วารสารการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine
ปีที่ 9 ฉบับที่ 2 กันยายน-ธันวาคม 2554 Vol. 9 No. 2 September-December 2011

นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเถาวัลย์เปรียงจากแหล่งต่าง ๆ และแคลลัส

ธัญญ์วัณณ์ มงคลชัยภักดิ์*
สรเพชร มาสุด*
ปภาวดี สุฉันทบุตร*

บทคัดย่อ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprint) ของตัวอย่างเถาวัลย์เปรียงที่เก็บจากแหล่งต่าง ๆ 19 ตัวอย่าง และแคลลัส 1 ตัวอย่าง รวม 20 ตัวอย่าง เพื่อศึกษาลักษณะภายนอก การตรวจวิเคราะห์ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอและพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง (TLC Fingerprint) พบว่า ลักษณะภายนอกของเถาวัลย์เปรียงไม่มีความแตกต่างกัน ยกเว้นขนาดเถาของตัวอย่างที่ได้จากจังหวัดพิษณุโลกที่มีขนาดใหญ่สุด มีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 6 ซม. และตัวอย่างจากจังหวัดลพบุรีมีขนาดเล็กที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.7 ซม. ซึ่งทั้งสองตัวอย่างมีลายพิมพ์ดีเอ็นเออยู่ในกลุ่มย่อยที่ 2.2 แสดงให้เห็นว่าขนาดของเถาอาจขึ้นกับอายุ ดินฟ้าอากาศ พื้นที่ปลูก น้ำและดินที่ปลูก ผลการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม WinBoot อาจแบ่งตัวอย่างเถาวัลย์เปรียงได้เป็น 3 กลุ่ม โดยมีจังหวัดเพชรบุรี (เขากระปุก), จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (สถานเสาวภา), จังหวัดสระแก้ว, จังหวัดนครปฐม (มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา) และแคลลัส จัดอยู่ในกลุ่มย่อยที่ 1.1 และจังหวัดนนทบุรี, จังหวัดระยองและจังหวัดจันทบุรี จัดอยู่ในกลุ่มย่อยที่ 1.2 ซึ่งกลุ่มย่อยทั้งสองกลุ่มจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ในขณะที่กลุ่มที่ 2 มี 2 กลุ่มย่อยโดย จังหวัดขอนแก่น, จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (อ่าวน้อย), จังหวัดนครราชสีมา, จังหวัดเพชรบุรี (กลัดหลวง) และจังหวัดนครนายก อยู่ในกลุ่มย่อยที่ 2.1 ส่วนจังหวัดกาญจนบุรี (วังเย็น), จังหวัดพิษณุโลก, จังหวัดลพบุรี, จังหวัดนครปฐม (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน), จังหวัดบุรีรัมย์และกรุงเทพฯ อยู่ในกลุ่มย่อยที่ 2.2 ส่วนจังหวัดปราจีนบุรีแยกออกไปเป็นกลุ่มที่ 3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบางของเถาวัลย์เปรียงทุกตัวอย่างมีรูปแบบของรงคเลขผิวบางที่คล้ายคลึงกัน ผลการทดลองเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาความแตกต่างด้านพันธุกรรมของเถาวัลย์เปรียง เพื่อใช้ในการพิสูจน์สายพันธุ์และพัฒนาพันธุ์สมุนไพร

คำสำคัญ : เถาวัลย์เปรียง, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ภูมิหลังและเหตุผล

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในการศึกษาลักษณะของรูปแบบพันธุกรรมหรือจีโนไทป์ (genotype) ของพืช ซึ่งมีความแตกต่างของยีนในแต่ละชนิด (species) หรือแต่ละสายพันธุ์ (strain) จึงสามารถใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อจำแนกชนิด (species) ของพืชที่อยู่ในสกุล (genus) เดียวกัน หรือใช้จำแนกสายพันธุ์ของพืชชนิดเดียวกันได้ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงมีประโยชน์ในการใช้ช่วยคัดเลือกสายพันธุ์ของสมุนไพรที่มีคุณภาพดี เช่น มีสารสำคัญในปริมาณสูงเพื่อการขยายพันธุ์ หรือใช้ในการ

*สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ควบคุมคุณภาพของวัตถุดิบสมุนไพรได้

สมุนไพรชนิดเดียวกันแต่มาจากแหล่งปลูกที่ต่างกันอาจมีปริมาณสารสำคัญที่แตกต่างกันได้มาก ทำให้เกิดปัญหาในการผลิตยาจากสมุนไพรที่มีปริมาณสารสำคัญตามที่กำหนด ทั้งนี้ มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อปริมาณสารสำคัญ เช่น ดิน ภูมิอากาศ ปัจจัยเหล่านี้ทำให้พืชสมุนไพรต้องมีการปรับตัวให้อยู่รอดในสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ บางสายพันธุ์สามารถอยู่รอดและเจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น ในกรณีเช่นนี้ สมุนไพรที่มาจากแหล่งที่ต่างกันนอกเหนือจากความแตกต่างของปริมาณสารสำคัญแล้ว จึงอาจมีความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วย ซึ่งความแตกต่างเหล่านี้ไม่อาจจะตรวจสอบได้ด้วยการดูลักษณะภายนอกหรือลักษณะภายในด้วยกล้องจุลทรรศน์ แต่สามารถใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการตรวจสอบความแตกต่างได้ ตัวอย่างเช่น เปลือกซินโคนา ซึ่งถ้าปลูกในที่ราบจะมีสารควินิน แต่ถ้าปลูกบนยอดเขาหรือที่ลาดชันจะไม่มีสารควินิน

การควบคุมคุณภาพด้วย chemical marker หรือใช้ลายพิมพ์สารเคมี (Chemical fingerprinting) เช่น โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หรือ High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) รวมทั้งการตรวจวิเคราะห์สารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ (Biomarker) เป็นอีกวิธีที่ใช้กันมาก แต่ก็มีข้อจำกัดในบางกรณี เช่น สมุนไพรที่ยังไม่ทราบว่าสารใดเป็นสารออกฤทธิ์ หรือกระบวนการผลิตทำให้เกิดสารใหม่ที่รบกวนการวิเคราะห์ด้วยการใช้ลายพิมพ์สารเคมี การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์โพรไฟล์ของสมุนไพร ซึ่งเหมาะกับการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรม[1-4]

เถาวัลย์เปรียงมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Derris scandens* (Roxb.) Benth. วงศ์ Fabaceae - Papilionoideae[5] ชื่ออื่น ๆ เช่น เถาตาปลา (นครราชสีมา), เครือเขาหนัง, เถาวัลย์เปรียง (ไทยภาคกลาง)[5] ย่านเหมาะ (นครศรีธรรมราช)[6] เถาวัลย์เปรียงเป็นไม้เถาขนาดใหญ่ ชอบเลื้อยพันตามต้นไม้ใหญ่ ขึ้นเองตามชายป่าและที่โล่งทั่วไป ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก ใบย่อยรูปวงรี ดอกช่อห้อยลง ขนาดของดอกย่อยเล็กกว่าดอกสน ดอกสีชมพูอ่อนหรือสีขาว มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ ผลเป็นฝักแบนเล็ก มีเมล็ด 2-4 เมล็ด[6] ตำรายาโบราณระบุว่าเถากินเป็นยาแก้ปวดเมื่อย แก้กษัย ถ่ายเสมหะลงสู่ทวารหนัก ถ่ายเส้นและกษัย ถ่ายเส้นเอ็น รักษาปัสสาวะพิการ ขับปัสสาวะ รักษาโรคบิด ไอ หวัด เป็นต้น[7] มีรายงานผลการวิจัยว่าเถาวัลย์เปรียงออกฤทธิ์เสริมภูมิคุ้มกัน[8] ฤทธิ์ต้านการอักเสบ[9,10] ต้านอนุมูลอิสระ[11] ลดความดันโลหิต[12] ต้านเชื้อรา[13] พบสารสำคัญเป็นสารกลุ่ม isoflavones เช่น genistein และอนุพันธุ์[14]

การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของเถาวัลย์เปรียงจากแหล่งต่าง ๆ และแคลลัส เพื่อแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งจะมีประโยชน์เชิงพาณิชย์[2-4,15-17]

ระเบียบวิธีศึกษา

สถานที่ทดลอง

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแคลลัสเถาวัลย์เปรียง ทำที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

2. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ทำที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ห้องตรวจวิเคราะห์คุณภาพ โรงงานต้นแบบผลิตภัณฑ์สมุนไพร สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

ตัวอย่าง

1. ตัวอย่างเถาวัลย์เปรียง เก็บจากสถานที่ตามภาคต่าง ๆ 19 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างจากกรุงเทพฯ จังหวัดกาญจนบุรี (บ้านวังเย็น) ขอนแก่น จันทบุรี นครนายก (มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน) นครราชสีมา นนทบุรี บุรีรัมย์ ประจวบคีรีขันธ์ (สถานเสาวภา) ประจวบคีรีขันธ์ (อ่าวน้อย) ปราจีนบุรี พิษณุโลก เพชรบุรี (กลัดหลวง) เพชรบุรี (เขากระปุก) ระยอง ลพบุรี สระแก้ว (ตารางที่ 1)

2. เนื้อเยื่อแคลลัสเถาวัลย์เปรียง เกิดจากการนำส่วนของเมล็ดเถาวัลย์เปรียงซึ่งเก็บจากมหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม มาเพาะเลี้ยงและกระตุ้นให้เกิดแคลลัส แล้วเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตร 43+C1 โดยห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้อายุ 1

เดือน น้ำหนักเนื้อเยื่อสดประมาณ 5 กรัม

3. ตัวอย่างเถาวัลย์เปรียงอ้างอิง DMSc Herbarium No. 4568 จากพิพิธภัณฑ์พืชกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

วิธีวิจัย

1. การศึกษาสำรวจเถาวัลย์เปรียงจากแหล่งต่าง ๆ

สำรวจและเก็บตัวอย่างวัตถุดิบเถาวัลย์เปรียงจากแหล่งธรรมชาติต่าง ๆ ในจังหวัดภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง ตัวอย่างตามข้อ 1 รวม 19 ตัวอย่าง เก็บส่วนของลำต้น, ใบ, ดอกและฝักทำการตรวจลักษณะภายนอกของลำต้น ขนาดเถา บันทึกตาม ลำต้น, ใบ, ดอก, ฝัก ตรวจสอบชนิดพืชอย่างถูกต้องตามหลักพฤกษอนุกรมวิธาน โดยห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง (DMSc Herbarium No.4568) จากพิพิธภัณฑ์พืช กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ พบว่า คือ *Derris scandens* (Roxb.) Benth.วงศ์ Fabaceae - Papilionoideae สุ่มเลือกส่วนยอดใบอ่อน จากแต่ละตัวอย่างนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2.1 ตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์มีจำนวน 20 ตัวอย่าง ประกอบด้วยใบอ่อนเถาวัลย์เปรียงแช่เย็นจำนวน 19 ตัวอย่าง และเนื้อเยื่อแคลลัส 1 ตัวอย่าง

2.2 สกัดดีเอ็นเอเถาวัลย์เปรียง ทำโดยการบดใบอ่อน 2 - 3 ใบ (แล้วแต่ขนาดใบ) หรือเนื้อเยื่อแคลลัส ประมาณ 5 กรัมน้ำหนักสดให้ละเอียด และเติมน้ำแข็งแห้งหรือไนโตรเจนเหลวลงไปขณะบด ตักแบ่งตัวอย่างที่บดแล้วประมาณ 50 มิลลิกรัม นำไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจากพืช UltraClean™ Plant DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.) ตามขั้นตอนการใช้งานผลิตภัณฑ์ ตัวอย่างส่วนที่เหลือเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ

2.3 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ร่วมกับการใช้เทคนิค ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) โดยใช้ primer จำนวน 12 primer ซึ่ง primer M15 เป็น primer ที่ดีที่สุด มีลำดับเบสเป็น 5′-GAAT GAAT GAAT GAAT-3′ และมีส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ดังนี้ น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปลอดเชื้อ 5.8 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 1.0 ไมโครลิตร, 100 mM dNTP 1.0 ไมโครลิตร, เอนไซม์ Prime Taq DNA Polymerase 5.0 U/ul 0.2 ไมโครลิตร, 10 mM primer 1.0 ไมโครลิตร และ ดีเอ็นเอตัวอย่าง 1.0 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาชุดควบคุมใช้น้ำกลั่นบริสุทธิ์ปลอดเชื้อ 1.0 ไมโครลิตรแทนดีเอ็นเอตัวอย่าง

2.4 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใช้เครื่อง GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) โดยมีสภาวะการทำงานดังนี้ - preheating ที่ 94°ซ เป็นเวลา 3 นาที แล้วทำปฏิกิริยา heating-annealing-extension 10 รอบ (94°ซ 1 นาที -> 50°ซ 1 นาทีและลดอุณหภูมิลง 0.5°ซ ทุกรอบ -> 72°ซ 1 นาที) จากนั้นทำปฏิกิริยา heating-annealing extension อีก 25 รอบ (94°ซ 1 นาที -> 42.5°ซ 1 นาที -> 72°ซ 1 นาที) แล้วบ่มต่ออีก 5 นาทีที่อุณหภูมิ 72°ซ จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่ 4°ซ

2.5 การทำเจลอิเล็คโตรโฟลิซิสเพื่อแยกแถบดีเอ็นเอ ใช้เจลแอกาโรสที่ความเข้มข้น 1.8% ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ที่ความเข้มข้น 0.5x เติมสีย้อมแถบดีเอ็นเอ GelStar® (Cambrex Bio Science Rockland, Inc.) แล้วแยกแถบดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า 100 mV เป็นเวลาประมาณ 90 นาที

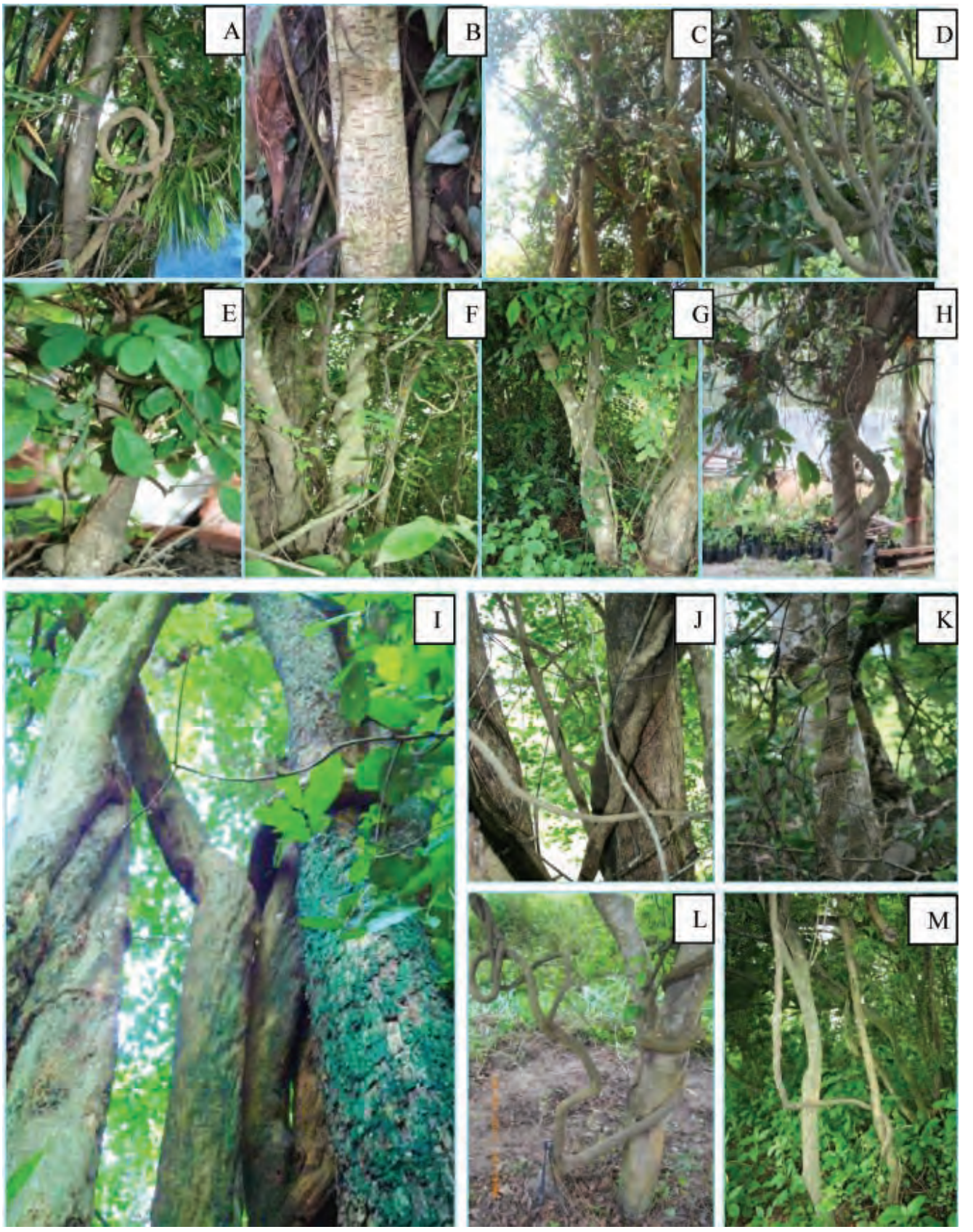
2.6 บันทึกภาพเจลแอกาโรส โดยใช้ชุดถ่ายภาพ Platinum by UVItec Cambridge และวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม UVIband version 12.11 เก็บข้อมูลจำนวนและขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้ นำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของตัวอย่างเถาวัลย์เปรียงด้วยโปรแกรม WinBoot[15]

3. การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทรกราฟีผิวบาง (TLC Fingerprint) ของเถาวัลย์เปรียงจากแหล่งต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเถาวัลย์เปรียงอ้างอิง

3.1 สกัดตัวอย่างเถาวัลย์เปรียง 1.0 กรัมด้วยเอทานอลจำนวน 20 มิลลิลิตร โดยวิธีรีฟลักซ์บนอ่างไอน้ำ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที กรองขณะร้อน นำสารที่กรองได้ไประเหยจนแห้งด้วยเครื่องสุญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ละลายสารที่ได้ด้วยเอทานอลจำนวน 3.0 มิลลิลิตร ใช้หลอดรูเล็ก (capillary tube) ดูดสารที่ได้แต้มลงในแผ่นซิลิกาเจล ตัวอย่างละ 5 ไมโครลิตร

3.2 น้ำยาแยกใช้คลอโรฟอร์ม เมทานอล น้ำและกรดแอซิติกในอัตราส่วน 80:30:5:1

3.3 การตรวจสอบ นำแผ่นซิลิกาเจลไปพ่นด้วยสารละลาย 20% กรดกำมะถัน ในเอทานอล ทิ้งไว้ให้แห้ง



รูปที่ 1 ลักษณะภายนอกของต้นเถาวัลย์เปรียง (A=กรุงเทพฯ, B=จันทบุรี, C=นครนายก, D=นครปฐม (ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน), E=นนทบุรี, F=ประจวบคีรีขันธ์ (สถานเสาวภา), G=ประจวบคีรีขันธ์ (อ่าวน้อย), H=ปราจีนบุรี, I=พิษณุโลก, J=เพชรบุรี (กลัดหลวง), K=เพชรบุรี (เขากระปุก) L=ระยอง และM=ลพบุรี

รูปที่ 2 ลักษณะลำต้นตัดตามขวางของเถาวัลย์เปรียงจากแหล่งต่างๆ A=กรุงเทพ ฯ, B=กาญจนบุรี (บ้านวังเย็น), C=ขอนแก่น, D=จันทบุรี, E=นครนายก, F=นครปฐม, G=นครราชสีมา, H=นนทบุรี, I=บุรีรัมย์, J=ประจวบคีรีขันธ์ (อ่าวน้อย), K=ประจวบคีรีขันธ์ (สถานเสาวภา), L=ปราจีนบุรี, M=เพชรบุรี (กลัดหลวง), N=เพชรบุรี (เขากระปุก), O=ระยอง, P=สระแก้ว, Q= ลพบุรี, R =พิษณุโลก และ S =เถาวัลย์เปรียงอ้างอิง

นำแผ่นซิลิกาเจลไปทำให้ร้อนบนเตาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที สังเกตสีที่เกิดขึ้นภายใต้แสงธรรมชาติ

ผลการศึกษา

1. ผลการศึกษาสำรวจเถาวัลย์เปรียงจากแหล่งต่างๆ

ลักษณะภายนอกเถายาวประมาณ 30 เมตร เปลือกสีน้ำตาลอมเทา มีจุดสีขาวกระจายอยู่ทั่วไปเนื้อในเถาสีน้ำตาล มีวงปีตั้งแต่ 3 - 5 วงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 - 6.5 เซนติเมตร (รูปที่ 1, 2 และตารางที่ 1) ใบประกอบแบบขนนกปลายคี่ ใบย่อย 3-5 คู่ รูปใบหอกหรือรูปไข่ ปลายแหลม โคนสอบแคบกึ่งรูปลิ่ม (รูปที่ 3) ช่อดอกแบบช่อกระจะยาว 25-45 เซนติเมตร ดอกรูปดอกถั่ว กลีบดอกสีขาว ใบประดับขนาดเล็กรูปคล้ายสามเหลี่ยมแกมรูปไข่ ใบประดับย่อยรูปไข่ รังไข่มี

ตารางที่ 1 รายชื่อสถานที่ตามภาคต่างๆ ในการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของเถาวัลย์เปรียง

ลำดับที่	จังหวัด	ภาค	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเถาวัลย์เปรียง (ซม.)
1	กรุงเทพฯ	กลาง	2.1
2	กาญจนบุรี (บ้านวังเย็น)	กลาง	3.8
3	ขอนแก่น	ตะวันออกเฉียงเหนือ	4.9
4	แคลลัส C1 (อาหารสูตร 43+C1)	กลาง	-
5	จันทบุรี	กลาง	1.8
6	นครนายก	กลาง	3.7
7	นครปฐม (ม.มหิดล วิทยาเขตศาลายา)	กลาง	2.9
8	นครปฐม (ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน)	กลาง	2.5
9	นครราชสีมา	ตะวันออกเฉียงเหนือ	3.0
10	นนทบุรี	กลาง	2.4
11	บุรีรัมย์	ตะวันออกเฉียงเหนือ	2.7
12	ประจวบคีรีขันธ์ (สถานเสาวภา)	ใต้	3.2
13	ประจวบคีรีขันธ์ (อ่าวน้อย)	ใต้	3.9
14	ปราจีนบุรี	กลาง	3.0
15	พิษณุโลก	เหนือ	6.0
16	เพชรบุรี (กลัดหลวง)	ใต้	3.8
17	เพชรบุรี (เขากระปุก)	ใต้	3.1
18	ระยอง	ใต้	2.3
19	ลพบุรี	กลาง	1.7
20	สระแก้ว	กลาง	3.5
R	เถาวัลย์เปรียงอ้างอิง		

6-8 ออวุล (รูปที่ 4) ผลเป็นฝักรูปขอบขนาน ปลายและโคนแหลม (รูปที่ 5) เมล็ดรูปไต สีเทากึ่งน้ำตาลเข้ม มี 1-5 เมล็ด

2. ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ของดีเอ็นเอเถาวัลย์เปรียง 20 ตัวอย่าง ได้ทำการทดสอบ primer จำนวน 12 primer พบว่า ISSR primer M15 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5′ -GAAT GAAT GAAT GAAT-3′ เป็น primer ที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งได้แถบดีเอ็นเอดังแสดงในรูปที่ 6 เมื่อนำข้อมูลจำนวนและขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม WinBoot สามารถจัดกลุ่มตัวอย่างตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ 3 กลุ่มใหญ่ โดยมีตัวอย่างจากปราจีนบุรีเพียงตัวอย่างเดียวที่ถูกจัดแยกออกจากตัวอย่างอื่นเป็นกลุ่มที่สามอย่างชัดเจน (แผนภูมิที่ 1 ตารางที่ 2 และตารางที่ 3) ภายในกลุ่มใหญ่ที่หนึ่งและสองสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยภายในได้อีกสองกลุ่มย่อย ดังนี้

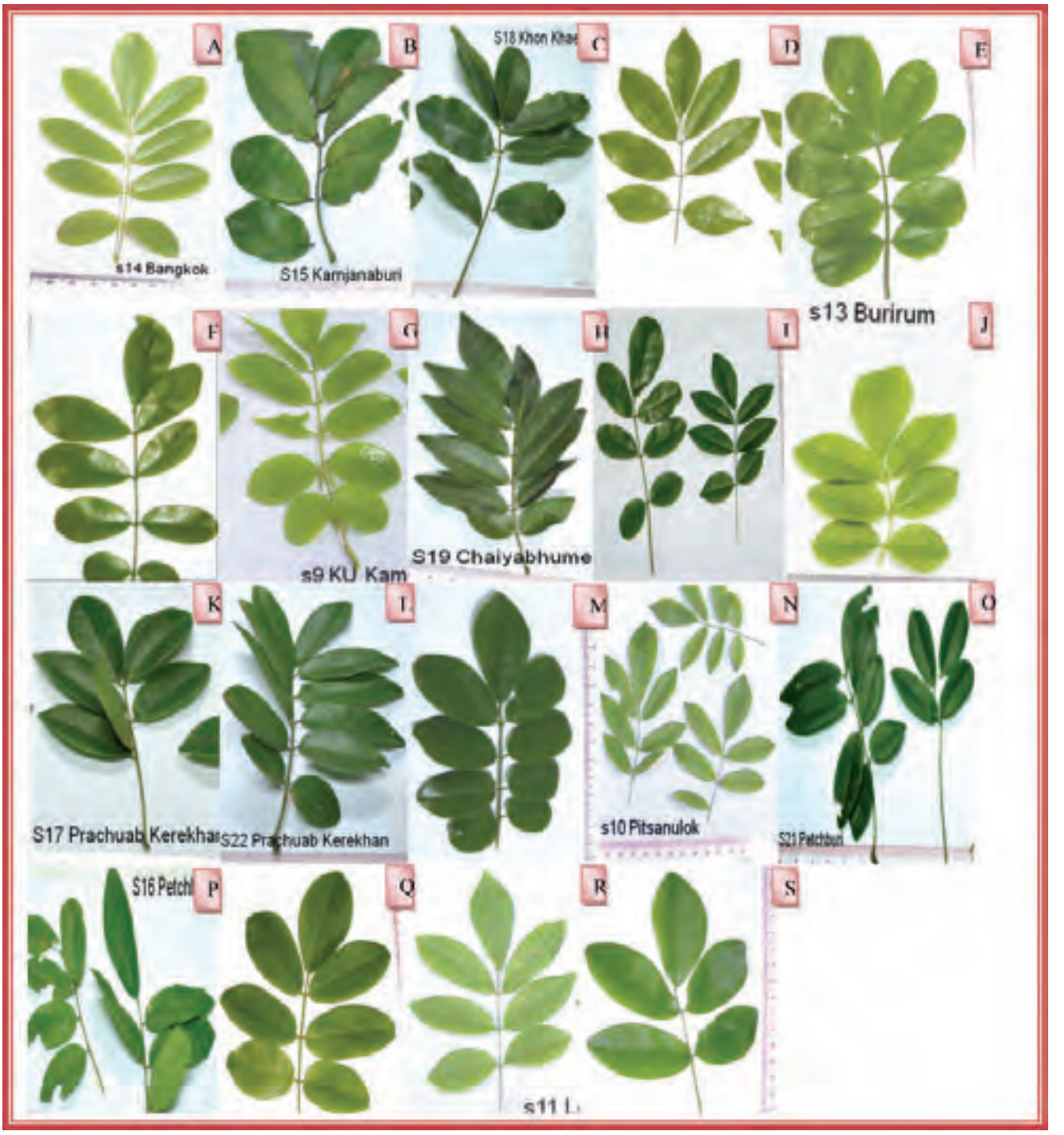
กลุ่มย่อยที่ 1.1 ประกอบด้วยตัวอย่างจาก เพชรบุรี (เขากระปุก), ประจวบคีรีขันธ์ (สถานเสาวภา), สระแก้ว, นครปฐม (มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา) และแคลลัส

กลุ่มย่อยที่ 1.2 ประกอบด้วยตัวอย่างจาก นนทบุรี, ระยอง และจันทบุรี

กลุ่มย่อยที่ 2.1 ประกอบด้วยตัวอย่างจาก ขอนแก่น, ประจวบคีรีขันธ์ (อ่าวน้อย), นครราชสีมา, เพชรบุรี (กลัดหลวง) และ นครนายก

กลุ่มย่อยที่ 2.2 ประกอบด้วยตัวอย่างจาก กาญจนบุรี (วังเย็น), พิษณุโลก, ลพบุรี, นครปฐม (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน), บุรีรัมย์ และกรุงเทพฯ

ค่า Similarity Index (SI) ของเถาวัลย์เปรียง ทั้ง 20 ตัวอย่างในตารางที่ 3, แสดงเป็นการเปรียบเทียบความใกล้ชิด

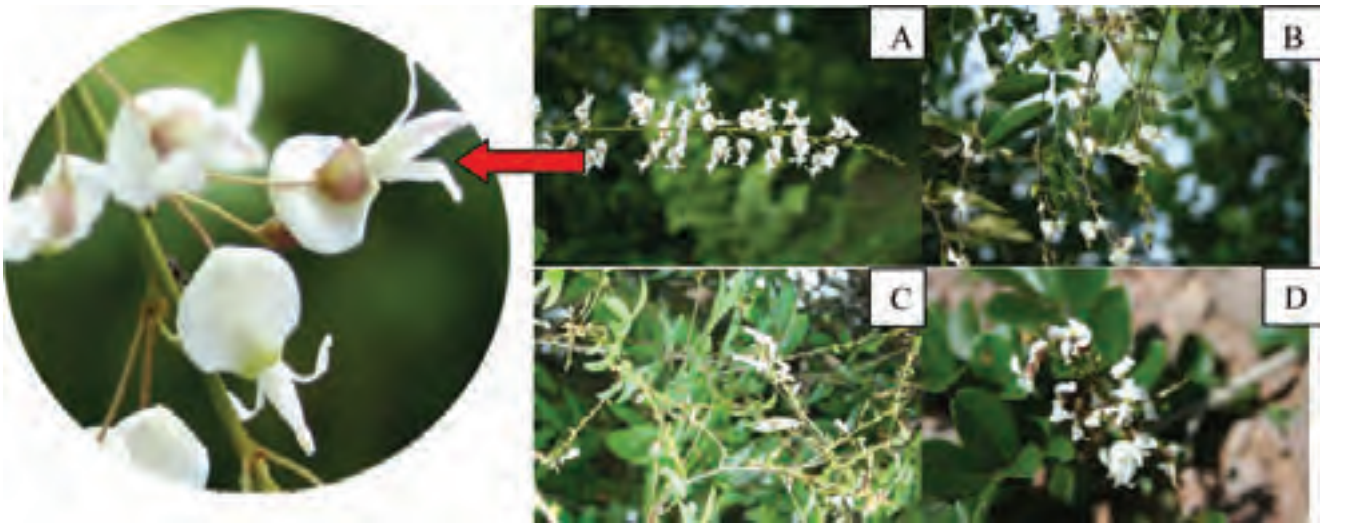


รูปที่ 3 ลักษณะใบของเถาวัลย์เปรียงจากแหล่งต่างๆ A=กรุงเทพ ฯ, B=กาญจนบุรี (บ้านวังเย็น), C= ขอนแก่น, D=จันทบุรี, E=นครนายก, F=นครปฐม, G=นครปฐม (ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน), H=นครราชสีมา, I=นนทบุรี, J=บุรีรัมย์, K=ประจวบคีรีขันธ์ (สถานเสาวภา), L=ประจวบคีรีขันธ์ (อ่าวน้อย), M=ปราจีนบุรี, N=พิษณุโลก, O=เพชรบุรี (กลัดหลวง), P=เพชรบุรี (เขากระปุก), Q=ระยอง, R= ลพบุรี และ S=สระแก้ว

ทางพันธุกรรมระหว่างตัวอย่างเถาวัลย์เปรียงแต่ละคู่ ค่า SI ที่เข้าใกล้ 1 มากเท่าใดหมายถึงตัวอย่างคู่นั้นมีฐานพันธุกรรมใกล้ชิดกันมาก ส่วนค่า SI ที่เท่ากับศูนย์หรือเข้าใกล้ศูนย์หมายถึงตัวอย่างคู่นั้นมีฐานพันธุกรรมที่ต่างกัน จนอาจถือได้ว่าเป็นพืชต่างสายพันธุ์กัน

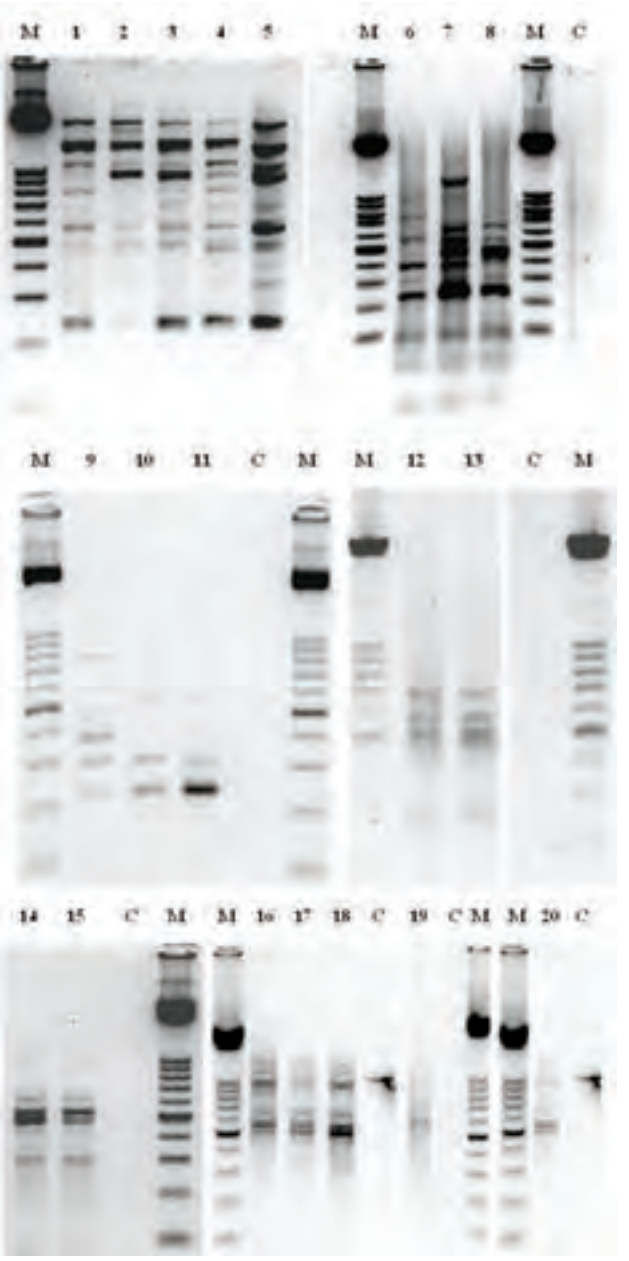
3. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง (TLC Fingerprint)

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลข



รูปที่ 4 ลักษณะดอกของเถาวัลย์เปรียงจากแหล่งต่างๆ A=เพชรบุรี (เขากระปุก), B=เพชรบุรี (กลัดหลวง), C=ประจวบคีรีขันธ์ (อ่าวน้อย) และ D=นครราชสีมา

รูปที่ 5 ลักษณะของฝักเถาวัลย์เปรียงจากแหล่งต่างๆ E=เพชรบุรี (เขากระปุก), F=เพชรบุรี (กลัดหลวง), G=ประจวบคีรีขันธ์ (อ่าวน้อย) และ H=นครราชสีมา



รูปที่ 6 แอกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ กับไพร์เมอร์ M15

หมายเหตุ : M = ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100-base pairs DNA marker (BioExcellece), C = ชุดควบคุม, 1 = ระยอง, 2 = จันทบุรี, 3 = นนทบุรี, 4 = นครปฐม (ม.มหิดล วิทยาเขตศาลายา), 5 = แคลลัส, 6 = นครนายก, 7 = ปราจีนบุรี, 8 = สระแก้ว, 9 = นครปฐม (ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน), 10 = พิษณุโลก, 11 = ลพบุรี, 12 = บุรีรัมย์, 13 = กรุงเทพฯ, 14 = เพชรบุรี, 15 = ประจวบคีรีขันธ์ (สถานเสาวภา), 16 = ขอนแก่น, 17 = นครราชสีมา, 18 = กาญจนบุรี, 19 = เพชรบุรี และ 20 = ประจวบคีรีขันธ์ (อ่าวน้อย)

ผิวบางของเถาวัลย์เปรียง 20 ตัวอย่างเปรียบเทียบกับเถาวัลย์เปรียงอ้างอิง พบว่า ทุกตัวอย่างเมื่อตรวจสอบด้วยกรดกำมะถันให้รูปแบบของรงคเลขผิวบางที่คล้ายคลึงกัน (รูปที่ 7)

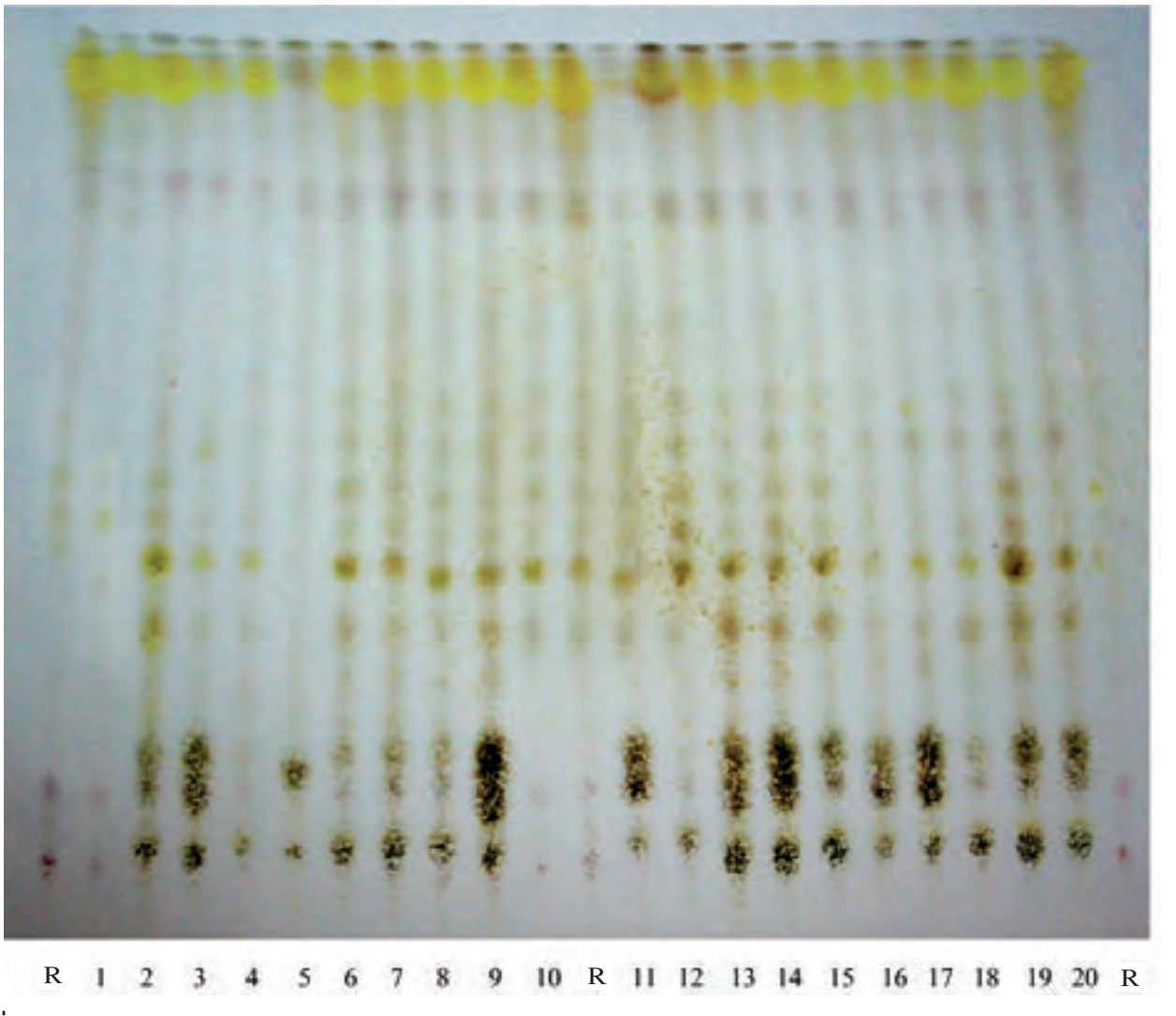
วิจารณ์

การศึกษาลักษณะทางกายภายภายนอกของเถาวัลย์เปรียงซึ่งเก็บตัวอย่างจากสถานที่ตามภาคต่าง ๆ มีลักษณะไม่แตกต่างกันยกเว้นขนาดของเถาของตัวอย่างจากพิษณุโลก มีขนาดใหญ่ที่สุดโดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 6 เซนติเมตร และตัวอย่างจากจังหวัดลพบุรีมีขนาดเล็กที่สุด คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.7 เซนติเมตร แต่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทั้งสองตัวอย่างถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อยที่ 2.2 แสดงให้เห็นว่าขนาดของเถาอาจขึ้นกับอายุของต้น ดินฟ้าอากาศ พื้นที่ปลูก น้ำและดินที่ปลูก จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบางพบว่า ทุกตัวอย่างมีรูปแบบของรงคเลขผิวบางที่คล้ายคลึงกัน เนื่องจากการตรวจด้วยกรดกำมะถันซึ่งเป็น Universal reagent ทำให้ตรวจสอบสารทุติยภูมิได้หลายกลุ่มได้มากกว่า (รูปที่ 7) ดังนั้นการตรวจสอบวิธีทางเคมีไม่สามารถจำแนกความแตกต่างในระดับโมเลกุลของเถาวัลย์เปรียง แต่สามารถจำแนกได้โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แบ่งกลุ่มของเถาวัลย์เปรียงเป็น 3 กลุ่มใหญ่ หรือ 5 กลุ่มย่อยดังตารางที่ 2

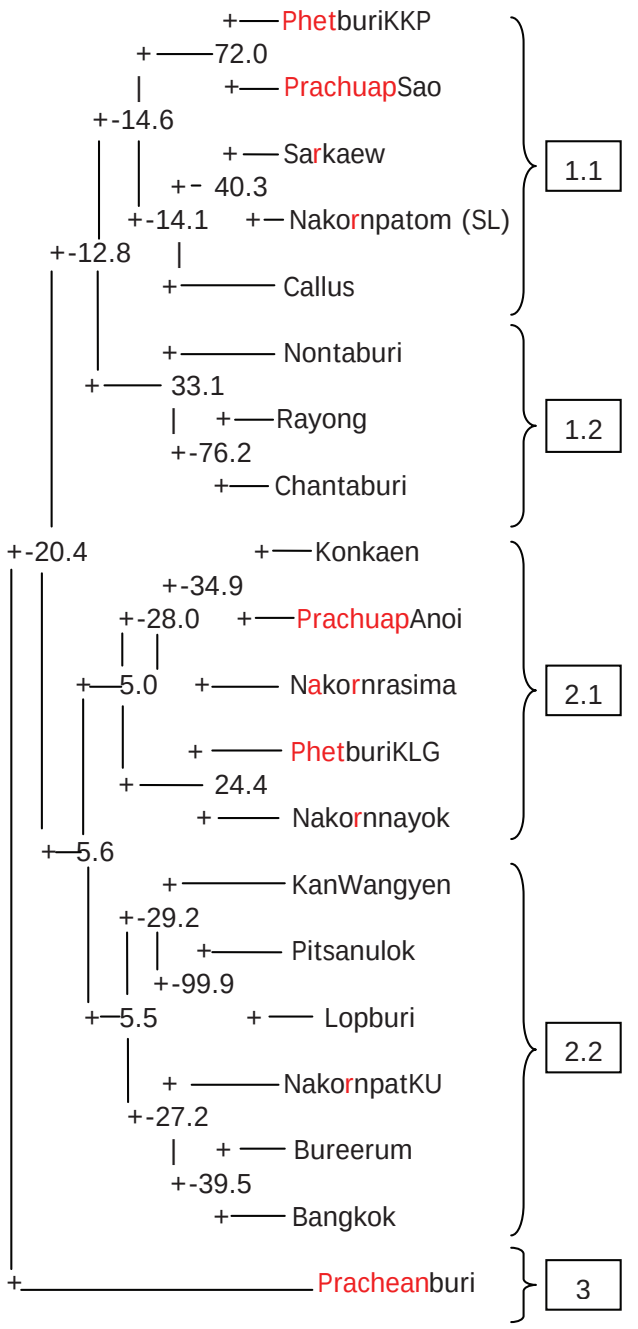
เป็นที่น่าสังเกตว่าแคลลัสที่ชักนำให้เกิดจากส่วนของเมล็ดเถาวัลย์เปรียงซึ่งเป็นเมล็ดพันธุ์ที่ได้มาจากพื้นที่บริเวณมหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม ตรวจพบว่ามีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอตรงกับตัวอย่างใบจากมหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา เช่นกัน (รูปที่ 6 หมายเลข 5 และ 4 ตามลำดับ) อีกทั้งยังถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มย่อยที่ 1.1 เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 2) ส่วนตัวอย่างจาก จังหวัดระยอง จันทบุรี และนนทบุรี ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มย่อยที่ 1.2 เดียวกัน มีค่า SI ระหว่างจังหวัดระยองกับจังหวัดจันทบุรีเท่ากับ 0.5882 และจังหวัดระยองกับจังหวัดนนทบุรีเท่ากับ 0.3333 (ตารางที่ 3) เนื่องจากเถาที่เก็บจากต้นที่ จังหวัดนนทบุรี และจังหวัดระยองเป็นต้นที่นำมาจากต้นแม่พันธุ์จากสวนสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดจันทบุรี แสดงให้เห็นว่าการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถแยกความแตกต่างทางด้านพันธุ

ตารางที่ 2 สรุปผลวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 20 ตัวอย่างโดยโปรแกรม WinBoot

กลุ่มใหญ่	กลุ่มย่อย	ตัวอย่าง (จังหวัด)
กลุ่มที่ 1 แคลลัส	1.1	เพชรบุรี (เขากระปุก), ประจวบคีรีขันธ์ (เสาวภา), สระแก้ว, นครปฐม (ม.มหิดล วิทยาเขตศาลายา),
	1.2	นนทบุรี, ระยอง, จันทบุรี
กลุ่มที่ 2	2.1	ขอนแก่น, ประจวบคีรีขันธ์ (อ่าวน้อย), นครราชสีมา, เพชรบุรี (กลัดหลวง), นครนายก
	2.2	กาญจนบุรี (วังเย็น), พิษณุโลก, ลพบุรี, นครปฐม (ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน), บุรีรัมย์, กรุงเทพฯ
กลุ่มที่ 3 ปราจีนบุรี	---	---



รูปที่ 7 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีรงคเลขผิวบาง ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากเถาวัลย์เปรียงจากแหล่งต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเถาวัลย์เปรียงอ้างอิง เมื่อใช้สารละลายผสมคลอโรฟอร์ม: เมทานอล: น้ำ : กรดแอซิติกในอัตราส่วน 80:30:5:1 เป็นน้ำยาแยก ตรวจสอบด้วยสารละลายกรดกำมะถัน 20% เมื่อได้รับความร้อน กำหนดให้ R=เถาวัลย์เปรียงอ้างอิง, 1=จ.ระยอง, 2=จ.จันทบุรี, 3=จ.นนทบุรี, 4=จ.นครปฐม (ม.มหิดล วิทยาเขตศาลายา), 5=แคลลัส C3 (อาหารสูตร 43+C1), 6=จ.นครนายก, 7=จ.ปราจีนบุรี, 8=จ.สระแก้ว, 9=จ.นครปฐม (ม. เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน), 10=จ.พิษณุโลก, 11=จ.ลพบุรี, 12=จ.บุรีรัมย์, 13=จ.กรุงเทพฯ, 14=จ.เพชรบุรี (กลัดหลวง), 15=จ.ประจวบคีรีขันธ์, 16=จ.ขอนแก่น, 17=จ.นครราชสีมา, 18=จ.กาญจนบุรี, 19=จ.เพชรบุรี (เขากระปุก), 20=จ.ประจวบคีรีขันธ์ (อ่าวน้อย)



แผนภูมิที่ 1 แผนภูมิผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ รวม 20 ตัวอย่าง

กรรมได้อย่างถูกต้องดัง เช่น การศึกษาการใช้เทคนิค Intersimple sequence repeat (ISSR) markers ในการตรวจสอบการจำแนกพันธุ์ทุเรียน พบว่าวิธีการนี้สามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถแยกพันธุ์ทุเรียนพันธุ์การค้า 4 พันธุ์ได้อย่างชัดเจน ได้แก่ พันธุ์หมอนทอง กระดุม ก้านยาว และชะนี อีกทั้งยังสามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างต้นในพันธุ์เดียวกัน (plant-to-plant variation) ได้[16] นอกจากนั้นยังสามารถแยกความแตกต่างของพืชสมุนไพรสกุล *Derris* 5 ชนิด ได้แก่ *D. scandens* (เถาวัลย์เปรียง), *D. elliptica* (หางไหลแดง), *D. malaccensis* (หางไหลขาว), *D. trifoliata* (ถอบแถบน้ำ) และ *D. reticulate* (ชะเอมเหนือ) โดยใช้เทคนิค Random amplification of polymorphic DNA RAPD สามารถแบ่งกลุ่มพืชสมุนไพรได้ 2 กลุ่ม ซึ่ง *D. trifoliata* แยกความแตกต่างด้านพันธุกรรมจากพืชสมุนไพรทั้ง 4 ชนิด ได้[17]

อย่างไรก็ตามผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเถาวัลย์เปรียงในรายงานนี้ ถือได้ว่าเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการวิจัยเกี่ยวกับข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของเถาวัลย์เปรียง ที่จะนำไปสู่ความเชื่อมโยงของพันธุกรรมกับการสร้างสารสำคัญที่มีคุณสมบัติเป็นยาสมุนไพรในเถาวัลย์เปรียง รวมถึงคุณสมบัติด้านกายภาพอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการพัฒนาให้เป็นพืชสมุนไพรเศรษฐกิจต่อไป

สรุป

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ได้เก็บตัวอย่างเถาวัลย์เปรียงจากแหล่งต่าง ๆ 19 ตัวอย่าง (รูปที่ 1, 2, 3, 4 และ 5) และได้ศึกษาลักษณะภายนอกพบว่าลักษณะภายนอกไม่มีความแตกต่างกันยกเว้นขนาดเถาของจังหวัดพิษณุโลก มีเถาใหญ่ที่สุดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 6.0 ซม. และจังหวัดลพบุรี มีเถาเล็กที่สุด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 1.7 ซม. (ตารางที่ 1) เมื่อตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์จากข้อมูลแถบดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม WinBoot (รูปที่ 6, ตารางที่ 2, 3 และแผนภูมิที่ 1) พบว่าแบ่งเป็น 3 กลุ่ม (ตารางที่ 2 และ 3, แผนภูมิที่ 1) มีกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 โดยกลุ่มที่ 3 จ.ปราจีนบุรีแยกออกไปต่างหาก ส่วนตัวอย่างจาก จ.เพชรบุรี (เขากระปุก), ประจวบคีรีขันธ์ (เสาวภา), สระแก้ว, จ.นครปฐม (ม.มหิดล วิทยาเขตศาลายา) และแคลลัส จัดอยู่ใน กลุ่มย่อยที่ 1.1 และจ.นนทบุรี, ระยอง และจันทบุรี จัดอยู่ในกลุ่มย่อยที่ 1.2 ซึ่งกลุ่มย่อยทั้งสองจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ในขณะที่กลุ่มที่ 2 มีสองกลุ่มย่อยโดย จ.ขอนแก่น, จ.ประจวบคีรีขันธ์ (อ่าวน้อย), จ.นครราชสีมา, จ.เพชรบุรี (กลัดหลวง) และจ.นครนายก อยู่ในกลุ่มย่อยที่ 2.1 ส่วน จ.กาญจนบุรี (วังเย็น), จ.พิษณุโลก, จ.ลพบุรี, จ.นครปฐม (ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน), จ.บุรีรัมย์และกรุงเทพฯ

ตารางที่ 3 ค่า Similarity Index (SI) ของเถาวัลย์เปรียง 20 ตัวอย่าง

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	PetburiKKP	PajuabSao	Konkaen	Nkonrasima	KanWangyen	PetburiKLG	PajuabAnoi	NakonpatKU	Pitsanulok	Lopburi	Bureerum	Bangkok	Rayong	Chantaburi	Nontaburi	Nakonpatom SL	Callus	Nakonnayok	Pajeanburi	Sakaew
1	1.000000																			
2	0.444444	1.000000																		
3	0.000000	0.000000	1.000000																	
4	0.000000	0.000000	0.333333	1.000000																
5	0.105263	0.210526	0.100000	0.111111	1.000000															
6	0.000000	0.000000	0.117647	0.266667	0.000000	1.000000														
7	0.111111	0.111111	0.315789	0.235294	0.210526	0.000000	1.000000													
8	0.000000	0.000000	0.133333	0.307692	0.133333	0.166667	0.000000	1.000000												
9	0.000000	0.166667	0.153846	0.181818	0.307692	0.000000	0.166667	0.250000	1.000000											
10	0.000000	0.166667	0.153846	0.181818	0.307692	0.000000	0.166667	0.250000	1.000000	1.000000										
11	0.000000	0.000000	0.000000	0.166667	0.000000	0.000000	0.000000	0.444444	0.000000	0.000000	1.000000									
12	0.000000	0.285714	0.000000	0.000000	0.266667	0.000000	0.142857	0.200000	0.250000	0.250000	0.444444	1.000000								
13	0.111111	0.000000	0.000000	0.000000	0.105263	0.125000	0.111111	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	1.000000							
14	0.117647	0.000000	0.000000	0.000000	0.222222	0.000000	0.117647	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.588235	1.000000						
15	0.000000	0.111111	0.000000	0.000000	0.000000	0.125000	0.111111	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.142857	0.333333	0.235294	1.000000					
16	0.100000	0.100000	0.000000	0.000000	0.095238	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.300000	0.421053	0.100000	1.000000				
17	0.100000	0.200000	0.095238	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.125000	0.100000	0.105263	0.200000	0.272727	1.000000			
18	0.000000	0.000000	0.200000	0.222222	0.100000	0.235294	0.000000	0.266667	0.153846	0.153846	0.000000	0.000000	0.105263	0.000000	0.105263	0.000000	0.095238	1.000000		
19	0.000000	0.000000	0.000000	0.133333	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.181818	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.111111	0.000000	0.000000	1.000000	
20	0.133333	0.133333	0.000000	0.000000	0.000000	0.153846	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.133333	0.000000	0.133333	0.352941	0.117647	0.125000	0.153846	1.000000

(ค่าที่ใกล้กับ 1.000000 หมายถึง ตัวอย่างคู่นั้นมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสูงมาก, ค่า 0 หมายถึง ตัวอย่างคู่นั้นมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมต่ำมาก จนน่าจะถือได้ว่าต่างสายพันธุ์)

อยู่ในกลุ่มย่อยที่ 2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมีด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบางพบว่า ทุกตัวอย่างมีรูปแบบของลายพิมพ์โครมาโทกราฟีผิวบางที่คล้ายคลึงกัน (รูปที่ 7)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นางสาวมะลิวัลย์ จรรยาวณิชกุล นักวิจัย สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรม พันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, นางสาวไพริน ทองคุ้ม นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชำนาญการพิเศษ ห้องปฏิบัติการเภสัชเวทและพิพิธภัณฑ์พืช สถาบันวิจัยสมุนไพร ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเถาวัลย์เปรียงอ้างอิง และนางสาวดวงเพ็ญ ปัทมดิลก เภสัชกรชำนาญการพิเศษ ห้องปฏิบัติการเภสัชเคมี สถาบันวิจัยสมุนไพร ที่ให้คำแนะนำด้านการตรวจวิเคราะห์รงคเลขผิวบาง (TLC Fingerprint)

เอกสารอ้างอิง

1. Breithaupt H. Back to the roots. EMBO Rep. 2003;4:10 -2.
2. Mihalov JJ, Marderosain AD, Pierce JC. DNA identification of commercial ginseng samples. J Agric Food Chem 2000;48:3744-52.
3. Henry RJ. Plant genotyping: The DNA fingerprint of plants. New York: CABI Publishing,; 2001.
4. Ha WY, Show PC, Liu J, Yau FC, Wang J. Authentication of *Panax qingseng* and Panax 2002.
5. เต็ม สมิตินันทน์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม พ.ศ. 2544. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: บริษัท ประชาชน จำกัด; 2554. หน้า 184.
6. พเยาว์ เหมือนวงศ์ญาติ. สมุนไพรก้าวใหม่ (แก้ไขปรับปรุงใหม่จากตำราวิทยาศาสตร์สมุนไพร). พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: บริษัท ที.พี. พริ้นท์ จำกัด; 2537. หน้า 86-7.
7. วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ: โอเอสพริ้นติ้ง เฮ้าส์; 2531. หน้า 349-50.
8. Anchalee C, Pranee C. Immunomodulating activity of *Derris scandens* Benth. Thai J Pharm Sci 1998;22:137-48.
9. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JR, Inharat A. An evaluation of the activity related to inflammation of four plants used in Thailand to treat arthritis. J Ethnopharmacol 2003;85:207-13.
10. กัลยา อนุลักขณาปกรณ์, บรรจง ชาวไร่, ยุวดี เมตตาเมธา, ประไพ วงศ์สินคงมั่น, อภิรักษ์ ศักดิ์เพ็ชร, จารีย์ บันสิทธิ์, ปราณี ชวลิตธำรง. ฤทธิ์ต้านอักเสบของผักคาวตอง (*Houttluynia cordata* Thunb.) และเถาวัลย์เปรียง (*Derris scandens* Benth.). สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข [สืบค้น 7 กันยายน 2554]. Available from : http://www.dtam.moph.go.th/alternative/viewstory.phd?id=520.
11. ฐิติพร ทับทิมทอง, กัลยา อนุลักขณาปกรณ์, จิรานุช มิ่งเมือง, อภิรักษ์ ศักดิ์เพ็ชร, จารีย์ บันสิทธิ์. ฤทธิ์ การต้านออกซิเดชันของเถาวัลย์เปรียง, รางจืด, ผักคาวตอง, ปัญจขันธ์ และบัวบก. [สืบค้น 18 พฤศจิกายน 2554]. Available from : http://www.dtam.moph.go.th/alternative/viewstory.php?id=494.
12. Jansakul C, Srichanbarn A, Saelee A. Some pharmacological studies of a hypotensive fraction from *Derris scandens*. J Sci Soc Thailand 1997;23:323-34.
13. Sekine T, Inagaki M, Koseki T, Murakoshi I, Fuji Y, Yamamoto K, Ruangrungsi N, Ikegami F. Antifungal constituents of Thai medicinal plants, *Derris scandens* and *Rauwolfia verticillata*. Current advances in natural Product research. The Third NRCT-JSPS joint seminar. Bangkok, Thailand. 1996;229-35.
14. พิสมัย เหล่าภัทรเกษม, บรรจบ ศรีภา, วิรุฬห์ เหล่าภัทรเกษม. ฤทธิ์ต้านการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งของเถาวัลย์เปรียงต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี. ศรีนครินทร์เวชสาร 2550;22:339-45.
15. Yap I V, Nelson R J. WinBoot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. Phipippines: Internaitonal Rice Research Institute; 1996.
16. ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, สุภาพ สุนทรนนท์, ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์. การจำแนกทุเรียนด้วย Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Marker. วารสารวิทยาการเกษตร 2548;36:262-4.
17. Sukrong S, Phadungcharoen T, Ruangrungsi N. DNA fingerprinting of medicinally used *Derris* Species by RAPD molecular markers. Thai J Pharm Sci 2005;29:155-63.

Abstract

DNA Fingerprinting of *Derris scandens* Benth. from Callus and Different Locations

Thanyawan Mongkolchaipak*, Sorrapetch Marsud*, Paparvadee Suchantaboot*

**Medicinal Plant Research Institute, Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health, Nonthaburi Province*

Twenty samples of *Derris scandens* Benth., 19 of which were collected from different provinces and one which was from a callus cultured on media formulation 43+C1, underwent morphological study, DNA fingerprint analysis, and TLC fingerprint analysis. Morphological study of the 19 samples showed no difference in characteristics except for the diameter of the stems; the largest was the sample from Phitsanulok (6 cm) and the smallest was the sample from Lop Buri (1.7 cm). However, they were in the same subgroup 2.2, which indicated that the diameter of stems may depend on the age, climate, zone, water and soil where the plant originates.

Analysis of the DNA fingerprint of *D. scandens* by Winboot program indicated that it was divided into 3 groups. Group 1 was further divided into subgroups 1.1 and 1.2. Those in subgroup 1.1 were from Phetchaburi (Khaokrapook), Prachuap Kiri Khan (Saovapha), Sa Kaeo, Nakhon Pathom (SL) and callus. Those in subgroups 1.2 were from Nonthaburi, Rayong, Chanthaburi. Group 2 was further divided into subgroups 2.1 and 2.2. Those in subgroup 2.1 were from Khon Kean, Prachuap Kiri Khan (Ao Noi), Nakhon Ratchasima, Phetchaburi (Kladlaung) and Nakhon Nayok. Those in subgroup 2.2 were from Kanchanaburi (Bunwangyen), Phitsanulok, Lop Buri, Nakhon Pathom (KU), Buri Ram and Bangkok. The one in group 3 was from Prachinburi only. TLC fingerprint identification showed that the TLC fingerprint pattern of all samples was similar. The present study gave preliminary results on genetic differences of *D. scandens* Benth. that could be used to identify different varieties of *D. scandens* and for future genetic development of the plant.

Key words: ***Derris scandens*, DNA fingerprinting, TLC fingerprint analysis**