



การศึกษาเชิงโมเลกุลของว่านเปราะต้น ชนิดที่พบบริเวณลุ่มแม่น้ำโขงของไทยและลาว

เอกภูมิ ชัยยุตต์*

สุชาดา สุขทรงง์†

ชยันต์ พิเชียรสุนทร*‡

บทคัดย่อ

ว่านเปราะต้น (*Caulokaempferia*) เป็นพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) สกุลหนึ่ง. บางชนิด (species) เป็นสมุนไพรที่ใช้ในตำรายาพื้นบ้านของพระป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของราชอาณาจักรไทยและภาคกลางของประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว. การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ส่วน ITS1-ITS2 สำหรับเป็นลักษณะประกอบนอกเหนือจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อใช้ยืนยันความแตกต่างระหว่างว่านเปราะต้น ๕ ชนิดที่พบกระจายพันธุ์บริเวณลุ่มแม่น้ำโขงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของราชอาณาจักรไทย และบริเวณภาคกลางของประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว อันได้แก่ ว่านเปราะต้นกุหลาบ (C. bracteata K. Larsen & S.S. Larsen), ว่านเปราะต้นจี้รวงส์ (C. jirawongsei Picheans & Mookamul), ว่านเปราะต้นกุหลาบ (C. phulangkaensis Picheans.), ว่านเปราะต้นกุหลาบ (C. phutokensis Picheans.) และว่านเปราะต้นกุหลาบ (C. phuwoensis Picheans. & Koonterm). การศึกษาพบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เมื่อวิเคราะห์และสร้างเป็นสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogenetic tree) แล้ว พืชทั้ง ๕ ชนิดจัดอยู่ในกิ่ง (clade) เดียวกัน แสดงความใกล้ชิดกันในการวิวัฒนาการชาติพันธุ์ และสนับสนุนข้อมูลทางสัณฐานวิทยาว่าว่านเปราะต้นทั้ง ๕ ชนิดนี้ เป็นพืชต่างชนิดกันด้วยความเชื่อมั่นในระดับสูง (ค่า bootstrap อยู่ระหว่างร้อยละ ๘๗-๑๐๐) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลลักษณะสัณฐานและชีวภูมิศาสตร์ของว่านเปราะต้นทั้ง ๕ ชนิด.

คำสำคัญ : การศึกษาเชิงโมเลกุล, ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ, ส่วน ITS1-ITS2, พืชสกุลว่านเปราะต้น, บริเวณลุ่มแม่น้ำโขง ประเทศไทยและลาว

ภูมิหลังและเหตุผล

พืชสกุลว่านเปราะต้น (*Caulokaempferia* K. Larsen) เป็นพืชในวงศ์ขิง (Zingiberaceae) สกุลหนึ่ง เป็นพืชล้มลุกอายุ

หลายปี ต้นมีกลิ่น มีเหง้า, ลำต้นเหนือดินเป็นลำต้นเทียมที่เกิดจากการงอกของเหง้า, โครงสร้างของดอกมีวิวัฒนาการสูง^๑. พืชสกุลนี้หลายชนิดเป็นพืชสมุนไพรสำคัญในตำรายาพื้นบ้านของพระป่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย^๒.

พืชสกุลว่านเปราะต้นนี้พบในประเทศไทย ๑๘ ชนิด^๓ เป็นกลุ่มดอกเหลือง ๑๕ ชนิด ได้แก่ C. amplexicaulis Suksathan^๔, C. appendiculata K. Larsen & Triboun^๕, C. jirawongsei Picheans. & Mookamul^๖, C. khao-maenensis Picheans. & Mookamul^๗, C. kuapii K.

* หน่วยวิจัยเภสัชพฤกษศาสตร์และเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

† ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

‡ สำนักวิทยาศาสตร์ ราชบัณฑิตยสถาน กรุงเทพมหานคร

Larsen^๙, *C. larsenii* Suksathan & Triboun^๙, *C. limmiana* Mokkamul & Picheans.^{๑๐}, *C. pedemontana* Triboun & K. Larsen^๙, *C. phulangkaensis* Picheans.^{๑๑}, *C. phuluangensis* Picheans. & Mokkamul^๖, *C. phutokensis* Picheans. ^{๑๑}, *C. phuwoaensis* Picheans. & Koonterm^{๑๑}, *C. saksuwaniae* K. Larsen^{๑๒}, *C. satunensis* Picheans.^{๑๓}, *C. saxicola* K. Larsen^๙, และ กลุ่มดอกสีม่วง-สีขาว ๓ ชนิด ได้แก่ *Caulokaempferia alba* K. Larsen & R.M. Smith^{๑๒}, *C. thailandica* K. Larsen^{๑๓} และ *C. violacea* K. Larsen & Triboun^๙.

พืชสกุลนี้พบในประเทศอื่น อีก ๙ ชนิด ได้แก่ *C. coenobialis* (Hance) K. Larsen (มณฑลกว๋างต้ง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน)^{๙,๑๔}, *C. secundra* (Wall.) K. Larsen (รัฐสิกขิมและรัฐอัสมัม ประเทศสาธารณรัฐอินเดีย)^๙, *C. linearis* (Wall.) K. Larsen (รัฐอัสมัม ประเทศสาธารณรัฐอินเดีย)^๙, *C. sikkimensis* (King) K. Larsen (รัฐสิกขิม ประเทศสาธารณรัฐอินเดีย และประเทศภูฏาน)^๙, *C. petelotii* K. Larsen (ประเทศสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม)^๙, *C. bracteata* K. Larsen & S.S. Larsen (แขวงจำปาสัก ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว)^๕, *C. burtii* K. Larsen & Jenjitt. (แขวงจำปาสัก ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว)^{๑๕}, *C. laotica* Picheans. & Mokkamul (แขวงจำปาสัก ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว)^{๑๖} และ *C. bolavenensis* Picheans. & Koonterm^{๑๗}.

ปัจจุบันพืชสกุลนี้จึงมีรายงานรวมทั้งหมด ๒๗ ชนิด ซึ่งเมื่อพิจารณาจากการกระจายพันธุ์ของพืชสกุลนี้ จะเห็นว่าศูนย์กลางการกระจายพันธุ์ของพืชสกุลนี้อยู่ในประเทศไทย.

อย่างไรก็ตาม เมื่อ พ.ศ. ๒๕๕๑ ชยันต์ พิเชียรสุนทร และคณะ เสนอให้แยกกลุ่มดอกสีขาวถึงสีม่วง ออกเป็นพืชสกุลใหม่ คือสกุลว่านเปราะภู (*Jirawongsea* Picheans.)^{๑๘} และคงกลุ่มดอกสีเหลืองทั้งหมดไว้ในสกุลว่านเปราะต้น (*Caulokaempferia* K. Larsen). ทั้งนี้โดยอาศัยข้อมูลจากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและการศึกษาเชิงโมเลกุล^{๑๙}.

การศึกษาเชิงโมเลกุลเพื่อจำแนกชนิดพืชเป็นการศึกษาอนุกรมวิธานประยุกต์ซึ่งอาจศึกษาได้จากดีเอ็นเอในนิวเคลียส, คลอโรพลาสต์ หรือไมโทคอนเดรีย โดยอาจใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เป็นลักษณะหนึ่งในการจำแนกชนิดพืชได้. การ

ศึกษาเชิงโมเลกุลนี้ใช้ตัวอย่างพืชในปริมาณน้อย อาจใช้เพียงส่วนหนึ่งส่วนใดก็ได้ เช่น ใบ ยอดอ่อน เมล็ด. นอกจากนั้น ตัวอย่างพืชยังเก็บไว้สำหรับตรวจสอบได้เป็นเวลานาน และสามารถนำมาศึกษาเมื่อใดก็ได้.

พืชสกุลว่านเปราะต้นที่พบในประเทศไทย มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก. ลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดได้แก่ รูปและขนาดของลิ่มใบ, จำนวนใบประดับต่อช่อดอก, จำนวนดอกต่อใบประดับ เป็นต้น. โครงสร้างดอก เช่น กลีบข้าง (staminode), กลีบปาก (labellum), รยางค์อับเรณู (anther crest) อาจคล้ายคลึงกันมาก จนอาจยากสำหรับใช้จำแนกชนิดในกลุ่มที่คล้ายคลึงกันมาก ซึ่งการศึกษาเชิงโมเลกุลอาจให้ลักษณะที่ใช้ยืนยันการจำแนกชนิดโดยอาศัยข้อมูลเชิงสัณฐานวิทยา.

รายงานนี้เสนอผลการศึกษาเชิงโมเลกุลของพืชสกุลว่านเปราะต้นที่มีรูปสัณฐานใกล้เคียงกัน ๕ ชนิด ซึ่งพบกระจายในบริเวณลุ่มแม่น้ำโขงที่จังหวัดหนองคายและนครพนมของราชอาณาจักรไทย และแขวงบริคำไซ ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ซึ่งอยู่คนละฝั่งของแม่น้ำโขง. ชนิดที่พบได้แก่ ว่านเปราะต้นภูเขาควาย (*Caulokaempferia bracteata* K. Larsen & S.S. Larsen), ว่านเปราะต้นจี้รวงส์ (*C. jirawongsei* Picheans. & Mokkamul), ว่านเปราะต้นภูลังกา (*C. phulangkaensis* Picheans.), ว่านเปราะต้นภูทอก (*C. phutokensis* Picheans.) และว่านเปราะต้นภูว้าว (*C. phuwoaensis* Picheans. & Koonterm) โดยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อยืนยันว่า ว่านเปราะต้นทั้ง ๕ ชนิด เป็นพืชต่างชนิดกัน โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ส่วน internal transcribed spacer (ITS) ช่วง ITS1 และ ITS2.

ระเบียบวิธีศึกษา

พืชตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างว่านเปราะต้นทั้ง ๕ ชนิด จากส่วนยอดอ่อน ก่อนใบคล้อออก, จากตัวอย่างพืชในบริเวณเดียวกับที่เก็บตัวอย่างต้นแบบ หรือบริเวณที่คาดว่าจะจะเป็นบริเวณที่เก็บตัวอย่างต้นแบบ ดังแสดงในตารางที่ ๑ โดยใช้พืชชนิดที่ ๖ เป็นตัวอย่างเปรียบเทียบ เนื่องจากเป็นตัวอย่างที่มีการศึกษา

ตารางที่ ๑ ตัวอย่างพืชที่ใช้ศึกษาและสถานที่เก็บตัวอย่าง

พืชตัวอย่าง	สถานที่
<i>C. bracteata</i> K. Larsen & S. S. Larsen	ภูม อูทยานแห่งชาติภูเขาควาย แขวงบอลิคำไซ ประเทศลาว*
<i>C. jirawongsei</i> Pichans. & Mokkamul	ภูว ุเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูว จังหวัดหนองคาย
<i>C. phulangkaensis</i> Pichans.	น้ำตกตาดขาม อูทยานแห่งชาติภูลังกา จังหวัดนครพนม
<i>C. phutokensis</i> Pichans.	ภูทอกน้อย จังหวัดหนองคาย
<i>C. phuwoaensis</i> Pichans. & Koonterm	น้ำตกเจ็ดสี เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูว จังหวัดหนองคาย
<i>C. saxicola</i> K. Larsen	เขาเขียว อูทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา

*ตัวอย่างต้นแบบได้จากตลาดนัดจตุจักรในกรุงเทพมหานคร สถานที่ที่ระบุเป็นสถานที่จากการสำรวจของคณะผู้วิจัย

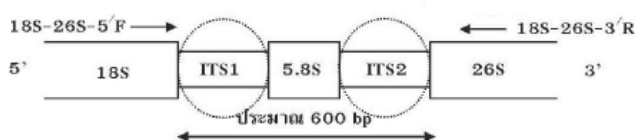
แล้วและมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอส่วน ITS1-ITS2 ในฐานข้อมูลสากล (GenBank).

การศึกษาลักษณะเชิงโมเลกุล

การศึกษาเชิงโมเลกุลนี้ทำโดยสกัดและวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ในส่วน internal transcribed spacer (ITS) ช่วง ITS1 กับ ITS2 ซึ่งประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ประมาณ ๖๐๐ คู่เบส^{๑๕-๒๑} (รูปที่ ๑).

การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำโดยนำตัวอย่างพืชแห้งบดด้วยไนโตรเจนเหลว. จากนั้นจึงไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด DNeasy Kit[®] (Qiagen, Germany), ทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยชุดสกัด GeneClean II Kit[®] แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส. ไพร์เมอร์ที่ใช้คือ 18S-26S-5' F และ 18S-26S-3' R โดยไพร์เมอร์ทั้งสองมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังรูปที่ ๒.

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเริ่มจากขั้นตอน pre-denaturation โดยใช้อุณหภูมิ ๙๕ องศาเซลเซียส นาน ๓ นาที. ขั้นตอน denaturation ใช้อุณหภูมิ ๙๕ องศาเซลเซียส นาน ๔๐ วินาที. ขั้นตอน annealing ใช้อุณหภูมิ ๕๑ องศาเซลเซียส นาน ๔๐ วินาที. ขั้นตอน polymerization ใช้อุณหภูมิ ๗๒ องศาเซลเซียส นาน ๑ นาที จำนวนทั้งหมด ๒๔ รอบ และขั้นตอน polymerization สุดท้าย ใช้อุณหภูมิ ๗๒ องศาเซลเซียส นาน ๕ นาที. ตรวจผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมด้วย etidium bromide. จากนั้นส่งผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอ ด้วยชุด QIAquick PCR Purifi-



รูปที่ ๑ ตำแหน่ง ITS1, 5.8S และ ITS2 บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

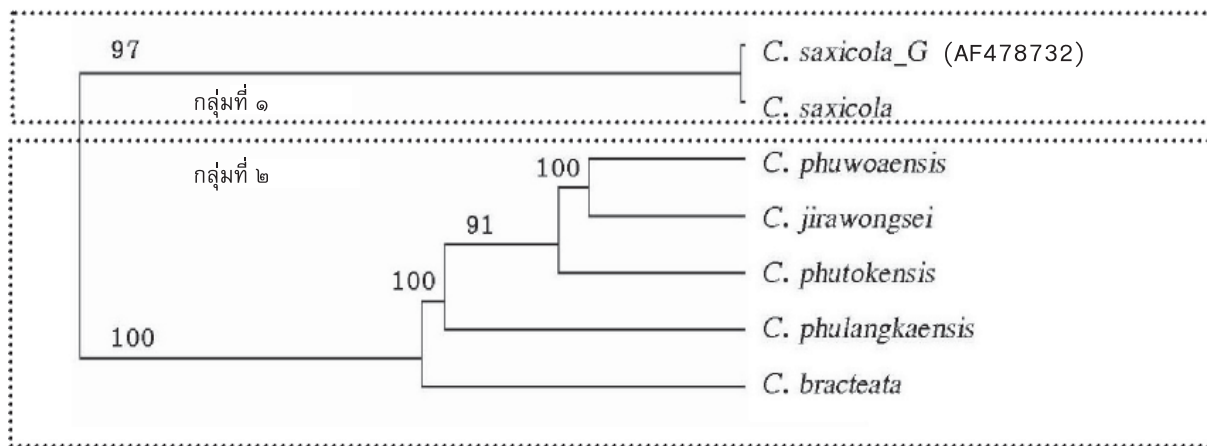
18S-26S-5' F 5' - GTAGGTGAACCTGCAAAGGATCA -3'
18S-26S-3' R 5' - CCATGCTTAACTCAGCGGGT -3'

รูปที่ ๒ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

cation Kit[®] โดยบริษัทไซบีเลส (ประเทศไทย) [Cybeles (E-mail: sequence@cybeles.de)].

การวิเคราะห์ผล

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสกุลว่านเปราะต้นทั้ง ๕ ชนิด กับเปราะหิน (*C. saxicola* K. Larsen) ซึ่งมีรายงานอยู่ใน Genbank (Accession Number AF478732) ด้วยโปรแกรม BioEdit[®], คำนวณด้วยโปรแกรม ClustalW Example Application[®]. นำผลที่ได้มาจัดทำเป็นสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์และสรุปผลด้วยโปรแกรม PAUP*4.0 beta win โดยตั้งค่า bootstrap เท่ากับ ๑,๐๐๐ ครั้งของการสุ่มซ้ำ ซึ่งค่า bootstrap แสดงถึงความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ว่าน่าจะเป็นจริงบนสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ที่ถูกต้อง



รูปที่ ๓ สายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของวั้นเปราะต้น ๕ ชนิด คือ *C. bracteata* K. Larsen & S.S. Larsen, *C. jirawongsei* Picheans. & Mookamul, *C. phulangkaensis* Picheans., *C. phutokensis* Picheans. และ *C. phuwoaensis* Picheans. & Koonterm โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วง ITS1, 5.8S และ ITS2 เปรียบเทียบกับเปราะหิน (*C. saxicola* K. Larsen) [*C. saxicola_G* เป็นข้อมูลที่ได้จาก GenBank (Accession Number AF478732)] [Length = 96 ค่า consistency index (CI) = 0.9479 ค่า retention index (RI) = 0.9123 และค่า rescaled consistency index (RC) = 0.8648) โดยตัวเลขที่แสดงอยู่ด้านบนสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ เป็นตัวเลขแสดงความเชื่อมั่น (bootstrap)].

โดยค่า bootstrap อยู่ระหว่างร้อยละ ๕๐-๗๐ แสดงความเชื่อมั่นในระดับต่ำ, ค่า bootstrap ระหว่างร้อยละ ๗๑-๘๔ แสดงความเชื่อมั่นในระดับปานกลาง, ค่า bootstrap ระหว่างร้อยละ ๘๕-๑๐๐ แสดงความเชื่อมั่นในระดับสูง. ค่าสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้แก่ ค่า consistency index (CI) ซึ่งเป็นค่าที่บอกระดับการเข้ากันได้ของข้อมูลสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ ค่า retention index (RI) เป็นอัตราส่วนของลักษณะที่พัฒนาไปที่มีอยู่ร่วมกัน (synapomorphy) ที่พบบนแผนภูมิที่สามารถจะยอมรับได้ว่าเป็น synapomorphy ที่แท้จริง โดยค่า CI และ RI ที่ดีควรมีค่าเท่ากับ ๑ ค่า rescaled consistency index (RC) จะเป็นผลหารระหว่างค่า RI ด้วยค่า CI ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้จะแสดงให้เห็นถึงผลกระทบจากความแตกต่างระหว่างค่า g (จำนวนสูงสุดของลักษณะที่สามารถจะเปลี่ยนแปลงไปได้บนสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ที่กำหนดให้) ของแต่ละลักษณะที่ศึกษา.

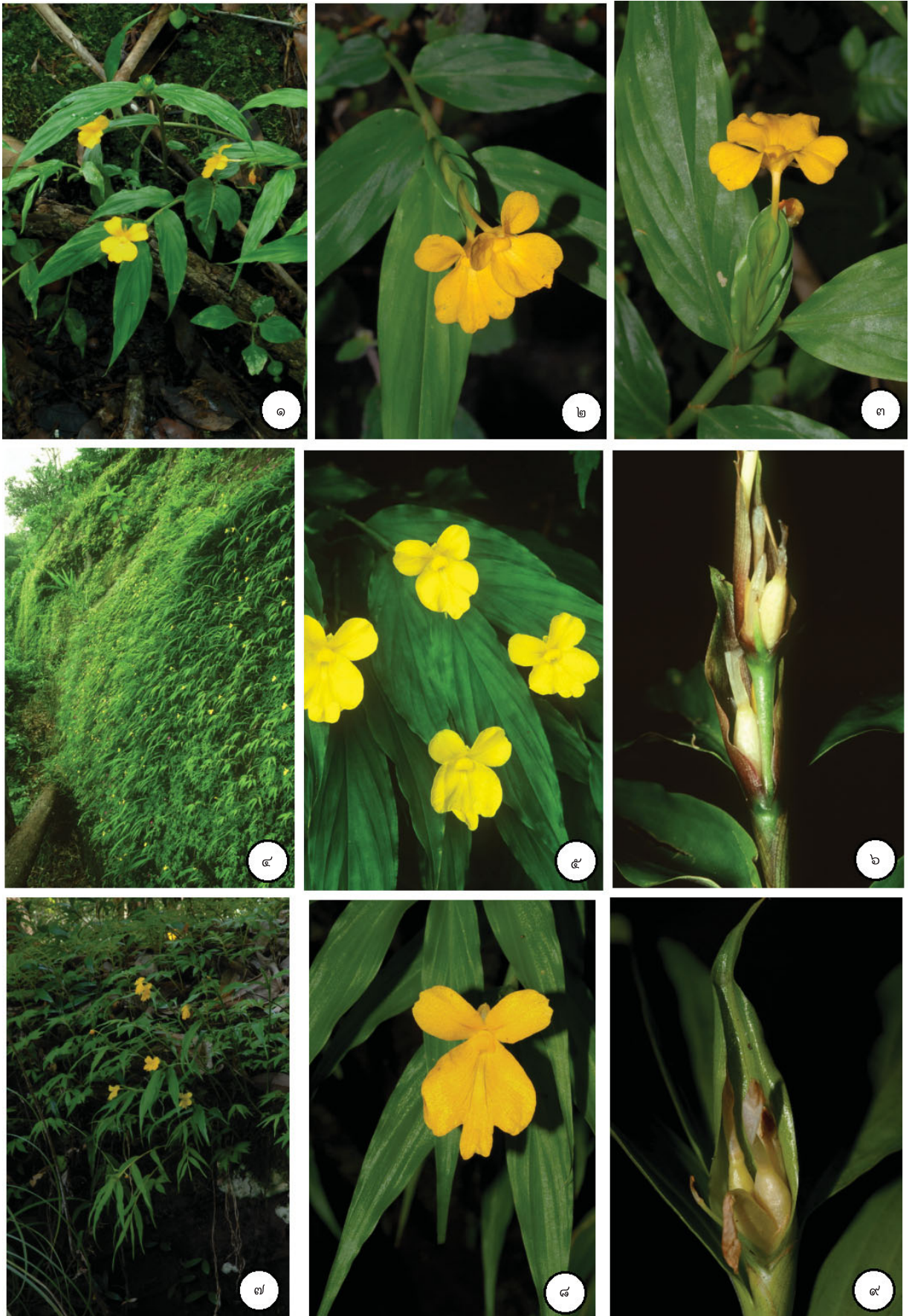
ผลการศึกษา

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ส่วน ITS1, 5.8S และ ITS2 ของตัวอย่างทั้ง ๖ ชนิด มีความยาวอยู่ในช่วง ๑-๕๘๕ คาร์เรเตอร์ และนำข้อมูลที่ได้มาจัดทำสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์โดยตั้งค่า bootstrap replicates = ๑๐๐๐

ได้ผลดังที่แสดงในรูปที่ ๓.

สายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ที่ได้ (รูปที่ ๓) แบ่งวั้นเปราะต้นทั้ง ๖ ชนิดมีความแตกต่างกันในเชิงวิวัฒนาการชาติพันธุ์ในระดับความเชื่อมั่นสูง และแบ่งวั้นเปราะต้นทั้ง ๖ ชนิดออกเป็น ๒ กลุ่มได้ชัดเจน โดยกลุ่มที่ ๑ มีเปราะหิน (*C. saxicola*) ชนิดเดียว ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณที่เก็บตัวอย่างต้นแบบ (*C. saxicola* ในรูปที่ ๓) กับที่รายงานไว้ใน GenBank (*C. saxicola_G* ในรูปที่ ๓, Accession Number AF478732) นั้นเหมือนกัน. ส่วนกลุ่มที่ ๒ มีวั้นเปราะต้น ๕ ชนิดที่พบกระจายอยู่ในบริเวณลุ่มแม่น้ำโขงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยและภาคกลางของลาว ซึ่งได้แก่ วั้นเปราะต้นภูเขาคาย (*C. bracteata*), วั้นเปราะต้นจี้รวงส์ (*C. jirawongsei*), วั้นเปราะต้นภูลังกา (*C. phulangkaensis*), วั้นเปราะต้นภูทอก (*C. phutokensis*) และวั้นเปราะต้นภูวาว (*C. phuwoaensis*). แต่ละชนิดแยกจากกันอย่างชัดเจนด้วยค่าความเชื่อมั่นในระดับสูง (ค่า bootstrap ร้อยละ ๙๗-๑๐๐) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลลักษณะสัณฐานและชีวภูมิศาสตร์ของวั้นเปราะต้นทั้ง ๖ ชนิด.

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ในช่วง ITS1, 5.8S และ ITS2 ของวั้นเปราะต้นทั้ง ๖ ชนิด



รูปที่ ๔ ๑-๓ ว่านเปราะตันภูเขาควาย (*C. bracteata* K. Larsen & S.S. Larsen), ๔-๖ ว่านเปราะตันจี้รวงส์ (*C. jirawongsei* Pichean. & Mokkamul) และ ๗-๙ ว่านเปราะตันภูถ้ำกา (*C. phulangkaensis* Picheans.)



๑๐



๑๑



๑๒



๑๓



๑๔



๑๕



๑๖



๑๗



๑๘

รูปที่ ๔ (ต่อ) ๑๐-๑๒ ว่านเปราะตันภูทอก (*C. phutokensis* Picheans.), ๑๓-๑๕ ว่านเปราะตันภูวัว (*C. phuwoaensis* Picheans. & Koonterm), ๑๖-๑๘ เปราะหิน (*C. saxicola* K. Larsen)

ตารางที่ ๒ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ในช่วง ITS1, 5.8S และ ITS2 ของว่านเปราะตันที่พบกระจายพันธุ์บริเวณลุ่มแม่น้ำโขงทั้ง ๕ ชนิด คือ *C. bracteata*, *C. jirawongsei*, *C. phulangkaensis*, *C. phutokensis* และ *C. phuwoaensis* เปรียบเทียบกับว่านเปราะตัน *C. saxicola*

																		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Position	1	1	2	3	4	4	5	5	5	6	7	7	7	8	8	8	8	0	1	2	2	3	3	4	4	5	5	5	5	6
	0	1	8	9	5	9	2	6	9	5	6	7	9	2	3	5	9	1	4	1	2	2	6	1	4	3	4	5	7	0
<i>C. saxicola</i>	-	-	G	T	C	C	C	C	T	A	C	G	T	A	C	G	C	G	A	T	C	T	C	A	G	G	A	G	-	T
<i>C. bracteata</i>	G	A	*	*	*	*	*	*	G	*	A	A	A	T	A	C	*	C	*	*	*	G	*	G	A	A	C	T	T	A
<i>C. jirawongset</i>	G	A	T	*	*	*	*	*	*	C	A	A	A	G	A	C	A	C	*	*	*	G	*	G	T	*	*	*	C	A
<i>C. phuwoaensis</i>	G	A	T	C	*	*	*	*	*	*	A	A	A	G	A	C	*	C	*	*	*	G	T	G	T	*	*	*	C	A
<i>C. phulangkaensis</i>	G	A	*	*	*	T	T	T	*	*	*	A	A	G	A	C	*	C	G	-	-	G	*	G	A	*	*	*	C	A
<i>C. phutokensis</i>	G	A	T	*	T	*	*	T	*	*	A	A	A	G	A	C	*	C	*	*	*	G	*	G	T	*	*	*	C	A

Position	1	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	
	6	7	7	7	7	7	8	8	0	1	1	1	2	2	4	5	6	6	6	6	7	7	7	8	8	8	8	0	0	3	3
	1	3	4	5	6	9	1	3	4	4	8	9	7	8	5	2	1	3	6	7	4	5	8	0	3	4	7	8	0	4	
<i>C. saxicola</i>	A	T	C	C	T	G	A	C	C	G	C	C	C	G	G	G	G	G	C	A	T	G	G	C	G	T	T	C	C	T	
<i>C. bracteata</i>	G	A	T	T	*	*	*	*	T	*	T	*	T	*	T	T	A	T	*	G	*	*	T	G	*	C	C	T	T	C	
<i>C. jirawongset</i>	G	*	T	*	C	A	*	*	T	A	T	T	T	T	T	*	*	T	*	G	*	T	T	*	T	C	C	T	T	C	
<i>C. phuwoaensis</i>	G	*	T	*	*	A	T	A	T	A	T	*	T	T	T	*	*	T	*	G	*	*	T	*	*	C	C	T	T	C	
<i>C. phulangkaensis</i>	G	*	T	*	*	*	*	*	T	*	T	*	T	*	T	*	*	T	T	G	*	A	T	*	*	C	C	T	T	C	
<i>C. phutokensis</i>	G	*	T	*	*	A	*	*	T	A	T	*	T	T	T	*	*	T	*	G	C	*	T	*	*	C	C	T	T	C	

Position	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	3	3	4	4	4	4	4	5	5	6	7	8	8	9	9	0	0	1	2	3	3	3	3	4	4	4	4	4	6	
	5	9	0	2	4	5	6	1	2	1	2	5	6	3	9	0	9	6	1	2	3	8	9	0	3	6	8	1		
<i>C. saxicola</i>	T	G	G	A	G	-	-	G	G	T	C	C	T	C	C	G	C	T	A	C	T	T	G	T	A	C	G	T		
<i>C. bracteata</i>	A	A	*	*	T	G	T	*	*	G	T	T	*	T	G	A	G	C	C	T	G	*	*	G	C	T	*	C		
<i>C. jirawongsei</i>	A	A	*	*	T	G	T	*	*	G	T	T	*	T	G	*	G	*	C	T	G	*	*	G	C	*	*	C		
<i>C. phuwoaensis</i>	A	A	*	*	T	G	T	*	*	G	T	T	*	T	G	*	G	*	C	T	G	C	*	G	C	*	*	C		
<i>C. phulangkaensis</i>	C	A	*	*	T	G	T	*	*	G	T	A	A	T	G	*	G	*	C	A	G	*	C	G	C	T	*	C		
<i>C. phutokensis</i>	A	A	T	C	*	G	T	A	A	G	T	T	*	T	G	*	G	*	C	T	G	*	*	G	C	*	A	C		

เครื่องหมายติดลบ (-) แสดงตำแหน่งที่เป็นช่องว่างในการจัดเรียงเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ เครื่องหมายดอกจันทน์ (*) เป็นเครื่องหมายที่แสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับ *C. saxicola* K. Larsen. การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นเริ่มจากด้านปลาย 5' ของบริเวณ ITS1

มาเรียงเปรียบเทียบ จะพบความแตกต่างกันได้ถึง ๘๘ ตำแหน่งเมื่อเปรียบเทียบกับเปราะหิน *C. saxicola* K. Larsen ดังแสดงในตารางที่ ๒.

เมื่อพิจารณาถิ่นฐานวิทยาของว่านเปราะตันทั้ง ๒ กลุ่ม (รูปที่ ๔) พบว่าว่านเปราะตัน ๕ ชนิดในกลุ่มที่ ๒ มีใบประดับขนาดใหญ่, มีกลีบปากที่มีลักษณะเฉพาะ คือปลายมี ๓ พู และพูกกลางยื่นยาวออก โดยมีปลายที่เว้าตั้งแต่หยักต้นถึงลึกมาก. ว่านเปราะตันกลุ่มที่ ๒ นี้ทุกชนิดมีการกระจายอยู่ในบริเวณลุ่มแม่น้ำโขงทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของราชอาณาจักรไทยและภาคกลางของประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (อุทยานแห่งชาติภูเขาคาย แขวงบอลิคำไซ-แขวงเวียงจันทน์-เขตพิเศษไซสมบูน) โดยว่านเปราะตันกลุ่มนี้ทุกชนิดจัดเป็นกลุ่มที่มีการกระจายพันธุ์ใน

พื้นที่ที่อยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกัน.

ตารางที่ ๒ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ในช่วง ITS1, 5.8S และ ITS2 ของว่านเปราะตันที่พบกระจายพันธุ์บริเวณลุ่มแม่น้ำโขงทั้ง ๕ ชนิด คือ *C. bracteata*, *C. jirawongsei*, *C. phulangkaensis*, *C. phutokensis* และ *C. phuwoaensis* เปรียบเทียบกับเปราะหิน *C. saxicola*

สรุป

พืชสกุลว่านเปราะตัน ๕ ชนิดที่กระจายพันธุ์ในบริเวณลุ่มแม่น้ำโขงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยและภาคกลางของประเทศไทย ได้แก่ ว่านเปราะตันภูเขาคาย (*C.*

bracteata K. Larsen & S.S. Larsen), ว่านเปราะตันจี้รวงลี (*C. jirawongsei* Pichans. & Mookamul), ว่านเปราะตันญลิ่งกา (*C. phulangkaensis* Pichans.), ว่านเปราะตันญทอก (*C. phutokensis* Pichans.) และว่านเปราะตันญวู้ (*C. phuwoaensis* Pichans. & Koonterm) เป็นกลุ่มพืชสกุล ว่านเปราะตัน (*Caulokaempferia*) ที่มีลักษณะสัณฐานที่คล้ายคลึงกันนั้นมีความแตกต่างกันในลักษณะเชิงโมเลกุลในส่วนของดีเอ็นเอที่ศึกษาคือไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ในช่วง ITS1, 5.8S และ ITS2 มีความแตกต่างกันที่ความเชื่อมั่นระดับสูงเมื่อเทียบกับเปราะหิน (*C. saxicola* K. Larsen) ซึ่งอยู่ในกิ่งของสายวิวัฒนาการชาติพันธุ์ที่แตกต่างกัน แยกเป็นคนละกลุ่มกัน, ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานและชีวภูมิศาสตร์ของพืชทั้ง ๒ กลุ่ม.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาองค์ความรู้พื้นฐานทางพฤกษศาสตร์และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของว่านยาไทย” ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนภูมิปัญญาการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข. คณะผู้ช่วยวิจัย ได้แก่ นายจิรเดช มาเยอะ, นายเฉลิมโชค บุญจิตร, นายปิยะพงษ์ ยัพราษณ์, นางสาวพรพิมล วงศ์สุวรรณ, นางสาวกมลชนก ทศกิตติ, นายวิทยา การดี, นายสุกชัย คุณเต็ม และ นางสาวอัมภา คนชื่อ ซึ่งมีส่วนในการช่วยอำนวยความสะดวกประสานงาน หรือร่วมในคณะสำรวจ จนทำให้งานนี้สำเร็จลุล่วงได้. บัณฑิตวิทยาลัย และคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้ให้ทุนส่วนหนึ่งในช่วงการศึกษาระดับมหาบัณฑิตแก่ผู้วิจัยที่ ๑ ในหลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชภัณฑ์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เอกสารอ้างอิง

๑. ชยันต์ พิเชียรสุนทร. พืชวงศ์ขิงในประเทศไทย ตอนที่ ๒ : สกุลเปราะ. นิตยสารเอดวานซ์ไทยแลนด์จีโอกราฟฟิก ๒๕๔๕; ๕๓: ๑๕๓-๘๐.
๒. มุลนิธิพุทธสมุนไพร. ตำราว่านยาไทย. กรุงเทพฯ : บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง (มหาชน); ๒๕๕๑.
๓. Chaiyoot A. Molecular studies of the genus *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) in Thailand and Laos. Master's degree Thesis. The Graduate School, Khon Kaen University, Thailand, 2007.
๔. Larsen K, Suksathan P, Triboun P. Further studies in the genus *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) in Thailand with the description of two new species. Nord J Bot 2005;23:401-6.
๕. Larsen K. Three new species of *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from Thailand with a discussion of the generic diversity. Nord J Bot 2003;22:409-18.
๖. Pichansoonthon C, Mookamul P. Two new *Caulokaempferia* taxa (Zingiberaceae) from northeastern Thailand. Folia malaysiana 2004;5:69-80.
๗. Pichansoonthon C, Mookamul P. A new species of *Caulokaempferia* from southern Thailand. Folia malaysiana 2004;5:1-8.
๘. Larsen K. Studies on Zingiberaceae IV: *Caulokaempferia*, a new genus. Botanisk. Tidssk 1964; 60(3):165-179.
๙. Suksathan P, Triboun P. 2004. A new species of *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from Thailand. Edinb J Bot 2004;60:513-6.
๑๐. Mookamul P, Pichansoonthon C. A new species of *Caulokaempferia* taxa (Zingiberaceae) from northern Thailand. Folia malaysiana 2004; 5:187-194.
๑๑. Pichansoonthon C, Koonterm S. Three newspecies of the yellow-flowered *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from northeastern Thailand. Taiwania 2008;53:248-57.
๑๒. Pichansoonthon C, Mookamul P. Two new *Caulokaempferia* taxa (Zingiberaceae) from northeastern Thailand. Folia malaysiana 2004;5:69-80.
๑๓. Larsen K. Studies on Zingiberaceae VI. Botanisk Tidssk 1973;68:157-9.
๑๔. Pichansoonthon C, LIM CK, Sukrong S, Chaiyoot A. A new species of *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from southern Thailand. Folia malaysiana. 2007;8(2):53-60.
๑๕. Wu TL, Larsen K. Zingiberaceae. In: Wu ZY, Raven PH, editors. Flora of China. Beijing: Science Press; 2000. p. 24: 377.
๑๖. Larsen K, Jenjittikul T. A new species of *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from Laos. Edinb J Bot 2004;60:509-12.
๑๗. Pichansoonthon C, Mookamul P. A new species of *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from Southern Laos. Nat Hist Bull Siam Soc 2006;54: 75-80.
๑๘. Pichansoonthon C, Koonterm S, Chaiyoot A, Sukrong S, Homchuen S. A new species of *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from Laos, with further information on other species from Laos. Nat Hist Bull Siam Soc (in press).
๑๙. Pichansoonthon C, Chaiyoot A, Sukrong S. *Jirawongsea*, a new genus of the family Zingiberaceae. Folia malaysiana (in press).
๒๐. Kress WJ, Prince LM, Williams KJ. The phylogeny and a new classification of the Gingers (Zingiberaceae): Evidence from molecular data. Am. J. Bot. 2002;89:1682-96.
๒๑. Ngamriabsakul C, Newman MF, Cronk QCB. 2004. The phylogeny of tribe Zingibereae (Zingiberaceae) based on ITS (nrDNA) and *trnL-F* (cpDNA) sequences. Edinb J Bot 2004;60:483-507.
๒๒. ดวงกมล ทองอร่าม, วุฒิพงศ์ มหาคำ. การจำแนกพืชสกุล *Caulokaempferia* K. Larsen (วงศ์ขิง) โดยการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลทางชีววิทยาระดับโมเลกุล. วารสารวิจัย มข. ๒๕๔๘;๑๐:๕-๑๒.

Abstract**Molecular Study of the Genus *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) Distributed along the Mekong River of Northeastern Thailand and Central Laos****Akapoom Chaiyoot^{*}, Suchada Sukrong[†], Chayan Picheansoonthon^{*,‡}**^{*}*Pharmaceutical Botany and Pharmacognosy Research Unit, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand*[†]*Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Khet Phayathai, Bangkok 10330, Thailand*[‡]*Academy of Science, The Royal Institute of Thailand, Sanam Suea Pa, Sri Ayuthaya Rd., Khet Dusit 10300, Thailand*

Caulokaempferia is a genus of the ginger family (Zingiberaceae). Some taxa of this genus distributed along the Mekong River of northeastern Thailand and central Laos are used medicinally by forest monks. This study was aimed at demonstrating molecular information as a character, apart from morphological characters, to confirm species distinction between the five morphologically closely related *Caulokaempferia* taxa native to the Mekong River basin in northeastern Thailand and Laos: *C. bracteata* K. Larsen & S.S. Larsen, *C. jirawongsei* Picheans & Mookamul, *C. phulangkaensis* Picheans., *C. phutokensis* Picheans., and *C. phuwoaensis* Picheans. & Koonterm. The phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of the ITS1-ITS2 region of the ribosomal DNA from all five species was constructed, with *C. saxicola* K. larsen (AF478732) as an out group, and their corresponding base sequences were compared. The result clearly indicates that these five species are closely related, but distinct. This molecular information complies with the morphological and biogeographical characters of these five species.

Key words: molecular study, ribosomal DNA, ITS1-ITS2 region, genus *Caulokaempferia*, Mekong River in Thailand and Laos