ว.วิทย. มข. 43(3) 403-412 (2558) KKU Sci. J. 43(3) 403-412 (2015)

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนอนตายหยาก ด้วยเทคนิค Sequence Related Amplified Polymorphism

Genetic Diversity Analysis of *Stemona* spp. by Sequence Related Amplified Polymorphism Technique

อภิชา ไชยเหล็ก[1] *และ สิริพร โรจน์อารยานนท์*[1]*

บทคัดย่อ

พืชในสกุลหนอนตายหยาก (*Stemona* spp.) เป็นสมุนไพรที่รู้จักอย่างแพร่หลายทั้งในและต่างประเทศ ในประเทศไทยมีความหลากหลายในระดับชนิดที่สามารถจำแนกได้แล้วไม่น้อยกว่า 10 ชนิด งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของหนอนตายหยากจากแปลงรวบรวมพันธุ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค sequence related amplified polymorphism (SRAP) จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบพืชสกุลหนอนตายหยากจำนวน 160 ตัวอย่าง นำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP โดยใช้ไพรเมอร์ 10 คู่ ได้แก่ M1E1, M1E2, M1E8, M2E10, M4E4, M4E8, M4E9, M5E5, M7E2 และ M8E9 พบแถบลายพิมพ์จำนวน 225 แถบ โดยเป็นแถบลายพิมพ์ที่มีความแตกต่างกันจำนวน 222 แถบ คิดเป็น 98.66% ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จากการวิเคราะห์หาค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมด้วยวิธี Dice Similarity Coefficient มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงอยู่ระหว่าง 0.923 ถึง 0.998 เมื่อนำข้อมูลไปสร้างภาพแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ *S. kerrii* Craib, *S. tuberosa* Lour., *S. curtisii* Hook.f., *S. burkillii* Prain และกลุ่มตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิดแต่ลักษณะของใบคล้าย *S. tuberosa* Lour. จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค SRAP สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างตามชนิดและแต่ละชนิดพบความหลากหลายทางพันธุกรรม

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

*Corresponding Author, E-mail: siriphorn.biocmu@gmail.com

ABSTRACT

Stemona spp. are widely known in Thailand and other foreign countries. In Thailand there are about 10 species could be recognised. This research aimed to study the genetic diversity of *Stemona* spp. in a conserved plantation of Chiang Mai University. DNA fingerprints were constructed using the sequence related amplified polymorphism (SRAP) technique to identify the species of *Stemona* spp. Genomic DNA was extracted from the leaves of 160 samples. The DNA fingerprints were constructed by SRAP technique with 10 pairs of primers: M1E1, M1E2, M1E8, M2E10, M4E4, M4E8, M4E9, M5E5, M7E2 and M8E9. Two hundred and twenty five bands were detected, 222 (98.66%) of which were polymorphic. Analysis of genetic diversity with Dice Similarity Coefficient method showed the values of similarity coefficient to be 0.923-0.998. Cluster analysis of all the *Stemona* spp. samples revealed that they could be grouped into five clusters i.e. *S. kerrii* Craib, *S. tuberosa* Lour., *S. burkillii* Prain., *S. curtisii* Hook.f. and unidentified species that having the leaves similar to those of *S. tuberosa* Lour. These results indicated that SRAP technique for DNA fingerprint is an effective tool for determining genetic diversity of *Stemona* spp.

คำสำคัญ: หนอนตายหยาก ความหลากหลายทางพันธุกรรม ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เอสอาร์เอพี

Keyword: *Stemona* spp, genetic diversity, DNA fingerprinting, SRAP

บทนำ

พืชในสกุลหนอนตายหยาก (*Stemona* spp.) เป็นสมุนไพรที่รู้จักอย่างแพร่หลายทั้งในและต่างประเทศ โดยเป็นพืชที่มีคุณสมบัติทางยารักษาโรคและคุณสมบัติในการกำจัดแมลงศัตรูพืช เช่น ชาวจีน ญี่ปุ่น และเกาหลี มีการใช้สารสกัดจากส่วนของรากหนอนตายหยาก (*S. tuberosa* Lour.) รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับทางเดินหายใจ (Ren et al., 2006) จากการทดสอบสารสกัดจากรากหนอนตายหยากพบสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม alkaloids หลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น stemofolin พบในรากหนอนตายหยากดอกสั้น (*S. collinsae* Craib.) และรากตอ (*S. curtisii* Hook.f.) มีคุณสมบัติในการกำจัดแมลง (Brem et al., 2002) และจากการศึกษาของ Zhu (1998) ได้สกัดสาร alkaloid หลายชนิดจากรากหนอนตายหยาก ได้แก่ สาร tuberostemonine, stenine, oxotuberostemonine, stemonine, stemotinine, tuberostemoninol และ stemoninoamide ที่ทำให้หนอน (maggots), ยุง (mosquitoes), เพลี้ยส้ม (mandarin aphids) และหนอนกระทู้ (cutworms) ตายได้ และพบสารสกัดจากรากของรากตอ มีสาร alkaloid สำคัญที่มีชื่อว่า stemocurtisine (Mungkornasawakul et al., 2003) โดยสารนี้มีผลต่อกระแสประสาทของเส้นประสาท sciatic ของกบ อีกทั้งยังมีการทดลองที่พบว่าสาร stilbinoid ที่พบในรากหนอนตายหยากและ *S. sessilifolis* (Miq.) Franch & Sav. มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ

Staphylococus aureus และ *Staphylococus epidermis* (Yang et al., 2006; Lin et al., 2008)

มีรายงานพบพืชในสกุล *Stemona* ประมาณ 30 ชนิด ในประเทศต่าง ๆ อาทิ ฟิลิปปินส์ ญี่ปุ่น จีน และออสเตรเลีย (เมธี, 2544) ส่วนในประเทศไทยพบตามพื้นที่ป่าทั่วไปในทุกภาค และมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามท้องถิ่น เช่น พญาร้อยหัว กะเพียดหนู โป่งมดง่าม สามสิบกลีบ หรือ สลอดเชียงคำ จากการสำรวจชนิดหนอนตายหยากในประเทศไทยพบประมาณ 10 ชนิด ได้แก่ หนอนตายหยากดอกสั้น (*S. collinsae* Craib), รากตอ (*S. curtisii* Hook.f.), โป่งมดง่าม (*S. burkillii* Prain), เครือปุง (*S. aphylla* Craib), เครือปุงขน (*S. kerrii* Craib), สามสิบกลีบ (*S. phyllantha* Gagnep.), หนอนตายหยาก (*S. tuberosa* Lour.), *S. asperula* J.J.Sm., *S. griffithiana* Kurz และ *S. hutanguriana* W.Chuakul (เมธี, 2544 และสำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2557) แต่การจำแนกชนิดของพืชสกุลหนอนตายหยากทำได้ยากและต้องใช้เวลานาน เนื่องจากการจำแนกต้องอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ คือ ดอก และผล ซึ่งมีฤดูกาลออกดอกเพียงปีละหนึ่งครั้ง และต้องอาศัยนักอนุกรมวิธานที่มีความชำนาญ

การใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอเป็นวิธีหนึ่งที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต สามารถนำข้อมูลไปวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) หรือความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้อย่างแม่นยำ และได้ข้อมูลที่ดีกว่าหลักฐานทางโบราณคดีเพราะไม่มีความลำเอียง ทั้งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล สามารถนำมาวิเคราะห์และสร้างเป็นแผนภาพต้นไม้ (dendrogram) เพื่อจัดกลุ่มตัวอย่างตามพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน (สุรินทร์, 2552)

เทคนิค sequence related amplified polymorphism (SRAP) ถูกคิดค้นและพัฒนาโดย Li และ Quiros (2001) โดยเป็นการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่อาศัยเทคนิคพีซีอาร์ และใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดมีขนาด 17 เบส และไพรเมอร์-รีเวิร์สมีขนาด 18 เบส ไพรเมอร์ของเทคนิค SRAP มีลักษณะพิเศษ คือ ที่ปลาย 3′ มีเบสคัดเลือกสามเบส และส่วนถัดมาของไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดเป็นเบส CCGG เพื่อจำเพาะกับลำดับเบสบริเวณ exon ในขณะที่ไพรเมอร์รีเวิร์สเป็นเบส AATT เพื่อจำเพาะกับลำดับเบสบริเวณ intron จากการทดลองของ Li และ Quiros (2001) พบว่า เทคนิค SRAP มีความสามารถในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากบริเวณ open reading frames (ORFs) และมีความสามารถในการทำซ้ำ (reproducible) สูง โดยพบว่าแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *Brassica oleracea* L. ที่สร้างจากเทคนิค SRAP ตรงกับยีนที่มีรายงานไว้ใน GENBANK ถึงร้อยละ 60 อีกทั้งเทคนิค SRAP ให้แถบที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic band) สูง ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลของลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกัน อีกทั้งทำได้ง่าย รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายไม่สูง จึงมีการนำเทคนิค SRAP มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิด เช่น แก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.), ฟักทอง (*Cucurbita pepo* L.) และพืชสกุลมัลเบอรี่ (*Morus* spp.) (ดลรัชต์และคณะ, 2553; Ferriol et al., 2005; Zhao et al., 2009) นอกจากนี้ข้อมูลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค SRAP สามารถใช้ระบุชนิดของพืชได้ เช่น ยาง (*Dipterocarpus* spp.), กล้วย (*Musa* spp.) และ

อ้อย (*Saccharum* spp.) (วาริณ, 2545; สุจิตราและคณะ, 2548; Suman et al., 2008)

จากการสำรวจแปลงรวบรวมพันธุ์ภายในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบพืชสกุลหนอนตายหยากที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการที่แตกต่างกัน ในการทดลองครั้งนี้จึงได้นำเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล SRAP มาทำการสร้างลายพิมพ์เพื่อยืนยันชนิดและตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างหนอนตายหยากในแปลงรวบรวมพันธุ์

วิธีดำเนินการวิจัย

พืชตัวอย่าง

ตัวอย่างพืชที่ใช้ทำการทดลอง มาจากแปลงรวบรวมพันธุ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่จำนวน 160 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างที่ทราบชนิดจำนวน 135 ตัวอย่าง ประกอบด้วยโป่งมดง่าม (*S. burkillii*) จำนวน 86 ตัวอย่าง, รากตอ (*S. curtisii*) จำนวน 42 ตัวอย่าง, เครือปุงขน (*S. kerrii*) จำนวน 1 ตัวอย่าง, หนอนตายหยาก (*S. tuberosa*) จำนวน 6 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิดจำนวน 25 ตัวอย่าง

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบของหนอนตายหยากด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ NucleoSpin Plant II ของบริษัท MACHEREY – NAGEL จากนั้นตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี 0.8% agarose gel electrophoresis และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

ทำการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP โดยจับคู่ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดจำนวน 10 ไพรเมอร์ และไพรเมอร์-รีเวิร์สจำนวน 10 ไพรเมอร์ ได้คู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 100 คู่ (ตารางที่ 1) และคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมไว้ศึกษาต่อไป

นำตัวอย่างดีเอ็นเอของหนอนตายหยากทั้ง 160 ตัวอย่าง มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP โดยการเตรียมปฏิกิริยาเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอปริมาตร 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ 50 นาโนกรัม ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด 5 พิโคโมล ไพรเมอร์รีเวิร์ส 5 พิโคโมล 0.2 mM dNTP (Vivantis) 10x PCR buffer และ *Taq* polymerase (RBC) 0.5 ยูนิต นำไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ที่มีขั้นตอนดังนี้ ขั้นที่ 1 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นทำปฏิกิริยาขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 35 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที, จำนวน 5 รอบ ทำปฏิกิริยาขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 52 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที, จำนวน 35 รอบ และขั้นสุดท้าย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis บันทึกภาพด้วยเครื่อง gel documentation

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของของหนอนตายหยาก

นำแถบดีเอ็นเอมาแปลผลโดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในตำแหน่งเดียวกันเป็นหมายเลข 1 และการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันเป็นหมายเลข 0 นำข้อมูลมาวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมด้วยวิธี Dice similarity coefficient (Dice, 1945; Nei และ Li, 1979) โดยใช้โปรแกรม Phylip รุ่น 3.69 และแสดงภาพแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม MEGA รุ่น 3.1

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดและไพรเมอร์รีเวิร์ส

ชื่อ	ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (5′-3′)	ชื่อ	ไพรเมอร์รีเวิร์ส (5′-3′)
M-1	TGAGTCCAAACCGGAAA	E-1	GACTGCGTACGAATTAAC
M-2	TGAGTCCAAACCGGAAG	E-2	GACTGCGTACGAATTAAT
M-3	TGAGTCCAAACCGGAAC	E-3	GACTGCGTACGAATTGAC
M-4	TGAGTCCAAACCGGAAT	E-4	GACTGCGTACGAATTGCA
M-5	TGAGTCCAAACCGGAGC	E-5	GACTGCGTACGAATTCAA
M-6	TGAGTCCAAACCGGACA	E-6	GACTGCGTACGAATTCAG
M-7	TGAGTCCAAACCGGACC	E-7	GACTGCGTACGAATTCAC
M-8	TGAGTCCAAACCGGATA	E-8	GACTGCGTACGAATTCTG
M-9	TGAGTCCAAACCGGTAG	E-9	GACTGCGTACGAATTTGA
M-10	TGAGTCCAAACCGGTCA	E-10	GACTGCGTACGAATTTGC

ผลการทดลอง

จากการทดสอบเพื่อคัดเลือกหาคู่ไพร์เมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลหนอนตายหยาก พบคู่ไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันจำนวน 38 คู่ จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ที่ดีที่สุดจำนวน 10 คู่ นำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างทั้งหมด พบแถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งสิ้น 225 แถบ เฉลี่ย 22.5 แถบต่อหนึ่งคู่ไพรเมอร์ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างจำนวน 222 แถบ คิดเป็น 98.66% ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด และแถบดีเอ็นเอที่พบมีขนาดตั้งแต่ 90 คู่เบส ถึง 2900 คู่เบส (ตารางที่ 2)

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.923 ถึง 0.998 จากนั้นนำข้อมูลค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมไปสร้างภาพแผนภูมิต้นไม้สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้ (รูปที่ 1) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยตัวอย่างชนิดเครือปุง-ขน (*S. kerrii*) จำนวน 5 ตัวอย่าง เมื่อพิจารณาลักษณะของลำต้น พบว่ามีขนาดเล็กกว่าตัวอย่างกลุ่มอื่น และที่ผิวของลำต้นและใบมีขนปกคลุม ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของตัวอย่างในกลุ่มนี้มีค่าระหว่าง 0.971 ถึง 0.992 ซึ่งตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด คือ CMU 112 กับ CMU 114 ส่วนตัวอย่างที่มีคล้ายคลึงมากกันที่สุด คือ CMU 110 กับ CMU 111

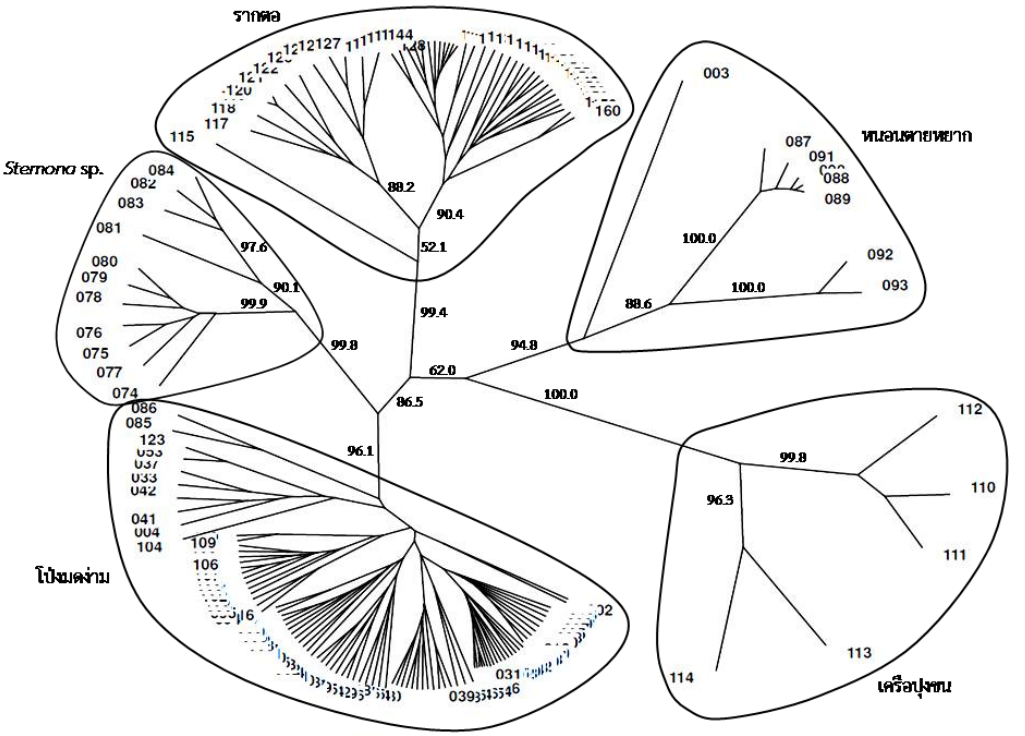
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างชนิดหนอนตายหยาก (*S. tuberosa*) จำนวน 8 ตัวอย่าง เมื่อพิจารณาลักษณะของลำต้น พบว่าไม่มีขน เลื้อยยาวได้ถึง 4 เมตร รากอยู่รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายมันฝรั่ง ลักษณะใบรูปไข่ ขนาดใหญ่ ยาว 9-19.5 เซนติเมตร กว้าง 3-14 เซนติเมตร ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของตัวอย่างในกลุ่มนี้มีค่าระหว่าง 0.952 ถึง 0.998 ซึ่งตัวอย่างที่มีแตกต่างกันมากที่สุด คือ CMU 003 กับ CMU 093 ส่วนตัวอย่างที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด คือ CMU 088 กับ CMU 089

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยตัวอย่างชนิดรากตอ (*S. curtisii*) จำนวน 45 ตัวอย่าง ลักษณะสำคัญของตัวอย่างกลุ่มนี้ ได้แก่ ผิวลำต้นไม่มีขนสามารถเลื้อยยาวได้มากกว่า 3 เมตร รากเป็นแบบทูเบอร์ยาวประมาณ 10 เซนติเมตร อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ใบเรียงกันแบบสลับหรือแบบตรงกันข้าม ขนาดใบยาว 6-21 เซนติเมตร

กว้าง 2.5-10 เซนติเมตร ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทาง พันธุกรรมของตัวอย่างในกลุ่มนี้มีค่าระหว่าง 0.953 ถึง 0.998 ซึ่งตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด คือ CMU 123 กับ CMU 145 ส่วนตัวอย่างที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด คือ CMU 119 กับ CMU 120

ตารางที่ 2 จำนวนและขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละคู่ไพรเมอร์

คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบทั้งหมด	จำนวนแถบพอลิมอฟิซึม	เปอร์เซ็นต์แถบพอลิมอฟิซึม	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (bp)
M1/E1	20	20	100	100 - 1400
M1/E2	27	27	96.2	110 - 1500
M1/E8	17	17	100	120 - 1100
M2/E10	16	16	100	90 - 1700
M4/E4	27	27	100	150 - 1500
M4/E8	28	27	96.4	100 - 1200
M4/E9	25	25	100	120 - 1500
M5/E5	13	11	84.6	150 - 950
M7/E2	29	29	100	150 - 2900
M8/E9	23	23	100	120 - 800
รวม	**225**	**222**	**98.66**	
ค่าเฉลี่ย	**22.50**	**22.20**		



รูปที่ 1 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหนอนตายหยาก (*Stemona* spp.)

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยตัวอย่างชนิดโป่งมดง่าม (*S. burkillii*) จำนวนทั้งหมด 91 ตัวอย่าง เมื่อพิจารณาลักษณะลำต้นพบว่า มีลักษณะลำต้นตั้งตรง ไม่มีขน มีรากแบบทูเบอร์ จำนวนมาก ลักษณะใบมีรูปไข่ ปลายแหลม ขนาดใบยาว 5-11 เซนติเมตร กว้าง 6.25-7.5 เซนติเมตร ก้านใบยาว 10-15 เซนติเมตร ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของตัวอย่างในกลุ่มนี้มีค่าระหว่าง 0.962 ถึง 0.998 ซึ่งตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด คือ CMU 001 กับ CMU 085 ส่วนตัวอย่างที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด คือ CMU 025 กับ CMU 027

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีลักษณะภายนอกคล้ายกับหนอนตายหยาก (*S. tuberosa*) แต่มีรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน มีจำนวน 11 ตัวอย่าง ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของตัวอย่างในกลุ่มนี้มีค่าระหว่าง 0.975 ถึง 0.995 ซึ่งตัวอย่างที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด คือ CMU 074 กับ CMU 081 ส่วนตัวอย่างที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด คือ CMU 075 กับ CMU 076

สำหรับตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิดก่อนการทดลอง เมื่อนำมาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าถูกจัดรวมอยู่ในชนิดเครือปุงขน (*S. kerrii*) จำนวน 4 ตัวอย่าง, หนอนตายหยาก (*S. tuberosa*) จำนวน 2 อย่าง, รากตอ (*S. curtisii*) จำนวน 3 ตัวอย่าง, โป่งมดง่าม (*S. burkillii*) จำนวน 5 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่มีลักษณะภายนอกคล้ายกับหนอนตายหยาก (*S. tuberosa*) จำนวน 11 ตัวอย่าง

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดสอบสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ของเทคนิค SRAP จำนวน 100 คู่ พบว่ามี 38 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอได้ดี มีแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันมาก แสดงให้เห็นว่าเทคนิค SRAP มีประสิทธิภาพในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสกุลหนอนตายหยาก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Li และ Quiros (2001) ที่ใช้เทคนิค SRAP ในการศึกษาพืชในสกุล *Brassica* ชนิดต่าง ๆ รวมถึง broccoli, cauliflower และ collard ด้วย และการทดลองของสุจิตรา (2548) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยด้วยเทคนิค RAPD ร่วมกับ SRAP พบว่าทั้งสองเทคนิคให้ผลการทดลองไปในแนวเดียวกัน โดยแต่ละตัวอย่างให้แถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่เหมือนกัน แต่พบแถบดีเอ็นเอบางตำแหน่งที่จำเพาะกับตัวอย่างชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ซึ่งช่วยให้สามารถแยกพืชต่างชนิดออกจากกันได้

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค SRAP จำนวน 225 แถบ มาวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างหนอนตายหยากได้ 5 กลุ่ม ซึ่งไม่สอดคล้องกับการระบุชนิดของพืชสกุลหนอนตายหยากภายในแปลงโดยใช้ข้อมูลของลักษณะ ราก ลำต้น และใบ ที่จัดกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 4 กลุ่ม จากผลการทดลองส่วนนี้ แสดงให้เห็นว่าเทคนิค SRAP มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตมากกว่าการจัดกลุ่มด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาที่ใช้การเปรียบเทียบลักษณะภายนอก ซึ่งลักษณะทางสัณฐานที่นำมาตรวจสอบนี้มักขึ้นกับสภาพแวดล้อม ทำให้การตรวจสอบผิดพลาดได้ (สุรินทร์, 2552) จากการวิเคราะห์ความเชื่อมั่นของการจัดกลุ่มด้วยค่า bootstrap จำนวน 1000 ครั้ง พบว่าการจัดกลุ่มตัวอย่างทั้ง 5 กลุ่มมีค่า bootstrap มากกว่าร้อยละ 90 ถือได้ว่าการจัดกลุ่มมีความน่าเชื่อถือสูง เครื่องหมาย SRAP สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของพืชสกุลหนอนตายหยากได้เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น เช่น งานวิจัยของวาริน (2545) ใช้เทคนิค

SRAP จำแนกพืชในวงศ์ยาง (family: Dipterocarpaceae) ได้ 3 กลุ่ม คือกลุ่มยางกราด กลุ่มยางพลวง และกลุ่มยางที่คาดว่าเป็นลูกผสม และ Ferriol et al. (2005) ได้จำแนกสายพันธุ์ฟักทอง (*Cucurbita pepo*) จำนวน 69 สายพันธุ์จาก 2 ชนิดย่อยคือ *C. pepo* ssp. *pepo* และ *C. pepo* ssp. *ovifera* พบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค SRAP มีความสอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมไปถึงงานวิจัยของดลรัชต์และคณะ (2553) ที่สร้างลายพิมพ์ ดีเอ็นเอของแก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus* L.) ด้วยเครื่องหมาย SRAP พบว่าสามารถบ่งบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างจำนวน 47 สายพันธุ์ได้

จากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมร่วมกับการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA พบความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มตัวอย่างทั้ง 5 กลุ่ม โดยความแตกต่างของค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของแต่ละตัวอย่างภายในกลุ่มเดียวกัน เป็นตัวบ่งชี้ถึงความหลากหลายภายในชนิด สอดคล้องกับงานวิจัยที่ใช้เทคนิค SRAP ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดหลินจือ (Sun et al., 2006) เชอรี่ (Abedian et al., 2012) และแตงโม (Uluturk et al., 2011) โดยความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันเป็นสิ่งที่ได้รับมาจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรม และเป็นพื้นฐานที่จะทำให้เกิดวิวัฒนาการ และมีโอกาสในการอยู่รอด รวมถึงการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่ผันแปร (สุจิตรา, 2551) หรืออาจเกิดจากกลไกการป้องกันการผสมพันธุ์ (อัจฉริยา, 2555) เนื่องจากหนอนตายหยากแต่ละชนิดมีช่วงเวลาออกดอกที่แตกต่างกันจึงทำให้ไม่มีการผสมข้ามชนิดกัน แต่อย่างไรก็ตามในงานทดลองนี้ยังไม่สามารถสรุปตัวอย่างกลุ่มที่ 5 ได้แน่ชัด เนื่องจากพืชในกลุ่มดังกล่าวยังไม่พบว่ามีการออกดอก ถ้าพบดอกก็อาจทำให้สามารถบอกได้ว่าเป็นพืชสกุลหนอนตายหยากชนิดใด อีกทั้งการศึกษาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมยังพบว่า ยังไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์กับการกระจายตัวของพืชสกุลหนอนตายหยากในแต่ละพื้นที่ เนื่องจากบางตัวอย่างไม่สามารถสืบค้นข้อมูลย้อนหลังถึงแหล่งที่มาได้ ในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแปลงรวบรวมพันธุ์พืชสกุลหนอนตายหยากของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ เป็นแหล่งรวบรวมพันธุ์หนอนตายหยากที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง สามารถนำข้อมูลการทดลองไปใช้ในการอนุรักษ์และจัดการแหล่งพันธุกรรมต่อไปได้

สรุปผลการวิจัย

จากการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ของเทคนิค SRAP ที่มีความเหมาะสมต่อการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหนอนตายหยากจำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ ไปสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในหนอนตายหยากจำนวน 160 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างที่ทราบชนิด 135 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิดอีก 25 ตัวอย่าง พบว่าได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 225 แถบ เป็น polymorphic band จำนวน 222 แถบ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อจำแนกตัวอย่างพืชสกุลหนอนตาย หยากออกเป็นกลุ่มโดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม สามารถจัดจำแนกตัวอย่างทั้งหมดออกเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งผลการจัดจำแนกพบว่าตัวอย่างที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการใกล้เคียงกัน และพบว่าภายในกลุ่มมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่อาจเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและการอนุรักษ์พันธุกรรมของพืชสกุลหนอนตายหยาก นอกจากนี้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมาย SRAP สามารถจำแนกชนิดของหนอนตาย หยากได้ และพบความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างหนอนตายหยาก

ภายในแปลงรวบรวมพันธุ์ของของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากทุนโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย เชียงใหม่ สำหรับทุนสนับสนุนการทำวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา

เอกสารอ้างอิง

ดลรัชต์ สุดหล้า ปรียา พวงสำลี หวังสมนึก พิเชษฐ์ศักดิ์ ศรีวงศ์ พินิจ หวังสมนึก สนั่น จอกลอย และอารันต์ พัฒโนทัย. (2553). ความหลากหลายของแก่นตะวันจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SRAPs. ใน: การประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 11 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น. 476-481.

เมธี รุ่งโรจน์สกุล. (2544). ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำนวนโครโมโซม และการขยายพันธุ์ของหนอนตายหยาก (*Stemona* spp.). วิทยา นิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัย เชียงใหม่. เชียงใหม่. 110 หน้า

วาริน วรรณประโพธิ. (2545). การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรวจสอบยางกราด ยางพลวง และยางที่คาดว่าเป็นลูกผสม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 97 หน้า

สำนักงานหอพรรณไม้ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (2557). ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย เต็ม สมิตินันท์ ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2557. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ. หน้า 528.

สุจิตรา โพธิ์ปาน. (2548). การตรวจสอบความสัมพันธของพันธุกล่วยกลุม AA AAB และ BB โดยเทคนิค specific-PCR RAPD SRAP และ AFLP. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 124 หน้า

สุจิตรา จางตระกูล. (2551). การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและไอโซเอนไซม์ยีนเพื่อการประเมินสถานภาพแหล่งทรัพยากรทางพันธุกรรมป่าไม้. กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, แหล่งที่มา: http://www.dnp.go.th/geneticsgroup/genetic/paper/50การศึกษาความหลากหลาย ทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอและไอโซเอนไซม์ยีนเพื่อการประเมินสถานภาพ ค้นเมื่อ วันที่ 11 พฤศจิกายน 2557.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). เครื่องหมายดีเอ็นเอจากพื้นฐานสู่การประยุกต์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์. หน้า 63-65.

อัจฉริยา รังษิรุจิ. (2555).วิวัฒนาการ:จากทฤษฎีสู่การประยุกต์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: แท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น. หน้า 142.

Abedian, M., Talebi, M., Golmohammdi, H.R. and Tabatabaei, B.E. (2012). Genetic diversity and population structure of mahaleb cherry (*Prunus mahaleb* L.) and sweet cherry (*Prunus avium* L.) using SRAP markers. Biochemical Systematics and Ecology 40: 112–117.

Brem, B., Seger, C., Pacher, T., Hofer, O., Vajrodaya, S. and Greger, H. (2002). Feeding deterrence and contact toxicity of *Stemona* alkaloidss-a source of potent natural insecticides. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 6383–6388.

Dice, L.R. (1945). Measures of the amount of ecological assosciation between species. Journal of Ecology 26: 297–302.

Ferriol, M., Picó, B. and Nuez, F. (2003). Genetic diversity of a germplasm collection of

Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers. Theoretical and Applied Genetics 107: 271-282.

Li, G., and Quiros, C.F. (2001). Sequence related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: it application to mapping and gene tagging in the Brassica. Theoretical and Applied Genetics 130: 445-461.

Lin, L.G., Yang, X.Z., Tang, C.P., Ke, C.Q., Zhang, J.B. and Ye, Y. (2008). Antibacterial stilbenoids from the roots of *Stemona tuberosa*. Phytochemistry 69: 457–463.

Mungkornasawakul, P., Pyne, S.G., Jatisatienr, A., Supyen, D., Lie, W., Ung, A.T., Skelton, B.W. and White, A.H. (2003). Stemocutisine, the first pyrido [1,2-a] azapine *Stemona* alkaloid. Journal of Asian Natural Products 66: 980–982.

Nei, M. and Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America 76: 5269–5273.

Ren, W.J., Po, M.H., Yan, Z., Yiu, M.C., Yan, T.X., Hong, X.X., Harald, G., Pang, C.S. and Paul, P.B. (2006). Alkaloids and chemical diversity of *Stemona tuberosa*. Journal of Natural Products 69: 749–754.

Suman, A., Kimbeng, C.A., Edme, S.J. and Veremis, J. (2008). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers for assessing genetic relationships and diversity in sugarcane germplasm collections. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization 6: 222–231.

Sun, S.J., Gao, W., Lin, S.Q., Zhu, J., Xie, B.G. and Lin, Z.B. (2006). Analysis of genetic diversity in *Ganoderma* population with a novel molecular marker SRAP. Applied Genetic and Molecular Biotechnology 72: 537–543.

Uluturk, Z.I., Frary, A. and Doganlar, S. (2011). Determination of genetic diversity in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum & Nakai] germplasm. Australian Journal of Crop Science 5: 1832–1836.

Yang, X.Y., Tang, C.P. and Ye, Y. (2006). Stilbenoids from *Stemona japonica*. Journal of Asian Natural Products Research 8: 47– 3.

Zhao, W., Fang, R., Pan, Y., Yang, Y., Chung, J.W., Chung, L. and Park, Y.J. (2009). Analysis of genetic relationships of mulberry (*Morus* L.) germplasm using Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) marker. African Journal of Biotechnology 8: 2604-2610.

Zhu, J., Gal, M.D., Quarrie, S., Jackson, M.T. and Bryan, G.J. (1998). AFLP markers for the study of rice biodiversity. Theoretical and Applied Genetics 96: 602–611.

❑❑❑❑❑