บทที่ 4
การศึกษาลักษณะเชิงโมเลกุล

1. เครื่องมือ และอุปกรณ์

1.1 เครื่องมือ

- ตู้แช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge)
- เครื่อง PCR (Thermal Cycler)
- เครื่องถ่ายภาพเจล (gel document)
- เครื่องไมโครเวฟ
- หม้ออบแรงดันสูง (Autoclave)
- เครื่องรันเจล (electrophoresis)
- คอมพิวเตอร์ 1 ชุด
- โปรแกรมคอมพิวเตอร์
    - โปรแกรม Prime3
    - โปรแกรม MultAlin
    - โปรแกรม BioEdit
    - โปรแกรม PAUP*4.0 beta win

1.2 อุปกรณ์

- ถุงมือชนิดไม่มีแป้ง
- ชุดไมโครปิเปต
- หลอดเก็บตัวอย่าง (collection tube)
- ถาดรองหลอดเก็บตัวอย่าง
- กล่องโฟมสำหรับใส่น้ำแข็ง
- โกร่งบดยา
- กระบอกตวง
- ปากกาเคมี

1.3 สารเคมี

- Ethanol 95%

- Molecular water
- ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
- Ethidium bromide
- Agarose (GenePure LE Agarose)
- TAE 10X buffer
- น้ำแข็ง
- ไพรเมอร์ (Primer) 4 ชุด ได้แก่
    - ITS1 กับ ITS4
    - 18S-26S-5′F กับ 18S-26S-3′R
    - trn-Kef กับ trn-Ker1
    - trnF 806 กับ trn-Ker
- ชุด DNeasy Kit® (บริษัท QIAGEN)
- ชุด GeneClean II Kit® (บริษัท Qbiogene)
- ชุด QIAquick PCR Purification Kit® (บริษัท QIAGEN)
- ชุด PCR

2. วิธีการดำเนินงานวิจัย

ทำการศึกษาเชิงโมเลกุลของพืชสกุลว่านดอกทองจำนวน 19 ชนิด 36 ตัวอย่าง และใช้ out group ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีการศึกษาไว้จากฐานข้อมูลสากล (GenBank) จำนวน 3 ตัวอย่าง คือ *Amomum glabrum* S. Q. Tong, *A. yunnanense* S. Q. Tong และ *Siamanthus siliquosus* K. Larsen & J. Mood ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction) จากนั้นนำผลผลิตของ PCR ที่ได้ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ในการศึกษานี้จะทำการวิเคราะห์ข้อมูลนิวคลีโอไทด์ในไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) ช่วง Internal transcribed spacer (ITS1 และ ITS2) และในจีน *mat*K

2.1 การศึกษาในช่วง ITS และ จีน *mat*K

การศึกษาครั้งนี้ ใช้ไพรเมอร์ที่มีการคัดเลือกโดยการนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสกุลนี้ที่มีการศึกษาไว้แล้วบางส่วนมาจัดเรียง (align) เพื่อพิจารณาว่าสามารถจับคู่กับช่วงที่ต้องการศึกษาได้ จากการคัดเลือกได้ไพรเมอร์คือ ITS1, ITS4, 18S-26S-5F, 18S-26S-3R (Urbatsch et al., 2000; White et al., 1990 อ้างถึงใน ดวงกมล ทองอร่าม และคณะ, 2549)

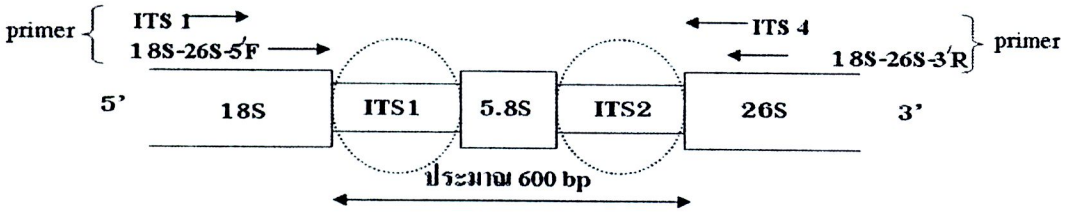
และการศึกษาในส่วนคลอโรพลาสต์นั้น ไพรเมอร์ที่ใช้ ได้แก่ trn-Kef, trn-Ker1, trn-F806 และ trn-Ker ซึ่งได้จากการออกแบบด้วยโปรแกรม prime3 โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาในช่วง ITS1, ITS2

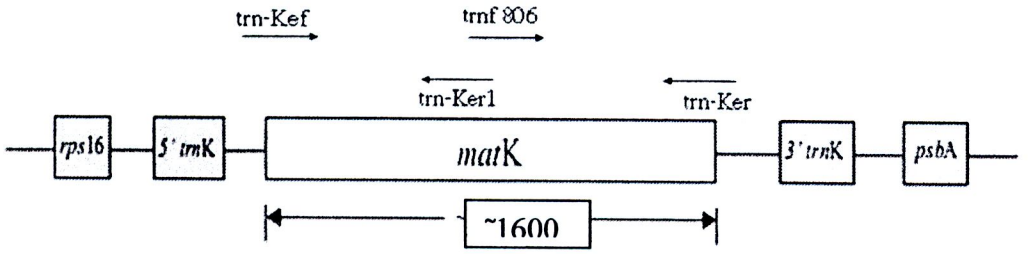
ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
ITS1	5′- GTCCACTGAACCTTATCATTTAG -3′
ITS4	5′- TCCTCCGTTATTGATATG C -3′
18S-26S-5′F	5′- GTAGGTGAACCTGCAAAGGATCA -3′
18S-26S-3′R	5′- CCATGCTTAAACTCAGCGGGT -3′

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาในช่วงจีน *mat*K

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
trn-Kef	5′- TTCCTTCTACCTCCGCTTCAC -3′
trn-Ker1	5′- CGATGGTAAGGAATCAAATGC -3′
trn-F806	5′- CTCCGCTTCACGTGGAAATA -3′
trn-Ker	5′- GTTTTGGGGAGGGATTTGTT -3′



ภาพที่ 39 แสดงตำแหน่ง ITS1 และ ITS2 ในไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA: rDNA) และตำแหน่งของไพรเมอร์



ภาพที่ 40 แสดงตำแหน่ง ของจีน *mat*K ในคลอโรพลาสต์ และตำแหน่งของไพรเมอร์

2.2 การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

2.2.1 นำตัวอย่างยอดอ่อนแห้งที่เก็บไว้ในซิลิกาเจลมาไว้ในโกร่งบดตัวอย่าง

2.2.2 เทไนโตรเจนเหลวใส่โกร่งบดตัวอย่าง บดให้ละเอียดหรือจนเป็นผงถ้ายังไม่ละเอียด ให้เทไนโตรเจนเหลวลงใหม่แล้วบดจนกว่าจะละเอียด

2.2.3 นำตัวอย่างพืชที่บดแล้ว สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Cetyl Trimethy Ammonium Bromide) หรือชุดสกัด DNeasy Kit® Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)

2.2.4 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดย 1 ชุดตัวอย่าง ปริมาณ 50 μl ประกอบด้วย ddH_2O (29.2 μl), 5X PCR buffer (10 μl), $MgCl_2$ (2nM) (5 μl), dNTPs (10nM) (1 μl), FastStart Taq DNA Polymerase 5U/ 5 μl (5 U fastStart taq 0.3 μl), Forward primer (1.25 μl), Reverse primer (1.25 μl) และ DNA template (2 μl)

2.2.5 หลังจากผสมส่วนประกอบทุกอย่างเสร็จแล้ว นำไปใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermo Cycler) รุ่น Master cycler gradient โดยตั้งอุณหภูมิในขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

pre-denaturation	อุณหภูมิ (94-95 °C)	เป็นเวลา 4 นาที
denaturation	อุณหภูมิ (94-95 °C)	เป็นเวลา 1 นาที
annealing	อุณหภูมิ (53-58 °C)	เป็นเวลา 30-45 วินาที
poly-merization	อุณหภูมิ (72 °C)	เป็นเวลา 2 นาที
final-polymerization	อุณหภูมิ (72 °C)	เป็นเวลา 4-10 นาที

ทำซ้ำ 30-35 รอบ

ตรวจสอบผลการสังเคราะห์ DNA โดยวิธีเจลอีเล็คโตรโฟเรซิส (gel electrophoresis) โดย Agarose gel ความเข้มข้น 0.8% ใช้กำลังไฟฟ้า 100 โวล์ (v) เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นย้อมด้วย etidium bromide เป็นเวลา 10-15 นาที และแช่ในน้ำ 5 นาที จึงนำไปตรวจสอบด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกด้วยเครื่องถ่ายภาพปริมาณสารพันธุกรรม (Gel Document)

2.2.6 กำจัดส่วนประกอบอื่นๆ (ingredient) ที่ปลอมปน QIAquick PCR Purification Kit® ก่อนส่งสารสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างไปวิเคราะห์หาลำดับสายดีเอ็นเอ

2.2.7 ส่งตัวอย่างหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัทไซบีเลส ประเทศไทย เพื่อส่งต่อไปยัง Molecular Informatic Laboratory Hong Kong ประเทศฮ่องกง

ตารางที่ 4 รายชื่อตัวอย่างพืชที่ใช้สำหรับการศึกษาเชิงโมเลกุล

รายชื่อพืช	สถานที่เก็บ	หมายเลขผู้เก็บ
E. angustifolia 1	เก็บมาจากคาบสมุทรมลายู ปลูกไว้ที่เกาะปีนัง ประเทศมาเลเซีย	*PY-CY* 0001
E. burttiana 2	เก็บมาจากคาบสมุทรมลายู ปลูกไว้ที่เกาะปีนัง ประเทศมาเลเซีย	*PY-CY* 0002
E. chayaniana 3	เขาทุ่งสะพานหิน อ. ขลุง จ. จันทบุรี	*PY-CY* 0003
*E. curtisii*4	เกาะปีนัง ประเทศมาเลเซีย	*PY-CY* 0004
E. monophylla 6	วัดป่าคานวิเวก อ. ปากคาด จ. หนองคาย	*PY-CY* 0006
E. smithiae 8	อุทยานแห่งชาติบูโด-สุไหงปาดี อ. สุไหงปาดี จ. นราธิวาส	*PY-CY* 0088
E. slahmong 9	เก็บมาจากคาบสมุทรมลายู ปลูกไว้ที่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น	*PY-CY* 0009
E. limiana 10	อุทยานแห่งชาติภูพาน อ. เมือง จ. สกลนคร	*PY-CY* 0010
E. triloba 11	ดานสวรรค์ เมืองปากช่อง แขวงจำปาสัก ประเทศลาว	*PY-CY* 0111
E. penangiana 12	เก็บมาจากคาบสมุทรมลายู ปลูกไว้ที่เกาะปีนัง ประเทศมาเลเซีย	*PY-CY* 0012
E. rugosa 13	เก็บมาจากคาบสมุทรมลายู ปลูกไว้ที่เกาะปีนัง ประเทศมาเลเซีย	*PY-CY* 0113
E. elan 20	เก็บมาจากคาบสมุทรมลายู ปลูกไว้ที่ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น	*PY-CY* 0020
E. smithiae 23	น้ำตกโตนเต๊ะ เทือกเขาบรรทัด อ. ปะเหลียน จ. ตรัง	*PY-CY* 0023
E. exserta 24	สวนพฤกษศาสตร์เขาช่อง อ. นาโยง จ. ตรัง	*PY-CY* 0024
E. exserta 25	อุทยานแห่งชาติเขาหลวง อ. ลานสกา จ. นครศรีธรรมราช	*PY-CY* 0025
E. smithiae 26	น้ำตกธารปลิว อ. ทุ่งหว้า จ. สตูล	*PY-CY* 0026

ตารางที่ 4 รายชื่อตัวอย่างพืชที่ใช้สำหรับการศึกษาเชิงโมเลกุล (ต่อ)

รายชื่อพืช	สถานที่เก็บ	หมายเลขผู้เก็บ
E. smithiae 28	น้ำตกโตนเต๊ะ เทือกเขาบรรทัด อ. ปะเหลียน จ. ตรัง	*PY-CY* 0028
E. smithiae 30	ยะโฮร์บาห์รู (Johorbaru) ประเทศมาเลเซีย	*PY-CY* 0030
E. wandokthong 31	ปลูกไว้ที่ จ. ขอนแก่น	*PY-CY* 0031
E. wandokthong 32	ปลูกไว้ที่ จ. ขอนแก่น	*PY-CY* 0032
E. triloba 34	วัดป่าดานวิเวก อ. ปากคาด จ. หนองคาย	*PY-CY* 0034
E. johoensis 36	ยะโฮร์บาห์รู (Johorbaru) ประเทศมาเลเซีย	*PY-CY* 0036
E. exserta 37	เก็บมาจากคาบสมุทรมลายู ปลูกไว้ที่เกาะปีนัง ประเทศมาเลเซีย	*PY-CY* 0037
E. smithiae 38	เก็บมาจากคาบสมุทรมลายู ปลูกไว้ที่เกาะปีนัง ประเทศมาเลเซีย	*PY-CY* 0038
E. poonsakiana 40	อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี	*PY-CY* 0040
E. monophylla 43	ประเทศลาว	*PY-CY* 0043
E. slahmong 44	เก็บมาจากคาบสมุทรมลายู ปลูกไว้ที่เกาะปีนัง ประเทศมาเลเซีย	*PY-CY* 0044
E. monophylla 45	ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว	*PY-CY* 0045
E . latiflora 46	Bugit timah ประเทศสิงคโปร์	*PY-CY* 0046
E. triloba 48	แขวงอัตปือ ประเทศลาว	*PY-CY* 0048
E. triloba 49	แขวงบอลิคำไซ ประเทศลาว	*PY-CY* 0049
E. triloba 50	เมืองหลักซาว ประเทศลาว	*PY-CY* 0050
E. triloba 51	อุทยานแห่งชาติดงภูเวียง ประเทศลาว	*PY-CY* 0051
E. angustifolia 56	เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าคลองนาคา อ. กะเปอร์ จ. ระนอง	*PY-CY* 0056

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตารางที่ 4 รายชื่อตัวอย่างพืชที่ใช้สำหรับการศึกษาเชิงโมเลกุล (ต่อ)

รายชื่อพืช	สถานที่เก็บ	หมายเลขผู้เก็บ
E. triloba 59	บ้านกาโสม ประเทศลาว	*PY-CY* 0059
E. tratensis 62	เขากวบ จ.ตราด	*PY-CY* 0062
E. trangensis 33	จ.ตรัง และคาบสมุทรมลายู	*PY-CY* 0033
E. trangensis 35	เก็บมาจากคาบสมุทรมลายู ปลูกไว้ที่เกาะปีนัง ประเทศมาเลเซีย	*PY-CY* 0035

3. การวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล

3.1 นำสายดีเอ็นเอมาจับคู่กัน โดยสายที่ใช้ Forward primer คู่กับสายที่ใช้ Reverse primer เพื่อยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ถูกต้อง ด้วยโปรแกรม MultAlin (Corpet, 1998)

3.2 ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 2004) เปรียบเทียบกับ spectrum จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.3 จัดเรียง (align) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชแต่ละชนิดเข้าด้วยกัน และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ในโปรแกรม BioEdit โดยคำนวณด้วย ClustalW Example Application

3.4 นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบและจัดทำเป็นสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ ด้วยโปรแกรม PAUP* (Version 4.0 beta 10a, Sinauer Assoc. Inc., U.S.A.) โดยตั้งค่า bootstrap เท่ากับ 1000 ครั้ง ของการสุ่มซ้ำ (Replicates) ซึ่งค่า bootstrap แสดงถึงความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ ที่จะเกิดขึ้นจริงบนวงศ์วานวิวัฒนาการที่ถูกต้อง โดยค่า bootstrap = 50-70% แสดงถึงความเชื่อมั่นในระดับต่ำ ค่า bootstrap = 71-84% แสดงถึงความเชื่อมั่นในระดับปานกลาง ค่า bootstrap = 85-100% แสดงถึงความเชื่อมั่นในระดับสูง และมีค่าสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ ได้แก่ ค่า Consistency Index (CI) เป็นค่าที่บอกถึงระดับการเข้ากันได้ของข้อมูลสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ ค่า Retention Index (RI) เป็นอัตราส่วนของลักษณะที่พัฒนาไปที่มีอยู่ร่วมกัน (synapomorphy) ที่พบบนแผนภูมิ ที่สามารถจะยอมรับได้ว่าเป็น synapomorphy ที่แท้จริง โดยค่า CI และ RI ที่ดีควรมีค่าเท่ากับ 1 ค่า โดยเรียกค่าที่ได้นี้แสดงให้เห็นถึงผลกระทบจากความแตกต่างของแต่ละลักษณะที่ศึกษา (Rescaled Consistency Index :RC) (กมลทิพย์ สุวรรณเดช และ ดวงใจ ศุขเฉลิม, 2548)

4. ผลการศึกษาวิจัยในช่วง ITS1 และ ITS2

ผลการศึกษาจากตัวอย่างทั้งหมด 39 ตัวอย่าง และ outgroup จำนวน 3 ตัวอย่าง จากฐานข้อมูลสากล NCBI (GenBank) พร้อม Accession number ได้แก่ *Amomum glabrum* S. Q. Tong มี (Accession number AF478721), *A. yunnanense* S. Q. Tong (Accession number AY352012) และ *Siamanthus siliquosus* K. Larsen & J. Mood (Accession number AF478790) โดยมีความยาวอยู่ในช่วง 1-600 คาแรกเตอร์ จากการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน ITS1 อยู่ในช่วงลำดับที่ 16-192 ส่วน 5.8S อยู่ในช่วงลำดับที่ 193-355 และส่วน ITS2 อยู่ในช่วงลำดับที่ 356-592 (ภาพที่ 43-54)

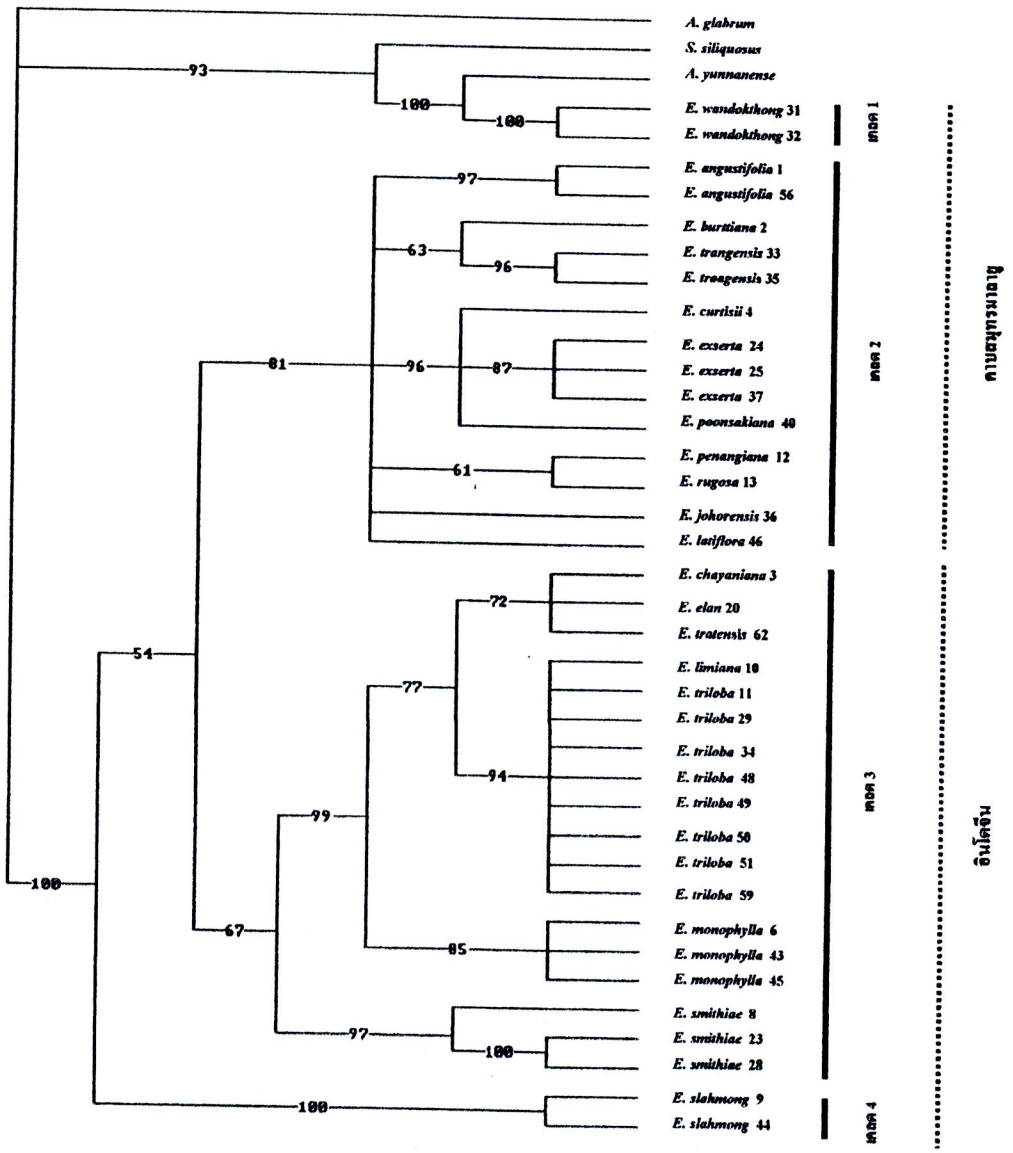
ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบและจัดทำเป็นสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ ด้วยโปรแกรม PAUP*4.0 beta win มีค่า Consistency Index (CI) = 0.7540 ค่า Retention Index (RI) = 0.8010 ค่า Rescaled Consistency Index (RC) = 0.6492 โดยตั้งค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 ครั้งของการสุ่มซ้ำ (Replicates) ได้ผลดังนี้

เคลด 1 ประกอบด้วย *E. wandokthong*31 และ *E.wandokthong*32 มีค่าความเชื่อมั่นระดับสูง (boostrap = 100 %) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

เคลด 2 ประกอบด้วย *E. angustifolia* 1, *E. angustifolia* 56, *E. burttiana* 2, *E. trangensis* 33, *E. trangensis* 35, *E. curtisii* 4, *E. exserta* 24, *E. exserta* 25, *E. exserta* 37, *E. poonsakiana* 40, *E. penangiana* 12, *E. rugosa* 13, *E. johorensis* 36, *E. latiflora* 46 มีค่าความเชื่อมั่นระดับปานกลาง (bootstrap = 81 %) ในเคลดนี้ยังแบ่งย่อยเป็น *E. angustifolia* 1, *E. angustifolia* 56 มีค่าความเชื่อมั่นระดับสูง (bootstrap = 97 %) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน และ *E. exserta* 24, *E. exserta* 25, *E. exserta* 37 มีค่าความเชื่อมั่นระดับสูง (bootstrap = 87 %) ส่วน *E. penangiana* 12, *E. rugosa* 13 มีค่าความเชื่อมั่นระดับต่ำ (bootstrap = 62 %)

เคลด 3 ประกอบด้วย *E. chayaniana* 3, *E. elan* 20, *E. tratensis* 62, *E. limiana* 10, *E.triloba* 11, *E. triloba* 29, *E. triloba* 34, *E. triloba* 48, *E. triloba* 49, *E. triloba* 50, *E. triloba* 59, *E. monophylla* 6, *E. monophylla* 43, *E. monophylla* 45, *E. smithiae* 8, *E. smithiae* 23, *E. smithiae* 28 พบว่า *E. chayaniana* 3, *E. elan* 20, *E. tratensis* 62 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมีค่าความเชื่อมั่นระดับปานกลาง (bootstrap = 72 %) และ *E monophylla* 6, *E. monophylla* 43, *E. monophylla* 45 มีค่าความเชื่อมั่นระดับสูง (bootstrap = 85 %) โดยกลุ่มนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน ส่วน *E. smithiae* 8, *E. smithiae* 23, *E. smithiae* 28 มีค่าความเชื่อมั่นระดับสูง (bootstrap = 97 %) ซึ่งกลุ่มนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกัน

เคลด 4 ประกอบด้วย *E. slahmong* 9, *E. slahmong* 44 พบว่าพืชตัวอย่างทั้งสองตัวอย่างนี้มีค่าความเชื่อมั่นระดับสูง (bootstrap = 100 %) และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน



ภาพที่ 41 สายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของพืชสกุลว่านดอกทอง (*Elettariopsis*) กับพืชที่เก็บจากสถานที่ต่างๆ ทั้งในประเทศไทยและคาบสมุทรมลายู โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงITS1 และ ITS2 [Length = 313 ค่า Consistency Index (CI) = 0.7540 ค่า Retention Index (RI) = 0.8010 ค่า Rescaled Consistency Index (RC) = 0.6492] โดยตัวเลขที่แสดงอยู่ด้านบนสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์เป็นตัวเลขแสดงค่าความเชื่อมั่น (bootstrap)

5. ผลการศึกษาวิจัยในช่วงจีน *mat*K

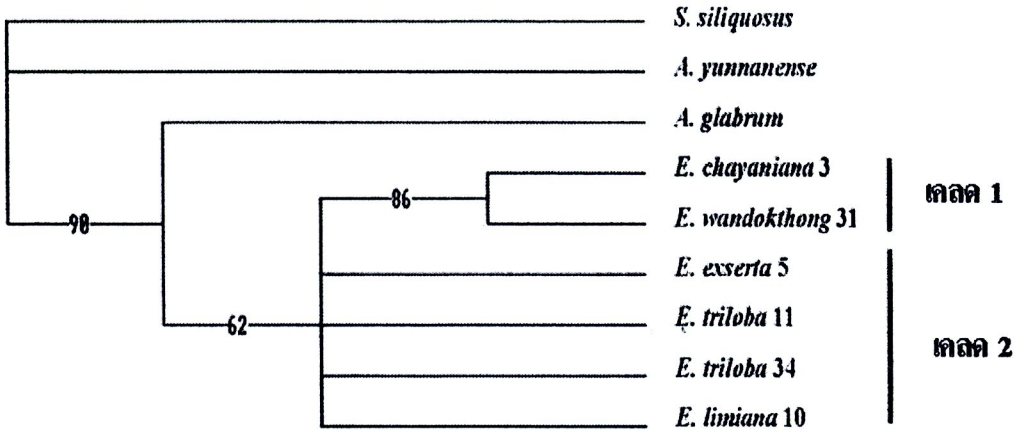
ผลการศึกษาจากตัวอย่างทั้งหมด 9 ตัวอย่าง และ outgroup จำนวน 3 ตัวอย่างจากฐานข้อมูลสากล NCBI (GenBank) พร้อม Accession number ได้แก่ *Amomum glabrum* S. Q. Tong (Accession number AY352019), *A. yunnanense* S. Q. Tong (Accession number AY352042) และ *Siamanthus siliquosus* K. Larsen & J. Mood (Accession number AF478891) โดยมีความยาวอยู่ในช่วง 1-1,500 คาแรกเตอร์ จากการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอโทด์ส่วนส่วนจีน *mat*K อยู่ในช่วงลำดับ 146-1,500 (ภาพที่ 55-63)

จากการเปรียบเทียบและจัดทำเป็นสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ ด้วยโปรแกรม PAUP*4.0 beta win จากตัวอย่างทั้งหมด 9 ตัวอย่าง มีค่า Consistency Index (CI) = 0.9153 ค่า Retention Index (RI) = 0.6875 ค่า Rescaled Consistency Index (RC) = 0.6292 โดยตั้งค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 ครั้งของการสุ่มซ้ำ (Replicates) ได้ผลดังนี้

เคลด 1 ประกอบด้วย *E. chayaniana*3 กับ *E. wandokthong*31 มีค่าความเชื่อมั่นระดับสูง (bootstrap = 86%)

เคลด 2 ประกอบด้วย *E. exserta* 5, *E. triloba* 11, *E. triloba* 34 และ *E. limiana* 10 พบว่า *E. exserta* 5, *E. triloba* 11, *E. triloba* 34 และ *E. limiana* 10 มีค่าความเชื่อมั่นระดับต่ำ (bootstrap = 62 %)

อย่างไรก็ตามการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีน *mat*K ของพืชสกุลว่านดอกทอง (*Elettariopsis*) ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้เห็นถึงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์ที่ชัดเจนยิ่งขึ้น



ภาพที่ 42 สายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของพืชสกุลว่านดอกทอง (*Elettariopsis*) กับพืชที่เก็บจากสถานที่ต่างๆ ทั้งในประเทศไทย และคาบสมุทรมลายู โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วง จีน *mat*K [Length = 59 ค่า Consistency Index (CI) = 0.9153 ค่า Retention Index (RI) = 0.6875 ค่า Rescaled Consistency Index (RC) = 0.6292] โดยตัวเลขที่แสดงอยู่ด้านบนสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ เป็นตัวเลขแสดงค่าความเชื่อมั่น (bootstrap)

6. สรุปผลและอภิปรายผลการศึกษาวิจัย

6.1 สรุปผลการศึกษาวิจัยในช่วง ITS1 และ ITS2

จากการศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วง ITS1 และ ITS2 ของพืชสกุลว่านดอกทองทั้ง 19 ชนิด 36 ตัวอย่าง และ outgroup อีก 3 ชนิด รวมทั้งหมด 39 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มได้ชัดเจน คือ กลุ่มที่มีช่อดอกแบบช่อกระจุก และ กลุ่มที่มีช่อดอกแบบยืดยาว และในกลุ่มที่มีช่อดอกแบบยืดยาวสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยคือ กลุ่มย่อยที่ 1 กลุ่มช่อดอกแบบช่อกระจุกที่มีก้านช่อดอกยืดยาว และกลุ่มย่อยที่ 2 กลุ่มช่อดอกยืดยาวแบบแตกแขนงซึ่งสามารถจัดจำแนกได้ดังนี้ (ภาพที่ 41)

เคลดที่ 1 จากแผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์ พบว่า *E. wandokthong* เป็นกลุ่มที่มีช่อดอกแบบช่อกระจุกมีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศไทยแถบจังหวัดปราจีนบุรีเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ปลูกไว้เพื่อการศึกษาในครั้งนี้ การจัดลำดับความใกล้ชิดจากเชิงวิวัฒนาการชาติพันธุ์นี้ *E. wandokthong* ทั้ง 2 ตัวอย่างเป็นชนิดเดียวกันมีค่าความเชื่อมันระดับสูง (bootstrap = 100 %) ใน เคลดที่ 1 นี้สำหรับ *E. wandokthong* เมื่อพิจารณาจากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์ พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *A. yunnanense* โดยมีค่าความ

เชื่อมั่นระดับสูง (bootstrap = 100 %) ซึ่งแสดงถึง *E. wandokthong* เป็นชนิดที่มีวิวัฒนาการชาติพันธุ์มาจากบรรพบุรุษมากกว่า 1 บรรพบุรุษ (polyphyletic) ซึ่งมีความสอดคล้องกับการรายงานของ Ganepain (1907) ที่จัด *A. trilobatum* และ *A. monophyllum* ไว้ในพืชสกุลกระวาน เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน และต่อมาได้จัดให้เป็นพืชในสกุลว่านดอกทอง (*Elettariopsis*) เนื่องจากมีความแตกต่างกับพืชสกุลกระวานอย่างชัดเจน คือพืชสกุลกระวานจะมีรยางค์ของเกสรเพศผู้ตรงโคนมีลักษณะคล้ายเขี้ยวหรือฟันขนาดเล็ก ส่วนใบประดับย่อยจะเชื่อมติดกันเป็นหลอดซึ่งไม่พบลักษณะนี้ในพืชสกุลว่านดอกทอง

เคลดที่ 2 จากแผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์พบว่า *E. angustifolia*, *E. burttiana*, *E. curtisii*, *E. exserta*, *E. poonsakiana*, *E. johorensis*, *E. latiflora*, *E. rugosa* และ *E. trangensis* เป็นกลุ่มที่มีช่อดอกแบบยืดยาว มีค่าความเชื่อมั่นระดับปานกลาง (bootstrap = 81 %) และสามารถจัดเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม คือ กลุ่มย่อยที่ 1 กลุ่มช่อดอกกระจุกก้านยืดยาว ได้แก่ *E. angustifolia*, *E. johorensis*, *E. penangiana* และ *E. trangensis* และกลุ่มย่อยที่ 2 กลุ่มช่อดอกยืดยาวแตกแขนง ได้แก่ *E. burttiana*, *E. curtisii*, *E. exserta*, *E. poonsakiana* และ *E. rugosa* ทั้งสองกลุ่มมีเขตการกระจายพันธุ์ที่คาบสมุทรมลายู, ประเทศมาเลเซียและทางภาคใต้ของประเทศไทย ยกเว้น *E. poonsakiana* ที่มีแถบการกระจายพันธุ์ในของประเทศไทย จ. กาญจนบุรี ส่วน *E. trangensis* พบว่าเป็นกลุ่มที่มีช่อดอกแบบช่อกระจุกแต่จัดไว้ใน เคลดที่ 2 เนื่องจากมีเขตการกระจายพันธุ์ในแถบคาบสมุทรมลายู และประเทศไทย มีค่าความเชื่อมั่นระดับสูง (bootstrap = 96 %) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Wood, Whitten & Williams (2000) ที่ได้กล่าวไว้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้แสดงถึงความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการชาติพันธ์กับภูมิศาสตร์ และนิเวศวิทยา

เคลดที่ 3 จากแผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์ พบว่า *E. chayaniana*, *E. elan*, *E. tratensis*, *E. limiana*, *E. triloba*, และ *E. monophylla*, *E. smithiae* เป็นกลุ่มที่มีช่อดอกแบบกระจุก มีค่าความเชื่อมั่นระดับสูง (bootstrap = 99 %) กลุ่มนี้รังไข่ส่วนมากจะมีขน และลิ้นใบมีขนชัดเจน ผลเป็นรูปรีมีสันชัดเจน 6-8 สัน ยกเว้น *E. elan* ที่รังไข่เกลี้ยง ผลกลมสีแดง แต่มีลักษณะที่สัมพันธ์กันคือมีช่อดอกแบบช่อกระจุก โดยพืชกลุ่มนี้พบการกระจายพันธุ์ที่คาบสมุทรอินโดจีน มีค่าความเชื่อมั่นระดับปานกลาง (bootstrap = 77 %)

เคลด 4 จากแผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์ พบว่า *E. slahmong* เป็นกลุ่มที่มีช่อดอก 2 กลุ่ม มีค่าความเชื่อมั่นระดับสูง (bootstrap = 100 %) กลุ่มที่ 1 กลุ่มช่อดอกแบบช่อกระจุก โดยพืชในกลุ่มนี้เป็นตัวอย่างเก็บได้จากธรรมชาติ และกลุ่ม 2 กลุ่มช่อดอกแบบยืดยาวพืชในกลุ่มนี้เป็นตัวอย่างที่ได้ปลูกไว้เพื่อทำการศึกษา มีถิ่นการกระจายพันธุ์ที่ทางภาคใต้ของประเทศไทย และคาบสมุทรมลายู

6.2 สรุปผลการศึกษาวิจัยในจีน *mat*K

เคลด 1 จากแผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์ พบว่า *E. chayaniana* กับ *E. wandokthong* มีค่าความเชื่อมั่นระดับสูง (bootstrap = 86 %) เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกันต่างกันเพียง 2 ลำดับ และมีเขตการกระจายพันธ์อยู่ในเขตพื้นที่ภูมิศาตสร์พื้นที่ป่าที่เป็นป่าลักษณะแบบเดียวกัน

เคลดที่ 2 จากแผนภาพแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์ พบว่า *E.exserta, E. triloba, E. triloba* และ *E. limiana* มีค่าความเชื่อมั่นระดับต่ำ (bootstrap = 62 %) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันแต่มีเขตการกระจายพันธุ์ในแถบอินโดจีนเหมือนกัน ยกเว้น *E. exserta* มีเขตการกระจายพันธุ์ ทางภาคใต้ของประเทศไทย และคาบสมุทรมลายู ประเทศมาเลเซีย

การศึกษาจีน *mat*K นี้ยังไม่สามารถแบ่งแยกได้ชัดเจน เนื่องจากทำเพียงบางส่วนทำให้เห็นความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของชาติพันธุ์ไม่ชัดเจน