แก่นเกษตร ๓๔ (๔) : ๒๗๔-๒๘๕ (๒๕๔๙) KHON KAEN AGRI. J. 34 (4) : 274-285 (2006)

การศึกษาลักษณะพันธุ์กระชายดำโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล AFLP

Characterization of Krachai-Dam (*Kaempferia parviflora*) Cultivars Using AFLP Markers

เสริมสกุล พจนการุณ[1], เรือนแก้ว ประพฤติ[2], เชวง แก้วรักษ์[1] และ อัมพร ยอดดี[2]

Sermsakul Pojanagaroon[1], Reankaew Praphet[2], Chawaeng Kaewrak[1] and Amphorn Yotdi[2]

Abstract

Twelve collected Krachai-Dam (*Kaempferia parviflora*) cultivars from commercial cultivated area in Loei, Phitsanulok and Phetchabun were grown in 2003 at Phurua Highland Agricultural Experiment Station, Phurua, Loei. They were studied using amplified fragment length polymorphic (AFLP) markers, 34 selected AFLP primer combinations produced 147 polymorphic markers. Results were analysed for a similarity among the cultivars, and an unweighted pair group method cluster analysis was performed. The analysis revealed that the cultivars could be divided into 2 main groups: 'Green leaves' and 'Red leaves' groups, which also divided into 6 subgroups. The dendrogram showed good relationship between the banding patterns of Krachai-Dam cultivars and the morphological traits of leaves, petioles and rhizomes; especially the internal skin color of rhizomes. In addition, the relationship between the banding patterns and their quantities of chemical components in essential oil, total phenolic and flavonoids compounds, and pharmacological activity of Krachai-Dam rhizomes, were obviously.

Keywords: AFLP, characterization, cultivars, *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker, Krachai-Dam

[1] ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเลย (สถานีทดลองเกษตรที่สูงภูเรือ) อ.ภูเรือ จ.เลย 42160

[1] Phurua Highland Agricultural Experiment Station, Phurua, Loei, 42160, Thailand

[2] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290

[2] Biotechnology Center, Maejo University, Chaing Mai, 50290, Thailand

บทคัดย่อ

ทำการรวบรวมพันธุ์กระชายดำจากแหล่งปลูกการค้าในจังหวัดเลย พิษณุโลกและเพชรบูรณ์ จำนวน 12 สายพันธุ์ มาทดลองปลูกในปี พ.ศ. 2546 ณ สถานีทดลองเกษตรที่สูงภูเรือ อ.ภูเรือ จ.เลย ทำการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค AFLP พบว่ามี 34 ไพรเมอร์คู่เบสที่ได้ทำการคัดเลือกซึ่งสามารถสร้างแถบเครื่องหมายแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์กระชายดำทั้ง 12 สายพันธุ์ได้จำนวน 147 แถบเครื่องหมาย เมื่อจัดกลุ่มที่คล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted pair group method cluster analysis แล้วสร้างเป็น dendrogram พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มกระชายดำออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม 'ใบเขียว' และ 'ใบแดง' ซึ่งสามารถแบ่งย่อยได้อีกเป็น 6 กลุ่ม โดยพบความสัมพันธ์ที่ดีระหว่างแถบเครื่องหมายของพันธุ์กระชายดำกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ ก้านใบ และเหง้า โดยเฉพาะสีเนื้อในเหง้ากระชายดำ องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระชายดำ องค์ประกอบทางเคมีของสารประกอบกลุ่มฟินอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดเอทานอลจากเหง้ากระชายดำ

คำสำคัญ: กระชายดำ จำแนกพันธุ์ สายพันธุ์ เอเอฟแอลพี

คำนำ

กระชายดำ (Krachai-Dam) เป็นพืชล้มลุกอยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Kaempferia parviflora* Wall. Ex Baker ซึ่งต่างจาก "กระชาย" ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Boesenbergia pandurata* (Roxb.) Schltr. (พ้องกับ *B. rotunda* (L.) Mansf.) และกระชายขาว (Krachai-khao) ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Globba leeta* K. Larsen H. (ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้, 2544) เหง้ากระชายดำมีประสิทธิผลในการรักษาอาการเจ็บไข้เกี่ยวกับโรคกามตายด้านหรือบำรุงกำหนัด บำรุงกำลังด้านต่าง ๆ ในลักษณะโสมไทย ตลอดจนมีสรรพคุณในการเพิ่มสมรรถภาพทางเพศ จนได้รับการขนานนามว่าเป็น "สมุนไพรไทยสู้ไวอะกร้า" (ประเชิญและสุเทพ, 2543) สำหรับเทคนิค AFLP (Amplified fragment length polymorphism) นั้น เป็นเทคนิคของเครื่องหมาย DNA ที่อาศัยพื้นฐานการตรวจสอบชิ้น DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะและทำการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR เป็นเทคนิคที่มีความเชื่อถือได้สูง และสามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิม (Vos et al., 1995) เป็นการวิเคราะห์ DNA ที่ไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสของ DNA เช่นเดียวกับเทคนิค RAPD (Random amplified polymorphic DNA) ทำได้รวดเร็วและใช้ปริมาณ DNA เริ่มต้นจำนวนน้อย สามารถตรวจสอบ DNA ได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน คือมี multiplex ratio สูง ในหนึ่งปฏิกิริยาจะให้แถบ DNA มากกว่า RAPD ประมาณ 4 เท่า ทำให้เกิด polymorphism จำนวนมาก จึงสามารถใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างได้ดี สามารถใช้ศึกษาทางพันธุศาสตร์ได้เช่นเดียวกับเครื่องหมาย DNA แบบอื่น เช่น การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร ศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ และใช้ทำแผนที่จีโนมได้เป็นอย่างดี (สุรินทร์, 2545) มีงานวิจัยที่ใช้เทคนิค AFLP ในการจำแนกพันธุ์จำนวนมากในปัจจุบัน เช่น ข้าวโพด (Lubberstedt et al., 2000) แตงโม (Garcia-Mass et al., 2000) ฝ้าย (Abdalla et al., 2001) ฝิ่น (Sander *et al.,* 2001) มะกอกน้ำมัน (Resta et al., 2002; Sensi et al., 2003) และมังคุด (Yapwattanaphun et al., 2003) เป็นต้น สำหรับข้อด้อยของเทคนิค AFLP ประการหนึ่งคือ

ความไม่เหมาะสมสำหรับใช้เปรียบเทียบสิ่งทีชีวิตที่มีความแตกต่างกันมาก ๆ คือ มีลำดับเบสที่เหมือนกันต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เพราะจะมีแถบ DNA ที่เหมือนกัน (common band) จำนวนน้อย ทำให้การวิเคราะห์ผลในแง่การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการผิดพลาดได้ (สุรินทร์, 2545)

สำหรับกระชายดำที่รวบรวมมาศึกษานี้ คณะผู้วิจัยได้เคยทำการศึกษาลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RAPD (เสริมสกุล และคณะ, 2547) ซึ่งเทคนิค RAPD แม้จะทำได้ง่ายและรวดเร็ว แต่มีข้อเสียคือ การทดลองซ้ำบางครั้งได้ผลที่แตกต่างจากเดิม เนื่องจากมีความไวต่อการเปลี่ยนสภาวะต่าง ๆ ทำให้ผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือต่ำ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเน้นการสร้างลายพิมพ์ DNA โดยอาศัยเทคนิค AFLP ที่ใช้คู่ผสมไพรเมอร์ 2 ชนิดร่วมกัน มีการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ร่วมกับ *Mse*I เพื่อศึกษาพื้นฐานทางพันธุกรรมของกระชายดำสายพันธุ์รวบรวม โดยวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม (similarity index) ระหว่างกระชายดำทั้ง 12 สายพันธุ์ ร่วมกับการเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการของใบ ก้านใบ ดอก และเหง้า สีเนื้อในของเหง้า องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระชายดำ องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดเหง้ากระชายดำในกลุ่มฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากเหง้ากระชายดำ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างพืช

ทำการรวบรวมเหง้ากระชายดำจากแหล่งปลูกกระชายดำเป็นการค้า 12 แหล่งในจังหวัดเลย พิษณุโลกและเพชรบูรณ์ โดยใช้ชื่อแหล่งที่รวบรวมเป็นชื่อสายพันธุ์กระชายดำ (Table 1) ทำการปลูกเหง้ากระชายดำในถุงพลาสติกดำ และปลูกในแปลงทดสอบ 3 พื้นที่ คือ ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเลย (ภูเรือ) อำเภอภูเรือ จังหวัดเลย ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตลำปาง อำเภอห้างฉัตร จังหวัดลำปาง และศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ส่วนแยกพืชสวนแม่จอนหลวง อำเภอแม่แจ่ม จังหวัดเชียงใหม่ ต้นกระชายดำพันธุ์รวบรวมทั้ง 12 สายพันธุ์ได้รับการตรวจสอบและยืนยันทางพฤกษศาสตร์ว่ามีชื่อวิทยาศาสตร์ *'Kaempferia parviflora'* โดย 'นายจรัล มากน้อย' หอพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ (หมายเลขตัวอย่าง QSBG C. Maknoi No. 466–477)

2. การสกัดดีเอ็นเอ

เตรียมดีเอ็นเอโดยใช้ใบอ่อนที่เพาะจากเหง้าที่มีความยาวประมาณ 5–10 ซม. นำมาบดละเอียดในโกร่งกับไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB ของ Doyle and Doyle (1987) ที่ดัดแปลงโดย Fabbri et al. (1995) ในสารละลาย CTAB buffer จากนั้นสกัดต่ออีก 2 ครั้งด้วย Chloroform/Isoamyl alcohol (24:1) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 7.5 M Ammonium acetate และ 80% ethanol ปั่นล้างตะกอนด้วยสารละลาย ethanol 70% 3 ครั้ง ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งประมาณ 15 นาที ละลายดีเอ็นเอให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย 10 mM TE buffer pH 8.0 นำไปตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสง (สุรินทร์, 2545) แล้วปรับดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตรด้วย TE buffer

Table 1 The sources of Krachai-Dam rhizomes which were collected from 12 commercial cultivated areas in Loei, Phitsanulok and Phetchabun provinces

Name of cultivars	Herbarium code*	Commercial cultivated areas
1. 'Huay Nam Sai'	QSBG C.Maknoi 466	Moo 16 Ban Huay Num Sai Tai, Tambon Nern-Perm, Nakorn-Thai, Phitsanulok.
2. 'Rong-Jig'	QSBG C.Maknoi 471	Moo 1 Ban Rong-Jig, Tambon Rong-Jig, Phurua, Loei.
3. 'Ban-Klang#1'	QSBG C.Maknoi 472	Moo 4 Ban Klang, Tambon Plaba, Phurua, Loei.
4. 'Ban-Klang#2'	QSBG C.Maknoi 473	Moo 4 Ban Klang, Tambon Plaba, Phurua, Loei.
5. 'Nam-Juang'	QSBG C.Maknoi 467	Moo 15 Ban Nam-Juang, Tambon Boh-Park, Charttrakarn, Phitsanulok.
6. 'Na-Kha'	QSBG C.Maknoi 474	Moo 5 Ban Na-Kha, Tambon Pak-mun, Dan-Sai, Loei.
7. 'Nhong-Seang'	QSBG C.Maknoi 475	Moo 2 Ban Nhong-Saeng, Tambon Sarn-Tom, Phurua, Loei.
8. 'Boh Muang Noi#1'	QSBG C.Maknoi 476	Moo 5 Ban Boh Muang Noi, Tambon Saeng-Pha, Na-Heaw, Loei.
9. 'Boh Muang Noi#2'	QSBG C.Maknoi 477	Moo 5 Ban Boh Muang Noi, Taombon Saeng-Pha, Na-Heaw, Loei.
10 'Rom-Klao'	QSBG C.Maknoi 468	Moo 4 Ban Rom-Klao,Tambon Boh-Park, Charttrakarn, Phitsanulok.
11 'Kheg-Noi#1'	QSBG C.Maknoi 469	Moo 9 Ban Prakobsuk,, Tambon Kheg-Noi, Khao-Khor, Phetchabun.
12 'Kheg-Noi#2'	QSBG C.Maknoi 470	Moo 8 Ban Chaichana, Tambon Kheg-Noi, Khao-Khor, Phetchabun.

*Plant samples were kept in Herbarium at the Queen Sirikit Botanical Garden (QSBG), Mae-Rim, Chiang Mai

3. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค AFLP

วิธีการที่ใช้ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Vos et al. (1995) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่ต้องติดฉลากด้วยสารรังสีแต่ใช้การย้อมเจลด้วย silver stain และในขั้นตอนของการทำ PCR มีวิธีการโดยสังเขปดังนี้ นำดีเอ็นเอ 250 นาโนกรัมมาตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR*I/ *Mse*I จากนั้นนำมาเชื่อมต่อ (ligation) เข้ากับส่วนของ *EcoR*I adapter และ *Mse*I adapter

*EcoR*I adapter 5′-CTCGTAGACTGCGTACC
CATCTGACGCATGGTTAA-5′

*Mse*I adapter 5′-GACGATGAGTCCTGAG
TACTCAGGACTCAT-5′

จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา preselective amplification โดยใช้ *EcoR*I+A และ *Mse*I+C primer (Qiagen Operon) ในปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย *EcoR*I+A และ *Mse*I+C primer อย่างละ 0.2 μM, Taq DNA polymerase (Invitrogen) 0.25 U, dNTPs 0.12 μM (Promega), $MgCl_2$ 1.5 mM , diluted restriction-lagation 5 ng, 1 x Taq DNA polymerase buffer เติมน้ำ deionized sterile ให้มีปริมาตรครบ 25 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา PCR 20 รอบ ตั้งโปรแกรมให้เครื่องทำงานที่ 94 ° C 30 วินาที (denaturation step), 56 ° C 1 นาที (annealing step), 72 ° C 1 นาที (extension step) นำสารละลายที่ถูกเพิ่มปริมาณในขั้นตอน preselective amplification มาทำให้เจือจางลง 20 เท่าด้วย 10 mM TE buffer จากนั้นนำมาทำ selective PCR ในปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย *EcoR*I+3 primer 0.05 μM, *Mse*I+3 primer 0.25 μM (Qiagen Operon), Taq DNA polymerase 0.5U (Invitrogen), 1 x Taq DNA polymerase buffer, dNTPs 0.2 mM, MgCl2 1.5 mM, diluted preselective (1:20) 3 μl เติมน้ำ deionized sterile ให้มีปริมาตรครบ 10 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา PCR 36 รอบ โดยตั้งโปรแกรมให้เครื่องทำงานที่ 94° C 2 นาที (รอบแรก), 92° C 30 วินาที, 65 ° C 30 วินาที, 72 ° C 45 วินาที จำนวน

12 รอบ ในขั้นตอนนี้ตั้งโปรแกรมให้เครื่องลดอุณหภูมิที่ 65 ° C ลง 0.7 ° C ในแต่ละรอบของการทำงาน จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อเนื่องอีกที่ 94 ° C 30 วินาที, 56 ° C 30 วินาที, 72 ° C 1 นาที จำนวน 23 รอบ ใช้เครื่อง GeneAmp 2400 (Perkin Elmer) นำสารพันธุกรรมที่ถูกเพิ่มปริมาณมา load ลงใน 5% denaturing polyacrylamide gel ขนาด 140 มม. x 160 มม. นำมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยตั้งค่ากระแสคงที่ 600 โวลท์ ใน 0.5 x TBE buffer ใช้เวลานาน 3:30 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วย silver nitrate เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจน ทำการบันทึกผลข้อมูลเป็นสัญลักษณ์ '1' หมายถึง 'ปรากฏแถบ' และ '0' หมายถึง 'ไม่ปรากฏแถบ' ดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่าง

ผลและวิจารณ์

จากการศึกษาลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค Amplified fragment length polymorphism DNA (AFLP) ของกระชายดำ 12 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์คู่ผสม 34 คู่เบสที่คัดเลือกได้ (selected combination) ซึ่งให้แถบเครื่องหมายที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic AFLP markers) จำนวน 147 แถบเครื่องหมายโดยมีค่าเฉลี่ยของแถบเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์กระชายดำต่อไพรเมอร์คู่ผสม คิดเป็น 4.32 แถบเครื่องหมาย (Table 2, Fig. 1)

Table 2 34 selected primers *EcoR*I and *Mse*I plus three additional selective nucleotides used for AFLP amplification

Primer combination number	Forward primer, *EcoR*I+3	Reverse primer, *Mse*I+3	Numbers of polymorphic bands
30	*EcoR*I + ACG	*Mse*I + CGC	2
32	*EcoR*I + AGG	*Mse*I + CAC	4
33	*EcoR*I + AGG	*Mse*I + CAG	5
36	*EcoR*I + AGG	*Mse*I + CTA	6
37	*EcoR*I + AGG	*Mse*I + CTC	3
38	*EcoR*I + AGG	*Mse*I + CTT	2
39	*EcoR*I + AGG	*Mse*I + CGG	2
41	*EcoR*I + AAC	*Mse*I + CAC	5
42	*EcoR*I + AAC	*Mse*I + CAG	3
43	*EcoR*I + CAC	*Mse*I + CTA	2
44	*EcoR*I + AAC	*Mse*I + CTC	6
45	*EcoR*I + AAC	*Mse*I + CTG	4
46	*EcoR*I + AAC	*Mse*I + CTT	4
47	*EcoR*I + AAC	*Mse*I + CGG	8
48	*EcoR*I + AAC	*Mse*I + CGC	5
49	*EcoR*I + AAG	*Mse*I + CAA	2
50	*EcoR*I + AAG	*Mse*I + CAC	5
51	*EcoR*I + AAG	*Mse*I + CAG	4
52	*EcoR*I + AAG	*Mse*I + CAT	3
53	*EcoR*I + AAG	*Mse*I + CTA	3
54	*EcoR*I + AAG	*Mse*I + CTC	5
55	*EcoR*I + AAG	*Mse*I + CTG	3
57	*EcoR*I + AAG	*Mse*I + CGC	9
58	*EcoR*I + ACC	*Mse*I + CAA	7
59	*EcoR*I + ACC	*Mse*I + CAC	6
60	*EcoR*I + ACC	*Mse*I + CAT	4
61	*EcoR*I + ACC	*Mse*I + CTA	8
62	*EcoR*I + ACC	*Mse*I + CTC	3
64	*EcoR*I + ACC	*Mse*I + CTT	2
65	*EcoR*I + ACC	*Mse*I + CGG	3
66	*EcoR*I + ACC	*Mse*I + CGC	6
67	*EcoR*I + ACT	*Mse*I + CAA	5
69	*EcoR*I + ACT	*Mse*I + CAG	4
	Total (band)		**147**
	Mean (band/primer combination)		**4.32**

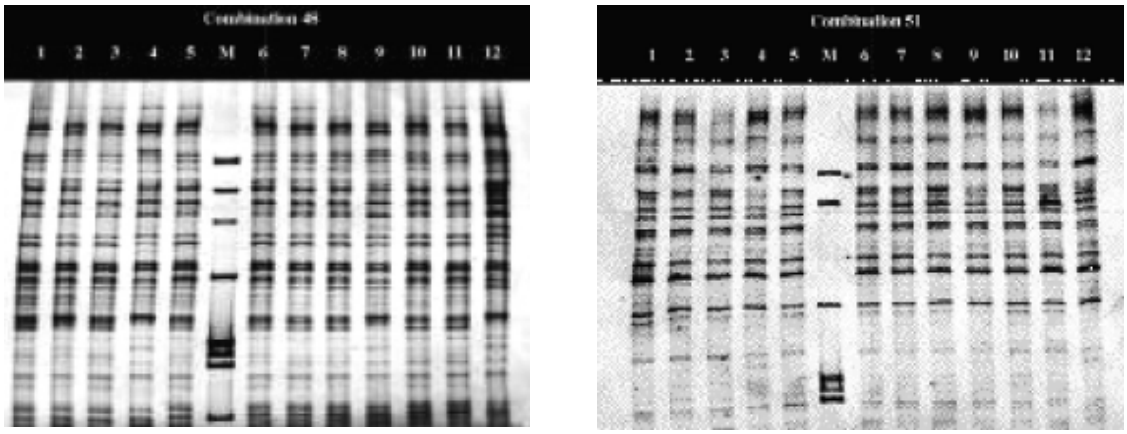

Fig. 1 AFLP amplification production patterns of the 12 collected Krachai-Dam cultivars obtained with the primer combination no.48 (*EcoR*I+AAC, *Mse*I+CGC) and no. 50 (*EcoR*I+AAG, *Mse*I+CGC) under Polyacrylamide Gel Electrophoresis (the letter M= the puc19 DNA/*Msf*I marker, the number 1 to 12 = the Krachai-Dam cultivars which have the serial number according to the name of their cultivars shown in Table 1

เมื่อนำมาจัดกลุ่มความคล้ายคลึงกันโดยใช้วิธี Unweighted pair group method cluster analysis (UPGMA) พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มสายพันธุ์กระชายดำที่รวบรวมจากแหล่งปลูกการค้าในจังหวัดเลย พิษณุโลก และเพชรบูรณ์ ออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Fig. 2) ดังนี้

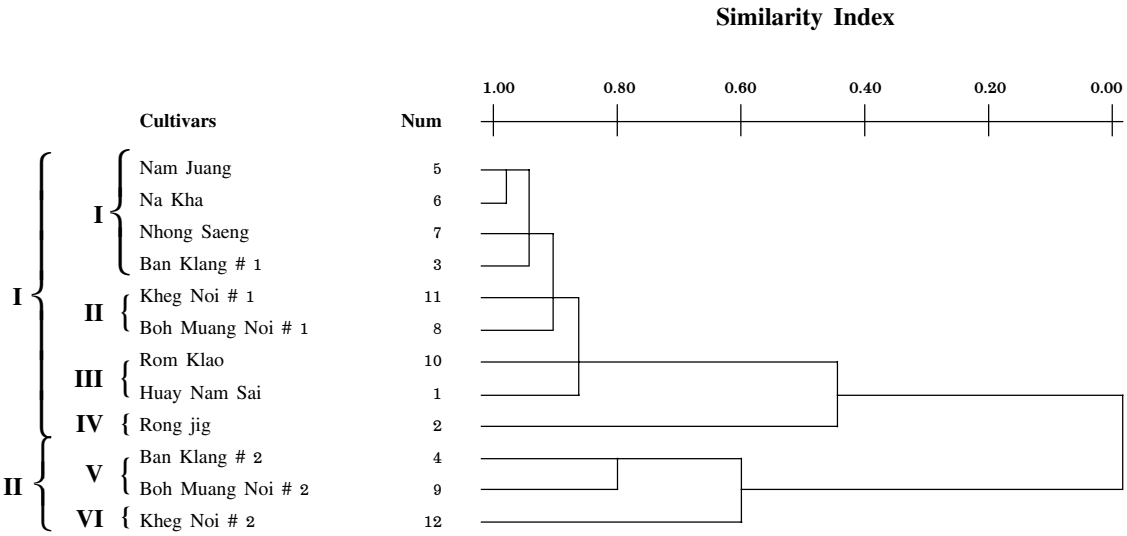

Fig. 2 Dendrogram obtained by UPGMA cluster analysis from the similarity index among 12 collected Krachai-Dam cultivars for 147 polymorphic AFLP

กลุ่มใหญ่ที่ 1 ได้แก่ กลุ่มที่มีใบแดงสีเนื้อในเหง้า 'สีเข้ม' ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นอีก 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่มีสีเนื้อในเหง้า 'สีม่วงเข้มถึงม่วงดำ' ซึ่งสามารถแบ่งย่อยได้อีกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มย่อยที่ 1.1 มี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 'น้ำจวง' 'นาข่า' 'หนองแซง' และ 'บ้านกลาง-1' ; กลุ่มย่อยที่ 1.2 มี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 'เข็กน้อย-1' และ 'บ่อเหมืองน้อย-1' ; กลุ่มย่อยที่ 1.3 มี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 'ร่มเกล้า' และ 'ห้วยน้ำไทร' และ กลุ่มที่ 2 มีสายพันธุ์เดียว ได้แก่ สายพันธุ์ 'ร่องจิก' ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างกลุ่มที่มีสีเนื้อในเหง้า 'สีเข้ม' และกลุ่มที่มีใบเขียวสีเนื้อในเหง้า 'สีจาง'

กลุ่มใหญ่ที่ 2 ได้แก่ กลุ่มที่มีใบเขียวสีเนื้อในเหง้า 'สีจาง' ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 มี 2 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ 'บ้านกลาง-2' และ 'บ่อเหมืองน้อย-2' และ กลุ่มที่ 2 มีสายพันธุ์เดียว ได้แก่ สายพันธุ์ 'เข็กน้อย-2'

เมื่อเปรียบเทียบ dendrogram (Fig. 2) กับ dendrogram ที่สร้างจาก 139 polymorphic RAPD markers (Fig. 3) (เสริมสกุล และคณะ, 2547) แสดงให้เห็นว่าสอดคล้องกัน กล่าวคือสามารถจัดกลุ่มกระชายดำทั้ง 12 สายพันธุ์ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่ม'ใบแดง' และกลุ่ม 'ใบเขียว' ต่างกันเพียงสายพันธุ์ 'ร่องจิก' กลับอยู่ในกลุ่ม 'ใบแดง' เมื่อพิจารณาประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ ก้านใบดอก และเหง้ากระชายดำที่รวบรวมศึกษาทั้ง 12 สายพันธุ์ (เสริมสกุล และคณะ, 2547) พบความสัมพันธ์ที่ดี กล่าวคือ พบความแตกต่างที่ชัดเจนระหว่างกลุ่มใบเขียวสีเนื้อในเหง้าสีจาง และกลุ่มใบแดงสีเนื้อในเหง้าสีเข้ม คือ ด้านท้องใบของกลุ่มใบแดงจะมีสีแดงเหลือบสีเขียวอ่อนบริเวณครึ่งบนของใบ และขอบใบด้านท้องใบมีสีแดง ขณะที่กลุ่มใบเขียวจะเป็นสีเขียวทั้งหมดไม่มีสีแดงปนแต่อย่างใด ยกเว้นเพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้นคือ 'ร่องจิก' ที่มีขอบใบสีแดงแต่ด้านท้องใบไม่มีสีแดงเหลือบสี

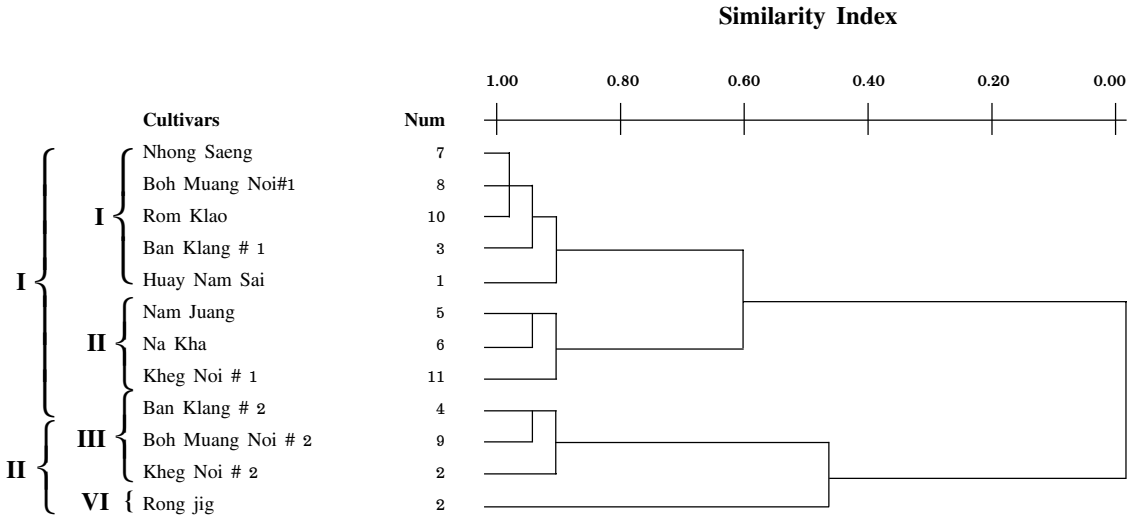

Fig. 3 Dendrogram obtained by UPGMA cluster analysis from the Q-Yule's Similarity index among 12 collected Krachai-Dam cultivars for 139 polymorphic RAPD

เขียวอ่อน ซึ่งถูกจำแนกให้อยู่ในกลุ่มใบแดง จาก dendrogram ที่สร้างโดยเทคนิค AFLP (Fig. 2) นี้ แต่เป็นสายพันธุ์ที่อยู่ห่างจากกลุ่มใบแดงสายพันธุ์อื่น ๆ มาก ขณะที่ถูกจำแนกให้อยู่ในกลุ่มใบเขียวจาก dendrogram ที่สร้างจาก RAPD (เสริมสกุล และคณะ, 2547) (Fig. 3) แต่มีสีเนื้อในเหง้าสีซีดเหมือนกลุ่มใบเขียว จึงถือได้ว่าสายพันธุ์ 'ร่องจิก' เป็นสายพันธุ์ที่อยู่กึ่งกลางระหว่างกลุ่มใบเขียวกับใบแดง นอกจากนี้กลุ่มใบแดงจะมีด้านล่างของก้านใบบริเวณชิดดินเป็นสีแดง และ scale เป็นสีแดง ขณะที่กลุ่มใบเขียวไม่มีสีแดงบริเวณก้านใบแต่อย่างใดและ scale จะมีสีเขียว สีเขียวเหลือบแดง ถึงแดงอ่อน สำหรับช่อดอกกระชายดำนั้นแทบไม่พบความแตกต่างกันระหว่าง 12 สายพันธุ์ที่ศึกษา แต่พบแนวโน้มว่ากลุ่ม'ใบเขียว' ได้แก่สายพันธุ์ 'เข็กน้อย-2' 'บ้านกลาง-2' 'บ่อเหมืองน้อย-2' และ'ร่องจิก'มี labellum สีม่วงเข้มค่อนข้างกว้างกว่าสายพันธุ์ใบแดง กล่าวคือ อยู่ในช่วง 0.5-0.7 เซนติเมตร ขณะที่สายพันธุ์ 'ใบแดง' มี labellum กว้างเพียง 0.3-0.6 เซนติเมตรเท่านั้น (เสริมสกุล และคณะ, 2547)

เหง้ากระชายดำเป็นลำต้นสะสมอาหารใต้ดินประเภท 'rhizomes' สำหรับขนาดเหง้านั้น พบว่ามีแนวโน้มที่สายพันธุ์ใบแดงสีเนื้อในเข้มจะมีขนาดเล็กกว่าสายพันธุ์ใบเขียวสีเนื้อในสีจาง และพบความสัมพันธ์ที่ดีระหว่างสีเนื้อในเหง้ากระชายดำกับสีใบและก้านใบของต้นกระชายดำ

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบ dendrogram ที่ได้จาก AFLP markers (Fig. 2) กับ dendrogram สีเนื้อในของเหง้ากระชายดำในระบบ a*L*b* ที่วัดด้วยเครื่องวัดสี MINOLTA รุ่น CR-300 (Fig. 4) (Pojanagaroon and Kaewrak, 2003) พบความ

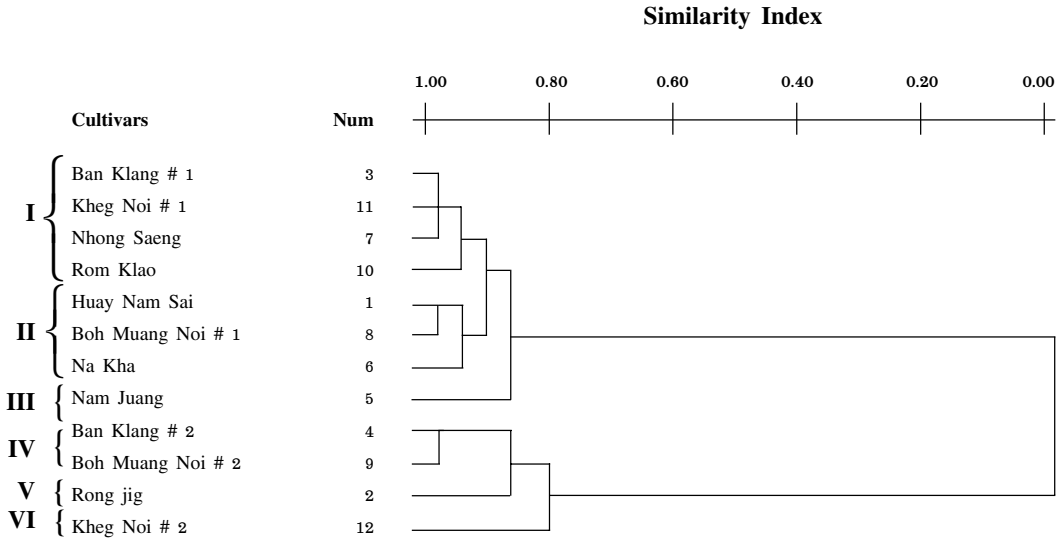

Fig. 4 Dendrogram from Hierarchical cluster analysis (average linkage between groups) of value a*,L* and b* in a*L*b* color system of Khrachai-Dam rhizomes' internal skin color. In the L* a* b* color space; L* indicates brightness: +L* is the lightness or white, -L* is the darkness or black; a* and b* are the chromaticity coordinates; +a* is the red direction, -a* is the green direction, +b* is the yellow direction, -b* is the blue direction.

สัมพันธ์ที่ดีระหว่าง dendrogram ทั้งสองโดยเฉพาะในกลุ่มใหญ่ที่สอง (กลุ่มที่มีสีเนื้อในเหง้า สีจาง) ยกเว้นสายพันธุ์ 'ร่องจิก' ขณะที่ในกลุ่มใหญ่ที่หนึ่ง (กลุ่มที่มีสีเนื้อในเหง้าสีเข้ม) นั้นกลับพบว่ามีการเหลื่อมล้ำกันระหว่างกลุ่มย่อยใน dendrogram ทั้งสอง แสดงให้เห็นว่าสีของเนื้อในเหง้ากระชายดำในกลุ่มสีเข้มส่วนหนึ่งเกิดจากอิทธิพลของสายพันธุ์หรือพันธุกรรม (genotypic effect) ขณะที่อีกส่วนหนึ่งน่าจะเกิดจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมของแหล่งปลูก (environmental effect) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาค่าอัตราพันธุกรรมอย่างกว้าง (Heritability in broad sense, h_b^2) ระหว่างฤดูกาลปลูก 2546-2547 ด้านการเกิดสีเนื้อในเหง้ากระชายดำในระบบพิกัดสี a*L*b* (เสริมสกุล และเชวง, 2547ก.) ซึ่งพบว่าค่าแกนสี L* (ความสว่างและความมืด) และค่าสี b* (สีน้ำเงินและสีเหลือง) ขึ้นกับอิทธิพลของพันธุกรรม (h_b^2= 0.89 และ 0.90) ขณะที่ค่าแกนสี a* (สีแดงและสีเขียว) เกิดจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม (h_b^2= 0.14)

เมื่อเปรียบเทียบ dendrogram ที่สร้างจาก AFLP markers (Fig.2) กับ dendrogram ที่สร้างจากองค์ประกอบทางเคมี 51 ชนิดของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระชายดำ (Fig.5) ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มกระชายดำออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (เสริมสกุลและเชวง, 2547ก.) โดยพบความสัมพันธ์ที่ดีมากในกลุ่มใหญ่ที่สอง ซึ่งประกอบด้วยสายพันธุ์ใบเขียวสีเนื้อในเหง้าสีซีด ยกเว้นเฉพาะสายพันธุ์ 'ร่องจิก' ขณะที่ในกลุ่มที่หนึ่ง ซึ่งประกอบด้วยสายพันธุ์กลุ่มใบแดงสีเนื้อในเหง้าสีเข้มมีความสัมพันธ์สอดคล้องกันเพียงบางส่วนและมีความเหลื่อมล้ำกันระหว่างกลุ่มย่อยใน dendrogram ทั้งสองเช่นกัน แสดงให้เห็นว่า กระบวนการสังเคราะห์สารทุติยภูมิที่มีองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระชายดำที่รวบรวมน่าจะมีปัจจัยส่วนหนึ่งมาจากพันธุกรรมหรือสายพันธุ์ และอีกส่วนหนึ่งมาจากสิ่งแวดล้อมและการเขตกรรมของแหล่งปลูกเช่นเดียวกับการเกิดสีเนื้อในของเหง้ากระชายดำดังกล่าวข้างต้น

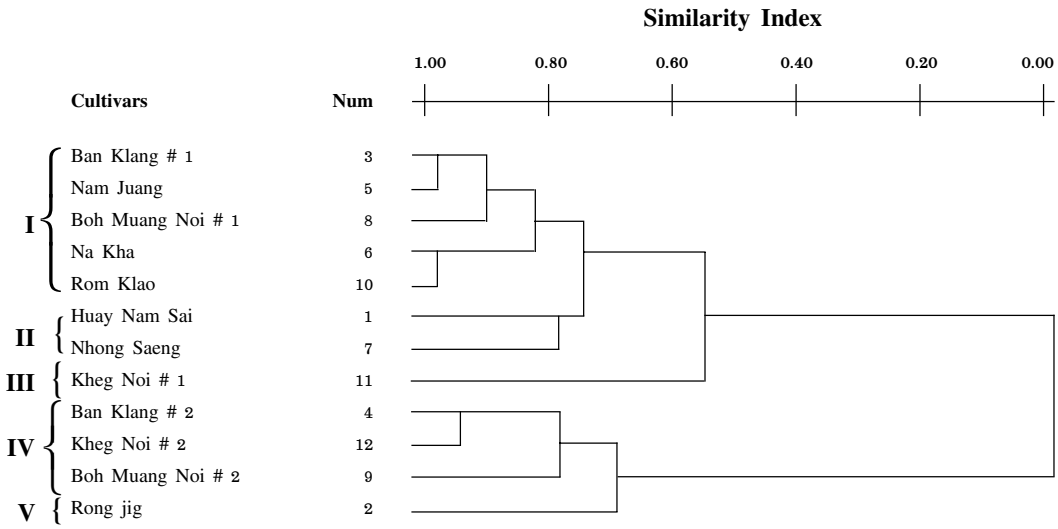

Fig. 5 Dendrogram from Hierarchical cluster analysis (average linkage between groups) of 51 chemical components of the essential oil in Krachai-Dam rhizomes

เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาปริมาณสารประกอบกลุ่มฟีนอลิคและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดเอธานอลจากเหง้ากระชายดำที่มีสีเนื้อในเหง้าแตกต่างกัน 4 ระดับ (Table 3) (เสริมสกุล และเชวง, 2548) พบว่าสอดคล้องกับการแบ่งสายพันธุ์กระชายดำเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มใบแดง และกลุ่มใบเขียว กล่าวคือ สารสกัดเอทานอลจากกระชายดำกลุ่มที่มีสีเนื้อในเหง้าสีเข้ม(ได้แก่ สายพันธุ์ 'ร่มเกล้า' และ 'น้ำจวง') มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยล์ทั้งหมดสูงกว่าสารสกัดเอทานอลกระชายดำที่มีสีเนื้อในเหง้าสีจาง (ได้แก่ สายพันธุ์ 'บ่อเหมืองน้อย-2' และ 'เข็กน้อย-2') อย่างเห็นได้ชัด โดยเฉพาะปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของกลุ่มเนื้อเหง้าสีเข้มมีค่ามากกว่ากลุ่มเนื้อเหง้าสีจางโดยคิดเป็นสัดส่วนระหว่างกลุ่มเนื้อเหง้าสีเข้ม': กลุ่มเนื้อเหง้าสีจาง เท่ากับ 2.44:1.00 เมื่อเปรียบเทียบ dendrogram ที่ได้จาก AFLP markers (Fig. 2) กับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเหง้ากระชายดำ 3 ด้าน ได้แก่ ฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร (เสริมสกุล และไชยยง, 2547ก.), ฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระ (เสริมสกุล และไชยยง, 2547ข.) และฤทธิ์ต้านความเหนื่อยล้า (เสริมสกุล และไชยยง, 2548) ไม่พบความสัมพันธ์ที่ชัดเจนในด้านฤทธิ์ต้านการเกิดแผลในกระเพาะอาหารและฤทธิ์ต้านความเหนื่อยล้า แต่พบความสัมพันธ์ที่ดีด้านฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระที่พบว่าสารสกัดเอทานอลจากกระชายดำที่มีสีเนื้อในเหง้าสีม่วงดำมีฤทธิ์สูงกว่าสายพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญ

ประเด็นปัญหาที่เกิดขึ้นจากผลงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้อยู่ระหว่างดำเนินการวิจัยโดยใช้เทคนิค regional yield trials และ multi-environment yield trials เพื่อพิสูจน์ให้เห็นว่ากระบวนการเกิดสารทุติยภูมิขององค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระชายดำ ตลอดจนการสังเคราะห์สารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาภายในเหง้ากระชายดำนั้นเกิดมาจากอิทธิพลของพันธุกรรมหรือสิ่งแวดล้อม โดยแสดงในเทอมของ genotypic effects (G) environmental effects (E) และ genotypic x environment (GE) interaction effects และค่าอัตราพันธุกรรมอย่างกว้าง (heritability in broad sense, h_b^2)

Table 3 Phenolic compounds and total flavonoids contents in *Kaempferia parviflora* ethanolic extract with different internal skin color of rhizomes

***Kaempferia parviflora* extract**	**Phenolic compounds (equiv. tannic acid, mg/g) (n=4)**	**Total flavonoids (equiv. quercetin, mg/g)(n=3)**
Very dark-purple Krachai-Dam (cv 'Rom-Klao')	46.39 ± 9.34	95.53 ± 0.45
Dark-purple Krachai-Dam (cv 'Nam-Juang')	43.32 ± 9.32	89.59 ± 0.31
Purple Krachai-Dam (cv. 'Boh Muang Noi #2')	22.65 ± 2.83	39.56 ± 0.36
Pale-purple Krachai-Dam (cv. 'Kheg-Noi#2')	31.57 ± 7.22	36.18 ± 0.17

Determined by Folin-Ciocal Teau technique (measured O.D. at 725 nm)

$ Determined by AI (III) flavonoids complexation technique (measured O.D. at 420 nm)

สรุป

จากการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค AFLP ด้วยไพรเมอร์คู่ผสม 31 คู่เบสที่คัดเลือกได้ ซึ่งสามารถสร้างแถบเครื่องหมายแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์กระชายดำทั้ง 12 สายพันธุ์ได้จำนวน 147 แถบเครื่องหมาย เมื่อจัดกลุ่มที่คล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted pair group method cluster analysis แล้วสร้างเป็น dendrogram พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มกระชายดำออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มใบเขียว และใบแดง ซึ่งสามารถแบ่งย่อยได้อีกเป็น 6 กลุ่มย่อย โดยพบความสัมพันธ์ที่ดีระหว่างแถบเครื่องหมายของพันธุ์กระชายดำกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ ก้านใบ และเหง้า โดยเฉพาะสีเนื้อในเหง้ากระชายดำ องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระชายดำ องค์ประกอบทางเคมีของสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดเอทานอลจากเหง้ากระชายดำ

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ‘นายจรัล มากน้อย’ หอพรรณไม้ องค์การสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ฯที่กรุณาตรวจสอบและยืนยันชนิดของตัวอย่างกระชายดำที่รวบรวมศึกษา และขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในโครงการวิจัยศึกษาเพื่อกำหนดมาตรฐานคุณภาพสมุนไพรกระชายดำ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้

เอกสารอ้างอิง

ประเชิญ สร้อยทองคำ และสุเทพ เฉียบแหลม. 2542. กระชายดำ สมุนไพรไทยสู้ไวอะกร้า. วนสาร. 57(2) : 134–138.

ส่วนพฤกษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันทน์. พิมพ์ครั้งที่ 2. บริษัทประชาชน จำกัด. กรุงเทพฯ. 810 หน้า.

สุรินทร์ ปิยโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอนเอ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 116 หน้า.

เสริมสกุล พจนการุณ และเชวง แก้วรักษ์. 2547ก. รวบรวมศึกษาและคัดเลือกพันธุ์กระชายดำ: องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระชายดำ. วารสารเกษตร. 20(1): 44–55.

เสริมสกุล พจนการุณ และเชวง แก้วรักษ์. 2547ข. การประเมินค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะสีเนื้อในเหง้าของกระชายดำ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 35(5–6): 59–62.

เสริมสกุล พจนการุณ และเชวง แก้วรักษ์. 2548. รวบรวมศึกษาและคัดเลือกพันธุ์กระชายดำ. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เสนอต่อกรมวิชาการเกษตร. ศูนย์บริการวิชาการด้านพืชและปัจจัยการผลิตเลย (ภูเรือ). เลย. 53 หน้า.

เสริมสกุล พจนการุณ และไชยยง รุจจนเวท. 2547ก. ผลของเหง้ากระชายดำที่มีสีเนื้อในเหง้าแตกต่างกันต่อฤทธิ์ต้านการสร้างแผลในกระเพาะอาหาร. การสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติประจำปี 2547 (26–27 มกราคม 2547) ภาคโปสเตอร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น. หน้า 136–144.

เสริมสกุล พจนการุณ และไชยยง รุจจนเวท. 2547ข. ผลของเหง้ากระชายดำที่มีสีเนื้อในเหง้าแตกต่างกันต่อฤทธิ์ต้านการเกิดอนุมูลอิสระ. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 32(4): 270–277.

เสริมสกุล พจนการุณ และไชยยง รุจจนเวท. 2548. ผลของเหง้ากระชายดำที่มีสีเนื้อในเหง้าแตกต่างกันต่อฤทธิ์ต้านความเหนื่อยล้า. ใน: การสัมมนาวิชาการเกษตรประจำปี 2548 มหาวิทยาลัยขอนแก่น (24–25 มกราคม 2548) ภาคบรรยาย. ขอนแก่น. หน้า 82–83.

เสริมสกุล พจนการุณ เรือนแก้ว ประพฤติ เชวง แก้วรักษ์ และ อัมพร ยอดดี. 2547. ศึกษาลักษณะพันธุ์กระชายดำโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล RAPD, ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระชายดำ. ใน: เอกสารเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 สาขาพืช (3-6 กุมภาพันธ์ 2547) ภาคบรรยาย. กรุงเทพฯ. หน้า 55-64.

Abdalla, A.M., O.U.K. Reddy, and K.M. El-Zik. 2001. Genetic Diversity and Relationships of Diploid and Tetraploid Cottons Revealed Using AFLP. Theor. Appl. Genet. 1002: 222-229.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A Rapid Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. Phytochem. Bul. 19: 11-15.

Fabbri, A., J.I. Hormaza, and V.S. Polito. 1995. Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of Olive (*Olea europaea* L.) cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120(3): 538-542.

Garcia-Mass, J., M. Oiver, and H. Gomez Paniagua. 2000. Comparing AFLP, RAPD and RFLP. Marker of Measuring Genetics Diversity in Melon. Theor. Appl. Genet. 101: 860-864.

Lubberstedt, T., A.E. Melchinger, C. DuBle, M. Vuylsteke, and M. Kuiper. 2000. Relationships Among Early European Maize Inbreds: IV. Genetic Diversity and Revealed with AFLP Markers and Comparison with RFLP, RAPD, and Pedigree data. Crop Sci. 40: 783-791.

Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 5269-5273.

Pesta, P., C. Lotti, G. Fanizza, A. Godini, R. Mariani, and M. Palasciano. 2002. Use of AFLP to Characterize Apulian Olive Varieties (*O Europaea* L.) Acta Hort. 586: 73-77.

Pojanagaroon, S. and C. Kaewrak. 2003. Varietal Selection of Collected Krachai-Dam (*Kaempferia parviflora* Wall.) Rhizomes by Using the Preference of Krachai-Dam Products' Distributors and Sellers. p. 401-407. In: Proceedings of the International Conference on Biodiversity and Bioactive compounds, 17-19 July 2003, PEACH, Pattaya, 561p.

Sanders, J.A., M.J. Pedroni, L.D.J. Penrose, and A.J. Fist. 2001. AFLP Analysis of Opium Poppy. Crop Sci. 41: 1596-1601.

Sensi, E., R. Vignani, M. Scali., E. Masi, and M. Cresti. 2003. Sci. Hortic. 97: 379-388.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique or DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23: 4407-4414.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalshi, and S.V. Tingey. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

Yapwattanaphun, C., S. Kanzaki, K. Yonemori, and S. Subhadrabandhu. 2003. Genetic Variations Among Mangosteens (Garcinia mangostana L.) Revealed by AFLP Analysis. Thai. J. Agri. Sci. 36(3): 329-338.