การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD และการเปรียบเทียบผลผลิต ปริมาณสารสำคัญในหญ้าหวานสายพันธุ์คัดเลือก

Study on Genetic Relationship Using Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) and Yield Comparisons, Biochemical Characteristics of *Stevia rebaudiana* Promising Line

พรนิภา ถาโน[1*] อนุภพ เผือกผ่อง[1] สุพัฒธณกิจ โพธิ์สว่าง[1] และ ศิรากานต์ ขยันการ[1]
Thano, P.[1*], Puekpong, A.[1], Posawang, S.[1] and Khayankarn, S.[1]

[1] ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ อ.หางดง จ.เชียงใหม่ 50230
[1] Chiang Mai Royal Agricultural Research Center, Hang Dong, Chiang Mai 50230
**Corresponding author: phornnipa.pt@gmail.com*

บทคัดย่อ

หญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni) เป็นพืชที่ให้ความหวานสูง แต่ไม่ให้พลังงาน ปัจจุบันนำสารสกัดสติวิโอไซด์จากหญ้าหวานมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับผู้บริโภคที่หันมาใส่ใจเรื่องสุขภาพ และนิยมปลูกทางภาคเหนือของประเทศไทย งานวิจัยนี้ดำเนินการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ปลูกเปรียบเทียบผลผลิต ปริมาณสารสำคัญ ได้แก่ สารสติวิโอไซด์ และสารต้านอนุมูลอิสระ ของหญ้าหวานสายพันธุ์คัดเลือก จำนวน 3 สายต้น คือ SMOL2 SMOL3 และ SMOL4 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก (RCBD) จำนวน 7 ซ้ำ ใน 2 พื้นที่ ได้แก่ 1) แปลงเกษตรกร อำเภอสะเมิง (ระดับความสูงจากน้ำทะเล 700 เมตร) และศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ (หน่วยย่อยขุนวาง ที่ระดับความสูงจากน้ำทะเล 1,300 เมตร) จังหวัดเชียงใหม่ จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) พบว่า หญ้าหวานทั้ง 3 สายต้นมีความใกล้ชิดทางสายพันธุ์ แต่ไม่ใช่พันธุ์เดียวกัน โดยสายต้น SMOL3 มีความใกล้ชิดกับสายต้น SMOL4 มากกว่าสายต้น SMOL2 เมื่อเปรียบเทียบผลผลิต และปริมาณสารสำคัญ พบว่า หญ้าหวานทั้ง 3 สายต้น ที่ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 700 เมตร มีน้ำหนักผลผลิตสด ผลผลิตแห้ง ไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตาม สายต้น SMOL3 ให้ผลผลิตสดและแห้งสูงที่สุด แต่สายต้น SMOL2 ให้ปริมาณสารสติวิโอไซด์ และสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 7.59 กรัม/100กรัม และ 50.96 มิลลิกรัม Trolox/กรัม ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติจากสายต้นอื่น ๆ ในขณะที่พื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 1,300 เมตร ผลผลิตสด ผลผลิตแห้ง และปริมาณสารสติวิโอไซด์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยสายต้น SMOL2 ให้ผลผลิตสดที่ 618.84 กิโลกรัมต่อไร่ ผลผลิตแห้งที่ 117.10 กิโลกรัมต่อไร่ และปริมาณสารสติวิโอไซด์ที่ 7.06 กรัม/100กรัม ซึ่งสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายต้นอื่น ๆ แต่สายต้น SMOL3 มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด และแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญจากสายต้นอื่น ๆ

คำสำคัญ: หญ้าหวาน ผลผลิต ปริมาณสารสำคัญ สติวิโอไซด์

Abstract

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) is a plant which high sweetness, but non-caloric. Now, stevioside has been used incorporate it in numerous food products for conscious consumers and commonly grown in the North of Thailand. This study was investigated genetic relationship, yields, biochemical characteristics such as stevioside and antioxidant of stevia 3 clones; SMOL2 SMOL3and SMOL4. The experiments were designed to RCBD with 7 replications under 2 locations 1) farmer's field in Samoeng district (700 meters above sea level) and Chiang Mai Royal Agricultural Research Centre (Khun Wang at 1,300 meters above sea level) Chiang Mai Province. Genetic relationship was analyzed by Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) technique; the result showed all of stevia 3 clones have been closely related genetic relationship but not the same

clone. Clone SMOL3 has higher genetic similarity with SMOL4 than SMOL2. Yield and biochemical characteristics were evaluated; the results showed fresh and dry weight of all stevia clones at 700 meters above sea level was not significantly different. However, clones SMOL3 showed the highest fresh weight and dry weight, but SMOL2 gave the highest of stevioside and antioxidant at 7.59 g/100g and 50.96 mg Trolox/g, respectively and significant differences from other clones. While at 1300 meters above sea level, fresh and dry weights and stevioside were not significantly different. SMOL2 showed high fresh weight at 618.84 kg/rai, dry weight at 117.10 kg/rai, and steviside at 7.06 g/100g, but SMOL3 gave the highest antioxidant and significant differences from other clones.

Keywords: stevia, yield, biochemical characteristics, stevioside

บทนำ

หญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni) หรือ stevia เป็นพืชล้มลุกขนาดเล็กจัดอยู่ในวงศ์ Asteraceac ปัจจุบันปลูกกันมากในภาคเหนือโดยเฉพาะที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และเชียงราย เนื่องจากพืชนิดนี้ชอบอากาศค่อนข้างเย็น อุณหภูมิประมาณ 20-26 องศาเซลเซียส และเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดีเมื่อเพาะปลูกในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 600-700 เมตร (หทัยชนก, 2558) เมื่อนำใบหญ้าหวานมาสกัดด้วยน้ำจะได้สารที่ให้ความหวานมากกว่าน้ำตาลทราย 250-300 เท่า มีความคงตัวสูงทั้งในตัวทำละลายที่เป็น กรดอ่อน เบสอ่อน และทนความร้อนได้ ถึง 200 องศาเซลเซียส จึงไม่สลายตัวหรือเปลี่ยนสภาพจากความร้อนในการปรุงอาหาร ไม่มีพิษและปลอดภัยในการบริโภค (พิสมัย, 2555) ปัจจุบันมีการนำสารสกัดจากหญ้าหวานไปใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้แก่ อาหาร อาหารเสริม เครื่องดื่ม เบเกอรี่ หมากฝรั่ง ยาสีฟัน ฯลฯ ในต่างประเทศมีการอนุญาตให้ใช้สารสกัดจากหญ้าหวานเป็นสารทดแทนน้ำตาล และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ส่วนในประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขได้ออกประกาศให้มีการใช้สตีวิโอไซด์ (Stevioside) เป็นวัตถุเจือปนอาหาร (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข, 2556) อีกทั้งในปี 2560 กระทรวงสาธารณสุขได้มีการรณรงค์ให้ลดการบริโภคน้ำตาลของคนไทย รวมถึงผู้บริโภคหันมาใส่ใจในเรื่องของสุขภาพมากขึ้น ส่งผลให้ผู้ประกอบการในระบบอุตสาหกรรมอาหารทุกระดับ มีการคิดค้น พัฒนา และปรับปรุงสูตรผลิตภัณฑ์อาหารให้มีการลดการใช้ปริมาณน้ำตาลซูโครสลง และนำสารให้ความหวานแทนน้ำตาลมาใช้แทนมากขึ้น ส่งผลให้การใช้สารให้ความหวานแทนน้ำตาลได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นอย่างกว้างขวาง Libik-Konieczny และคณะ (2018) กล่าวว่า หญ้าหวานแต่ละสายพันธุ์มีลักษณะแตกต่างกันออกไป เช่น ขนาดของใบ ระยะเวลาการออกดอก และความเข้มข้นของสติวิออลไกลโคไซด์ รวมถึงปริมาณสารประกอบฟีนอลลิก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะทางจีโนไทป์ และสภาพแวดล้อมที่ปลูก จากการตรวจเอกสารด้านการศึกษาข้อมูลทางด้านการเกษตรของหญ้าหวานในไทยนั้นมีน้อยมาก ซึ่ง บุญฤทธิ์ และ สมยศ (2560) ได้ศึกษาผลของการตัดช่อดอกที่มีต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของหญ้าหวาน พบว่า การตัดช่อดอกจำนวนบ่อยครั้งที่สุดมีการเจริญเติบโตทางลำต้น การสะสมน้ำหนักต้น ใบและรากแห้งมากที่สุด ส่วนหญ้าหวานที่ไม่ได้ทำการตัดช่อดอกออก มีการเจริญเติบโต และการสะสมน้ำหนักแห้งน้อยที่สุด สำหรับการศึกษาและการพัฒนาสายพันธุ์หญ้าหวานนั้น สุพัฒธณกิจ และคณะ (2563) ได้รวบรวมหญ้าหวานที่ได้จากการสำรวจเขตภาคเหนือตอนบนในปี 2559 สามารถแยกลักษณะความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาได้ 4 กลุ่มลักษณะ คือ 1) กลุ่มใบใหญ่มีขน (BLHS) 2) กลุ่มยอดอ่อนสีม่วง (PYSS) 3) กลุ่มใบแคบยาว (ไต้หวัน, LNLS) และ 4) กลุ่มทรงพุ่มเล็ก (SSS) ในด้านการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหญ้าหวานจำนวน 4 กลุ่ม พบว่า มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมทั้งหมด จึงได้คัดเลือกหญ้าหวานในกลุ่มใบใหญ่มีขน (BLHS) 2) กลุ่มยอดอ่อนสีม่วง (PYSS) 3) กลุ่มใบแคบยาว (ไต้หวัน, LNLS) มาดำเนินการทดสอบเปรียบเทียบต่อเนื่องจากเป็นหญ้าหวานในกลุ่มที่เกษตรกรนิยมปลูกมากที่สุด ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเพื่อหาความใกล้ชิดหรือความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยใช้เทคนิค RAPD และเปรียบเทียบผลผลิตและปริมาณสารสำคัญของหญ้าหวานสายพันธุ์คัดเลือกที่เจริญเติบโตได้ดีในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหญ้าหวานสายพันธุ์คัดเลือกด้วยเทคนิค Random Amplification of

Polymorphic DNA (RAPD) สกัดดีเอ็นเอหญ้าหวานทั้ง 3 สายต้นด้วยวิธี PVP extraction method (ปรับใช้จาก Kim *et al*., 1997) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วย ไพรเมอร์ RAPD จำนวน 11 ไพรเมอร์ (Table 1) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส ประกอบ ด้วย 3 ขั้นตอน (Table 2) แล้วตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 % วิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ของหญ้าหวานแต่ละสายต้น โดยนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอนเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส มาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงในระดับพันธุกรรม โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS 2.11a จากนั้นหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยสร้างแผนภูมิต้นไม้โดยวิธี Neighbor-joining (NJ) ด้วยโปรแกรม Unweighted Pair Group Method with Arithmetic average (UPGMA)

Table 1 RAPD primers used for amplification of Stevia genomic DNA in this study

No.	Primer name	Sequence
1	OPA-01	CAGGCCCTTC
2	OPA-02	TGCCGAGCTG
3	OPA-14	CTCGTGCTGG
4	OPB-08	GTCCACACGG
5	OPB-12	CCTTGACGCA
6	OPD-18	GAGAGCCAAC
7	OPA-03	AGTCAGCCAC
8	OPB-10	CTGCTGGGAC
9	OPB-15	GGAGGGTGTT
10	OPD-09	CTCTGGAGAC
11	OPD-20	ACCCGGTCAC

Table 2 Optimized conditions for PCR amplifications

Steps involved (temperature °C)	Time	No. of cycles
Initial denaturation (94 °C)	5 min	1
Denaturation (94 °C)	30 s	39
Annealing (34 °C)	40 s	
Extension (72 °C)	1 min 15 s	
Final extension (72 °C)	7 min	1

2. ปลูกทดสอบหญ้าหวาน จำนวน 3 สายต้น ได้แก่ สายต้น SMOL2 SMOL3 และ SMOL4 ในจังหวัดเชียงใหม่ พื้นที่อำเภอสะเมิง ที่ความสูง 700 เมตร จากระดับน้ำทะเล และศูนย์วิจัยเกษตรหลวงหน่วยย่อยขุนวาง ที่ความสูง 1,300 เมตร ดำเนินการทดสอบในช่วงเดือนพฤษภาคม 2566 ถึง เดือนมีนาคม 2567 วางแผนการทดลองแบบบล็อกสุ่มสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design : RCB) จำนวน 3 กรรมวิธี (สายต้น) กรรมวิธีละ 7 ซ้ำ ๆ ละ 144 ต้น (จำนวน 4 แถว ๆ ละ 36 ต้น) พื้นที่เก็บเกี่ยว 8 ตารางเมตร ระยะปลูก 25 × 25 เซนติเมตร (กรมวิชาการเกษตร, 2565) เมื่อพืชอายุ 135 วันหลังปลูก ดำเนินการเก็บข้อมูลผลผลิต ได้แก่ น้ำหนักผลผลิตใบสด และน้ำหนักผลผลิตใบแห้ง

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารสติวิโอไซด์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง เตรียมตัวอย่างดัดแปลงจากวิธีของ Woelwer-Rieck และคณะ (2010) ชั่งใบหญ้าหวานแห้งที่บดเป็นผงละเอียดมา 0.5 กรัม ลงในหลอดปั่นแยก (centrifuge

tube) ขนาด 10 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปราศจากไอออน (deionized water) 8 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำตัวอย่างออกมาตั้งทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิปกติ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร สกัดซ้ำแบบเดิมอีก 2 ครั้ง ปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นกรองสารละลายตัวอย่างด้วย nylon filter ขนาดความละเอียด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำสารที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง โดยใช้คอลัมน์ C-18 ขนาด 4.6 × 150 มิลลิเมตร 5 ไมครอน (Sunfire C18 , Waters) ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียสในการแยกสาร ตรวจวัด ด้วยเครื่องตรวจวัดชนิดโฟโตไดโอดอาเรย์ (Photodiode Array) ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร แล้วคำนวณหาปริมาณสารสติวิโอไซด์ เทียบกับสารละลายมาตรฐานสติวิโอไซด์ ในช่วงความเข้มข้น 5 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ปริมาณสติวิโอไซด์ในตัวอย่างหญ้าหวานแห้ง ในหน่วยร้อยละ (g/100g DW)

4. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (DPPH antioxidant assay) สกัดใบหญ้าหวานดัดแปลงจากวิธีของ Prommajak และคณะ (2014) โดยชั่งผงตัวอย่างใบหญ้าหวานที่บดละเอียดมาตัวอย่างละ 0.5 กรัม ลงในหลอดที่มีฝาปิดขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารสกัดเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วกรองสารละลายที่ได้ ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และนำสารละลายที่สกัดได้ไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องกลั่นระเหยแบบสุญญากาศ (rotary evaporator) และละลายสารสกัดหยาบด้วยสารละลาย DMSO ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นทดสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีดีพีพีเอช (DPPH radical scavenging) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Singh และคณะ (2002) โดยเตรียมสารละลายตัวอย่างสารสกัดใบหญ้าหวานให้มีความเข้มข้น 0.1-0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย DMSO และเติมสารละลาย DPPH เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเตรียมสารละลายควบคุมโดยใช้ DMSO ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย DPPH เช่นเดียวกันกับสารละลายตัวอย่าง ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมได้ มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ด้วยสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณร้อยละการยับยั้ง ดังสมการ

$$\%\text{DPPH radical scavenging activity} = \{(A_{ctrl} - A_{sample})/A_{ctrl}\} \times 100$$

เมื่อ A_{ctrl} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม

A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลผลผลิตของหญ้าหวานแต่ละสายต้นโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance; ANOVA) ตามการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีด้วยวิธี Least significant difference (LSD) และการวิเคราะห์ข้อมูลปริมาณสารสติวิโอไซด์ และสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance; ANOVA) ตามการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีด้วยวิธี Least significant difference (LSD)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอของหญ้าหวานทั้ง 3 สายต้น มาวิเคราะห์และคำนวณหาค่าดัชนี โดยการนำผลที่ได้จากขั้นตอนการทำ PCR มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เพื่อสร้างเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความใกล้ชิดอยู่ในช่วง 0.43 – 0.64 โดยหญ้าหวานสายต้น SMOL2 มีค่าดัชนีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับสายต้น SMOL3 ที่ 0.43 และมีค่าดัชนีความใกล้ชิดกันกับสายต้น SMOL4 ที่ 0.55 ในขณะที่หญ้าหวานสายต้น SMOL3 มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับสายต้น SMOL4 ที่ 0.62 (Table 3 and Figure 1) แสดงให้เห็นว่าหญ้าหวานทั้ง 3 สายต้นมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม แต่ไม่ใช่พันธุ์เดียวกัน และหญ้าหวานสายต้น SMOL3 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับสายต้น SMOL4 มากกว่าสายต้น SMOL2 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ สุพัฒธณกิจ และคณะ (2563) ที่สำรวจและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหญ้า

หวานได้รายงานว่าสามารถแยกลักษณะความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยาได 4 กลุ่มลักษณะ และได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางด้านพันธุกรรมของหญ้าหวานจำนวน 4 กลุ่ม พบว่า มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมทั้งหมด

Table 3 Similarity matrix table of *S. rebaudiana* 3 samples

Samples	SMOL2	SMOL3	SMOL4
SMOL2	1		
SMOL3	0.428	1	
SMOL4	0.547	0.642	1

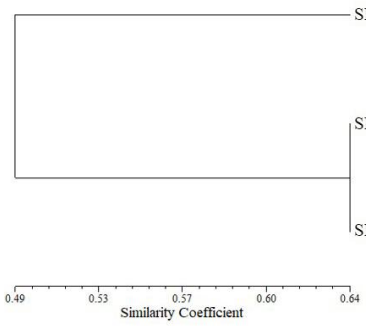

Figure 1 Dendrogram shows the results of DNA band analysis of 3 Stevia using NTSYSpc version 2.11a program

ผลผลิตรวมที่เก็บเกี่ยวจำนวน 5 ครั้ง ในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2566-เดือนมีนาคม 2567 และปริมาณสารสติวิโอไซด์ของหญ้าหวานสายพันธุ์คัดเลือกปลูกที่ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 700 เมตร พบว่า ผลผลิตน้ำหนักใบสดและน้ำหนักใบแห้งต่อไร่ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยที่หญ้าหวานสายต้น SMOL3 มีผลผลิตใบสดต่อไร่มากที่สุด คือ 1,178.70 กิโลกรัมต่อไร่ รองลงมาคือ สายต้น SMOL2 และสายต้น SMOL4 คือ 1,145.40 และ 1,139.90 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ และหญ้าหวานสายต้น SMOL3 ให้ผลผลิตน้ำหนักแห้งต่อไร่มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสายต้นอื่น ๆ ที่ปลูกในพื้นที่เดียวกัน รองลงมา คือ สายต้น SMOL4 และ SMOL2 คือ 178.94, 172.61 และ 170.00 กิโลกรัมต่อไร่ ทั้งนี้หญ้าหวานสายพันธุ์คัดเลือกทั้ง 3 สายต้น มีปริมาณสารสติวิโอไซด์แตกต่างกันทางสถิติ โดยหญ้าหวานสายต้น SMOL2 มีปริมาณสารมากที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติกับหญ้าหวานสายต้น SMOL3 คือ 7.59 และ 7.26 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่หญ้าหวานสายต้น SMOL4 มีปริมาณของสารสติวิโอไซด์น้อยที่สุด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับสายต้น SMOL3 คือ 7.01 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม (Table 4) และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของหญ้าหวานทั้ง 3 สายต้นที่วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH โดยสายต้น SMOL2 มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาคือ สายต้น SMOL3 และ SMOL4 ซึ่งมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระที่ 50.96, 45.77 และ 37.49 mg Trolox/g (Table 4)

ผลผลิตรวมที่เก็บเกี่ยวจำนวน 5 ครั้ง ในช่วงเดือนพฤศจิกายน 2566-เดือนมีนาคม 2567 ปริมาณสารสติวิโอไซด์ และปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระของหญ้าหวานสายพันธุ์คัดเลือกปลูกที่ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 1,300 เมตร พบว่า ผลผลิตน้ำหนักสด น้ำหนักแห้ง และปริมาณสารสติวิโอไซด์ของหญ้าหวานทั้ง 3 สายต้น ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยที่สายต้น SMOL2 ให้ผลผลิตน้ำหนักสด และผลผลิตน้ำหนักแห้งสูงที่สุด คือ 618.84 และ 117.10 กิโลกรัมต่อไร่ รองลงมาคือ หญ้าหวานสายต้น SMOL4 และ SMOL3 ที่ให้ผลผลิตใบสดที่ 506.74 และ 464.50 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ และผลผลิตน้ำหนักแห้งที่ 106.41 และ 98.70 กิโลกรัมต่อไร่ ตามลำดับ ส่วนปริมาณสารสติวิโอไซด์ พบว่า หญ้าหวานสายต้น SMOL2 ให้ปริมาณสารสติวิโอไซด์มากที่สุด คือ 7.06 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือสายต้น SMOL4 และ SMOL3 ที่มีปริมาณสารสติวิโอไซด์ 7.00 และ 6.80 กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้ง 3 สายต้นแตกต่างกันทางสถิติ โดยสายต้น SMOL3 มีปริมาณสูงที่สุดแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับสายต้นอื่น ๆ คือ มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ 48.88 mg

Trolox/g รองลงมาคือ สายต้น SMOL4 และ SMOL2 คือ 39.59 และ 17.63 mg Trolox/g ตามลำดับ (Table 4) จากการทดสอบ พบว่า ปริมาณของสารสติวิโอไซด์ในหญ้าหวานทั้ง 3 สายต้น ที่ปลูกในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 700 เมตร ให้ปริมาณสารสติวิโอไซด์มากกว่าพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 1,300 เมตร ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณสารสติวิโอไซด์ที่สะสมในใบหญ้าหวานขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ช่วงแสง อุณหภูมิ และปริมาณธาตุอาหารที่ได้รับ นอกจากนั้นแล้วเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความสูญเสียของน้ำหนัก พบว่า ผลผลิตของของหญ้าหวานที่ปลูกในพื้นที่ 1,300 เมตรจากระดับน้ำทะเล มีเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้อยกว่าหญ้าหวานที่ปลูกในพื้นที่ 700 เมตรจากระดับน้ำทะเล เนื่องจากชีวมวลของใบและความเข้มข้นของปริมาณสารขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโต การจัดการและการดูแลรักษา (Pal *et al*. 2015) Kang และ Lee (1981) กล่าวว่า สภาพภูมิอากาศมีผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างสารทุติยภูมิของหญ้าหวาน พื้นที่ 1,300 เมตรจากระดับน้ำทะเล มีอุณหภูมิต่ำกว่า ส่งผลให้การสะสมอาหารมากกว่า น้ำหนักแห้งจึงสูงกว่า และเนื่องจากหญ้าหวานเป็นพืชวันสั้นที่มีช่วงวันวิกฤตที่ 13-14 ชั่วโมง เมื่อหญ้าหวานอยู่ในสภาพวันที่ขึ้นยาวจะส่งผลให้ชีวมวลของใบและปริมาณสารสติวิโอไซด์เพิ่มมากขึ้น ในทางเดียวกัน Guerrero และคณะ (2018) กล่าวว่า ปริมาณสารสตีวิออลไกลโคไซด์ของหญ้าหวานที่ปลูก 2 แหล่งแตกต่างกัน ในขณะที่การเจริญเติบโตและช่วงของการเก็บเกี่ยวไม่แตกต่างกัน

Table 4 Total fresh leaves and dry leaves weight per rai which harvesting 5 times and Content of stevioside and DPPH in three promising stevia clones cultivated in Chiang Mai province at 700 and 1,300 meters above sea level.

Promising line	Yield/rai (kg)				Stevioside content (g/100g DW)		Antioxidant capacity (mg Trolox/g)	
	Fresh leaves		Dry leaves					
	700 m.	1,300 m.	700 m.	1,300 m.	700 m.	1,300 m.	700 m.	1,300 m.
SMOL2	1145.4	618.84	170.00	117.10	7.59^{a}	7.06	50.96^{a}	17.63^{c}
SMOL3	1178.7	464.50	178.94	98.70	7.26^{ab}	6.80	45.77^{b}	48.88^{a}
SMOL4	1139.9	506.74	172.61	106.41	7.01^{b}	7.00	37.49^{c}	39.59^{b}
C.V. (%)	12.86	33.58	11.57	39.69	3.73	6.24	0.70	8.26

Means within the same column followed by the same letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

สรุปผล

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของหญ้าหวานสายพันธุ์คัดเลือกจำนวน 3 สายต้น พบว่า หญ้าหวานทั้ง 3 สายต้นไม่ได้เป็นพันธุ์เดียวกัน แต่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม โดยที่สายต้น SMOL3 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับสายต้น SMOL4 มากกว่าสายต้น SMOL2 และเมื่อทดสอบเปรียบเทียบผลผลิต ปริมาณสารสติวิโอไซด์ และสารต้านอนุมูลอิสระของหญ้าหวานสายพันธุ์คัดเลือกจำนวน 3 สายต้น ได้แก่ SMOL2 SMOL3 และ SMOL4 ที่ปลูกทดสอบในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลที่แตกต่างกัน พบว่า หญ้าหวานสายต้น SMOL2 เหมาะสมกับการปลูกในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 700 และ 1,300 เมตร และหากต้องการหญ้าหวานที่มีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงในพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 1,300 เมตร พบว่า สายต้น SMOL3 มีศักยภาพมากที่สุด

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) สำหรับแหล่งทุนสนับสนุนงานวิจัยในการวิจัยและพัฒนาการผลิตหญ้าหวาน ศูนย์วิจัยเกษตรหลวงเชียงใหม่ สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร เกษตรกรสำหรับสถานที่ในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่สนับสนุนการทำงานวิจัยให้สำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2565. เทคนิคทางสถิติในการปฏิบัติงานวิจัย. พิมพ์ครั้งที่5. สำนักพิมพ์เกินคุ้ม มีเดีย,นนทบุรี. 51 หน้า.

บุญฤทธิ์ ชุมทอง และ สมยศ เดชภิรัตนมงคล. 2560. ผลของการตัดช่อดอกที่มีต่อการเจริญเติบโต และผลผลิตของหญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni). วารสารแก่นเกษตร 45 (พิเศษ 1): 195-199.

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง สตีวิออลไกลโคไซด์ (ฉบับที่ 360) พ.ศ. 2556 ประกาศ ณ วันที่ 8 กรกฎาคม พ.ศ. 2556. คัดจากราชกิจจานุเบกษา เล่ม 130 ตอนพิเศษ 91 ง วันที่ 31 กรกฎาคม 2556

พิสมัย กุลกาญจนาธร. 2555. หญ้าหวาน หวานทางเลือก เพื่อสุขภาพ. ภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 3 หน้า

สุพัฒธณกิจ โพธิ์สว่าง, พัชธาวดี ขุนไกร, เกษม ทองขาว, จันทร์เพ็ญ แสนพรหม, พิจิตร ศรีปินตา, ลัดดาวัลย์ อินทร์สังข์ และสายชล โนสุวรรณ. 2563. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเปรียบเทียบปริมาณสารสำคัญของหญ้าหวาน. วารสารผลิตกรรมการเกษตร 2(1): 67-78.

หทัยชนก กันตรง. 2558. หญ้าหวาน สมุนไพรที่มีรสหวาน แต่เปี่ยมไปด้วยคุณค่า. อาหาร 45(3): 41-44.

Guerrero, A. B., Leticia, S. E., Itziar, D., Ignacio, I. and Julio, M. 2018. Steviol glycoside content dynamics during the growth cycle of *Stevia rebaudiana* Bert. American Journal of Plant Sciences 9: 892-901.

Kang, KH and Lee, FW. 1981. Physio-ecological studies on Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Korean Journal of Crop Science 26: 69–89.

Kim, C. S., Lee, C. H., Shin, J. S., Chung, Y. S. and Hyung, N. I. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. Nucleic Acids Research 25(5): 1085–1086.

Libik-Konieczny, M., Ewa, C., Edyta, K., Michal, D., Aleksandra, G. J., Elwira, S., and Laura, P. 2018. Growth, development and steviol glycosides content in the relation to the photosynthetic activity of several *Stevia rebaudiana* Bertoni strains cultivated under temperate climate conditions. Scientia Horticulturae 234: 10-18.

Pal, P. K., Rajender, K., Vipan, G., Mitali, M., Ramdeen, P., Vijaylata, P., Baljinder, S. G., Devinder, S., Gopi C., Bikram, S., Rakesh, D. S. and Paramvir, S. A. 2015. Crop-ecology and nutritional variability influence growth and secondary metabolites of *Stevia rebaudiana* Bertoni. BMC Plant Biology 15(67): 1-16.

Prommajak, T., Surawang, S. and Rattanapanone, N. 2014. Ultrasonic-assisted extraction of phenolic and antioxidative compounds from lizard tail (*Houttuynia cordata* Thunb). Songklanakarin Journal of Science and Technology 36(1): 65-72.

Singh, R.P., K.N.C., Murty. and Jayaprakasha, G.K. 2002. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(1): 81-86.

Woelwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrzum, A. and Wust, M. 2010. Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. European Food Research and Technology 231: 581-588.

องค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยของปุดช้อนทองและปุดช้างจากประเทศไทย

Essential Oil Components of *Etlingera pauciflora* (Ridl.) R.M.Sm. and *E. littoralis* (König) Giseke from Thailand

อภิญญา วงศ์เปี้ย[1*] ธีรภัทร เหลืองศุภบูลย์[1] และ ชลลดา สามพันพวง[1]

Wongpia, A.[1*], Luangsuphabool, T.[1] and Samphunphuang, C.[1]

[1]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

[1]Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Rangsit, Thanyaburi, Pathum Thani 12110

**Corresponding author: aphinya.wongpia@gmail.com*

บทคัดย่อ

พืชสกุลปุดเป็นพืชสมุนไพรล้มลุกอายุหลายปีที่จัดอยู่ในวงศ์ขิง พืชสกุลปุดหลายชนิดมีการนำไปใช้เป็นอาหารและยาพื้นบ้าน อย่างไรก็ตามอีกหลายชนิดยังไม่เป็นที่รู้จักมากนักทั้งด้านสรรพคุณเชิงบำบัดและการนำไปใช้ประโยชน์ ด้วยเหตุนี้จึงได้ศึกษาองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยของพืชสกุลปุด 2 ชนิด ได้แก่ ปุดช้อนทอง (*E. pauciflora*) และปุดช้าง (*E. littoralis*) ที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดสตูล โดยสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบและลำต้นของพืชแล้ววิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี น้ำมันหอมระเหยของปุดช้อนทองมีเบต้า-ไพนีน (68.21%) และแอลฟา-ไพนีน (16.34%) เป็นองค์ประกอบหลัก ขณะที่องค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยที่ตรวจพบในปุดช้าง ได้แก่ 1,8-ซินิออล (20.55%) เบต้า-ไพนีน (18.42%) แอลฟา-ไพนีน (15.65%) และซาบินีน (13.69%) องค์ประกอบที่วิเคราะห์ได้เหล่านี้เกี่ยวข้องกับสรรพคุณเชิงบำบัดของชนิดพืชสกุลปุด อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันหอมระเหยเพื่อพิสูจน์สรรพคุณทางยาของพืชสกุลปุดทั้ง 2 ชนิดก่อนที่จะส่งเสริมการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

คำสำคัญ: พืชสกุลปุด พืชวงศ์ขิง จังหวัดสตูล แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี

Abstract

Etlingera is a genus of herbaceous perennial plants belonging to the Zingiberaceae family. Several species of *Etlingera* have been used as foods and folk medicines. However, many species do not know their therapeutic properties and application widely. Hence, the volatile oil compositions of two *Etlingera* species including *E. pauciflora* and *E. littoralis*, which were collected from Satun province, were studied. The essential oils of leaves and stems of plant samples were extracted using the hydrodistillation method and then analyzed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The *E. pauciflora* essential oil contained β-pinene (68.21%) and α-pinene (16.34%) as major components, whereas the dominant constituents detected in *E. littoralis* volatile oil were 1,8-cineole (20.55%), β-pinene (18.42%), α-pinene (15.65%), and sabinene (13.69%). These identified compounds would relate to the therapeutic attributes of *Etlingera* species. However, the bioactivities of their volatile oils need to be further investigated to prove their medicinal properties before being promoted to their application in the future.

Keywords: *Etlingera*, Zingiberaceae, Satun Province, Gas Chromatography-Mass Spectrometry

บทนำ

สกุลปุด (*Etlingera*) จัดเป็นหนึ่งในพืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) ที่มีความหลากหลายของชนิดมากที่สุดถึง 150-200 ชนิด และพบการกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางตั้งแต่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตอนเหนือของออสเตรเลีย หมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก อเมริกากลาง ไปจนถึงหมู่เกาะในอ่าวกินีของทวีปแอฟริกา (Poulsen, 2012; Yeats, 2013) พืชสกุลปุดเป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปีที่มีความสูงของต้นไม่เกิน 50 เซนติเมตร จนกระทั่งสูงถึงเกือบ 10 เมตร โดยปุดชนิดที่มีขนาดใหญ่จะมีลำต้นเทียม (leafy shoot) ที่แข็งแรงซึ่งเจริญเติบโตมาจากเหง้าที่อยู่ใต้ดิน (Yeats, 2013; Trimanto and Hapsari, 2018) ปุดหลายชนิดได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ตามวิถีชาวบ้านและเชิงพาณิชย์ทั้งเป็นอาหาร สมุนไพร ยารักษาโรค และไม้ดอกไม้ประดับ (Poulsen, 2012)

สำหรับประเทศไทยได้มีรายงานการค้นพบพืชสกุลปุดทั้งหมด 17 ชนิด (Mood and Ibrahim, 2000; Khaw, 2001; Kittipanangkul and Ngamriabsakul, 2008; Chongkraijak *et al*., 2013; Saensouk *et al*., 2016) แต่ส่วนใหญ่เป็นที่รู้จักและนำมาใช้ประโยชน์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น ตัวอย่างเช่น ดาหลา (*E. elatior* (Jack) R. M. Smith) ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดีและมีการนำไปใช้ประโยชน์มากที่สุดโดยทั้งเป็นอาหาร เครื่องดื่ม เวชสำอาง ตลอดจนเป็นไม้ดอกไม้ประดับ ปุดช้าง (*E. littoralis* (König) Giseke) และเร่วหอม (*E. pavieana* (Pierre ex Gagnep.) R.M. Smith) นำผลและหน่ออ่อนมารับประทานและใช้เป็นยาขับลม แก้ปวดท้อง อาหารไม่ย่อย แก้ท้องอืด ท้องเฟ้อ แก้โรคกระเพาะอาหาร และแก้อาหารเป็นพิษ สำหรับกะลาขี้แมว (*E. maingayi* (Baker) R.M. Smith) จะนำดอกมารับประทานเป็นพืชผัก เป็นต้น (Sirirugsa, 1997; Larsen *et al*., 1999)

พืชสกุลปุดอุดมไปด้วยพฤกษเคมีที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพด้านต่าง ๆ เช่น ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลินทรีย์ เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนส ยับยั้งความชรา และปกป้องตับ เป็นต้น ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้สัมพันธ์กับชนิดและปริมาณของพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบในพืชสกุลปุด (Chan *et al*., 2013; Ghasemzadeh *et al*., 2015) จากรายงานของ Chiang และคณะ (2010) สามารถวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบพืชสกุลปุด 4 ชนิด ได้แก่ ปุดใบลาย (*E. rubrostriata*) ดาหลา (*E. elatior*) ดาหลาปากนกแก้ว (*E. fulgens*) และดาหลาขี้แมว (*E. maingayi*) ที่พบในประเทศมาเลเซีย ได้เท่ากับ 23, 15, 11, และ 4 ชนิดตามลำดับ โดยพฤกษเคมีที่พบในน้ำมันหอมระเหยส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มเทอร์พีน (terpenes) และอนุพันธ์ กรดไขมัน เอสเทอร์ และแอลกอฮอล์ ขึ้นอยู่กับชนิดพืชสกุลปุด นอกจากนี้น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากพืชสกุลปุดทั้ง 4 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, และ *Staphylococcus aureus* ข้อมูลพฤกษเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชสกุลปุดทั้ง 4 ชนิดนี้แสดงให้เห็นถึงสรรพคุณของพืชสกุลปุดที่มีศักยภาพในนำไปใช้ประโยชน์เชิงสุขภาพและเภสัชบำบัดได้

งานวิจัยนี้ได้สำรวจพืชสกุลปุดในจังหวัดสตูล ซึ่งเป็นหนึ่งในพื้นที่ภาคใต้ตอนล่างที่มีความหลากหลายทางชีวภาพของพืชสูง โดยเก็บตัวอย่างปุดข้อนทอง (*E. pauciflora* (Ridl.) R.M. Smith) และปุดช้างจาก ต.วังประจัน อ.ควนโดน จ.สตูล มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโทรเมตรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS) เพื่อระบุชนิดพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักและสืบค้นฤทธิ์ทางชีวภาพ สำหรับเป็นแนวทางการพัฒนาต่อยอดการใช้ประโยชน์จากพืชสกุลปุดทั้ง 2 ชนิด

อุปกรณ์และวิธีการ

สำรวจพืชสกุลปุดใน ต.วังประจัน อ.ควนโดน จ.สตูล คัดเลือกใบและก้านของพืชสกุลปุด 2 ชนิด ได้แก่ ปุดข้อนทองและปุดช้าง มาล้างให้สะอาด ผึ่งให้แห้ง หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วชั่งน้ำหนัก 750 กรัม ก่อนนำไปสกัดน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีต้มกลั่น (hydrodistillation) โดยใช้ชุดสกัด clevenger type apparatus กำจัดน้ำที่ปนมา ก่อนเก็บน้ำมันหอมระเหยที่ได้ใส่ขวดแก้วสีชา คำนวณเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้ (%yield) จากนั้นกรองน้ำมันหอมระเหยผ่านตัวกรอง (filter membrane) ขนาดรูพรุน 0.2 ไมโครเมตร แล้ววิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยด้วยเครื่อง GC-MS (Agilent Technologies, Model 6890 N, Quadrupole Mass Selective Detector Model 5973 inert) โดยใช้คอลัมน์ HP-5MS (30 m x 0.25 mm, film thickness 0.25 µm) ฉีดตัวอย่างแบบ pulse split (split ratio, 20:1) ที่อุณหภูมิเท่ากับ 230°C สภาวะคอลัมน์เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 50°C แล้วเพิ่มขึ้นในอัตรา 4°C ต่อนาทีจนถึง 230°C โดยใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา (11.01 psi, flow 1.2 mL/min)

ตรวจวัดด้วยเครื่อง MSD (EI 70 eV, scan mode, 40-400 amu) และวิเคราะห์ชนิดขององค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยเทียบกับฐานข้อมูลของ Wiley 7n และ Adams (2001) โดยใช้ 90% quality match

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ประเทศไทยได้มีการสำรวจความหลากหลายของพืชสกุลปุดในพื้นที่ต่าง ๆ รวมถึงปุดช้อนทองและปุดช้าง โดยมีรายงานการค้นพบปุดช้อนทองเป็นครั้งแรกในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2543 ในพื้นที่ อ.แว้ง จ.นราธิวาส และ อ.เบตง จ.ยะลา (Maknoi and Sirirugsa, 2002) ส่วนปุดช้างนั้นมีรายงานการค้นพบเป็นครั้งแรกในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2322 ณ จ.ภูเก็ต (Burtt and Smith, 1986) และต่อมาก็พบการกระจายพันธุ์อยู่เกือบทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ รวมถึงภาคใต้ทั้งฝั่งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน (Chongkraijak *et al*., 2013) งานวิจัยนี้ได้รายงานการค้นพบปุดช้อนทองและปุดช้างเป็นครั้งแรกใน จ.สตูล ซึ่งอยู่ในเขตภาคใต้ตอนล่างอันเป็นส่วนหนึ่งของแหลมมลายูที่มีความหลากหลายทางชีวภาพของพืชสูงเนื่องจากมีระบบนิเวศเป็นป่าดิบชื้นและป่าฝนเขตร้อน โดยดำเนินการสำรวจและเก็บตัวอย่างปุดช้อนทองและปุดช้างจากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติในพื้นที่ ต.วังประจัน อ.ควนโดน จ.สตูล (Figure 1A-C) ซึ่งพบว่าปุดทั้ง 2 ชนิดมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่คล้ายคลึงกันโดยเฉพาะส่วนของใบและลำต้นเทียม อย่างไรก็ตามสามารถจำแนกปุดทั้ง 2 ชนิดได้จากลักษณะดอก โดยปุดช้อนทองจะมีกลีบดอกสีส้มขอบแดง ช่อดอกประกอบด้วยดอกย่อย 2-5 ดอก ส่วนปุดช้างจะมีกลีบดอกหลายเฉดสีตั้งแต่ขาวอมชมพู แดงขอบเหลือง และแดงขอบส้ม ช่อดอกประกอบด้วยดอกย่อย 4-12 ดอกที่บานพร้อมกัน อย่างไรก็ตามควรมีการจัดจำแนกในระดับชีวโมเลกุลเพื่อยืนยันผลวิเคราะห์ทางพฤกษศาสตร์และเพื่อระบุเอกลักษณ์ของปุดแต่ละชนิด

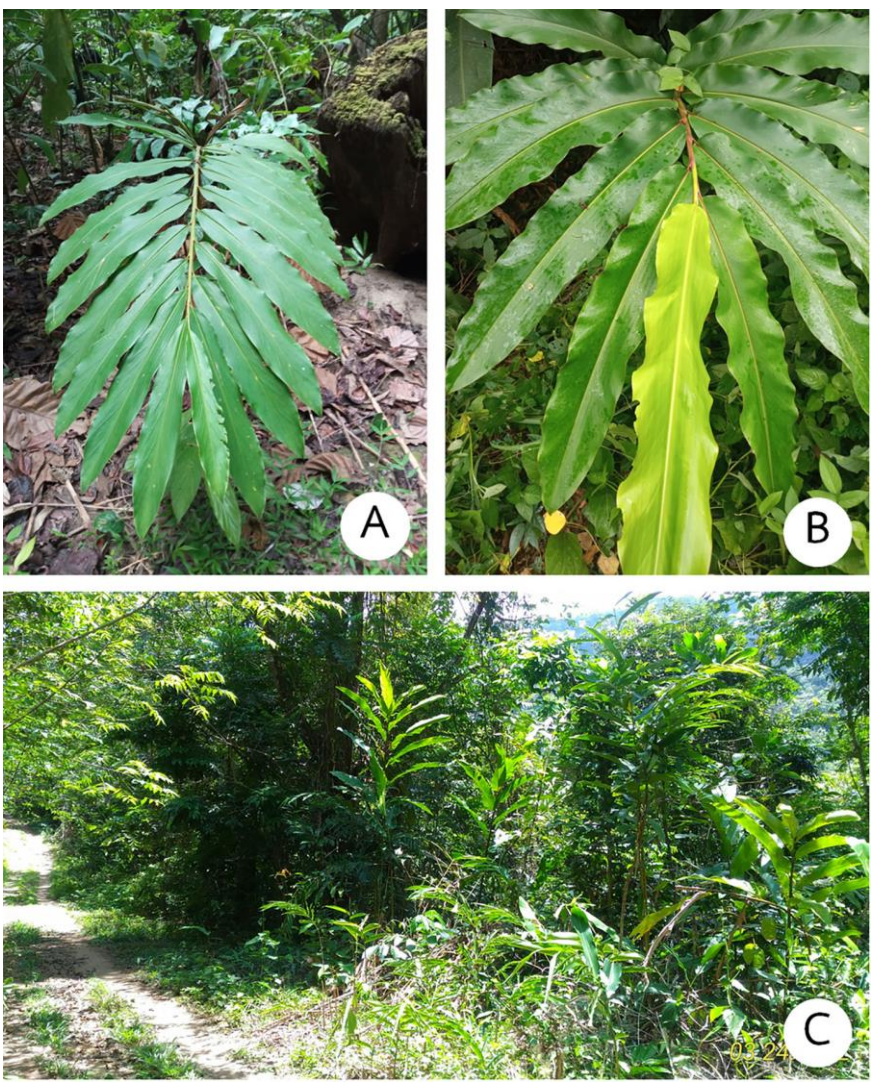

Figure 1 Leafy shoots and leaves of *E. pauciflora* (A) and *E. littoralis* (B) collected from their native habitat in the lower part of southern Thailand (C)

ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบและลำต้นเทียมของปุดช้อนทองและปุดช้างด้วยวิธีต้มกลั่น ได้น้ำมันหอมระเหยใสสีเหลืองอ่อนและมีกลิ่นหอม โดยปุดช้อนทองและปุดช้างได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 0.15 และ 0.13 มิลลิลิตรเทียบต่อน้ำหนักสดตามลำดับ ซึ่งถือว่าได้ปริมาณที่ใกล้เคียงกัน และใกล้เคียงกับปริมาณน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบและลำต้นเทียมของปุดช้างที่พบในประเทศมาเลเซียที่สกัดได้ 0.2 มิลลิลิตรเทียบต่อน้ำหนักที่เท่ากัน (Wong *et al*., 2010) น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จะนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยเทคนิค GC-MS ผลการวิเคราะห์แสดงในรูปของโครมาโทแกรม (chromatogram) ดังภาพที่ 2 (Figure 2) จะเห็นได้ว่าน้ำมันหอมระเหยจากปุดช้อนทองและปุดช้างมีรูปแบบโครมาโทแกรมที่แตกต่างกัน แต่มีช่วงแรกที่คล้ายคลึงกันซึ่งส่วนใหญ่เป็นองค์ประกอบหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหย โดยสามารถระบุชนิดพฤกษเคมีเทียบกับฐานข้อมูล (library) ได้ 8 และ 16 ชนิด จากปริมาณ 96.05% และ 89.95% ขององค์ประกอบทั้งหมดที่พบในน้ำมันหอมระเหยของปุดช้อนทองและปุดช้างตามลำดับ (Table 1)

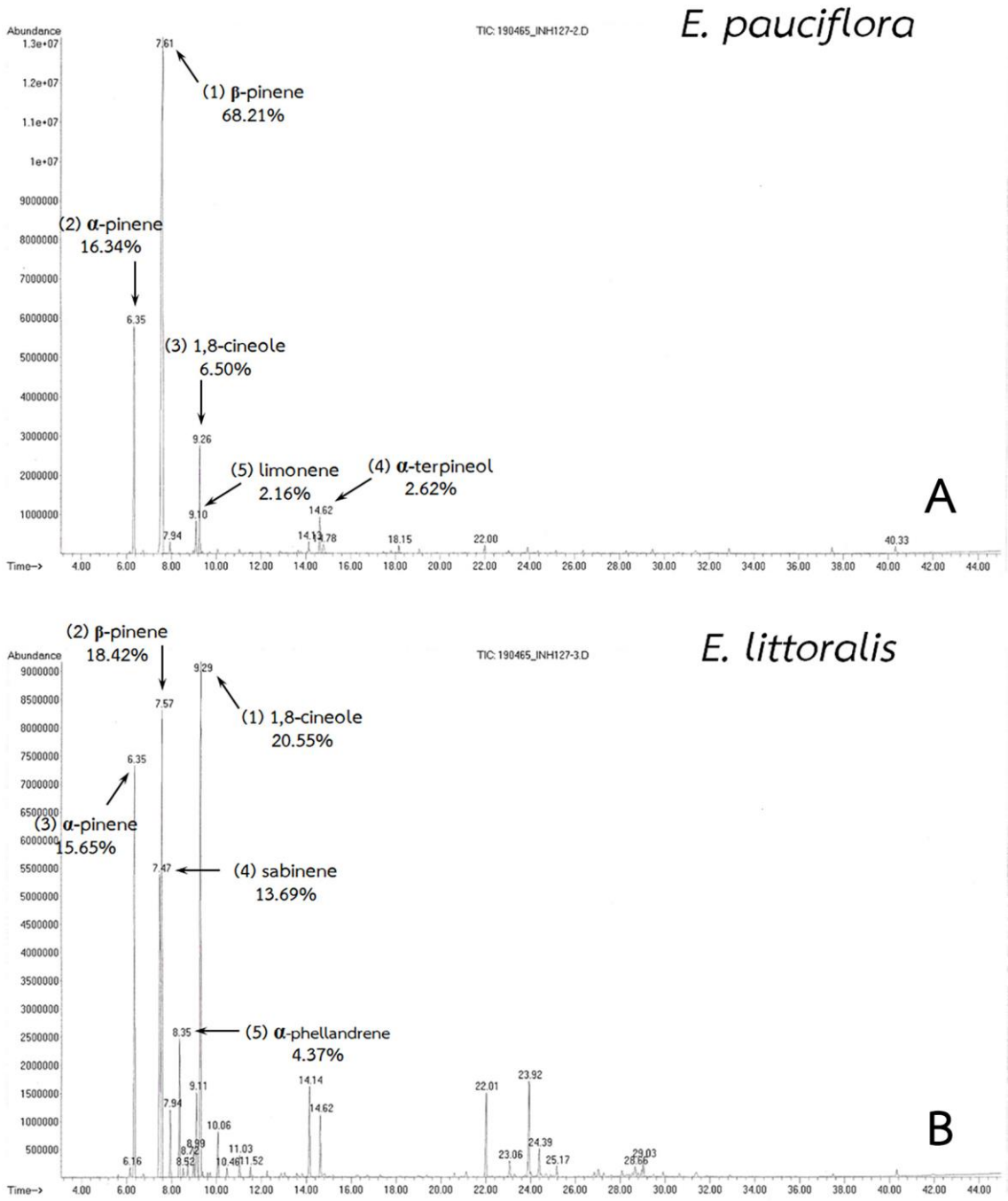

Figure 2 GC-MS chromatograms of the essential oils extracted from *E. pauciflora* (A) and *E. littoralis* (B)

องค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันหอมระเหยของปุดช้อนทองและปุดช้างทั้งหมด 16 ชนิด เป็นพฤกษเคมีในกลุ่มของเทอร์พีน โดยอยู่ในกลุ่มโมโนเทอร์พีน (monoterpenes) แทบทั้งหมด ยกเว้นทราน-คาริโอฟีลเลน (*trans*-caryophyllene) และแอลฟา-ฮูมูลีน (α-humulene) ที่จัดอยู่ในกลุ่มเซสควิเทอร์พีน (sesquiterpenes) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการจำแนกองค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยในพืชสกุลปุดชนิดต่าง ๆ ของ Ud-Daula และ Basher (2019) เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยของพืชสกุลปุดทั้ง 2 ชนิดพบว่าปุดช้อนทองมีเบต้า-ไพนีน (β-pinene, 68.21%) และแอลฟา-ไพนีน (α-pinene, 6.34%) เป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนปุดช้างมี 1,8-ซินิออล (1,8-cineole, 20.55%) เบต้า-ไพนีน (18.42%) แอลฟา-ไพนีน (15.65%) และซาบินีน (sabinene, 13.69%) เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่มโมโนเทอร์พีนที่มีโครงสร้างหลักเป็นคาร์บอน 10 อะตอม (Figure 3)

Table 1 Essential oil constituents (% of total) of *E. pauciflora* and *E. littoralis* collected from Satun province

No.	RT	Compounds	% Constituent in each species	
			E. pauciflora	*E. littoralis*
1	6.35	α-pinene	16.34	15.65
2	7.47	sabinene	-	13.69
3	7.57	β-pinene	68.21	18.42
4	7.93	β-myrcene	0.65	2.02
5	8.35	α-phellandrene	-	4.37
6	8.72	α-terpinene	-	0.66
7	8.97	*p*-cymene	-	1.01
8	9.10	limonene	2.16	3.63
9	9.29	1,8-cineole	6.50	20.55
10	10.06	γ-terpinene	-	1.47
11	11.02	α-terpinolene	-	0.74
12	11.52	linalool	-	0.32
13	14.14	terpinene-4-ol	0.85	3.41
14	14.62	α-terpineol	2.62	2.27
15	21.98	*trans*-caryophyllene	0.61	3.35
16	23.07	α-humulene	-	0.72
		others	3.95	10.05

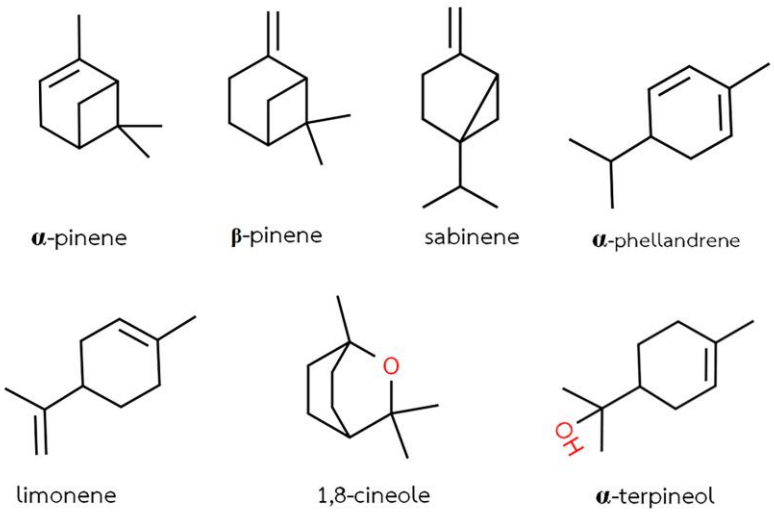

Figure 3 Structures of top five components identified from the volatile oils of *E. pauciflora* and *E. littoralis*

เมื่อสืบค้นฤทธิ์ทางชีวภาพของพฤกษเคมีที่พบเป็นองค์ประกอบหลักในน้ำมันหอมระเหยของปุดช้อนทองและปุดช้าง พบว่าพฤกษเคมีเหล่านี้ต่างมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย แอลฟา-ไพนีนและเบต้า-ไพนีนเป็นพฤกษเคมีที่อาจกล่าวได้ว่าเป็นของขวัญที่น่าอัศจรรย์จากธรรมชาติ (Salehi *et al*., 2019) เนื่องจากมีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายด้าน อาทิเช่น แก้ปวด ต้านจุลินทรีย์ ยับยั้งเซลล์เนื้องอก ต้านการอักเสบ ปกป้องระบบทางเดินอาหาร ต้านอนุมูลอิสระ รักษาอาการชักและอาการซึมเศร้า (da Silva *et al*., 2012; Guzmán-Gutiérrez *et al*., 2015; Salehi *et al*., 2019) ซาบินีนมีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ต้านเชื้อรา ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ และป้องกันการฝ่อของกล้ามเนื้อเมื่อทดสอบในหนูทดลอง เป็นต้น (Ryu *et al*., 2019; Sharma *et al*., 2019) 1,8-ซินิออลมีศักยภาพในการต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลินทรีย์ ต้านมะเร็ง บรรเทาปวด และช่วยขยายหลอดลม เป็นต้น จนอาจกล่าวได้ว่า 1,8-ซินิออลเป็นพฤกษเคมีเอนกประสงค์ที่สามารถนำไปใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ ได้อย่างหลากหลาย (Hoch *et al*., 2023; Bicak, 2024) นอกจากนี้ยังมีแอลฟา-เทอพินีออล (α-terpineol) ลิโมนีน (limonene) และแอลฟา-ฟีแลนดรีน (α-phellandrene) ในปริมาณสูงสุด 5 อันดับแรกขององค์ประกอบที่พบในน้ำมันหอมระเหยด้วย โดยแอลฟา-เทอพินีออลมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ต้านการอักเสบ ต้านจุลินทรีย์ ต้านมะเร็ง บรรเทาอาการปวด รักษาอาการท้องร่วง บำรุงประสาท ปกป้องระบบทางเดินอาหาร และป้องกันการเกิดโรคหัวใจ (Chen *et al*., 2023) ลิโมนีนมีสรรพคุณในการบรรเทาปวด ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ปกป้องระบบประสาท ต้านจุลินทรีย์ ฆ่าพยาธิและแมลง เป็นต้น (Lin *et al*., 2024) ส่วนแอลฟา-ฟีแลนดรีน (α-phellandrene) มีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์เนื้องอก บรรเทาปวด และสามารถฆ่าหนอนแมลงได้ (Radice *et al*., 2022)

ปุดช้อนทองมีเปอร์เซ็นต์ของแอลฟา-ไพนีนและเบต้า-ไพนีนในปริมาณสูง 84.55% เมื่อเทียบกับองค์ประกอบทั้งหมดที่พบในน้ำมันหอมระเหย ในขณะที่ปุดช้างมีเปอร์เซ็นต์ของ 1,8-ซินิออล เบต้า-ไพนีน แอลฟา-ไพนีน และซาบินีน รวมกันสูงถึง 68.31% ขององค์ประกอบทั้งหมด โดยพฤกษเคมีเหล่านี้ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลินทรีย์ ต้านการอักเสบ และบรรเทาปวด ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพของพฤกษเคมีที่เป็นองค์ประกอบหลักเหล่านี้อาจเป็นตัวแปรที่กำหนดสรรพคุณและแนวโน้มการนำไปใช้ประโยชน์ของพืชสกุลปุดทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้องค์ประกอบอื่นในน้ำมันหอมระเหยก็มีผลต่อสรรพคุณของปุดแต่ละชนิด และอาจเป็นตัวแปรที่ทำให้ปุดแต่ละชนิดมีศักยภาพที่โดดเด่นแตกต่างกัน งานวิจัยนี้ได้เปิดเผยถึงองค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยของปุดช้อนทองและปุดช้างที่พบในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทยและแนวโน้มฤทธิ์ทางชีวภาพที่อาจเชื่อมโยงถึงสรรพคุณของปุดทั้ง 2 ชนิด และแสดงให้เห็นว่าปุดช้อนทองและปุดช้างมีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์นอกเหนือจากพืชสกุลปุดชนิดอื่นที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบทางเภสัชและคลินิกของพฤกษเคมีในน้ำมันหอมระเหย รวมถึงตรวจวิเคราะห์และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพฤกษเคมีในส่วนที่ไม่ใช่น้ำมันหอมระเหย (non-volatile compounds) เพื่อประเมินสรรพคุณและศักยภาพโดยรวมของปุดช้อนทองและปุดช้าง ก่อนที่จะนำไปส่งเสริมการใช้ประโยชน์ในระดับชุมชนและต่อยอดงานวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เชิงสุขภาพ เภสัช และเวชสำอางจากปุดช้อนทองและปุดช้าง

สรุปผล

งานวิจัยนี้ถือเป็นครั้งแรกของการค้นพบปุดช้อนทองและปุดช้างในพื้นที่ จ.สตูล รวมถึงรายงานผลการวิเคราะห์พฤกษเคมีในน้ำมันหอมระเหยของปุดทั้ง 2 ชนิด ผลการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบและลำต้นเทียมของปุดช้อนทองและปุดช้าง ได้ปริมาณน้ำมันหอมระเหยเท่ากับ 0.15% และ 0.13% เทียบกับน้ำหนักสดตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี GC-MS สามารถระบุชนิดขององค์ประกอบทางเคมีในปุดช้อนทองได้ 8 ชนิด คิดเป็น 96.05% ขององค์ประกอบทั้งหมดที่พบในน้ำมันหอมระเหย โดยมีเบต้า-ไพนีน (68.21%) และแอลฟา-ไพนีน (16.34%) เป็นองค์ประกอบหลัก สำหรับปุดช้างสามารถระบุชนิดขององค์ประกอบทางเคมีในน้ำมันหอมระเหยได้ 16 ชนิด คิดเป็น 89.95% ขององค์ประกอบทั้งหมด โดยมี 1,8-ซินิออล (20.55%) เบต้า-ไพนีน (18.42%) แอลฟา-ไพนีน (15.65%) และซาบินีน (13.69%) เป็นองค์ประกอบหลัก พฤกษเคมีเหล่านี้ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลินทรีย์ ต้านการอักเสบ และบรรเทาปวด เป็นต้น อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าปุดทั้ง 2 ชนิดมีเปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบในน้ำมันหอมระเหยที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลให้ปุดทั้ง 2 ชนิดมีสรรพคุณที่แตกต่างกัน จึงควรทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพฤกษเคมีในพืชสกุลปุด เพื่อประเมินศักยภาพและส่งเสริมการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงสุขภาพ เภสัช และเวชสำอางในอนาคต

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) เพื่อสนับสนุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund : FF) ผ่านการจัดสรรงบประมาณจากกรมวิชาการเกษตร ขอขอบคุณคุณจิรัฏฐ์ เงินสว่าง สำหรับการช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและบันทึกภาพพืชสกุลปุด และขอขอบคุณสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่อำนวยความสะดวกด้านวัสดุอุปกรณ์ บุคลากรและสถานที่ทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Adams, R.P. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy, 3rd ed. Carol Stream, Ill., USA: Allured Publishing.

Bicak, B. 2024. A study of the anticancer effect of 1,8-cineole: Molecular docking analysis. Bilge International Journal of Science and Technology Research 8(1): 50-55.

Burtt, B.L. and Smith, R.M. 1986. *Etlingera*: The inclusive name for Achasma, Geanthus and Nicolaia (Zingiberaceae). Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh 43: 235-241.

Chan, E.W.C., Lim, Y.Y. and Wong, S.K. 2013. Botany, uses, phytochemistry and pharmacology of selected *Etlingera gingers*: A review. Pharmacognosy Communications 3(4): 3-12.

Chen, Y., Zhang, L.L., Wang, W. and Wang, G. 2023. Recent updates on bioactive properties of α-terpineol. Journal of Essential Oil Research 35(3): 274–288.

Chiang, E.C.W., Yan, L.Y. and Ali, N.A.M. 2010. Composition and antibacterial activity of essential oils from leaves of *Etlingera* species (Zingiberaceae). International Journal of Advanced Science and Technology 1(2): 1-12.

Chongkraijak, W., Ngamriabsaku,l C. and Poulsen, A.D. 2013. Morphological diversity and distribution of *Etlingera littoralis* (König) Giseke (Zingiberaceae) in Southern Thailand. Walailak Journal of Science and Technology 10(6): 643-656.

da Silva, A.C.R., Lopes, P.M., de Azevedo, M.M.B., Costa, D.C.M., Alviano, C.S. and Alviano, D.S. 2012. Biological activities of α-pinene and β-pinene enantiomers. Molecules 17: 6305-6316.

Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E., Rahma, A. and Ashkani, S. 2015. Secondary metabolites constituents and antioxidant, anticancer and antibacterial activities of *Etlingera elatior* (Jack) R.M.Sm. grown in different locations of Malaysia. BMC Complementary and Alternative Medicine 15: 335.

Guzmán-Gutiérrez, S.L., Bonilla-Jaime, H., Gómez-Cansino, R. and Reyes-Chilpa, R. 2015. Linalool and β-pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway. Life Science 128: 24-29.

Hoch, C.C., Petry, J., Griesbaum, L., Weiser, T., Werner, K., Ploch, M., Verschoor, A., Multhoff, G., Dezfouli, A.B. and Wollenberg, B. 2023. 1, 8-cineole (eucalyptol): A versatile phytochemical with therapeutic applications across multiple diseases. Biomedicine and Pharmacotherapy 167: 115467.

Khaw, S.H. 2001. The genus *Etlingera* (Zingiberaceae) in peninsular Malaysia including a new species. Gardens' Bulletin Singapore 53(1-2): 233-234.

Kittipanangkul, N. and Ngamriabsakul, C. 2008. Zingiberaceae diversity in Khao Nan and Khao Luang National Parks, Nakhon Si Thammarat, Thailand. Walailak Journal of Science and Technology 5(1): 17-27.

Larsen, K., Ibrahim, H., Khaw, S.H. and Saw, L.G. 1999. Gingers of Peninsular Malaysia and Singapore. Kota Kinabalu: Natural History Publications (Borneo).

Lin, H., Li, Z., Sun, Y., Zhang, Y., Wang, S., Zhang, Q., Cai, T., Xiang, W., Zeng, C. and Tang, J. 2024. D-Limonene: Promising and sustainable natural bioactive compound. Applied Sciences 14(11): 4605.

Maknoi, C. and Sirirugsa, P. 2002. New records of Zingiberaceae from southern Thailand. The Natural History Bulletin of the Siam Society 50(2): 225-237.

Mood, J. and Ibrahim, H. 2000. A new species of *Etlingera* (Zingiberaceae) from peninsular Malaysia and southern Thailand. Nordic Journal of Botany 20(3): 279-283.

Poulsen, A.D. 2012. *Etlingera* of Sulawesi. Natural History Publications (Borneo) Sdn. Bhd., Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia.

Radice, M., Durofil, A., Buzzi, R., Baldini, E., Martínez, A.P., Scalvenzi, L. and Manfredini, S. 2022. Alpha-phellandrene and alpha-Phellandrene-rich essential oils: A systematic review of biological activities, pharmaceutical and food applications. Life (Basel) 12(10): 1602.

Ryu, Y., Lee, D., Jung, S.H., Lee, K.J., Jin, H., Kim, S.J., Lee, H.M., Kim, B. and Won, K.J. 2019. Sabinene prevents skeletal muscle atrophy by inhibiting the MAPK-MuRF-1 pathway in rats. International Journal of Molecular Sciences 20(19): 4955.

Saensouk, S., Saensouk, P., Pasorn, P. and Chantaranothai, P. 2016. Diversity and uses of Zingiberaceae in Nam Nao National Park, Chaiyaphum and Phetchabun provinces, Thailand, with a new record for Thailand. Agriculture and Natural Resources (50)6: 445-453.

Salehi, B., Upadhyay, S., Orhan, I.E., Jugran, A.K., Jayaweera, S.L.D., Dias, D.A., Sharopov, F., Taher,i Y., Martins, N., Baghalpour, N., Cho, W.C. and Sharifi-Rad, J.. 2019. Therapeutic potential of α-pinene and β-pinene: A miracle gift of nature. Biomolecules 9: 738.

Sharma, S., Gupta, J., Prabhakar, P.K., Gupta, P., Solanki, P. and Rajput, A. 2019. Phytochemical repurposing of natural molecule: Sabinene for identification of novel therapeutic benefits using *in silico* and *in vitro* approaches. Assay and Drug Development Technologies 17(8): 339-351.

Sirirugsa, P. 1997. Thai Zingiberaceae: Species diversity and their uses. Proceedings of the International Conference on Biodiversity and Bioresources: Conservation and Utilization, Phuket, Thailand, 23-27 November 1997, pp. 1-8.

Trimanto, T. and Hapsari, L. 2018. Short communication: A new record of *Etlingera* megalocheilos (Griff.) A.D. Poulsen (Zingiberaceae) in Sulawesi, Indonesia. Biodiversitas 19: 1227-1235.

Ud-Daula, A.F.M.S and Basher, M.A. 2019. Genus *Etlingera* – A review on chemical composition and antimicrobial activity of essential oils. Journal of Medicinal Plants Research 13(7): 135-156.

Wong, K.C., Sivasothy, Y., Boey, P.L., Osman, H. and Sulaiman, B. 2010. Essential oils of *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Smith and *Etlingera littoralis* (Koenig) Giseke, Journal of Essential Oil Research 22: 461-466.

Yeats, H. 2013. The history and cultivation of *Etlingera*-The torch gingers - at the Royal Botanic Garden Edinburgh. Sibbaldia: The Journal of Botanic Garden Horticulture 2: 71-86.

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจัดจำแนกชนิดและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไพลดำในภาคใต้ของประเทศไทย
DNA Barcoding for Identification and Phylogenetic Relationship of *Zingiber ottensii* Valeton in Southern Thailand

ธีรภัทร เหลืองศุภบูลย์[1*] อภิญญา วงศ์เปี้ย[1] และ ชลลดา สามพันพวง[1]
Luangsuphabool, T.[1*], Wongpia, A.[1] and Samphunphuang, C.[1]

[1]สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110
[1]Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, Rangsit, Thanyaburi, Pathum Thani, 12110
**Corresponding author: Theerapat.l@doa.in.th*

บทคัดย่อ

ไพลดำ (*Zingiber ottensii* Valeton) เป็นพืชสมุนไพรที่มีมูลค่าสูงและนิยมปลูกมากทางภาคใต้ของประเทศไทย การระบุชนิดพืชสกุลขิงยากที่จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่เพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะต้นอ่อนหรือวัตถุดิบสมุนไพร การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจัดจำแนกชนิด และศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างไพลดำและพืชสกุลขิงชนิดต่าง ๆ โดยใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *ITS* และ *rps*16 ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ จาการศึกษา พบว่า ตำแหน่ง *ITS* มีประสิทธิภาพสูงในการระบุชนิดไพลดำ ซึ่งสามารถจำแนกไพลดำออกจากกระทือพิลาส (*Z. spectabile*) และกระทือ (*Z. zerumbet*) ในขณะที่ตำแหน่ง *rps*16 ไม่สามารถใช้ในการจัดจำแนกไพลดำ และกระทือออกจากกันได้ จากการวิเคราะห์วิวัฒนาการชาติพันธุ์ของตำแหน่ง *ITS* ร่วมกับ *rps*16 ทำให้มีความเชื่อมั่น และความชัดเจนในการระบุชนิดพืชในสกุลขิงได้เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไพลดำมีความใกล้ชิดกับกระทือ (*Z. zerumbet*) มากกว่ากระทือพิลาส (*Z. spectabile*) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาของช่อดอกและเหง้า
คำสำคัญ: ไพลดำ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด การจัดจำแนก ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Abstract

Phlai Dam (*Zingiber ottensii*) is a high-value medicinal plant that popular cultivated in the southern Thailand. Species identification of *Zingiber* genera have been difficult based on morphological characters alone, especially in immature stage or herbal raw materials. The objective of this study is to test the efficiency of DNA barcode loci for species identification and investigate on the phylogenetic relationships between *Z. ottensii* and other species within genus *Zingiber*. Two DNA loci of *ITS* and *rps*16 were chosen for phylogenetic analysis. The *ITS* locus showed a high efficiency for identifying *Z. ottensii* species which could be separated *Z. ottensii* from *Z. spectabile* and *Z. zerumbet*. While the *rps*16 locus could not separate *Z. ottensii* from *Z. zerumbet*. Phylogenetic analysis based on combination of *ITS* and *rps*16 regions made confident and clear identification of the species. In addition, the phylogenetic relationship of *Z. ottensii* was more closely related to *Z. zerumbet* than *Z. spectabile*. Similar result was obtained from morphological characters of inflorescence and rhizome.
Keywords: *Zingiber ottensii,* DNA barcoding, identification, phylogenetic relationship

บทนำ

ไพลดำ (*Zingiber ottensii* Valeton) เป็นพืชล้มลุกอายุหลายปีจัดอยู่ในสกุลขิง (*Zingiber*) มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และสามารถพบการกระจายพันธุ์ได้ตั้งแต่เกาะชวาของประเทศอินโดนีเซียไปจนถึงประเทศพม่า (Valeton, 1918; Aung and Tanaka, 2019) สำหรับในประเทศไทยไพลดำสามารถพบเห็นได้ทุกภูมิภาคแต่ส่วนใหญ่เป็นการนำไปปลูก อย่างไรก็ตามสามารถพบไพลดำในแหล่งธรรมชาติได้เฉพาะพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยเท่านั้น (Kittipanangkul and Ngamriabsakul, 2008) โดยไพลดำนิยมปลูกมากทางภาคใต้ของประเทศไทยและเป็นพืชสมุนไพรที่มีมูลค่า ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ในภูมิปัญญาท้องถิ่น (Samuel *et al*., 2010; Inta *et al*., 2023) การระบุชนิดพืชสกุลขิงยากที่จะจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาแต่เพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะต้นกล้าหรือวัตถุดิบสมุนไพร สำหรับไพลดำในระยะต้นกล้าจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับกระทือ (*Zingiber zerumbet* (L.) Smith) (Larsen *et al*., 1999) เมื่อเจริญเติบโตสมบูรณ์จะมีลักษณะต่างกัน โดยไพลดำมีลำต้นสีแดงเข้มและเหง้ามีสีม่วงค่อนข้างเทา (Malek *et al*., 2005) แต่อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวมีความแปรผันสูงตามปัจจัยต่าง ๆ ที่ได้รับ (Pant *et al*., 2021) จนก่อให้เกิดความสับสนในการจัดจำแนกชนิดหรือระบุชนิดพันธุ์เพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้อง การใช้วิธีการทางชีวโมเลกุลเพื่อการระบุชนิดพืชด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ด

บริเวณนิวเคลียสและคลอโรพลาสต์เป็นวิธีการที่นิยมนำมาใช้ในการจัดจำแนกชนิดของพืชดอกหลายชนิด (Kress *et al*., 2005) โดยจะใช้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลจากบริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสมกับชนิดพืชร่วมกับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะช่วยให้สามารถจัดจำแนกชนิดพืชได้อย่างถูกต้อง สำหรับการศึกษาพันธุกรรมในระดับอณูชีววิทยาของไพลดำในประเทศไทยยังมีรายงานการศึกษาค่อนข้างน้อย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสมในการจัดจำแนกไพลดำ (*Zingiber ottensii*) ออกจากพืชสกุลขิงอื่น ๆ ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันและศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระหว่างไพลดำ (*Zingiber ottensii*) และพืชสกุลขิง (*Zingiber*) ชนิดต่าง ๆ เพื่อความเข้าในความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไพลดำ อีกทั้งยังเป็นฐานข้อมูลและเป็นวิธีการสำหรับใช้ในการจัดจำแนกชนิดไพลดำ (*Zingiber ottensii*) เพื่อการนำไพลดำ (*Zingiber ottensii*) ไปใช้ประโยชน์ที่ถูกต้อง

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างไพลดำและการศึกษาลักษณะทางพฤกศาสตร์

เก็บตัวอย่างไพลดำจากแหล่งชุมชนที่มีการใช้ประโยชน์เป็นพืชสมุนไพรจากจังหวัดต่าง ๆ ทางภาคใต้ของประเทศไทยและพืชสกุลขิงที่มีลักษณะใกล้เคียงกับไพลดำ จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเปรียบเทียบกับรูปวิธานของพืชแต่ละชนิดเพื่อใช้ประกอบการทดสอบประสิทธิภาพในการจัดจำแนกโดยใช้ดีเอ็นบาร์โค้ดและอธิบายความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Table 1)

Table 1 Species and sample locations of *Zingiber ottensii* and related species used in this study

Scientific name	ID	Local name	Location
Zingiber ottensii Valeton	Z2	Phlai Dam	Sai Buri district, Pattani province
Zingiber ottensii Valeton	Z3	Phlai Dam	Sai Buri district, Pattani province
Zingiber ottensii Valeton	Z9	Phlai Dam	Saba Yoi district, Songkhla province
Zingiber ottensii Valeton	Z14	Phlai Dam	Sawi district, Chumphon province
Zingiber ottensii Valeton	KT8	Phlai Dam	Srinagarindra district, Phatthalung province
Zingiber cf. *fragile* S.Q.Tong	Z16	-	Mueang Nakhon Nayok district, Nakhon Nayok province
Zingiber cf. *fragile* S.Q.Tong	Z17	-	Mueang Prachin Buri district, Prachin Buri province
Zingiber parishii Hook.f.	Z19	Khing Phu Phan	Phu Ruea district, Loei province
Zingiber spectabile Griff.	KT1	Kratue Philad	Srinagarindra district, Phatthalung province
Zingiber spectabile Griff.	KT2	Kratue Philad	Yan Ta Khao district, Trang province
Zingiber zerumbet (L.) Smith	KT3	Kratue	Thai Mueang district, Phang Nga province
Zingiber zerumbet (L.) Smith	KT10	Kratue	Yan Ta Khao district, Trang province

การสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างไพลดำและพืชสกุลขิงมาสกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจากวิธีของ Cubero และ Crespo (2002) โดยเตรียมใบพืชประมาณ 20-50 มิลลิกรัม และ stainless steel beads ขนาด 1 มิลลิเมตร จำนวน 10 เม็ด ใส่ลงในหลอด ไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 2.0 มิลลิลิตร แช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่อง Mixer MM 400 โดยความถี่ 30 เฮิรตซ์ เป็นเวลา 2 นาทีหรือจนกว่าตัวอย่างจะละเอียด เติม CTAB extraction buffer หลอดละ 400 ไมโครลิตร และ เติม 5% (w/v) PVPP (Polyvinyl polypyrrolidone) 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (Choloroform / isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 24 : 1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์หลอดใหม่เจือจางส่วนใส 3 เท่า ด้วย CTAB precipitation buffer ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือเพียงตะกอน เติมสารละลาย 1.2 M NaCl ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน เติม RNAase buffer ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และเติม RNAase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมละลาย 1.2 โมลาร์ NaCl ปริมาตร 370 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (Choloroform : isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร อีกครั้ง ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์หลอดใหม่ เติมสารละลาย 2-โพรพานอล (isopropanol) ปริมาณ 0.6 เท่า ของปริมาตรส่วนใสในแต่ละหลอด ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือเพียงตะกอน เติมเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วทิ้งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำจีโนมิกส์ดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง Internal transcribed spacer (*ITS*) และ ribosomal protein S16 (*rps*16) สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร 5X PCR buffer 2 ไมโครลิตร 25 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ 1 ไมโครลิตร 2 มิลลิโมลาร์ dNTP 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (20 ไมโครโมลาร์) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และ *Pfu* DNA polymerase ยี่ห้อ Vivantis (5 unit) 0.1 ไมโครลิตร (บริเวณยีน *ITS* และ *rps*16) โดยบริเวณยีน *ITS* ใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) และ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al*., 1990) และบริเวณยีน *rps*16 ใช้คู่ไพรเมอร์ rpsF (GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT) และ rpsR2 (TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC) (Oxelman *et al*., 1997) จากนั้นตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง PCR thermal cycle ประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 54 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ที่เติม SERVA DNA Stain G ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 10 มิลลิลิตร โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp+1.5 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร จากนั้นผลผลิตพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด FavorPrep GEL/ PCR Purification Kit ยี่ห้อ Favorgen และส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณต่าง ๆ ไปหาตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ บริษัท เอ ที จี ซี จำกัด ณ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระดับโมเลกุลและประสิทธิภาพในการจัดจำแนกชนิด

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดของไพลดำและพืชสกุลขิงแต่ละตำแหน่งมาจัดเรียง (DNA sequence alignment) ด้วย MUSCLE (Edgar, 2004) ปรับเรียงใหม่อีกครั้งด้วยโปรแกรม MEGA 11 (Tamura *et al*., 2021) โดยใช้ *Curcuma longa* (KY129785 และ KU215006) และ *C. xanthorrhiza* (KU215130 และ KU215007) เป็น outgroup และจากนั้นนำชุดข้อมูลของดีเอ็นเอบาร์โค้ดแต่ละบริเวณมาวิเคราะห์หา nucleotide substitution model ของชุดข้อมูลแต่ละบริเวณด้วยโปรแกรม jModelTest v.2.1.4 (Darriba *et al*., 2012) ร่วมกับ Akaike Information Criterion (AIC) ซึ่งโมเดลที่ดีที่สุดสำหรับบริเวณ *ITS* และ *ITS* ร่วมกับ *rps*16 คือ General Time Reversible + gamma distribution (GTR+G) model ในขณะที่ *rps*16 คือ General Time Reversible (GTR) model โดยชุดข้อมูลของดีเอ็นเอบาร์โค้ดและโมเดลที่ดีที่สุดที่ถูกเลือกของแต่ละบริเวณจะถูกนำมาวิเคราะห์วิวัฒนาการชาติพันธุ์ระดับโมเลกุลด้วยวิธี Maximum likelihood (ML) ด้วยโปรแกรม RAxML-HPC2 v.8.2.12 (Stamatakis, 2014) บน CipresWeb Portal (https://www.phylo.org) และทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ และผลการวิเคราะห์จะถูกแสดงโดยโปรแกรม FigTree v.1.4.4 (http:// tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/) จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการและประสิทธิภาพการจัดจำแนกชนิดไพลดำกับแผนภูมิวิวัฒนาการชาติพันธุ์ระดับโมเลกุลแต่ละบริเวณร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของไพลดำ (*Z. ottensii*) และพืชสกุลขิง (*Zingiber*) ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับไพลดำ (*Z. ottensii*) พบว่าไพลดำ (*Z. ottensii*) ระยะต้นอ่อนมีความคล้ายคลึงกับกระทือ (*Z. zerumbet*) ที่อยู่ในระยะเดียวกัน โดยจะมีสีของลำต้นเทียมเป็นสีเข้มน้ำตาลอมแดง ในขณะที่ลำต้นเทียมของกระทือพิลาส (*Z. spectabile*) จะมีสีเขียว (Figure 1) และยังพบว่าลักษณะเหง้าของไพลดำ (*Z. ottensii*) กระทือ (*Z. zerumbet*) และกระทือพิลาส (*Z. spectabile*) ถ้าดูจากลักษณะสัณฐานวิทยาจากภายนอกมีความเหมือนกันมาก แต่ไพลดำ (*Z. ottensii*) มีสีภายในเหง้าที่เข้มกว่า กระทือ (*Z. zerumbet*) และกระทือพิลาส (*Z. spectabile*) (Figure 1) ซึ่งลักษณะของสีที่พบเป็นผลมาจากปริมาณสารพฤกษเคมีที่สะสมอยู่ ซึ่งมีความไม่แน่นอนสามารถแปรผันไปตามสิ่งแวดล้อมของแหล่งที่ปลูก และระยะเวลาการเก็บเกี่ยว (Pant *et al*., 2021) โดยลักษณะของลำต้นเทียมในระยะต้นอ่อนและลักษณะของเหง้าอาจจะสร้างความสับสนได้ในการแยกความแตกต่างของไพลดำ ออกจากพืชสกุลขิงชนิดที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันได้

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลและประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจัดจำแนกไพลดำ (*Z. ottensii*) ออกจากพืชสกุลขิงชนิดอื่น ๆ ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับไพลดำ (*Z. ottensii*) โดยการนำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Figure 1) มาวิเคราะห์ร่วมกับแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการชาติพันธุ์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *ITS rps*16 และ *ITS* ร่วมกับ *rps*16 พบว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *ITS* มีประสิทธิภาพสูงในการระบุชนิดไพลดำ (*Z. ottensii*) สามารถจำแนกไพลดำออกจากกระทือพิลาส (*Z. spectabile*) และกระทือ (*Z. zerumbet*) โดยมีค่าความเชื่อมั่น (Bootstrap) สนันสนุนสูงถึง 91 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถจำแนกไพลดำ (*Z. ottensii*) ออกจากกระทือพิลาส (*Z. spectabile*) และกระทือ (*Z. zerumbet*) ที่ค่าความเชื่อมั่น 97 เปอร์เซ็นต์ และ < 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 2A) ในขณะที่ดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *rps*16 ไม่มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกชนิดระหว่างไพลดำ (*Z. ottensii*) และกระทือ (*Z. zerumbet*) แต่สามารถใช้ในการระบุชนิดของกระทือพิลาส (*Z. spectabile*) มากกว่าตำแหน่ง *ITS* โดยมีค่าความเชื่อมั่นสนันสนุนสูงถึง 97 เปอร์เซ็นต์ (Figure 2B) สำหรับวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่

ตำแหน่ง *ITS* ร่วมกับ *rps*16 พบว่าสามารถจัดจำแนกชนิดระหว่างไพลดำ (*Z. ottensii*) กระทือ (*Z. zerumbet*) และกระทือพิลาส (*Z. spectabile*) โดยความเชื่อมั่นสนับสนุนที่ 95 เปอร์เซ็นต์ 89 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Figure 3) ซึ่งให้ค่าความเชื่อมั่นสนับสนุนสูงกว่าการใช้ตำแหน่งดีเอ็นเอบาร์โค้ดตำแหน่ง *ITS* หรือ *rps*16 เพียงตำแหน่งเดียวในการจัดจำแนกชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไพลดำ (*Z. ottensii*) มีความใกล้ชิดกับกระทือ (*Z. zerumbet*) มากกว่ากระทือพิลาส (*Z. spectabile*) โดยมีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำต้นเทียม เหง้า และช่อดอก (Figure 1) มีความคล้ายคลึงกันมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะต้นกล้าและเหง้า ซึ่งเป็นระยะที่ถูกนำมาใช้สำหรับการผลิตวัตถุดิบสมุนไพร การแยกความแตกต่างระหว่างไพลดำ (*Z. ottensii*) กระทือ (*Z. zerumbet*) และกระทือพิลาส (*Z. spectabile*) ในระยะดังกล่าวจะช่วยสร้างความมั่นใจในการปลูกและสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้องมากขึ้น

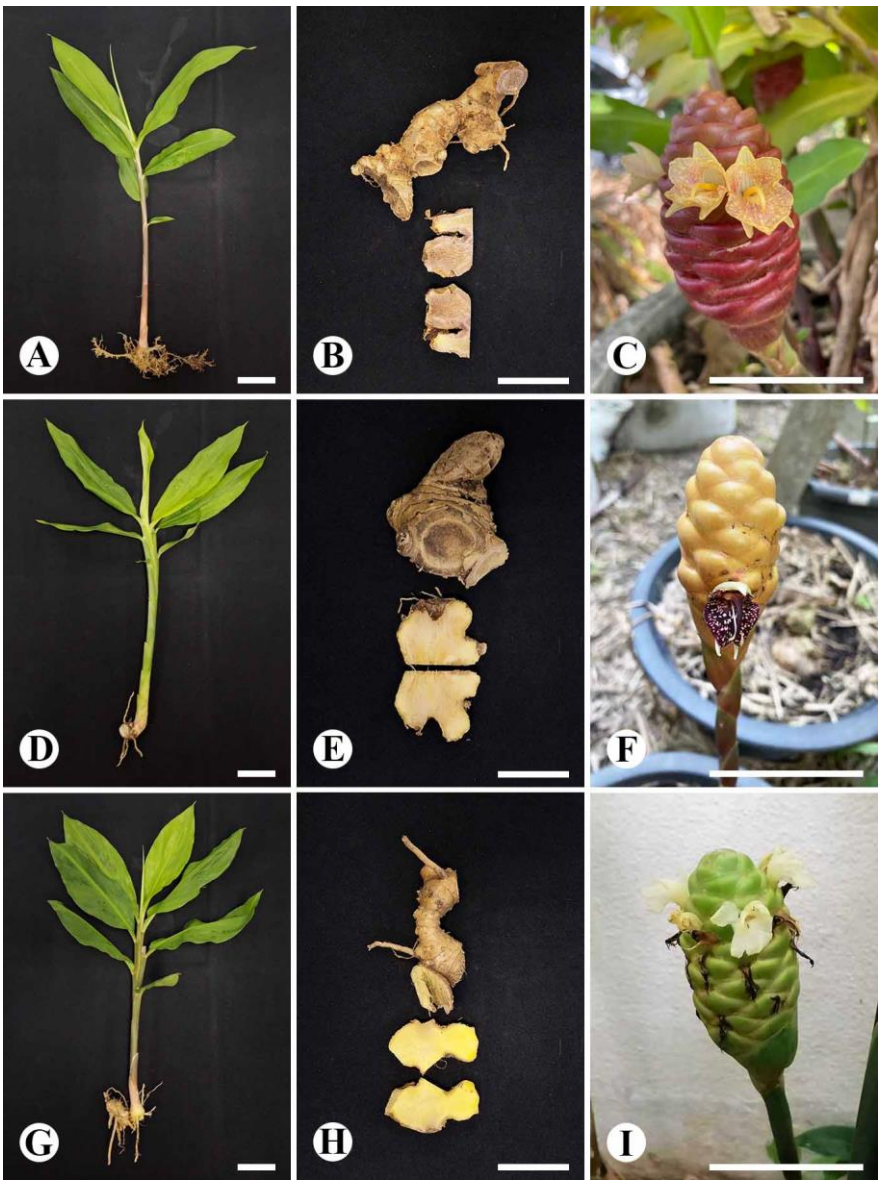

Figure 1 Morphological characters of *Zingiber* species that related to *Z. ottensii*. (A-C) *Z. ottensii*: (A) pseudostem, (B) rhizome, and (C) Inflorescence; (D-F) *Z. spectabile*: (A) pseudostem, (B) rhizome and (C) Inflorescence; (G-I) *Z. zerumbet*: (A) pseudostem, (B) rhizome and (C) Inflorescence. Scale bar = 5 cm.

จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณที่อยู่นิวเคลียสยีนมีประสิทธิภาพในการระบุชนิดไพลดำและพืชสกุลขิงได้ดีที่สุด สอดคล้องการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณนิวเคลียสโดยเฉพาะบริเวณ *ITS* มีประสิทธิภาพในการระบุชนิดพืชและมีความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างชนิดสูงกว่ายีนบริเวณคลอโรพลาสต์โดยสามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างในระดับสกุล ระดับชนิด และระดับสายพันธุ์ของพืชชนิดต่าง ๆ โดยพืชสกุลขมิ้น (*Curcuma*) ดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *ITS*2 มีอัตราความถูกต้องในการจัดจำแนกชนิดสูง ซึ่งดีกว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณคลอโรพลาสต์ (*mat*K, *rbc*L, *trn*H-*psb*A และ *trn*L-F) (Chen *et al*., 2015) และในพืชสกุลข่า (*Alpinia*) มีรายงานว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *ITS*2 มีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกชนิดถึง 88.2 เปอร์เซ็นต์ (Tan *et al*., 2020) สำหรับพืชสกุลขิงได้มีรายงานการเปรียบเทียบการใช้บริเวณดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจัด

จำแนกชนิด *Z. loerzingii* ในพื้นที่สุมาตราเหนือของประเทศอินโดนีเซียพบว่าบริเวณ *ITS*2 มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับบริเวณ *rbc*L และ *trn*L-F และยังพบว่า *ITS*2 เป็นบริเวณที่มีระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกันน้อยกว่าบริเวณ *rbc*L และ *trn*L-F (Prasetya *et al*., 2023) แต่มีความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างชนิดสูง (Saudah *et al*., 2022) ในขณะที่ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีนบริเวณคลอโรพลาสต์ตำแหน่ง *rbc*L and *mat*K มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกชนิดพืชวงศ์ขิงบางชนิดในประเทศอินเดียได้ดีกว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *ITS* (Vinitha *et al*., 2014) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าตำแหน่ง *rps*16 สามารถใช้ในการระบุชนิดกระทือพิลาส (*Z. spectabile*) แต่กลับไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างไพลดำ (*Z. ottensii*) และกระทือ (*Z. zerumbet*) จากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ดแต่ละบริเวณมีความเหมาะสม มีประสิทธิภาพในการจำแนกและระบุชนิดได้แตกต่างกัน ดังนั้น ควรมีการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในบริเวณอื่น ๆ ร่วมกับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อช่วยให้สามารถระบุชนิดไพลดำและพืชสกุลขิงอื่น ๆ ได้อย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

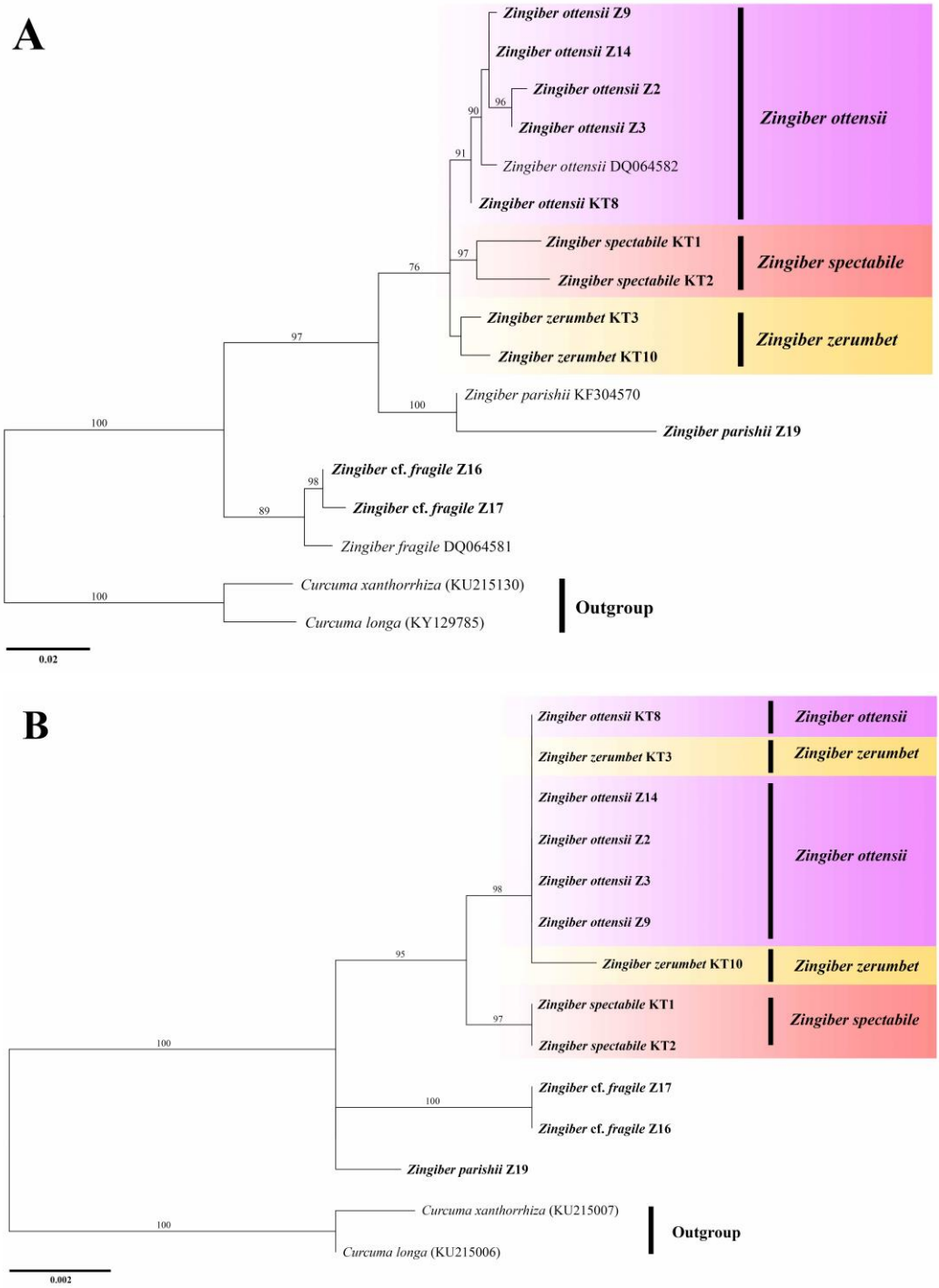

Figure 2 Molecular phylogeny of *Z. ottensii* and *Zingiber* species based on maximum likelihood using each DNA barcode loci of *ITS* (A), *rps*16 (B) and *ITS* + *rps*16 (C). The bootstrap values ≥70% is given above the branches.

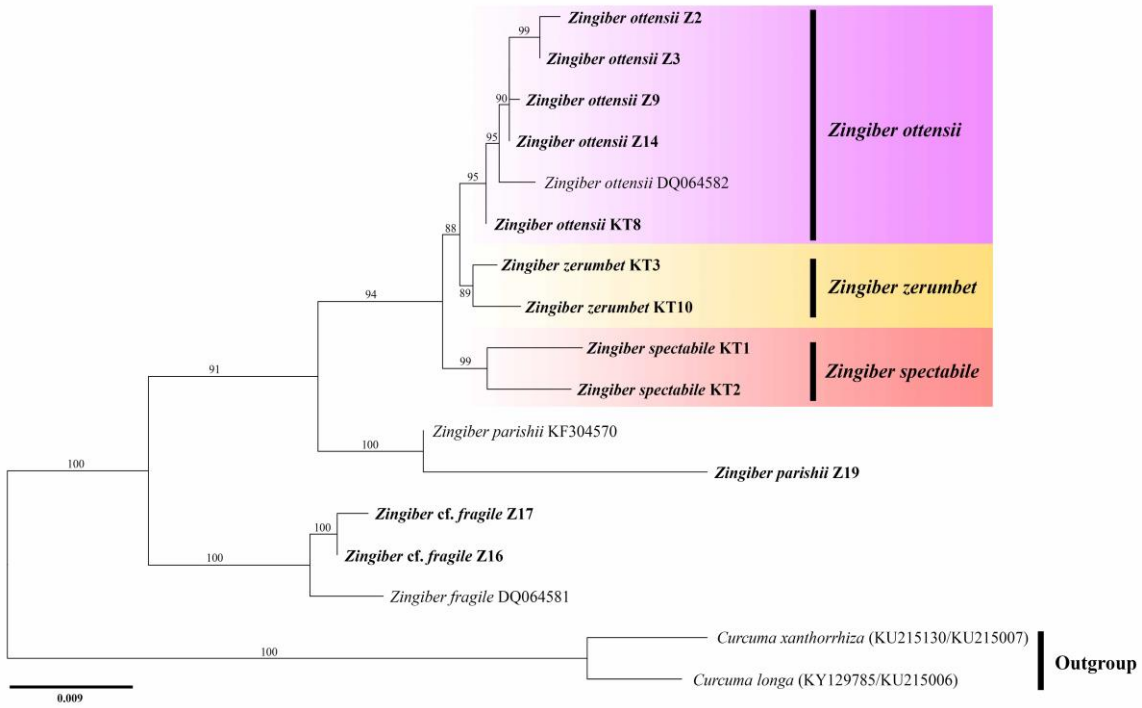

Figure 3 Molecular phylogeny of *Z. ottensii* and *Zingiber* species based on maximum likelihood using two DNA barcode loci *ITS* and *rps*16. The bootstrap values ≥70% is given above the branches.

สรุปผล

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดบริเวณ *ITS* สามารถใช้จัดจำแนกชนิดไพลดำ (*Z. ottensii*) ออกจากกระทือพิลาส (*Z. spectabile*) และกระทือ (*Z. zerumbet*) ได้ ในขณะที่ตำแหน่ง *rps*16 ไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างไพลดำ (*Z. ottensii*) และกระทือ (*Z. zerumbet*) แต่สามารถใช้ระบุชนิดกระทือพิลาส (*Z. spectabile*) ได้ การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ตำแหน่ง *ITS* ร่วมกับ *rps*16 สามารถเพิ่มความเชื่อมั่นในการจัดจำแนกไพลดำ (*Z. ottensii*) และพืชในสกุลขิงชนิดอื่น ๆ ได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าไพลดำ (*Z. ottensii*) มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับกระทือ (*Z. zerumbet*) มากกว่ากระทือพิลาส (*Z. spectabile*) โดยสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนายจิรัฏฐ์ เงินสว่าง และนางสาวณัฐธร สีหะวงษ์ นักวิชาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างพืชและขอขอบคุณเงินทุนสนับสนุนจากกองทุนสงเสริมวิทยาศาสตร วิจัยและนวัตกรรม สำนักงานคณะกรรมการ สงเสริมวิทยาศาสตร วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.)

เอกสารอ้างอิง

Aung, M.M. and Tanaka, N. 2019. Seven Taxa of Zingiber (Zingiberaceae) newly recorded for the flora of Myanmar. Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B 45(1): 1-8.

Chen, J., Zhao, J., Erickson, D.L., Xia, N. and Kress, W.J. 2015. Testing DNA barcodes in closely related species of *Curcuma* (Zingiberaceae) from Myanmar and China. Molecular Ecology Resources 15: 337-348.

Cubero, O.F. and Crespo, A. 2002. Isolation of nucleic acids from lichens. *In* Protocols in Lichenology. Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring. (ed. I. Kranner, R. P. Beckett and A. K. Varma), pp. 381–392. Berlin: Springer.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. and Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9: 772.

Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research 32: 1792–1797.

Inta, A., Trisonthi, C., Pongamornkul, W. and Panyadee, P. 2023. Ethnobotany of Zingiberaceae in Mae Hong Son, Northern Thailand. Biodiversitas 24 (4): 2114-2124.

Kittipanangkul, N. and Ngamriabsakul, C. 2008. Zingiberaceae diversity in Khao Nan and Khao Luang National Parks, Nakhon Si Thammarat, Thailand. Walailak Journal of Science and Technology 5(1): 17-27.

Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A. and Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. PNAS 102: 8369–8374.

Larsen, K., Ibrahim, H., Khaw, S.H. and Saw, L.G. 1999. Gingers Peninsular Malaysia and Singapore. Kota Kinabalu: Natural History Publications. 135 p.

Malek, S.N.A., Ibrahim, H., Lai, H.S., Serm, L.G., Seng, C.K., Yusoff, M.M. and Ali, N.A.M. 2005. Essential Oils of *Zingiber ottensii* Valet. and *Zingiber zerumbet* (L.) Sm. from Sabah, Malaysia. Malaysian Journal of Science 24: 49-58.

Oxelman, B., Lidén, M. and Berglund, D. 1997.Chloroplast *rps*16 intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution* 206: 393–410.

Pant, P., Pandey, S. and Dall'Acqua, S. 2021. The Influence of Environmental Conditions on Secondary Metabolites in Medicinal Plants: A Literature Review. Chemistry & Biodiversity 18: e2100345.

Prasetya, E., Lazuardi, L., Harahap, F., Rachmawati, Y., Yusuf, Y., Idrus, S.I.A and Prastowo, P. 2023. Region of Nuclear Ribosomal DNA (*ITS*2) and Chloroplast DNA (*rbc*L and *trn*L-F) as A Suitable DNA Barcode for Identification of *Zingiber loerzingii* Valeton from North Sumatera, Indonesia. Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology 8(3): jtbb76956.

Samuel, A.J.S.J., Kalusalingam, A., Chellappan, D.K., Gopinath, R., Radhamani, S., Husain, H. A., Muruganandham, V. and Promwichit, P. 2010. Ethnomedical survey of plants used by the Orang Asli in Kampong Bawong, Perak, West Malaysia. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 6: 5.

Saudah, Zumaidar, Darusman, Fitmawati, Roslim, D. I. and Juliantari, E. 2022. Molecular authentication of *Etlingera* spp. (Zingiberaceae) in Aceh Province, Indonesia using DNA barcoding. Biodiversitas 23(8): 3976–3983.

Stamatakis, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. Bioinformatics 30: 1312–1313.

Tamura, K., Stecher, G. and Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, Molecular Biology and Evolution 38: 3022–3027.

Tan, W.H., Chai, L.C. and Chin, C.F. 2020. Efficacy of DNA barcode internal transcribed spacer 2 (*ITS* 2) in phylogenetic study of *Alpinia* species from Peninsular Malaysia. Physiology and Molecular Biology of Plants 26: 1889–1896.

Valeton, T. 1918. New notes on the Zingiberaceae of Java and Malaya. Bulletin du Jardin botanique de Buitenzorg 27: 1-176.

Vinitha, M.R., Kumar, U.S., Aishwarya, K., Sabu, M. and Thomas, G. 2014. Prospects for discriminating Zingiberaceae species in India using DNA barcodes. Journal of Integrative Plant Biology 56(8): 760–773.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* PCR Protocols: a guide to methods and applications. (ed. M.A., Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White), pp. 315–322. New York, USA: Academic Press.

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพริกไทยพันธุ์จันทบุรี

Study of DNA barcoding in *Piper nigrum* L. var. Chanthaburi

วลัยลักษณ์ ถึงคุณ[1] **และ ปัทมา ศรีน้ำเงิน**[1*]

Thungkhoon, W.[1] **and Srinamngoen, P.**[1*]

[1] คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จ.จันทบุรี 22170

[1] Faculty of Science and Arts, Burapha University, Chanthaburi Campus, Chanthaburi 22170

** Corresponding Author: pattama@buu.ac.th*

บทคัดย่อ

พริกไทยพันธุ์จันทบุรีหรือพันธุ์ปรางถี่เป็นพริกไทยพันธุ์พื้นเมืองของจังหวัดจันทบุรีซึ่งเป็นที่นิยมของผู้บริโภค ปัจจุบันการระบุพันธุ์พืชมักใช้ลักษณะทางสัณฐานซึ่งทำได้ยาก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพริกไทยพันธุ์จันทบุรีด้วยยีน *rbcL* ผลการวิจัยพบว่า การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่ง *rbcL* ได้ดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ความเหมือนกับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับยีน *rbcL* ของพืชสกุล *Piper* ได้แก่ *Piper nigrum* L. (EF450315.1), *P. laetispicum* (EF591353.1) และ *P. austrosinense* (EF450305.1) ที่ *E* value 0.0 และ Homology identity 99.43 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการศึกษาความสามารถในการเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยโปรแกรม DNA Subway ร่วมกับพืชสกุล *Piper* ทั้งหมด 15 ชนิด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนยีน *rbcL* ของพริกไทยพันธุ์จันทบุรีมีความเหมือนกับยีน *rbcL* ของพืชสกุล *Piper* อย่างสูง โดยมีค่า Homology identity สูงถึง 98.26-99.43 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อคำนวนด้วย K2P distance ที่ 0.008 สอดคล้องกับแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการ การวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* มีความสามารถเพียงพอในการเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาหรือจัดจำแนกพืชในสกุล *Piper* ได้

คำสำคัญ: พริกไทย ดีเอ็นเอบาร์โค้ด แผนภูมิพันธุกรรม

Abstract

Chanthaburi or Prang-Thee pepper is a native variety in Chanthaburi province. It is identifying plant varieties based on morphological characteristics, which can be difficult. This research aims to study the development of DNA barcodes for the identification Chanthaburi pepper using the *rbcL* gene. The results found that the *rbcL* gene of Chanthaburi pepper is 700 bp. For alignment analyzed against the GenBank database, it was found that there is a similarity with the *rbcL* gene in *Piper nigrum* L. (EF450315.1), *P. laetispicum* (EF591353.1) and *P. austrosinense* (EF450305.1) with *E* value of 0.0 and a homology identity of 99.43%. Subsequently, the capability to be a DNA barcode was studied using the DNA Subway program with all 15 species of the *Piper* genus. It was found that high similarity with the *rbcL* gene of the *Piper* genus, with homology identity ranging from 98.26% to 99.43%. The nucleotide sequence divergence, calculated by K2P distance at 0.008, aligns with the phylogenetic relationship diagram in evolutionary genetics. This research indicates that the *rbcL* gene sequence could be used as a DNA barcode which is basic information for studying or classifying plants in the *Piper* genus.

Keywords: Pepper, DNA barcoding, Phylogenetic tree

บทนำ

พริกไทย (Pepper, *Piper nigrum* L.) เป็นสมุนไพรที่มีศักยภาพ พบว่าเป็นเครื่องเทศสำคัญที่มีความจำเป็น และมีความต้องการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาสมุนไพร โดยพบว่าพื้นที่ปลูกพริกไทยประมาณร้อยละ 95 ของพื้นที่ปลูกทั่วประเทศอยู่ที่จังหวัดจันทบุรี สามารถสร้างรายได้จากการส่งออกให้กับประเทศปีละจำนวนมากเป็นสินค้าขึ้นชื่อและเป็นพืชเศรษฐกิจของภาคตะวันออก พริกไทยพันธุ์จันทบุรีหรือพันธุ์ปรางถี่เป็นพริกไทยพันธุ์พื้นเมืองของจังหวัดจันทบุรีที่ปลูกกันมานาน ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคเนื่องจากมีเมล็ดใหญ่และรสเผ็ดจัด (กัญญา เสนาะสรรพ, 2564) พริกไทยที่นิยมปลูกในประเทศไทยมี 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ ซีลอน พันธุ์ปะเหลี่ยน พันธุ์มาเลย์ และพันธุ์จันทบุรี ซึ่งภายใต้สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันจะมีผลต่อปริมาณสารสำคัญและยิ่งเป็นสายพันธุ์ย่อยอาจจะให้สารสำคัญที่เปลี่ยนแปลงไป ในการจำแนกสายพันธุ์หรือพันธุ์จะต้องอาศัยข้อมูล 3 ส่วน คือ อนุกรมวิธานในการแยกเป็นเบื้องต้น ลักษณะทางเคมี สารสำคัญหรือองค์ประกอบทางเคมี และลักษณะทางพันธุกรรม โดยเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในปัจจุบันคือการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นวิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุลได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ในการระบุชนิดหรือกลุ่มของสิ่งมีชีวิตภายในเวลาอันรวดเร็ว วิธีการนี้อาศัยหลักการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอในบริเวณที่เรียกว่า “ดีเอ็นเอมาตรฐาน” ซึ่งยีนเหล่านี้เป็นบริเวณอนุรักษ์ในพืชสามารถจำแนกชนิดพันธุ์โดยอาศัยการเกิดการกลายพันธุ์บางตำแหน่ง การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดคือการใช้ลำดับเบสของดีเอ็นเอช่วงสั้น ๆ (short genetic loci) ที่มีความผันแปรสูง มาชี้เฉพาะสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้อย่างรวดเร็ว โดยช่วงดีเอ็นเอที่จะใช้เป็นบาร์โค้ดนั้นต้องเป็นช่วงดีเอ็นเอที่ผ่านการตกลงและยอมรับ (standardized genetic loci) ให้เป็นบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ กล่าวคือ สามารถระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งในทางปฏิบัติอาจมีการกำหนดตำแหน่ง (locus) ดีเอ็นเอมาตรฐานมากกว่า 1 ช่วงสำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกสิ่งมีชีวิตให้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น ซึ่งในปัจจุบันมีช่วงดีเอ็นเอที่สามารถใช้เป็นบาร์โค้ดสำหรับพืชหลายช่วงด้วยกัน ตัวอย่าง เช่น Ribulose-bisphosphate carboxylase (*rbcL*), MaturaseK (*matK*), Nuclear ribosomal internal transcribed spacers (ITS) region, *psb*A-*trn*H intergenic spacer และ *trn*L-*trn*F intergenic spacer เป็นต้น

ยีน *rbcL* ไม่มีอินทรอน (intron) เป็นยีนในคลอโรพลาสต์จีโนมที่ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) เป็นหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (Large subunit) ความยาวของยีน *rbcL* โดยทั่วไปมีความยาวเฉลี่ย 1,400 คู่เบส (Ford *et al*., 2009) จุดเด่นที่ยีน *rbcL* ที่นิยมนำมาทำเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือดีเอ็นเอมาตรฐานคือ มีความเป็นมาตรฐานสากลและให้ลำดับนิวคลีโอไทด์มีคุณภาพดีมาก (วุฒิพงศ์ มหาคำ, 2554) จากการศึกษาพบว่ามีการนำยีน *rbcL* และ *rpoC1* มาใช้ในการจำแนกพืชในสกุล *Piper* ซึ่งเป็นสมุนไพรที่ขึ้นในแถบบริเวณตอนเหนือของประเทศมาเลเซีย (Darlina and Mahboob, 2020) นอกจากนี้ยังมีการนำยีน *rbcL*, *ITS* และ *psbA-trnH* มาใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดและสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมของ *P. longum* (Sneha and Jenifer, 2023) ดังนั้นการวิจัยนี้จึงได้มีการนำเอาเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาใช้ในการสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของพริกไทยพันธุ์จันทบุรี ซึ่งการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพริกไทยจะช่วยให้สามารถจำแนกหรือทดสอบชนิดพันธุ์พริกไทย การอนุรักษ์สายพันธุ์พริกไทย ทั้งยังประโยชน์ต่อการศึกษาสรรพคุณทางยาในอนาคตได้อีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชทดลอง การสกัดเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพ

เก็บตัวอย่างใบอ่อนพริกไทยพันธุ์จันทบุรี โดยได้รับความอนุเคราะห์จากวิสาหกิจชุมชนพริกไทยแปลงใหญ่แก่งหางแมว อำเภอแก่งหางแมว จังหวัดจันทบุรี มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Tiangen (Tiangen Biotech (Beijing) Co., Ltd.) กล่าวคือ เติมบัฟเฟอร์ LP1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันแล้วเติม RNase A 6 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม LP2 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง นาน 5 นาที ดูดส่วนใส่หลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ LP3 ปริมาตร 1.5 เท่าของส่วนใสดูดผสมให้เข้ากันเบา แล้วย้ายลง CB3 นำไปปั่นเหวี่ยง นาน 30 วินาที เทส่วนใสทิ้งล้างเมมเบรน (ที่มีตะกอนดีเอ็นเอ) ด้วยการเติมบัฟเฟอร์ PW ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงนาน 30 วินาที จากนั้นเปิดฝาคอลัมเพื่อระเหย

แอลกอฮอล์นาน 3 นาที เมื่อแผ่นเมมเบรนแห้ง ทำการ elute ดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50-100 ไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nano-spectrophotometer และเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไว้ที่ – 20 องศาเซลเซียล เพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนถัดไป

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย *rbcL* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายคือ ยีนมาตรฐาน *rbcL* โดยการนำดีเอ็นเอพริกไทยพันธุ์จันทบุรีมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบมาให้จำเพาะกับบางส่วนของยีนมาตราฐาน *rbcL* ได้แก่ rbcL-F ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC และ rbcL-R CGTTCACCTTCTAGTTTACCTACAACAGT (Hasebe *et al*., 1994) โดยการผสมดีเอ็นเอพริกไทยพันธุ์จันทบุรีต้นแบบความเข้มข้น 50 นาโนกรัม, 1x PCR buffer, 0.25 µM rbcL primer, 0.1 mM dNTPs, 2 mM $MgCl_2$ และ 1 U *Taq* DNA polymerase (ThermoScientific, U.S.A) จากนั้นนำไปใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Thermal cycle, VWR®XT96 ประเทศเยอรมัน) โดยกำหนดขั้นตอนและระยะเวลา ดังนี้ 1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 2) denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 3) annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 4) extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที (ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 34 รอบ และ 5) final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยวิธีเจลอะกาโรสอิเล็คโทรโฟรีซีส (Agarose gel electrophoresis) โดยการผสมเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ กับสารย้อมสีดีเอ็นเอ SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) ทำการแยกผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้เทียบกับดีเอ็นเอมาตราฐาน 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific™) โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้ภายใต้แสง Blue-light converter และบันทึกภาพ ด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (gelONE Gel Documentation, Cleaver Scientific, UK) ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายของยีน *rbcL* ขนาดประมาณ 700 คู่เบส ทำการ recovery ชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายออกมาจากเจลอะกาโรส และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดแยกสกัดสำเร็จรูป TIAN quick Midi Purification Kit สารละลายดีเอ็นเอที่ได้ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ตามกรรมวิธีของบริษัท Integrated DNA Technologies, IDS ประเทศสหรัฐอเมริกา

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคดและแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพริกไทยพันธุ์จันทบุรี

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน *rbcL* ของพริกไทยและพืชชนิดอื่น ๆ วิเคราะห์ความเหมือนด้วยโปรแกรม BLAST กับฐานข้อมูล GenBank วิเคราะห์ความเป็นเอกลักษณ์ของยีนมาตรฐาน *rbcL* รวมทั้ง Sequence Similarity ด้วยโปรแกรม DNA subway (https://dnasubway.cyverse.org/) จากนั้นคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) ระหว่างพริกไทยพันธุ์จันทบุรีและพืชอื่น ๆ ในสกุล *Piper* ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป MEGA version 11 โดยการคำนวณและเปรียบค่า Kimura 2-parameter (K2P) distance ทำการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยคำนวณจากโมเดลจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair-group mean average) โดยกำหนดค่า Bootstrap ที่ 1,000 รอบ ด้วยโปรแกรม MEGA version 11

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โคดของพริกไทยพันธุ์จันทบุรี

จากการทดลองเมื่อทำการสกัดดีเอ็นจากใบอ่อนพริกไทยพันธุ์จันทบุรี พบมีความเข้มข้น 44.10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่า $O.D_{260/280}$ เท่ากับ 1.85 (Figure 1) แสดงว่าเป็นดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและมีความบริสุทธิ์สูง สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความเป็นเอกลักษณ์ได้เป็นอย่างดี ซึ่งการใช้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์มาศึกษาจะทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่แม่นยำมากขึ้น ลดความน่าจะเป็นที่จะแปลผลผิดจากการปนเปื้อนหรือการแตกหักของชิ้นดีเอ็นเอ (Meyer and Paulay, 2005) จากการเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีน *rcbL* ของพริกไทยพันธุ์จันทบุรีด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 700 คู่เบส (Figure 1) โดยเมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่า พบว่ามีความใกล้เคียงกับพืชในสกุล *Piper* ได้แก่ *P. nigrum* L. (EF450315.1), *P. laetispicum* (EF591353.1) และ *P. austrosinense* (EF450305.1) ที่ *E* value 0.0 และ Homology identity 99.43

เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนับว่ามีความใกล้เคียงกันสูงมาก จากนั้นทำการศึกษาความสามารถในการเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด ด้วยการวิเคราะห์ความเหมือน (Alignment) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม DNA Subway พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนยีน *rbcL* ของพริกไทยพันธุ์จันทบุรีมีความเหมือนกับยีน *rbcL* ของพืชสกุล *Piper* อย่างสูง โดยมีค่าความเหมือนหรือ Homology identity สูงถึง 98.26-99.43 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยบางส่วนของยีน *rbcL* ของพริกไทยพันธุ์จันทบุรีมีความเหมือนกับยีน *rbcL* ของพืชสกุล *Piper* อื่น ๆ ที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ (Table 1)

เมื่อพิจารณาขนาดของยีน *rbcL* ที่ได้จากเพิ่มปริมาณและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีขนาด 700 คู่เบส สอดคล้องกับการทดลองของปัทมา ศรีน้ำเงิน (2562) ที่ได้พัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้รองเท้านารีด้วยยีน *rbcL* พบมีขนาด 700 คู่เบส เช่นเดียวกัน ซึ่งความยาวที่เหมาะสมในการนำบางส่วนของยีน *rbcL* มาใช้สร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดจะยาวตั้งแต่ 500-700 คู่เบส (วุฒิพงศ์ มหาคำ, 2554) นอกจากนี้การที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบางส่วนยีน *rbcL* ของพริกไทยพันธุ์จันทบุรีมีความเหมือนกับยีน *rbcL* ของพืชอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank สูงถึง 98.26-99.43 เปอร์เซ็นต์นั้น แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพภาพดี สามารถนำมาใช้ศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังเป็นการบ่งชี้ว่ายีน *rbcL* มีความสามารถนำใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพริกไทยได้ จาก Table 1 เมื่อนำพืชสกุล *Piper* จำนวน 14 ชนิด ได้แก่ *P. nigrum* (EF450315.1), *P. laetispicum* (EF591353.1), *P. austrosinense* (EF450305.1), *P. chinense* (EF450314.1), *P. arborescensribulose* (AY572253.1), *P. hancei* (EF591358.1), *P. sarmentosum* (EF591364.1), *P. macropiper* (FJ976159.1), *P. betle* (EF450311.1), *P. longum* (MH287276.1), *P. pseudopothifolium* (MG718198.1), *P. cernuum* (MG718196.1), *P. gaudichaudianum* (MG718197.1) และ *P. aduncum* (AY572252.1) มาวิเคราะห์ค่า similarity homology ร่วมกับพริกไทยพันธุ์จันทบุรี ด้วยโปรแกรม DNA Subway ด้วยการวิเคราะห์ Determine Sequence Relationship พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 98.50-100 เปอร์เซ็นต์ เป็นการบ่งชี้ถึงความเหมือนหรือใกล้ชิดกันของลำดับนิวคลีโทด์ของยีน *rbcL* ซึ่งยีน *rbcL* เป็นยีนที่พบในคลอโรพลาสต์จีโนมที่ทำหน้าที่ถอดรหัสเอนไซม์ 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) ซึ่งมีหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ RuBP กับ CO_2 ในวัฏจักรคาลวิน และเป็นยีนที่เหมาะสมนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานหรือบาร์โค้ดเนื่องจากมีวิวัฒนาการของดีเอ็นเอ และอัตราการแทนที่ของดีเอ็นเอค่อนข้างสูง ทำให้มีประสิทธิภาพในการจำแนกและวิวัฒนาการของพืชได้ (ประดิพันธ์ ทองแถม ณ อยุธยา และคณะ, 2565)

การศึกษาแผนภูมิพันธุกรรมของพริกไทยพันธุ์จันทบุรี

ในการศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งของยีน *rbcL* ในพริกไทยพันธุ์จันทบุรีร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสกุล *Piper* ด้วยการวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความแตกต่างด้วยฟังก์ชั่น Kimura 2-parameter (K2P) distance ด้วยโปรแกรม MEGA version 11 พบว่าเมื่อทำการคำนวณค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดพืชในสกุล *Piper* จำนวน 15 ชนิด ด้วย K2P distance โดยการเปรียบเทียบครั้งละ 1 คู่ (โดยที่ค่า K2P distance นั้นจะมีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.00 เป็นการบ่งชี้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของคู่นั้นมีความแตกต่างกัน 100 เปอร์เซ็นต์) พบมีค่าระหว่าง 0.000-0.017 หรือเฉลี่ย 0.008 โดยค่า K2P distance ระหว่าง *P. betle* และ *P. aduncum* มีค่ามากที่สุด คือ 0.017 หรือมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* มากที่สุดนั่นเอง ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ที่มีค่า K2P distance น้อยที่สุดคือ 0.000 หรือมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุด ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ระหว่าง *P. nigrum* var. Chanthaburi - *P. austrosinense*, *P. nigrum* และ *P. laetispicum* เช่นเดียวกับ *P. sarmentosum* - *P. longum* และ *P. cernuum* - *P. pseudopothifolium* (Table 2) ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างนิวคลีโอไทด์โดยคำนวนระยะห่างทางวิวัฒนาการระหว่างสายนิวคลีโอไทด์ โดยใช้การคำนวณตามโมเดล K2P distance นั้นเป็นการคำนวนระยะห่างของลำดับนิวคลีโอไทด์จากสมมติฐานฐานที่ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด มีอัตราการแทนที่แบบ transition และ transversion ในสัดส่วนที่ไม่เท่ากัน ซึ่งวิธีนี้นิยมใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตและวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิด (Kimura, 1980) ในการพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมหรือการบ่งชี้เอกลักษณ์ทางพันธุกรรม รวมทั้งการจำแนกสายพันธุ์ผ่านการเปรียบเทียบระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) สามารถใช้ยีนมาตรฐาน 1 ชนิด หรือมากกว่าเพื่อการจำแนกที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ทีปกา มีเสงี่ยม และคณะ (2561) พบว่าการใช้ยีนมาตรฐาน *rbcL* และ

matK ร่วมกันสามารถจำแนกกล้วยไม้พันธุ์รองเท้านารีได้ดีกว่าการใช้ยีนมาตรฐานเพียงชนิดเดียว ซึ่งยีนมาตรฐาน *rbcL*นั้นมีความเหมาะสมสามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการศึกษาพันธุกรรมระดับ single locus ได้เป็นอย่างดี (Patric *et al*., 2016)

จากการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการของพืชสกุล *Piper* และพริกไทยจันทบุรี จำนวน 15 ชนิด ที่ได้จากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งยีน *rbcL* พบว่าสามารถแยกพืชสกุล *Piper* ออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพืชสกุล *Piper* จำนวน 11 ชนิด ได้แก่ *P. arborescens*, *P. macropiper, P. sarmentosum*, *P. longum, P. hancei, P. chinense, P. austrosinense, P. nigrum, P. nigrum* var. Chanthaburi, *P. laetispicum* และ *P. betle* โดยพริกไทยพันธุ์จันทบุรี *P. nigrum* var Chanthaburi จัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกับ *P. nigrum, P. laetispicum* และ *P. austrosinense* (Figure 2) แสดงว่ามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันอย่างมาก สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ระยะห่างทางวิวัฒนาการระหว่างสายนิวคลีโอไทด์เมื่อคำนวณด้วยค่า K2P distance ที่ปรากฏใน Table 2 โดยพืชสกุล *Piper* กลุ่มย่อยนี้พบเป็นพืชที่มีลักษณะเป็นไม้เลื้อยหรือไม้เถาและมีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชีย ในขณะที่พืชในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยพืชสกุล *Piper* จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *P. aduncum, P. gaudichaudianum, P. cernuum* และ *P. pseudopothifolium* จัดเป็นกลุ่มที่แยกสายวิวัฒนาการออกมาจากพืชชนิดอื่น ๆ จากข้อมูลขององค์กร The Royal Botanic Gardens (https://powo.science.kew.org) พบว่า พืชสกุล *Piper* ทั้ง 4 ชนิดนี้ที่มีถิ่นกำเนิดในแถบอเมริกากลาง การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการโดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในครั้งนี้ สามารถช่วยสนับสนุนและยืนยันความสอดคล้องถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการกระจายตัวของพืชสกุล *Piper* เช่น พืชในสกุลพริกไทย *P. laetispicum* และ *P. austrosinense* เป็นพืชที่เจริญเติบโตพืชเขตร้อน-กึ่งร้อน มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีนแพร่มายังภาคเหนือของประเทศไทย ลำต้นมีลักษณะเป็นเถาและมีสรรพคุณทางยา (Kongxaisavath *et al*., 2020) เช่นเดียวกับ *P. nigrum* var. Chanthaburi อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* เพียงอย่างเดียวยังไม่สามารถแยกพืชตัวอย่างสกุล *Piper* ทั้งหมดออกจากได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะ *P. nigrum*, *P. nigrum* var Chanthaburi, *P. laetispicum* และ *P. austrosinense* ดังนั้นการนำยีนมาตรฐานชนิดอื่น ๆ เช่น *ITS, matK, rpoB, rpoC1* และ *trnH-psbA* มาวิเคราะห์ร่วมกันจะสามารถสร้างแผนภูมิพันธุกรรมที่มีความสามารถในการจำแนกได้ดียิ่งขึ้น

สรุปผล

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้เป็นการประยุกต์เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพริกไทยจันทบุรีด้วยยีนมาตรฐาน *rbcL* พบว่ามีขนาด 700 คู่เบส มีความเหมือนกับยีน *rbcL* ในพืชสกุล *Piper* ได้แก่ *P. nigrum* L. (EF450315.1), *P. laetispicum* (EF591353.1) และ *P. austrosinense* (EF450305.1) ที่ *E* value 0.0 และ Homology identity 99.43 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนับว่ามีความใกล้เคียงกันสูงมาก จากการศึกษาระยะห่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย K2P distance และแผนภูมิพันธุกรรมสามารถกล่าวได้ว่า ยีน *rbcL* มีความสามารถเพียงพอในการเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพริกไทยพันธุ์จันทบุรี ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวิเคราะห์หรือสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดรวมทั้งจัดจำแนกพืชในพืชสกุล *Piper* ได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัย จากงบประมาณเงินรายได้ส่วนงาน คณะวิทยาศาสตร์ศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2567

เอกสารอ้างอิง

กัญญา เสนาะสรรพ์. 2564. พริกไทยพันธุ์จันทบุรี. เอกสารเผยแพร่ 77 ภูมิปัญญาท้องถิ่นทั่วไทย โครงการพัฒนาฐานข้อมูลภูมิปัญญาท้องถิ่นด้านการเกษตรเพื่อเสริมสร้างอัตลักษณ์พื้นถิ่น สำนักงานเกษตรท่าใหม่ จันทบุรี.

ทีปกา มีเสงี่ยม, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. 2561. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบลายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *matK*. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 26(1):

103-112.

ประดิพันธ์ ทองแถม ณ อยุธยา, กุลฑีราณัฐ พูลแก้ว, ปณาลี ทวีสุข, วรางรัตน์ ง่วนชู และวุฒิชัย ฤทธิ. 2565. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและประสิทธิภาพของยีน *rbcL* ในการจัดจำแนกกล้วยไม้ไทยจากแหล่งอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิด. วารสารวิทยาศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี 19(2): 70-81.

ปัทมา ศรีน้ำเงิน. 2562. การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum spp*.) ในประเทศไทย. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

วุฒิพงศ์ มหาคำ. 2554. DNA barcodes ของพืช: หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด. วารสารพฤกษศาสตร์ไทย 3 (1): 1-30.

Darlina, Md. N. and Shahid, M. 2020. Molecular identification of herbal species belonging to genus *Piper* within family Piperaceae from northern Peninsular Malaysia. Journal of King Saud University – Science, 32(2): 1417-1426.

Ford, C.S., Ayres, K.L., Toomey, N., Haider, N., Van Alphen Stahl, J., Kelly, L. J., Wikstrom, N., Hollingsworth, P.M., Duff, R.J., Hoot, S.B., Cowan, R.S., Chase, M.W. and Wilkinson, M.J. 2009. Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants. Botanical Journal of the Linnean Society 159: 1-11.

Hasebe, M., Omori, T., Kanazawa, M., Sano, T., Kato, M. and Iwatsuki, K. 1994. *rbcL* gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91: 5730–5734.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16(2): 111-120.

Kongxaisavath, D., Kermanee P. and Suwanphakdee, C. 2020. New native and introduced species record of *Piper* (Piperaceae) in Lao PDR. Thai Journal of Botany 12 (1): 163–175.

Meyer, C. P., and Paulay, G. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. PLoS Biology 3(12): e422. doi: 10.1371/journal.pbio.0030422.

Patrick, O., Muoma, J., Mulaya, E., Wekesa, C., Dennis, O. O. and Paul, O. A. 2016. The potential of DNA barcode-based delineation using seven putative candidate loci of the plastid region in inferring molecular diversity of cowpea at sub-species level. American Journal of Molecular Biology 6: 138-158.

Sneha, M. S. and Jenifer, U. P. 2023. DNA barcoding and phylogenetic analysis of Indian medicinal plant *Piper longum*. Current Trends in Biotechnology and Pharmacy 17(4): 1404-1409.

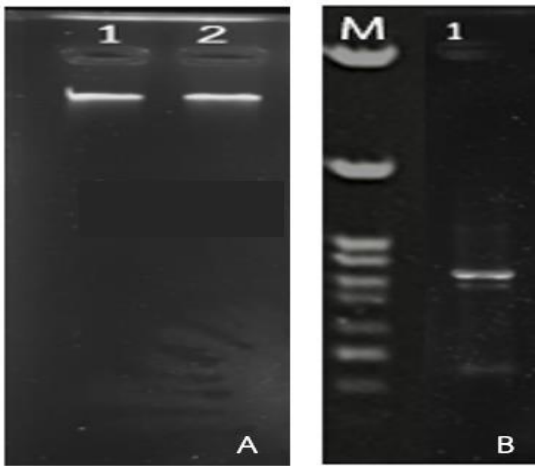

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of *P. nigrum* L. var. Chanthaburi A) genomic DNA B) PCR product of *rbcL* gene

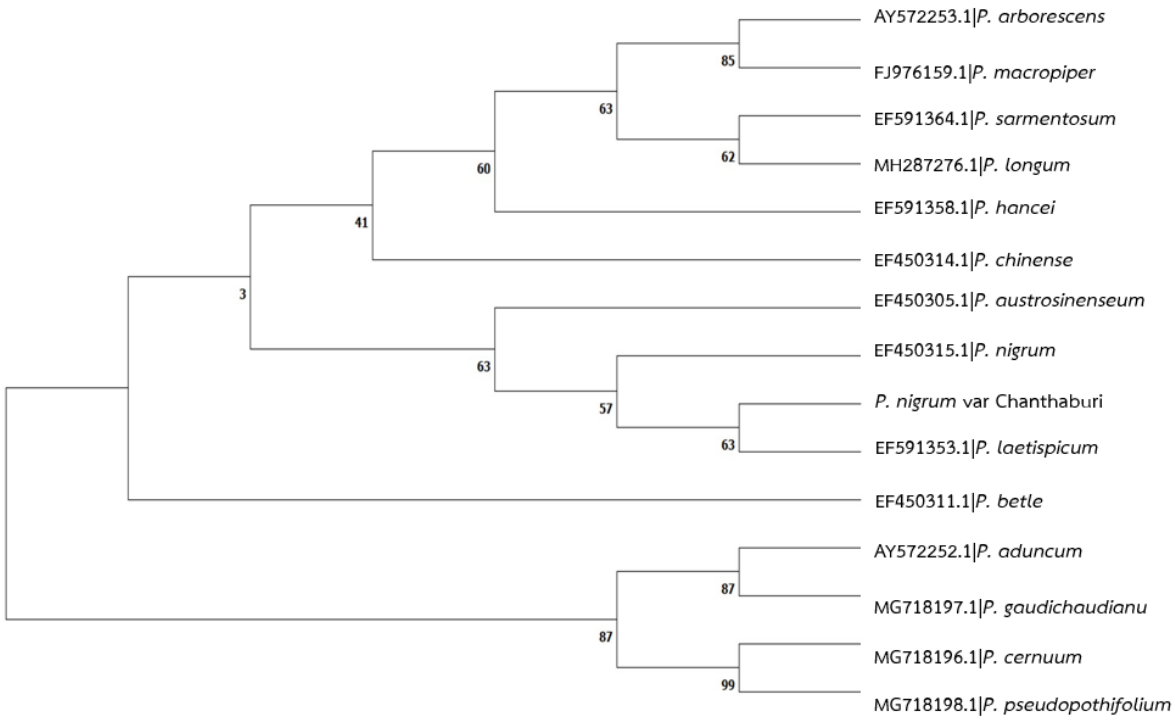

Figure 2 Phylogenetic relationship between different Piper species differentiated based on *rbcL* gene.

Table 1 Statistical simulation of BLAST Sequence homology with *rbcL* gene belonging to *P. nigrum* L. var. Chanthaburi using DNA Subway Database

No.	Scientific name and details	Accession number	*E* value	Homology identity	Mis-match
1	*P. nigrum* ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, complete cds	EF450315.1	0.0	99.43	1
2	*P. laetispicum* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*) gene, partial cds	EF591353.1	0.0	99.43	1
3	*P. austrosinense* ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, complete cds - chloroplast	EF450305.1	0.0	99.43	1
4	*P. chinense* ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, complete cds	EF450314.1	0.0	99.15	3
5	*P. arborescensribulose* ribulose -1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*) gene, partial cds	AY572253.1	0.0	99.15	3
6	*P. hancei* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*) gene, partial cds	EF591358.1	0.0	99.15	3
7	*P. sarmentosum* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*) gene, partial cds	EF591364.1	0.0	99.15	3
8	*P. macropiper* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*) gene, partial cds	FJ976159.1	0.0	99.41	3
9	*P. betle* ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, complete cds	EF450311.1	0.0	99.00	4
10	*P. longum* voucher QRI 507 ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*) gene, partial cds	MH287276.1	0.0	99.15	3
11	*P. pseudopothifolium* isolate PECB185 *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds*	MG718198.1	0.0	98.41	8

No.	Scientific name and details	Accession number	*E* value	Homology identity	Mis-match
12	*P. cernuum* isolate PECB182 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*) gene, partial cds	MG718196.1	0.0	98.26	9
13	*P. gaudichaudianum* isolate PECB184 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*) gene, partial cds	MG718197.1	0.0	98.28	9
14	*P. aduncum* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*) gene, partial cds - chloroplast	AY572252.1	0.0	98.39	10

**rbcL* = ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large subunit

Table 2 Pairwise genetic distance matrix of *rbcL* gene sequence among of genus *Piper*

Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. *P. aduncum*															
2. *P. arborescens*	0.015														
3. *P. nigrum* var. Chanthaburi	0.015	0.003													
4. *P. austrosinense*	0.015	0.003	0.000												
5. *P. betle*	0.017	0.005	0.005	0.005											
6. *P. chinense*	0.015	0.003	0.003	0.003	0.005										
7. *P. nigrum*	0.015	0.003	0.000	0.000	0.005	0.003									
8. *P. laetispicum*	0.015	0.003	0.000	0.000	0.005	0.003	0.000								
9. *P. hancei*	0.015	0.003	0.003	0.003	0.005	0.003	0.003	0.003							
10. *P. sarmentosum*	0.015	0.003	0.003	0.003	0.005	0.003	0.003	0.003	0.003						
11. *P. macropiper*	0.015	0.000	0.003	0.003	0.005	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003					
12. *P. cernuum*	0.012	0.012	0.012	0.012	0.014	0.012	0.012	0.012	0.009	0.012	0.012				
13. *P. gaudichaudianum*	0.008	0.014	0.014	0.014	0.015	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.011			
14. *P. pseudopothifolium*	0.012	0.012	0.012	0.012	0.014	0.012	0.012	0.012	0.009	0.012	0.012	0.000	0.011		
15. *P. longum*	0.015	0.003	0.003	0.003	0.005	0.003	0.003	0.003	0.003	0.000	0.003	0.012	0.014	0.012	
Average 0.008															