ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดด้วย *rbcL* ยีนของเครือหมาน้อย *(Cyclea sp.)*

Genetic diversity and species classification by using *rbcL* gene of Krueo Ma Noy *(Cyclea sp.)*

กัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์[1*], วรพรรณ สิทธิถาวร[2], พนม สุทธิศักด์โสภณ[1], อรินทม์ งามนิยม[1], ดวงรัตน์ แพงไท[1] และ ศิริกุล ธรรมจิตสกุล[3]

Kun Silprasit[1*], Worapan Sitthithaworn[2], Phanom Sutthisaksopon[1], Arin ngamniyom[1], Duangrat pangthai[1] and Sirikul Thummajitsakul[3]

บทคัดย่อ: ต้นเครือหมาน้อยเป็นพืชที่ถูกใช้ในสมุนไพร อาหารเพื่อสุขภาพและอาหารตามภูมิปัญญาพื้นบ้านมานาน ซึ่งจากฐานข้อมูลยังมีชื่อทางวิทยาศาสตร์สับสนกับชนิดพันธุ์อยู่มาก โดยจุดประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย RAPD และการใช้ *rbcL* ยีน ในการจำแนกชนิดของพืชในสกุลเครือหมาน้อย จากการศึกษาพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง *rbcL* ยีน ของตัวอย่างเครือหมาน้อยมีลำดับ DNA ที่เป็นเอกลักษณ์ของไทยอยู่ 1 บริเวณ ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่บ่งชี้เอกลักษณ์ของต้นเครือหมาน้อยของไทยได้ เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูลพันธุกรรมในระดับสากล (gene bank) ของ NCBI พบว่าตัวอย่าง ทั้งหมดจากแหล่งต่างๆ จำนวน 5 จังหวัด มีความใกล้เคียงกับ *Cyclea polypetala* และ *Cylcea barbanii* มากที่สุด ไม่ใช่ *Cissampelos pareira* ที่เคยมีรายงานมาก่อน การศึกษา RAPD แสดงให้เห็นว่า พืชเครือหมาน้อยที่รวบรวมมา มีความหลากหลายทางพันธุกรรมเช่นเดียวกับลักษณะรูปร่างของใบที่หลากหลายเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบว่า ลักษณะการมีขนปกคลุมเป็นลักษณะสำคัญในการแยกต้นเครือหมาน้อยออกจากพืชใน family เดียวกัน ที่มีลักษณะใกล้เคียงกันได้ ดังนั้นการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมที่สามารถจำแนกพืชในกลุ่มเครือหมาน้อยได้อย่างแม่นยำและรวดเร็ว จะเพิ่มคุณค่าในการนำมาใช้ประโยชน์เป็นอาหารสมุนไพรและภูมิปัญญาท้องถิ่นได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ: เครือหมาน้อย, สมุนไพร, วงศ์ Menispermaceae, ดีเอ็นเอบาร์โค๊ด, ภูมิปัญญาท้องถิ่น

ABSTRACT: Krueo Ma Noy was used as a medicinal plant, healthy food and food for indigenous knowledge for long time. However, the scientific name for the species was very confusing. The purpose of this research was to study of genetic diversity with RAPD and using rbcL genes to identify *Cyclea* sp. The study found that there was one position in *rbcL* gene showed unique for Thai ' s *Cyclea sp*. When comparing the nucleotide sequence of the DNA database in gene bank (NCBI), the results shown that all sources of the five provinces are close to *Cyclea polypetala* and *Cylcea barbanii*, not been *Cissampelos pareira* as previously reported. The DNA pattern by RAPD technique shown that Krueo Ma Noy were high level of genetic diversity, as well as a variety of leaf shapes as well. The *rbcL* gene and RAPD, It also found that the nature of the hairy leaf was important to separate the *Cyclea sp* from other plants in the same plant family. Therefore, the development of genetic markers that can identify plants in the Clyclea species precisely and quickly would raise value to the uses of culinary herbs and local wisdom as well.
Keywords: Krueo Ma Noy, medicinal plants, Menispermaceae, DNA barcode, Local wisdom

[1] คณะวัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จ.นครนายก
Faculty of Environmental Culture and Ecotourism, Srinakharinwirot University, Srinakharinwirot University, Nakhon Nayok, Thailand, 26120

[2] คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จ.นครนายก
Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University, Nakhon Nayok, Thailand, 26120

[3] สาขาส่งเสริมสุขภาพ คณะกายภาพบำบัด มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จ.นครนายก
Faculty of Physical Therapy, Srinakharinwirot University, Nakhon Nayok, Thailand, 26120

* Corresponding author: kun@g.swu.ac.th

บทนำ

เครือหมาน้อย เป็นพืชอยู่ วงศ์ Menispermaceae พืชป่าตระกูลเถาเลื้อยอาศัยไม้พุ่ม ต้นเครือหมาน้อยเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณหลายด้านและยังมีสารแพคตินเป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก ทำให้มีการนำมาทำเป็นอาหารพื้นบ้านในหลายท้องที่ทั้งไทยและต่างประเทศเช่น ทางภาคอีสานของประเทศ นิยมใช้นำมาประกอบอาหาร หรือ ทางประเทศอินเดียใช้เป็นส่วนประกอบในตำหรับยา (ตรีชฎา และคณะ 2553, พรประภา และคณะ, 2556) โดยคุณสมบัติของใบเครือหมาน้อยคือมีสารเพคติน อยู่ถึง 30 % เมื่อครั้นน้ำสกัดจากใบจะสามารถแข็งตัวในลักษณะของวุ้นแข็งโดยไม่ต้องการน้ำตาลช่วยในการเกิดวุ้น (Arkarapanthu et al., 2005) ซึ่งเนื้อวุ้นเองเป็นสารประกอบไม่ให้พลังงาน ด้วยเหตุนี้ จึงสามารถนำไปใช้ในการผลิตอาหารเพื่อสุขภาพที่ให้พลังงานต่ำได้ดี และยังมีสรรพคุณเป็นยาสมุนพรได้ เช่น แก้ไข้ บรรเทาอาการปวดท้อง เป็นต้น (พิเชษฐ์ และคณะ, 2546) ต้นเครือหมาน้อยมีถูกเรียกด้วย ชื่อวิทยาศาตร์ 2 ชื่อ คือ *Cissampelos pareira* L และ *Cyclea barbata* Miers.1 (Arkarapanthu et al., 2005) อย่างไรก็ตามในวงศ์ Menispermaceae นี้ จะมีการกล่าวถึง 2 สกุลที่มีสรรพคุณใกล้เคียงกันคือ Cissampelos และ Cyclea โดย Cissampelos จะมี 1 ชนิดคือ *Cissampelos pareira* ขณะที่ clyclea จะมี 14 ชนิด คือ *C. polypetala C. barbata C. meeboldii C. tonkinensis C. racemosa C. debiliflora C. sutchuenensis C. hypoglauca C. wattii C. ochiaiana C. gracillima C. racemosa C. longgangensis และ C. insularis*

ในประเทศไทย มีรายงานการสำรวจ 3 ชนิด คือ *Cissampelos pareira Cyclea barbata* และ *Cyclea polypetala* โดยเรียกชื่อเดียวกัน คือ เครือหมาน้อย ในขณะที่ประเทศอินเดียใช้ชื่อที่แยกกันชัดเจน ได้แก่ *Cissampelos parieta* Linn. (North India) เรียกว่า laghu patha และ *Cyclea peltata* (south India) เรียกว่า Raja patha (Singh and Nishteswar, 2013) อย่างไรก็ตาม ลักษณะภายนอกของสามชนิดมีความใกล้เคียงกันมาก ต้องจำแนกด้วยลักษณะดอกเท่านั้น โดยพบการออกดอกน้อยมาก การจำแนกด้วยลักษณะดอกเพียงอย่างเดียวจึงใช้เวลานาน เพื่อรอให้พืชดังกล่าวมีดอก อีกทั้งลักษณะภายนอกยังมีความหลากหลายตามสภาพแวดล้อมในธรรมชาติอีกด้วย ดังนั้นการเก็บตัวอย่างหรือการนำใบเครือหมาน้อยไปใช้ประโยชน์ทางสุมนไพร ยังมีความเสี่ยงที่จะนำไปใช้คนละชนิดกันทำให้สรรพคุณทางยาคลาดเคลื่อนไปได้ เนื่องจากทั้งสามชนิดมีสารองค์ประกอบมีความแตกต่างกันชัดเจน (Hullatti et al., 2011; Hullatti and Sharada, 2010; Samanta et al., 2012)

การศึกษาที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิคทางเคมีมาใช้ในการศึกษาความแตกต่างของพืชทั้งสามชนิด โดยใช้เทคนิค HPTLC และ HPLC fingerprinting ของ *Cissampelos pareira* และพืชใกล้เคียง คือ *Cyclea peltata Cyclea polypetala* และ *cyclea babata*. พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของพืชทั้งสามชนิดได้ (Hullatti and Sharada, 2010) นอกจากนี้ ยังมีการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้ในการจำแนก ได้แก่ ISSR markers ในการจำแนก Cyclea peltata (Lam.) Hook.f. & Thomson Cissampelos pareira L. var. hirsute และ Stephania japonica (Thunb.) พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างกัน และสามารถใช้จำแนกพืชทั้งสามชนิดออกจากกันได้ (Vijayan et al., 2014) อย่างไรก็ตามเทคนิคการวิเคราะห์สารองค์ประกอบแปรผันไปตามการแสดงออกของพืชและสภาวะแวดล้อมและ ISSR markers ยังใช้การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอซึ่งมีความผันผวนไปตามสภาวะในการเตรียมองค์ประกอบต่างๆ เครื่องมือ คุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ใช้ในปฏิกิริยา (Shivakumar et al., 2011)

ณ ปัจจุบัน การใช้หลักการ DNA barcode ในการจำแนกหรือจัดกลุ่มพืชเป็นที่นิยมแพร่หลายและให้ผลที่คงที่ (Chase et al., 2007) เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์ในระดับ ลำดับดีเอ็นเอ โดยตำแหน่งที่ใช้ในการหา

ลำดับดีเอ็นเอ ได้แก่ tpF-atpH spacer, matK gene, rbcL gene, rpoB gene, rpoC1 gene, psbK-psbI spacer และ trnH-psbA spacer ซึ่งมีรายงานว่าตำแหน่ง *rbcL* ยีน นิยมใช้ในการจำแนกพืชดอกหลายชนิดและ ยังสามารถให้ผลการแยกพืชชนิดเดียวกันที่มีความหลากหลายของลักษณะภายนอกอีกด้วย (Bafeel et al., 2011, 2012; Muellner et al., 2003; Sarhan et al., 2016) ดังนั้น จึงนำมาสู่การศึกษาวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและใช้ *r rbcL* ยีน ในการเทียบเคียงชนิดพืช เครือหมาน้อยในที่รวบรวมได้ในพื้นที่บางส่วนของประเทศไทยกับในฐานข้อมูลสากล (NCBI gene bank)

วิธีการศึกษา

1. สำรวจและรวบรวมเครือหมาน้อย

ลงพื้นที่สำรวจในพื้นที่ธรรมชาติในจังหวัดปราจีนบุรี สระแก้ว นครนายก สกลนคร เพชรบูรณ์ ซึ่งในพื้นที่ดังกล่าวมีรายงานการนำเครือหมาน้อยไปใช้ประโยชน์ด้วยภูมิปัญญาท้องถิ่น ทำการเก็บรวบรวมใบ ทำความสะอาด ถ่ายภาพลักษณะใบ และถ่ายภาพขนใบด้วย stereomicroscope นำบางส่วนของใบตัดเป็นชิ้นส่วนเล็ก เพื่อสกัดดีเอ็นเอ ด้วย ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป NucleoSpin® Plant II โดยมีขั้นตอนวิธีการสกัดดังนี้คือนำตัวอย่างใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ 1.5 มิลลิลิตร ทำการบดด้วยแท่งแก้วจนละเอียด จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PL1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ RNase A ปริมาตร 10 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายส่วนใสด้านบนลงใน NucleoSpin® filter นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบ/นาที 2 นาที ปิเปตสารละลายที่ผ่าน NucleoSpin® filter ลงหลอดไมโคเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่เติมสารละลายบัฟเฟอร์ PC 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปิเปตสารละลายทั้งหมดลงใน NucleoSpin® column นำไปปั่นเหวี่ยง 11,000 รอบ/นาที 1 นาที เทสารละลายที่ไหลผ่าน NucleoSpin® column ทิ้งไปทำการล้างจีโนมิกดีเอ็นเอติดอยู่ใน NucleoSpin® column ให้บริสุทธิ์โดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PW2700 ไมโครลิตร นำไปเหวี่ยงที่ 11,000 รอบ/นาที 1 นาทีโดยทำการล้าง NucleoSpin®column ซ้ำสองครั้งในครั้งที่สองจะใช้สารละลายบัฟเฟอร์ PW2 200 ไมโครลิตรแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบ/นาที 2 นาที หลังจากปั่นเหวี่ยงแล้วตั้ง NucleoSpin® column ทิ้งไว้ให้แห้ง 10 นาที จึงทำการชะจีโนมิกดีเอ็นเอจาก NucleoSpin® column โดยเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PE50 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบ/นาที 1 นาที สำหรับขั้นตอนการชะจีโนมิกดีเอ็นเอจะทำสองซ้ำเมื่อได้จีโนมิกดีเอ็นเอแล้วทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเลคโตรโฟเรซีส

2. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชด้วยเทคนิค HAT RAPD

โดยทั่วไป ใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ประมาณ 35-42^{0}C แต่ใน HAT-RAPD จะมี อุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 46-62^{0}C เทคนิคนี้ให้ผลที่ละเอียด (high resolution) ทำซ้ำได้ (reproducibility) และแสดงความหลากหลายได้ (polymorphism) โดยใช้ไพรเมอร์ 10 oligomer RAPD มาใช้ในปฏิกิริยา RAPD-PCR ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย DNA พืช (1 ไมโครลิตร) GoTaq® Green Master Mix 10 ไมโครลิตร (GoTaq® DNA Polymerase, 2X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8.5) 400 ไมโครโมลาร์ dATP 400 ไมโครโมลาร์ dGTP 400 ไมโครโมลาร์ dCTP 400 ไมโครโมลาร์ dTTP และ 3 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ และ 4 ไมโครลิตร ของ 10 ไมโครโมลาร์ RAPD primers และปรับปริมาตรให้ได้ 20 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ nuclease free water ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่อง Thermal cycle โดยประกอบด้วย pre- denaturation ที่อุณหภูมิ 94.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีและเริ่มรอบของการทำ PCR จำนวน 35 รอบ ด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94.0 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ

46-62^{0}C องศาเซลเซียส 45 นาที elongation ที่อุณหภูมิ 72.0 องศาเซลเซียส 1 นาที และรอบสุดท้ายสุดท้ายทำ final extension ที่อุณหภูมิ 72.0 องศาเซลเซียส 7 นาที นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาตรวจสอบด้วยอิเลคโตรโฟเรซีสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ทำการเปรียบเทียบรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในแต่ละตัวอย่าง

3. การจัดทำฐานข้อมูลพันธุกรรมเครือหมาน้อยในท้องถิ่นด้วย *rbc*L gene

นำDNA ที่สกัดได้ มาใช้เป็น template ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ด้วยเทคนิค PCR ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย DNA พืช (1 ไมโครลิตร) GoTaq® Green Master Mix 10 ไมโครลิตร (GoTaq® DNA Polymerase 2X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8.5) 400 ไมโครโมลาร์ dATP 400 ไมโครโมลาร์ dGTP 400 ไมโครโมลาร์ dCTP 400 ไมโครโมลาร์ dTTP และ 3 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ และ 4 ไมโครลิตร ของ 10 ไมโครโมลาร์ primer โดยใช้ primer ในยีนของ *rbc*L ได้แก่ forward primer rbcL_F 5'-GCAGCATTYCGAGTAASTCCYCA-3' และ reverse primer rbcL_R 5'-GAAACGYTC-TCTCCAWCGCATAAA-3' โปรแกรมที่ใช้ทำ PCR ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรม ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้ pre-denaturation ที่ 94°C (1นาที) 1 รอบ denaturation ที่ 94°C (30 วินาที) annealing 55°C (45 วินาที) และ extension ที่ 72°C (60 วินาที) เป็นจำนวน 35 รอบและ final extension ที่ 72°C (5 นาที) 1 รอบ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำผลผลิต (PCR product) ที่ได้ไปวิเคราะห์รูปแบบ DNA ด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ใน 0.5 X TAE โดยใช้กระแสไฟ 100 volt เป็นเวลา 20 นาทีทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ ที่ปรากฏ จากนั้นทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยนำผลผลิต PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์ ด้วย RBC Real Genomics™ DNA/RNA Purification kit (Taipei County, Taiwan) ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (macrogen) สำหรับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมด ทำการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล (Blast) และทำการเปรียบเทียบ (alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ กับ ฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างของต้นเครือหมาน้อยแต่ละแหล่งในประเทศและในฐานข้อมูล และหาลำดับที่เป็นเอกลักษณ์ของต้นเครือหมาน้อยในประเทศไทย

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. การสำรวจความหลากหลายของต้นเครือหมาน้อย

การสำรวจแหล่งอาศัยและการใช้ประโยชน์เบื้องต้นของเครือหมาน้อย ได้แก่ อ. องครักษ์ อ.เมือง จ.นครนายก ต.ดงบัง อ.เขาชะอุ่ม จ. ปราจีนบุรี อ.วัฒนานคร จ.สระแก้ว อ.วิหารแดง จ.สระบุรี ในแต่ละที่นั้นซึ่งจะพบว่าลักษณะใบมีความหลากหลายกันมาก ได้แก่ลักษณะก้นปิด ของใบ บางพื้นที่มีลักษณะโค้งเว้ารูปหัวใจ บางพื้นที่เป็นรูปโค้งมน ความกว้างและความยาวของใบก็หลากหลาย ทำให้ใบมีลักษณะกลม และเรียวต่างกันไปดังภาพ Figure 1

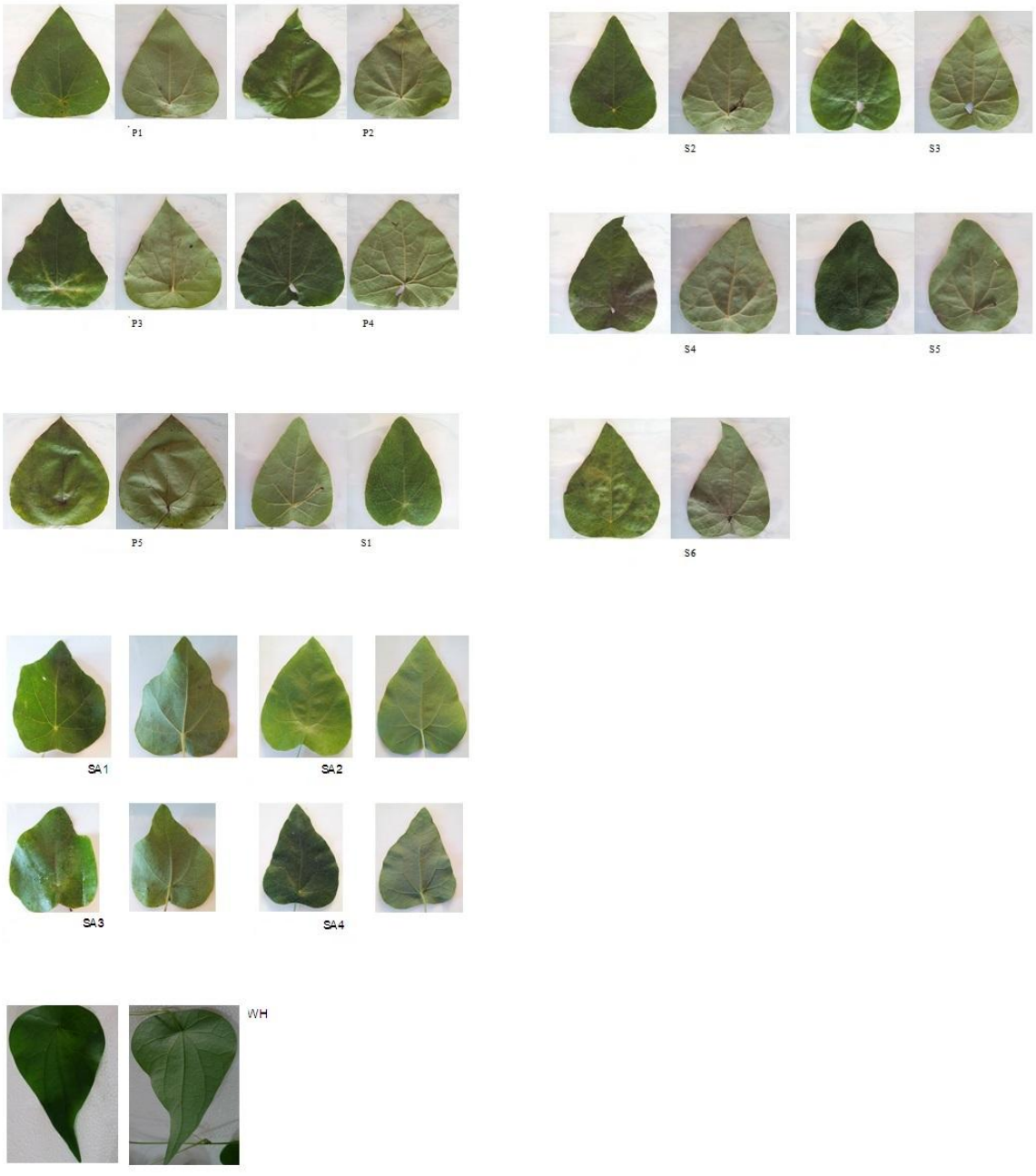

Figure 1 leaf morphology variation of Krueo Ma Noy sample collected from Pechabun (P) Sakolnakhon (S) Sakeaw (Sa) and wihan dang (WH) saraburi province, Thailand.

นอกไปจากนี้ยังพบว่า ลักษณะขนที่ปกคลุมใบยังมีความยาวที่หลากหลายขนาด 0.5-3 mm (P SA และ S) อย่างไรก็ตามพบว่าลักษณะการมีขนที่ใบเป็นลักษณะที่พบ เฉพาะพืชในกลุ่มเครือหมาน้อย ในขณะที่พืชอื่นที่มีใบรูปร่างใกล้เคียง (WH) แต่ไม่มีขนปกคลุมที่ใบและลำต้น จากการเทียบเคียงลำดับพันธุกรรมในส่วน *rbcL* gene พบว่าเป็น *Stephania abyssinica* ซึ่งเป็นพืชคนละชนิดกันแต่อยู่ใน family เดียวกัน ดัง **Figure 2**

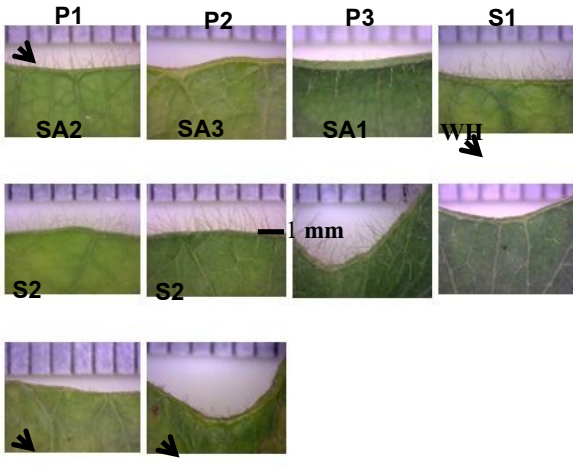

Figure 2 Hairy leaf of plant sample; long hair shown in P1 S1 S2 and SA1, short hair shown in P2 P3 SA2 and SA3 , No hair shown in WH.

พืชในสกุลเครือหมาน้อย ทั้ง Cissampelos และ Cyclea ทั้งคู่มีลักษณะใบเหมือนกันคือ ฐานใบที่มีก้านใบติดตรงกลางแผ่นใบ (Leaves peltate) ซึ่งส่วนที่ใช้ในการจำแนกแต่ละชนิดคือ ช่อดอก และใน สกุล Cyclea ได้แก่ *C. polypetala* และ *C. barbata* ที่มีลักษณะใบคล้ายคลึงกันมาก ก็มีความแตกต่างกัน ที่ช่อดอก เช่นกัน ดังนั้นการคัดแยกชนิดในพืชกลุ่มนี้จึงทำได้ยาก เนื่องจากต้องศึกษาที่ช่อดอก ซึ่งในจากการสำรวจในปี 2558-2559 พบเห็นการออกดอกน้อยมากในธรรมชาติ ดังนั้น การจำแนกโดยใช้ลักษณะภายนอกจึงยังไม่ชัดเจน ลักษณะภายนอกที่คล้ายกัน ทำให้สับสนในการจำแนก ยิ่งไปกว่านั้นแต่ละชนิด ยังมีสารองค์ประกอบต่างๆ กันไป (Hullatti and Sharada, 2010; Singh and Nishteswar, 2013) ดังนั้นการนำพืชกลุ่มนี้มาเป็นพืชอาหาร สมุนไพร สรรพคุณที่ได้อาจมีความคลาดเคลื่อนไปได้

2. วิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมในส่วน *rbc*L gene เครือหมาน้อยและเอกลักษณ์ของลายพิมพ์ทางเคมี

จากการเทคนิค PCR เพิ่มปริมาณยีน ในส่วนของ *rbcL* gene ได้ PCR product ขนาด 700 bp ซึ่งจากการวิเคราะห์ตัวอย่างจาก สระแก้ว นครนายก เพชรบูรณ์ ปราจีนบุรีและสกลนคร พบว่า เครือหมาน้อยที่รวบรวมได้อยู่ใน สกุล cyclea และเป็นชนิด *cyclea polypetala* และ *cyclea burmanii* ดัง **Figure 4** ซึ่งจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ตำแหน่ง *rbcL* ยีน ของตัวอย่างเครือหมาน้อยจากที่ต่างๆ จำนวน 20 ตัวอย่าง มีลำดับ DNA ที่เป็นเอกลักษณ์ของไทยอยู่ 1 บริเวณ ดัง **Figure 3** ซึ่งใช้เป็น DNA barcode แสดงเอกลักษณ์ของต้นเครือหมาน้อยของไทยได้ อย่างไรก็ตาม การใช้ *rbcL* ยีน ซึ่งเป็นส่วนของ Plastid Coding Gene สามารถใช้ในการระบุในระดับ genus ได้ 92% และระบุชนิดได้ 17% (Arif et al., 2010; Bafeel et al., 2011; de Groot et al., 2011) ในขณะที่ matK locus ไม่ประสบผลสำเร็จในการชำจำแนก เช่นเดียวกับยีนส่วนอื่นๆ อย่างไรก็ตาม การใช้ 2-3 ยีนในการจำแนกระดับ ชนิดพันธ์ จะให้ความแม่นยำกว่า การใช้ยีนเพียงยีนเดียว ดังนั้นในการจำแนกด้วย DNA barcode สำหรับพืชในกลุ่มเครือหมาน้อย อาจต้องใช้มากกว่า หนึ่งยีน ซึ่งจะนำไปสู่การต่อยอดวิจัยต่อไป

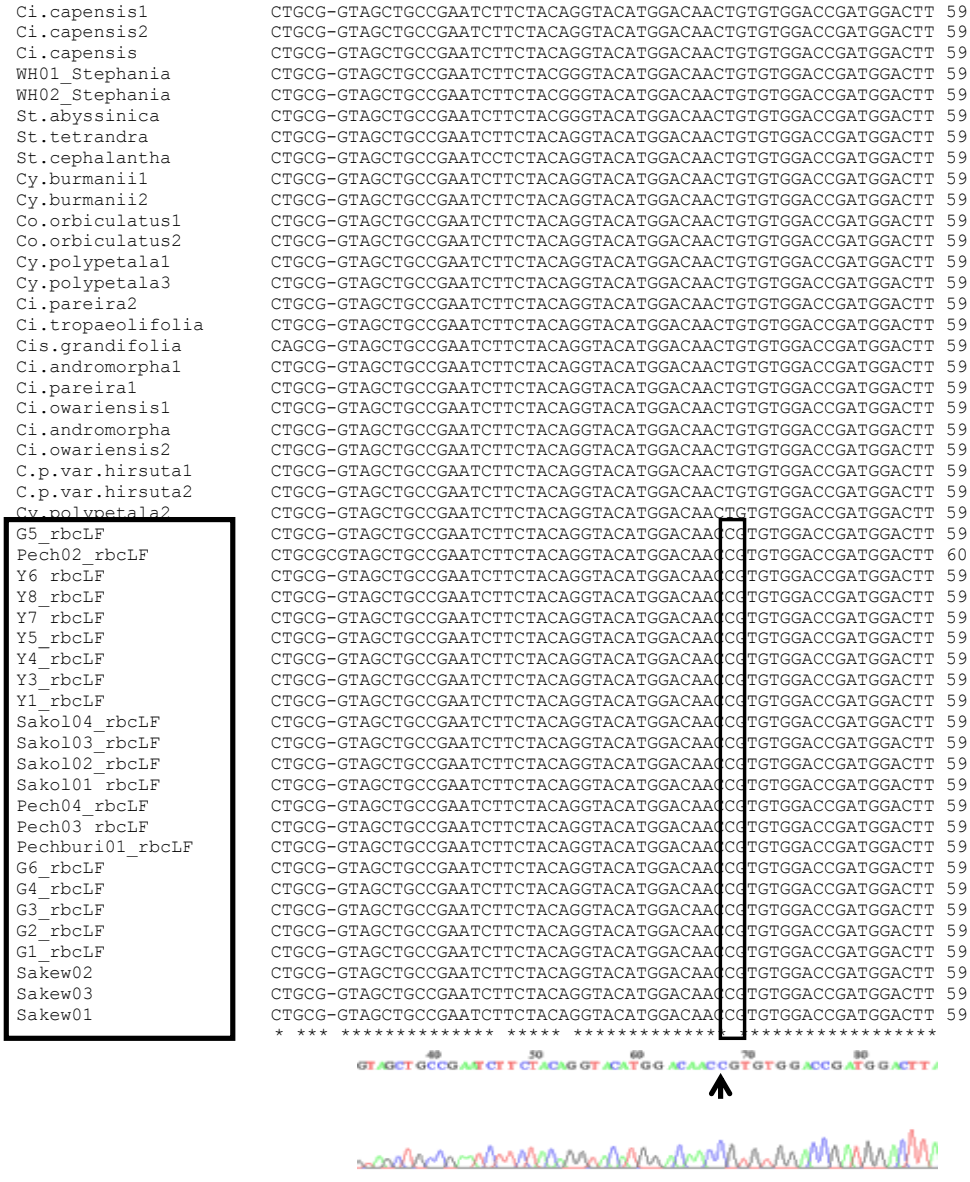

Figure 3 The aligned fragment of rbcL gene showed unique nucleotide which appeared in Thai sample only (nucleotide C was indicated by Arrow)

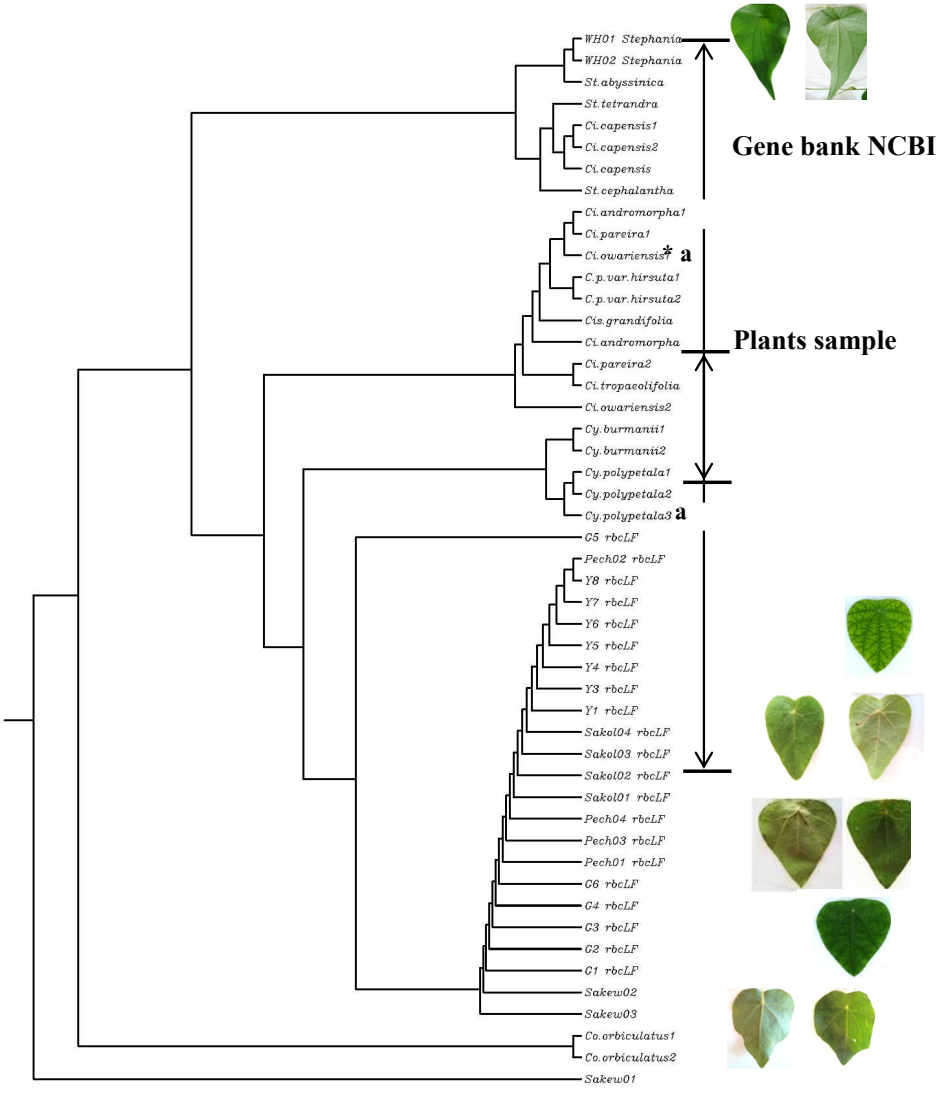

Figure 4 The UPMA tree showed sample group; the collected sample were in *Cyclea polypetala* and *cyclea burmanii* group. * indicated sciencific name appeared in thai herbs database, [a] indicated plants were reported in thai plant herbarium.

อย่างไรก็ตามมีการรายงานไว้ว่า ชื่อวิทยาศาตร์ของเครือหมาน้อยยังไม่ชัดเจน โดยมีชื่อที่ใช้เรียก 2 ชื่อ คือ *Cissampelos pareira* L และ *Cyclea barbata* Miers (Arkarapanthu et al., 2005) ในขณะที่ฐานข้อมูลสมุนไพรส่วนมากแสดงชื่อวิทยาศาสตร์ของเครือหมาน้อย คือ *Cissampelos pareira* L. var. hirsutar และ ยังมีรายงาน ใช้ชื่อท้องถิ่นให้ต่างกันออกไป คือ *Cissampelos pareira* var. hirsuta (Buch. ex DC.) Forman ใช้ชื่อ กรุงเขมา ขณะที่ *Cyclea barbata* Miers ใช้ชื่อ กรุงบาดาล (Nangngam et al., 2011) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า พืชกลุ่มเครือหมาน้อยยังมีความไม่ชัดเจนเกี่ยวกับ ชนิดและชื่อวิทยาศาสตร์

ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้ได้แสดงผลจากการเทียบเคียงชนิดโดยใช้ลำดับสารพันธุกรรม *rbcL* ยีน ดัง Figure 4 จะพบว่า ตัวอย่างที่รวบรวมได้จาก สระแก้ว นครนายก เพชรบูรณ์ สกลนคร ในครั้งนี้ อยู่ในกลุ่มของ *Cyclea polypetala* และ *cyclea burmanii* ซึ่งอยู่คนละกลุ่มกับ *Cissampelos pareira* อย่างไรก็ตามในประเทศไทยเองมีรายงานไว้ในฐานข้อมูลพรรณไม้องค์กรสวนพฤกษศาสตร์ ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ *Cissampelos pareira* 13 ตัวอย่างแห้ง รวบรวมจากจังหวัดเชียงใหม่ ตาก น่าน และ เลย *Cissampelos pareira var. hirsuta* 10 ตัวอย่างแห้ง รวบรวมจากจังหวัดเชียงใหม่ เลย *Cyclea barbata* 8 ตัวอย่างแห้ง รวบรวมจากจังหวัดเชียงใหม่ ขอนแก่น พะเยา และ *Cyclea polypetala* 12 ตัวอย่างแห้ง รวบรวมจากจังหวัดเชียงใหม่ น่าน เลย ไม่มีรายงานการพบ ชนิด *Cyclea burmanii* การศึกษาพืชสกุล *Cyclea* พบว่า *Cyclea barbata* Miers และ *Cyclea polypetala* มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก อาจทำให้สับสนในการจำแนก (Manilal et al., 1985) รวมถึงการเก็บพืชในกลุ่มนี้ไปใช้ประโยชน์ในแง่สมุนไพร อาจส่งผลให้ได้สรรพคุณที่ไม่แน่นอน แม้ว่าลักษณะภายนอกจะคล้ายกันมากแต่องค์ประกอบทางเคมีของ *Cissampelos pareira Cyclea peltata Cyclea polypetala* และ *cyclea babata*. มีความแตกต่างกันชัดเจน (Hullatti and Sharada, 2010) เช่นเดียวกับการศึกษาด้านโมเลกุล ของพืชสามชนิด *Cyclea barbata* Miers *Cyclea polypetala* และ Cissampelos pareira โดยพันธุกรรมในตำแหน่ง ITS แสดงความแตกต่างของสามชนิดนี้อย่างชัดเจนเช่นกัน (Wang et al., 2007)

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย เทคนิค RAPD

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยด้วยเทคนิค RAPD แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นเครือหมาน้อยที่แตกต่างกัน โดยใช้ไพรเมอร์ 15 เส้น พบว่าไพร์เมอร์ 7 เส้น ได้แก่ OPAA-01 03 04 09 10 11 และ 15 สามารถให้แถบดีเอ็นเอจากการทำ PCR ได้ และไพร์เมอร์ OPAA-01 ให้ fragment ขนาด 250-1500 bp สามารถแสดงความหลากหลายได้อย่างชัดเจนดัง Table 1 และ Figure 5 แสดงให้เห็นว่า ลักษณะภายนอกที่หลากหลายนั้นก็เนื่องจากความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชชนิดนี้เช่นกัน ดังนั้นการจำแนกพืชชนิดนี้ด้วยลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียวนั้นอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนไปได้

Table 1 RAPD primers using classified genetic diversity in Krueo Ma Noy

Primer	Sequences	Fragment range [a]	Polymorphism [b]	Resolution [c]
OPAA-01	AGACGGCTCC	250-1500	highly	Clear
OPAA-03	TTAGCGCCCC	500-700	low	Clear
OPAA-04	AGGACTGCTC	200-1000	moderate	Unclear
OPAA-09	AGATGGGCAG	500-700	low	Unclear
OPAA-10	TGGTCGGGTG	600-1000	moderate	Unclear
OPAA-11	ACCCGACCTG	250-100	low	Clear
OPAA-15	ACGGAAGCCC	250-400	low	Clear

a = fragment size appear in agarose gel b = variation in different fragment for many sample

c = fragment size distinguish in agarose gel.

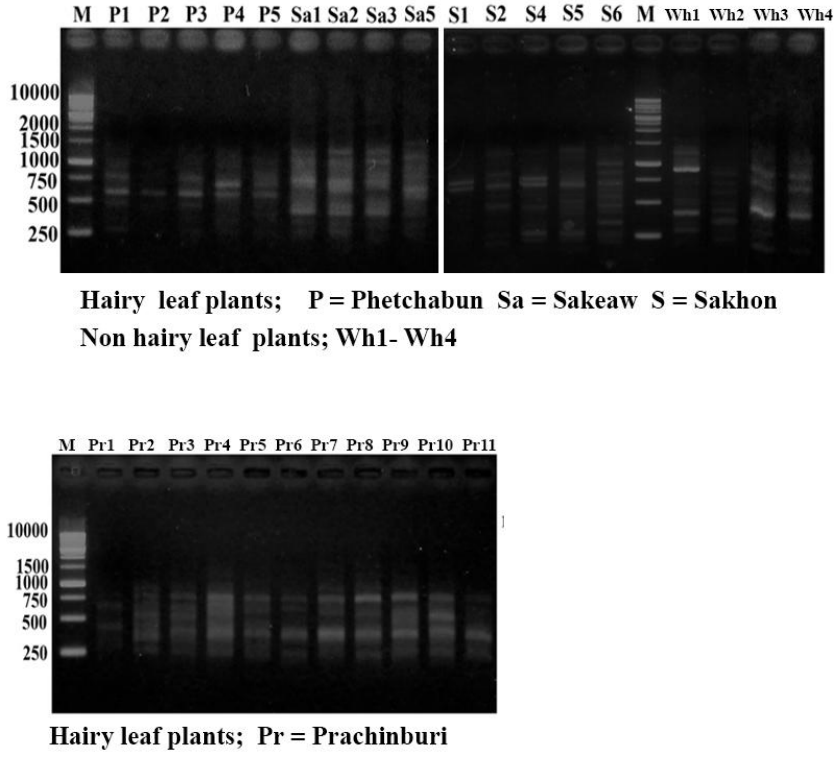

Figure 5 RAPD pattern of collected samples comparing to DNA ladder (M)

การศึกษา RAPD แสดงให้เห็นว่า พืชเครือหมาน้อยที่รวบรวมมา มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมาก เห็นได้จากแถบ DNA ที่แตกต่างกัน ในกลุ่มพืชที่มาจากพื้นที่เดียวกัน เช่น ตัวอย่างจาก เพชรบูรณ์ P1-P5 เช่นเดียวกับตัวอย่างจาก สระแก้ว SA1-SA5 สกล S1-S6 และปราจีนบุรี Pr1-Pr11 อย่างไรก็ตาม รูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างจาก ปราจีนบุรี คล้ายคลึงกับตัวอย่างจากสระแก้ว แต่จะต่างจากรูปแบบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างจากสกลนครและเพชรบูรณ์ ซึ่งทั้งหมดที่รวบรวมเป็นต้นที่มี ขนอ่อนปกคลุมที่ใบและลำต้น แต่ยังมีตัวอย่างอีกส่วนหนึ่งที่มีลักษณะรูปร่างใบคล้าย ลักษณะการเจริญเติบโตเหมือนกัน แต่ไม่มีขนปกคลุมที่ใบ คือ ตัวอย่าง Wh1-Wh4 จากการทำ RAPD พบว่ารูปแบบดีเอ็นเอของพืชในกลุ่มที่ไม่มีใบ จะแสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอแตกต่างจากตัวอย่างที่มี ขน ชัดเจนมาก จากการเทียบเคียงลำดับ DNA ของ *rbc*L ยีน กับฐานข้อมูล gene bank พบว่าเป็นพืชตัวอย่าง Wh1-Wh4 อยู่ใน Family เดียวกันคือ Menispermaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Stephania abyssinica*

สรุป

ศึกษาด้วย RAPD พบความหลากหลายทางพันธุกรรมในแต่ละพื้นที่ โดยลักษณะที่ มี ขนปรากฏที่ใบและลำต้น เป็นลักษณะเด่นที่ใช้แยก *Cissampelos pareira Cyclea peltata Cyclea polypetala* และ *cyclea babata* จากพืช ชนิดใกล้เคียงได้ ซึ่งตรงกับผลของ *rbcL* ยีน ที่จัดกลุ่มตัวอย่างที่พบให้อยู่ในกลุ่มของ *Cyclea polypetala* และ *cyclea babata* แยกชัดเจนจากตัวอย่างที่ไม่มีขน คือ *Stephania abyssinica* ยิ่งไปกว่านั้น ยังพบว่า ตัวอย่างที่ได้ยังอยู่คนละกลุ่มกับ *Cissampelos pareira* ไม่สอดคล้องกับฐานข้อมูลสมุนไพรไทยที่ระบุใช้ชื่อ *Cissampelos pareira* เป็น

ชื่อวิทยาศาสตร์ของเครือหมาน้อย ดังนั้น การเพิ่มตัวอย่างให้ครอบคลุมทั่วประเทศและเพิ่ม DNA marker ไทย ชนิดอื่นๆ จะช่วยให้ข้อมูลชนิดเครือหมาน้อยที่พบในประเทศไทยได้ชัดเจนและแม่นยำมากขึ้น

คำขอบคุณ

ขอบคุณมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สถาบันยุทธศาสตร์ทางปัญญาและวิจัย รหัสทุน 073/2559

เอกสารอ้างอิง

ตรีชฎา อุทัยดา. 2553. การพัฒนาวุ้นผงเครือหมาน้อยเพื่อสุขภาพ. ราชภัฏเพชรบูรณ์สาร. 12(2): 22-28.

พรประภา ชุนถนอม, กรรณิการ์ สมบุญ, สุดารัตน์ สกุลคู และอรนุช สีหามาลา. 2556. ผลของวิธีการสกัดต่อคุณภาพของเพคตินจากใบหมาน้อย ในเทือกเขาภูพาน. แก่นเกษตร. 41(ฉบับพิเศษ 1): 556-562.

พิเชษฐ เทบำรุง. 2546. การสะกดเพคตินจากใบกรุงเขมา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม.

Arkarapanthu, A., V. Chavasit, P. Sungpuag, and L. Phuphathanaphong. 2005. Gel extraced from Khruea-Ma-Noi (Cyclea barbata Miers) leaves: chemical composition and gelation properties. Journal of the Science of Food and Agriculture. 85: 1741-1749.

Arif, I.A., M.A. Bakir, H.A. Khan, and A.H. Al Farhan. 2010. Application of RAPD for molecular characterization of plant species of medicinal value from an arid environment. Genetics and Molecular Research. 9: 2191-2198.

Bafeel, S.O., I.A. Arif, M.A. Bakir, A.A. Al Homaidan, A.H. Al Farhan, and H.A. Khan. 2012. DNA barcoding of arid wild plants using rbcL gene sequences. Genetics and Molecular Research. 11(3): 1934-1941.

Bafeel, S.O., I.A. Arif, M.A. Bakir, and H.A. Khan. 2011. Comparative evaluation of PCR success with universal primers of maturase K (matK) and ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (rbcL) for barcoding of some arid plants. Plant Omics Journal. 4: 195-198.

Chase, M.W., R.S. Cowan Hollingsworth, P.M. Van den Berg, C. Madrinan, S. Petersen, G. Seberg, O., Jorgsensen, T. Cameron, K.M. Carine, M. Pedersen, N. Hedderson, T.A.J. Conrad, F. Salazar, G.A. Richardson, J.E. Hollingsworth, M.L. Barraclough, T.G. Kelly, L. and M. Willkinson. 2007. New trends in plant systematics: a proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. Taxon. 56(2): 295-299.

de Groot, G.A., H.J. During, J.W. Maas, and H. Schneider. 2011. Use of rbcL and trnL-F as a two-locus DNA barcode for identification of NW-European ferns: an ecological perspective. PLoS One. 6: e16371.

Hullatti, K.K., and M.S. Sharada. 2010. Comparative Phytochemical Investigation of the Sources of Ayurvedic Drug *Patha*: A Chromatographic Fingerprinting Analysis. Indian Journal of Pharmaceutical Science. 72(1): 1-148.

Hullatti, K.K, U.V. Gopikrishna, and I.J. Kuppast. 2011. Phytochemical investigation and diuretic activity of *Cyclea peltata* leaf extracts . Journal of advanced pharmaceutical technology and research. 2(4): 241-244.

Mukerji, B., and P.R. Bhandari. 1959. *Cissampelos pareira* source of a new curariform drug. Planta Medica. 7: 250-259.

Manilal, K.S., and T. Sabu. 1985 Cyclea barbata miers (menispermaceae): a new record of a medicinal plant from South India. Ancient Science of Life. 4(4): 229-231.

Muellner, A.N., R. Samuel, S.A. Johnson, M. Cheek, T.D. Pennington, and M.W. Chase. 2003. Molecular phylogenetics of *Meliaceae*(Sapindales) based on nuclear and plastid DNA sequences. American Journal of Botany. 90: 471-480.

Nangngam, P., K. Sreepoowiang, W. Pupichit, S. Watanakarn, and C. Chuayna. 2011. Vegetation of Limestone Mountain in Thung Salaeng Luang National Park, Phitsanuloke Province. NU Science Journal. 8(1): 72-86.

Samanta, J., S. Bhattacharya, and R. Rayat. 2012. Phytochemical investigation and pharmacognostic standardization of *Cissampelos pareira* root . Ancient Science of Life. 31(4): 181-184.

Sarhan, S., F. Hamed, and W. Al-Youssef. 2016. The rbcL Gene Sequence Variations among and within Prunus Species. Journal of Agricultural Science and Technology. 18: 1105-1115.

Shivakumar, B. and E. Talebi, and G. Subramanya. 2011. Molecular Model Markers (RAPD & ISSR) Application for the Conservation of Molecular Genetics in *Bombyx mori* L. International Journal of Advanced Biological Research. 1(1): 1-7.

Singh, S. and K. Nishteswar. 2013. Review on *Cissampelos Pareira* & *Cyclea Peltata* (Patha Dwaya) - Phyto-Pharmacological Perspectives. Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine. 4(4): 282-289.

Vijayan, D., A. Cheethaparambil, G. S. Pillai, and I. Balachandran. 2014. Molecular authentication of Cissampelos pareira L. var. hirsuta (Buch.-Ham. ex DC.) Forman, the genuine source plant of ayurvedic raw drug 'Patha', and its other source plants by ISSR markers. Biotech. 4: 559-562.

Wang, W., H.C. Wang, and Z.D. Chen. 2007. Phylogeny and morphological evolution of tribe Menispermeae (Menispermaceae) inferred from chloroplast and nuclear sequences Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics. 8: 141-154.