

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมว่านชักมดลูก (พืชวงศ์ขิง) ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ภาณี ทองพำนัก อาสาพาหะ พัฒนธารา บังอร ยิ้มแย้ม และสุดใจ ล้อเจริญ

ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน

DNA markers analysis for genetic diversity of Wan Chagmodlook (Zingiberaceae)

Panie Tongpamnak, Asarnha Phatthanathara, Bungon Yimyam and Sudchai Locharoen

Central Laboratory and Greenhouse Complex, Kasetsart University Research and Development Institute,
Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom

บทคัดย่อ

วิเคราะห์ดีเอ็นเอ ว่านชักมดลูก ที่ได้ทำการเก็บรวบรวม จากจังหวัดต่างๆ ได้แก่ เชียงใหม่ พิษณุโลก กาญจนบุรี มุกดาหาร นongคาย จังหวัดละ 1 สายต้น สกลนคร 2 สายต้น และไม่ทราบแหล่งที่มาอีก 2 สายต้น ซึ่งรวมจำนวนทั้งสิ้น 10 สายต้น โดยใช้เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ด้วยไพรเมอร์ที่เหมาะสม 15 ชนิด ซึ่งคัดเลือกจากการใช้ operon primers จำนวน 45 ชนิด พบว่าว่านชักมดลูกจากแหล่งต่างๆมีความเป็นเอกลักษณ์แยกออกจากกันได้เป็น 3 กลุ่ม โดยในกลุ่มที่ 1 เป็นสายต้นจากจังหวัดกาญจนบุรีเพียงสายต้นเดียว และสายต้นที่ CM8 ที่ไม่ทราบแหล่งที่มา มีความใกล้ชิดกับว่านชักมดลูกในกลุ่มที่ 2 ที่มีสายต้นจากจังหวัดสกลนคร และสายต้น CM9 มีความใกล้ชิดกับว่านชักมดลูกในกลุ่มที่ 3 ที่มีสายต้นจากจังหวัดเชียงใหม่ พิษณุโลก มุกดาหาร และนongคาย ซึ่งสายต้นในกลุ่มเดียวกันไม่มีความสัมพันธ์กันตามภูมิภาค และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการปรากฏสีแดงบริเวณเส้นกลางใบที่ใช้ในการจำแนกชนิดของว่านชักมดลูก เพียงลักษณะเดียวไม่สามารถใช้ในการจำแนกชนิดได้ ควรใช้ลักษณะหลายๆ ลักษณะในการจำแนกชนิด โดยเฉพาะลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกร่วมด้วย

Abstract

Wan Chagmodlook DNA leave samples were harvested from plants of tubers, which were collected from several provinces such as Chiang Mai, Pitsanulok, Kanchana Buree, Mugdahan, Nong Khai, Sakon Nakorn and unknown location. These DNA samples were employed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). Using 15 screening from 45 primers, which presented polymorphic and persistent banding pattern among Wan Chagmodlook clones,

assessed unique RAPD markers of each location and could be divided in three groups of sample locations. The first unique banding pattern was Kanchana Buree. The second group was Sakon Nakorn and unknown SMP 327 and the third group were party of Chiang Mai, Pitsanulok, Mugdahan, Nong Khai and unknown SMP 326.



ภาพที่ 1: แสดงสีของเส้น กลางใบของว่านชักมดลูก ก. เส้นกลางใบปรากฏสีแดง ข. เส้นกลางใบไม่ปรากฏสี

บทนำ

ว่านชักมดลูก เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งเป็นที่รู้จักอย่างแพร่หลายของผู้สนใจสมุนไพร ในประเทศไทยสามารถพบว่านชักมดลูกได้สองชนิด คือ *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. และ *Curcuma comosa* Roxb. ลักษณะโดยทั่วไปของพืชทั้งสองชนิดนี้มีความคล้ายคลึงกันมาก คือ เป็นพืชล้มลุก สูงประมาณ 1-2 เมตร มีเหง้าใต้ดินขนาดใหญ่ รูปทรงค่อนข้างกลม เนื้อเหง้ามีสีเหลือง ถ้าเปรียบเทียบกับสีเนื้อเหง้าของทั้ง 2 ชนิด *C. comosa* Roxb. จะมีสีเนื้อเหง้าเหลืองอ่อน และ ชนิด *C. xanthorrhiza* Roxb. สีของเนื้อเหง้าจะเป็นสีเหลืองเข้ม มีกลิ่นฉุนร้อน ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงตัวเป็นกระจุกใกล้ราก ใบรูปขอบขนานแกมรี โดยเส้นกลางใบของหลังใบชนิด *C. xanthorrhiza* Roxb. มีสีม่วง (ภาพที่ 1 ก.) พบคนที่ท้องใบ และก้านใบสั้น แต่ในชนิด *C. comosa* Roxb. เส้นกลางใบของหลังใบมีสีเขียว (ภาพที่ 1 ข.) ไม่พบคนที่ท้องใบ และก้านใบยาว ดอกออกเป็นช่อแทงจากพื้นดิน เกสรเพศผู้เป็นหมันมีสีขาว ใบประดับส่วนบนที่ไม่ได้รองรับดอกย่อยมีสีม่วง และใบประดับส่วนล่างที่รองรับ

ดอกย่อยมีสีเขียวอ่อน ว่านชักมดลูกทั้งสองชนิดมีแหล่งที่มาที่แตกต่างกัน โดยที่ว่านชักมดลูกชนิด *C. comosa* Roxb. เป็นพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย ซึ่งในบางท้องถิ่นเรียกว่า “ว่านชักมดลูกตัวเมีย” และว่านชักมดลูกชนิด *C. xanthorrhiza* Roxb. เป็นชนิดที่นำเข้ามาจากประเทศอินโดนีเซีย จึงมีการเรียกชื่อท้องถิ่นในบางครั้งว่า “ว่านชักมดลูกตัวผู้” (สนั่น ศุภธีรสกุล, 2546) มีการศึกษาผลทางเภสัชวิทยา โดยสารสกัดจากว่านชักมดลูก *C. xanthorrhiza* Roxb. ที่มีชื่อว่า xanthorrhizol มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย (Hwang *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการต้านอาการอักเสบ ซึ่งมีศักยภาพที่สามารถพัฒนาเป็นยาต่อไปได้ (Lee *et al.*, 2002) ส่วนว่านชักมดลูก *C. comosa* Roxb. ได้มีการทดสอบฤทธิ์ทางยาในหนูแฮมเตอร์ พบว่าสามารถลดคลอเรสเตอรอลในเลือดที่มีมากผิดปกติได้ (Pawinee *et al.*, 1999) และมีการนำมาใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้านเพื่อการรักษาและบำรุงอาการต่างๆ ในสตรี เช่น ชักมดลูกเข้าอู่ แก้วตมดลูก แก้วประจำเดือนมาไม่ปกติ เป็นต้น แต่ยังไม่มียาสูตรของการนำมาใช้ในแง่

สมุนไพรพื้นบ้านว่าสามารถรักษา และบำรุงอาการในสตรีได้ผลดีจริง อีกทั้งยังคงเป็นที่ถกเถียงกันว่าว่านชักมดลูกทั้ง 2 ชนิดมีฤทธิ์ในทางยาแตกต่างกัน หากนำมาใช้ไม่ถูกต้องอาจเกิดผลเสียได้

วัตถุประสงค์

ตรวจแยกชนิดของว่านชักมดลูกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิค RAPD เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านสมุนไพรที่ถูกต้องและมีคุณภาพ

อุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

รวบรวมพันธุ์ว่านชักมดลูกได้ทั้งสิ้น 10 สายต้น ได้นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ดังแสดงในตารางที่ 1 นำมาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD ดังนี้

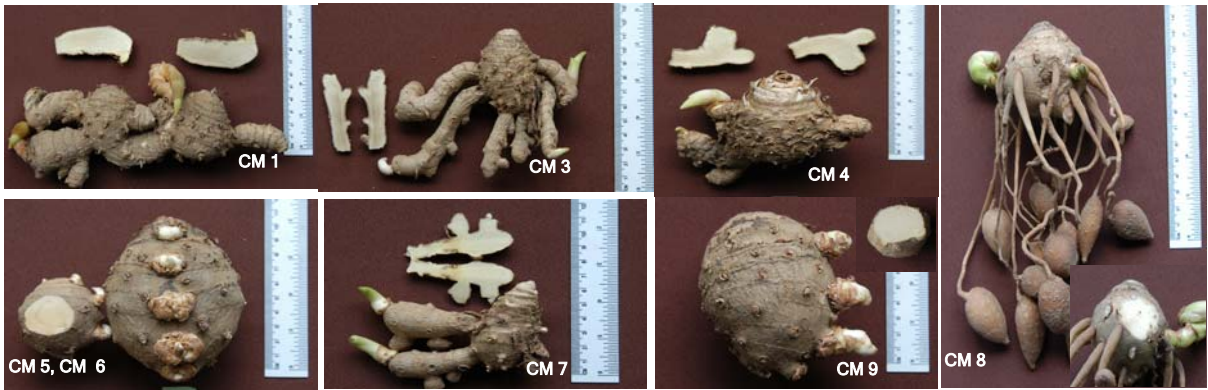
สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของตัวอย่างว่านชักมดลูก 10 สายต้นด้วยวิธีของ Doyle and Doyle

(1987) แล้วจึงนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาปรับความเข้มข้น เพื่อทำปฏิกิริยา RAPD กับไพรเมอร์ และตรวจสอบผลโดยเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิสชนิด Mupid โดยผ่านอะกาโรสเจลที่เข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์ใน 1X TAE buffer เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม จากการคัดเลือกไพรเมอร์ทั้งสิ้น 45 ไพรเมอร์ได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสม 15 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPM 04, OPM 07, OPM 09, OPG 02, OPG 04, OPG 06, OPG 11, OPF 03, OPF 10 , OPE 06, OPE 07, OPE 09, OPE 10 และ OPE 18 ซึ่งไพรเมอร์เหล่านี้จะถูกนำมาใช้ทำปฏิกิริยา RAPD กับดีเอ็นเอว่านชักมดลูกที่ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว และวิเคราะห์ผลโดยอิเล็กโทรโฟเรซิส บนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอจะทำการเปรียบเทียบความเหมือน และแตกต่างระหว่างสายต้น แล้วนำมาวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อจัดกลุ่มความใกล้เคียงของฐานพันธุกรรมของพันธุ์โดย Program NTSYS-PC software และแสดงผลของ cluster analysis, unweighted pair-group with arithmetical averages (UPGMA)

ตารางที่ 1: แสดงรายละเอียดของว่านชักมดลูกที่นำมาศึกษา DNA

ลำดับที่	รหัส DNA	ชื่อท้องถิ่น	สถานที่เก็บ
1	CM1	ทรหดชักมดลูก	จ.เชียงใหม่
2	CM2	ว่านชักมดลูก	จ.กาญจนบุรี
3	CM3	ว่านชักมดลูก	จ.มุกดาหาร
4	CM4	ทรหด	จ.หนองคาย
5	CM5	ว่านชักมดลูก/1	จ.สกลนคร
6	CM6	ว่านชักมดลูก/2	จ.สกลนคร
7	CM7	ว่านชักมดลูก	จ.พิษณุโลก
8	CM8	ว่านชักมดลูก	ไม่ทราบแหล่งที่มา
9	CM9	ว่านชักมดลูก	ไม่ทราบแหล่งที่มา
10	CM10	ว่านชักมดลูก	จ.เชียงใหม่

ผลการศึกษา

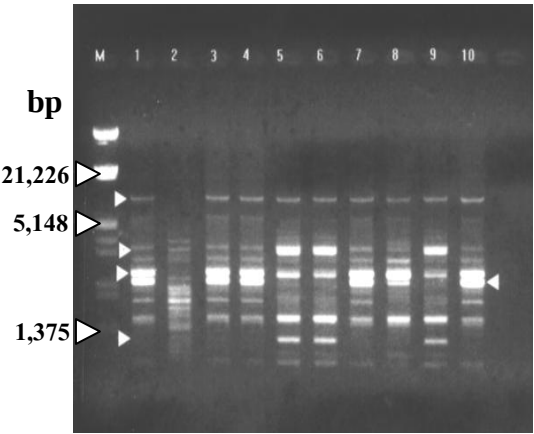


ภาพที่ 2: แสดงลักษณะของเหง้า ว่านชักมดลูก (*Curcuma* spp.)

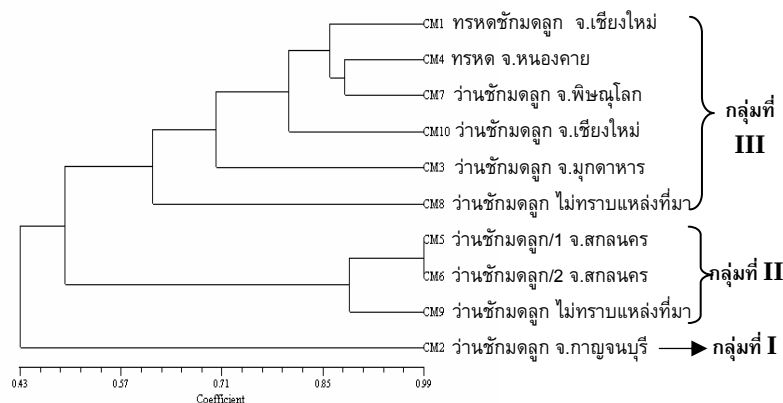
ตารางที่ 2: แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างของแต่ละสายต้น

สายต้นที่	แหล่งที่มา	รูปร่างเหง้า *	การปรากฏข้อปล้อง *	การปรากฏเหง้าแขนง *	รูปร่างใบ	การปรากฏสีแดงที่เส้นกลางใบ
CM1	จ.เชียงใหม่	ค่อนข้างกลม	ชัดเจน	มี	รี	ไม่ปรากฏ
CM3	จ.มุกดาหาร	รี	ชัดเจน	มี	รี	ปรากฏ
CM4	จ.หนองคาย	ค่อนข้างกลม	ชัดเจน	มี	รีแกมขอบขนาน	ไม่ปรากฏ
CM5, CM6	จ.สกลนคร	รี	ชัดเจน	ไม่มี	รีแกมขอบขนาน	ปรากฏ
CM7	จ.พิษณุโลก	ค่อนข้างกลมถึงรีขอบขนาน	ชัดเจน	มี	รีแกมขอบขนาน	ไม่ปรากฏ
CM8	ไม่ทราบ	ค่อนข้างกลม	ไม่ชัดเจน	ไม่มี	รีแกมขอบขนาน	ปรากฏ
CM9	ไม่ทราบ	รี	ชัดเจน	ไม่มี	รี	ปรากฏ
CM10	จ.เชียงใหม่	-	-	-	รีแกมขอบขนาน	ไม่ปรากฏ

หมายเหตุ * แสดงดังภาพที่ 2



ภาพที่ 3: แสดงลายพิมพ์ DNA ของว่านชักมดลูก 9 สายต้นวิเคราะห์โดยเทคนิค RAPD



ภาพที่ 4: แสดง Cluster analysis ความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม ของ RAPD – markers ว่านชักมดลูก 9 สายต้นโดยโปรแกรม NTSYS-PC

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อจัดกลุ่มความใกล้เคียงของฐานพันธุกรรมของว่านชักมดลูกทั้ง 10 สายต้นโดยเทคนิค RAPD สามารถจำแนกพืชทั้งหมดออกเป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 3 และ 4) จากการวิเคราะห์ข้อมูลทำให้ทราบได้ว่า สายต้น CM8 และ CM9 ที่ไม่ทราบที่มาของแหล่งที่เก็บ เป็นสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกับ ว่านชักมดลูกในกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 ตามลำดับ โดยกลุ่มที่ 2 เป็นสายต้นจากจังหวัดสกลนคร และกลุ่มที่ 3 เป็นสายต้นจากจังหวัดเชียงใหม่ พิษณุโลก มุกดาหาร และหนองคาย ซึ่งสายต้นของกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 มีลักษณะของเส้นกลางใบ 2 ลักษณะ คือ เส้นกลางใบสีแดง และเส้นกลางใบสีเขียว อยู่ปะปนภายในกลุ่มเดียวกัน ดังนั้นลักษณะดังกล่าวอาจยังไม่สามารถใช้จำแนกชนิดของว่านชักมดลูกได้ และเนื่องจากทุกสายต้นยังไม่ออกดอก ซึ่งอวัยวะส่วนนี้จะเป็นส่วนที่ให้ความชัดเจนในการจำแนกได้มากที่สุด และในกลุ่มที่ 1 เป็นสายต้นจากกาญจนบุรี มีลักษณะของรูปแบบ band ที่แตกต่างอย่างชัดเจน อาจเนื่องจากเป็นพืชในสกุลขมิ้นที่มีความใกล้ชิดและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาล้ำกับว่านชักมดลูก จึงเรียกว่าว่านชักมดลูกซึ่งอาจเป็นการเข้าใจผิดว่าเป็นชนิดเดียวกัน

สรุป

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของว่านชักมดลูกทั้ง 10 สายต้น สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม โดยสายต้นในกลุ่มเดียวกันไม่มีความสัมพันธ์กันตามภูมิภาค และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการปรากฏสีแดงบริเวณเส้นกลางใบที่ใช้ในการจำแนกชนิดของว่านชักมดลูก เพียงลักษณะเดียวไม่สามารถใช้ในการจำแนกชนิดได้ ควรใช้ลักษณะหลายๆ ลักษณะในการจำแนกชนิด โดยเฉพาะลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกร่วมด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ในการแนะนำกรอบการวิจัย และให้การสนับสนุนเครื่องมือ รวมทั้งสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนทุนงบประมาณการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- เต๋ม สมิตินันท์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. บริษัทประชาชน จำกัด, กรุงเทพมหานคร. 810 หน้า.
- สนั่น ศุภธีรสกุล และฉัตรชัย วัฒนากิรมย์สกุล. 2546. วานชักมดลูก. บทความประจำเดือนกันยายน 2546 ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. แหล่งที่มา: <http://pcog.pharmacy.psu.ac.th/Article/2546/09-46/curcumab.pdf>, 26 มิถุนายน 2548.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation proceduer for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- Hwang, J.K., Shim, J.S. and Pyun, Y.R.. 2000. Antibacterial activity of xanthorrhizol from *Curcuma xanthorrhiza* against oral pathogens. *Fitoterapia* 71(3): 321-323.
- Lee S.K., Hong, C.H., Huh, S.K., Kim, S.S., Oh, O.J., Min, H.Y., Park, K.K., Chung, W.Y., and Hwang, J.K. 2002. Supressive effect of natural sesquiterpenoids on inducible cyclooxygenase (COX-2) and nitric oxide synthase (iNOS) activity in mouse macrophage cells. *Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 21(2): 141-148.
- Pawinee Piyachaturawat, Jinda Charoenpiboonsin, Chaivat Toskulkao and Apichart Suksamrarn. 1999. Reduction of plasma cholesterol by *Curcuma comosa* extract in hypercholesterolaemic hamsters. *Journal of Ethnopharmacology* 66(2): 199-204