



การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *ITS2* และการผลิตชิ้นส่วนปลอดเชื้อของทองกวาวเหลือง

ITS2 Nucleotide Sequence Analysis and Cleaned Culture Production of *Butea monosperma* var. *lutea*

ศุภณัฐ กาญจนวัฒนาวงศ์^{1,2*}, ณัฐธิดา สิงห์บำรุง¹, จุฑินันท์ เจริญทอง¹, ราฮีมา วาเมดีศา³

Supanath Kanjanawattanawong^{1,2*}, Natthathida Singbumrung¹, Thitinun Rianthong¹, Raheema Wamaedeesat³

(Received: Sep 6, 2019; Revised: Nov 14, 2019; Accepted: Dec 23, 2019)

บทคัดย่อ

ทองกวาวเหลือง (*Butea monosperma* (Lam.) Kuntze var. *lutea* (Witt.) Maheswari) เป็นไม้ประดับและสมุนไพรหายาก มีการใช้ในการรักษาโรคผิวหนัง และต้านอาการท้องร่วง เป็นต้น จึงนำมาศึกษาการจำแนกสายพันธุ์โดยการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยไพรเมอร์บริเวณ *matK* *ITS2* และ *rbcL* พบว่า มีเพียง *ITS2* ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ (66.67%) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับในฐานข้อมูล พบว่ามีความเหมือนกับ *B. monosperma* AC: KJ436383.1 ถึง 99% และลำดับนิวคลีโอไทด์ของทองกวาวเหลืองและทองกวาวแสดงที่เพิ่มปริมาณได้ไม่มีความแตกต่างกัน จึงควรมีการพัฒนาไพรเมอร์และเทคนิคอื่นๆ ที่จะช่วยในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของทองกวาวต่อไป ทั้งนี้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *ITS2* ที่ได้ ถูกบรรจุในฐานข้อมูล NCBI แล้ว (AC: MK651821, MK651822, MK651823, และ MK651824) และด้วยทองกวาวเหลืองเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการรักษาพันธุ์พืชหายากที่มีประสิทธิภาพ แต่ผิวของทองกวาวเหลืองมีขนปกคลุมหนาแน่น ทำให้ยากต่อการฟอกเชื้อที่ผิว งานวิจัยนี้จึงศึกษาวิธีการการปนเปื้อนของชิ้นส่วนตาข่ายโดยการใส่สารต่างๆ ช่วยลดการปนเปื้อนในช่วงการเพาะเลี้ยง ผลการทดลองพบว่า การเติม Plant Preservative Mixture (PPM) ความเข้มข้น 400 µl/l ในอาหารเหลวสูตร MS (Murashige and Skoog) ทำให้ชิ้นส่วนมีการปนเปื้อนน้อยที่สุด (30.0%) และการรอดชีวิต (72.4%) สำหรับการใส่ PPM ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 หรือ 4 mg/l เพื่อกระตุ้นการพัฒนาของตาข่ายพบว่าเนื้อเยื่อมีการรอดชีวิตต่ำกว่าชุดควบคุม (25.0-58.3%) และการเติมสารลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหารเหลวสูตร WPM (Woody Plant Media) พบว่า การเติม PPM ความเข้มข้น 400 µl/l ร่วมกับ streptomycin ความเข้มข้น 250 mg/l หรือ carbendazim ความเข้มข้น 250 mg/l ทำให้มีการปนเปื้อนน้อยที่สุด (22.2%) โดยที่การเติม PPM ความเข้มข้น 400 µl/l ร่วมกับ streptomycin ความเข้มข้น 250 mg/l พบว่ามีการรอดชีวิตสูงสุด (90.8%)

คำสำคัญ: ทองกวาวเหลือง การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สารชีวฆาต พืชท้องถิ่น ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

¹ โครงการจัดตั้งวิทยาเขตอำนาจเจริญ มหาวิทยาลัยมหิดล

¹ Mahidol University Amnatcharoen Campus

² สาขาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University

³ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

³ Faculty of Agriculture, Princess of Naradhiwas University

* Corresponding author: supanath@kku.ac.th

Abstract

Yellow Flame of the Forest (*Butea monosperma* (Lam.) Kuntze var. *lutea* (Witt.) Maheswari) is a rare ornamental and medicinal plant used for the treatment of vaginal discharge, skin diseases, and as an antidiarrheal. Thus, the discrimination between yellow and orange varieties is important, so DNA barcoding technique using specific primers for *matK*, *ITS2* and *rbcL* regions were performed. As a result, it was found that only *ITS2* region could be amplified (66.67%). The BlastN DNA analysis also showed that *ITS* sequences had high homology (99%) to *B. monosperma* (AC: KJ436383). However, the multiple sequence alignment of these amplified fragments showed no difference between the yellow and orange varieties. Thus, additional markers should be developed for more effective discrimination. Of these, the *ITS2* sequences have already been deposited in the NCBI database (AC: MK651821, MK651822, MK651823, and MK651824). Because the plant has a high risk of extinction, micropropagation is an effective method to increase its quantity and maintain these rare species. However, the surface of this plant is covered with dense hairs, which makes surface sterilization difficult. Therefore, surface sterilization techniques, with the addition of several disinfectants, into various culture media, were investigated. The lowest contamination (30.0%) with 72.4% of survivability was achieved by adding 400 μ l/l Plant Preservatives Mixture (PPM) in MS media. The use of 400 μ l/l PPM, in combination with BA 2 or 4 mg/l to stimulate growth of lateral bud, showed a lower survival percentage than the control treatment (25-58.3%). For the addition of various microbial disinfectant agents in liquid WPM (Woody Plant Media), the lowest contamination (22.2%) was obtained from liquid WPM containing 400 μ l/l PPM in combination with 250 mg/l streptomycin or 250 mg/l carbendazim. The highest surviving rate (90.8%) was observed in the media supplement with PPM and streptomycin.

Keywords: *Butea Monosperma*, Micropropagation, Biocide, Native Plant, DNA Barcoding

บทนำ

ทองกวาวเป็นไม้ยืนต้นของไทย มีดอกสวยงาม นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ พันธุ์ทั่วไปมีดอกสีแสด ส่วนชนิดที่มีดอกสีเหลือง หายากมาก เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ทองกวาวเหลือง (*Butea monosperma* (Lam.) Kuntze var. *lutea* (Witt.) Maheswari) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมเรียก “จานเหลือง” อยู่ในวงศ์ Fabaceae เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ดอกสีเหลือง มีดอกย่อยเป็นกลุ่ม เวลชานมี 5 กลีบ ผลเป็นฝักสีน้ำตาลอ่อน ภายในมีเมล็ดขนาดเล็ก 1 เมล็ด เป็นดอกไม้ประจำจังหวัดอำนาจเจริญแต่อนแอต่อสภาพแวดล้อม โรค และแมลง (Kaewsri, 2014) ส่วนต่าง ๆ ของทองกวาวเหลืองมีสรรพคุณทางยา เช่น เปลือกไม้สกัดใช้รักษาตกขาว ดีซ่าน และโรคผิวหนัง (Yarra, Bulle, Mushke, & Murthy, 2016) ยางสีแสดจากเปลือกไม้ต้านอาการท้องร่วง (Gunakunru et al., 2005) ทั้งนี้ทองกวาวเหลืองไม่สามารถจำแนกจากทองกวาวแสดได้ด้วยลักษณะอื่น นอกจากสีดอก จึงควรมีการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์โดยการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยทั่วไปทองกวาวเหลืองขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด แต่มีการออกและรอดชีวิตต่ำ จึงพบได้น้อยในธรรมชาติ (Mahender, Mahesh, & Murthy, 2014) ซึ่งอาจนำไปสู่การการสูญพันธุ์ได้ อีกทั้งการขยายพันธุ์ทองกวาวเหลืองด้วยการเพาะเมล็ดอาจมีโอกาสได้ทั้งต้นที่มีดอกสีแสดและสีเหลืองปะปนกัน (Kaewsri, 2014) การขยายพันธุ์ไม้ยืนต้นในสภาพปลอดเชื้อเป็นวิธีการที่สามารถเพิ่มปริมาณพืชได้จำนวนมากในเวลาอันสั้น และประยุกต์ใช้ในการรักษาพันธุ์พืชได้ในพื้นที่หลายชนิด ที่ผ่านมามีรายงานการศึกษาการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนของใบเลี้ยงและเมล็ดทองกวาวเหลืองบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS (Murashige & Skoog, 1962) ร่วมกับ 6-benzylaminopurine (BAP)



หรือ kinetin (Kn) พบว่า ชิ้นส่วนสามารถสร้างยอดได้มากถึง 7 ยอด ภายใน 21 วัน (Yarra et al., 2016) 8.35 ยอด ภายใน 21-30 วัน (Rathnaprabha, Muralikrishna, Raghu, & Sadanandam, 2017) อย่างไรก็ตาม จากผลการทดสอบความเสถียรทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD 4 ไพร์เมอร์เทียบกับต้นแม่ พบว่ามีบางตัวอย่างที่แสดงลักษณะ polymorphic กับต้นแม่ (Yarra et al., 2016) และยังไม่มียารานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของทรวงกวเลื่องจากชิ้นส่วนตาข้าง ซึ่งเป็นการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งจะทำให้ต้นพันธุ์ที่ได้มีพันธุกรรมดกกลีเหมือนต้นแม่ ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้น การฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นส่วนตาข้างเป็นขั้นตอนแรกที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของทรวงกวเลื่อง เนื่องจากพืชชนิดนี้มีขนอ่อนปกคลุมที่ผิวจำนวนมาก ทำให้ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวได้ยาก การใช้สารลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เป็นวิธีการที่สามารถช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์บนชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น PPM ซึ่งเป็นสารฆ่าเชื้อราและแบคทีเรียที่ออกฤทธิ์แบบกว้าง (Plant Cell Technologies, 2019) โดยให้ความเข้มข้นแตกต่างกัน เช่น ความเข้มข้น 2% ใน Black walnut (*Juglans nigra* L.) (Stevens, & Pijut, 2018) ความเข้มข้น 0.2-0.8% ใน *Calophyllum brasiliense* (Silveira, Cordeiro-Silva, Degenhardt-Goldbach, & Quoirin, 2016) การใช้ยาปฏิชีวนะ streptomycin ความเข้มข้น 0.1% ในการฆ่าเชื้อที่ผิวปลายยอดอ่อน (Thorat, Sonone, Choudhari, Devarumath, & Babu, 2017) ความเข้มข้น 3.5% ในการฆ่าเชื้อที่ผิว *Sargassum polycystum* (Muhamad, Ling, & Wong, 2018) และ การใช้ Bavistin (50% (w/v) of carbendazim) เป็นสารกำจัดเชื้อราที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยทั่วไป เช่น การใช้ใน *Aegle marmelos* (Rawal, & Keharia, 2019) ดังนั้นการศึกษาการใช้สารที่เหมาะสมเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตชิ้นส่วนปลอดเชื้อของทรวงกวเลื่องจะเพิ่มโอกาสความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชหายากชนิดต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อวิเคราะห์ดีเอ็นเอบาร์โคดของทรวงกวเลื่อง
2. เพื่อศึกษาการใช้สารลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตชิ้นส่วนปลอดเชื้อของทรวงกวเลื่อง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะของทรวงกวเลื่องสำหรับการจำแนกและอนุรักษ์พันธุ์พืชท้องถิ่น หายาก และวิธีการที่เหมาะสมในการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของทรวงกวเลื่อง

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การสร้างข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โคดของทรวงกวเลื่อง

การศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งเฉพาะ โดยนำตัวอย่างใบอ่อนของทรวงกวเลื่อง และทรวงกวแสด ที่เก็บตัวอย่างชนิดละ 3 แห่ง (ตารางที่ 1) จำนวนตัวอย่างละ 100 mg บดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Doyle & Doyle, 1987) และวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอด้วย NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) และวิธี gel electrophoresis จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยไพร์เมอร์สำหรับการสร้างดีเอ็นเอบาร์โคดมาตรฐานจาก 3 คูไพร์เมอร์ ได้แก่ *matK* *ITS2* และ *rbcl* (Table 2) ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Kanjanawattanawong et al. (2014) ปริมาตรรวม 30 µl โดยใช้ Tm ที่ 59.6 °C จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริการของ Macrogen Inc. (Korea) แล้วเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลใน NCBI ด้วย BLASTn หาคความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย multiple sequence alignment วิเคราะห์ phylogenetic tree ด้วย Neighbor-Joining (NJ) โดยโปรแกรม MEGA7 ด้วย K2P model (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016)

ตารางที่ 1 สถานที่เก็บตัวอย่างของกวาวแสดและทองกวาวเหลือง

สีดอก	รหัส	สถานที่	พิกัดทางภูมิศาสตร์
สีแสด	RA1	จังหวัดอำนาจเจริญ	15.897948, 104.621283
	RA2	จังหวัดอำนาจเจริญ	15.892231, 104.626004
	RB	จังหวัดบุรีรัมย์	15.552164, 102.965617
สีเหลือง	YA	จังหวัดอำนาจเจริญ	15.892183, 104.625703
	YSK	จังหวัดสกลนคร	17.282139, 104.121420
	YR9	สวนหลวง ร. 9	13.686161, 100.662808

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ดีเอ็นเอบาร์ไคโตมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในทองกวาว

ตำแหน่ง	ชื่อไพรเมอร์	5' → 3'	อ้างอิง
<i>matK</i>	matK-KIM1R_F matK-KIM3F_R	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC CGTACAGTACTTTTGTGTT	(Newmaster, Grguric, Shan-mughanandhan, Ramalingam & Ragupathy, 2013)
<i>rbcL</i>	rbcLa_F rbcLa_R	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC GTAAATCAAGTCCACCRGC	(Newmaster et al., 2013)
<i>ITS2</i>	ITS-S2_F ITS4_R	ATGCGATACTTGGTGTGAAT TCCTCCGCTTATTGATATGC	(Fazekas, Kuzmina, Newmaster & Hollingsworth, 2012)

2. การฆ่าเชื้อที่ผิวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทองกวาวเหลือง

2.1 ศึกษาการเติม Plant Preservative Mixture™ (PPM, Plant Cell Technology) และการล้างด้วยน้ำไหลผ่านเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

นำชิ้นส่วนตาข้างของทองกวาวเหลือง ตัดแต่งส่วนที่แห้งและเสียหายออก จากนั้นล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาผสมน้ำยาล้างจานที่โพลี® ฟันด้วยแอลกอฮอล์ 70% ให้ทั่ว แล้วฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวชิ้นด้วยสารละลาย ไฮเตอร์® โดยเปรียบเทียบ 3 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 แช่ชิ้นส่วนตาข้างในสารละลายไฮเตอร์® เข้มข้น 15% ผสม Tween-20 จำนวน 2 หยด เขย่านาน 10 นาที ตามด้วยสารละลายไฮเตอร์® เข้มข้น 10% ผสม Tween-20 จำนวน 2 หยด เขย่าเป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ครั้งๆ ละ 1 นาที ตัดชิ้นส่วนขนาด 1 เซนติเมตร นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็งสูตร MS

กรรมวิธีที่ 2 ใช้วิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ 1 แต่นำชิ้นส่วนไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม PPM ความเข้มข้น 400 µl/l

กรรมวิธีที่ 3 หลังจากตัดแต่งชิ้นส่วนตาข้างและล้างทำความสะอาดแล้ว นำชิ้นส่วนพืชไปแช่ในน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอดเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเช่นเดียวกับกรรมวิธีที่ 1

ทำการทดลอง 40 ซ้ำ (1 ซีน/ขวด) วางขวดเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที ในที่มืด ที่มีอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส บันทึกจำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อน จำนวนชิ้นส่วนที่ตาย และจำนวนชิ้นส่วนที่รอดชีวิต หลังการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์



2.2 ผลของการเติม PPM และ BA ต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

จากการทดลองที่ 2.1 พบว่า การเติม PPM สามารถช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์หลังการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวได้ แต่ตาข่ายบนชิ้นส่วนยังไม่มีการพัฒนา จึงทำการฟอกฆ่าเชื้อด้วยกรรมวิธีที่ 1 แล้วศึกษาการเพาะเลี้ยงร่วมกับการเติม BA ความเข้มข้น 2 หรือ 4 mg/l ในอาหารเหลวสูตร MS รวม 5 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 เติม PPM ความเข้มข้น 400 μ l/l (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 เติม PPM ความเข้มข้น 400 μ l/l ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2 mg/l

กรรมวิธีที่ 3 เติม PPM ความเข้มข้น 400 μ l/l ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 4 mg/l

กรรมวิธีที่ 4 เติม BA ความเข้มข้น 2 mg/l

กรรมวิธีที่ 5 เติม BA ความเข้มข้น 4 mg/l

ทำการทดลอง 20 ซ้ำ (1 ชิ้น/ขวด) วางขวดเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกจำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อน จำนวนชิ้นส่วนที่ตาย และจำนวนชิ้นส่วนที่รอดชีวิต หลังการเพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์

2.3 การใช้สารลดการปนเปื้อนในการฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นส่วนต่างๆ

ศึกษาวิธีการที่สามารถเพิ่มการรอดชีวิตของชิ้นส่วน โดยใช้อาหารที่เหมาะสมกับพืชที่เนื้อไม้โดยเฉพาะคือสูตร Woody Plant Media (WPM) ที่เติมสารลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และเพิ่มการรอดชีวิตของชิ้นส่วนที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีปกติ แล้วเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร WPM 5 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 เติม PPM ความเข้มข้น 400 μ l/l (ชุดควบคุม)

กรรมวิธีที่ 2 เติม PPM ความเข้มข้น 400 μ l/l ร่วมกับ streptomycin 250 mg/l

กรรมวิธีที่ 3 เติม PPM ความเข้มข้น 400 μ l/l ร่วมกับเติม streptomycin ความเข้มข้น 250 mg/l และ carbendazim ความเข้มข้น 250 mg/l

กรรมวิธีที่ 4 เติม streptomycin ความเข้มข้น 250 mg/l

กรรมวิธีที่ 5 เติม streptomycin ความเข้มข้น 250 mg/l ร่วมกับ carbendazim ความเข้มข้น 250 mg/l

ทำการทดลอง 24 ซ้ำ (1 ชิ้น/ขวด) วางขวดเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 110 รอบ/นาที ในที่มืด ที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส บันทึกจำนวนชิ้นส่วนที่ปนเปื้อน จำนวนชิ้นส่วนที่ตาย และจำนวนชิ้นส่วนที่รอดชีวิต หลังการเพาะเลี้ยง 1 สัปดาห์

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Resign (CRD) และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

1. การสร้างข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของทองกวาวเหลือง

จากการเก็บใบอ่อนทองกวาวเหลือง และทองกวาวเสด ชนิดละ 3 แห่ง มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB และวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอด้วย NanoDrop™ 1000 spectrophotometer พบว่า ดีเอ็นเอที่ได้มีค่าสัดส่วน OD260/280 อยู่ระหว่าง 1.7-1.9 จากนั้นนำดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานจาก 3 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ *matK* *ITS2* และ *rbcl* พบว่า มีเพียงไพรเมอร์ *ITS2* เท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในตัวอย่างทองกวาว 4 ใน 6 ตัวอย่าง (66.67%) ได้แก่ ตัวอย่างรหัส RA1 RB YSK และ YR9 ซึ่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้สำเร็จ 100% (ตารางที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลใน NCBI ด้วย BLASTn พบว่า มีความเหมือนกับ *B. monosperma* (accession no. KJ436383.1) ด้วยค่า identity match 99% จากนั้นหาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย multiple sequence alignment

วิเคราะห์ phylogenetic tree ด้วย Neighbor-Joining (NJ) โดยโปรแกรม MEGA7 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชนิดเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างทองกวาวเหลืองและทองกวาวแสด แต่มีความแตกต่างเพียงตำแหน่งเดียวในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 18 ของตัวอย่างทองกวาวแสด (RA1) เมื่อเทียบกับ RB และทองกวาวเหลือง (YSK และ YR9) ตัวอย่างอื่นๆ โดยมีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ A 1 ตำแหน่ง (duplication) (ภาพที่ 1) ส่งผลให้การวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่า RA1 ไม่ถูกจัดอยู่เดียวกับ RB YSK และ YR9 โดยมีค่า evolutionary distances ระหว่างกลุ่ม เท่ากับ 1.75 (ภาพที่ 2) ทั้งนี้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ที่ได้ทั้ง 4 ตัวอย่าง ได้ยื่นข้อมูลเพื่อบรรจุในฐานข้อมูล NCBI โดยมี accession number ดัง แสดงใน ตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ข้อมูลพื้นฐานของการวิเคราะห์ดีเอ็นเอบาร์โคดบริเวณตำแหน่ง *matK*, *rbcL*, และ *ITS2* ของทองกวาว

ตำแหน่งยีน	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>ITS2</i>
จำนวนพันธุ์ที่ศึกษา	2	2	2
ความสำเร็จในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (%)	0	0	66.67
จำนวนตัวอย่างที่ศึกษา (n)	6	6	6
ความสำเร็จในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (%)	-	-	100
ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปรียบเทียบ (คู่เบส)	-	-	427
จำนวน SNPs ที่พบ	-	-	1
ความถี่ของการพบ SNPs (SNPs/100 คู่เบส)	-	-	0.23

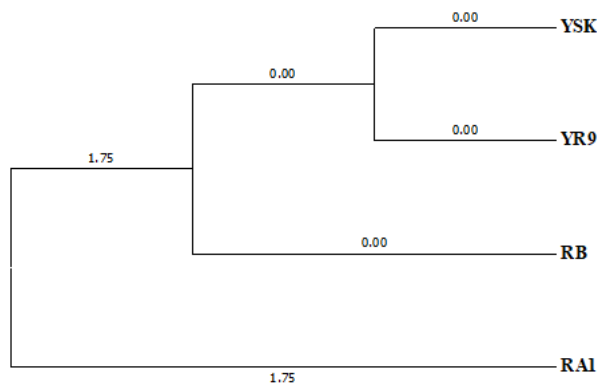
* *matK* และ *rbcL* ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในทองกวาวทุกตัวอย่าง

M7: Alignment Explorer (align)

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help

Species/Abbrv	Group Name	DNA Sequences	Translated Protein Sequences
1. RA1	Orange	AGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCGAGCCATCTGAGGGCACGCTTGGGTGT	
2. RB	Orange	AGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCGAGCCATCTGAGGGCACGCTTGGGTGT	
3. YR9	Yellow	AGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCGAGCCATCTGAGGGCACGCTTGGGTGT	
4. YSK	Yellow	AGTCTTTGACGCAAGTTGCGCCGAGCCATCTGAGGGCACGCTTGGGTGT	

ภาพที่ 1 การวิเคราะห์ Multiple sequence alignment ของทองกวาว 4 ตัวอย่าง ด้วยโปรแกรม MEGA7



ภาพที่ 2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของตัวอย่างทองกวาว ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยใช้โปรแกรม MEGA7 (ดอกสีแสด: RA1 และ RB; ดอกสีเหลือง: YSK และ YR9)



ตารางที่ 4 หมายเลข GenBank accession ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของกวาวแสดและทองกวาวเหลืองที่ได้

สีดอก	รหัส	ตำแหน่งยีน	GenBank accession
สีแสด	RA1	ITS2	MK651821
สีแสด	RB	ITS2	MK651822
สีเหลือง	YSK	ITS2	MK651823
สีเหลือง	YR9	ITS2	MK651824

2. ผลของการเติม PPM และการล้างด้วยน้ำไหลผ่านต่อการลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

หลังการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวทั้ง 3 กรรมวิธี และเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนเป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า การเลี้ยงชิ้นส่วนในอาหารเหลวที่เติม PPM ความเข้มข้น 400 $\mu\text{L/l}$ (Tr.2) มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่ำที่สุด (30.00%) โดยมีการรอดชีวิต 72.42% รองลงมาคือ การฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีปกติ แล้วเลี้ยงชิ้นส่วนบนอาหารกึ่งแข็ง (Tr.1) ที่มีการปนเปื้อน 62.50% และการรอดชีวิต 100% และ การแช่น้ำไหลผ่านก่อนการฟอกฆ่าเชื้อด้วยวิธีปกติ (Tr.3) ซึ่งมีการปนเปื้อนสูงถึง 80.00% แต่ชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อนมีการรอดชีวิตทั้งหมด (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และการรอดชีวิตของชิ้นส่วน จากการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยวิธีต่างๆ หลังการเลี้ยงชิ้นส่วนเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในที่มีด และม็อดูม 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส

วิธีการ	เปอร์เซ็นต์	
	การปนเปื้อน	การรอดชีวิต*
(Tr.1) วิธีปกติและเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง	62.50 $\pm$ 9.57b	100.00 $\pm$ 0.00b
(Tr.2) วิธีปกติ และเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม PPM	30.00 $\pm$ 8.16a	72.42 $\pm$ 10.45a
(Tr.3) แช่น้ำไหลผ่านแล้วฟอกวิธีปกติและเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง	80.00 $\pm$ 14.14c	100.00 $\pm$ 0.00b

ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) วิเคราะห์ด้วยวิธี DMRT

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกัน (p<0.05)

* อัตราการรอดชีวิตคำนวณจากจำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

3. ผลของการเติม PPM และ BA ต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์

ผลจากการทดลองแรก พบว่า การเติม PPM สามารถช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ภายหลังการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวได้ แต่ประสบปัญหาตาบอดชิ้นส่วนมีการพัฒนาช้า จึงศึกษาเพิ่มเติมโดยการเติม BA ความเข้มข้น 2 หรือ 4 mg/l ร่วมกับ PPM ในอาหารเหลวสูตร MS รวม 5 กรรมวิธี เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า ในทุกวิธีการที่มีการเติม PPM ความเข้มข้น 400 $\mu\text{L/l}$ มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างต่ำ (25.00-30.00%) เมื่อเทียบกับกรรมวิธีที่ไม่ได้เติม PPM ซึ่งมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ 45.00-50.00% (ตารางที่ 6) ทั้งนี้ พบว่า ในทุกกรรมวิธีที่มีการเติม BA นั้นมีชิ้นส่วนที่รอดชีวิตเพียง 25.00-58.33% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่เติม BA (กรรมวิธีที่ 1) (ตารางที่ 6) หลังจากนั้น ย้ายชิ้นส่วนที่รอดชีวิตทั้งหมดมาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งสูตร MS เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ตาข้างของชิ้นส่วนทั้งหมดสามารถพัฒนาได้ไม่ต่างกัน แต่ชิ้นส่วนที่มาจากกรรมวิธีที่ 2 มีการพัฒนาแคลลัสขาวถึงสีน้ำตาลอ่อนเกิดขึ้น 2 ใน 5 ชิ้นส่วน แต่แคลลัสดังกล่าวไม่สามารถพัฒนาต่อได้ และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มและตายในที่สุด (ภาพที่ 3D)

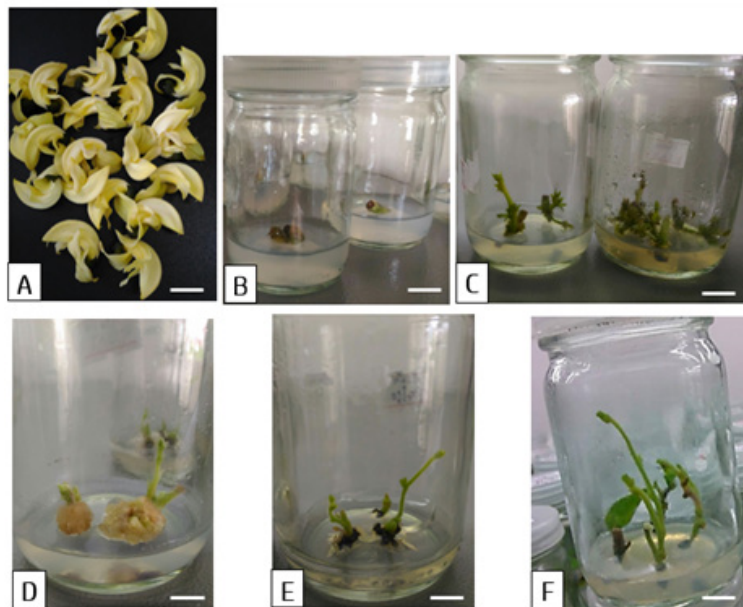
ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และการรอดชีวิตของชิ้นส่วนจากการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวแล้วเลี้ยงในอาหารเหลว สูตร MS ที่เติมและไม่เติม PPM และ BA เป็นเวลา 2 สัปดาห์

วิธีการ		เปอร์เซ็นต์	
ความเข้มข้น PPM	ความเข้มข้น BA	การปนเปื้อนจุลินทรีย์	การรอดชีวิต*
400 µl/l	0	25.00±10.00a	72.92±20.83a
	2 mg/l	25.00±10.00a	33.33±11.79b
	4 mg/l	30.00±11.55ab	25.00±0.00b
0	2 mg/l	45.00±10.00bc	44.42±19.25b
	4 mg/l	50.00±11.55c	58.33±9.62ab

ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) วิเคราะห์ด้วยวิธี DMRT

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกัน (p<0.05)

* อัตราการรอดชีวิตคำนวณจากจำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์



ภาพที่ 3 ลักษณะดอกและการเจริญเติบโตของชิ้นส่วนปลอดเชื้อของกวางเลื่อง (A: ลักษณะดอกของกวางเลื่อง; B: ชิ้นส่วนตาข้างหลังการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว; C: การเจริญเติบโตของตาข้าง และการเกิดสีน้ำตาลของอาหารเพาะเลี้ยง หลังการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลอดเชื้อเป็นเวลา 6 สัปดาห์; D: การเกิดแคลลัสบนชิ้นส่วนปลอดเชื้อ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์; E: การเจริญเติบโตของตาข้าง และการเกิดสีน้ำตาลของชิ้นส่วนปลอดเชื้อ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 สัปดาห์; F: การเจริญเติบโตของตาข้าง หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยแถบสีขาวแทนความยาว 1 เซนติเมตร)



4. การใช้สารลดการปนเปื้อนในการฟอกฆ่าเชื้อผิวชิ้นส่วนตาข่าย

ศึกษาการเติมสารลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ การเติม PPM ความเข้มข้น 400 µl/l การเติม streptomycin ความเข้มข้น 250 mg/l และ carbendazim ความเข้มข้น 250 mg/l ในอาหารเหลวสูตร WPM เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของชิ้นส่วนทองกวาวเหลือง รวม 5 กรรมวิธี หลังการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วน 1 สัปดาห์ พบว่า การเติม PPM ความเข้มข้น 400 µl/l ร่วมกับ streptomycin ความเข้มข้น 250 mg/l และ/หรือ carbendazim ความเข้มข้น 250 mg/l (กรรมวิธีที่ 2 และ กรรมวิธีที่ 3) มีอัตราการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่ำสุด (22.22%) และการเติม PPM ความเข้มข้น 400 µl/l ร่วมกับ streptomycin ความเข้มข้น 250 mg/l (กรรมวิธีที่ 2) ชิ้นส่วนมีการรอดชีวิตสูงสุด (90.83%) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อเทียบกับการ PPM เพียงอย่างเดียว (66.25%) (ตารางที่ 7)

ทั้งนี้ ชิ้นส่วนที่รอดชีวิตทั้งหมดมีการตายเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 15% หลังจากการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว 4 สัปดาห์ แต่ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มเติม จากนั้นชิ้นส่วนที่รอดชีวิตทั้งหมดเริ่มมีการพัฒนาของตาข่ายจนเป็นต้นอ่อนได้ใน 8 สัปดาห์

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ และการรอดชีวิตของชิ้นส่วนจากการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว หลังการเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร WPM ที่เติมสารลดการปนเปื้อนต่างชนิดๆ เป็นเวลา 1 สัปดาห์

วิธีการ		เปอร์เซ็นต์	
PPM	สารลดการปนเปื้อน	การปนเปื้อนจุลินทรีย์	การรอดชีวิต*
400 µl/l	none	25.00±9.62a	66.25±13.77a
	+ 250 mg/l streptomycin	22.22±9.62a	90.83±10.67b
	+ 250 mg/l streptomycin + 250 mg/l carbendazim	22.22±9.62a	79.58±3.44ab
0	+ 250 mg/l streptomycin	33.33±0.00a	87.50±14.43b
	+ 250 mg/l streptomycin + 250 mg/l carbendazim	33.33±13.61a	74.17±5.53ab

ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) วิเคราะห์ด้วยวิธี DMRT

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกัน (p<0.05)

* อัตราการรอดชีวิตคำนวณจากจำนวนชิ้นส่วนที่ไม่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

อภิปรายผล

เนื่องจากทองกวาวเหลืองเป็นพืชหายาก และมีการใช้เป็นพืชสมุนไพร ดังนั้นจึงควรมีการระบุสายพันธุ์ที่ถูกต้องเพื่อประโยชน์ในการตรวจสอบการปลอมปนในอนาคต จึงศึกษาการสร้างข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานของพืชในทองกวาวเหลือง โดยใช้ไพรเมอร์จาก 3 บริเวณ ได้แก่ *matK* *ITS2* และ *rbcL* พบว่า มีเพียงไพรเมอร์ *ITS2* เท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอได้ ซึ่งต่างจากที่รายงานในพืชอื่นที่พบว่า *ITS* จะมีอัตรา amplification ต่ำกว่า (Han et al., 2016; Liu et al., 2017) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากทองกวาวสด (RA1 และ RB) และทองกวาวเหลือง (YSK และ YR9) เปรียบเทียบกับข้อมูลใน NCBI ด้วย BLASTn พบว่า มีความเหมือนกับ *B. monosperma* (accession no. KJ436383.1) ด้วยค่า identity match 99% ซึ่งเป็นการตรวจสอบและวิเคราะห์คุณภาพ (Pearson, 2013) ของข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทองกวาวเหลืองที่รายงานเป็นครั้งแรก และของทองกวาวสดที่เพิ่มเติมจากการศึกษาครั้งนี้

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เพิ่มปริมาณได้จากคู่ไพรเมอร์ของ *ITS2* ด้วย multiple sequence alignment และ phylogenetic tree ด้วย NJ โดยโปรแกรม MEGA7 พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างทองกวาวเหลืองกับทองกวาวแสด ซึ่งผลดังกล่าวนี้เป็นข้อจำกัดหนึ่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการจำแนกความแตกต่างที่ระดับต่ำกว่า species แต่จะมีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกที่ระดับ (species identification) (Cowan & Fay, 2012; Parveen, Gafner, Techen, Murch, & Khan, 2016) อย่างไรก็ตามมีความแตกต่างเพียงตำแหน่งเดียว (SNPs) ในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 18 ของตัวอย่างทองกวาวแสด (RA1) เมื่อเทียบกับ RB และทองกวาวเหลือง (YSK และ YR9) ตัวอย่างอื่นๆ เป็นการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ A อีก 1 ตำแหน่ง (duplication) ซึ่งเกิดได้บ่อยครั้งในจีโนมพืช มีรายงานว่า อาจมีผลต่อวิวัฒนาการในด้านต่างๆ เช่น โครงสร้างดอก กระบวนการต้านทานโรค หรือ สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ (Panchy, Lehti-Shiu, & Shiu, 2016) ส่งผลให้การวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่า RA1 ไม่ถูกจัดอยู่เดียวกับ RB YSK และ YR9 โดยมีค่า evolutionary distances ระหว่างกลุ่ม เท่ากับ 1.75 ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าทั้งกลุ่มสีเหลืองและแสดยังคงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในระหว่างกลุ่มสีต่างๆ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการขยายพันธุ์พืชท้องถิ่น หรือพืชหายากที่มีโอกาสเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในพืชหลายชนิด ซึ่งขั้นตอนการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวเป็นขั้นตอนแรกที่ละเอียดอ่อน และเป็นตัวแปรสำคัญต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชชนิดนั้นๆ (Bhadane & Patil, 2016) เนื่องจากผิวชั้นส่วนของทองกวาวเหลืองมีขนาดเล็กปกคลุมหนาแน่น (Kaewsri, 2014) อีกทั้งต้นแม่พันธุ์เจริญอยู่ในสภาพธรรมชาติ ทำให้มีโอกาสการปนเปื้อนได้สูง จึงยากต่อการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวให้ปลอดเชื้อ จากการศึกษาค้นคว้าพบว่า การใช้ PPM ที่ความเข้มข้น 400 $\mu\text{l/l}$ ทำให้ชิ้นส่วนเนื้อตรากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ต่ำสุดได้ เนื่องจาก PPM เป็นสารลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดออกฤทธิ์กว้าง (broad-spectrum biocide) ที่มีประสิทธิภาพสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Plant Cell Technologies, 2019) แต่การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนต่างๆของทองกวาวเหลืองประสบปัญหาตามขั้นตอนที่รอดชีวิตนั้นมีการพัฒนา หรือไม่พัฒนาเป็นยอด จึงศึกษาการเติม BA ความเข้มข้น 2 หรือ 4 mg/l ร่วมกับ PPM แต่กลับพบว่าในทุกวิธีการที่มีการเติม BA นั้น มีอัตราชิ้นส่วนที่รอดชีวิตต่ำ (25.00-58.33%) อาจเกิดจาก BA ไม่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่างๆของทองกวาวเหลือง ซึ่งมีเพียงรายงานการใช้ 6-benzylaminopurine (BAP) kinetin (Kn) และ BA ในการเพาะเลี้ยงเมล็ด และชิ้นส่วนต้นที่งอกจากเมล็ดทองกวาว (Mahender et al., 2014; Rathnaprabha et al., 2017) เท่านั้นสำหรับการใช้ PPM ร่วมกับ streptomycin และ carbendazim พบว่า สามารถช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ดียิ่งขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้ PPM เพียงอย่างเดียว สอดคล้องกับข้อมูลการใช้ของ PPM ที่เมื่อใช้ร่วมกับ streptomycin จะควบคุมการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Plant Cell Technologies, 2019)

สรุป

การสร้างข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของทองกวาวเหลือง พบว่า มีเพียงคู่ไพรเมอร์ *ITS2* เท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาตรวจสอบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความเหมือนกับ *B. monosperma* (AC: KJ436383.1; 99% identity match) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของทองกวาวเหลืองและทองกวาวแสดที่นำมาทดสอบนั้นไม่มีความแตกต่างกัน สำหรับการผลิตชิ้นส่วนปลอดเชื้อจากตาข้างทองกวาวเหลืองที่มีลักษณะเป็นขนปกคลุมหนาแน่นทำให้ยากต่อการผลิตชิ้นส่วนปลอดเชื้อนั้น วิธีการฟอกฆ่าเชื้อที่ผิวที่มีประสิทธิภาพที่สุดคือ การแช่ชิ้นส่วนตาข้างในสารละลายไฮเตอร์เข้มข้น 15% ผสม Tween-20 จำนวน 2 หยด แช่นาน 10 นาที ต่อด้วยสารละลายไฮเตอร์①เข้มข้น 10% ผสม Tween-20 จำนวน 2 หยด แช่เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 3 ครั้งๆ ละ 1 นาที จากนั้นเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์พบว่า อาหารเหลวสูตร WPM ที่เติมสารลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ PPM ความเข้มข้น 400 $\mu\text{l/l}$ ร่วมกับ streptomycin ความเข้มข้น 250 mg/l มีอัตราการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ต่ำสุด และชิ้นส่วนมีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด



ข้อเสนอแนะ

ควรมีการพัฒนาโปรแกรมและเทคนิคอื่นๆ ที่จะช่วยในการจำแนกความแตกต่างของความหลากหลายทางพันธุกรรมของทองกวาวสายพันธุ์ๆ อีกทั้งเพิ่มการศึกษาทางสัณฐานวิทยาจากตัวอย่างที่หลากหลายมากยิ่งขึ้นต่อไปสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทองกวาวเหลือง หลังจากได้ปลอดเชื้อสำหรับรักษาพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ การศึกษาสูตรอาหารและสารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณยอด และชักนำรากให้เป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์สำหรับปลูกเพิ่มปริมาณในธรรมชาติอีกทางหนึ่งด้วย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ.ดร. ทยา เจนจิตติกุล และ ดร.ธัญญ์วณิช ธัญสิริวรรณ ในการเก็บตัวอย่างใบทองกวาวเหลือง ผศ.ดร. พนิศ คงสวัสดิ์วรกุล ที่เอื้อเฟื้อดูแลนักศึกษาในการสกัดดีเอ็นเอบางส่วน รศ.ดร. จริญญา ณรงค์ชนะ สำหรับวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีในการทดสอบโปรแกรมเบื้องต้น และโครงการนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยมหิดล

รายการอ้างอิง (References)

- Bhadane, B. S., & Patil, R. H. (2016). Data on the cost effective surface sterilization method for *C. carandas* (L.) seeds and callus induction from aseptic seedling. *Data in brief*, 7, 1551.
- Cowan, R. S., & Fay, M. F. (2012). Challenges in the DNA barcoding of plant material. In *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding* (pp. 23-33): Springer.
- Doyle J.J. & J.L. Doyle. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19, 11-15.
- Fazekas, A. J., Kuzmina, M. L., Newmaster, S. G., & Hollingsworth, P. M. (2012). DNA barcoding methods for land plants. In *Methods in Molecular Biology*, 858, 223-252.
- Gunakkunru, A., Padmanaban, K., Thirumal, P., Pritila, J., Parimala, G., Vengatesan, N., Pillai, K. K. (2005). Anti-diarrhoeal activity of *Butea monosperma* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(3), 241-244.
- Han, Y.-W., Duan, D., Ma, X.-F., Jia, Y., Liu, Z.-L., Zhao, G.-F., & Li, Z.-H. (2016). Efficient identification of the forest tree species in Aceraceae using DNA barcodes. *Frontiers in plant science*, 7, 1707.
- Kaewsri, W. (2014). *Native plant genetic of Amnathcharoen Province*. Amnathcharoen: Pimdee Amnathcharoen Offset. (in Thai)
- Kanjanawattanawong, S., Tangphatsornruang, S., Triwitayakorn, K., Ruang-areerate, P., Sangsrakru, D., Poopear, S., . . . Narangajavana, J. (2014). Characterization of rubber tree microRNA in phytohormone response using large genomic DNA libraries, promoter sequence and gene expression analysis. *Molecular genetics and genomics*, 289(5), 921-933.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Liu, Z.-F., Ci, X.-Q., Li, L., Li, H.-W., Conran, J. G., & Li, J. (2017). *DNA barcoding evaluation and implications for phylogenetic relationships in Lauraceae from China*. Retrieved from <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175788>



- Mahender, A., Mahesh, D. M., & Murthy, E. N. (2014). *In vitro* seed germination and development of *Butea monosperma* (Lam.) Taub Var. *lutea* (Willt.): a step for rehabilitation. *International Journal of Multidisciplinary and Current Research*, 2, 297-301.
- Muhamad, S. N. S., Ling, A. P. K., & Wong, C. L. (2018). Effect of plant growth regulators on direct regeneration and callus induction from *Sargassum polycystum* C. Agardh. *Journal of applied phycology*, 30(6), 3299-3310.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Newmaster, S. G., Grguric, M., Shanmughanandhan, D., Ramalingam, S., & Ragupathy, S. (2013). DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products. *BMC Medicine*, 11(1).
- Panchy, N., Lehti-Shiu, M., & Shiu, S.-H. (2016). Evolution of gene duplication in plants. *Plant physiology*, 171(4), 2294-2316.
- Parveen, I., Gafner, S., Techen, N., Murch, S. J., & Khan, I. A. (2016). DNA barcoding for the identification of botanicals in herbal medicine and dietary supplements: strengths and limitations. *Planta Medica*, 82(14), 1225-1235.
- Pearson, W. R. (2013). An introduction to sequence similarity ("homology") searching. *Current protocols in bioinformatics*, 42(1), 311-318.
- Plant Cell Technologies. (2019). *PPM™—Plant Preservative Mixture Product Information*. Retrieved from <https://www.plantcelltechnology.com/ppm-product-information/>
- Rathnaprabha, D., Muralikrishna, N., Raghu, E., & Sadanandam, A. (2017). Micropropagation of White Palash tree (*Butea monosperma* (Lam.) Taub. var. *lutea* (Witt.)). *Journal of Phytology*, 9(1). doi:<https://doi.org/10.19071/jp.2016.v8.3070>.
- Rawal, K., & Keharia, H. (2019). Prevention of Fungal Contamination in Plant Tissue Culture Using Cyclic Lipopeptides Secreted by *Bacillus amyloliquefaciens* AB30a. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 29(1), 111-119.
- Silveira, S. S., Cordeiro-Silva, R., Degenhardt-Goldbach, J., & Quoirin, M. (2016). Micropropagation of *Calophyllum brasiliense* (Cambess.) from nodal segments. *Brazilian Journal of Biology*, 76(3), 656-663.
- Stevens, M. E., & Pijut, P. M. (2018). Rapid *in vitro* shoot multiplication of the recalcitrant species *Juglans nigra* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 54(3), 309-317.
- Thorat, A. S., Sonone, N. A., Choudhari, V. V., Devarumath, R. M., & Babu, K. H. (2017). Plant regeneration from cell suspension culture in *Saccharum officinarum* L. and ascertaining of genetic fidelity through RAPD and ISSR markers. *3 Biotech*, 7(1), 16.
- Yarra, R., Bulle, M., Mushke, R., & Murthy, E. N. (2016). *In vitro* conservation and genetic homogeneity assessment of *Butea monosperma* (Lam.) Taub. Var. *lutea* (Witt.) Maheshwari—A potential pharmaceutical legume tree. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(4), 195-199.