ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาสกุล *Camellia* จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *Chalcone synthase*

DNA Fingerprinting of The Genus *Camellia* Based on Partial Sequences of *Chalcone synthase*

จิตรอนงค์ คำรศ และ ชูตา บุญภักดี*

Jitanong Khamros and Chuta Boonphakdee*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131

**Corresponding author: chuta@buu.ac.th*

บทคัดย่อ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาสกุล *Camellia* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *Chalcone synthase* (*ChS*) จำนวน 64 ข้อมูลที่บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ณ เดือนมีนาคม พ.ศ. 2555 ขนาด 768 คู่เบส ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) โดยตัดด้วยเอนไซม์ *Aci*I, *Bbv*I, *Hpa*II และ *Rsa*I ปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาแตกต่างกันจำนวน 8, 6, 7 และ 3 รูปแบบตามลำดับ และเมื่อพิจารณาเอนไซม์ตัดร่วมกันทั้ง 4 ชนิด ปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต่างกันจำนวน 27 รูปแบบ สามารถจำแนกชาที่ปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย ได้แก่ ชาจีน (*C. sinensis*) ชาอัสสัม (*C. sinensis* var. *assamica*) และชาน้ำมัน (*C. oliefera*) ออกจากกันได้

ABSTRACT

DNA fingerprint of the tea plant genus *Camellia* based on *Chalcone synthase* (*ChS*) sequences, was investigated. The partial 768-bp *ChS* gene sequences that could be achieved by PCR (Polymerase Chain Reaction) were retrieved from GenBank (as of March, 2012). Sixty-four data were then analized by RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Eight, 6, 7 and 3 different DNA profiles were detected after digestion of the *ChS* gene with *Aci*I, *Bbv*I, *Hpa*II and *Rsa*I, respectively. Later, 27 characteristic RFLP patterns were identified for all 64 samples using these composite digestive enzymic profiles. Of these, the restriction endonuclease patterns are able to differentiate between *C. sinensis, C. sinensis* var. *assamica* and *C. Oliefera*; the typical varieties of tea that planted extensively throughout the North of Thailand.

คำสำคัญ: ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, *Camellia*, *ChS*, *Chalcone synthase*, RFLP

Keywords: DNA fingerprint, *Camellia*, *ChS*, *Chalcone synthase*, RFLP

บทนำ

ชาสกุล *Camellia* เป็นชาที่มีความหลากหลายของชนิด พบประมาณ 120 ชนิด กระจายอยู่ในประเทศแถบทวีปเอเชีย ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น ภูฏาน จีน อินเดีย และไทย เป็นต้น โดยพบมากที่สุดในประเทศจีนประมาณ 97 ชนิด (Shu, 2007) ผลผลิตชาทั่วโลกในปี พ.ศ. 2555 มีประมาณ 3.8 ล้านตัน สำหรับประเทศไทยมีการผลิตชาร้อยละ 0.2 ของปริมาณการผลิตชาทั้งหมดในตลาดโลก ในปี พ.ศ. 2555 มีผลผลิตใบชาสดรวม 40,847 ตัน โดยจังหวัดเชียงรายมีการเพาะปลูกและได้ผลผลิตมากที่สุด (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) และในปัจจุบันการบริโภคชาเพื่อสุขภาพกำลังได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นสาเหตุประการหนึ่งมาจากสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิในใบชา คือคาเทชิน ซึ่งมีมากที่สุดในใบอ่อน มีสรรพคุณทางยาโดยเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านมะเร็ง และสารต้านความดันโลหิตสูง (Adrian and Bolwell, 2000) เป็นต้น ดังนั้นจึงมีผลิตภัณฑ์ชา เช่น ชาห่อ ชาผง ชาผสมสมุนไพร หลากชนิดวางขายในท้องตลาด ซึ่งการตรวจสอบการระบุชนิดของชาตามที่ปรากฏบนฉลากสินค้าโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างเดียวย่อมเป็นไปได้ยาก

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวโมเลกุลถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการดังกล่าวในผลิตภัณฑ์จากสัตว์และพืชหลายชนิด เทคนิคที่นิยมใช้ เช่น PCR (Polymerase Chain Reaction) สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากที่มีปริมาณน้อยและจากเนื้อเยื่อที่เสียสภาพได้ ซึ่งข้อความพันธุกรรมบางบริเวณสามารถนำไปใช้บ่งชี้ชนิดสิ่งมีชีวิตและผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปได้อย่างจำเพาะ ปัจจุบันมีข้อมูลพันธุกรรมของพืชที่ศึกษาและบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank จำนวนมาก ดังนั้นการพิจารณาใช้ประโยชน์จากชีวสารสนเทศศาสตร์จัดการข้อมูลก่อนปฏิบัติการทดลองจริง โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *Chalcone synthase* (*ChS*) ที่มีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์ phenylpropanoids และกระบวนการป้องกันการถูกทำลายโดยรังสีอัลตราไวโอเลตจากแสงอาทิตย์ของชาสกุล *Camellia* ที่มีการบันทึกไว้มาจำลองเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอเอกลักษณ์ในระดับชนิดหรือสายพันธุ์ของชา และเน้นชนิดที่มีการปลูกอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย ได้แก่ ชาอัสสัม (*Camellia sinensis* var. *assamica*) ชาจีน (*C. sinensis*) และชาน้ำมัน (*C. oleifera*) โดยหาความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน *ChS* เลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอย่อยด้วยเทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ที่สามารถตรวจสอบได้บนเจลอะกาโรส ทำให้ลดความผิดพลาด และลดค่าใช้จ่ายสำหรับการปฏิบัติในห้องปฏิบัติการในลำดับขั้นต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

นำข้อมูลลำดับเบสบริเวณยีน *ChS* จากฐานข้อมูล GenBank ของชาสกุล *Camellia* จำนวน 64 ข้อมูล ณ เดือน มีนาคม พ.ศ. 2555 รวมชนิดที่พบว่าปลูกอยู่ในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย คือ ชาจีน *C. sinensis* (GenBank accession no. D26594) ชาอัสสัม *C. sinensis* var. *assamica* (GU722449) และชาน้ำมัน *C. oleifera* (GU722488) กำหนดบริเวณยีนที่ศึกษาที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิค PCR จากคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบในส่วนของแอกซอนที่ 2 (GenBank Accession no. D26594; Kaundun and Matsumoto, 2003) และทดสอบนำร่องในห้องปฏิบัติการได้ผลผลิตขนาด 768 คู่เบส โดยนำข้อมูลบริเวณที่กำหนดมาเทียบเคียงความเหมือนด้วยโปรแกรม ClustalX version 2.0.11 วิเคราะห์และเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดแตกต่างกันของชาแต่ละตัวอย่าง และศึกษาความสัมพันธ์โดยนำข้อมูลมาทำ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 5.1 สร้างด้วยวิธี Maximum Likelihood โมเดล Kimura-2-parameter โดยสับเปลี่ยนข้อมูล (bootstrap) 1,000 ครั้ง

ผลการทดลองและวิจารณ์

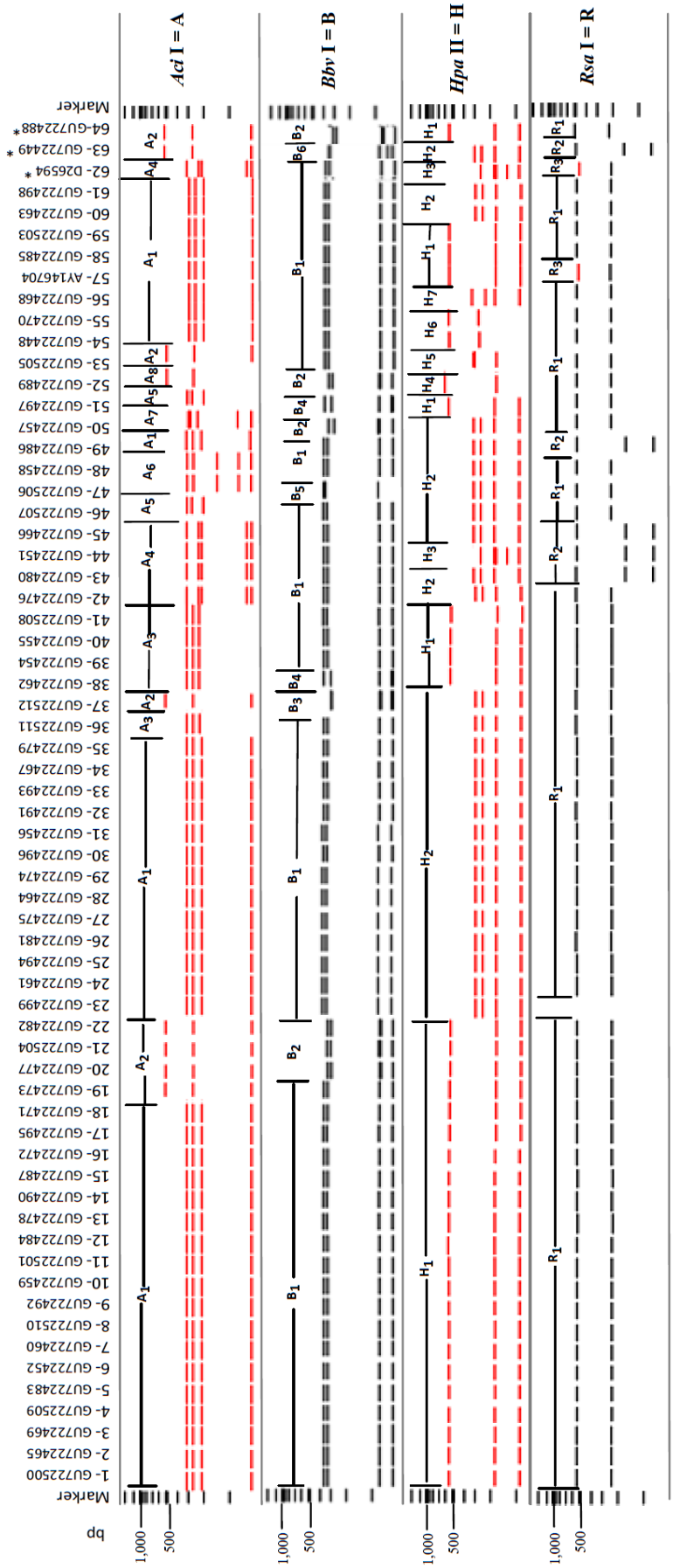
เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชาบริเวณยีน *ChS* ที่ศึกษามาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Aci*I, *Bbv*I, *Hpa*II และ *Rsa*I ปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้งหมด 8, 6, 7 และ 3 รูปแบบตามลำดับ (รูปที่ 1; *Aci*I= A_{1-8}; *Bbv*I= B_{1-6}; *Hpa*II= H_{1-7} และ *Rsa*I=R_{1-3} ตามลำดับ) ถ้าพิจารณาเฉพาะชาที่ปลูกในภาคเหนือของประเทศไทยจะพบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอเมื่อตัดด้วย *Aci*I สามารถระบุเอกลักษณ์ของชาจีน (62-D26594) เป็นรูปแบบ A_4 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอย่อยขนาด 13, 35, 211, 229, 313 คู่เบส แต่ไม่สามารถแยกชาอัสสัม (63-GU722449) และชาน้ำมัน (64-GU722488) ออกจากกันได้ เมื่อใช้เอนไซม์ *Bbv*I พบว่าจัดกลุ่มชาได้ทั้งหมด 6 กลุ่ม และแยกชาอัสสัมและชาน้ำมันออกจากกัน คือ รูปแบบ B_6 และ B_2 ชิ้นดีเอ็นเอย่อยมีขนาด 22, 44, 301, 333 และ 22, 69, 76, 301, 333 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อพิจารณาใช้เอนไซม์ *Hpa*II จะสามารถแยกชาออกเป็น 7 กลุ่ม (H_1- H_7) แยกความแตกต่างของชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันออกจากกัน กล่าวคือ ปรากฏรูปแบบ H_3 (84, 177, 245, 295), H_2 (84, 126, 169, 177, 245) และ H_1 (84, 177, 540) ตามลำดับ เช่นเดียวกับเอนไซม์ *Rsa*I ที่สามารถแยกชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันออกจากกันได้เช่นกัน ปรากฏรูปแบบ R_3 (242, 522), R_2 (69, 173, 559) และ R_1 (242, 559) ตามลำดับ

แต่ทั้งนี้การใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวตัดในส่วนของยีน *ChS* นั้นไม่สามารถแยกชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันออกจากชาชนิดอื่นได้ เช่น *Hpa*II แยกชาจีนออกจากชาอัสสัมและชาน้ำมัน (H_3) ซึ่งเป็นรูปแบบเดียวกับของชา *C. atrothea* (44-GU722451) แต่ถ้าพิจารณารูปแบบที่เกิดจากเอนไซม์ทั้งสี่ชนิดจะพบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 27 รูปแบบ จำแนกชาได้ 18 ชนิด และ 4 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน รวมถึงสามารถจำแนกชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันได้ ($A_4B_1H_3R_3$, $A_2B_6H_2R_2$, $A_2B_2H_1R_1$ ตามลำดับ) สอดคล้องกับการศึกษาของ Matsumoto *et al*. (2002) ใช้เทคนิค PCR-RFLP จำแนกชาเขียวญี่ปุ่น (*yama-cha*; *C. sinensis*) โดยศึกษาในส่วนของยีน *PAL* (Phenylalanine ammonia-lyase) ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Eco*RV สามารถจำแนกชาเขียวญี่ปุ่นที่เป็นสายพันธุ์พื้นเมืองกับสายพันธุ์ลูกผสมออกจากกัน และจัดชาเขียวญี่ปุ่นไว้ต่างกลุ่มจากชาสายพันธุ์ที่มีแหล่งกำเนิดจากประเทศจีนด้วยแผนผัง Phylogenetic tree เช่นเดียวกับผลการศึกษาครั้งนี้ที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Phylogenetic tree พบว่าแยกชาน้ำมันออกจากชาอัสสัมและชาจีนอย่างชัดเจน และชาอัสสัมอยู่ต่างเคลดย่อยกับชาจีน (รูปที่ 2) สอดคล้องกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาจากเทคนิค PCR-RFLP ดังกล่าวมาข้างต้น

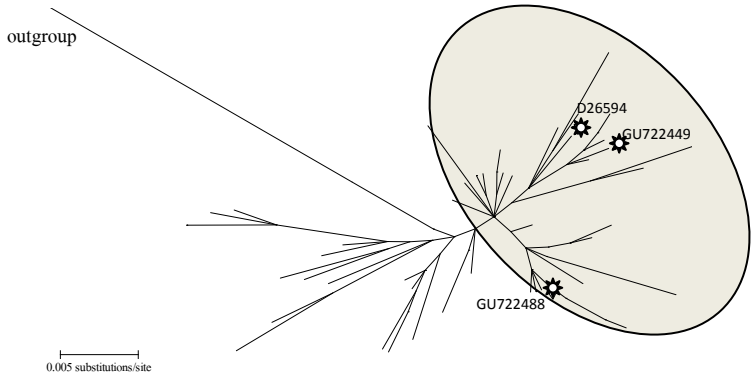
ผลการวิจัยด้วยเทคนิค PCR-RFLP บริเวณยีน *ChS* ครั้งนี้จะสามารถนำไปศึกษาต่อได้ในห้องปฏิบัติการที่วิเคราะห์ผลด้วยเจลอะกาโรส จะสามารถระบุชนิดหรือสายพันธุ์ของชาได้ ทำให้ย่นระยะเวลาและมีค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีการอ่านลำดับเบส (sequencing) ทั้งหมด

สรุปผลการทดลอง

สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาสกุล *Camellia* จากข้อมูลที่ปรากฏบนฐานข้อมูล GenBank โดยวิเคราะห์ในส่วนของยีน *ChS* ขนาด 768 คู่เบส ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Aci*I, *Bbv*I, *Hpa*II และ *Rsa*I ปรากฏลายพิมพ์ทั้งหมด 27 รูปแบบ ที่สามารถบ่งชี้ชนิดและสายพันธุ์ของชาได้โดยเฉพาะชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมัน ที่มีการปลูกอยู่ในภาคเหนือของประเทศไทย



รูปที่ 1 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของซาสกุล Camellia ในส่วนของยีน ChS ตัดด้วยเอนไซม์ Acil, Bbvl, Hpall และ Rsal บนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0 % เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder; * = ชนิดของชาที่ปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย; GU722488 = ชาน้ำมัน C. oleifera, GU722449 = ชาอัสสัม C. sinensis var. assamica และ D26594 = ชาจีน C. sinensis



รูปที่ 2 Phylogenetic tree ในส่วนของยีน *ChS* ของชาสกุล *Camellia* จำนวน 64 ข้อมูลบนฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) คือชา *Pyrenaria menglaensis* (GU722513) สร้างด้วยโปรแกรม MEGA 5.1 วิธี Maximum Likelihood โมเดล Kimura-2 parameter; ✡ = ชนิดของชาที่ปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย; GU722488 = ชาน้ำมัน *C. oleifera*, GU722449 = ชาอัสสัม *C. sinensis* var. *assamica* และ D26594 = ชาจีน *C. sinensis*

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการส่งเสริมครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) สนับสนุนทุนการศึกษาแก่ จิตรอนงค์ คำรศ และงบประมาณเงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา สนับสนุนทุนการนำเสนอผลงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

สำนักเศรษฐกิจการเกษตร. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2555. เอกสารสถิติการเกษตร. 2555. 167-168.

Adrian JP, Bolwell GP. Phenols in the plant and in man: the potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. J. Sci. Food. Agric. 2000;80:985-1012.

Kaundun SS, Matsumoto S. Development of CAPS markers based on three key genes of the phenylpropanoid pathway in Tea, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze, and differentiation between *assamica* and *sinensis* varieties. Theor Appl Genet. 2003; 106:375-383.

Matsumoto S, Kiriiwa Y, Takeda Y. Differentiation of Japanese green tea cultivars as revealed by RFLP analysis of phenylalanine ammonia-lyase DNA. Theor Appl Genet. 2002;104:998-1002.

Shu SC. *Camellia Linnaeus*. Flora of China. 2007;12:367-412.