

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการระดับโมเลกุลของพันธุ์พื้นเมือง
และพันธุ์ลูกผสม (*Gynostemma pentaphyllum*)
Molecular Phylogeny of Native Panchakhan Varieties and Hybrids
(*Gynostemma pentaphyllum*)

กาญจนา พฤษพันธ์^{1/*} ศศิธร วรพิติรังสี^{2/} อัญชลี แก้วดวง^{3/}ธีรวุฒิ ชูตินันท์กุล^{4/}
Kanchana Pruesapan^{1/*} Sasitorn Vorapitirangsi^{2/} Anchalee Kaewdoun^{3/} Theerawut Chutinanthakun^{4/}

Received 25 Sep. 2024/Revised 30 Oct. 2024/Accepted 30 Oct. 2024

ABSTRACT

Morphological diversity of Panchakhan (Thai Jiaogulan) based on its different ecotypes affects the stability of taxonomy nomenclature. This research aimed to study the relationship of 20 native Panchakhan varieties and their hybrids using chloroplast DNA markers of *accD*, *petD*, *psbB* and *ycf3* genes and to confirm the botanical name. The evolutionary relationships were generated using maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) and minimum evolution (ME) methods. The results of ML, MP, and ME analyses showed the concordant clustering of Panchakhan varieties and confirmed their name as *Gynostemma pentaphyllum*. The phylogenetic tree of the combined datasets of all genes was the most efficient in grouping Panchakhan into 2 formae (f.), f. *pentaphyllum* and f. *dasycarpum*. The native Panchakhan, namely Sankampaeng, shared the characteristics of f. *pentaphyllum*, with the ovary/fruit surface covered with no hairs and the spherical seeds, ovate shape with regular papillae on surfaces. In addition, hybrid Panchakhan, namely Chiangrai2, also grouped together under this forma according to the genetic characteristics of its mother strain, Sankampaeng. As for the other 9 native Panchakhan varieties; namely Doitung1, Doitung2, Chiangkhong, Phrae1, Wawi2, Wawi4, Wiangkaen1, Wiangkaen2 and Angkhang; showed the characteristics of f. *dasycarpum*, with the ovary/fruit surface covered with pubescent hairs and flat seeds with slightly triangular to heart-shaped with irregular papillae on the surfaces.

^{1/} สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช อ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Plant Varieties Protection Office, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

^{2/} ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ต. ป่าออดอนชัย อ. เมือง จ. เชียงราย 57000

^{2/} Chiang Rai Horticultural Research Center, Pa O Don Chai, Mueang, Chiang Rai 57000, Thailand

^{3/} สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ถ.รังสิต-นครนายก คลอง 6 อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี 12110

^{3/} Biotechnology Research and Development Office, Rangsit-Nakhon Nayok Rd., Khlong Hok, Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand

^{4/} สถาบันวิจัยพืชสวน อ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{4/} Horticultural Research Institute, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

* Corresponding author: kpruesapan@gmail.com

Furthermore, a group of hybrids Panchakhan, namely Chiangrai1, isolate Chiangrai1-7, isolate Chiangrai1-9, isolate Chiangrai1-11, isolate Chiangrai1-13, isolate Chiangrai1-19, isolate Chiangrai2-10, and isolate Chinese-Local, formed a group with their mother strain, Sibsongpanna, under f. *dasycarpum*.

Keywords: phylogenetic relationships; chloroplast DNA; Jiaogulan; morphology

บทคัดย่อ

ความผันแปรทางสัณฐานวิทยาตามสภาพแวดล้อมของปัญญาชน ส่งผลให้เกิดความไม่คงที่ในการเรียกชื่อพืชตามหลักพฤกษอนุกรมวิธาน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของปัญญาชนพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสม 20 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ของยีน *accD* *petD* *psbB* และ *ycf3* และระบุยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) และ minimum evolution (ME) พบว่า การวิเคราะห์แบบ ML MP และ ME แสดงผลการจัดกลุ่มความสัมพันธ์สอดคล้องกัน และยืนยันความเป็นชนิดเดียวกันของปัญญาชนทั้ง 20 พันธุ์ คือ *Gynostemma pentaphyllum* โดยแผนภูมิข้อมูลดีเอ็นเอร่วมของยีนทั้งหมดมีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ออกเป็น 2 แบบ (forma (f.)) ได้แก่ f. *pentaphyllum* และ f. *dasycarpum* ซึ่งปัญญาชนที่แสดงลักษณะของ f. *pentaphyllum* คือ พันธุ์พื้นเมืองสันกำแพง โดยมีพันธุ์ลูกผสมเชียงราย2 ร่วมกลุ่มแสดงความใกล้ชิดตามลักษณะพันธุกรรมของพันธุ์แม่ ตามลักษณะทางสัณฐานร่วมของพื้นผิวรังไข่/ผลเกลี้ยง และมีเมล็ดทรงกลมรูปไข่

ผิวเมล็ดเป็นตุ่มมีรูปร่างค่อนข้างสม่ำเสมอ ส่วนปัญญาชนที่แสดงลักษณะของ f. *dasycarpum* ได้แก่ ดอยตุง1 ดอยตุง2 เชียงของ แพร์1 วาวี2 วาวี4 เวียงแก่น1 เวียงแก่น2 และอ่างขาง โดยมีพันธุ์ลูกผสมเชียงราย1 สายพันธุ์1-7 1-9 1-11 1-13 1-19 2-10 และสายพันธุ์จีน-พื้นเมือง ร่วมกลุ่มแสดงความใกล้ชิดตามลักษณะพันธุกรรมของพันธุ์แม่สืบสองปันนา ตามลักษณะทางสัณฐานร่วมของพื้นผิวรังไข่/ผลมีขนนุ่มปกคลุม และมีเมล็ดทรงแบนค่อนข้างสามเหลี่ยมจนถึงรูปหัวใจ ผิวเมล็ดเป็นตุ่มรูปร่างไม่สม่ำเสมอ

คำสำคัญ: ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ; คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ; เจียวกู่หลาน; สัณฐานวิทยา

บทนำ

กรมวิชาการเกษตรได้ดำเนินการสำรวจและเก็บรวบรวมปัญญาชนพันธุ์พื้นเมืองในปี พ.ศ. 2555 และนำมาปรับปรุงพันธุ์จนได้พันธุ์ลูกผสมที่มีความสม่ำเสมอของพันธุ์มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2556 (ศศิธร และคณะ, 2556) ได้ปัญญาชนที่มีคุณสมบัติโดดเด่นในการให้ผลผลิตและการให้สารสำคัญหลักสูง ซึ่งกรมวิชาการเกษตรพิจารณาให้เป็นพันธุ์พืชแนะนำในปี พ.ศ. 2562 (ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย, 2562ก, 2562ข) แสดงให้เห็นว่า พันธุ์พื้นเมืองของไทยมีศักยภาพที่จะใช้ในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ปัญญาชนในประเทศไทยให้มีความหลากหลายของสายพันธุ์มากขึ้น อย่างไรก็ตาม พันธุ์พื้นเมืองเหล่านี้แสดงความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานของใบ ดอก ผล หรือเมล็ด จึงจำเป็นต้องตรวจสอบให้ชัดเจนว่าเป็นชนิด (species) หรือพันธุ์ (variety) หรือแบบ (forma) เดียวกันหรือไม่ เนื่องจากปัญญาชนมีความผันแปรของลักษณะทางสัณฐานภายในชนิดเดียวกันตามสภาพแวดล้อมค่อนข้างสูง ขณะเดียวกันก็มี

ลักษณะทางสัณฐานคาบเกี่ยวกันระหว่างชนิดสูง อีกด้วย จึงต้องมีการตรวจพิสูจน์ชนิดพืชทั้งด้วยวิธีของอนุกรมวิธานพื้นฐาน และวิธีของอนุกรมวิธานขั้นสูงด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ เพื่อให้มีความชัดเจน สำหรับใช้ประโยชน์ในการนำไปศึกษาต่อยอด

สกุลปัญญาจันทร์ คือ *Gynostemma* Blume เป็นพืชในวงศ์แตง (Cucurbitaceae) ประกอบด้วยสมาชิก 17 ชนิด แบ่งออกเป็น 2 สกุลย่อย (subgenus) คือ *Gynostemma* และ *Trirostellum* C.Y.Wu & S.K. Chen ซึ่งทั้งสองสกุลย่อยมีลักษณะทางสัณฐานของผลแตกต่างกัน โดยชนิดพืชในสกุลย่อย *Gynostemma* มีลักษณะของผลเป็นแบบผลมีเนื้อหลายเมล็ด (berry) ส่วนชนิดพืชในสกุลย่อย *Trirostellum* มีลักษณะของผลเป็นแบบผลแห้งแตก (capsule) (Wu and Chen, 1983; Chen, 1995; De Wilde and Duyfjes, 2007, 2008, 2010; Chen et al., 2011) จากลักษณะทางสัณฐานที่ใกล้เคียงกัน และคาบเกี่ยวกัน De Wilde and Duyfjes (2007, 2008, 2010) ได้ศึกษาพรรณพฤกษชาติในเขตประเทศไทยและภูมิภาคมาเลเซีย จำแนกชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชสกุลปัญญาจันทร์ โดยยุบชื่อชนิดพืชที่มีความคล้ายคลึงกันไว้ในระดับ forma ภายใต้ชนิดพืช *G. pentaphyllum* (Thunb.) Makino) ในทางตรงกันข้าม ประเทศจีนซึ่งเป็นศูนย์กลางของความหลากหลายของพืชสกุลปัญญาจันทร์ นักพฤกษอนุกรมวิธานได้จำแนกแตกต่างออกไป โดยยกชื่อในระดับ forma ขึ้นมาในระดับ species และ variety (Wu and Chen, 1983; Chen, 1995; Chen et al., 2011) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชตามหลักอนุกรมวิธานที่ขัดแย้งกันนี้ ได้สร้างความสับสนในการเรียกชื่อชนิดปัญญาจันทร์ให้ถูกต้อง ทั้งนี้ ในประเทศไทยได้มีการศึกษาความหลากหลายและอนุกรมวิธานของปัญญาจันทร์ (De Wilde and Duyfjes, 2007; 2008) พบว่า ลักษณะทางสัณฐานมีความผันแปรสูงมาก จึงถูกจัดแยกออกเป็น 5 แบบ คือ *G. pentaphyllum* f. *pentaphyllum*,

f. dasycarpum (C.Y. Wu) W.J. de Wilde & Duyfjes, *f. grandiflorum* W.J. de Wilde & Duyfjes, *f. knemandrum* W.J. de Wilde & Duyfjes และ *f. pubescens* (Gagnep.) W.J. de Wilde & Duyfjes ซึ่ง forma ต่าง ๆ ของพืชชนิดเดียวกันนี้มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อมที่พืชเหล่านี้อาศัยอยู่ เรียกว่า แบบนิเวศ (ecotype) ซึ่งเป็นผลจากการปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาพท้องถิ่นนั้น ๆ และพบว่า *f. grandiflorum* และ *f. knemandrum* เป็นพืชถิ่นเดียวที่พบเฉพาะทางภาคเหนือของประเทศไทย นอกจากนี้ De Wilde and Duyfjes (2007) ยังรายงานพบ *f. simplicifolium* (Blume) W.J. de Wilde & Duyfjes และ *f. fasciculare* W.J. de Wilde & Duyfjes กระจายพันธุ์อยู่ในแถบเอเชีย แต่ยังไม่มีรายงานพบในประเทศไทย ซึ่งให้เห็นว่า ปัญญาจันทร์มีความผันแปรตามสภาพแวดล้อมสูงมาก ซึ่งอาจมี forma อื่น ๆ ที่กระจายพันธุ์อยู่แต่ยังสำรวจไม่พบ

มีงานศึกษาวิจัยข้อมูลดีเอ็นเอของพืชทั้งจีโนม เพื่อใช้สนับสนุนการจำแนกพืชสกุลปัญญาจันทร์ (Zhao et al., 2015; Zhang et al., 2017; Wang et al., 2020) แสดงให้เห็นว่า ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ สามารถใช้สนับสนุนการจำแนกพืชสกุลปัญญาจันทร์ในการยกชื่อในระดับ forma ขึ้นมาเป็นระดับ species ได้ นอกจากนี้ ยังมีการวิจัยออกแบบพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะในการระบุชนิดพืช (species-specific chloroplast markers) โดยใช้ยีน *acetyl-CoA carboxylase beta subunit (accD)*, *cytochrome b6/F complex subunit IV (petD)*, *photosystem II 4.7 kDa protein (psbB)* และ *photosystem I assembly protein (ycf3)* สำหรับระบุชนิดของสกุลปัญญาจันทร์ที่นิยมปลูกเป็นพืชสมุนไพร ได้แก่ *G. burmanicum* King ex Chakr., *G. longipes* C.Y.Wu ex C.Y.Wu & S.K.Chen, *G. pentaphyllum* และ *G. pubescens* (Gagnep.) C.Y.Wu (Abid et al.,

2019) ซึ่งชนิดพืชเหล่านี้มีฐานฐานวิทยาใกล้เคียงกับปัญจันธุ์พันธุ์พื้นเมืองของไทย ข้อมูลดีเอ็นเอจากยีนเหล่านี้ จึงมีความเหมาะสมในการตรวจสอบความแตกต่างของปัญจันธุ์พันธุ์พื้นเมืองของไทยให้มีความน่าเชื่อถือยิ่งขึ้น รวมถึงพันธุ์ลูกผสมที่มีความสม่ำเสมอของพันธุ์แล้ว เพื่อการศึกษาความสัมพันธ์ของปัญจันธุ์พันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ของยีน *accD* *petD* *psbB* และ *ycf3* และระบุยืนยันชื่อวิทยาศาสตร์ของปัญจันธุ์ที่ศึกษา

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างพืชที่ศึกษา

1.1 ตัวอย่างพืชในกลุ่มที่ศึกษา (Ingroup taxa)

1.1.1 ข้อมูลดีเอ็นเอที่ศึกษาใหม่

เก็บรวบรวมจากแปลงรวบรวมพันธุ์ ของศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ระหว่างปี พ.ศ. 2563-2564 จำนวน 20 พันธุ์ แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) กลุ่มพันธุ์พื้นเมือง 10 พันธุ์ ได้แก่ ดอยตุง1 ดอยตุง2 แพร่1 วาวี2 วาวี4 เวียงแก่น1 เวียงแก่น2 สันกำแพง อ่างช้าง และเชียงของ 2) กลุ่มพันธุ์ลูกผสมที่มีลักษณะสม่ำเสมอ 2 พันธุ์ ได้แก่ เชียงราย1 และ 2 3) กลุ่มลูกผสมของพันธุ์สิบสองปันนา × พันธุ์พื้นเมือง ที่มีลักษณะไม่สม่ำเสมอ 7 สายพันธุ์ ได้แก่ 1-7 1-9 1-11 1-13 1-19 2-10 และสายพันธุ์จีน-พื้นเมือง ใช้ศึกษาเพื่อเป็นพันธุ์เปรียบเทียบความใกล้ชิดของพันธุ์ลูกผสมด้วยกัน และความใกล้ชิดกับพันธุ์พ่อแม่พันธุ์แม่ 4) พันธุ์ต่างประเทศ 1 พันธุ์ คือ สิบสองปันนา เป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากประเทศจีนเพื่อเป็นคู่ผสมพันธุ์ (ใช้เปรียบเทียบความใกล้ชิดกับพันธุ์ลูกผสมและพันธุ์พื้นเมืองของไทย) ทั้งนี้ทั้ง 20 พันธุ์ ได้ลงทะเบียนเก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ กรมวิชาการเกษตร

(Bangkok Herbarium, BK) ตามกรรมวิธีการจัดทำพรรณไม้แห้งของพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ

1.1.2 ข้อมูลดีเอ็นเออ้างอิงของสกุลปัญจันธุ์

ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของชนิดพืชสกุลปัญจันธุ์ (*Gynostemma* spp.) ที่มีการเก็บบันทึกไว้บนเว็บไซต์ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) นำมาใช้เป็นดีเอ็นเออ้างอิงของชนิดพืชในกลุ่มที่ศึกษา ประกอบด้วย สกุลปัญจันธุ์ 2 สกุลย่อย ได้แก่ *Gynostemma* 12 ตัวอย่าง และ *Triostellum* 5 ตัวอย่าง รวม 17 ตัวอย่าง (Table 1) โดยคัดเลือกจากชนิดพืชที่มีจีโนมคลอโรพลาสต์สมบูรณ์ และคัดเลือกศึกษาเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณคลอโรพลาสต์ 4 ยีน ได้แก่ *accD* *petD* *psbB* และ *ycf3*

พืชสกุล *Gynostemma* ที่คัดเลือกมาใช้เปรียบเทียบความสัมพันธ์ จำนวน 11 ชนิด จาก 17 ตัวอย่าง เป็นชนิดพืชที่มีการกระจายพันธุ์ทั้งในประเทศไทย และใกล้เคียงซึ่งมีสภาพภูมิประเทศและภูมิอากาศคล้ายคลึงกัน สกุล *Gynostemma* ที่คัดเลือกมาเหล่านี้จึงใช้เป็นตัวแทนที่ช่วยพิสูจน์ความเป็นชนิดเดียวกันกับปัญจันธุ์ที่ศึกษาใหม่นี้

1.2 ตัวอย่างพืชนอกกลุ่มที่ศึกษา (Outgroup taxa)

ตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของสกุลพืชที่มีความใกล้เคียงกับสกุล *Gynostemma* Blume และจัดอยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae ที่มีการเก็บบันทึกไว้บนเว็บไซต์ของ GenBank, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) ใช้ตัวอย่างพืชนอกกลุ่มที่ศึกษา 6 ตัวอย่าง (Table 1) โดยคัดเลือกจากชนิดพืชที่มีจีโนมคลอโรพลาสต์สมบูรณ์ และคัดเลือกศึกษาเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณคลอโรพลาสต์ 4 ยีน ได้แก่ *accD* *petD* *psbB* และ *ycf3*

Table 1 The nucleotide sequences of the *accD*, *petD*, *psbB* and *ycf3* genes downloaded from the GenBank, NCBI

Name	GenBank accession no.	Tribe
Ingroup taxa		
Subgenus <i>Gynostemma</i> Blume		
<i>Gynostemma 'burmanicum'</i>	MF152731	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Gynostemma 'burmanicum'</i>	NC036141	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Gynostemma caulopterum</i> S.Z.He	NC036135	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Gynostemma compressum</i> X.X.Chen & D.R.Liang	NC037179	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Gynostemma longipes</i> C.Y.Wu ex C.Y.Wu & S.K.Chen	MF152730	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Gynostemma longipes</i> C.Y.Wu ex C.Y.Wu & S.K.Chen	NC036140	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino	KT695603	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino	KX014626	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino	KX852298	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino	NC029484	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Gynostemma pubescens</i> (Gagnep.) C.Y.Wu	MF152732	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Gynostemma pubescens</i> (Gagnep.) C.Y.Wu	NC036142	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
Subgenus <i>Triostellum</i> (Z.P.Wang & Q.Z.Xie) C.Y.Wu & S.K.Chen		
<i>Gynostemma cardiospermum</i> Cogn. ex Oliv.	NC035959	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Gynostemma laxiflorum</i> C.Y.Wu & S.K.Chen	NC036134	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Gynostemma microspermum</i> C.Y.Wu & S.K.Chen	MZ286581	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Gynostemma pentagynum</i> Z.P.Wang	NC036136	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Gynostemma yixingense</i> (C.P.Wang & Q.Z.Xie) C.Y.Wu & S.K.Chen	NC053537	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
Outgroup taxa		
<i>Coccinia grandis</i> (L.) Voigt	KX147312	Tribe <i>Benincaseae</i>
<i>Cucumis sativus</i> L.	DQ865975	Tribe <i>Benincaseae</i>
<i>Gomphogyne cissiformis</i> Griff.	MH256801	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Hemsleya zhejiangensis</i> C.Z.Zheng	NC056163	Tribe <i>Gomphogyneae</i>
<i>Momordica charantia</i> L.	MT727082	Tribe <i>Momordiceae</i>
<i>Trichosanthes kirilowii</i> Maxim.	NC041088	Tribe <i>Sicyoeae</i>

2. การศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอที่จำเพาะ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ โดยนำชิ้นส่วนใบทั้ง 20 พันธุ์ มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป PureLink Plant Total DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) ตามกรรมวิธีของบริษัท แล้วตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ของปฏิกิริยาที่สกัดได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส 0.5% ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 15 นาที ในสารละลาย 0.5X TBE บันทึกภาพดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง Azure 200 (Azure Biosystems, Inc., USA) และเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20°C.

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 2.1 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งในแต่ละปฏิกิริยา ประกอบด้วยดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 ng ปริมาตร 1-1.25 μ L คู่มือไพรเมอร์บริเวณคลอโรพลาสต์ *accD* *petD* *psbB* และ *ycf3* (รายละเอียดตาม Abid et al., 2019) ความเข้มข้น 10 μ M ข้างละ 2.5 μ L ชุดน้ำยา 2X Phire Plant Direct PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) ปริมาตร 25 μ L และเติมน้ำให้มีปริมาตรรวม 50 μ L โดยใช้สภาวะเริ่มต้นในขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (initial denaturation) ที่ 95 °ซ. เป็นเวลา 5 นาที แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอใน 3 ขั้นตอน จำนวน 25 รอบ ประกอบด้วย ขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกัน (denaturation) ที่ 95 °ซ. เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่ 58 °ซ. เป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (extension) ที่ 72 °ซ. เป็นเวลา 45 วินาที ตามด้วยขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์รอบสุดท้าย (final extension) ที่ 72 °ซ. เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5% ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 15 นาที ในสารละลาย 0.5X TBE บันทึกภาพดีเอ็นเอภายใต้แสง UV โดยใช้เครื่อง Azure 200 (Azure Biosystems, Inc., USA)

2.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี BTSeq™ (Barcode-Tagged Seq) (Celeomics, Inc., Korea) ตามกรรมวิธีของบริษัท แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบความปนเปื้อนด้วย BlastN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) บนฐานข้อมูลของ NCBI เมื่อพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์

นั้น ๆ มีเปอร์เซ็นต์ความใกล้เคียงกับพืชกลุ่มปญจันธุ์สูง จึงนำมาตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย BioEdit 7 (Hall, 1999) และเก็บบันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์ของปญจันธุ์ทั้ง 20 พันธุ์ไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank, NCBI ตามรูปแบบและขั้นตอนของระบบฐานข้อมูลที่กำหนดไว้

3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปญจันธุ์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณ *accD* *petD* *psbB* และ *ycf3*

3.1 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปจัดเรียงตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับของแต่ละยีนร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสกุล *Gynostemma* 17 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างพืชในกลุ่มที่ศึกษา และตัวอย่างพืชนอกกลุ่มที่ศึกษา (Table 1) โดยใช้ ClustalW (Thompson et al., 1994) ด้วยวิธี multiple alignment และตรวจสอบความถูกต้องของการจัดเรียงด้วยตาเปล่าอีกครั้ง

3.2 การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ นำเมตริกซ์ (matrix) ของลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะบริเวณ *accD* *petD* *psbB* และ *ycf3* ที่ได้จัดเรียงเปรียบเทียบตำแหน่งแล้วไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยวิธี maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) และ minimum evolution (ME) ใน MEGA 7 (Kumar et al., 2016) โดยการวิเคราะห์แต่ละยีน หากความสัมพันธ์ของแต่ละยีนไม่ขัดแย้งกัน จึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ยีนร่วมกัน โดยกำหนดค่า bootstrap test ที่ 1,000 replicates (Felsenstein, 1985) ประเมินค่า bootstrap percentages (BPs) ที่ 85-100% เป็นค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นระดับสูง 75-84% ระดับปานกลาง 50-74% ระดับต่ำ และ <50% เป็นค่าที่ไม่สนับสนุนความเชื่อมั่น (Wurdack et al., 2005)

4. การศึกษาข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ของปัญจขันธ์ 20 พันธุ์ และปัญจขันธ์อ้างอิง

พิจารณาความสัมพันธ์ของปัญจขันธ์ทั้ง 20 พันธุ์ เปรียบเทียบกับสกุลปัญจขันธ์อ้างอิง เพื่อให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ ว่ามีการแสดงออกถึงความแตกต่าง ได้แก่ ระดับ species, variety หรือ forma หรือไม่มีความแตกต่าง โดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอร่วมกับข้อมูลสัณฐานวิทยาในการพิจารณาเพื่อระบุชื่อวิทยาศาสตร์ที่ชัดเจนของปัญจขันธ์

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ความสัมพันธ์ของปัญจขันธ์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณ *accD* *petD* *psbB* และ *ycf3*

ผลการศึกษาดีเอ็นเอบริเวณจำเพาะของยีน *accD* *petD* *psbB* และ *ycf3* พบว่า มีความจำเพาะสูงกับปัญจขันธ์ที่ศึกษาใหม่นี้ โดยมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนทั้ง 4 ยีน ได้ทั้ง 20 พันธุ์ หรือ 100% และได้เก็บบันทึกไว้บนฐานข้อมูลของ GenBank, NCBI (Table 2)

ผลการวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยข้อมูลดีเอ็นเอของยีน *accD* *petD* *psbB* และ *ycf3* ของปัญจขันธ์ด้วยวิธี MP ML และ ME (Table 3) พบว่า เมื่อจัดเรียงลำดับเบสของชุดข้อมูลที่แยกวิเคราะห์แล้ว ยีน *petD* มีความยาวสูงสุด คือ 807 คู่เบส รองลงมา คือ *psbB* *accD* และ *ycf3* เป็น 608 454 และ 268 คู่เบสตามลำดับ แต่มีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ไม่สอดคล้องกับลำดับความยาวของข้อมูลเรียงตามลำดับ ดังนี้ *petD* *ycf3* *psbB* และ *accD* มี 50 24 23 และ 15 คู่เบสแสดงให้เห็นว่า ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ไม่ได้ขึ้นอยู่กับความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ และชุดข้อมูลที่วิเคราะห์ร่วมกันของทั้ง 4 ยีน ซึ่งมีความยาวของการจัดเรียง 2,137

คู่เบส แสดงตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ของชุดข้อมูลแยกรวมกันเป็น 112 คู่เบส ซึ่งข้อมูลนี้จะส่งผลต่อรูปร่างและค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นบนแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของตัวอย่างที่ศึกษา

แผนภูมิที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้ง 3 กรรมวิธีสอดคล้องกัน ผลการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอของยีน *accD* และ *ycf3* แสดงความสัมพันธ์ในการจัดกลุ่มของชนิดพืชในสกุลปัญจขันธ์ (*Gynostemma* clade) ไว้ด้วยกัน แต่ไม่สามารถแสดงความสัมพันธ์ที่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นของกลุ่มพันธุ์ปัญจขันธ์กับสกุลปัญจขันธ์อ้างอิงได้ในขณะที่ข้อมูลดีเอ็นเอของยีน *petD* และ *psbB* สามารถจัดกลุ่มที่มีค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นของชนิดปัญจขันธ์ในระดับ subgenus *Gynostemma* ได้ และยังแสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดของกลุ่มพันธุ์ปัญจขันธ์กับสกุลปัญจขันธ์อ้างอิงได้อีกด้วย ทั้งนี้เมื่อพิจารณาความยาวนิวคลีโอไทด์และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ พบว่า มีความสอดคล้องกับการแสดงผลความสัมพันธ์ของตัวอย่างบนแผนภูมิกล่าวคือ เมื่อตัวแปรดังกล่าวข้างต้นมีค่าสูง จะแสดงความสัมพันธ์ของตัวอย่างที่ศึกษาบนแผนภูมิได้ชัดเจนขึ้น ในการอธิบายความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปัญจขันธ์ จึงเลือกใช้แผนภูมิการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอรวมของยีนทั้ง 4 ยีน (Figure 1) เพื่อยืนยันให้เห็นความสัมพันธ์ใกล้ชิดของปัญจขันธ์ที่ศึกษาทั้ง 20 พันธุ์ กับสกุลปัญจขันธ์อ้างอิง ซึ่งเป็นสมาชิกใน subgenus *Gynostemma*

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยข้อมูลดีเอ็นเอรวมของยีน *accD* *petD* *psbB* และ *ycf3* แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันของสกุล *Gynostemma* และปัญจขันธ์ที่ศึกษาทั้ง 20 พันธุ์ ซึ่งรวมกลุ่มอยู่ด้วยกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นสูง (Clade A) (Figure 1) โดยพบว่า ทั้ง 20 พันธุ์นี้จัดกลุ่ม

Table 2 Voucher specimens of native Panchakhan varieties and hybrids deposited at Bangkok Herbarium (BK) and the new nucleotide sequences generated in the present study

Name	Collector no.	BK no.	GenBank accession no.			
			<i>accD</i>	<i>petD</i>	<i>psbB</i>	<i>ycf3</i>
'Jiaogulan Chiangrai 1'	Pruesapan et al. KP2020-1	BK 071525	OQ093516	OQ093536	OQ093556	OQ093576
'Jiaogulan Chiangrai 2'	Pruesapan et al. KP2020-2	BK 071526	OQ093517	OQ093537	OQ093557	OQ093577
Isolate Chiangrai 1-7	Pruesapan et al. KP2020-3	BK 071527	OQ093518	OQ093538	OQ093558	OQ093578
Isolate Chiangrai 1-9	Pruesapan et al. KP2020-4	BK 071528	OQ093519	OQ093539	OQ093559	OQ093579
Isolate Chiangrai 1-11	Pruesapan et al. KP2020-5	BK 071529	OQ093520	OQ093540	OQ093560	OQ093580
Isolate Chiangrai 1-13	Pruesapan et al. KP2020-6	BK 071530	OQ093521	OQ093541	OQ093561	OQ093581
Isolate Chiangrai 1-19	Pruesapan et al. KP2020-7	BK 071531	OQ093522	OQ093542	OQ093562	OQ093582
Isolate Chiangrai 2-10	Pruesapan et al. KP2020-8	BK 071532	OQ093523	OQ093543	OQ093563	OQ093583
Isolate Chinese-Local	Pruesapan et al. KP2020-9	BK 071533	OQ093524	OQ093544	OQ093564	OQ093584
ecotype Sibsongpanna	Pruesapan et al. KP2020-10	BK 071534	OQ093525	OQ093545	OQ093565	OQ093585
ecotype Angkhang	Pruesapan et al. KP2020-11	BK 071534	OQ093526	OQ093546	OQ093566	OQ093586
ecotype Sankampaeng	Pruesapan et al. KP2020-12	BK 071536	OQ093527	OQ093547	OQ093567	OQ093587
ecotype Doitung 1	Pruesapan et al. KP2020-13	BK 071537	OQ093528	OQ093548	OQ093568	OQ093588
ecotype Doitung 2	Pruesapan et al. KP2020-14	BK 071538	OQ093529	OQ093549	OQ093569	OQ093589
ecotype Wiangkaen 1	Pruesapan et al. KP2020-15	BK 071539	OQ093530	OQ093550	OQ093570	OQ093590
ecotype Wiangkaen 2	Pruesapan et al. KP2020-16	BK 071540	OQ093531	OQ093551	OQ093571	OQ093591
ecotype Wawi 2	Pruesapan et al. KP2020-17	BK 071541	OQ093532	OQ093552	OQ093572	OQ093592
ecotype Wawi 4	Pruesapan et al. KP2020-18	BK 071542	OQ093533	OQ093553	OQ093573	OQ093593
ecotype Chiangkhong	Pruesapan et al. KP2020-19	BK 071543	OQ093534	OQ093554	OQ093574	OQ093594
ecotype Phrae 1	Pruesapan et al. KP2020-20	BK 071544	OQ093535	OQ093555	OQ093575	OQ093595

Table 3 Nucleotide data of *accD*, *petD*, *psbB* and *ycf3* genes used for maximum likelihood, maximum parsimony and minimum evolution analyses

Characteristics/Gene	<i>accD</i>	<i>petD</i>	<i>psbB</i>	<i>ycf3</i>	Combined data
No. of taxa	43	43	43	43	43
No. of accessions (ingroups)	37	37	37	37	37
Length of sequences (bp)	439-454	772-794	608	242-261	Not determined
Length of alignment (bp)	454	807	608	268	2137
No. of variable characters	46	96	47	38	226
No. of potential informative sites	15	50	23	24	112

อยู่ด้วยกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นสูง (Clade A) (Figure 1) โดยพบว่า ทั้ง 20 พันธุ์นี้จัดกลุ่มอยู่ กับปญจพันธ์อ้างอิง *G. burmanicum* 2 ตัวอย่าง *G. pubescens* 2 ตัวอย่าง *G. longipes* 2 ตัวอย่าง และ *G. pentaphyllum* 4 ตัวอย่าง โดยรวมกลุ่มอยู่

ด้วยกันด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นสูง (Clade B) โดยภายใต้ Clade B พบปญจพันธ์ทั้ง 20 พันธุ์ แสดง ความใกล้ชิดกับปญจพันธ์อ้างอิงแยกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ พันธุ์สันกำแพง และเชียงราย 2 จัดกลุ่มอยู่ ร่วมกับปญจพันธ์อ้างอิง *G. longipes* 2 ตัวอย่าง และ

G. pentaphyllum 4 ตัวอย่าง ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นต่ำ (Clade C) ส่วนปญจชันธุ์อื่น ๆ อีก 18 พันธุ์ จัดกลุ่มอยู่ร่วมกับปญจชันธุ์อ้างอิง *G. burmanicum* 2 ตัวอย่าง และ *G. pubescens* 2 ตัวอย่าง ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นสูงใน MP และ ME และต่ำใน ML (Clade D) แต่ปญจชันธุ์อ้างอิงทั้ง 4 ตัวอย่าง กลับจัดกลุ่มแยกออกมาด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นต่ำใน MP และ ML และสูงใน ME อีกทั้งยังจัดค้ำยืนยันความใกล้ชิดของ *G. burmanicum* ทั้ง 2 ตัวอย่าง และของ *G. pubescens* ทั้ง 2 ตัวอย่าง ด้วยค่าสนับสนุนความเชื่อมั่นสูง และต่ำ ตามลำดับ ในขณะที่ปญจชันธุ์อีก 18 พันธุ์ ไม่แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่สามารถแยกแยะให้ชัดเจนได้ (polytomy)

2. การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอ

2.1 ความสัมพันธ์ในระดับสกุลย่อยของ *Gynostemma* spp.

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุล *Gynostemma* (Figure 1) แสดงให้เห็นความสอดคล้องของการจำแนกกลุ่มชนิดของ *Gynostemma* ด้วยลักษณะประเภทของผล (De Wilde and Duyfjes, 2007) พบว่า *G. microspermum*, *G. laxiflorum* และ *G. yixingense* แยกตัวอยู่ใกล้ชิดกันที่ฐานของแผนภูมิ ซึ่งสอดคล้องกับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน ที่จำแนก 3 ชนิดนี้ไว้ในสกุลย่อย *Trirostellum* ด้วยลักษณะของผลแบบผลแห้งแตก (Chen, 1995) ขณะที่ *G. pentagynum* สมาชิกอีกชนิดของสกุลย่อยนี้ จัดกลุ่มอยู่กับ *G. caulopterum* และ *G. compressum* ซึ่งเป็นสมาชิกของสกุลย่อย *Gynostemma* ที่มีผลแบบผลแห้งมีเนื้อหลายเมล็ด (Figure 2C-D) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Zhang et al. (2017) และ Wang et al. (2020) แต่พืชชนิดนี้จำแนกไว้ต่างหากในสกุลย่อย *Trirostellum* หมู่

Pentastylus ด้วยลักษณะเด่นของการมีก้านชูเกสรเพศเมีย 5 อัน และมียอดเกสรเพศเมีย 2 แฉก (Chen, 1995) ซึ่งการมียอดเกสรเพศเมีย 2 แฉก (Figure 2A-B) มีความคล้ายคลึงกับชนิดพืชในสกุลย่อย *Gynostemma* จึงอาจเป็นสาเหตุของการจับกลุ่มแสดงความใกล้ชิดกับชนิดพืชที่อยู่ต่างกลุ่มนี้ ส่วนสมาชิกอื่นของสกุลย่อย *Gynostemma* แสดงความใกล้ชิดกับปญจชันธุ์ที่ศึกษาใหม่ทั้ง 20 พันธุ์ (Clade B) ซึ่งพิสูจน์ให้เห็นว่าพืชที่มีผลแบบผลแห้งมีเนื้อหลายเมล็ดนี้ (Figure 2C-D) แสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสอดคล้องกับข้อมูลฐานวิธาน และยืนยันการจำแนกกลุ่มปญจชันธุ์ทั้ง 20 พันธุ์นี้ อยู่ในสกุลย่อย *Gynostemma*

2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ของปญจชันธุ์ 20 พันธุ์

เมื่อพิจารณาความใกล้ชิดกันด้วยข้อมูลดีเอ็นเอจาก Figure 1 พบว่า ใน Clade B ปญจชันธุ์อ้างอิงแบ่งเป็น 2 กลุ่ม อยู่ทั้งใน Clade C และ Clade D เช่นเดียวกับปญจชันธุ์ที่ศึกษาใหม่ทั้ง 20 พันธุ์

ภายใน Clade C แสดงให้เห็นว่าพันธุ์สันกำแพง และเชียงราย 2 มีความใกล้ชิดกับปญจชันธุ์อ้างอิง *G. longipes* และ *G. pentaphyllum* มากกว่าพันธุ์อื่น ๆ เมื่อตรวจสอบประวัติพันธุ์ พบว่า พันธุ์เชียงราย 2 เป็นลูกผสมจากแม่พันธุ์สันกำแพง กับพ่อพันธุ์สิบสองปันนา เนื่องจาก ยีน *accD* *petD* *psbB* และ *ycf3* เป็นยีนบริเวณคลอโรพลาสต์ ซึ่งแสดงลักษณะดีเอ็นเอของแม่ เมื่อพิจารณาลักษณะทางฐานวิธานประกอบความใกล้ชิดกับปญจชันธุ์อ้างอิง *G. longipes* และ *G. pentaphyllum* ตามการจำแนกพรรณพฤกษชาติของเขตประเทศจีน (Chen et al., 2011) พบว่า พันธุ์สันกำแพงมีลักษณะรังไข่และผลเกลี้ยง (Figure 2A, C) และมีเมล็ดทรงกลมเป็นรูปไข่ ผิวเมล็ดเป็นตุ่มรูปร่างค่อนข้างสม่ำเสมอ (Figure 2E)

Combined datasets
(*accD*+*petD*+*psbB*+*ycf3*)

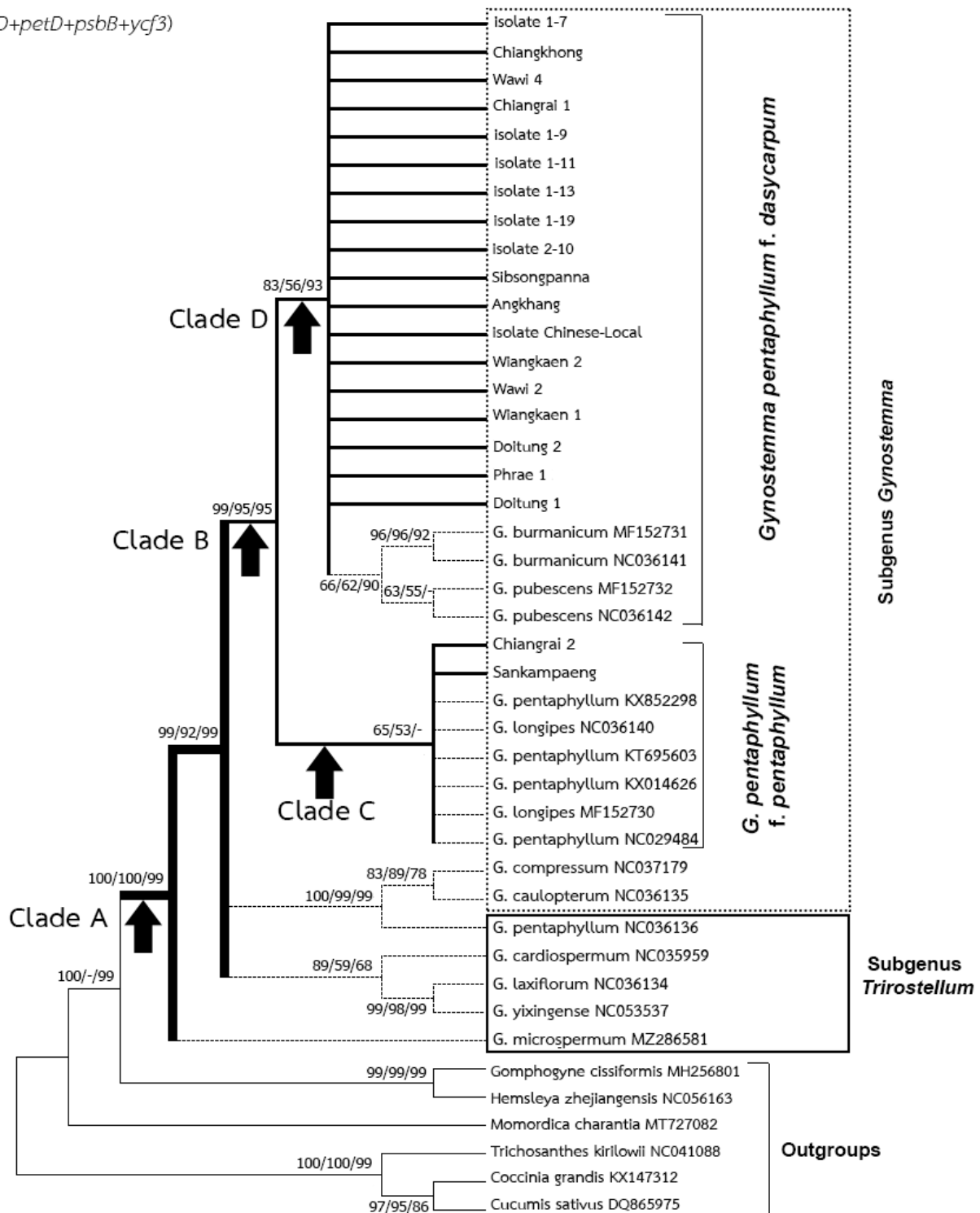


Figure 1 Maximum parsimony cladogram of *Gynostemma* spp. based on the combined chloroplast DNA of *accD*, *petD*, *psbB* and *ycf3*. The value indicated for branches are bootstrap percentages (BPs) of maximum parsimony, maximum likelihood and minimum evolution, respectively

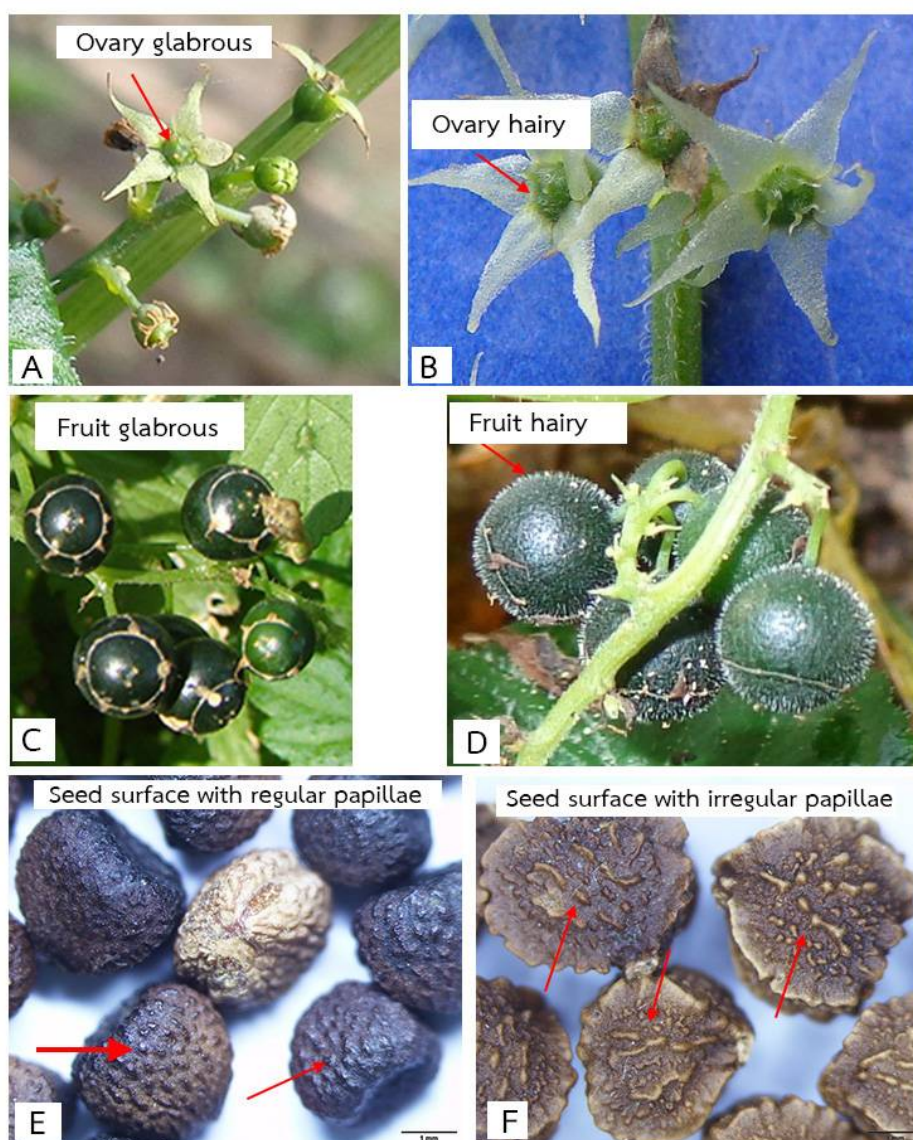


Figure 2 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino; ovary (A-B); fruits (C-D); seeds spherical, ovate shape with regular papillae on surfaces (E); seeds flat, subtriangular to hearth shape with irregular papillae on surfaces (F)

คล้ายกับ *G. pentaphyllum* var. *pentaphyllum* แต่มีขนปกคลุมทั้งแผ่นใบด้านบนและด้านล่าง ในขณะที่พันธุ์สันกำแพงมีขนปกคลุมแผ่นใบด้านบน แต่แผ่นใบด้านล่างเกลี้ยง มีขนปกคลุมเฉพาะส่วนของเส้นใบเท่านั้น เช่นเดียวกับพันธุ์เชียงใหม่ 2 โดย Chen et al. (2011) ได้รวบรวม *G. pubescens* ไว้ภายใต้ *G. pentaphyllum* var. *pentaphyllum* แต่คำอธิบายไม่ชัดเจนเพียงพอและมีความคาบเกี่ยว

กับปัญจชันชานิอื่น สำหรับลักษณะทางสัณฐานของ *G. longipes* นั้น แผ่นใบด้านล่างไม่มีขนปกคลุม และ รังไข่/ผลมีผิวเกลี้ยง คล้ายพันธุ์สันกำแพง แต่รูปร่าง เมล็ดแตกต่าง แต่ Jeffrey หนึ่งในผู้เขียนมีความเห็น ต่างว่า *G. longipes* ควรถูกยุบเป็นชื่อพ้องของ *G. pentaphyllum* var. *pentaphyllum* ซึ่งเมื่อ เปรียบเทียบกับการจำแนก *Gynostemma* ของเขต ประเทศไทยและภูมิภาคมาเลเซียแล้ว พบว่า พันธุ์

สันกำแพงมีลักษณะใกล้เคียงกับ *G. pentaphyllum* f. *pentaphyllum* (De Wilde and Duyfjes, 2007; 2008; 2010)

ภายใน Clade D ปัญจพันธ์ที่ศึกษาใหม่ที่เหลือจับกลุ่มกับปัญจพันธ์อ้างอิง *G. burmanicum* และ *G. pubescens* แต่ปัญจพันธ์อ้างอิงทั้งสองชนิดกลับแยกมาจับกลุ่มกัน เมื่อพิจารณาการจำแนก *Gynostemma* ของเขตพรรณพฤกษชาติประเทศจีนพบว่า *G. pubescens* ยุบเป็นชื่อพ้องของ *G. pentaphyllum* var. *pentaphyllum* ซึ่งทั้ง *G. burmanicum* และ *G. pentaphyllum* var. *pentaphyllum* มีลักษณะเด่นที่มีขนปกคลุมแผ่นใบทั้งสองด้าน และรังไข่/ผลมีผิวเกลี้ยง สำหรับปัญจพันธ์ที่ศึกษาใหม่นี้ทั้ง 18 พันธุ์พบว่า มีขนปกคลุมเฉพาะแผ่นใบด้านบน ส่วนด้านล่างมีขนปกคลุมเฉพาะเส้นใบเท่านั้น นอกจากนี้ เวียงแก่น อ่างขาง สิบสองปันนา และเชียงราย1 แสดงลักษณะของรังไข่/ผลมีขนนุ่มปกคลุม (Figure 2B, D) แสดงให้เห็นว่า ทั้ง 18 พันธุ์ ไม่ใช่ *G. burmanicum* หรือ *G. pentaphyllum* var. *pentaphyllum* แต่แสดงลักษณะทางสัณฐานที่คล้ายคลึงกับ *G. pentaphyllum* var. *dasycarpum* ตามการจำแนกพรรณพฤกษชาติของเขตประเทศจีน และคล้ายคลึงกับ *G. pentaphyllum* f. *dasycarpum* ตามการจำแนกพรรณพฤกษชาติของเขตประเทศไทยและภูมิภาคมาเลเซีย (De Wilde and Duyfjes, 2007; 2008, 2010) ด้วยลักษณะของผลที่มีขนปกคลุม (Figure 2D) แต่ไม่มีข้อมูลดีเอ็นเอของปัญจพันธ์อ้างอิงของ var./f. *dasycarpum* มาช่วยยืนยันบน Clade D พบความสัมพันธ์ของเมล็ดทรงแบนค่อนข้างรูปสามเหลี่ยมไปจนถึงรูปหัวใจ ผิวเมล็ดมีตุ่มรูปร่างไม่สม่ำเสมอ (Figure 2F) ของพันธุ์อ่างขาง ดอยตุง1 สิบสองปันนา เชียงราย1 และสายพันธุ์1-7 สำหรับพันธุ์เชียงของ แพร่1 วาวี2 และวาวี4 แม้ไม่มีรังไข่/ผล และเมล็ดในการศึกษา แต่ข้อมูลดีเอ็นเอแสดงว่ามีความใกล้ชิดกับพันธุ์อื่น ๆ โดยเฉพาะพันธุ์ลูกผสม

ทั้ง 7 สายพันธุ์ ที่แสดงลักษณะดีเอ็นเอของแม่หรือพันธุ์สิบสองปันนา ดังเห็นได้จากพันธุ์ตัวแทนที่มีพ่อแม่เดียวกัน คือ พันธุ์เชียงราย1 และสายพันธุ์1-7 ที่แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาาร่วมของรังไข่/ผล และเมล็ดกับปัญจพันธ์พันธุ์สิบสองปันนาดังกล่าวมาข้างต้น

การแสดงตำแหน่งบนแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของ *G. burmanicum* *G. longipes* *G. pentaphyllum* และ *G. pubescens* ในงานวิจัยนี้ ยืนยันความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับปัญจพันธ์ทั้ง 20 พันธุ์ แต่เมื่อพิจารณารายงานวิจัยข้อมูลดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ทั้งจีโนมคลอโรพลาสต์ของพืชสกุล *Gynostemma* (Zhang et al., 2017; Wang et al., 2020) พบว่า ทั้ง 4 ชนิด มีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับชนิดอย่างชัดเจน และยืนยันความใกล้ชิดกันของ *G. burmanicum* กับ *G. pubescens* และ *G. longipes* กับ *G. pentaphyllum* ซึ่งสอดคล้องกัน โดยลำดับดีเอ็นเอของจีโนมของพืชสกุล *Gynostemma* ที่สมบูรณ์นี้ยืนยันความต่างชนิดกันของ *G. burmanicum* *G. longipes* และ *G. pubescens* และ *G. pentaphyllum* ผลการศึกษาความใกล้ชิดกันของพืชสกุล *Gynostemma* ด้วยข้อมูลโมเลกุลจึงเห็นแย้งกับการยุบรวมชื่อชนิดของ *G. burmanicum* *G. longipes* และ *G. pubescens* ไว้ภายใต้ *G. pentaphyllum* ตามความเห็นของนักพฤกษอนุกรมวิธานด้วยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว (ความเห็นของ C. Jeffrey ใน De Wilde and Duyfjes, 2007; 2008; 2010; Chen et al., 2011) แต่เห็นด้วยกับการยกชื่อเหล่านี้เป็นระดับชนิด (Wu and Chen, 1983; Chen, 1995; Chen et al., 2011) ซึ่งต้องรอพิสูจน์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอตามที่ Zhang et al. (2017) ได้วางแผนจะเพิ่มเติมการศึกษาข้อมูลดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ทั้งจีโนมคลอโรพลาสต์ของพืชสกุล *Gynostemma* ให้ครบถ้วนในอนาคต

2.3 การระบุชื่อวิทยาศาสตร์

เมื่อพิจารณาการศึกษาวิจัยของ Suntaranond et al. (2008) เกี่ยวกับความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล ISSR และ RAPD ของปัญญาชนพันธุ์สิบสองปันนาที่นำมาปลูกในประเทศไทย พบว่า มีความผันแปรทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอภายในพันธุ์สูงมาก และความผันแปรเหล่านี้ส่งผลต่อปริมาณสารซาโปนินที่พบด้วย เช่นเดียวกับการศึกษาในกลุ่มประชากรพันธุ์ป่าของ *G. pentaphyllum* จำนวน 72 กลุ่มในประเทศจีน พบว่า มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับต่ำ แต่มีความผันแปรในระดับสูงในหมู่ประชากร เนื่องจากการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศที่แพร่หลาย การเบี่ยงเบนทางพันธุกรรม และการแยกที่อยู่อาศัยในระยะยาว (Zhang et al., 2019) ซึ่งด้วยความผันแปรที่สูงเช่นนี้ อาจนำไปสู่การแปลผลการวิเคราะห์ว่ามีความแตกต่างในระดับชนิดดังที่กล่าวมาข้างต้นก็เป็นไปได้ ซึ่งเมื่ออาศัยทฤษฎีนี้ในการวิเคราะห์ผล อีกทั้งความคาบเกี่ยวทางสัณฐานวิทยาของพืชในกลุ่มที่ไม่สามารถบ่งชี้การจำแนกในระดับชนิดได้ ผลการวิจัยนี้จึงสนับสนุนการยุบรวม *Gynostemma* ทั้ง 4 ชนิดข้างต้น ลงเป็นระดับ *forma* อยู่ภายใต้ *G. pentaphyllum* ตามทฤษฎีการจำแนกพืชในเขตประเทศไทยและเขตภูมิภาคมาเลเซีย โดยสามารถสรุปได้ในเบื้องต้นว่า ปัญญาชนพันธุ์พื้นเมืองที่กรมวิชาการเกษตรเก็บรวบรวมไว้มีความหลากหลายจำแนกได้เป็น 2 *forma* (f.) ดังนี้

1) *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) f. *pentaphyllum* คือ พันธุ์สันกำแพง และมีการรวมกลุ่มแสดงความใกล้ชิดตามพันธุ์แม่ของพันธุ์เชียงราย2

2) *Gynostemma pentaphyllum* f. *dasycarpum* (C.Y.Wu) W.J.De Wild. & Duyfjes ประกอบด้วย 9 พันธุ์ คือ พันธุ์ดอยตุง1 ดอยตุง2 เชียงของ แพร่1 วาวี2 วาวี4 เวียงแก่น1 เวียงแก่น

2 และอ่างขาง และมีการรวมกลุ่มแสดงความใกล้ชิดตามลักษณะพันธุกรรมร่วมของพันธุ์แม่สิบสองปันนา กับพันธุ์เชียงราย1 สายพันธุ์1-7 1-9 1-11 1-13 1-19 2-10 และสายพันธุ์จีน-พื้นเมือง

ข้อมูลดีเอ็นเอที่ได้จากยีน *accD* *petD* *psbB* และ *ycf3* ของปัญญาชนทั้ง 20 พันธุ์ ที่ศึกษานี้ มีความสอดคล้องกับพืชสกุล *Gynostemma* ที่กระจายพันธุ์อยู่ในคาบสมุทรมหาลี (Abid et al., 2019) ขนาดความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นต้นแบบในการคัดเลือกดีเอ็นเอบาร์โค้ด เพื่อใช้ในการตรวจสอบพันธุ์ของปัญญาชนได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดสมุนไพรอื่น ๆ ได้อย่างไรก็ตาม การจำแนกความแตกต่างของพืชสมุนไพรที่มีความใกล้ชิดกันมากอาจเป็นเรื่องยาก ซึ่งสามารถใช้เครื่องหมายลำดับดีเอ็นเออื่น ๆ เข้ามาช่วยเสริม (Wang et al., 2001) หรือศึกษาปัญญาชนทั้งจีโนม (Gan et al., 2023) ช่วยอำนวยความสะดวกในการระบุชนิดสมุนไพร และตรวจสอบการปลอมปนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Li et al., 2011) เพื่อนำพันธุ์ปัญญาชนที่เหมาะสมไปพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ให้มีคุณสมบัติตามที่ภาคการเกษตรและภาคเศรษฐกิจต้องการ เช่น การศึกษายีนที่ให้รสหวานของปัญญาชนเพิ่มขึ้น หรือยีนที่ส่งเสริมการสร้างสารซาโปนินให้มีปริมาณสูงขึ้น เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง

ข้อมูลดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ของยีน *accD* *petD* *psbB* และ *ycf3* มีประสิทธิภาพในการแบ่งกลุ่มพันธุ์ของปัญญาชนพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสมของไทยได้ และมีความสอดคล้องกับข้อมูลสัณฐานวิทยา สามารถระบุชื่อของปัญญาชนพันธุ์พื้นเมืองได้ในระดับ *forma* (f.) ได้แก่ *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) f. *pentaphyllum*

และ f. *dasycarpum* (C.Y.Wu) W.J. De Wild. & Duyfjes โดยมีพันธุ์ลูกผสมอยู่รวมกลุ่มภายใต้แต่ละ forma ตามพันธุ์แม่ เก็บบันทึกข้อมูลดีเอ็นเอใหม่ของ พันธุ์ปัจจุบันไว้บนระบบออนไลน์สากล (NCBI) เพื่อใช้ ประโยชน์ในการตรวจสอบยืนยันความเป็นเจ้าของ พันธุ์กรรมพืช และใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์พืช สมุนไพรปัจจุบันได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว เป็นประโยชน์ในการควบคุมคุณภาพสมุนไพรและ ผลิตภัณฑ์จากสมุนไพร อีกทั้งยังสามารถนำงานวิจัยไป ต่อยอดในการคัดเลือกพันธุ์ปัจจุบันจากข้อมูลที่ ศึกษาไว้ได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากมูลนิธิ งบประมาณ พ.ศ. 2563-2564 จากกองทุนส่งเสริม วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

เอกสารอ้างอิง

ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย. 2562ก. พันธุ์ลูกผสมสายพันธุ์ เชียงราย 2-20. ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัย พืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 22 หน้า.

ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย. 2562ข. พันธุ์ลูกผสมสายพันธุ์ เชียงราย 7 ใบ. ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัย พืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 21 หน้า.

ศศิธร วรปิตังสี วีระ วรปิตังสี จริญญา ดิษฐไชยวงศ์ และ แสงมณี ชิงดวง. 2556. การทดสอบพันธุ์ใน แหล่งปลูกเพื่อการค้า. รายงานผลงานเรื่องเต็มการ ทดลองที่สิ้นสุด ปี 2556. ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร กระทรวง เกษตรและสหกรณ์.

Abid, S., P. Mohanan, L. Kaliraj, J.K. Park, J.C. Ahn and D.C. Yang. 2019. Development of species-specific chloroplast markers for the authentication of *Gynostemma pentaphyllum* and their distribution in the Korean peninsula. *Fitoterapia*. 138: 104295.

Chen, S.K. 1995. A classificatory system and geographical distribution of the genus *Gynostemma* Bl. (Cucurbitaceae). *Acta Phytotaxonomica Sinica*. 33(4): 403-410.

Chen, S.K., A. Lu and C. Jeffrey. 2011. *Gynostemma* Blume. pp. 11-15. In: *Flora of China* Vol. 19 (Cucurbitaceae through Valerianaceae, with Annonaceae and Berberidaceae). Science Press, Beijing and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.

De Wilde, W.J.J.O. and B.E.E. Duyfjes. 2007. *Gynostemma* (Cucurbitaceae) in Thailand and Malesia. *Blumea*. 52(2): 263-280.

De Wilde, W.J.J.O. and B.E.E. Duyfjes. 2008. *Gynostemma*. pp. 447-454. In: *Flora of Thailand* Vol. 9 Part 4, Cucurbitaceae. The Forest Herbarium, National Park, Wildlife and Plant Conservation Department, Bangkok.

De Wilde, W.J.J.O. and B.E.E. Duyfjes. 2010. Cucurbitaceae. pp. 78-86. In: *Flora of Malesiana*, Series I-Seed Plants vol. 19, H.P. Nooteboom (ed.). Netherlands Centre for Biodiversity Naturalis, Leiden.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39(4): 783-791.

Gan, J., Y. Li, D. Tang, B. Guo, D. Li, F. Cao, C. Sun, L. Yu and Z. Yan. 2023. The complete chloroplast genomes of *Gynostemma* reveal the phylogenetic relationships of species within the genus. *Genes*. 14(4): 929.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41(41): 95-98.

Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33: 1870-1874.

- Li, M., H. Cao, P.P.H. But and P.C. Shaw. 2011. Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes. *Journal of Systematics and Evolution*. 49(3): 271–283.
- Suntaranond, S., S. Srijakval and J. Ditchaiwong. 2008. Genetic variation of Jiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum*) cultivar ‘Sibsongpunna 1’ revealed by RAPD and ISSR markers. *Acta Horticulturae*. 786: 279-282.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22(22): 4673-4680.
- Wang, J., W.Y. Ha, F.N. Ngan, P.P.H. But and P.C. Shaw. 2001. Application of sequence characterized amplified region (SCAR) analysis to authenticate *Panax* species and their adulterants. *Planta Medica*. 67: 781–783.
- Wang, L., G.Y. Lu, H. Liu, L.J. Huang, W.M. Jiang, P. Li and X. Lu. 2020. The complete chloroplast genome sequence of *Gynostemma yixingense* and comparative analysis with congeneric species. *Genetics and Molecular Biology*. 43(4): e20200092.
- Wu, C.Y. and S.K. Chen. 1983. A study of the genus *Gynostemma* Bl. (Cucurbitaceae) from China. *Journal of Systematics and Evolution*. 21(4): 355–369.
- Wurdack, K.J., P. Hoffmann and M.W. Chase. 2005. Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid *RBCL* and *TRNL-F* DNA sequences. *American Journal of Botany*. 92(8): 1397-1420.
- Zhang, X., T. Zhou, N.Z. Kanwai, Y.M. Zhao, G.Q. Bai and G.F. Zhao. 2017. Completion of eight *Gynostemma* Bl. (Cucurbitaceae) chloroplast genomes: Characterization, comparative analysis, and phylogenetic relationships. *Frontiers in Plant Science*. 8: 1583.
- Zhang, X., H. Su, J. Yang, L. Feng, Z. Li and G. Zhao. 2019. Population genetic structure, migration, and polyploidy origin of a medicinal species *Gynostemma pentaphyllum* (Cucurbitaceae). *Ecology and Evolution*. 9(19): 11145–11170.
- Zhao, Y.M., Y. Zhao, Z.H. Li and G.F. Zhao. 2015. Characterization of global transcriptome using illumina paired-end sequencing and development of EST-SSR markers in two species of *Gynostemma* (Cucurbitaceae). *Molecules*. 20(12): 21214–21231.