141	0.9888	0.6083	0.9850	0.6109	0.9811	0.6337	0.7410	0.6478	0.9668
32	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.6198	0.9851	0.6141	0.9813	0.6167	0.9774	0.6393	0.7381	0.6532	0.9632

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
33	0.5872	0.5872	0.5872	0.5872	0.5872	0.5872	0.9282	0.5872	0.9423	0.5812	0.9275	0.5837	0.9194	0.7215	0.9116	0.6109
34	0.6126	0.6126	0.6126	0.6126	0.6126	0.6126	0.8673	0.6126	0.8615	0.6063	0.8454	0.6000	0.8283	0.7379	0.8218	0.6195
35	0.9813	0.9813	0.9813	0.9813	0.9813	0.9813	0.6224	0.9813	0.6167	0.9774	0.6192	0.9736	0.6337	0.7410	0.6478	0.9594
36	0.9888	0.9888	0.9888	0.9888	0.9888	0.9888	0.6141	0.9888	0.6083	0.9850	0.6109	0.9811	0.6337	0.7410	0.6478	0.9668
37	0.5847	0.5847	0.5847	0.5847	0.5847	0.5847	0.9333	0.5847	0.9474	0.5787	0.9327	0.5812	0.9245	0.7364	0.9167	0.6083
38	0.5847	0.5847	0.5847	0.5847	0.5847	0.5847	0.9333	0.5847	0.9474	0.5787	0.9327	0.5812	0.9245	0.7364	0.9167	0.6083
39	0.7529	0.7529	0.7529	0.7529	0.7529	0.7529	0.6463	0.7529	0.6404	0.7480	0.6432	0.7510	0.6407	0.6862	0.6298	0.7336
40	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.6116	0.9851	0.6058	0.9813	0.6083	0.9774	0.6311	0.7381	0.6452	0.9632
41	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.6116	0.9851	0.6058	0.9813	0.6083	0.9774	0.6311	0.7381	0.6452	0.9632
42	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.6116	0.9851	0.6058	0.9813	0.6083	0.9774	0.6311	0.7381	0.6452	0.9632
43	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.9851	0.6116	0.9851	0.6058	0.9813	0.6083	0.9774	0.6311	0.7381	0.6452	0.9632
44	0.5907	0.5907	0.5907	0.5907	0.5907	0.5907	0.9289	0.5907	0.9429	0.5847	0.9282	0.5872	0.9296	0.7421	0.9217	0.6141
45	0.5897	0.5897	0.5897	0.5897	0.5897	0.5897	0.9135	0.5897	0.9275	0.5837	0.9126	0.5862	0.9143	0.7431	0.9065	0.6050
46	0.9888	0.9888	0.9888	0.9888	0.9888	0.9888	0.6058	0.9888	0.6000	0.9850	0.6025	0.9811	0.6255	0.7410	0.6397	0.9668
47	0.9888	0.9888	0.9888	0.9888	0.9888	0.9888	0.6058	0.9888	0.6000	0.9850	0.6025	0.9811	0.6255	0.7410	0.6397	0.9668
48	0.7969	0.7969	0.7969	0.7969	0.7969	0.7969	0.6723	0.7969	0.6581	0.7923	0.6609	0.7876	0.6667	0.7347	0.6639	0.7774

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
49	0.7500	0.7500	0.7500	0.7500	0.7500	0.7500	0.6522	0.7500	0.6463	0.7451	0.6404	0.7402	0.6552	0.6917	0.6441	0.7308
50	0.5966	0.5966	0.5966	0.5966	0.5966	0.5966	0.9245	0.5966	0.9384	0.5907	0.9238	0.5932	0.9252	0.7477	0.9174	0.6198
51	0.5966	0.5966	0.5966	0.5966	0.5966	0.5966	0.9245	0.5966	0.9384	0.5907	0.9238	0.5932	0.9252	0.7477	0.9174	0.6198
52	0.9542	0.9542	0.9542	0.9542	0.9542	0.9542	0.6186	0.9542	0.6128	0.9502	0.6239	0.9615	0.6303	0.7398	0.6446	0.9323
53	0.9582	0.9582	0.9582	0.9582	0.9582	0.9582	0.6076	0.9582	0.6102	0.9618	0.6043	0.9502	0.6109	0.7206	0.6255	0.9438
54	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.9140	0.6316	0.9273	0.6260	0.9132	0.6286	0.8969	0.7359	0.8987	0.6534
55	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.9140	0.6316	0.9273	0.6260	0.9132	0.6286	0.8969	0.7359	0.8987	0.6534
56	0.7674	0.7674	0.7674	0.7674	0.7674	0.7674	0.6552	0.7674	0.6494	0.7626	0.6609	0.7578	0.6496	0.7107	0.6555	0.7557
57	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.9140	0.6316	0.9273	0.6260	0.9132	0.6286	0.8969	0.7359	0.8987	0.6534
58	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.9140	0.6316	0.9273	0.6260	0.9132	0.6286	0.8969	0.7359	0.8987	0.6534
59	0.7645	0.7645	0.7645	0.7645	0.7645	0.7645	0.6524	0.7645	0.6466	0.7597	0.6580	0.7549	0.6468	0.7078	0.6527	0.7529
60	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.9140	0.6316	0.9273	0.6260	0.9132	0.6286	0.8969	0.7359	0.8987	0.6534
61	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.9140	0.6316	0.9273	0.6260	0.9132	0.6286	0.8969	0.7359	0.8987	0.6534
62	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.6316	0.9140	0.6316	0.9273	0.6260	0.9132	0.6286	0.8969	0.7359	0.8987	0.6534
63	0.9542	0.9542	0.9542	0.9542	0.9542	0.9542	0.5932	0.9542	0.5957	0.9579	0.5897	0.9462	0.6050	0.7398	0.6198	0.9398
64	0.9660	0.9660	0.9660	0.9660	0.9660	0.9660	0.6025	0.9660	0.6050	0.9697	0.5992	0.9582	0.6141	0.7470	0.6286	0.9517

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
65	0.9734	0.9734	0.9734	0.9734	0.9734	0.9734	0.5992	0.9734	0.6017	0.9771	0.5957	0.9655	0.6109	0.7368	0.6255	0.9513
66	0.9621	0.9621	0.9621	0.9621	0.9621	0.9621	0.5966	0.9621	0.5992	0.9658	0.5932	0.9542	0.6083	0.7419	0.6230	0.9478
67	0.9695	0.9695	0.9695	0.9695	0.9695	0.9695	0.5932	0.9695	0.5957	0.9732	0.5897	0.9615	0.6050	0.7317	0.6198	0.9474
68	0.9660	0.9660	0.9660	0.9660	0.9660	0.9660	0.6025	0.9660	0.6050	0.9697	0.5992	0.9582	0.6141	0.7470	0.6286	0.9517
69	0.9582	0.9582	0.9582	0.9582	0.9582	0.9582	0.5992	0.9582	0.6017	0.9618	0.5957	0.9502	0.6109	0.7368	0.6255	0.9438
70	0.7083	0.7083	0.7083	0.7083	0.7083	0.7083	0.7196	0.7083	0.7230	0.7029	0.7075	0.7059	0.7037	0.8661	0.6909	0.7049
71	0.6341	0.6341	0.6341	0.6341	0.6341	0.6341	0.9091	0.6341	0.9224	0.6286	0.9083	0.6230	0.8919	0.7304	0.8938	0.6560
72	0.9585	0.9585	0.9585	0.9585	0.9585	0.9585	0.6025	0.9585	0.6050	0.9621	0.5992	0.9506	0.6141	0.7390	0.6286	0.9442
73	0.9585	0.9585	0.9585	0.9585	0.9585	0.9585	0.6109	0.9585	0.6134	0.9621	0.6076	0.9506	0.6224	0.7470	0.6367	0.9442
74	0.6230	0.6230	0.6230	0.6230	0.6230	0.6230	0.9083	0.6230	0.9309	0.6173	0.9167	0.6281	0.9000	0.7368	0.9018	0.6452
75	0.9736	0.9736	0.9736	0.9736	0.9736	0.9736	0.6192	0.9736	0.6134	0.9773	0.6076	0.9582	0.6307	0.7390	0.6449	0.9517
76	0.8462	0.8462	0.8462	0.8462	0.8462	0.8462	0.6667	0.8462	0.6781	0.8494	0.6724	0.8295	0.6864	0.7377	0.7000	0.8409
77	0.6204	0.6204	0.6204	0.6204	0.6204	0.6204	0.9132	0.6204	0.9266	0.6148	0.9124	0.6255	0.8959	0.7424	0.8978	0.6426
78	0.6204	0.6204	0.6204	0.6204	0.6204	0.6204	0.9132	0.6204	0.9266	0.6148	0.9124	0.6255	0.8959	0.7424	0.8978	0.6426
79	0.9773	0.9773	0.9773	0.9773	0.9773	0.9773	0.5966	0.9773	0.5992	0.9810	0.5932	0.9618	0.6167	0.7419	0.6311	0.9552
80	0.7190	0.7190	0.7190	0.7190	0.7190	0.7190	0.7222	0.7190	0.7349	0.7137	0.7196	0.7167	0.7064	0.8407	0.7027	0.7073

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
81	0.9811	0.9811	0.9811	0.9811	0.9811	0.9811	0.6025	0.9811	0.6050	0.9848	0.5992	0.9658	0.6224	0.7470	0.6367	0.9591
82	0.9811	0.9811	0.9811	0.9811	0.9811	0.9811	0.6025	0.9811	0.6050	0.9848	0.5992	0.9658	0.6224	0.7470	0.6367	0.9591
83	0.9736	0.9736	0.9736	0.9736	0.9736	0.9736	0.6109	0.9736	0.6134	0.9773	0.6076	0.9582	0.6307	0.7470	0.6449	0.9517
84	0.9774	0.9774	0.9774	0.9774	0.9774	0.9774	0.6083	0.9774	0.6109	0.9811	0.6050	0.9621	0.6281	0.7440	0.6423	0.9556
85	0.9773	0.9773	0.9773	0.9773	0.9773	0.9773	0.6050	0.9773	0.6076	0.9810	0.6017	0.9618	0.6250	0.7500	0.6393	0.9552
86	0.8784	0.8784	0.8784	0.8784	0.8784	0.8784	0.6463	0.8784	0.6316	0.8819	0.6344	0.8696	0.6494	0.7531	0.6638	0.8571
87	0.6000	0.6000	0.6000	0.6000	0.6000	0.6000	0.9159	0.6000	0.9202	0.5941	0.9057	0.6050	0.8981	0.7321	0.8909	0.6230
88	0.9848	0.9848	0.9848	0.9848	0.9848	0.9848	0.6050	0.9848	0.6076	0.9886	0.6017	0.9695	0.6250	0.7419	0.6393	0.9627
89	0.9848	0.9848	0.9848	0.9848	0.9848	0.9848	0.6050	0.9848	0.6076	0.9886	0.6017	0.9695	0.6250	0.7419	0.6393	0.9627
90	0.9848	0.9848	0.9848	0.9848	0.9848	0.9848	0.6050	0.9848	0.6076	0.9886	0.6017	0.9695	0.6250	0.7419	0.6393	0.9627
91	0.9810	0.9810	0.9810	0.9810	0.9810	0.9810	0.6076	0.9810	0.6102	0.9847	0.6043	0.9655	0.6276	0.7449	0.6420	0.9588
92	0.9848	0.9848	0.9848	0.9848	0.9848	0.9848	0.6050	0.9848	0.6076	0.9886	0.6017	0.9695	0.6250	0.7419	0.6393	0.9627
93	0.9810	0.9810	0.9810	0.9810	0.9810	0.9810	0.6076	0.9810	0.6102	0.9847	0.6043	0.9655	0.6276	0.7449	0.6420	0.9588
94	0.7426	0.7426	0.7426	0.7426	0.7426	0.7426	0.6730	0.7426	0.6762	0.7458	0.6603	0.7489	0.6573	0.8416	0.6544	0.7303
95	0.9736	0.9736	0.9736	0.9736	0.9736	0.9736	0.5941	0.9736	0.5966	0.9773	0.5907	0.9582	0.6141	0.7470	0.6286	0.9517

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
17	1.0000															
18	1.0000	1.0000														
19	0.9964	0.9964	1.0000													
20	0.6667	0.6667	0.6614	1.0000												
21	0.9964	0.9964	1.0000	0.6614	1.0000											
22	0.8165	0.8165	0.8120	0.7078	0.8120	1.0000										
23	0.9854	0.9854	0.9890	0.6560	0.9890	0.8075	1.0000									
24	0.6480	0.6480	0.6506	0.9735	0.6506	0.6888	0.6452	1.0000								
25	0.6667	0.6667	0.6693	0.9649	0.6693	0.6996	0.6640	0.9823	1.0000							
26	0.6693	0.6693	0.6720	0.9604	0.6720	0.6942	0.6667	0.9778	0.9956	1.0000						
27	0.9819	0.9819	0.9783	0.6719	0.9783	0.8134	0.9745	0.6534	0.6719	0.6746	1.0000					
28	0.9632	0.9632	0.9594	0.6452	0.9594	0.8137	0.9481	0.6341	0.6452	0.6478	0.9524	1.0000				
29	0.9706	0.9706	0.9668	0.6532	0.9668	0.8137	0.9556	0.6341	0.6532	0.6559	0.9597	0.9925	1.0000			
30	0.9630	0.9630	0.9591	0.6504	0.9591	0.8046	0.9478	0.6393	0.6504	0.6531	0.9520	0.9925	0.9925	1.0000		
31	0.9668	0.9668	0.9630	0.6478	0.9630	0.8092	0.9517	0.6367	0.6478	0.6504	0.9559	0.9963	0.9963	0.9962	1.0000	
32	0.9632	0.9632	0.9594	0.6532	0.9594	0.8061	0.9481	0.6423	0.6532	0.6559	0.9524	0.9925	0.9925	0.9925	0.9963	1.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
33	0.6109	0.6109	0.6134	0.9116	0.6134	0.6609	0.6160	0.9108	0.9116	0.9159	0.6167	0.5872	0.5957	0.5923	0.5897	0.5957
34	0.6195	0.6195	0.6222	0.8218	0.6222	0.6636	0.6250	0.8200	0.8119	0.8159	0.6256	0.6216	0.6216	0.6182	0.6154	0.6126
35	0.9594	0.9594	0.9556	0.6478	0.9556	0.8015	0.9442	0.6367	0.6478	0.6504	0.9485	0.9888	0.9888	0.9887	0.9925	0.9888
36	0.9668	0.9668	0.9630	0.6478	0.9630	0.8092	0.9517	0.6367	0.6478	0.6504	0.9559	0.9963	0.9963	0.9962	1.0000	0.9963
37	0.6083	0.6083	0.6109	0.9167	0.6109	0.6667	0.6134	0.9159	0.9167	0.9209	0.6141	0.5847	0.5932	0.5897	0.5872	0.5932
38	0.6083	0.6083	0.6109	0.9167	0.6109	0.6667	0.6134	0.9159	0.9167	0.9209	0.6141	0.5847	0.5932	0.5897	0.5872	0.5932
39	0.7336	0.7336	0.7364	0.6298	0.7364	0.7200	0.7393	0.6352	0.6468	0.6496	0.7385	0.7451	0.7451	0.7431	0.7402	0.7373
40	0.9632	0.9632	0.9594	0.6452	0.9594	0.8061	0.9481	0.6341	0.6452	0.6478	0.9524	0.9925	0.9925	0.9925	0.9963	0.9925
41	0.9632	0.9632	0.9594	0.6452	0.9594	0.8061	0.9481	0.6341	0.6452	0.6478	0.9524	0.9925	0.9925	0.9925	0.9963	0.9925
42	0.9632	0.9632	0.9594	0.6452	0.9594	0.8061	0.9481	0.6341	0.6452	0.6478	0.9524	0.9925	0.9925	0.9925	0.9963	0.9925
43	0.9632	0.9632	0.9594	0.6452	0.9594	0.8061	0.9481	0.6341	0.6452	0.6478	0.9524	0.9925	0.9925	0.9925	0.9963	0.9925
44	0.6141	0.6141	0.6167	0.9217	0.6167	0.6724	0.6192	0.9209	0.9217	0.9259	0.6198	0.5907	0.5992	0.5957	0.5932	0.5992
45	0.6050	0.6050	0.6076	0.9159	0.6076	0.6638	0.6102	0.9057	0.9065	0.9108	0.6109	0.5897	0.5983	0.5948	0.5923	0.5983
46	0.9668	0.9668	0.9630	0.6397	0.9630	0.8092	0.9517	0.6286	0.6397	0.6423	0.9559	0.9888	0.9888	0.9887	0.9925	0.9888
47	0.9668	0.9668	0.9630	0.6397	0.9630	0.8092	0.9517	0.6286	0.6397	0.6423	0.9559	0.9888	0.9888	0.9887	0.9925	0.9888
48	0.7774	0.7774	0.7803	0.6722	0.7803	0.7891	0.7757	0.6695	0.6805	0.6833	0.7744	0.7893	0.7893	0.7799	0.7846	0.7893

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
49	0.7308	0.7308	0.7336	0.6441	0.7336	0.7331	0.7364	0.6496	0.6610	0.6638	0.7356	0.7422	0.7422	0.7402	0.7373	0.7422
50	0.6198	0.6198	0.6224	0.9266	0.6224	0.6781	0.6250	0.9167	0.9174	0.9217	0.6255	0.5966	0.6050	0.6017	0.5992	0.6050
51	0.6198	0.6198	0.6224	0.9266	0.6224	0.6781	0.6250	0.9167	0.9174	0.9217	0.6255	0.5966	0.6050	0.6017	0.5992	0.6050
52	0.9323	0.9323	0.9283	0.6446	0.9283	0.7938	0.9242	0.6333	0.6446	0.6473	0.9213	0.9542	0.9542	0.9538	0.9579	0.9542
53	0.9438	0.9438	0.9398	0.6255	0.9398	0.7984	0.9434	0.6058	0.6255	0.6281	0.9328	0.9582	0.9658	0.9579	0.9618	0.9582
54	0.6534	0.6534	0.6560	0.9075	0.6560	0.6942	0.6586	0.8889	0.8899	0.8850	0.6587	0.6316	0.6316	0.6286	0.6260	0.6316
55	0.6534	0.6534	0.6560	0.9075	0.6560	0.6942	0.6586	0.8889	0.8899	0.8850	0.6587	0.6316	0.6316	0.6286	0.6260	0.6316
56	0.7557	0.7557	0.7586	0.6471	0.7586	0.7194	0.7538	0.6525	0.6639	0.6667	0.7605	0.7674	0.7674	0.7656	0.7626	0.7597
57	0.6534	0.6534	0.6560	0.9075	0.6560	0.6942	0.6586	0.8889	0.8899	0.8850	0.6587	0.6316	0.6316	0.6286	0.6260	0.6316
58	0.6534	0.6534	0.6560	0.9075	0.6560	0.6942	0.6586	0.8889	0.8899	0.8850	0.6587	0.6316	0.6316	0.6286	0.6260	0.6316
59	0.7529	0.7529	0.7557	0.6444	0.7557	0.7165	0.7510	0.6498	0.6611	0.6639	0.7576	0.7645	0.7645	0.7626	0.7597	0.7568
60	0.6534	0.6534	0.6560	0.9075	0.6560	0.6942	0.6586	0.8889	0.8899	0.8850	0.6587	0.6316	0.6316	0.6286	0.6260	0.6316
61	0.6534	0.6534	0.6560	0.9075	0.6560	0.6942	0.6586	0.8889	0.8899	0.8850	0.6587	0.6316	0.6316	0.6286	0.6260	0.6316
62	0.6534	0.6534	0.6560	0.9075	0.6560	0.6942	0.6586	0.8889	0.8899	0.8850	0.6587	0.6316	0.6316	0.6286	0.6260	0.6316
63	0.9398	0.9398	0.9358	0.6198	0.9358	0.7938	0.9394	0.6000	0.6198	0.6224	0.9363	0.9466	0.9542	0.9462	0.9502	0.9466
64	0.9517	0.9517	0.9478	0.6286	0.9478	0.8077	0.9513	0.6091	0.6286	0.6311	0.9481	0.9585	0.9660	0.9582	0.9621	0.9585

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
65	0.9513	0.9513	0.9474	0.6255	0.9474	0.8062	0.9509	0.6058	0.6255	0.6281	0.9403	0.9658	0.9734	0.9655	0.9695	0.9658
66	0.9478	0.9478	0.9438	0.6230	0.9438	0.8031	0.9474	0.6033	0.6230	0.6255	0.9442	0.9545	0.9621	0.9542	0.9582	0.9545
67	0.9474	0.9474	0.9434	0.6198	0.9434	0.8016	0.9470	0.6000	0.6198	0.6224	0.9363	0.9618	0.9695	0.9615	0.9655	0.9618
68	0.9517	0.9517	0.9478	0.6286	0.9478	0.8077	0.9513	0.6091	0.6286	0.6311	0.9481	0.9585	0.9660	0.9582	0.9621	0.9585
69	0.9438	0.9438	0.9398	0.6255	0.9398	0.7984	0.9434	0.6058	0.6255	0.6281	0.9403	0.9506	0.9582	0.9502	0.9542	0.9506
70	0.7049	0.7049	0.7078	0.7091	0.7078	0.7745	0.7025	0.7064	0.7091	0.7032	0.7020	0.7083	0.7000	0.7059	0.7029	0.7000
71	0.6560	0.6560	0.6586	0.9027	0.6586	0.6888	0.6613	0.8839	0.8850	0.8800	0.6614	0.6341	0.6341	0.6311	0.6286	0.6341
72	0.9442	0.9442	0.9403	0.6286	0.9403	0.8000	0.9438	0.6091	0.6286	0.6311	0.9407	0.9509	0.9585	0.9506	0.9545	0.9509
73	0.9442	0.9442	0.9403	0.6367	0.9403	0.8000	0.9438	0.6173	0.6367	0.6393	0.9407	0.9509	0.9585	0.9582	0.9545	0.9509
74	0.6452	0.6452	0.6478	0.9107	0.6478	0.6946	0.6585	0.8919	0.8929	0.8879	0.6506	0.6148	0.6230	0.6198	0.6173	0.6230
75	0.9517	0.9517	0.9478	0.6449	0.9478	0.7923	0.9438	0.6255	0.6449	0.6475	0.9407	0.9660	0.9736	0.9658	0.9697	0.9660
76	0.8409	0.8409	0.8365	0.7000	0.8365	0.7608	0.8321	0.6891	0.6917	0.6946	0.8302	0.8385	0.8462	0.8372	0.8417	0.8385
77	0.6426	0.6426	0.6452	0.9067	0.6452	0.6917	0.6559	0.8879	0.8889	0.8839	0.6400	0.6122	0.6204	0.6173	0.6148	0.6204
78	0.6426	0.6426	0.6452	0.9067	0.6452	0.6917	0.6559	0.8879	0.8889	0.8839	0.6400	0.6122	0.6204	0.6173	0.6148	0.6204
79	0.9552	0.9552	0.9513	0.6311	0.9513	0.8031	0.9474	0.6116	0.6311	0.6337	0.9517	0.9697	0.9773	0.9695	0.9734	0.9697
80	0.7073	0.7073	0.7102	0.7117	0.7102	0.7679	0.7049	0.7091	0.7117	0.7059	0.7045	0.7190	0.7190	0.7250	0.7220	0.7190

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
81	0.9591	0.9591	0.9552	0.6367	0.9552	0.8077	0.9513	0.6173	0.6367	0.6393	0.9556	0.9736	0.9811	0.9734	0.9773	0.9736
82	0.9591	0.9591	0.9552	0.6367	0.9552	0.8077	0.9513	0.6173	0.6367	0.6393	0.9556	0.9736	0.9811	0.9734	0.9773	0.9736
83	0.9517	0.9517	0.9478	0.6449	0.9478	0.8077	0.9438	0.6255	0.6449	0.6475	0.9481	0.9736	0.9811	0.9734	0.9773	0.9736
84	0.9556	0.9556	0.9517	0.6423	0.9517	0.8046	0.9478	0.6230	0.6423	0.6449	0.9520	0.9774	0.9850	0.9773	0.9811	0.9774
85	0.9552	0.9552	0.9513	0.6393	0.9513	0.8031	0.9474	0.6198	0.6393	0.6420	0.9517	0.9697	0.9773	0.9695	0.9734	0.9697
86	0.8571	0.8571	0.8527	0.6723	0.8527	0.8000	0.8482	0.6609	0.6553	0.6581	0.8538	0.8706	0.8784	0.8775	0.8740	0.8706
87	0.6230	0.6230	0.6255	0.9091	0.6255	0.6723	0.6364	0.8899	0.8909	0.8950	0.6286	0.5917	0.6000	0.5966	0.5941	0.6000
88	0.9627	0.9627	0.9588	0.6393	0.9588	0.8031	0.9549	0.6198	0.6393	0.6420	0.9517	0.9773	0.9848	0.9771	0.9810	0.9773
89	0.9627	0.9627	0.9588	0.6393	0.9588	0.8031	0.9549	0.6198	0.6393	0.6420	0.9517	0.9773	0.9848	0.9771	0.9810	0.9773
90	0.9627	0.9627	0.9588	0.6393	0.9588	0.8031	0.9549	0.6198	0.6393	0.6420	0.9517	0.9773	0.9848	0.9771	0.9810	0.9773
91	0.9588	0.9588	0.9549	0.6420	0.9549	0.8062	0.9509	0.6224	0.6420	0.6446	0.9478	0.9734	0.9810	0.9732	0.9771	0.9734
92	0.9627	0.9627	0.9588	0.6393	0.9588	0.8031	0.9549	0.6198	0.6393	0.6420	0.9517	0.9773	0.9848	0.9771	0.9810	0.9773
93	0.9588	0.9588	0.9549	0.6420	0.9549	0.7984	0.9509	0.6224	0.6420	0.6446	0.9478	0.9734	0.9810	0.9732	0.9771	0.9734
94	0.7303	0.7303	0.7333	0.6636	0.7333	0.7586	0.7364	0.6605	0.6636	0.6667	0.7190	0.7342	0.7342	0.7404	0.7373	0.7342
95	0.9517	0.9517	0.9478	0.6286	0.9478	0.8077	0.9438	0.6091	0.6286	0.6311	0.9407	0.9736	0.9736	0.9658	0.9697	0.9660

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
33	1.0000															
34	0.8677	1.0000														
35	0.5897	0.6244	1.0000													
36	0.5897	0.6154	0.9925	1.0000												
37	0.9852	0.8737	0.5957	0.5872	1.0000											
38	0.9852	0.8737	0.5957	0.5872	1.0000	1.0000										
39	0.6396	0.6411	0.7402	0.7402	0.6457	0.6457	1.0000									
40	0.5957	0.6126	0.9888	0.9963	0.5932	0.5932	0.7451	1.0000								
41	0.5957	0.6126	0.9888	0.9963	0.5932	0.5932	0.7451	1.0000	1.0000							
42	0.5957	0.6126	0.9888	0.9963	0.5932	0.5932	0.7451	1.0000	1.0000	1.0000						
43	0.5957	0.6126	0.9888	0.9963	0.5932	0.5932	0.7451	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000					
44	0.9804	0.8691	0.5932	0.5932	0.9951	0.9951	0.6429	0.5992	0.5992	0.5992	0.5992	1.0000				
45	0.9751	0.8723	0.5923	0.5923	0.9802	0.9802	0.6425	0.5983	0.5983	0.5983	0.5983	0.9852	1.0000			
46	0.5897	0.6063	0.9850	0.9925	0.5872	0.5872	0.7480	0.9963	0.9963	0.9963	0.9963	0.5932	0.5923	1.0000		
47	0.5897	0.6063	0.9850	0.9925	0.5872	0.5872	0.7480	0.9963	0.9963	0.9963	0.9963	0.5932	0.5923	1.0000	1.0000	
48	0.6667	0.6698	0.7846	0.7846	0.6725	0.6725	0.8790	0.7893	0.7893	0.7893	0.7893	0.6696	0.6696	0.7923	0.7923	1.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
49	0.6457	0.6476	0.7373	0.7373	0.6518	0.6518	0.9630	0.7422	0.7422	0.7422	0.7422	0.6489	0.6486	0.7451	0.7451	0.8996
50	0.9756	0.8646	0.6076	0.5992	0.9903	0.9903	0.6400	0.6050	0.6050	0.6050	0.6050	0.9855	0.9706	0.5992	0.5992	0.6840
51	0.9756	0.8646	0.6076	0.5992	0.9903	0.9903	0.6400	0.6050	0.6050	0.6050	0.6050	0.9855	0.9706	0.5992	0.5992	0.6840
52	0.6026	0.6019	0.9579	0.9579	0.6000	0.6000	0.7550	0.9618	0.9618	0.9618	0.9618	0.5974	0.5965	0.9655	0.9655	0.7765
53	0.5913	0.6083	0.9618	0.9618	0.5887	0.5887	0.7360	0.9582	0.9582	0.9582	0.9582	0.5862	0.5764	0.9542	0.9542	0.7813
54	0.9065	0.8259	0.6341	0.6260	0.9116	0.9116	0.6496	0.6235	0.6235	0.6235	0.6235	0.9074	0.9014	0.6179	0.6179	0.6917
55	0.9065	0.8259	0.6341	0.6260	0.9116	0.9116	0.6496	0.6235	0.6235	0.6235	0.6235	0.9074	0.9014	0.6179	0.6179	0.6917
56	0.6311	0.6415	0.7626	0.7626	0.6283	0.6283	0.8980	0.7597	0.7597	0.7597	0.7597	0.6256	0.6250	0.7626	0.7626	0.8446
57	0.9065	0.8259	0.6341	0.6260	0.9116	0.9116	0.6496	0.6235	0.6235	0.6235	0.6235	0.9074	0.9014	0.6179	0.6179	0.6917
58	0.9065	0.8259	0.6341	0.6260	0.9116	0.9116	0.6496	0.6235	0.6235	0.6235	0.6235	0.9074	0.9014	0.6179	0.6179	0.6917
59	0.6283	0.6385	0.7597	0.7597	0.6256	0.6256	0.9024	0.7568	0.7568	0.7568	0.7568	0.6228	0.6222	0.7597	0.7597	0.8492
60	0.9065	0.8259	0.6341	0.6260	0.9116	0.9116	0.6496	0.6235	0.6235	0.6235	0.6235	0.9074	0.9014	0.6179	0.6179	0.6917
61	0.9065	0.8259	0.6341	0.6260	0.9116	0.9116	0.6496	0.6235	0.6235	0.6235	0.6235	0.9074	0.9014	0.6179	0.6179	0.6917
62	0.9065	0.8259	0.6341	0.6260	0.9116	0.9116	0.6496	0.6235	0.6235	0.6235	0.6235	0.9074	0.9014	0.6179	0.6179	0.6917
63	0.5764	0.6019	0.9425	0.9502	0.5739	0.5739	0.7390	0.9466	0.9466	0.9466	0.9466	0.5801	0.5789	0.9502	0.9502	0.7686
64	0.5862	0.6119	0.9545	0.9621	0.5837	0.5837	0.7460	0.9585	0.9585	0.9585	0.9585	0.5897	0.5887	0.9621	0.9621	0.7752

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
65	0.5826	0.6083	0.9618	0.9695	0.5801	0.5801	0.7440	0.9658	0.9658	0.9658	0.9658	0.5862	0.5852	0.9695	0.9695	0.7813
66	0.5801	0.6055	0.9506	0.9582	0.5776	0.5776	0.7410	0.9545	0.9545	0.9545	0.9545	0.5837	0.5826	0.9582	0.9582	0.7782
67	0.5764	0.6019	0.9579	0.9655	0.5739	0.5739	0.7390	0.9618	0.9618	0.9618	0.9618	0.5801	0.5789	0.9655	0.9655	0.7843
68	0.5862	0.6119	0.9545	0.9621	0.5837	0.5837	0.7460	0.9585	0.9585	0.9585	0.9585	0.5897	0.5887	0.9621	0.9621	0.7752
69	0.5826	0.6083	0.9466	0.9542	0.5801	0.5801	0.7440	0.9506	0.9506	0.9506	0.9506	0.5862	0.5852	0.9542	0.9542	0.7813
70	0.7150	0.7216	0.7113	0.7029	0.7212	0.7212	0.6784	0.7000	0.7000	0.7000	0.7000	0.7177	0.7184	0.7029	0.7029	0.7296
71	0.9014	0.8300	0.6367	0.6286	0.9065	0.9065	0.6524	0.6260	0.6260	0.6260	0.6260	0.9023	0.8962	0.6204	0.6204	0.6946
72	0.5862	0.6119	0.9470	0.9545	0.5837	0.5837	0.7381	0.9509	0.9509	0.9509	0.9509	0.5897	0.5887	0.9545	0.9545	0.7752
73	0.5948	0.6210	0.9470	0.9545	0.5923	0.5923	0.7460	0.9509	0.9509	0.9509	0.9509	0.5983	0.5974	0.9545	0.9545	0.7674
74	0.9005	0.7980	0.6255	0.6173	0.9057	0.9057	0.6494	0.6148	0.6148	0.6148	0.6148	0.9014	0.8952	0.6091	0.6091	0.6835
75	0.5948	0.6210	0.9621	0.9697	0.5923	0.5923	0.7460	0.9660	0.9660	0.9660	0.9660	0.5983	0.5974	0.9697	0.9697	0.7829
76	0.6520	0.6449	0.8340	0.8417	0.6491	0.6491	0.7611	0.8385	0.8385	0.8385	0.8385	0.6550	0.6549	0.8417	0.8417	0.7905
77	0.9057	0.8141	0.6230	0.6148	0.9108	0.9108	0.6293	0.6122	0.6122	0.6122	0.6122	0.9065	0.9005	0.6066	0.6066	0.6807
78	0.9057	0.8141	0.6230	0.6148	0.9108	0.9108	0.6293	0.6122	0.6122	0.6122	0.6122	0.9065	0.9005	0.6066	0.6066	0.6807
79	0.5801	0.6055	0.9658	0.9734	0.5776	0.5776	0.7410	0.9697	0.9697	0.9697	0.9697	0.5837	0.5826	0.9734	0.9734	0.7704
80	0.7177	0.7143	0.7303	0.7220	0.7333	0.7333	0.6812	0.7190	0.7190	0.7190	0.7190	0.7299	0.7308	0.7137	0.7137	0.7234

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
81	0.5862	0.6119	0.9697	0.9773	0.5837	0.5837	0.7460	0.9736	0.9736	0.9736	0.9736	0.5897	0.5887	0.9773	0.9773	0.7752
82	0.5862	0.6119	0.9697	0.9773	0.5837	0.5837	0.7460	0.9736	0.9736	0.9736	0.9736	0.5897	0.5887	0.9773	0.9773	0.7752
83	0.5948	0.6210	0.9697	0.9773	0.5923	0.5923	0.7381	0.9736	0.9736	0.9736	0.9736	0.5983	0.5974	0.9697	0.9697	0.7674
84	0.5923	0.6182	0.9736	0.9811	0.5897	0.5897	0.7431	0.9774	0.9774	0.9774	0.9774	0.5957	0.5948	0.9736	0.9736	0.7722
85	0.5887	0.6147	0.9658	0.9734	0.5862	0.5862	0.7490	0.9697	0.9697	0.9697	0.9697	0.5923	0.5913	0.9734	0.9734	0.7704
86	0.6126	0.6316	0.8661	0.8740	0.6099	0.6099	0.7851	0.8706	0.8706	0.8706	0.8706	0.6161	0.6154	0.8740	0.8740	0.8145
87	0.9275	0.8351	0.6025	0.5941	0.9327	0.9327	0.6256	0.5917	0.5917	0.5917	0.5917	0.9282	0.9223	0.5858	0.5858	0.6781
88	0.5887	0.6147	0.9734	0.9810	0.5862	0.5862	0.7410	0.9773	0.9773	0.9773	0.9773	0.5923	0.5913	0.9810	0.9810	0.7782
89	0.5887	0.6147	0.9734	0.9810	0.5862	0.5862	0.7410	0.9773	0.9773	0.9773	0.9773	0.5923	0.5913	0.9810	0.9810	0.7782
90	0.5887	0.6147	0.9734	0.9810	0.5862	0.5862	0.7410	0.9773	0.9773	0.9773	0.9773	0.5923	0.5913	0.9810	0.9810	0.7782
91	0.5913	0.6175	0.9695	0.9771	0.5887	0.5887	0.7360	0.9734	0.9734	0.9734	0.9734	0.5948	0.5939	0.9771	0.9771	0.7734
92	0.5887	0.6147	0.9734	0.9810	0.5862	0.5862	0.7410	0.9773	0.9773	0.9773	0.9773	0.5923	0.5913	0.9810	0.9810	0.7782
93	0.5913	0.6175	0.9695	0.9771	0.5887	0.5887	0.7440	0.9734	0.9734	0.9734	0.9734	0.5948	0.5939	0.9771	0.9771	0.7734
94	0.6765	0.6702	0.7373	0.7373	0.6829	0.6829	0.6696	0.7342	0.7342	0.7342	0.7342	0.6796	0.6798	0.7373	0.7373	0.7304
95	0.5776	0.6119	0.9621	0.9697	0.5751	0.5751	0.7540	0.9660	0.9660	0.9660	0.9660	0.5812	0.5801	0.9697	0.9697	0.7829

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
49	1.0000															
50	0.6549	1.0000														
51	0.6549	1.0000	1.0000													
52	0.7440	0.6121	0.6121	1.0000												
53	0.7410	0.6009	0.6009	0.9339	1.0000											
54	0.6553	0.9124	0.9124	0.6224	0.6281	1.0000										
55	0.6553	0.9124	0.9124	0.6224	0.6281	1.0000	1.0000									
56	0.9024	0.6316	0.6316	0.7778	0.7668	0.6498	0.6498	1.0000								
57	0.6553	0.9124	0.9124	0.6224	0.6281	1.0000	1.0000	0.6498	1.0000							
58	0.6553	0.9124	0.9124	0.6224	0.6281	1.0000	1.0000	0.6498	1.0000	1.0000						
59	0.9069	0.6288	0.6288	0.7747	0.7638	0.6471	0.6471	0.9960	0.6471	0.6471	1.0000					
60	0.6553	0.9124	0.9124	0.6224	0.6281	1.0000	1.0000	0.6498	1.0000	1.0000	0.6471	1.0000				
61	0.6553	0.9124	0.9124	0.6224	0.6281	1.0000	1.0000	0.6498	1.0000	1.0000	0.6471	1.0000	1.0000			
62	0.6553	0.9124	0.9124	0.6224	0.6281	1.0000	1.0000	0.6498	1.0000	1.0000	0.6471	1.0000	1.0000	1.0000		
63	0.7440	0.5862	0.5862	0.9297	0.9728	0.6141	0.6141	0.7778	0.6141	0.6141	0.7747	0.6141	0.6141	0.6141	1.0000	
64	0.7431	0.5957	0.5957	0.9344	0.9769	0.6230	0.6230	0.7765	0.6230	0.6230	0.7734	0.6230	0.6230	0.6230	0.9884	1.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
65	0.7410	0.5923	0.5923	0.9416	0.9845	0.6198	0.6198	0.7668	0.6198	0.6198	0.7638	0.6198	0.6198	0.6198	0.9805	0.9923
66	0.7460	0.5897	0.5897	0.9302	0.9807	0.6173	0.6173	0.7795	0.6173	0.6173	0.7765	0.6173	0.6173	0.6173	0.9922	0.9962
67	0.7440	0.5862	0.5862	0.9375	0.9883	0.6141	0.6141	0.7698	0.6141	0.6141	0.7668	0.6141	0.6141	0.6141	0.9844	0.9884
68	0.7431	0.5957	0.5957	0.9344	0.9769	0.6230	0.6230	0.7765	0.6230	0.6230	0.7734	0.6230	0.6230	0.6230	0.9884	1.0000
69	0.7490	0.5923	0.5923	0.9261	0.9767	0.6198	0.6198	0.7826	0.6198	0.6198	0.7795	0.6198	0.6198	0.6198	0.9883	0.9923
70	0.6930	0.7238	0.7238	0.7009	0.6979	0.7489	0.7489	0.7130	0.7489	0.7489	0.7100	0.7489	0.7489	0.7489	0.7094	0.7089
71	0.6581	0.9074	0.9074	0.6167	0.6307	0.9956	0.9956	0.6525	0.9956	0.9956	0.6498	0.9956	0.9956	0.9956	0.6167	0.6255
72	0.7510	0.5957	0.5957	0.9266	0.9769	0.6230	0.6230	0.7843	0.6230	0.6230	0.7813	0.6230	0.6230	0.6230	0.9884	0.9924
73	0.7510	0.6043	0.6043	0.9266	0.9692	0.6311	0.6311	0.7843	0.6311	0.6311	0.7813	0.6311	0.6311	0.6311	0.9807	0.9924
74	0.6552	0.9065	0.9065	0.6218	0.6276	0.9686	0.9686	0.6581	0.9686	0.9686	0.6553	0.9686	0.9686	0.9686	0.6134	0.6224
75	0.7431	0.6043	0.6043	0.9421	0.9615	0.6393	0.6393	0.7608	0.6393	0.6393	0.7578	0.6393	0.6393	0.6393	0.9575	0.9695
76	0.7661	0.6609	0.6609	0.8268	0.8392	0.6778	0.6778	0.8000	0.6778	0.6778	0.7968	0.6778	0.6778	0.6778	0.8504	0.8560
77	0.6352	0.9116	0.9116	0.6276	0.6250	0.9732	0.9732	0.6468	0.9732	0.9732	0.6441	0.9732	0.9732	0.9732	0.6109	0.6198
78	0.6352	0.9116	0.9116	0.6276	0.6250	0.9732	0.9732	0.6468	0.9732	0.9732	0.6441	0.9732	0.9732	0.9732	0.6109	0.6198
79	0.7381	0.5897	0.5897	0.9380	0.9653	0.6173	0.6173	0.7638	0.6173	0.6173	0.7608	0.6173	0.6173	0.6173	0.9690	0.9808
80	0.6870	0.7358	0.7358	0.7119	0.7089	0.7692	0.7692	0.7155	0.7692	0.7692	0.7124	0.7692	0.7692	0.7692	0.7034	0.7113

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
81	0.7431	0.5957	0.5957	0.9421	0.9692	0.6230	0.6230	0.7686	0.6230	0.6230	0.7656	0.6230	0.6230	0.6230	0.9730	0.9847
82	0.7431	0.5957	0.5957	0.9421	0.9692	0.6230	0.6230	0.7686	0.6230	0.6230	0.7656	0.6230	0.6230	0.6230	0.9730	0.9847
83	0.7352	0.6043	0.6043	0.9344	0.9692	0.6311	0.6311	0.7608	0.6311	0.6311	0.7578	0.6311	0.6311	0.6311	0.9653	0.9771
84	0.7402	0.6017	0.6017	0.9385	0.9732	0.6286	0.6286	0.7656	0.6286	0.6286	0.7626	0.6286	0.6286	0.6286	0.9692	0.9810
85	0.7460	0.5983	0.5983	0.9457	0.9653	0.6255	0.6255	0.7717	0.6255	0.6255	0.7686	0.6255	0.6255	0.6255	0.9767	0.9808
86	0.7819	0.6222	0.6222	0.8514	0.8800	0.6325	0.6325	0.8000	0.6325	0.6325	0.7967	0.6325	0.6325	0.6325	0.8835	0.8968
87	0.6404	0.9333	0.9333	0.6068	0.6043	0.9498	0.9498	0.6348	0.9498	0.9498	0.6320	0.9498	0.9498	0.9498	0.5897	0.5992
88	0.7381	0.5983	0.5983	0.9457	0.9730	0.6255	0.6255	0.7638	0.6255	0.6255	0.7608	0.6255	0.6255	0.6255	0.9690	0.9808
89	0.7381	0.5983	0.5983	0.9457	0.9730	0.6255	0.6255	0.7638	0.6255	0.6255	0.7608	0.6255	0.6255	0.6255	0.9690	0.9808
90	0.7381	0.5983	0.5983	0.9457	0.9730	0.6255	0.6255	0.7638	0.6255	0.6255	0.7608	0.6255	0.6255	0.6255	0.9690	0.9808
91	0.7331	0.6009	0.6009	0.9416	0.9690	0.6281	0.6281	0.7589	0.6281	0.6281	0.7559	0.6281	0.6281	0.6281	0.9650	0.9769
92	0.7381	0.5983	0.5983	0.9457	0.9730	0.6255	0.6255	0.7638	0.6255	0.6255	0.7608	0.6255	0.6255	0.6255	0.9690	0.9808
93	0.7410	0.6009	0.6009	0.9494	0.9690	0.6281	0.6281	0.7668	0.6281	0.6281	0.7638	0.6281	0.6281	0.6281	0.9728	0.9769
94	0.6578	0.6860	0.6860	0.7359	0.7414	0.7130	0.7130	0.6872	0.7130	0.7130	0.6842	0.7130	0.7130	0.7130	0.7359	0.7436
95	0.7510	0.5872	0.5872	0.9344	0.9615	0.6230	0.6230	0.7686	0.6230	0.6230	0.7656	0.6230	0.6230	0.6230	0.9575	0.9695

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
65	1.0000															
66	0.9884	1.0000														
67	0.9961	0.9922	1.0000													
68	0.9923	0.9962	0.9884	1.0000												
69	0.9845	0.9961	0.9883	0.9923	1.0000											
70	0.6979	0.7119	0.7009	0.7089	0.7064	1.0000										
71	0.6224	0.6198	0.6167	0.6255	0.6224	0.7431	1.0000									
72	0.9846	0.9962	0.9884	0.9924	0.9923	0.7173	0.6255	1.0000								
73	0.9846	0.9885	0.9807	0.9924	0.9846	0.7173	0.6337	0.9924	1.0000							
74	0.6192	0.6167	0.6134	0.6224	0.6192	0.7315	0.9640	0.6224	0.6307	1.0000						
75	0.9769	0.9655	0.9730	0.9695	0.9615	0.7004	0.6420	0.9618	0.9618	0.6224	1.0000					
76	0.8549	0.8516	0.8504	0.8560	0.8549	0.7241	0.6807	0.8560	0.8560	0.6780	0.8638	1.0000				
77	0.6167	0.6141	0.6109	0.6198	0.6167	0.7465	0.9686	0.6198	0.6281	0.9774	0.6281	0.6667	1.0000			
78	0.6167	0.6141	0.6109	0.6198	0.6167	0.7465	0.9686	0.6198	0.6281	0.9774	0.6281	0.6667	1.0000	1.0000		
79	0.9807	0.9769	0.9767	0.9808	0.9730	0.7034	0.6198	0.9732	0.9732	0.6083	0.9808	0.8516	0.6058	0.6058	1.0000	
80	0.7089	0.7059	0.7034	0.7113	0.7004	0.9252	0.7636	0.7113	0.7197	0.7706	0.7113	0.7265	0.7854	0.7854	0.7143	1.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

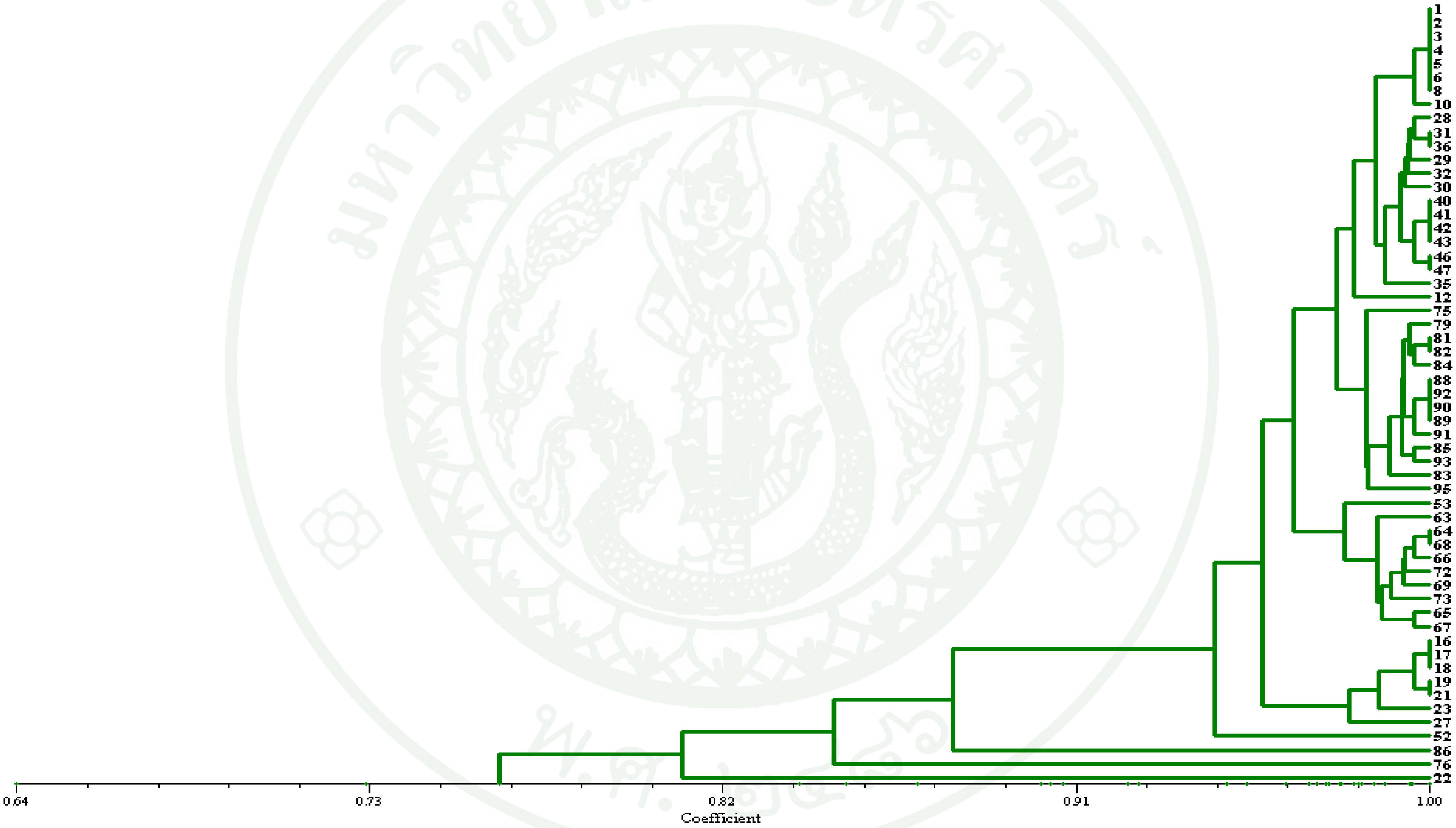
	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
81	0.9846	0.9808	0.9807	0.9847	0.9769	0.7089	0.6255	0.9771	0.9771	0.6141	0.9847	0.8560	0.6116	0.6116	0.9962	0.7197
82	0.9846	0.9808	0.9807	0.9847	0.9769	0.7089	0.6255	0.9771	0.9771	0.6141	0.9847	0.8560	0.6116	0.6116	0.9962	0.7197
83	0.9769	0.9732	0.9730	0.9771	0.9692	0.7089	0.6337	0.9695	0.9695	0.6224	0.9771	0.8482	0.6198	0.6198	0.9885	0.7280
84	0.9808	0.9771	0.9769	0.9810	0.9732	0.7059	0.6311	0.9734	0.9734	0.6198	0.9810	0.8527	0.6173	0.6173	0.9924	0.7250
85	0.9807	0.9769	0.9767	0.9808	0.9730	0.7119	0.6281	0.9732	0.9732	0.6167	0.9808	0.8594	0.6141	0.6141	0.9923	0.7227
86	0.8960	0.8924	0.8916	0.8968	0.8960	0.7225	0.6352	0.8889	0.8968	0.6320	0.8810	0.8421	0.6293	0.6293	0.8845	0.7249
87	0.5957	0.5932	0.5897	0.5992	0.5957	0.7358	0.9450	0.5992	0.6076	0.9537	0.6076	0.6552	0.9677	0.9677	0.5847	0.7477
88	0.9884	0.9769	0.9845	0.9808	0.9730	0.7034	0.6281	0.9732	0.9732	0.6167	0.9885	0.8594	0.6141	0.6141	0.9923	0.7143
89	0.9884	0.9769	0.9845	0.9808	0.9730	0.7034	0.6281	0.9732	0.9732	0.6167	0.9885	0.8594	0.6141	0.6141	0.9923	0.7143
90	0.9884	0.9769	0.9845	0.9808	0.9730	0.7034	0.6281	0.9732	0.9732	0.6167	0.9885	0.8594	0.6141	0.6141	0.9923	0.7143
91	0.9845	0.9730	0.9805	0.9769	0.9690	0.7064	0.6307	0.9692	0.9692	0.6192	0.9846	0.8549	0.6167	0.6167	0.9884	0.7173
92	0.9884	0.9769	0.9845	0.9808	0.9730	0.7034	0.6281	0.9732	0.9732	0.6167	0.9885	0.8594	0.6141	0.6141	0.9923	0.7143
93	0.9845	0.9730	0.9805	0.9769	0.9690	0.7064	0.6307	0.9692	0.9692	0.6192	0.9846	0.8627	0.6167	0.6167	0.9884	0.7173
94	0.7500	0.7382	0.7446	0.7436	0.7328	0.8804	0.7070	0.7350	0.7436	0.7230	0.7350	0.7424	0.7383	0.7383	0.7382	0.9194
95	0.9769	0.9655	0.9730	0.9695	0.9615	0.7089	0.6255	0.9618	0.9618	0.6058	0.9771	0.8482	0.6033	0.6033	0.9808	0.7029

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

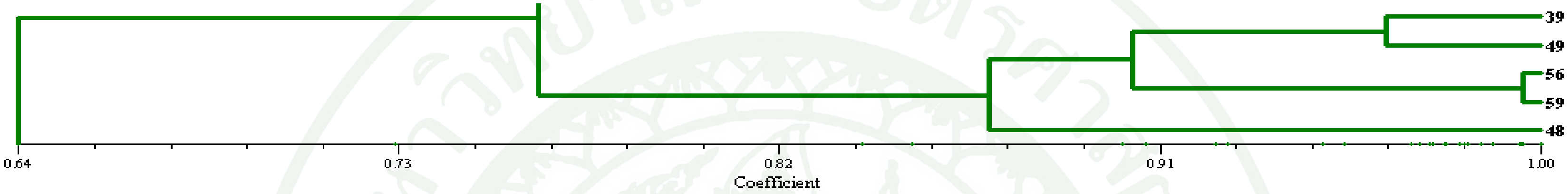
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
81	1.0000														
82	1.0000	1.0000													
83	0.9924	0.9924	1.0000												
84	0.9962	0.9962	0.9962	1.0000											
85	0.9962	0.9962	0.9885	0.9924	1.0000										
86	0.8889	0.8889	0.8810	0.8854	0.8845	1.0000									
87	0.5907	0.5907	0.5907	0.5966	0.5932	0.6167	1.0000								
88	0.9962	0.9962	0.9885	0.9924	0.9923	0.8845	0.5932	1.0000							
89	0.9962	0.9962	0.9885	0.9924	0.9923	0.8845	0.5932	1.0000	1.0000						
90	0.9962	0.9962	0.9885	0.9924	0.9923	0.8845	0.5932	1.0000	1.0000	1.0000					
91	0.9923	0.9923	0.9923	0.9885	0.9884	0.8800	0.5872	0.9961	0.9961	0.9961	1.0000				
92	0.9962	0.9962	0.9885	0.9924	0.9923	0.8845	0.5932	1.0000	1.0000	1.0000	0.9961	1.0000			
93	0.9923	0.9923	0.9846	0.9885	0.9961	0.8800	0.5957	0.9961	0.9961	0.9961	0.9922	0.9961	1.0000		
94	0.7436	0.7436	0.7350	0.7404	0.7468	0.7411	0.7177	0.7468	0.7468	0.7468	0.7414	0.7468	0.7500	1.0000	
95	0.9847	0.9847	0.9771	0.9810	0.9808	0.8730	0.5823	0.9885	0.9885	0.9885	0.9846	0.9885	0.9846	0.7350	1.0000

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



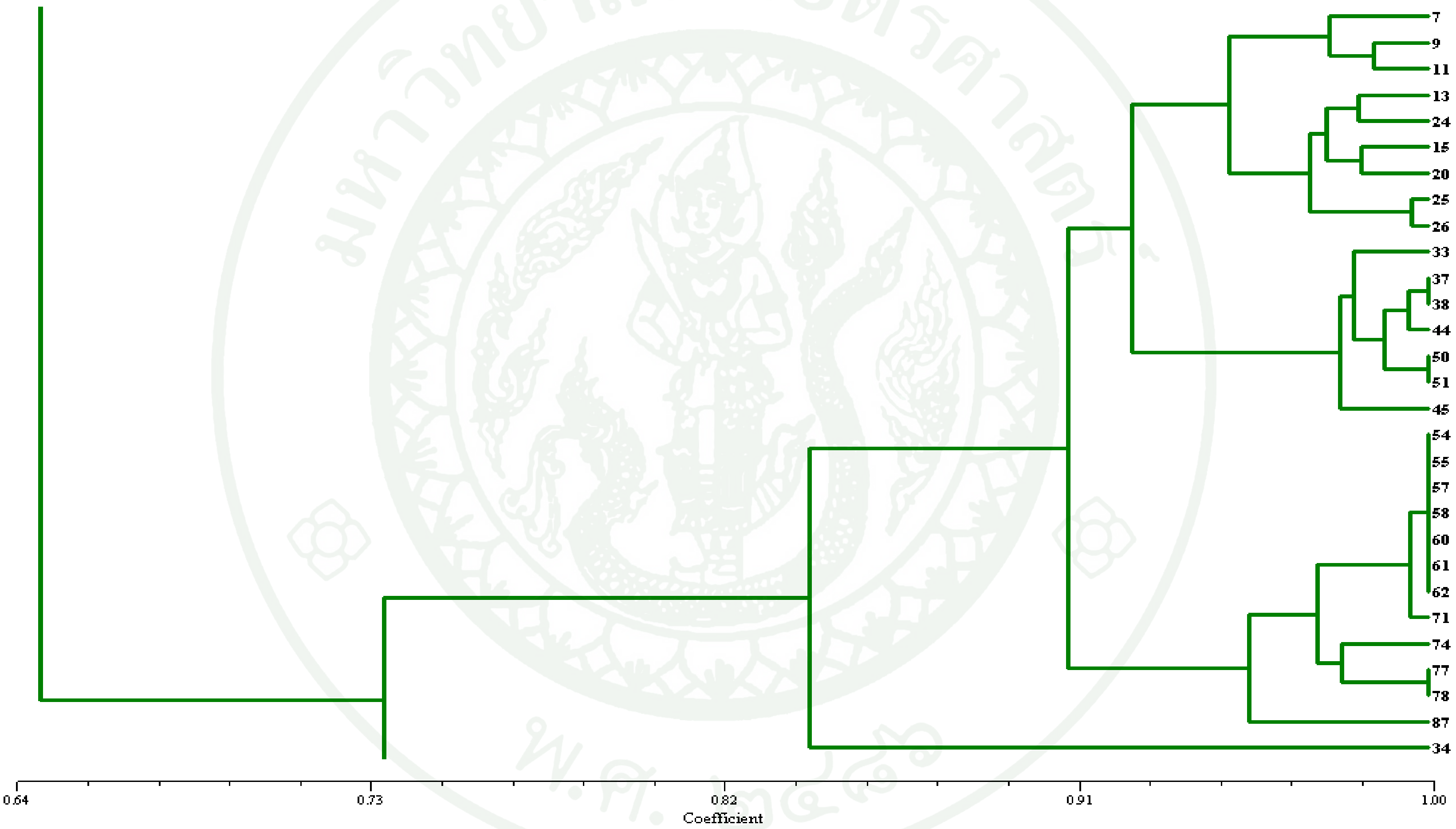
ภาพผนวกที่ 1 แผนภูมิทางพันธุกรรมของตัวอย่างกลุ่มที่ 1 สร้างด้วยวิธี UPGMA คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ด้วยวิธี Dice’s coefficient

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



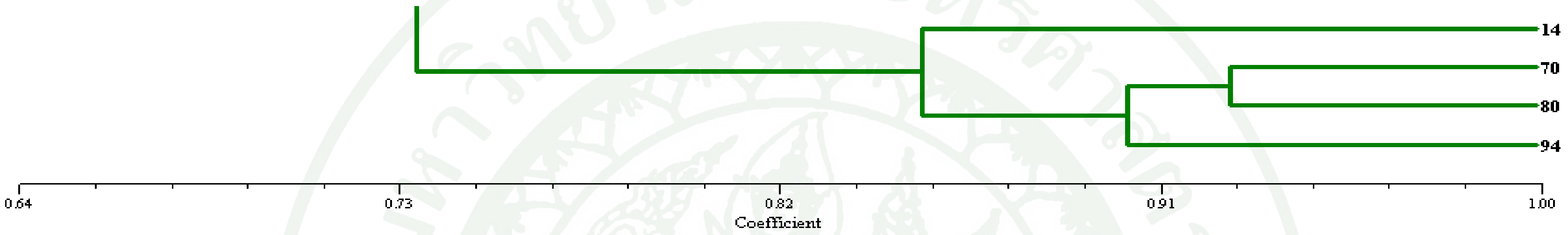
ภาพผนวกที่ 2 แผนภูมิทางพันธุกรรมของตัวอย่างกลุ่มที่ 2 สร้างด้วยวิธี UPGMA คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ด้วยวิธี Dice's coefficient

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ 3 แผนภูมิทางพันธุกรรมของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 สร้างด้วยวิธี UPGMA คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ด้วยวิธี Dice's coefficient

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ 4 แผนภูมิทางพันธุกรรมของตัวอย่างกลุ่มที่ 4 สร้างด้วยวิธี UPGMA คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ด้วยวิธี Dice’s coefficient

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวกุหลาบ เหล่าสาธิต
เกิดวันที่	22 สิงหาคม พ.ศ. 2529
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานทางวิชาการ	นำเสนอผลงาน ในการประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 4 วันที่ 24-26 มีนาคม พ.ศ. 2553 เรื่อง ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูก (*Curcuma* sp.) ในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์