

การจัดจำแนกพืชสกุล *Caulokaempferia* K. Larsen (วงศ์ขิง) โดยการ วิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลทางมีววิทยาระดับโมเลกุล

**Classification of the genus *Caulokaempferia* K. Larsen (Zingiberaceae)
based on the molecular phylogenetic analysis**

ดวงกมล ทองอราม (Duangkamol Thong-a-ram)¹

วุฒิพงศ์ มหาคำ (Wuttipong Mahakham)¹

คทาวุธ นามดี (Katawut Namdee)²

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในวงศ์ขอย Zingiberoideae จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในไรโบโซมอลดีเอ็นเอ บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS-1, 5.8S และ ITS-2) ด้วยวิธี Maximum Parsimony โดยใช้โปรแกรม PAUP* 4.0b10 เพื่อใช้ระบุตำแหน่งทางอนุกรมวิธานที่แน่นอนของพืชในสกุล *Caulokaempferia* จัดพืชสกุล *Caulokaempferia* เป็น polyphyletic group ที่มี *C. violacea* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Boesenbergia rotunda* ในขณะที่ *C. appendiculata*, *C. coenobialis*, *C. saxicola* และ *C. sp.* อยู่ในเคลตเดียวกันของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้ การเพิ่ม *C. appendiculata* เข้าไปกลุ่มแทกชาที่วิเคราะห์ในการวิจัยนี้ไม่สามารถจัด *Caulokaempferia* เข้าไว้ในผู้ใดได้ แต่ผลการศึกษาแสดงถึงความเป็นไปได้ที่กลุ่มของ *Caulokaempferia* ชนิดที่มีดอกสีเหลืองอาจจัดเป็นผู้ใดได้

Abstract

The phylogenetic analysis of the subfamily Zingiberoideae was revised, using nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS-1, 5.8S, and ITS-2) sequences in attempt to clarify the taxonomic position of the genus *Caulokaempferia*. The Maximum Parsimony analysis conducted using PAUP* 4.0b10 resulted in *Caulokaempferia* being polyphyletic group with *C. violacea* allied to *Boesenbergia rotunda*, whereas *C. appendiculata*, *C. coenobialis*, *C. saxicola* and *C. sp.* are placed within the same clade. The addition of *C. appendiculata* failed to resolve the placement of the genus into any tribe. It interestingly guides to the possibility of placing the yellow-flowered group of species to a new tribe.

คำสำคัญ: *Caulokaempferia* พืชวงศ์ขิง สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ Internal transcribed spacer

Keywords: *Caulokaempferia*, Zingiberaceae, phylogeny, internal transcribed spacer

¹อาจารย์ สุนีย์จัยอนุกรรณวิจานประยุกต์ และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

²นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเป็นข้อมูลที่มีความสำคัญยิ่งในการศึกษาเชิงวิทยาอย่างเป็นระบบ ทั้งในการศึกษาเชิงวิทยาพื้นฐานและเชิงวิทยาประยุกต์ ตัวอย่างเช่น สิ่งมีชีวิตที่จัดอยู่ในตระแห่งทางอนุกรมวิธานเดียวกันต้องมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันมากกว่าสิ่งมีชีวิตที่ถูกจัดอยู่คุณลักษณะ และการทำงานหน้าที่ของโปรดีตินจากลำดับต่อเนื่องของยีนนั้นจะกระทำได้อย่างถูกต้องมากยิ่งขึ้นหากว่าเป็นการทำงานจากข้อมูลเกี่ยวกับหน้าที่ของยีนที่ส่วนใหญ่ในสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาซึ่งได้มีการรายงานไว้แล้วมากกว่าที่จะพิจารณาจากความคล้ายคลึงของลำดับดีเอ็นเอในยีนนั้นเพียงอย่างเดียว และเนื่องจากลักษณะของสิ่งมีชีวิตเป็นผลจากการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ การศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลี-โอลайдของดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ จึงเป็นข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์หาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างสิ่งมีชีวิตกลุ่มที่ศึกษาได้

การใช้ข้อมูลลำดับนิวคลี-โอลайдในไรโบโนโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA (rDNA)) บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) และ plastid *matK* ในการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและใช้ข้อมูลดังกล่าวในการจำแนกพืชในวงศ์ชิงทำให้จำแนกพืชช่วงคืบได้เป็น 4 วงศ์ย่อย (Kress et al., 2002) ได้แก่ วงศ์ย่อย *Siphonochiloideae* มี 1 เผ่า *Siphonochileae* และ 1 สกุล *Siphonochilus* วงศ์ย่อย *Tamijioideae* มี 1 เผ่า *Tamijiaeae* และ 1 สกุล *Tamija* วงศ์ย่อย *Alpinioideae* มีสมาชิก 2 เผ่า คือเผ่า *Alpineae* มี 16 สกุล และเผ่า *Riedelieae* มี 4 สกุล ซึ่งสกุล *Siliquamomum* มีตำแหน่งทางอนุกรมวิธานที่ไม่แน่นอน (*incertae sedis*) และวงศ์ย่อย *Zingiberoideae* มีสมาชิก 2 เผ่า ได้แก่เผ่า *Zingibereae* มี 25 สกุล และเผ่า *Globbeae* มี 4 สกุล วงศ์ย่อย *Zingiberoideae* มีพืชสกุล *Caulokaempferia* ที่มีตำแหน่งทางอนุกรมวิธานที่

ไม่แน่นอน ไม่สามารถจัดได้ในเผ่า *Zingibereae* หรือ *Globbeae* ได้ พืชสกุล *Caulokaempferia* (ประจำภูมิภาค) เป็นพืชสกุลที่มีการจำแนกออกมาจากสกุล *Kaempferia* (Larsen, 1964) มีการแพร่กระจายในบริเวณทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Larsen and Jenjittikul, 2004) ในประเทศไทยมีพืชสกุล *Caulokaempferia* ทั้งหมด 11 ชนิด (Larsen, 2002; Larsen and Jenjittikul, 2004; Picheansoonthon and Mokkamul, 2004; Sukkathan and Triboun, 2004) ในบริเวณเทือกเขาทางตอนเหนือ และที่ราบสูงโคราช งานวิจัยของ Kress et al. (2002) ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากพืชสกุล *Caulokaempferia* 3 ชนิด ซึ่งเป็นชนิดที่มีดอกสีเหลืองเท่านั้น ทั้ง 3 ชนิดจัดเป็น monophyletic group กันในสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้ Ngamriabsakul et al. (2004) วิเคราะห์ลำดับนิวคลี-โอลайдจากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ ได้แก่ *trnL-F* ร่วมกับลำดับนิวคลี-โอลайдของ rDNA ITS ในการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุล *Caulokaempferia* โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจากพืช *C. violacea* ซึ่งเป็นชนิดที่มีดอกสีม่วง พบว่าพืชสกุลนี้ มีสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับสกุล *Boesenbergia* ซึ่งเป็นความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการที่ไม่สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ของ Kress et al. (2002)

การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลี-โอลайдจะให้ผลที่น่าเชื่อถือมากขึ้นหากมีจำนวนแทกชา (taxa) ที่นำมาวิเคราะห์จำนวนมาก เนื่องจากการมีตำแหน่งที่ให้ข้อมูล (informative characters) ในผลการวิเคราะห์มากขึ้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในวงศ์ย่อย *Zingiberoideae* และใช้ผลการวิเคราะห์ในการระบุตำแหน่งทางอนุกรมวิธานของพืชในสกุล *Caulokaempferia* โดยงานวิจัยนี้ใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลี-โอลайдบริเวณ rDNA ITS จากพืชสกุล *Caulokaempferia* 5 ชนิด เป็นชนิดที่มีดอกสีม่วง 1 ชนิด และชนิดที่มีดอกสีเหลือง 4 ชนิด

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างพืชสกุล *Caulokaemferia* จากบริเวณต่างๆ ที่มีรายงานการสำรวจพบจำนวน 9 ชนิด ตัวอย่างที่ใช้เคราะห์ในรายงานวิจัยนี้ได้แก่ *C. appendiculata* เก็บตัวอย่างพืชสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ไว้ที่อุณหภูมิ -70°C จนกว่าจะใช้งาน

2. ลำดับ rDNA ITS ที่ใช้ร่วมเคราะห์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ rDNA ITS ของพืชในวงศ์ย่อย Zingiberoideae 47 แทกชา (45 ชนิด) และพืชในสกุล *Caulokaemferia* 4 แทกชา (4 ชนิด) ที่ใช้ในการวิเคราะห์เพื่อหาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเป็นข้อมูลจากฐานข้อมูล GenBank มี accession number ดังแสดงในตารางที่ 1

3. การเลือก outgroup

ใช้พืชในสกุล *Siphonochilus* เป็น outgroup เนื่องจากการคงไว้ของนิวคลีโอไทด์ 12 ลำดับด้านปลาย 3' ของยีน *matK* ในคลอโรพลาสต์ ในขณะที่นิวคลีโอไทด์ 12 ลำดับนี้เกิดการขาดหายไป (deletion) ในพืชวงศ์ชิงสกุลอื่นทั้งหมด พืชสกุล *Siphonochilus* จึงจัดเป็น basal lineage ของพืชวงศ์ชิง (Kress et al., 2002) ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ rDNA ITS ของพืชสกุล *Siphonochilus* 3 แทกชา (3 ชนิด) ที่ใช้เป็น outgroup เป็นข้อมูลจากฐานข้อมูล GenBank มี accession number ดังแสดงในตารางที่ 1

4. การสังเคราะห์ rDNA ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR: Polymerase chain reaction) และการทำลำดับนิวคลีโอไทด์

สกัดเจลนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนใบของพืชด้วยวิธี CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ rDNA โดยเทคนิคพีซีอาร์ โปรแกรมที่ใช้ในปฏิกริยาได้แก่ ITS1 และ ITS4 ซึ่งมีลำดับดังนี้ (Urbatsch et al., 2000 และ White et al., 1990 อย่างถูกต้องใน Lee et al., 2002)

ITS1: 5'-GTCCACTGAACCTTATCATTAG-3'

ITS4: 'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

กำหนดขั้นตอน pre-denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 4 นาที แล้วให้เกิดปฏิกิริยาลูกลูคิฟีซีอาร์ ในขั้นตอน denaturation, annealing และ polymerization จำนวน 45 รอบ โดยกำหนดขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน polymerization ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 2 นาที ขั้นตอนสุดท้ายได้แก่ final polymerization กำหนดที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 4 นาที ทำการตรวจสอบผลการสังเคราะห์ rDNA ITS บนอะโกรสเจลด้วยวิธีเจลอะลีกโตรโฟเรชส์ที่ยกบัน 100 bp DNA marker โดยผลที่ได้จากปฏิกิริยาลูกลูคิฟีซีอาร์ที่ต้องการคือดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับ rDNA ITS คือประมาณ 700 bp ตกตะกอนตัวอย่างดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีขนาดถูกต้องด้วยอุปกรณ์ ส่วนตัวอย่างไปวิเคราะห์ทำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

5. การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ทำการเรียงเทียบ (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณ rDNA ITS เนพาะส่วนของ ITS1, 5.8S และ ITS2 ของพืช 55 แทกชาโดยใช้โปรแกรม ClustalX (Thomson et al., 1997) โดยตั้งค่าพารามิเตอร์ในการทำ pairwise alignment ดังนี้ ค่า gap opening penalty เท่ากับ 10.00 และ gap extension penalty เท่ากับ 0.10 ตั้งค่าพารามิเตอร์ในการทำ multiple alignment ดังนี้ ค่า gap opening penalty เท่ากับ 15.00 และ gap extension penalty เท่ากับ 0.30 ไฟล์ที่ได้ใช้เป็น input file สำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ปรับแต่งผลการเรียงเทียบที่ได้ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 2005) นำผลการปรับเปลี่ยนจาก BioEdit ไปแก้ไข input file สำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ด้วยโปรแกรม PAUP*4.0b10 (Swofford, 2000) ทำการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี Maximum Parsimony หาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี Heuristic search แบบ Stepwise-addition จำนวน 100 ครั้ง จากนั้นเลือก Consensus tree ที่ 50% majority rule วิเคราะห์หาค่า Bootstrap จำนวน 100 ชี้องการสูงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ออกในการวิเคราะห์แต่ละครั้ง ค่า Bootstrap มีความสัมพันธ์กับความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ค่า Bootstrap 85–100% แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับสูง ค่า Bootstrap 71–84% แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับปานกลาง ค่า Bootstrap 50–70% แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับต่ำของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้ (Richardson et al., 2000)

ผลการวิจัย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA ITS จำนวน 55 แทกษา ที่นำมาเรียงเทียบโดยโปรแกรม ClustalX มีความยาวอยู่ในช่วง 704–743 ค่าร์แรกเตอร์ (character) การปรับแต่งผลการเรียงเทียบด้วยโปรแกรม BioEdit ทำให้เหลือความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 55 แทกษา ใน input file สำหรับการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยโปรแกรม PAUP*4.0b10 เพียง 621 ค่าร์แรกเตอร์ โดยนับ gap ที่เกิดขึ้นเป็นค่าร์แรกเตอร์ที่หายไปเนื่องจากการขาดหายไป (deletion) หรือการแทรกเข้ามา (insertion) ของนิวคลีโอไทด์ และให้น้ำหนักคะแนนทุกค่าร์แรกเตอร์ เท่ากัน ในค่าร์แรกเตอร์ที่ใช้วิเคราะห์ทั้งหมด 621 ค่าร์แรกเตอร์ เป็นค่าร์แรกเตอร์ที่เหมือนกันในทุกแทกษา (constant characters) เท่ากัน 280 ค่าร์แรกเตอร์ (45.09%) เป็นค่าร์แรกเตอร์ที่มีความผันแปรในแต่ละแทกษา (variable characters) เป็นจำนวน 60 ค่าร์แรกเตอร์ (12.88%) จำนวนค่าร์แรกเตอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการวิเคราะห์ (informative characters) แบบ Maximum Parsimony เท่ากัน 261 ค่าร์แรกเตอร์ (42.03%) ค่า consistency index (CI) เท่ากัน 0.5005

ค่า retention index (RI) เท่ากัน 0.7058 ค่า Rescaled consistency index (RC) เท่ากัน 0.3533 ได้แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ที่เกิดจากความแตกต่างของแทกษาที่มีจำนวนครั้งของเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด (most parsimonious trees) ทั้งหมด 3 สายสัมพันธ์ ภาพที่ 1 แสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการซึ่งเป็น Consensus tree ที่ 50% majority rule

จากแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (ภาพที่ 1) พบว่า แทกษาที่เป็น outgroup และแทกษาที่เป็น ingroup แยกออกจากกันด้วยค่า Bootstrap 100% ในกลุ่มแทกษาที่เป็น ingroup จำนวน 52 แทกษา พืชในสกุล *Caulokaempferia* ชนิดจัดอยู่ในเคลตเดียร์กันและแยกออกจากพืชอื่นในวงศ์ย่อย Zingiberoideae 47 แทกษาที่เหลือ และ *C. violacea* 1 แทกษา โดยมีค่า Bootstrap 100% ซึ่งเป็นค่า Bootstrap ที่แสดงว่าการจัดแยกออกมากของเคลตดังกล่าวมีความเชื่อมั่นอยู่ในระดับสูง พืชสกุล *Caulokaempferia* ทั้ง 4 ชนิดนี้ได้แก่ *C. appendiculata*, *C. coenobialis*, *C. saxicola* และ *C. sp.* อย่างไรก็ได้ จากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่า พืชในสกุล *Caulokaempferia* ทั้ง 5 ชนิดที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้แสดงความเป็น polyphyletic group โดยมี *C. violacea* แสดงความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการกับ *Boesenbergia rotunda* ที่ความเชื่อมั่นในระดับสูง มีค่า Bootstrap 100%

สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้จากการศึกษายังไม่สามารถจัดพืชในสกุล *Caulokaempferia* ไว้ในตำแหน่งอนุกรมวิธานที่แน่นอนได้ เนื่องจากพืชในสกุลนี้ไม่ได้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับพืชในเพ่า Zingibereae หรือพืชในเพ่า Globbeae

ภายในกลุ่มของพืชในวงศ์ย่อย Zingiberoideae นั้น พืชในเพ่า Globbeae จัดอยู่ในเคลตเดียร์กันจึงเป็นกลุ่ม monophyletic และถึงแม้ว่าพืชเพ่าดังกล่าวจะมีความใกล้ชิดกับพืชในเพ่า Zingibereae จำนวน 30 ชนิด มากกว่าพืชในเพ่า Zingibereae สกุล *Camptandra*, *Curcuma*, *Hitchenia*, *Pyrgophyllum*, *Smithatriss* และ

Stahlianthus การแยกของ 3 เคลดนี้ (A, B และ C ในภาพที่ 1) มีค่า Bootstrap ที่ต่ำกว่า 50% จึงถือว่ามีความเชื่อมั่นในระดับที่ต่ำ ในรายงานอื่น (Kress et al., 2002) ซึ่งวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA ITS และ *matK* ร่วมกัน แม้พืชสองเผ่านี้จัดแยกออกจากกัน แต่การแยกออกของเคลดเป็นการแยกด้วยความเชื่อมั่นในระดับต่ำ เช่นกัน

สรุปและวิจารณ์ผล

ในรายงานที่มีมาก่อนเกี่ยวกับการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิัฒนาการโดยใช้ข้อมูลชีวิทยาระดับโมเลกุลของพืชในสกุล *Caulokaempferia* พบความไม่สอดคล้องของสายสัมพันธ์ทางวิัฒนาการของพืชสกุลนี้กับพืชสกุลอื่น ในรายงานของ Kress et al. (2002) พืชสกุล *Caulokaempferia* มีการจัดแยกออกเป็นกลุ่ม monophyletic ในขณะที่ Ngamriabsakul et al. (2004) รายงานความสัมพันธ์ทางวิัฒนาการที่ใกล้ชิดกันระหว่าง *Caulokaempferia* กับ *Boesenbergia* ความไม่สอดคล้องของผลการศึกษามิ่งสามารถนำไปสู่ข้อสรุปที่ชัดเจนได้ เนื่องจากทั้งสองงานวิจัยใช้พืชสกุล *Caulokaempferia* คนละชนิดกัน Kress et al. (2002) ศึกษา *Caulokaempferia* 3 ชนิด ซึ่งเป็นชนิดที่มีดอกสีเหลืองเท่านั้น ส่วน Ngamriabsakul et al. (2004) ศึกษาชนิดที่มีดอกสีม่วง 1 ชนิด ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้เพิ่มจำนวนแทกซานาของพืชสกุล *Caulokaempferia* เข้าในการวิเคราะห์ และวิเคราะห์ข้อมูลจากชนิดที่มีดอกสีเหลือง และดอกสีม่วงร่วมกัน พืชสกุล *Caulokaempferia* ที่ใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิัฒนาการจำนวน 5 ชนิด มี 4 ชนิดที่มีดอกสีเหลือง ได้แก่ *C. appendiculata*, *C. coenobialis*, *C. saxicola* และ *C. sp.* และมี 1 ชนิดที่มีดอกสีม่วง ได้แก่ *C. violacea* สายสัมพันธ์ทางวิัฒนาการที่ได้จากการวิเคราะห์จัด *Caulokaempferia* ชนิดที่มีดอกสีเหลืองไว้ในเคลดเดียวกัน แยกออกจากพืชอื่นในวงศ์ย่อย Zingiberoideae ในขณะที่ชนิดที่มีดอกสีม่วงถูกจัดแยกออกไปจากกลุ่มดอกสีเหลือง

ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ *Caulokaempferia* ชนิดที่มีดอกสีเหลืองจะได้รับการเสนอให้จัดเป็นเพิ่กใหม่ ข้อมูลที่จะช่วยสนับสนุนข้อเสนอผู้จะได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลของพืชสกุลนี้จำนวนมากชนิดขึ้นเพื่อยืนยันสายสัมพันธ์ทางวิัฒนาการของพืชกลุ่มนี้ ซึ่งเป็นงานที่กำลังอยู่ในระหว่างการดำเนินงานของกลุ่มวิจัยเดียวกันนี้

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนโครงการจากคูณย์วิจัยอนุกรรมาธิการประยุกต์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น รหัสโครงการ ATRC_R4716 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ.ดร.ประนอม จันทร์โภทัย และคุณปราโมทย์ ไตรรุณ สำหรับความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างและระบุชนิดพืช

เอกสารอ้างอิง

- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Hall, T. 2005. **BioEdit: Biological sequence alignment editor for Win95/98/NT/2K/XP.** Version 7.0.4. Ibis Therapeutics, Carlsbad, California.
- Kress, W. J., Prince, L. M. and Williams, K. J. 2002. The phylogeny and a new classification of the Gingers (Zingiberaceae): Evidence from molecular data. *American Journal of Botany* 89(11): 1682-1696.
- Larsen, K. 1964. Studies on Zingiberaceae IV: *Caulokaempferia*, a new genus. *Botaniska Tidsskrift* 60(3): 165-179.
- Larsen, K. 2002. Three new species of *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from Thailand with a discussion of the generic diversity. *Nordic Journal of Botany* 22(4): 409-418.

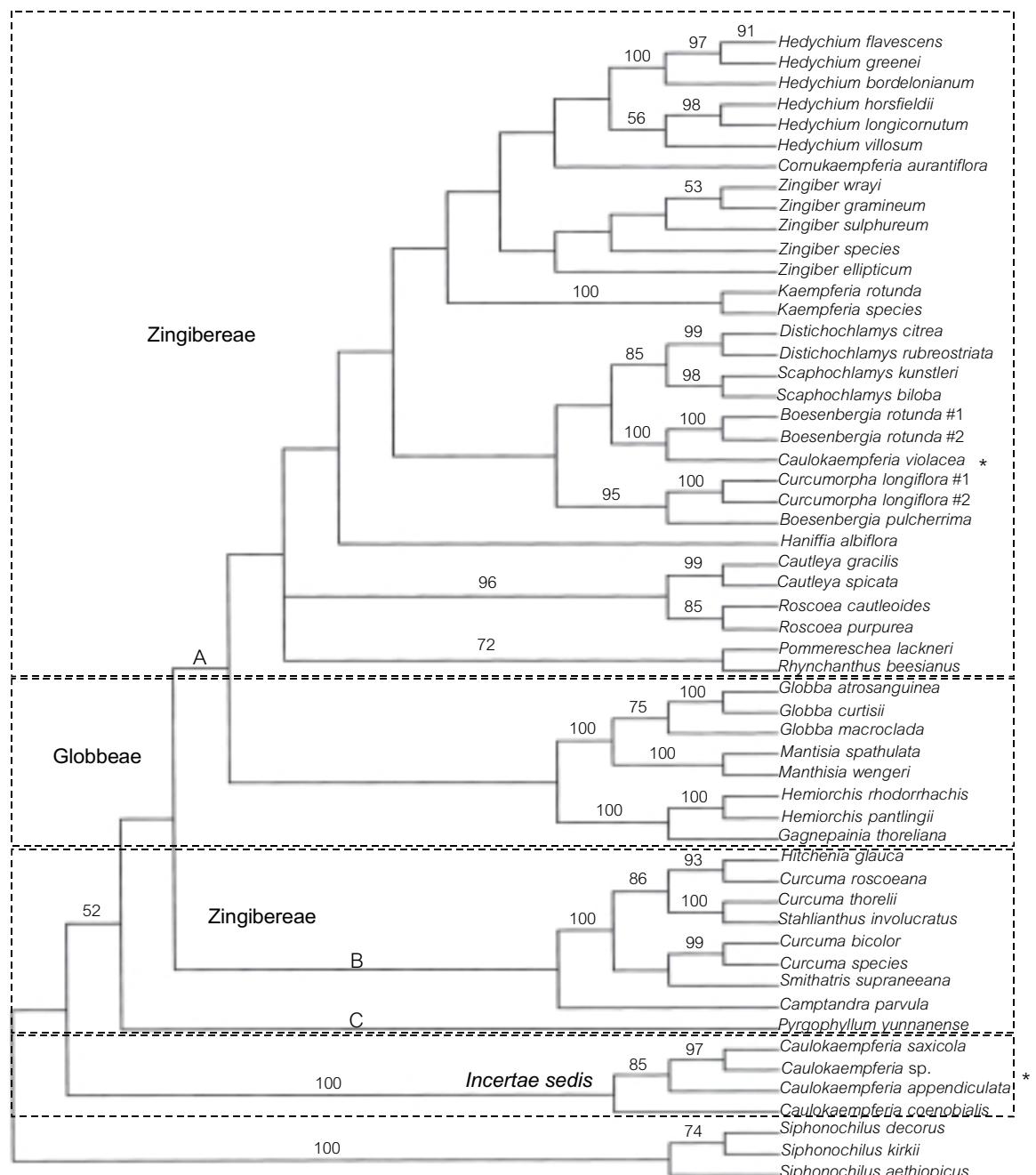
- Larsen, K. and Jenjittikul, T. 2004. A new species of *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from Laos. **Edinburgh Journal of Botany** 60(3): 509-512.
- Lee, J., Baldwin, B. G. and Gottlieb, L. D. 2002. Phylogeny of *Stephanomeria* and related genera (Compositae-Lactuceae) based on analysis of 18S-26S nuclear rDNA ITS and ETS sequences. **American Journal of Botany** 89(1): 160-168.
- Ngamriabsakul, C., Newman, M. F. and Cronk, Q. C. B. 2004. The phylogeny of tribe *Zingibereae* (Zingiberaceae) based on ITS (nrDNA) and *trnL*-F (cpDNA) sequences. **Edinburgh Journal of Botany** 60(3): 483-507.
- Picheansoonthon, C. and Mokkamul, P. 2004. Two new *Caulokaempferia* taxa (Zingiberaceae) from northeastern Thailand. **Folia Malaysiana** 5(2): 69-80.
- Richardson, J. E., Fay, M. F., Cronk, Q. C. B., Bowman, D. and Chase, M. W. 2000. A phylogenetic analysis of Rhamnaceae using *rbcL* and *trnL*-F plastid DNA sequences. **American Journal of Botany** 87: 1309-1324.
- Suksathan, P. and Triboun, P. 2004. A new species of *Caulokaempferia* (Zingiberaceae) from Thailand. **Edinburgh Journal of Botany** 60(3): 513-516.
- Swofford, D.L. 2000. **PAUP***, **Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)**, Version 4. Sinauer associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thomson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** 25: 4876-4882.

ตารางที่ 1 Accession number ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA ITS ของพืชในวงศ์ย่อย Zingiberoideae พืชในสกุล *Caulokaempferia* และพืชในสกุล *Siphonochilus* จากฐานข้อมูล GenBank

	พืช	GenBank accession number
วงศ์ย่อย Zingiberoideae		
เผ่า <i>Zingibereae</i>		
	<i>Boesenbergia pulcherrima</i>	AF478725
	<i>Boesenbergia rotunda</i> #1	AF478726
	<i>Boesenbergia rotunda</i> #2	AF478727
	<i>Camptandra parvula</i>	AF478730
	<i>Cautleya gracilis</i>	AF478734
	<i>Cautleya spicata</i>	AF478735
	<i>Curcuma bicolor</i>	AF478737
	<i>Curcuma roscooeana</i>	AF478739
	<i>Curcuma species</i>	AF478740
	<i>Curcuma thorelii</i>	AF478741
	<i>Curcumorpha longiflora</i> #1	AF478742
	<i>Curcumorpha longiflora</i> #2	AF478743
	<i>Cornukaempferia aurantiflora</i>	AF478736
	<i>Distichochlamys citrea</i>	AF478744

ตารางที่ 1 Accession number ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA ITS ของพืชในวงศ์ชิง Zingiberoideae พืชในสกุล *Caulokaempferia* และพืชในสกุล *Siphonochilus* จากฐานข้อมูล GenBank (ต่อ)

พืช	GenBank accession number	
<i>Distichochlamys rubrostriata</i>	AF478745	
<i>Haniffia albiflora</i>	AF478756	
<i>Hedychium bordelonianum</i>	AF478757	
<i>Hedychium flavescent</i>	AF478758	
<i>Hedychium greenei</i>	AF478759	
<i>Hedychium horsfieldii</i>	AF478760	
<i>Hedychium longicornutum</i>	AF478761	
<i>Hedychium villosum</i>	AF478762	
<i>Hitchenia glauca</i>	AF478765	
<i>Kaempferia rotunda</i>	AF478767	
<i>Kaempferia species</i>	AF478768	
<i>Pommereschea lackneri</i>	AF478776	
<i>Pyrgophyllum yunnanense</i>	AF478777	
<i>Rhynchanthus beesianus</i>	AF478784	
<i>Roscoea cautleoides</i>	AF478786	
<i>Roscoea purpurea</i>	AF478787	
<i>Scaphochlamys biloba</i>	AF478788	
<i>Scaphochlamys kunstleri</i>	AF478789	
<i>Zingiber ellipticum</i>	AF478799	
<i>Zingiber gramineum</i>	AF478800	
<i>Zingiber species</i>	AF478803	
<i>Zingiber sulphureum</i>	AF478801	
<i>Zingiber wrayi</i>	AF478802	
<i>Smithathris supraneelana</i>	AF478795	
<i>Stahlianthus involucratus</i>	AF478796	
<i>Gagnepainia thorelliana</i>	AF478752	
<i>Globba atrosanguinea</i>	AF478753	
<i>Globba curtisii</i>	AF478754	
<i>Globba macroclada</i>	AF478755	
<i>Hemiorchis pantlingii</i>	AF478764	
<i>Hemiorchis rhodorrhachis</i>	AF478763	
<i>Mantisia spathulata</i>	AF478769	
<i>Manthisia wengeri</i>	AF478770	
สกุล <i>Caulokaempferia</i>	<i>C. coenobialis</i>	AF478731
	<i>C. saxicola</i>	AF478732
	<i>C. violacea</i>	AY424748
	<i>C. sp.</i>	AF478733
สกุล <i>Siphonochilus</i>	<i>S. aethiopicus</i>	AF478792
	<i>S. decorus</i>	AF478793
	<i>S. kirkii</i>	AF478794



ภาพที่ 1 Consensus tree ที่ 50% majority rule ของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่เกิดจากความแตกต่างของแทกซ่าเป็นจำนวนลำดับน้อยที่สุดทั้งหมด 3 สายสัมพันธ์ ตัวเลขบนแต่ละเคล็ดแสดงค่า Bootstrap (ค่า Bootstrap ที่น้อยกว่า 50% ไม่ได้แสดงไว้ในสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนี้)

* แสดงตำแหน่งของพืชสกุล *Caulokaempferia*