ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae ในประเทศไทย

Genetic Diversity and Relationship of Subfamily Acanthoideae in Thailand

เจติยา ด่านธนวานิช[1]*, **สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม**[1], **อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม**[1] **และ วินัย สมประสงค์**[2]
Chetiya Danthanawanit[1]*, Supattra Poeaim[1], Anurug Poeaim[1] and Winai Somprasong[2]
[1]*สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520;*
[2]*กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900*
[1]*Department of Biology, Faculty of science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520;* [2]*Plant Variety Protection Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900*
**Corresponding author: miharuka_rainbow@hotmail.com*

บทคัดย่อ

ศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae จำนวน 52 ตัวอย่าง ร่วมกับ outgroup 3 ตัวอย่าง โดยเทคนิค PCR ในตำแหน่ง *trn*L-*trn*F ของคลอ-โรพลาสต์ดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ C/D หรือ C/F พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส และ 550 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 5 สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างพืชได้เป็น 2 เผ่า ได้แก่ เผ่า Ruellieae และเผ่า Acantheae โดยเผ่า Ruellieae จำแนกเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ เผ่าย่อยขาไก่ (Justiciinae) เผ่าย่อยต้อยติ่ง (Ruelliinae) เผ่าย่อยฟ้าทะลาย (Andrographinae) และเผ่าย่อยอังกาบ (Barleriinae)

ABSTRACT

The genetic diversity and relationship of subfamily Acanthoideae in Thailand was carried out. PCR technique was amplified sequence data from the intron and spacer of the *trn*L-*trn*F chloroplast DNA by primer C/D or C/F from 52 samples of Acanthoideae and 3 samples of outgroup. The size of amplified products is approximately 550 base pairs (C/D primer) and 900 base pairs (C/F primer). A phylogenetic analysis using neighbour-joining method was conducted in MEGA 5. The tree was divided the samples into 2 tribes; Ruellieae and Acantheae. Ruellieae was divided into 4 sub-group; Justiciinae, Ruelliinae, Andrographinae and Barleriinae.

คำสำคัญ: เทคนิค PCR, คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ, วงศ์ย่อย Acanthoideae
Keywords: PCR technique, chloroplast DNA, Acanthoideae

บทนำ

พืชวงศ์ย่อย Acanthoideae จัดอยู่ในวงศ์ Acanthaceae โดย Scotland และ Vollesen (2000) ได้จำแนกพืชวงศ์นี้เป็น 3 วงศ์ย่อย ได้แก่ Nelsonoideae, Thunbergioideae และ Acanthoideae และยังจำแนกวงศ์ย่อย Acanthoideae เป็น 2 เผ่า คือ Acantheae และ Ruellieae โดยเผ่า Ruellieae จำแนกเป็น 4 เผ่าย่อย คือ เผ่าย่อยต้อยติ่ง (Ruelliinae) เผ่าย่อยขาไก่ (Justiciinae) เผ่าย่อยอังกาบ (Barleriinae) และเผ่าย่อยฟ้าทะลาย (Andrographinae) ลักษณะทั่วไปของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae เป็นไม้พุ่ม ลำต้นมีหนามและไม่มีหนาม ใบมีรูปรีค่อนข้างยาว โคนและปลายใบเรียวแหลม พบดอกออกเป็นกระจุกหรือดอกเดี่ยว ดอกมีหลายสี เช่น ดอกสีม่วง สีม่วงอมชมพู สีเหลือง สีขาว และสีขาวแถบม่วง เป็นต้น พบมากตามป่าร้อนชื้น ป่าไผ่ และป่าดงดิบ ปัจจุบันในประเทศไทยพบประมาณ 40 สกุล 230 สปีชีส์ (Hansen, 1985) พืชวงศ์ย่อยนี้ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในทางการแพทย์ จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae ที่พบในประเทศไทย

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชมากขึ้น เนื่องจากข้อมูลที่ได้มีความถูกต้อง แม่นยำ และสามารถระบุชนิดหรือสายพันธุ์ของพืชได้อย่างชัดเจน มากกว่าการใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว เช่นการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์สามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ของพืชสกุล *Justicia* ได้ (Meister และคณะ, 2005) งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายและหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae ที่พบในประเทศไทย โดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR: Polymerase chain reaction)

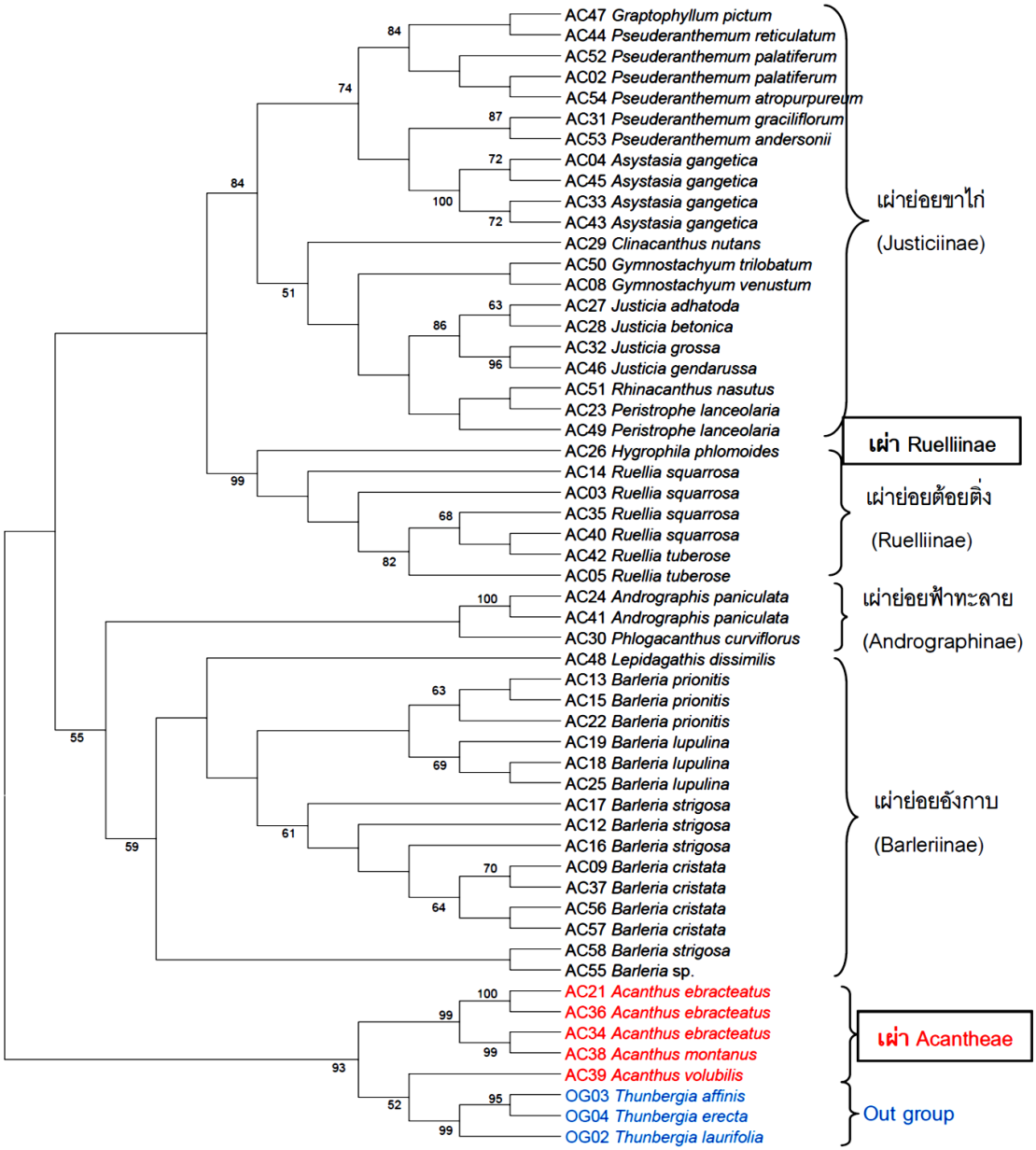
อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บตัวอย่างใบพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae จากสถานที่ต่างๆ และได้รับการจำแนกและระบุสปีชีส์จากคุณวินัย สมประสงค์ หัวหน้ากลุ่มวิจัยเพื่อการคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร และสกุล *Thunbergia* จำนวน 3 ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็น outgroup นำมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนใบของพืชด้วยวิธี CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ C (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3')/ D (5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3') หรือ F (5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3') (Taberlet et al., 1991) โดยกำหนดให้ pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ^{O}C เป็นเวลา 2 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ^{O}C เป็นเวลา 1 นาที, annealing ที่อุณหภูมิ 56 ^{O}C เป็นเวลา 2 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 ^{O}C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 35 รอบ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 ^{O}C เป็นเวลา 5 นาที ทำการตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส หลังจากนั้นทำการ purification และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบ (alignment) ด้วยโปรแกรม Bioedit และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining โดยโปรแกรม MEGA 5 (Tamura et al., 2011) ทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ

ผลการทดลองและวิจารณ์

เก็บตัวอย่างใบพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae จำนวน 52 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 15 สกุล ได้แก่ สกุล *Graptophyllum*, *Pseuderanthemum*, *Asystasia*, *Clinacanthus*, *Gymnostachyum*, *Rhinacanthus*, *Justicia, Hygrophila*, *Ruellia*, *Andrographis*, *Peristrophe*, *Phlogacanthus*, *Lepidagathis*, *Barleria*, และ *Acanthus* เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ C/D หรือ C/F พบว่ามีเพียง 2 สกุลเท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยไพรเมอร์ C/D คือ สกุล *Barleria* และ *Ruellia* โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 550 และ 500 คู่เบส ตามลำดับ สำหรับสกุลอื่นๆ รวมทั้ง outgroup สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ C/F โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining โดยโปรแกรม MEGA 5 จากแผนภูมิ (รูปที่ 1) สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างพืชได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (เผ่า) และในเผ่าขนาดใหญ่นั้นแบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย (เผ่าย่อย) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Scotland และ Vollesen (2000) ที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะของใบ ซิสโทลิท ดอก การออกดอก และกลีบเลี้ยง สามารถจำแนกวงศ์ย่อย Acanthoideae ออกเป็น 2 เผ่า คือ เผ่า Acantheae และเผ่า Ruellieae โดยเผ่า Ruellieae นั้นจำแนกเป็น 4 เผ่าย่อย คือ เผ่าย่อยต้อยติ่ง (Ruelliinae) เผ่าย่อยขาไก่ (Justiciinae) เผ่าย่อยอังกาบ (Barleriinae) และเผ่าย่อยฟ้าทะลาย (Andrographinae) โดยเผ่าย่อยอังกาบแสดงความใกล้ชิดกับเผ่าย่อยฟ้าทะลาย และเผ่าย่อยต้อยติ่งแสดงความใกล้ชิดกับเผ่าย่อยขาไก่ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ Mcdade และ Moody (1999) ที่ศึกษาในระดับโมเลกุลในตำแหน่งนี้เช่นกัน สามารถแบ่งพืชวงศ์ Acanthaceae เป็น 4 lineages คือ Acanthus, Barleria, Ruellia และ Justicia โดย Ruellia แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ Justicia lineages แต่ไม่ได้กล่าวถึง Andrographis



รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae

เมื่อพิจารณาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าเผ่า Acantheae มีเฉพาะสกุล *Acanthus* แต่สำหรับเผ่า Ruellieae แบ่งเป็น 4 เผ่าย่อย มีจำนวน 14 สกุล โดยเผ่าย่อยขาไก่ (Justiciinae) แสดงความหลากหลายมากที่สุดคือ 8 สกุล เช่นเดียวกับ Mcdade และ Moody (1999) ที่พบว่าเฉพาะ Justicia lineages สามารถแบ่งเป็น sublineages และเผ่าย่อยต้อยติ่ง (Ruelliinae) มีพืชอีกสปีชีส์หนึ่งคือ ชำชำ (*Hygrophila phlomoides*) ที่น่าสนใจและศึกษาเพิ่มเติมเนื่องจากเป็นสกุลไม้น้ำ รวมทั้งในเผ่าย่อยอังกาบ (Barleriinae) ที่ตัวอย่าง AC50 ยังไม่สามารถจำแนกได้ในระดับสปีชีส์ และตัวอย่าง AC58 *Barleria strigosa* ที่แยกจากกลุ่มของ *B. strigosa* หรือสังกรณี ซึ่งอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae จำนวน 52 ตัวอย่าง ร่วมกับสกุล *Thunbergia* จำนวน 3 ตัวอย่าง เพื่อใช้เป็น outgroup เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ *trn*L- *trn*F ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถจำแนกความหลากหลายของพืชได้ในระดับสกุล โดยสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างของพืชวงศ์ย่อย Acanthoideae ออกเป็น 2 เผ่า คือ เผ่า Acantheae ที่มีเฉพาะสกุล *Acanthus* และเผ่า Ruellieae ที่จำแนกเป็น 4 เผ่าย่อย คือ เผ่าย่อยต้อยติ่ง (Ruelliinae) เผ่าย่อยขาไก่ (Justiciinae) เผ่าย่อยอังกาบ (Barleriinae) และเผ่าย่อยฟ้าทะลาย (Andrographinae) ซึ่งมีจำนวน 14 สกุล แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาในจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้น และหลายตำแหน่งหรือหลายเทคนิค เพื่อให้ข้อมูลความหลากหลายมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง งบประมาณประจำปี 2556 และขอขอบคุณพิพิธภัณฑ์พืชสิริธร กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างบางส่วน

เอกสารอ้างอิง

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 1987; 19: 11-15.

Hansen, B. Studies on the Acanthaceae of Thailand. Fl. Malesiana Bulletin 1985; 38: 173-178.

Meister, J., Hubaishan, M.A., Kilian, N. and Oberprieler, C. Chloroplast DNA variation in the shrub *Justicia areysiana* (Acanthaceae) endemic to the monsoon affected coastal mountains of the southern Arabian Peninsula. Plant Systematics and Evolution 2005; 262: 153-171.

Mcdade, L.A. and Moody, M.L. Phylogenetic relationships among Acanthaceae: evidence from noncoding *trn*L-*trn*F chloroplast DNA sequences. American Journal of Botany 1999; 86: 70-80.

Scotland, R.W. and Vollesen, K. Classification of Acanthaceae. Kew Bulletin 2000; 55: 513-589.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology 1991; 17: 1105-1109.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 2011; 28: 2731-2739.