โครงการวิจัยที่ 2

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูกในประเทศไทย

Genetic Diversity of Wan Chak Mod Loog (*Curcuma comosa* Roxb., *Curcuma latifolia* and *Curcuma xanthorhiza* Roxb.) in Thailand

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2552 จำนวน 1,360,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 25 พฤษภาคม 2552 ถึง 25 พฤษภาคม 2553

รายงานคณะผู้วิจัย

ผศ.ดร.วิเชียร กีรตินิจกาล
นางสาวกุหลาบ เหล่าสาธิต
นางสาวโสภิดา ชิดชื่นเชย
นายชัยมงคล ตะนะสอน
นางสาวอารีย์รัตน์ ขุนภิบาล

บทคัดย่อ

ว่านชักมดลูกเป็นพืชสมุนไพรไทยในสกุล *Curcuma* ที่มีการนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย แต่เนื่องจากพืชในสกุลนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก จึงอาจเกิดความสับสนในการนำไปใช้ประโยชน์ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิด และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูกและพืชที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูก จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 411 ตัวอย่าง ซึ่งรวบรวมมาจากทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย คัดเลือกตัวอย่างที่มีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันจำนวน 60 ตัวอย่าง มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี จากผลการทดลองพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มของว่านชักมดลูก 2 กลุ่ม ได้แก่ ตัวอย่างกลุ่มที่ 1 และตัวอย่างกลุ่มที่ 3 ส่วนพืชที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูกถูกจัดอยู่กลุ่มที่ 2 เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมด้วย พบว่าสามารถระบุชนิดของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 ได้เป็น *Curcuma comosa* ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 สามารถระบุชนิดได้เป็น *Curcuma* sp. จากการศึกษาในครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าเทคนิคเอเอฟแอลพี เป็นเทคนิคที่สามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม แยกความแตกต่างและจำแนกชนิดของว่านชักมดลูกได้

คำสำคัญ (keyword) : ว่านชักมดลูก, เอเอฟแอลพี, ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Abstract

"Wan Chak Mod Loog" is an important medicinal herb which has been widely used in Thailand. This plant belongs to the genus *Curcuma.* Many reports indicate that the high similarity in morphological characteristics observed among *Curcuma* spp. may cause confusion in its utilization. The current study aims to investigate the genetic diversity of Wan Chak Mod Loog and related species using AFLP technique. In total, 411 accessions of *Curcuma* spp. were collected from cultivated sites throughout Thailand. Sixty samples which showed different phenotypes were selected and then subjected to AFLP fingerprinting. The result indicated that all 60 samples could be divided into three groups. Group I and group III samples were defined as Wan Chak Mod Loog. The related species samples were clustered together into Group II. Considering the morphological characteristics, Wan Chak Mod Loog samples in group III could be assigned to *Curcuma comosa*, whereas Wan Chak Mod Loog samples in group I and related species samples in group II could be assigned to *Curcuma* sp. We found that AFLP technique could be used to accurately identify and classify Wan Chak Mod Loog.

Keyword: Wan Chak Mod Loog, AFLP, genetic diversity

บทนำ

ว่านชักมดลูกเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกับขิง ข่า และขมิ้นชัน ว่านชักมดลูกจัดเป็นสมุนไพรพื้นบ้าน ใช้รากแก้อาการท้องอืดท้องเฟ้อ หัวหรือเหง้าใช้รักษาและบำรุงอาการต่าง ๆ ในสตรี เช่น แก้ปวดมดลูก แก้ประจำเดือนมาไม่ปกติ จากคุณสมบัติดังกล่าว ว่านชักมดลูกจึงเป็นองค์ประกอบสำคัญในยาน้ำสตรีชนิดต่าง ๆ ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งภายในและต่างประเทศ ว่านชักมดลูกมีสารสำคัญหลายชนิด เช่น มี phytoestrogen ซึ่งมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่มีฤทธิ์อ่อนกว่า ช่วยกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด เยื่อบุช่องมดลูก และช่วยเสริมสร้างความหนาแน่นของกระดูก (Piyachaturawat *et al*., 1995b, 1995c, 1998, 1999a; Suksamrarn, 2008) มี phloracetophenone glucoside ซึ่งช่วยลดคอเลสเทอรอล กระตุ้นการหลั่งน้ำดี (Piyachaturawat *et al*., 1995a, 1999b; Suksamrarn *et al.*, 1997) รวมทั้งมีสรรพคุณช่วยลดการอักเสบ (Jantaratnotai, 2006; Sodsai, 2007) และต้านอนุมูลอิสระ (Niumsakul *et al.*, 2007) ว่านชักมดลูกจึงจัดเป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพสูงและน่าสนใจอีกชนิดหนึ่ง แต่เนื่องจากว่านชักมดลูกและพืชในสกุล *Curcuma* บางชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก (Apavatjrut *et al*., 1999) จึงอาจเกิดความสับสน แล้วนำพืชต่างชนิดที่คล้ายว่านชักมดลูกไปใช้ ซึ่งในบางกรณีพืชชนิดนั้นอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ ในปัจจุบันข้อมูลทางด้านสายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูกและพืชที่จัดอยู่ในสกุลเดียวกันยังมีอยู่น้อยมาก และยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกสายพันธุ์ว่านชักมดลูกและพืชชนิดที่มีลักษณะใกล้เคียงเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกสายพันธุ์ว่านชักมดลูกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาถือเป็นแนวทางแก้ปัญหาอีกทางหนึ่ง แต่พบว่าวิธีนี้ยังคงมีข้อกำจัด เนื่องจากว่านชักมดลูกเป็นพืชที่ออกดอกยาก ทำให้ขาดข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอก ซึ่งถือเป็นลักษณะสำคัญประการหนึ่งที่ใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนก ด้วยเหตุผลดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าสามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกสิ่งมีชีวิตได้อย่างแม่นยำ มีความจำเพาะสูง รวมทั้งมีการนำไปประยุกต์ใช้กับพืชหลายชนิด (Powell *et al.*, 1996b) โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในครั้งนี้คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี หรือเทคนิคเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism; AFLP) เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ให้ผลการทดลองที่มีความน่าเชื่อถือ สามารถทำซ้ำแล้วได้ผลเช่นเดิม ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย ตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน และไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบส (สุรินทร์, 2545, 2552)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม รวมทั้งจำแนกสายพันธุ์ของว่านชักมดลูกและพืชที่มีลักษณะใกล้เคียงในประเทศไทยโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี เพื่อแก้ปัญหาความสับสนในการนำพืชสมุนไพรไปใช้ประโยชน์ นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับงานวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้องต่อไปได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของชักมดลูกโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี
2. เพื่อจำแนกกลุ่มสายพันธุ์ว่านชักมดลูกโดยใช้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ว่านชักมดลูก

ว่านชักมดลูกเป็นสมุนไพรพื้นบ้านของประเทศไทย จัดอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae สกุล *Curcuma* เป็นไม้ล้มลุกประเภทปีเดียว (annual herb) ออกดอกก่อนออกใบ โดยจะเริ่มออกดอกและใบช่วงต้นฤดูฝน คือประมาณปลายเดือนมีนาคม - ต้นเดือนเมษายน จากนั้นต้นก็จะเจริญเติบโตไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งช่วงฤดูหนาวหรือประมาณเดือนพฤศจิกายน - เดือนธันวาคม ต้นจะเริ่มโทรมและฟุบตัวเหลือเพียงส่วนหัวอยู่ใต้ดิน ส่วนใหญ่นิยมขุดหัวในช่วงเวลานี้มาใช้เนื่องจากจะมีปริมาณสารสำคัญสูง ว่านชักมดลูกสามารถเจริญเติบโตได้ในดินทุกประเภท แต่จะเจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนหรือดินร่วนปนทราย (ชมรมว่านมหาเศรษฐี, 2549; โชติอนันต์, 2550)

ว่านชักมดลูกเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่ใช้หัวหรือเหง้าในการรักษาและบำรุงอาการต่าง ๆ ในสตรี โดยอาจใช้ว่านชักมดลูกเพียงชนิดเดียว หรือใช้ร่วมกับสมุนไพรตัวอื่นในรูปตำหรับยาในการรักษา ว่านชักมดลูกมี

สรรพคุณช่วยลดการอักเสบ 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 กรองเอาแต่น้ำกินรักษาโรคไส้เลื่อน 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)-1-1phenyl-(1*E*)-1-heptene และ 7-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-1-phenyl-(1*E*)-1-heptene ช่วยลดการอักเสบ (Jantaratnotai, 2006; Sodsai, 2007) สาร diarylheptanoids ที่แยกได้จากสารสกัดส่วนที่มีขั้วน้อย มีฤทธิ์ฆ่าไส้เดือนตัวกลม (nematodes) (Jurgens, 1994) เป็นต้น

การจำแนกสายพันธุ์ว่านชักมดลูก

การจำแนกสายพันธุ์ว่านชักมดลูกเดิมสามารถแบ่งว่านชักมดลูกออกเป็น 2 ชนิด คือ *Curcuma comosa* Roxb. และ *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาและที่มา (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. มีเส้นกลางใบของหลังใบมีสีเขียว ไม่พบขนที่ท้องใบ ก้านใบยาว ดอกออกเป็นช่อแบบช่อเชิงลดแทงจากพื้นดิน เกสรตัวผู้เป็นหมันมีสีขาว ส่วน *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. เส้นกลางใบของหลังใบมีสีน้ำตาลอมแดง ท้องใบมีขน ก้านใบสั้น (สนั่น และ ฉัตรชัย, 2546)

ภาณี และคณะ (2548) ได้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูกจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (random amplified polymorphic DNA) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มว่านชักมดลูกได้เป็น 3 กลุ่ม และพบว่าว่านชักมดลูกในกลุ่มเดียวกันไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการปรากฏสีแดงบริเวณเส้นกลางใบที่ใช้ในการจำแนกชนิดของว่านชักมดลูกเพียงลักษณะเดียว ไม่สามารถใช้ใน

การจำแนกชนิดได้ ควรใช้ลักษณะหลาย ๆ ลักษณะในการจำแนก โดยเฉพาะลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกร่วมด้วย

Soontornchainaksaeng and Jenjittikul (2010) ได้ศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานและความหลากหลายทางพันธุกรรมของว่านชักมดลูก 24 ตัวอย่าง โดยใช้จำนวนโครโมโซม reproductive part คือ ลักษณะช่อดอก, ดอก และดอก ร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยาของใบ พบว่าว่านชักมดลูกมี 3 ชนิด คือ ชนิด *Curcuma comosa*, *Curcuma elata* และ *Curcuma latifolia* โดยว่านชักมดลูกชนิด *Curcuma comosa* จะมีก้านช่อดอกสั้น (2-5 ซม.) ไม่มีขนใต้แผ่นใบ และแบ่งเป็น 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ที่มีลักษณะช่อดอกรูปทรงกระบอกยาว มีจำนวนโครโมโซม 2n = 42 และพันธุ์ที่มีช่อดอกรูปทรงกระบอกสั้น มีจำนวนโครโมโซม 2n = 62 หรือ 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

เครื่องหมายที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

เครื่องหมายที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งลักษณะทางปริมาณและคุณภาพมี 2 ประเภท คือ เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) และเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) โดยเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา เป็นเครื่องหมายที่ใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยวิธีเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยาหรือทางสรีรวิทยา ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักจะขึ้นกับสภาพแวดล้อม ทำให้ผลการตรวจสอบผิดพลาดได้ จึงต้องใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน (protein marker) เป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่าง ๆ และระดับดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ โดยการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อได้เปรียบกว่าการตรวจสอบระดับโปรตีน คือ การตรวจสอบในระดับโปรตีนจะตรวจสอบได้เฉพาะส่วนที่มีการแสดงออกของยีนเท่านั้น จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้มีไม่มาก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม อีกทั้งต้องเลือกชนิดเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ นอกจากนี้โปรตีนยังเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย ต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัดและไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้นาน ส่วนโมเลกุลดีเอ็นเอนั้นมีความเสถียรมากกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใด ๆ ระยะการเจริญ เติบโตหรือสภาพทางสรีรวิทยาใด ๆ ก็ได้โดยไม่ขึ้นกับสิ่งแวดล้อม และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้จากทั้งส่วนที่เป็นยีนและไม่ใช่ยีน ทำให้สามารถตรวจสอบได้โดยไม่มีข้อจำกัด นอกจากนี้วิธีการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอยังมีให้เลือกหลายวิธี และสามารถประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้ไม่จำกัด (สุรินทร์, 2545,2552)

เครื่องหมายดีเอ็นเอแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. เครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทที่ไม่ใช้วิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction; PCR) 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) เครื่องหมายเอสเอสอาร์ หรือไมโครแซทเทลไลท์ (simple sequence repeat; SSR) (Brown *et al.*, 1996; Powell *et al*., 1996a) เครื่องหมายเอสอาร์เอพี (sequence related amplified polymorphism; SRAP) (Li and Quiros, 2001) เครื่องหมายทีอาร์เอพี (target region amplification polymorphism; TRAP) (Hu and Vick, 2003) เป็นต้น

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

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับพันธุ์ (variety) ภายในชนิด (species) เดียวกัน ควรเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถตรวจสอบพบความแตกต่างหรือมีพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) สูง ซึ่งอาจจะเป็นเครื่องหมายประเภทที่มีการข่มร่วมกัน (co-dominance) หรือข่มแบบสมบูรณ์ (dominance) ก็ได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบที่มีการข่มร่วมกันมักจะมีพอลิมอร์ฟิซึมสูงกว่า เช่น เครื่องหมายเอสเอสอาร์ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี แต่ข้อจำกัดของเครื่องหมายประเภทนี้ คือ สามารถตรวจสอบได้ครั้งละ 1 ตำแหน่งเท่านั้น ทำให้ต้องใช้เครื่องหมายจำนวนมากจึงจะได้ข้อมูลที่ถูกต้องน่าเชื่อถือ ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เป็นแบบสุ่มแม้ว่าจะมีพอลิมอร์ฟิซึมต่ำ แต่สามารถตรวจได้ครั้งละหลายตำแหน่ง จึงทดแทนการที่แต่ละตำแหน่งมีพอลิมอร์ฟิซึมต่ำไปได้ นอกจากนี้การตรวจสอบที่ใช้เทคนิคพีซีอาร์ สามารถทำได้รวดเร็ว การตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์เพียงไม่กี่ชนิดก็ครอบคลุมส่วนของจีโนมได้เพียงพอ ผลที่ได้จึงถูกต้องน่าเชื่อถือ ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ถ้ามีข้อมูลไพรเมอร์ของเครื่องหมายเอสเอสอาร์ที่พัฒนาไว้แล้วจำนวนมากพอก็สามารถนำมาใช้ได้เป็นอย่างดี แต่ถ้าต้องพัฒนาเครื่องหมายขึ้นใหม่ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบสุ่มชนิดที่ตรวจสอบได้ครั้งละหลายตำแหน่ง เช่น เครื่องหมายอาร์เอพีดี เครื่องหมายเอเอฟแอลพี จะเป็นทางเลือกที่ดีกว่า (สุรินทร์, 2552) แต่เนื่องจากเครื่องหมายอาร์เอพีดีมีข้อจำกัดในเรื่องการทดลองทำซ้ำแล้วให้ผลที่ไม่เหมือนเดิม เนื่องจากมีความไวต่อการเปลี่ยนสภาวะค่อนข้างสูง (สุรินทร์, 2545, 2552; Techaprasan *et al*., 2008) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมส่วนใหญ่จึงนิยมใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีมากกว่า ดังตัวอย่างเช่น การจำแนกสายพันธุ์ของไผ่ (รังสัน และ สุจิตรา, 2547) ข่า (กฤษณา, 2548) และกระชาย (Techaprasan *et al*., 2008) เป็นต้น

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism; AFLP)

พื้นฐานของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี คือ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ หลักการทำเอเอฟแอลพี สามารถแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิด ขั้นตอนเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนด้วยเอเอฟแอลพีไพรเมอร์ และขั้นตอนวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (สุรินทร์, 2545, 2552)

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ นิยมใช้เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส หรือที่เรียกว่า rare cutter ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส หรือที่เรียกว่า frequent cutter โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น frequent cutter จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นขนาดเล็ก ซึ่งจะเพิ่มปริมาณได้ดีในการทำพีซีอาร์ และชิ้นดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับแยกความแตกต่างด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส 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 เพราะตัดดีเอ็นเอได้ขนาดพอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ และการแยกโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel ส่วนเอนไซม์ที่เป็น rare cutter นิยมใช้ *Eco*RI เนื่องจากมีราคาถูก สามารถตัดดีเอ็นเอได้มีประสิทธิภาพ และพบโอกาสที่ตัดดีเอ็นเอไม่สมบูรณ์น้อย

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะทำได้โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสทางปลาย 5′ เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3′ อีกส่วนหนึ่ง เพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางชิ้น ส่วนของไพรเมอร์ที่เหมือนกับ adapter และบริเวณจดจำของเอนไซม์ เรียกว่า common part ส่วนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3′ เรียก selective part จำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3′ จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณลง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณได้ต้องมีลำดับเบสที่อยู่ต่อกับตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไป ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกมากขึ้น จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณได้ก็จะลดลง โดยปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จะเหลือเพียง 1 ใน 4 ของชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมด ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 2 เบส จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้จะลดลงเหลือ $(1/4)^2$ หรือ 1 ใน 16 ของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงสามารถควบคุมให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในจำนวนที่เหมาะสมได้ 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

การวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 50-100 แถบ การตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอทำได้ 2 วิธี คือ วิธีที่ติด

ฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี แล้วติดตามโดยการทำออโตเรดิโอกราฟ หรือติดฉลากด้วยสารเรืองแสง แล้วติดตามด้วยเครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ วิธีที่สอง คือ การย้อมเจลด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท หรือการไฮบริ-ไดเซชั่นโดยใช้โพรบที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำเอเอฟแอลพีมีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใด ๆ ก็ได้ ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม แม้ว่าวิธีการทำเอเอฟแอลพีจะค่อนข้างยุ่งยาก แต่ผลที่ได้สามารถทำซ้ำ และให้ผลคงเดิม (reproducible) สามารถเลือกคู่ผสมของไพรเมอร์ได้หลายแบบทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์คู่หนึ่งนั้นจะเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างหรือพอลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นนั้นมาจากการเปลี่ยนแปลงเบส (point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไปหรือเกิดขึ้นใหม่ หรือการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตรงส่วนที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกของไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว แล้วแต่กรณี หรืออาจเกิดจากการมีชิ้นดีเอ็นเอสั้น ๆ ขาดหายไป หรือสอดแทรกเข้ามาในระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ก็ได้ ผลที่เกิดขึ้นคือการมีแถบดีเอ็นเอหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น ๆ หรืออาจทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเปลี่ยนไป ดังนั้นการถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากการทำเอเอฟแอลพีจึงมีทั้งแบบที่แสดงลักษณะข่มสมบูรณ์โดยปรากฏเป็นการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ และแบบที่แสดงลักษณะข่มร่วมกัน โดยปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยทั่วไปจะพบเครื่องหมายเอเอฟแอลพีแบบที่เป็นลักษณะข่มมากกว่า ข้อดีของเครื่องหมายเอเอฟแอลพีคือไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษามาก่อน ด้วยประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์จึงทำให้การศึกษาทำได้รวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย นอกจากนี้ในการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่ง ๆ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (multilocus) พร้อมกัน ในหนึ่งปฏิกิริยาจะให้แถบดีเอ็นเอมากกว่าเครื่องหมายอาร์เอพีดีประมาณ 4 เท่า ทำให้เกิดพอลิมอร์ฟิซึมจำนวนมาก จึงสามารถใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง หรือศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตได้อย่างละเอียด (สุรินทร์, 2545, 2552)

จากที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่า เครื่องหมายเอเอฟแอลพีเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพมาก จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ หรือใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตเพื่อบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง รวมถึงนำไปจำแนกสายพันธุ์พืชได้ด้วย

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

นำว่านชักมดลูกที่รวบรวมได้จากทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทยจำนวน 411 ตัวอย่าง ปลูกในแปลงรวบรวมพันธุกรรมที่ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จ.นครราชสีมา เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยใช้ระยะห่างระหว่างแถว 75 เซนติเมตร และระยะห่างระหว่างต้น 60 เซนติเมตร ปลูกว่านชักมดลูกตัวอย่างละ 10 ต้น ก่อนปลูก ใส่ปุ๋ยมูลไก่อัตรา 250 กรัมต่อหลุม ให้น้ำโดยใช้ระบบสปริงเกลอร์ กำจัดศัตรูพืชตามความเหมาะสม

การพิจารณาคัดเลือกตัวอย่างจากแปลงปลูก ทางคณะผู้วิจัยได้คัดเลือกตัวอย่างโดยพิจารณาจากลักษณะการแสดงออกทางสัณฐานวิทยา และแหล่งที่มา ได้ตัวอย่างทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง แบ่งเป็นว่านชักมดลูก 54 ตัวอย่าง และพืชชนิดอื่นที่คล้ายว่านชักมดลูก 6 ตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบ โดยแหล่งที่มาของตัวอย่างครอบคลุมพื้นที่ทุกภูมิภาคของประเทศรวมทั้งสิ้น 29 จังหวัด และที่ไม่ทราบแหล่งที่มาที่แน่ชัด 4 แหล่ง ดังรายละเอียดในตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 รายละเอียดที่มาของตัวอย่างที่ทำการศึกษา

เลขที่ตัวอย่าง	ที่มา	เลขที่ตัวอย่าง	ที่มา	เลขที่ตัวอย่าง	ที่มา
1	พิษณุโลก	21	unkown	41	หนองคาย
2	พิจิตร	22	มหาสารคาม	42	unkown
3	ลำปาง	23	หนองคาย	43	เพชรบูรณ์
4	นครนายก	24	มหาสารคาม	44	นครปฐม
5	พิจิตร	25	กำแพงเพชร	45	unknown
6	พิษณุโลก	26	ราชบุรี	46*	พิษณุโลก
7	อยุธยา	27	สระแก้ว	47	มหาสารคาม
8	มหาสารคาม	28	ราชบุรี	48	เพชรบูรณ์
9	พิจิตร	29	กำแพงเพชร	49	เพชรบูรณ์
10	พิษณุโลก	30	กำแพงเพชร	50	อำนาจเจริญ
11	unknown	31	ลพบุรี	51	กระบี่
12	สมุทรปราการ	32	ชลบุรี	52*	สุราษฎร์ธานี
13	สุรินทร์	33	นครสวรรค์	53	สุรินทร์
14	พะเยา	34*	นครสวรรค์	54	บุรีรัมย์
15	สงขลา	35*	ปราจีนบุรี	55	เพชรบูรณ์
16	นครพนม	36	นครพนม	56*	ปราจีนบุรี
17	หนองคาย	37	ปราจีนบุรี	57*	ปราจีนบุรี
18	มหาสารคาม	38	ฉะเชิงเทรา	58	นครปฐม
19	พระนครศรีอยุธยา	39	เชียงใหม่	59	กาญจนบุรี
20	เพชรบูรณ์	40	หนองคาย	60	จันทบุรี

หมายเหตุ unknown คือตัวอย่างว่านชักมดลูกที่ไม่ทราบที่มาที่แน่ชัด

* คือ พืชชนิดอื่นที่คล้ายว่านชักมดลูก

1. การเก็บใบอ่อนของตัวอย่างเพื่อใช้สกัดดีเอ็นเอและวิธีสกัดดีเอ็นเอ

1.1 การเก็บใบอ่อนของตัวอย่างเพื่อใช้สกัดดีเอ็นเอ

เก็บใบอ่อนของตัวอย่างทั้ง 60 ตัวอย่าง ที่มีลักษณะม้วนงอ (รูปที่ 2-1) มาสกัดดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอที่สกัดได้จะมีปริมาณและคุณภาพสูง ตัดใบดังกล่าวใส่ในถุงพลาสติกมัดปากถุงให้แน่นสนิทแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อรักษาสภาพของตัวอย่าง จากนั้นจึงนำไปสกัดดีเอ็นเอ

รูปที่ 2-1 ใบอ่อนลักษณะม้วนงอของตัวอย่างว่านชักมดลูกและพืชชนิดใกล้เคียงที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1.2 วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนของตัวอย่างที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีที่ประยุกต์จากวิธีการของ Agrawal *et al*. (1992) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.2.1 นำใบอ่อนของตัวอย่างมาล้างทำความสะอาด แล้วซับให้แห้ง

1.2.2 เตรียม DNA extraction buffer (1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5M EDTA pH 8.0, 5M NaCl, CTAB, 2 - mercaptoethanol) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

1.2.3 นำใบอ่อนของตัวอย่างมาตัดเอาเฉพาะส่วนใบ ไม่เอาส่วนที่เป็นเส้นกลางใบ ใส่ลงในโกร่งที่เย็น เติมไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ให้ท่วม แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง ปล่อยให้ไนโตรเจนเหลวระเหยจนหมด แล้วจึงถ่ายผงใบลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มี DNA extraction buffer อยู่ จากนั้นผสมตัวอย่างกับ buffer ให้เข้ากัน

1.2.4 นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 60 นาที คอยพลิกหลอดไปมาทุก ๆ 10 นาที

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

1.2.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที (rpm) 10 นาที

1.2.7 ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรที่ดูดได้ พลิกหลอดไปมาเบา ๆ จะเริ่มเห็นสายดีเอ็นเอปรากฏขึ้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 30 นาที

1.2.8 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที

1.2.9 เทสารละลายทิ้งเติม washing buffer (absolute ethanol, 3 M NaOAc) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

1.2.10 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที

1.2.11 เทสารละลายทิ้ง ระวังตะกอนดีเอ็นเอหลุด เติม 70% ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงไปเพื่อล้างเกลือออกจากตะกอนดีเอ็นเอ

1.2.12 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที

1.2.13 เทสารละลายทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง

1.2.14 เติม RNase buffer (1 M Tris-HCl pH 8.0, 5 M NaCl) ลงไปปริมาตร 500 ไมโครลิตร ละลายตะกอนให้หมด

1.2.15 เติม RNase-A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ลงไป 8 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อกำจัด RNA ที่อาจปนเปื้อนอยู่

1.2.16 เติม Phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาตร 500ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบา ๆ

1.2.17 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 10 นาที

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

1.2.19 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 10 นาที

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

1.2.21 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที

1.2.22 เทสารละลายทิ้ง ระวังตะกอนดีเอ็นเอหลุด เติม 70 % ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงไปเพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ

1.2.23 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที

1.2.24 เทสารละลายทิ้ง ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง

1.2.25 ละลายตะกอนด้วย TE buffer (0.5M EDTA pH 8.0, 1M Tris-HCl pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

2. การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอทำได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล โดยใช้เจลความเข้มข้น 0.8 % และการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้สเปกโทรโฟโทเมทรี (spectro-photometry) โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

2.1.1 เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 % โดยเติมผงอะกาโรส 0.8 กรัมลงใน 1x TAE buffer (1x TAE : 4.84 g Tris Base, 1.142 ml glacial acetic acid, 2 ml 0.5 M EDTA; pH 8.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.1.2 นำไปละลายด้วยเตาไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวจนกระทั่งผงอะกาโรส ละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60 องศาเซลเซียส (ทดสอบได้โดยใช้ท้องแขนแตะที่ขวดเจล ถ้าสามารถทนความร้อนได้แสดงว่าเจลใช้ได้แล้ว)

2.1.3 เทเจลลงในถาดเจลที่เสียบหวี (comb) ลงไปตรงตำแหน่งที่ทำให้เกิดร่องสำหรับโหลดตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ เทเจลให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ

2.1.4 ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องประมาณ 20 นาที เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อย ๆ ดึงหวีออก

2.1.5 ย้ายเจลใส่ลงใน chamber สำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยให้ด้านที่มีช่องหวีอยู่ด้านขั้วลบ แล้วเท 0.5x TAE buffer ลงจนท่วมเจล

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

2.1.7 โหลดตัวอย่างลงในช่องหวีปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยโหลดดีเอ็นเอมาตรฐานไว้ที่ช่องแรกของเจล

2.1.8 ปิดฝาเครื่องแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักย์ 135 โวลต์ ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนไปพอประมาณ (15 นาที) โดยสังเกตจากการเคลื่อนที่ของโหลดดิ้งบัฟเฟอร์ (loading buffer) ได้ระยะทางที่เหมาะสม

2.1.9 ปิดเครื่อง นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 10 นาที

2.1.10 ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกด้วยน้ำสะอาดประมาณ 5 นาที นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation System

2.2 การวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้สเปกโทรโฟโทเมทรี

2.2.1 ดูดสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นสเตอไรด์ลงไป 147 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่มีค่า dilution factor = 50

2.2.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโท-เมทรี

2.2.3 คำนวณความเข้มข้นของ DNA ดังนี้

OD_{260} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (Abs 260)

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

2.2.4 ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ โดยดูค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 กับ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) ถ้ามีค่าประมาณ 1.8 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ถ้ามีค่ามากกว่าแสดงว่าอาจมีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนและถ้าต่ำกว่าแสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอล (สุรินทร์, 2545, 2552)

2.2.5 ปรับความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรด้วย TE buffer

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดเอเอฟแอลพี

3.1 การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อกับ adapter

3.1.1 นำสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตรใส่ในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร

3.1.2 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 2-2)	4	ไมโครลิตร
*Mse*I adapter (12.5 pmole/µl) (ตารางที่ 2-2)	4	ไมโครลิตร
10x T4 DNA ligase buffer	5	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (1 U/µl)	1	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นสเตอไรด์	25.375	ไมโครลิตร

ปริมาตรสารละลายรวม 50 ไมโครลิตร

3.1.3 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ตารางที่ 2-2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter

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

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

3.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์จะทำ 2 ครั้ง ครั้งแรก เรียกว่า preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบส 1 เบสที่ปลาย 3′ คือ E-A และ M-C (ตารางที่ 2-3) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

3.2.1.1 นำสารละลายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ adapter เรียบร้อยแล้วปริมาตร 2 ไมโครลิตร

3.2.1.2 เติมสารต่าง ๆ ดังนี้

*Eco*RI primer +1 (E-A) (5 pmole/µl) (ตารางที่ 2-3)	1	ไมโครลิตร
*Mse*I primer +1 (M-C) (5 pmole/µl) (ตารางที่ 2-3)	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
น้ำกลั่นสเตอไรด์	15.15	ไมโครลิตร

ปริมาตรสารละลายรวม 25 ไมโครลิตร

3.2.1.3 ผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้โปรแกรมดังนี้

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

3.2.1.4 แบ่งสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับสี 6x loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เพื่อตรวจสอบว่าสารละลายดีเอ็นเอถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะอย่างสมบูรณ์ และชิ้นดีเอ็นเอต่อกับ adapter อย่างสมบูรณ์แล้ว โดยเมื่อย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์จะพบรอยยาว (smear) ขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส

3.2.1.5 เจือจางสารละลายดีเอ็นเอที่เหลือ 20 เท่า ใน TE buffer

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

3.2.2.1 นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้ว มาปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.5 ml

3.2.2.2 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
น้ำกลั่นสเตอไรด์	8.3	ไมโครลิตร

ปริมาตรสารละลายรวม 20 ไมโครลิตร

3.2.2.3 ผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้โปรแกรม touch down ดังนี้

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

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 } 23 รอบ
ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 60 วินาที

3.2.2.4 นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบผล โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในโพลีอะคริลาไมด์เจล ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ต่อไป

ตารางที่ 2-3 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′

3.3 การแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel

3.3.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทโพลีอะคริลาไมด์เจล

3.3.1.1 นำแผ่นกระจกสำหรบเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 % ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น

3.3.1.2 เช็ดกระจกแผ่นหลังดวย bind silane (bind silane 1.5 ไมโครลิตร, glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และเอทานอล 496 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก

3.3.1.3 เช็ดกระจกแผ่นหนาที่มีลักษณะเป็นหูกระต่ายด้วย repel silane เพื่อไม่ให้ เจลติดกระจก

3.3.1.4 ปล่อยให้กระจกทั้งสองแผ่นแห้งประมาณ 5-10 นาที

3.3.1.5 นำกระจกทั้งสองแผ่นมาประกอบเข้าชุดโดยวาง spacer ขนาด 0.35 - 0.40 มิลลิเมตร ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทา bind silane และ repel silane เข้าหากัน แล้วใช้คลิปหนีบ

3.3.2 การเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจลความเข้มข้น 6 %

3.3.2.1 ชั่งยูเรีย 6.75 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร

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

3.3.2.3 นำไปอุ่นไฟอ่อน ๆ ให้ยูเรียละลายจนหมด

3.3.2.4 นำบีกเกอร์มาแช่น้ำให้อุณหภูมิลดลงเท่าอุณหภูมิห้อง

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

3.3.2.6 เขย่าให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็มอย่าให้มีฟอง แล้วใส่หวีลงไปด้านบน ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

3.3.3 การทำอิเล็คโทรโฟรีซิส

3.3.3.1 นำกระจกที่เจลแข็งตัวดีแล้วมาล้างทำความสะอาดกระจกด้านนอก ด้วยน้ำประปา แล้วค่อย ๆ ถอดหวีออกประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส

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

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

3.3.3.4 นำไปต้มบน heating box ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยวแล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที

3.3.3.5 เตรียม DNA marker (25 bp) โดยดูด 25 bp มา 1 ไมโครลิตรผสมกับน้ำกลั่น 3 ไมโครลิตรและ AFLP loading dye 2 ไมโครลิตร

3.3.3.6 นำไปอุ่นบน heating box ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสและแช่น้ำแข็งทันทีเช่นกัน

3.3.3.7 ปิดเครื่อง power supply ใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์เพื่อไล่ยูเรียตามช่องหวีของเจลออกให้หมด

3.3.3.8 โหลดตัวอย่างดีเอ็นเอใส่ลงไปในแต่ละช่องหวีของเจล และโหลด DNA marker ที่เตรียมไว้ลงไปที่ช่องแรกและช่องสุดท้ายเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอ

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

3.3.3.10 ปิดเครื่องนำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกัน เจลจะติดอยู่กับกระจกแผ่นที่เป็นสี่เหลี่ยม นำเจลไปย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทเพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอต่อไป

3.3.4 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

3.3.4.1 นำกระจกที่มีเจลติดอยู่มาแช่สารละลาย fixative ที่เย็น (10 % acetic acid 1.5 มิลลิลิตร, 95 % ethanol 32 มิลลิลิตร, น้ำกลั่นสเตอไรด์ 265 มิลลิลิตร) 5 นาที เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า

3.3.4.2 นำแผ่นกระจกที่ได้แช่ลงในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate 0.38 กรัม, น้ำกลั่นสเตอไรด์ 250 มิลลิลิตร) 8 นาที เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า

3.3.4.3 นำกระจกมาล้างสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทส่วนเกินออก โดยจุ่มแผ่นกระจกลงในน้ำกลั่นสเตอไรด์อย่างรวดเร็ว ไม่ควรเกิน 5 วินาทีเพราะถ้านานซิลเวอร์จะหลุดหมด

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

3.3.4.5 หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในสารละลาย fixative ที่เย็น 5 นาที

3.3.4.6 นำแผ่นกระจกที่ได้ผึ่งให้แห้งในอากาศก่อนนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป

4. การวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี

4.1 คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากทั้งหมด 35 คู่ไพรเมอร์ โดยเลือกเฉพาะคู่ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ชัดเจน และแสดงความแตกต่างของตัวอย่างแต่ละชนิดได้

4.2 คำนวณหาร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึม (percentage of polymorphism) และจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ไพรเมอร์ได้จาก

$$\text{Percentage of polymorphism} = \frac{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึม x 100}}{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด}}$$

4.3 คำนวณค่า polymorphism information content (PICs) (Anderson *et al*., 1993) จากสูตร

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

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

4.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยแปลข้อมูลแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ได้ โดยให้สัญลักษณ์เป็น “1” เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้สัญลักษณ์เป็น “0” เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ numerical taxonomy and multivariate analysis system (NTSYS)pc version 2.20k (Rohlf, 2009) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมด้วยวิธี Jaccard’s similarity coefficients (J) (Jaccard, 1908) จากสูตร

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

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 (Sokal and Rohlf, 1994)

5. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของตัวอย่าง เช่น รูปร่างลักษณะหัว การแตกแง่งแขนง สีเนื้อในหัว รูปร่างลักษณะใบ สีของเส้นกลางใบ การมีขนที่ท้องใบ (ด้านล่างของแผ่นใบ) ลักษณะช่อดอกโดยบันทึกลักษณะเมื่อดอก (flower) ที่อยู่ภายกลีบใบประดับตอนล่าง (flower bract) บาน ความสูงวัดจากพื้นดินถึงคอใบบนสุด เป็นต้น

ผลการศึกษา

ปลูกตัวอย่างในแปลงรวบรวมพันธุกรรม ณ ศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ จ.นครราชสีมา (รูปที่ 2-2) โดยรวบรวมตัวอย่างว่านชักมดลูกได้ทั้งสิ้น 411 ตัวอย่าง ปลูกตัวอย่างละ 10 ต้น

คัดเลือกตัวอย่างที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันจำนวน 60 ตัวอย่าง ครอบคลุม 29 จังหวัดทั่วประเทศไทยได้แก่ กระบี่ กาญจนบุรี กำแพงเพชร จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี เชียงใหม่ นครนายก นครปฐม นครพนม นครสวรรค์ บุรีรัมย์ ปราจีนบุรี พระนครศรีอยุธยา พะเยา พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์ มหาสารคาม ราชบุรี ลพบุรี ลำปาง สงขลา สมุทรปราการ สระแก้ว สุราษฎธานี สุรินทร์ หนองคาย และอำนาจเจริญ

รูปที่ 2-2 แปลงรวบรวมพันธุกรรมว่านชักมดลูกของโครงการ

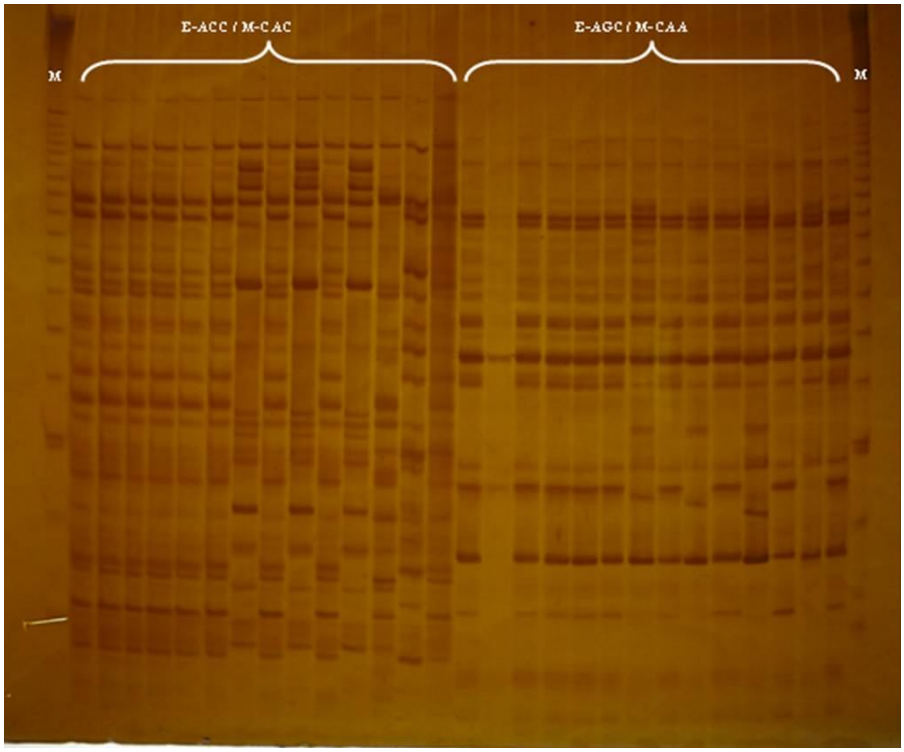
การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอว่านชักมดลูก

การหาไพรเมอร์ที่เหมาะสม

จากการทดสอบเบื้องต้น จากจำนวนคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 35 คู่ พบคู่ไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนเหมาะสม และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างว่านชักมดลูกได้ ดังตารางที่ 2-4 และรูปที่ 2-3

ตารางที่ 2-4 แสดงคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างว่านชักมดลูกได้

Primer	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						*		



รูปที่ 2-3 ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของตัวอย่าง 14 ตัวอย่างที่ใช้ screen ไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ไพรเมอร์ คือไพรเมอร์คู่ E-ACC กับ M-CAC และไพรเมอร์คู่ E-AGC กับ M-CAA

หมายเหตุ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ไพรเมอร์คู่ E-ACC กับ M-CAC คือ คู่ไพรเมอร์ที่เลือกเพื่อใช้แยกความแตกต่างว่านชักมดลูก

การจัดจำแนกกลุ่มว่านชักมดลูก

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกกลุ่มของตัวอย่างทั้ง 60 ตัวอย่าง โดยอาศัยข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 203 แถบ เฉลี่ย 22.56 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างจำนวน 156 แถบ หรือคิดเป็นร้อยละ 76.85 ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด ส่วนค่า PICs มีค่าอยู่ระหว่าง 0.00-0.50 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.26 เมื่อคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (similarity coefficient) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 0.3716-1.0000

เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) พบว่าสามารถจำแนกตัวอย่างทั้ง 60 ตัวอย่างที่ระดับความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมประมาณ 0.73 ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ (รูปที่ 2-4) ซึ่งแบ่งเป็นว่านชักมดลูก 2 กลุ่ม และกลุ่มของพืชชนิดอื่นที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูก 1 กลุ่ม โดยตัวอย่างกลุ่มที่ 1 และ 3 จัดเป็นกลุ่มของว่านชักมดลูก ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 2 จัดเป็นพืชชนิดอื่นที่คล้ายว่านชักมดลูก โดยมีรายละเอียดของตัวอย่างแต่ละกลุ่มเป็นดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของว่านชักมดลูก ประกอบด้วย 37 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 27, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 38, 41, 42, 43, 47, 48, 49, 50, 54, 55 และ 60 ซึ่งรวบรวมจากจังหวัดเพชรบูรณ์ 5 ตัวอย่าง จังหวัดมหาสารคาม 4 ตัวอย่าง จังหวัดพิษณุโลก 3 ตัวอย่าง จังหวัด

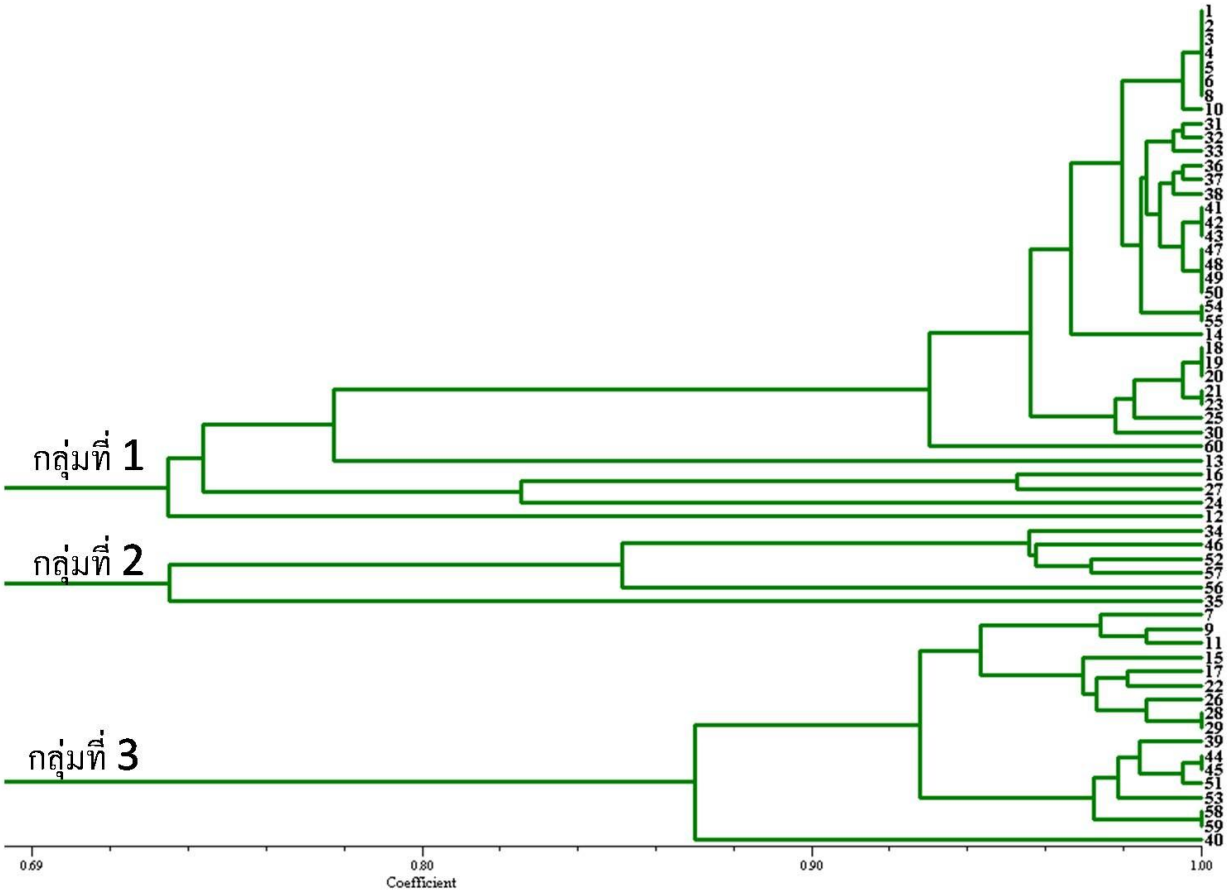
พิจิตร นครพนม หนองคาย กำแพงเพชร และแหล่งที่มาไม่แน่ชัด จังหวัดละ 2 ตัวอย่าง จังหวัดลำปาง นครนายก ฉะเชิงเทรา บุรีรัมย์ จันทบุรี พระนครศรีอยุธยา นครสวรรค์ พะเยา อำนาจเจริญ ลพบุรี ชลบุรี ปราจีนบุรี สระแก้ว สุรินทร์ และสมุทรปราการ จังหวัดละ 1 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 18, 19, 20, 21, 23, 41, 42, 43, 47, 48, 49, 50, 54 และ 55 มีลายพิมพ์เอเอฟแอลพีเหมือนกัน ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเท่ากับ 1 แสดงว่าตัวอย่างดังกล่าว น่าจะเป็นพันธุ์เดียวกันที่มีการนำไปปลูกในที่ต่าง ๆ ซึ่งพบบริเวณภาคเหนือ ภาคกลางตอนบน และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของพืชชนิดอื่นที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูก ประกอบด้วย 6 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 34 จากจังหวัดนครสวรรค์ ตัวอย่างที่ 46 จากจังหวัดพิษณุโลกตัวอย่างที่ 52 จากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ตัวอย่างที่ 35, 56 และ 57 จากจังหวัดปราจีนบุรี โดย ตัวอย่างที่ 34 คือตัวอย่างที่เรียกว่า ว่านหัวใหญ่ ซึ่งเป็นว่านที่ผู้ค้าบางรายนิยมอ้างว่าเป็นว่านชักมดลูกเนื่องจากมีลักษณะคล้ายคลึงกับว่านชักมดลูกมาก

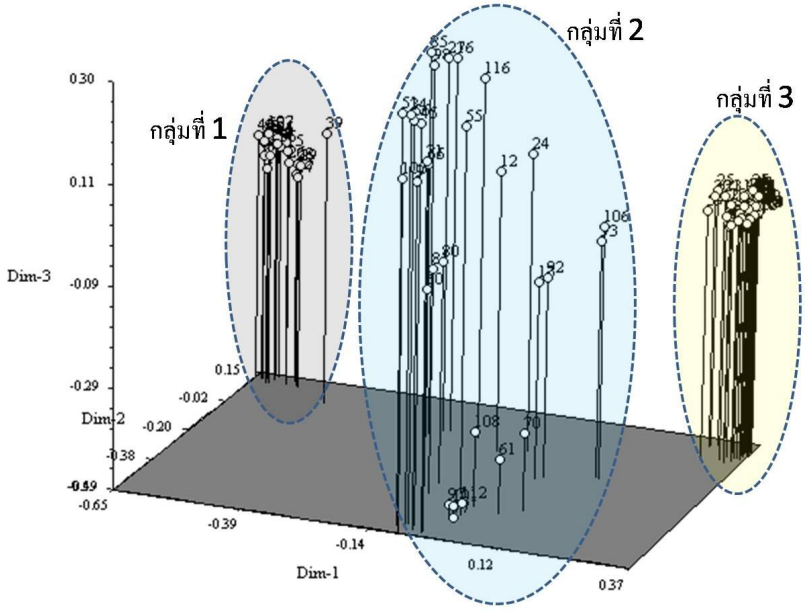
กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของว่านชักมดลูก ประกอบด้วย 17 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างที่ 7, 9, 11, 15, 17, 22, 26, 28, 29, 39, 40, 44, 45, 51, 53, 58 และ 59 ซึ่งรวบรวมจากจังหวัดหนองคาย ราชบุรี นครปฐม และแหล่งที่มาไม่แน่ชัด จังหวัดละ 2 ตัวอย่าง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา พิจิตร สงขลา มหาสารคาม กำแพงเพชร เชียงใหม่ กระบี่ สุรินทร์ และกาญจนบุรี จังหวัดละ 1 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ 28, 29, 44, 45, 58 และ 59 มีลายพิมพ์เอเอฟแอลพีเหมือนกัน ทำให้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเท่ากับ 1 แสดงว่าตัวอย่างน่าจะเป็นพันธุ์เดียวกันที่มีการนำไปปลูกในที่ต่าง ๆ ซึ่งพบบริเวณภาคกลาง และภาคตะวันตก

จากการคำนวณค่า cophenetic coefficient ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในการเปรียบเทียบว่า แผนภูมิทางพันธุกรรมที่ได้จากกระบวนการจัดกลุ่มนั้น มีความสัมพันธ์กับค่า genetic similarity เริ่มต้นอย่างไร สอดคล้องกันหรือไม่ พบว่าค่า cophenetic coefficient ที่คำนวณได้เท่ากับ 0.98823 แสดงให้เห็นว่าแผนภูมิทางพันธุกรรมที่ได้จากกระบวนการจัดกลุ่มนั้น มีความสัมพันธ์สอดคล้องกับ genetic distance/similarity เริ่มต้นมาก

เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี principal coordinates analysis (PCoA) เพื่อเปรียบเทียบกับผลการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA พบว่าการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี PCoA ให้ผลสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยมีตัวประกอบหลักที่ 1, 2 และ 3 ครอบคลุมความแปรปรวน 55.0022 เปอร์เซ็นต์ 12.5861 เปอร์เซ็นต์ และ 5.0767 เปอร์เซ็นต์ ของความแปรปรวนทั้งหมดตามลำดับ (รูปที่ 2-5)



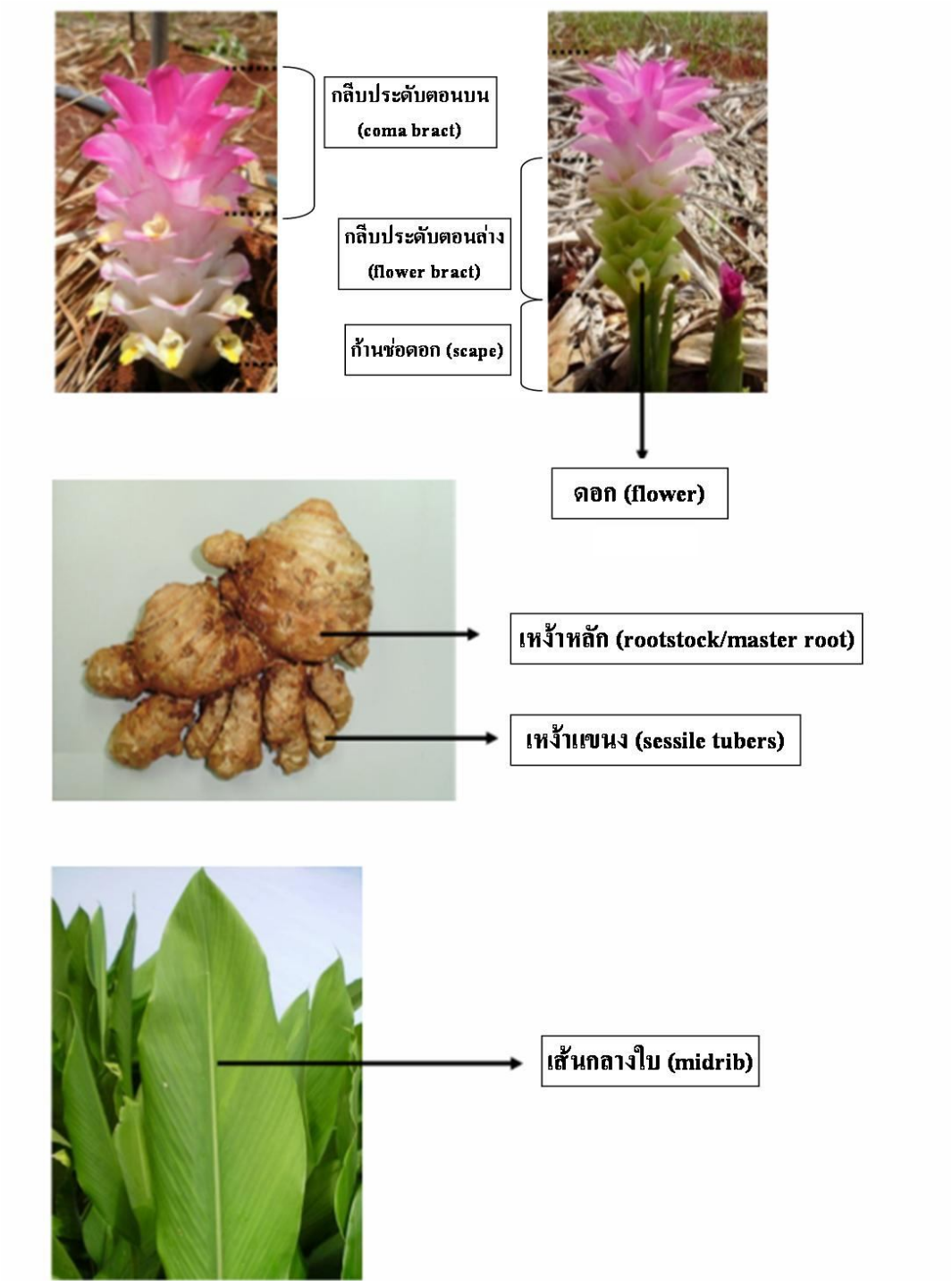
รูปที่ 2-4 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างทั้ง 60 ตัวอย่าง สร้างด้วยวิธี UPGMA คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ด้วยวิธี Jaccard coefficient (J)



รูปที่ 2-5 แผนภาพการจัดกลุ่มด้วยวิธี principle coordinates analysis (PCoA)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของตัวอย่าง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของตัวอย่าง (รูปที่ 2-6) เช่น ความสูง รูปร่างลักษณะหัว การแตกเหง้าแขนง สีเนื้อในหัว รูปร่างลักษณะใบ สีของเส้นกลางใบ การมีขนที่แผ่นใบด้านล่าง ลักษณะช่อดอกของตัวอย่างทั้ง 60 ตัวอย่าง พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ศึกษาสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม สอดคล้องกับข้อมูลลายพิมพ์เอเอฟแอลพี โดยมีรายละเอียดดังนี้



รูปที่ 2-6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของตัวอย่าง

จากการจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกตัวอย่างว่านชักมดลูกและพืชชนิดใกล้เคียงได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของว่านชักมดลูก เมื่อสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาโดยรวมพบว่าตัวอย่างส่วนใหญ่จะมีหัวหลักที่มีลักษณะกลม มีการแตกเหง้าแขนงทางด้านข้าง (รูปที่ 2-7) เนื้อในหัวมีสีเหลืองซีด มีกลิ่นฉุน เมื่อฝานเนื้อในหัวหลักหรือเหง้าแขนงจะพบเส้นใยบาง ๆ หน่ออ่อนที่เกิดใหม่จะมีสีเขียวอ่อน ต้นและใบเหมือนต้นขมิ้น แต่ว่านชักมดลูกจะมีลำต้นสูงกว่าและมีใบขนาดใหญ่ ก้านใบมีสีเขียว ลักษณะก้านด้านในเป็นร่อง ด้านนอกกลมนูน บริเวณโคนของก้านใบแผ่ออกเป็นกาบโอบหุ้มกันเป็นลำต้นเทียม สูงประมาณ 66-75 เซนติเมตร ใบรูปรียาว กว้าง 24-27 เซนติเมตร ยาว 86-91 เซนติเมตร สีเส้นกลางใบของใบอ่อนมีสีแดง เมื่อใบแก่พบว่าสีแดงที่เส้นกลางใบจะซีดจางลงมาก บางใบไม่ปรากฏสีแดง (รูปที่ 2-8) สีของแผ่นใบด้านบนมีสีเขียวเข้มกว่าทางด้านล่าง ไม่พบขนที่แผ่นใบ ลักษณะดอกออกเป็นช่อแทงจากพื้นดิน โดยจะออกดอกก่อนออกใบ ช่อดอกยาวประมาณ 25-40 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาวประมาณ 8-15 เซนติเมตร ขณะนี้ช่อดอกที่พบมี 2 ลักษณะ คือ ช่อดอกแบบที่ 1 พบทั้งหมด 22 ตัวอย่าง โดยช่อดอกจะมีกลีบประดับตอนบนมีสีชมพูทั้งกลีบหรือสีขาวแต้มสีชมพู ส่วนกลีบประดับตอนล่างมีสีเขียวอ่อนแต้มสีขาว หรือสีเขียวอ่อนแต้มสีชมพูหรือแต้มสีขาว หรือสีเขียวอ่อนทั้งกลีบ ดอกมีสีเหลืองอ่อนและมีแถบตรงกลางสีเหลืองเข้มอยู่ภายใน ปลายกลีบประดับมน กลีบประดับตอนบนมีขนาดใหญ่กว่ากลีบประดับตอนล่าง จำนวนชั้นของกลีบประดับมีประมาณ 12-15 ชั้น (รูปที่ 2-9) ช่อดอกแบบที่ 2 พบ 1 ตัวอย่าง โดยช่อดอกจะมีกลีบประดับตอนบนสีชมพูทั้งกลีบ หรือสีขาวอมสีชมพู ส่วนกลีบประดับตอนล่างมีสีขาวอมสีชมพู หรือสีขาวทั้งกลีบ ดอกมีสีเหลืองอ่อนและมีแถบตรงกลางสีเหลืองเข้มอยู่ภายใน ปลายกลีบประดับมน กลีบประดับตอนบนมีขนาดใหญ่กว่ากลีบประดับตอนล่าง จำนวนชั้นของใบประดับมีประมาณ 10-15 ชั้น (รูปที่ 2-9)

รูปที่ 2-7 ลักษณะหัวของตัวอย่างกลุ่มที่ 1

รูปที่ 2-8 สีเส้นกลางใบของตัวอย่างกลุ่มที่ 1

(A) สีเส้นกลางใบของใบอ่อน

(B) สีเส้นกลางใบของใบแก่

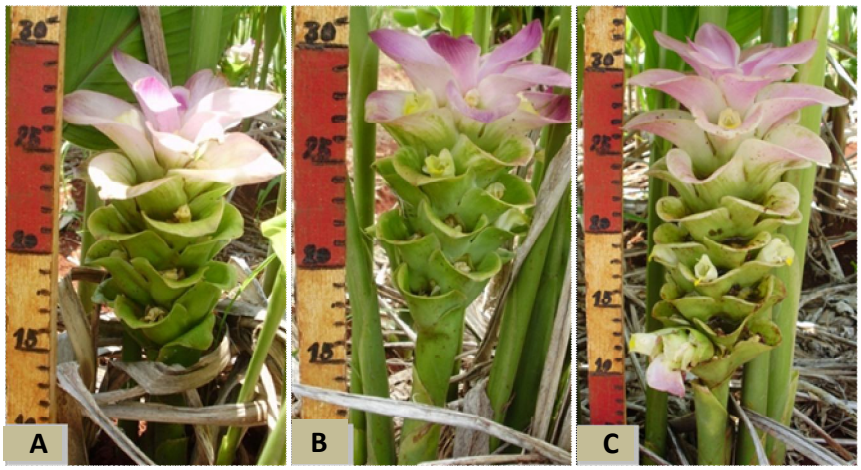
รูปที่ 2-9 ลักษณะช่อดอกของตัวอย่างกลุ่มที่ 1

(A-G) ช่อดอกแบบที่ 1

(H) ช่อดอกแบบที่ 2

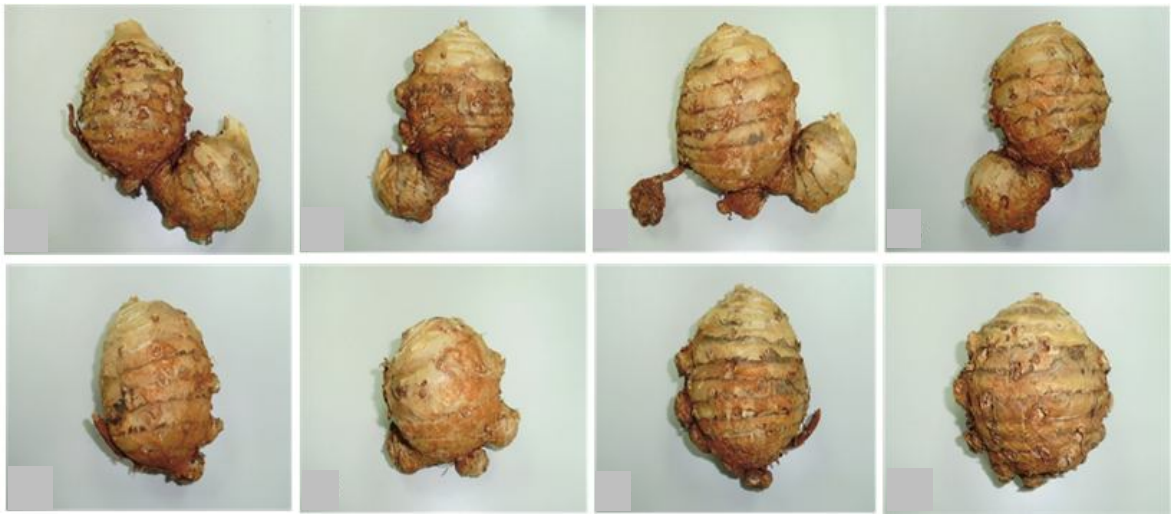
ตัวอย่างที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของพืชที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูก ลักษณะสัณฐานวิทยา โดยรวมพบว่าส่วนใหญ่จะมีหัวหลักลักษณะกลมยาว ปลายแหลม มีการแตกเหง้าแขนงทางด้านข้าง (รูปที่ 2-10) เนื้อในหัวมีสีเหลืองซีด มีกลิ่นฉุนร้อน เมื่อฝานเนื้อในหัวหลักหรือเหง้าแขนงจะพบเส้นใยบาง ๆ หน่ออ่อนที่เกิดใหม่จะมีสีเขียวอ่อน ต้นและใบเหมือนต้นขมิ้นอ้อย บริเวณโคนของก้านใบแผ่ออกเป็นกาบโอบหุ้มกันเป็นลำต้นเทียม สูงประมาณ 70-87 เซนติเมตร ใบรูปรี กว้าง 24-27 เซนติเมตร ยาว 70-85 เซนติเมตร เส้นกลางใบมีทั้งแบบที่มีสีแดง และแบบไม่มีสี สีของแผ่นใบด้านบนมีสีเขียวเข้มกว่าทางด้านล่าง พบว่ามีขนบริเวณท้องใบ (ด้านล่างของแผ่นใบ) ลักษณะดอกออกเป็นช่อแทงจากพื้นดิน ขณะนี้พบช่อดอก 3 ตัวอย่าง ลักษณะช่อดอกยาวประมาณ 25-35 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาวประมาณ 10-17 เซนติเมตร กลีบประดับตอนบนมีสีชมพูทั้งกลีบหรือสีขาวอมสีชมพู กลีบประดับตอนล่างสีเขียวอ่อนแต้มสีชมพู หรือสีเขียวอ่อนทั้งกลีบ ดอกมีสีเหลืองอ่อนและมีแถบตรงกลางสีเหลืองเข้มภายใน กลีบประดับตอนบนมีขนาดใหญ่กว่ากลีบประดับตอนล่าง ปลายกลีบประดับแหลม จำนวนชั้นของกลีบประดับมีประมาณ 10-13 ชั้น จำนวนชั้นกลีบประดับตอนบนน้อยกว่ากลีบประดับตอนล่าง (รูปที่ 2-11)

รูปที่ 2-10 ลักษณะหัวของตัวอย่างกลุ่มที่ 2

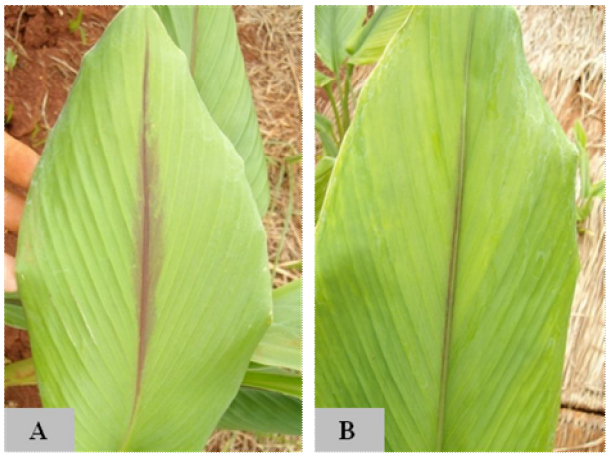


รูปที่ 2-11 ลักษณะช่อดอกของตัวอย่างกลุ่มที่ 2

ตัวอย่างที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของว่านชักมดลูก ลักษณะสัณฐานวิทยาโดยรวมพบว่าส่วนใหญ่จะมีหัวหลักลักษณะกลม ไม่มีการแตกเหง้าแขนงทางด้านข้าง (รูปที่ 2-12) เนื้อในหัวมีสีขาวนวล มีกลิ่นคล้ายมะม่วงอ่อน หน่ออ่อนที่เกิดใหม่จะมีสีขาว ก้านใบมีสีเขียว ลักษณะก้านด้านในเป็นร่อง ด้านนอกกลมนูน บริเวณโคนของก้านใบแผ่ออกเป็นกาบโอบหุ้มกันเป็นลำต้นเทียม เมื่อแก่กาบใบจะแผ่ออกคล้ายพัด ลำต้นเทียมสูงประมาณ 56-60 เซนติเมตร ใบรูปขอบขนานรียาว โคนใบสอบ แผ่นใบหนา เมื่อพับแผ่นใบเข้าหากันตามความยาวของเส้นกลางใบ พบว่า แผ่นใบทั้งสองข้างไม่สมมาตรกัน ใบกว้าง 19-21 เซนติเมตร ยาว 72-80 เซนติเมตร เส้นกลางใบส่วนใหญ่มีสีแดงเข้ม เมื่อแก่สีแดงจะซีดจางลงจนกระทั่งบางใบไม่มีสีแดงปรากฏอยู่ (รูปที่ 2-13) สีของแผ่นใบด้านบนมีสีเขียวเข้มกว่าทางด้านล่าง ไม่พบขนที่ท้องใบ ลักษณะดอกออกเป็นช่อแทงจากพื้นดิน โดยจะออกดอกก่อนออกใบ ขณะนี้ช่อดอกที่พบ มี 2 ลักษณะ คือ ช่อดอกแบบที่ 1 พบทั้งสิ้น 9 ตัวอย่าง โดยจะมีลักษณะช่อดอกยาวประมาณ 15-20 เซนติเมตร ก้านช่อดอกสั้นประมาณ 2-5 เซนติเมตร ช่อดอกรูปทรงคล้ายทรงกระบอกกว้าง กลีบประดับตอนบนมีสีชมพูทั้งกลีบ หรือสีขาวแต้มสีชมพู กลีบประดับตอนล่างมีสีขาวแต้มสีชมพู หรือสีขาวทั้งกลีบ ดอกมีสีเหลืองอ่อนและมีแถบตรงกลางสีเหลืองเข้มอยู่ภายในปลายกลีบประดับมน กลีบประดับตอนบนมีขนาดใกล้เคียงกับกลีบประดับตอนล่าง จำนวนชั้นของกลีบประดับมีประมาณ 10-12 ชั้น (รูปที่ 2-14) ช่อดอกแบบที่ 2 มีลักษณะช่อดอกยาวประมาณ 15-20 เซนติเมตร ก้านช่อดอกสั้นประมาณ 2-5 เซนติเมตร ลักษณะรูปทรงช่อดอกคล้ายทรงกระบอกแคบ กลีบประดับตอนบนมีสีขาวอมสีชมพูอ่อน หรือสีชมพูอ่อนทั้งกลีบ กลีบประดับตอนล่างมีสีขาวแต้มสีชมพูอ่อน หรือสีขาวทั้งกลีบ ดอกมีสีขาวและมีแถบเหลืองเข้มอยู่ภายใน ขนาดของกลีบประดับตอนบนจะใหญ่กว่ากลีบประดับตอนล่าง จำนวนชั้นของกลีบประดับประมาณ 10-15 ชั้น (รูปที่ 2-14)



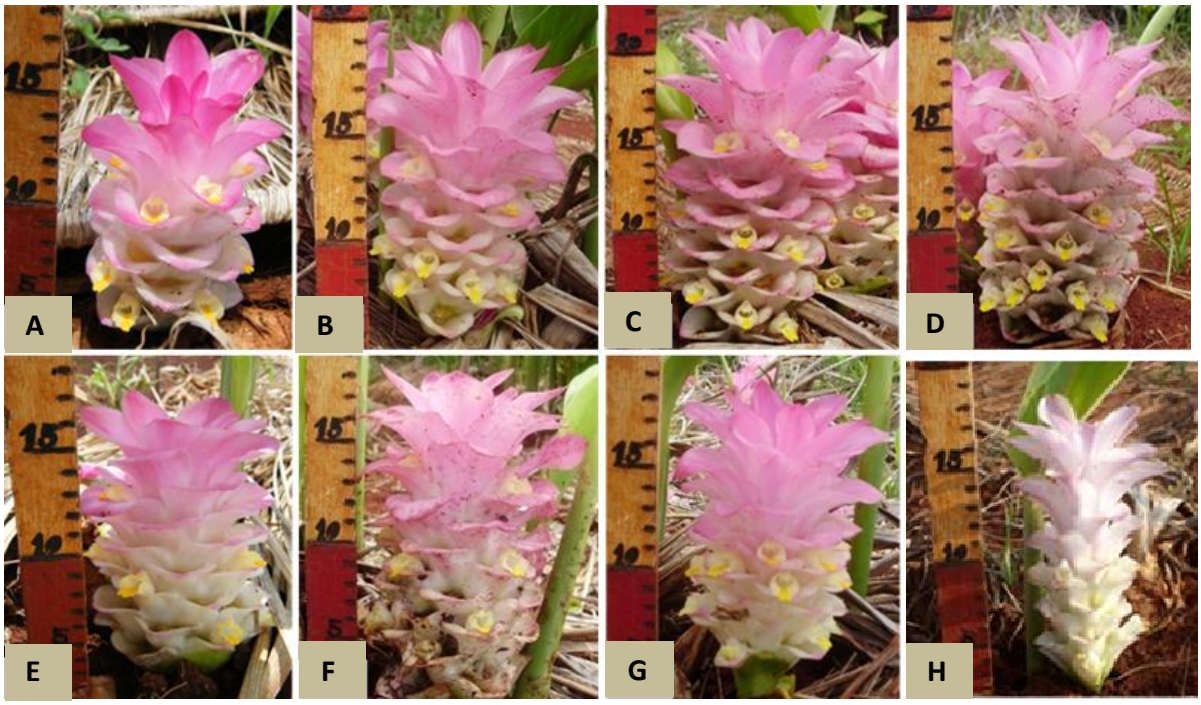
รูปที่ 2-12 ลักษณะหัวของตัวอย่างกลุ่มที่ 3



รูปที่ 2-13 สีเส้นกลางใบของตัวอย่างกลุ่มที่ 3

(A) สีเส้นกลางใบของใบอ่อน

(B) สีเส้นกลางใบของใบแก่



รูปที่ 2-14 ลักษณะช่อดอกของตัวอย่างกลุ่มที่ 1

(A-G) ช่อดอกแบบที่ 1

(H) ช่อดอกแบบที่ 2

อภิปรายและวิจารณ์ผล

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างว่านชักมดลูกและพืชชนิดใกล้เคียงโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่ามีไพรเมอร์ 9 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ชัดเจน และแสดงความแตกต่างของตัวอย่างแต่ละชนิดได้ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบรูปแบบและจำนวนแถบดีเอ็นเอ พบว่าได้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เข้มชัดเจนทั้งสิ้น 203 แถบ เฉลี่ย 22.56 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้พอลิมอร์ฟิซึม 156 แถบ คิดเป็น 76.85 เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด มีค่า PICs อยู่ระหว่าง 0.00-0.50 โดยมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.26 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างจัดอยู่ในระดับปานกลาง

เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดไปวิเคราะห์จัดกลุ่มตามค่าความเหมือนทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.20 k พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.3716-1.0000 เมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA แล้วแสดงผลในรูปของแผนภูมิทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มของว่านชักมดลูก 2 กลุ่ม และกลุ่มของพืชชนิดอื่นที่คล้ายกับว่านชักมดลูก 1 กลุ่ม จากการวิเคราะห์จัดกลุ่มด้วยวิธี PCoA พบว่าได้ผลสอดคล้องกับผลการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA คือแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มเช่นกัน

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าตัวอย่างในแต่ละกลุ่มมีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกัน ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับข้อมูลลายพิมพ์เอเอฟแอลพี โดยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่จะใช้แยกความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่าง ต้องใช้หลายลักษณะร่วมกันจึงจะแยกความแตกต่างได้ เช่น ใช้ลักษณะหัวร่วมกับลักษณะช่อดอก แยกความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างที่ 1 กับ 2 ออกจากกลุ่มตัวอย่างที่ 3 เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ภาณี และคณะ (2548) ซึ่งรายงานว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการปรากฏสีแดงบริเวณเส้นกลางใบเพียงลักษณะเดียวไม่สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างได้ ควรใช้ลักษณะหลาย ๆ ลักษณะในการจำแนก โดยเฉพาะลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอก

เมื่อนำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ศึกษาได้ในครั้งนี้ไประบุชนิด โดยอ้างอิงจาก Flora of British India (Hooker, 1894), 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) พบว่าสามารถระบุชนิดของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 ซึ่งเป็นกลุ่มของว่านชักมดลูกได้เป็น *Curcuma comosa* ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ จึงระบุเป็น *Curcuma* sp. ส่วนการศึกษาของ สนั่น และฉัตรชัย (2546) ที่รายงานว่า ว่านชักมดลูกมี 2 ชนิด คือ *Curcuma comosa* และ *Curcuma xanthorrhiza* โดย *Curcuma comosa* มีเนื้อในหัวสีเหลืองซีด เส้นกลางใบมีสีเขียว ไม่พบขนที่ท้องใบ ก้านใบยาว ดอกออกเป็นช่อแบบช่อเชิงลดแทงจากพื้นดิน ส่วน *Curcuma xanthorrhiza* เส้นกลางใบของหลังใบมีสีน้ำตาลอมแดง ท้องใบมีขน ก้านใบสั้น พบว่าข้อมูลดังกล่าวไม่สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ กล่าวคือ ว่านชักมดลูกกลุ่มที่สามารถระบุชนิดเป็น *Curcuma comosa* ในการศึกษาครั้งนี้มีเส้นกลางใบอ่อนมีสีแดง แต่เมื่อใบแก่ขึ้นสีแดงจะซีดจางลง ขณะที่ สนั่น และฉัตรชัย รายงานว่า *Curcuma comosa* มีเส้นกลางใบสีเขียว ส่วน *Curcuma xanthorrhiza* ที่ สนั่น และฉัตรชัย ระบุว่าเป็นว่านชักมดลูกอีกชนิดหนึ่งนั้น พบว่าเมื่อนำลักษณะทาง

สัณฐานวิทยาของตัวอย่างที่ศึกษาในครั้งนี้ไปเปรียบเทียบกับเอกสารอ้างอิงที่ใช้ระบุชนิดของตัวอย่าง คือ Flora of British India (Hooker, 1894) และ Flora of Java (Backer and Bakhuizen Van Den Brink, 1968) พบว่าไม่มีข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างใดในการทดลองนี้ที่สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Curcuma xanthorrhiza* ที่ระบุในเอกสารดังกล่าว เช่น สีของเนื้อในหัว ในเอกสารระบุว่า *Curcuma xanthorrhiza* มีสีเนื้อในหัวสีเหลืองเข้มหรือสีส้มเข้ม แต่ตัวอย่างที่ศึกษามีสีเนื้อในหัวสีเหลืองซีด ฉะนั้นตัวอย่างที่ศึกษาในครั้งนี้จึงไม่น่าจะเป็นพืชที่จัดอยู่ในชนิด *Curcuma xanthorrhiza*

จากการศึกษาของ Soontornchainaksaeng and Jenjittikul (2010) รายงานว่า ว่านชักมดลูก มี 3 ชนิด คือ ชนิด *Curcuma comosa*, *Curcuma elata* และ *Curcuma latifolia* โดยว่านชักมดลูกชนิด *Curcuma comosa* จะมีก้านช่อดอกสั้น (2-5 ซม.) ไม่มีขนใต้แผ่นใบ ส่วน *Curcuma elata* และ *Curcuma latifolia* มีลักษณะที่เหมือนกัน คือ มีก้านช่อดอกยาว 10-25 เซนติเมตร มีขนใต้แผ่นใบ ส่วนที่ต่างกัน คือ *Curcuma latifolia* มีเส้นกลางใบสีแดง ส่วน *Curcuma elata* ไม่พบสีแดงที่เส้นกลางใบ ซึ่งพบว่าผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ในส่วน *Curcuma comosa* เท่านั้น จากรายงานของ Soontornchainaksaeng and Jenjittikul ได้มีการบรรยายลักษณะสัณฐานวิทยาว่า *Curcuma elata* จะมีขนใต้แผ่นใบ แต่ไม่พบสีแดงที่เส้นกลางใบ ขณะที่ *Curcuma latifolia* มีขนใต้แผ่นใบ และพบสีแดงที่เส้นกลางใบ จะเห็นว่าลักษณะที่กล่าวมาทั้ง 2 สปีชีส์ ไม่สอดคล้องกับว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เพราะว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 ไม่พบขนที่ใต้แผ่นใบ จึงคาดว่าว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ใช่ *Curcuma elata* และ *Curcuma latifolia* แต่พบว่าลักษณะของ *Curcuma elata* และ *Curcuma latifolia* สอดคล้องกับลักษณะของตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ซึ่งเป็นพืชชนิดอื่นในสกุล *Curcuma* ที่มีลักษณะคล้ายว่านชักมดลูก ซึ่งมีผู้นำมาบริโภคเช่นกัน แต่ไม่เป็นที่นิยม เมื่อเทียบกับว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างกลุ่มที่ 2 ก็อาจมีสรรพคุณทางยาคล้ายกับว่านชักมดลูกเช่นกัน ซึ่งควรจะศึกษาต่อไปในอนาคต ดังนั้นจากข้อมูลในปัจจุบันยังไม่สามารถระบุชนิดของว่านชักมดลูกกลุ่ม 1 จากการทดลองครั้งนี้ได้แน่ชัด คณะผู้วิจัยจึงระบุชนิดของว่านชักมดลูกกลุ่มที่ 1 ให้เป็น *Curcuma* sp. ในเบื้องต้น เพื่อเก็บรวบรวมข้อมูลรายละเอียดเพื่อใช้ระบุชนิดเพิ่มเติมต่อไป

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยสามารถรวบรวมได้ทั้งสิ้น 411 ตัวอย่าง ครอบคลุม 29 จังหวัด ทั่วประเทศไทย คือจังหวัดกระบี่ กาญจนบุรี กำแพงเพชร จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี เชียงใหม่ นครนายก นครปฐม นครพนม นครสวรรค์ บุรีรัมย์ ปราจีนบุรี พระนครศรีอยุธยา พะเยา พิจิตร พิษณุโลก เพชรบูรณ์ มหาสารคาม ราชบุรี ลพบุรี ลำปาง สงขลา สมุทรปราการ สระแก้ว สุราษฎร์ธานี สุรินทร์ หนองคาย และอำนาจเจริญ

จากการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างจำนวนทั้งสิ้น 60 ตัวอย่าง พบว่า ตัวอย่างมีความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง โดยสามารถจำแนกตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่ม โดยใช้วิธีการจำแนกด้วยวิธี UPGMA และวิธี PCoA ซึ่งทั้งสองวิธีให้ผลสอดคล้องกันทำให้ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือ

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ผลการจัดกลุ่มโดยอาศัยข้อมูลลายพิมพ์เอเอฟแอลพีมีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา จึงสรุปได้ว่าเทคนิคเอเอฟแอลพี เป็นเทคนิคที่สามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม แยกความแตกต่างและจำแนกชนิดของว่านชักมดลูกได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็ว

จากการนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพีมาวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่มตัวอย่างตามค่าความเหมือนทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ สอดคล้องกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยลักษณะสัณฐานวิทยาที่เด่นชัดในแต่ละกลุ่มเป็นดังรูปที่ 2-15 - 2-17 และตารางที่ 2-5

รูปที่ 2-15 ลักษณะหัวของตัวอย่าง 3 กลุ่ม (A) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 1 (B) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 2 และ (C) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 3

รูปที่ 2-16 ลักษณะช่อดอกของตัวอย่าง 3 กลุ่ม

(A) คือ ตัวอย่างช่อดอกกลุ่มที่ 1 ช่อดอกแบบที่ 1

(B) คือ ตัวอย่างช่อดอกกลุ่มที่ 1 ช่อดอกแบบที่ 2

(C) คือ ตัวอย่างช่อดอกกลุ่มที่ 2

(D) คือ ตัวอย่างช่อดอกกลุ่มที่ 3 ช่อดอกแบบที่ 1

(E) คือ ตัวอย่างช่อดอกกลุ่มที่ 3 ช่อดอกแบบที่ 2

รูปที่ 2-17 ลักษณะดอก (flower) ที่อยู่ภายในกลีบประดับตอนล่าง

(A) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 1

(B) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 2

(C) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 3 ช่อดอกแบบที่ 1

(D) คือ ตัวอย่างกลุ่มที่ 3 ช่อดอกแบบที่ 2

ตารางที่ 2-5 ลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอย่างแต่ละกลุ่ม

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ตัวอย่างกลุ่มที่ 1	ตัวอย่างกลุ่มที่ 2	ตัวอย่างกลุ่มที่ 3
รูปร่างหัว	หัวหลักกลม มีการแตกเหง้าแขนงทางด้านข้าง	หัวหลักกลม มีการแตกเหง้าแขนงทางด้านข้าง	หัวหลักกลม ไม่มีการแตกเหง้าแขนงทางด้านข้าง
สีเนื้อในหัว	สีเหลืองซีด มีใย	สีเหลืองซีด มีใย	สีเหลืองซีด
สีเส้นกลางใบ	สีแดง เมื่อใบแก่สีแดงจางลง	ไม่มีสี	สีแดง เมื่อใบแก่สีแดงจางลง
ขนใต้แผ่นใบ	ไม่มี	มี	ไม่มี
ช่อดอก	มีก้านช่อดอกยาวประมาณ 8-15 ซม.	มีก้านช่อดอกยาวประมาณ 10-13 ซม.	ก้านช่อดอกสั้นลักษณะช่อดอกคล้ายทรงกระบอก
กลีบประดับตอนบน (coma bract)	สีขาวแต้มสีชมพูหรือสีชมพูทั้งกลีบ ปลายกลีบประดับมน	สีขาวแต้มสีชมพู หรือสีชมพูทั้งกลีบ ปลายกลีบประดับแหลม	สีขาวแต้มสีชมพู หรือสีชมพูทั้งกลีบ ปลายกลีบประดับมน

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ตัวอย่างกลุ่มที่ 1	ตัวอย่างกลุ่มที่ 2	ตัวอย่างกลุ่มที่ 3
กลีบประดับตอนล่าง (flower bract)	สีเขียวอ่อนแต้มสีชมพู หรือ สีเขียวอ่อน หรือสีขาวทั้งกลีบ	สีเขียวอ่อนแต้มสีชมพู หรือ สีเขียวอ่อนทั้งกลีบ	สีขาวแต้มสีชมพู หรือสีขาว ทั้งกลีบ
ดอก (flower)	ดอกสีเหลืองอ่อนแถบตรง กลางสีเหลืองเข้ม	ดอกสีเหลืองอ่อนแถบตรง กลางสีเหลืองเข้ม	ดอกสีเหลืองอ่อนแถบตรง กลางสีเหลืองเข้ม
จำนวนชั้นกลีบประดับ	10-15 ชั้น จำนวนชั้นกลีบ ประดับตอนบนใกล้เคียงหรือ น้อยกว่ากลีบประดับตอนล่าง	10-13 ชั้น จำนวนชั้นกลีบ ประดับตอนบนน้อยกว่า กลีบประดับตอนล่าง	10-12 ชั้น จำนวนชั้นกลีบประดับ ตอนบนใกล้เคียงกับกลีบประดับ ตอนล่าง
ความสูงต้น	66-75 ซม.	70-87 ซม.	56-60 ซม.

จากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถใช้แยกความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มได้ดังนี้ การแยกความแตกต่างของตัวอย่างกลุ่มที่ 1 และ 2 ต่างจากกลุ่มที่ 3 สามารถแยกความแตกต่างได้โดยพิจารณาจากลักษณะหัว ความสูงของลำต้นเทียม ซึ่งวัดจากพื้นดินถึงคอใบบนสุด และก้านช่อดอก โดยตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 และ 2 หัวหลักจะมีเหง้าแขนงแตกออกทางด้านข้าง ลำต้นเทียมสูงประมาณ 60-80 เซนติเมตร ก้านช่อดอกยาวประมาณ 8-15 เซนติเมตร ส่วนกลุ่มที่ 3 ไม่มีเหง้าแขนงแตกออกทางด้านข้าง ลำต้นเทียมสูงประมาณ 50-60 เซนติเมตร ก้านช่อดอกสั้นประมาณ 2-5 เซนติเมตร การแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างกลุ่มที่ 1 กับ 2 ให้พิจารณาที่ขนใต้แผ่นใบ จำนวนชั้นกลีบประดับตอนบนเทียบกับกลีบประดับตอนล่าง และลักษณะปลายกลีบประดับ โดยตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 จะไม่มีขนใต้แผ่นใบ จำนวนชั้นกลีบประดับตอนบนใกล้เคียง หรือน้อยกว่ากลีบประดับตอนล่าง ปลายกลีบประดับมน ส่วนตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 มีขนใต้แผ่นใบ จำนวนชั้นกลีบประดับตอนบนน้อยกว่ากลีบประดับตอนล่าง ปลายกลีบประดับแหลม

เมื่อนำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ได้ไประบุชนิด 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) พบว่าสามารถระบุชนิดของตัวอย่างกลุ่มที่ 3 ได้เป็น *Curcuma comosa* Roxb. ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 1 ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ เนื่องจากเมื่อนำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างกลุ่มที่ 1 ไปเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Curcuma* ชนิดต่าง ๆ ที่ระบุอยู่ในเอกสารอ้างอิงที่ใช้ระบุชนิดดังกล่าวข้างต้น พบว่าข้อมูลไม่สอดคล้องกับพืช *Curcuma* ชนิดใด จึงระบุชนิดตัวอย่างกลุ่มที่ 1 ให้เป็น *Curcuma* sp. คณะผู้วิจัยมีความเห็นว่าควรทำการศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานในตัวอย่างแต่ละกลุ่มต่อไป และควรศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างทุกกลุ่ม เพื่อใช้เป็นข้อมูลร่วมในการจัดจำแนกชนิดของตัวอย่าง และความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้

จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าว่านชักมดลูกมีความหลากหลายทางพันธุกรรมและสามารถแบ่งเป็นกลุ่มต่าง ๆ ได้ จึงมีความเป็นไปได้ว่า ตัวอย่างในแต่ละกลุ่มอาจมีชนิดและปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรศึกษาหาปริมาณสารสำคัญ สารพิษ รวมทั้งฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ของว่านชักมดลูกทุกกลุ่ม เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ว่านชักมดลูกที่มีปริมาณสารสำคัญสูง มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และสรรพคุณในการรักษาที่ดี มีความเป็นพิษต่ำหรือไม่มีพิษเลย เพื่อความปลอดภัยและประโยชน์สูงสุดของผู้บริโภค

บรรณานุกรม

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

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 และสุดใจ ล้อเจริญ. 2548. การวิเคราห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมว่านชักมดลูก (พืชวงศ์ขิง) ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, น. 346-351. *ใน* **การประชุมวิชาการประจำปีทรัพยากรไทย : สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว ครั้งที่ 2.** อาคารประชุม 2 ศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ คลองไผ่, นครราชสีมา.

รังสัน หล้าพรหม 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 สำนักพิมพ์แพร่พิทยา, กรุงเทพฯ.

สมาคมโรงเรียนแพทย์แผนโบราณ สำนักวัดพระเชตุพนวิมลมังคลาราม. 2520. **ประมวลสรรพคุณยาไทย (ภาคสนาม) ว่าด้วยพฤกษชาติวัตถุธาตุและสัตววัตถุนานาชนิด.** ไพศิลป์การพิมพ์, กรุงเทพฯ.

สนั่น ศุภธีรสกุล และฉัตรชัย วัฒนาภิรมย์สกุล. 2546. **ว่านชักมดลูก.** บทความประจำเดือน กันยายน 2546 ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

Apavatijrut, 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.

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

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.

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.

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

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.

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(1): 24-29.

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

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

Piyachaturawat, P., S. Ercharuporn and A. Suksamrarn. 1995c. An uterotropic effect of *Curcuma comosa* extract in rats. **Int. J. Pharmacog**. 33: 334-338.

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

Piyachaturawat, P., A. Timinkul, A. chauncharunee and A. Suksamrarn. 1999a. Effect of *Curcuma comosa* extract on male fertility in rats. **Pharmaceutical Biolo**. 37: 22-27.

Piyachaturawat, P., 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., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. 1996. 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 Priters & Publishers, New Delhi.

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

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

Soontornchainaksaeng, 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.

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

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

Techaprasan, J., S. Klinbunga and T. Jenjittikul. 2008. Genetic relationship and species authentication of *Boesenbergia* (Zingiberaceae) in Thailand based on AFLP and SSCP analysis. **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.