

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุล *Barleria* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnL-trnF*

Phylogenetic Relationships in The Genus *Barleria* Inferred from The *trnL-trnF* Sequences Region

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม^{1*}, วิภารัตน์ ศิริพงษ์¹, ชัยวัฒน์ ฤทธิเดชากุล¹, ดวงทิพย์ อภิรัตน์มนตรี¹ และ วินัย สมประสงค์²

Supattra Poeaim^{1*}, Wiparat Siripong¹, Chaiwat Rittidechakul¹ Duangthip Apiratmontree¹ and Winai Somprasong²

¹สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520;

²กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Biology, Faculty of science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520; ²Plant Variety Protection Division, Department of Agriculture, Bangkok 10900

*Corresponding author: poeaim@hotmail.com

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 16 ตัวอย่าง และพืชนอกสกุล *Barleria* จำนวน 2 ตัวอย่าง คือทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส บริเวณ *trnL-trnF* ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ พบชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 930-967 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 7 กลุ่ม ที่แยกตามชนิดได้อย่างชัดเจน ยกเว้นระงับพิษ (*B. siamensis*) ที่แสดงความใกล้เคียงกับทองพันชั่ง (*R. nasutus*) รวมทั้งหญ้าหัวนา (*B. strigosa* var. *polytricha*) ที่แยกออกไปจากชนิดอื่นอย่างชัดเจน จึงควรมีการทบทวนเรื่องการจัดจำแนกของพืชชนิดนี้ต่อไป

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the phylogenetic relationships of *Barleria* sp. For molecular characteristic, the *trnL-trnF* region sequences of chloroplast DNA were amplified from 16 samples of *Barleria* sp. and 2 samples (*Rhinacanthus nasutus* and *Andrographis paniculata*) for outgroup. The size of amplified products is 930-967 base pairs. Phylogenetic tree analysis of those sequences can be generated into 7 main groups that can divide each species of *Barleria*. Nevertheless, Ra ngap phit (*B. siamensis*) was separated into group 7 which containing *R. nasutus*. Furthermore, Ya hua nak (*B. strigosa* var. *polytricha*) is clearly separated from other species. For this reason, species revision should be planned.

คำสำคัญ: พืชสกุล *Barleria*, สังกรณี, หญ้าหัวนา, บริเวณ *trnL-trnF*

Keywords: *Barleria* sp., Sang korani (*Barleria strigosa*), Ya hua nak (*Barleria strigosa* var. *polytricha*), *trnL-trnF* region

บทนำ

ในปัจจุบันประเทศไทยให้ความสำคัญกับตัวยาที่เป็นพืชสมุนไพร เพราะมีผลข้างเคียงน้อยกว่าตัวยาที่ทำจากสารเคมี พืชวงศ์ Acanthaceae เช่น ฟ้ายะลวยโจร เสดดพังพอนตัวผู้ และสังกรณี เป็นต้น นิยมนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพร สกุล *Barleria* อยู่ในวงศ์ Acanthaceae เช่นกัน ในประเทศไทยพบพืชสกุลนี้บริเวณพื้นที่แห้งแล้ง รกร้าง ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าดิบแล้ง ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ จากการประชุมสัมมนาพิพิธภัณฑสถานแห่งชาติกับการพัฒนาการเกษตร และสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย ประจำปี 2552 เรื่องการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชของกรมวิชาการเกษตร และสถานการณ์การอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ทรัพยากรพันธุกรรมพืชในประเทศไทย แสดงให้เห็นว่าพืชสกุล *Barleria* มีอย่างน้อย 8 ชนิด คือ อังกาบเขา (*B. biloba*), อังกาบ (*B. cristata*), เท้าถาษี (*B. longiflora*), สังกรณี (*B. strigosa*), *B. polytricha*, เสดดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*), ระวังพิษ (*B. siamensis*) และอังกาบหนู (*B. prionitis*) โดยที่ชื่ออังกาบเขา และระวังพิษเป็นแหล่งพรรณไม้ในประเทศไทย ซึ่งการศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเฉพาะสีดอก และการออกดอกยากต่อการบ่งชี้ และระบุชื่อที่แน่นอน รวมทั้งบางชนิดมีลักษณะใบใกล้เคียงกับสมุนไพรอื่น เช่น อังกาบ (*B. cristata*) มีลักษณะใบเหมือนกับทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) อีกทั้งปัญหาของชื่อพ้อง (homonym) และชื่อท้องถิ่น จึงควรมีการระบุสายพันธุ์ ศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลของพืชในสกุล *Barleria* ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการอนุรักษ์พันธุกรรม ตลอดจนศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Barleria* ในประเทศไทย

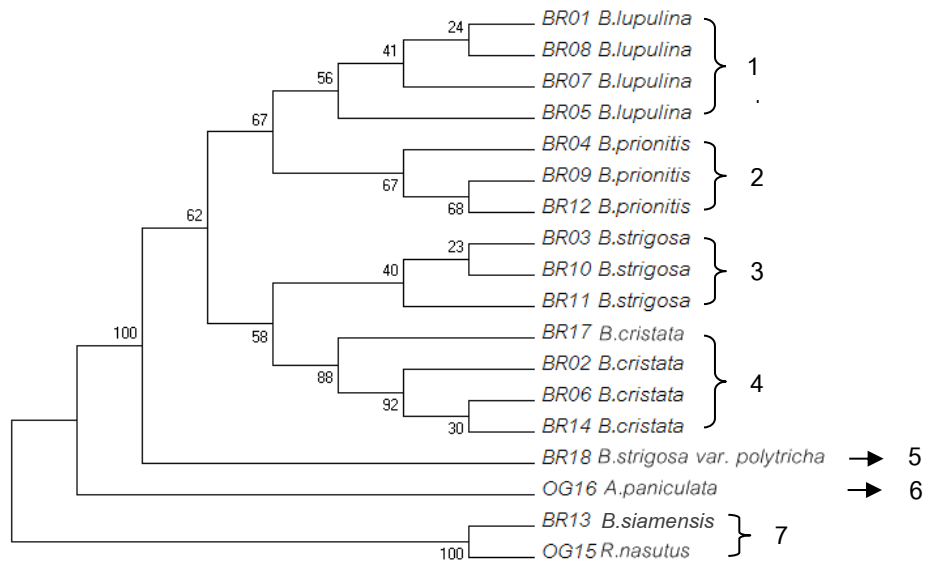
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ในพืชชนิดศึกษาในบริเวณ *trnL*(UAA) 5'exon และ *trnL*(UAA) 3'exon ของคลอโรพลาสต์ ด้วยคู่ไพรเมอร์ C และ D แต่พบข้อจำกัดในการศึกษา เนื่องจากมีขึ้นดีเอ็นเอขนาดสั้นและเป็นส่วนเฉพาะ intron ของ *trnL* จึงนิยมบริเวณ *trnL*(UAA)-*trnF*(GAA) ซึ่งมีขนาดขึ้นดีเอ็นเอที่ยาวขึ้น และประกอบด้วย intron ของ *trnL* และ intergenic spacer (IGS) ระหว่าง 3'exon *trnL* และ *trnF* exon

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บตัวอย่างพืชในสกุล *Barleria* จากทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยได้รับการจำแนกและระบุชนิดจากคุณวินัย สมประสงค์ หัวหน้ากลุ่มวิจัยเพื่อการคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนใบของพืชด้วยวิธี CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1990) วัดคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) บริเวณตำแหน่ง *trnL-trnF* ของคลอโรพลาสต์ โดยการใช้ไพรเมอร์ C และ F ตามวิธีของ Taberlet *et al.* (1991) ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X PCR buffer, dNTP 0.2 mM, *Taq* DNA polymerase 1 Unit, primer 0.8 mM และดีเอ็นเอต้นแบบ 6 ng/μl โดยใช้สภาวะ ดังนี้ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 2 นาที ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 2 นาที และอุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำในขั้นที่ 2 จำนวน 35 รอบ ขั้นต่อนสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ทำผลิตภัณฑ์ที่ีอาร์ให้บริสุทธิ์ ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบ (alignment) ด้วยโปรแกรม Bioedit และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining จากโปรแกรม MEGA 5 โดยสุ่มค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 (Tamura *et al.*, 2011)

ผลการทดลองและวิจารณ์

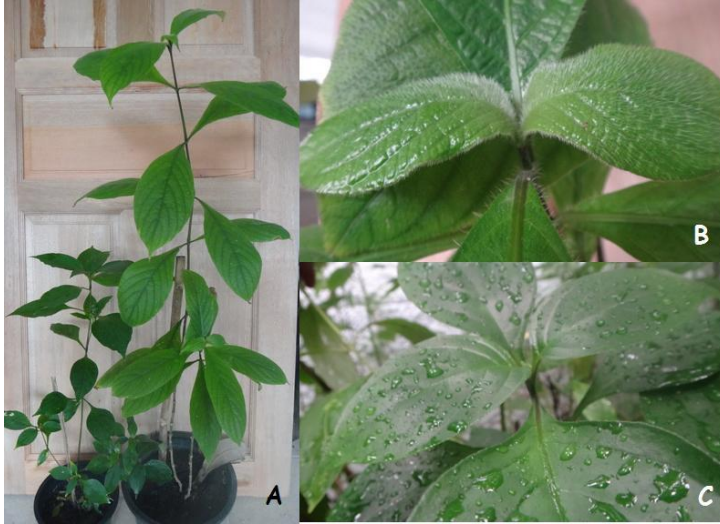
ตัวอย่างพืชในสกุล *Barleria* ที่นำมาศึกษาสามารถแบ่งออกเป็น 5 ชนิด คืออังกาบ (*B. cristata*) อังกาบหนู (*B. prionitis*) เสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*) สังกกรณี (*B. strigosa*) และระงับพิษ (*B. siamensis*) แสดงจำนวนของตัวอย่างตามรูปที่ 1 นอกจากนี้ยังนำทองพันชั่ง (*R. nasutus*) และฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) มาเป็น outgroup โดยทุกตัวอย่างสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ C/F ได้พบขึ้นดีเอ็นเอมีขนาด 930-967 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining จากแผนภูมิในรูปที่ 1 สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างพืชได้เป็น 7 กลุ่ม ตามชนิดของพืช โดยเสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*: กลุ่ม 1) แสดงความใกล้ชิดกับอังกาบหนู (*B. prionitis*: กลุ่มที่ 2) และสังกรณี (*B. strigosa*: กลุ่ม 3) แสดงความใกล้ชิดกับอังกาบ (*B. cristata*: กลุ่ม 4) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบว่าอังกาบหนูและเสลดพังพอนตัวผู้เป็นพืชที่มีหนาม กลุ่มที่ 5 และ 6 มีเพียงหญ้า ห้วนาค (*B. strigosa* var. *polytricha*) และฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) ตามลำดับ และกลุ่มที่ 7 แสดงความใกล้ชิดกันระหว่างระงับพิษ (*B. siamensis*) กับทองพันชั่ง (*R. nasutus*) ซึ่งเป็น outgroup มากกว่าพืชในสกุล *Barleria*



รูปที่ 1 เคนโตรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในสกุล *Barleria* ด้วยวิธี neighbor-joining จากโปรแกรม MEGA 5 โดยสุ่มค่า bootstrap เท่ากับ 1,000

จากการศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ intron ของ *trnL* และ intergenic spacer (IGS) ระหว่าง 3'exon *trnL* และ *trnF* exon ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ พบว่าหญ้าห้วนาคแสดงความสัมพันธ์กับสังกรณีในระดับต่ำ แม้ว่าเป็นพืชชนิดเดียวกัน ซึ่งสังกรณี (*B. strigosa*) เป็นไม้พุ่ม สูง 0.3-1 เมตร แตกกอเป็นพุ่มขนาดเล็ก ใบของสังกรณีมีโคนใบสอบเรียว ก้านใบยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ขนสั้นหยาบประปราย ใบรูปไข่กว้าง ปลายใบเรียวแหลม ดอกเป็นช่อแบบช่อดรูป ดอกเป็นกระจุกแน่น เรียงข้างเดียว หันไปทางปลายกิ่ง ในแนวระนาบกับลำต้น ใบประดับ 2 อัน รูปไข่ปลายแหลม ใบประดับขนาดเล็กเรียง 2 แถวซ้อนกัน ด้านล่างของแกนช่อดอก มีขนาด 1-1.5X2-2.7 เซนติเมตร ดอกสีม่วง หรือม่วงอ่อน โคนเชื่อมเป็นหลอดวงกลีบรูปแตร ปลายแยก 5 หยัก การเรียงกลีบแบบหยักวงกลีบขนาดเล็ก 2 หยัก ช่อดอกใหญ่ 3 หยัก พบขนต่อมจำนวนมากตลอดหลอดวงกลีบ เกสรเพศผู้สืบพันธุ์ได้ 2 เกสร ขนาดยาวกว่าเกสรเพศผู้เป็นหมัน 2 เกสร เกสรเพศเมีย 1 เกสร มีรังไข่และก้านชูเกสรเพศเมียเกลี้ยง ผลเป็นผลแห้งแตก ยาวประมาณ 1.8-2 เซนติเมตร เกลี้ยง สีดำเป็นมัน มี 4 เมล็ด เรียงไปทางขั้วผล ซึ่งต่างจากหญ้าห้วนาค (*B. strigosa* var. *polytricha*) ที่เป็นไม้พุ่ม สูง 1-3 เมตร ไม่แตกกอ โคนใบรูปลิ้ม ก้านใบยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ขนสั้นหยาบหนาแน่น ใบรูปไข่แคบ โคนใบรูปลิ้ม ปลายใบแหลม ดอกมีลักษณะคล้ายกับสังกรณี ยกเว้นพบขนสั้น

หนาแน่นบริเวณใบและใบประดับ ดังนั้นแม้ว่ามีการตั้งชื่อซ้ำชนิดกัน แต่โครงสร้างภายนอกของสังกรณี (*B. strigosa* Willd.) พบมีความแตกต่างจากหญ้าห้วนาค (*B. strigosa* var. *polytricha* (Wall.) R. Ben. อย่างชัดเจนทั้งความสูง (รูปที่ 2 A) รูปร่างใบ ความหนาแน่นของขนที่บริเวณใบ (รูปที่ 2 A และ B) และดอก กลีบประดับมีปลายเรียวแหลม สอดคล้องกันกับการศึกษาของ Imlay (1938) อย่างไรก็ตามในการเรียกชื่อท้องถิ่นของพืชมีหลากหลาย เช่น สังกรณี กำแพงใหญ่ ขี้ไพนกุ่ม เทิงดี หญ้าหงอนไก่ และหญ้าห้วนาค เป็นต้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาข้อมูลด้านโมเลกุลเพิ่มเติม และทบทวนเรื่องการจัดจำแนกของพืชชนิดนี้ต่อไป



รูปที่ 2 เปรียบเทียบลักษณะของสังกรณีและหญ้าห้วนาค (A) ความสูงของสังกรณี (ซ้าย) และหญ้าห้วนาค (ขวา) (B) ใบมีขนสั้นหนาแน่นของหญ้าห้วนาค และ (C) ใบมีขนสั้นปริมาณเล็กน้อยของสังกรณี

สรุปผลการทดลอง

ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 16 ตัวอย่าง และนอกสกุล *Barleria* จำนวน 2 ตัวอย่าง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnL-trnF* ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ สามารถแบ่งพืชสกุล *Barleria* ออกได้ตามชนิด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าหญ้าห้วนาค (*B. strigosa* var. *polytricha*) ที่จัดให้อยู่ในพืชชนิดเดียวกันกับสังกรณี (*B. strigosa*) แสดงความสัมพันธ์กันในระดับต่ำ จึงควรมีการศึกษาข้อมูลด้วยเทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ หรือศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอื่นเพิ่มเติม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังงบประมาณประจำปี 2555 และขอขอบคุณพิพิธภัณฑสถานพืชสิรินธร กองคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างบางส่วน

เอกสารอ้างอิง

- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 1990; 12: 13-15.
- Imlay, J.B. The taxonomy of the Siamese Acanthaceae. Ph.D. Thesis. University of Aberdeen, Scotland. UK. 499 p. 1938.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. Universal primers for amplification of three noncoding 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.