

การวิเคราะห์ลำดับเบสยีน *ITS2* และ *psbA-trnH* ในผักหวานป่า

DNA sequence analysis of *ITS2* and *psbA-trnH* genes in *Melientha suavis* Pierre

บวร ตันติวรชัย^{1*} และ สายันต์ ตันพานิช¹

Borworn Tontiworachai^{1*} and Sayan Tanpanich¹

บทคัดย่อ: การศึกษาลำดับเบสยีน *ITS2* และ *psbA-trnH* ของผักหวานป่า (*Melientha suavis* Pierre) ที่มีลักษณะใบแตกต่างกันคือใบที่มีรูปร่างโค้งมนจากจังหวัดสระบุรีและใบที่มีลักษณะปลายแหลมจากจังหวัดสกลนคร เพื่อตรวจสอบชนิดและศึกษาประชากรผักหวานป่าจากความผันแปรทางพันธุกรรมในบริเวณยีนดังกล่าว โดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบผักหวานป่าเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR บริเวณยีน *ITS2* และ *psbA-trnH* ตรวจสอบ PCR product โดยวิธี electrophoresis และวิเคราะห์หาลำดับเบส ลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์กับฐานข้อมูล NCBI, Alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW และสร้าง Phylogenetic tree โดยวิธี Neighbor-joining ด้วยโปรแกรม MEGA4 จากผลการศึกษสรุปได้ว่าผักหวานป่าจากจังหวัดสระบุรีและสกลนครเป็นพืชชนิดเดียวกันแต่แบ่งกลุ่มออกเป็น 2 ประชากรตามลักษณะภูมิประเทศที่แยกจากกัน

คำสำคัญ: ผักหวานป่า, ลำดับเบส, *ITS2*, *psbA-trnH*

ABSTRACT: Study on sequence of gene *ITS2* and *psbA-trnH* in *Melientha suavis* Pierre. The leaves are from different source and different leaves shaped as curve leaves from Saraburi and sharp leaves from Sakon Nakhon. For determine the species and population study of genetic variation of *Melientha suavis* Pierre. DNA was extracted from *Melientha suavis* Pierre use as DNA template for PCR at *ITS2* and *psbA-trnH* gene. Check PCR product by electrophoresis and analyze DNA sequencing. Then the sequence was analyzed with the NCBI database. Alignment with ClustalW program and Phylogenetic tree constructed by Neighbor-joining method with the MEGA4 program. The result is *Melientha suavis* Pierre from Saraburi and Sakon Nakhon is same species. Divided into 2 groups according to the topography of different populations

Keyword: *Melientha suavis* Pierre, DNA sequence, *ITS2*, *psbA-trnH*

บทนำ

ผักหวานป่า (*Melientha suavis* Pierre) เป็นพืชพื้นเมืองที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศไทย มีคุณค่าทางโภชนาการเพราะมีสารแอนติออกซิแดนท์ วิตามิน และโปรตีน (Tianpech

et al., 2008) โดยแหล่งปลูกผักหวานป่าที่สำคัญคือจังหวัดสระบุรี แต่ว่าใบผักหวานป่าจากจังหวัดสระบุรีกับสกลนครมีลักษณะที่แตกต่างกันคือผักหวานป่าจากสระบุรีจะมีใบรูปร่างโค้งมน แต่ผักหวานป่าจากสกลนครจะมีใบรูปร่างเรียวยาวปลายแหลม จึงเป็นที่มาของงานวิจัยเพื่อตรวจสอบว่าผักหวานป่าจากทั้ง 2

¹ ฝ่ายเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย(วว.) ปทุมธานี
Agricultural Technology Department, Thailand Institute of Scientific and Technological Research(TISTR),
Pathum Thani

* Corresponding author: Borworn@tistr.or.th

แหล่งจัดเป็นชนิดเดียวกันหรือไม่ โดยงานวิจัยที่ผ่านมา มีการจำแนกชนิดของพืชต่างๆ โดยใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสจากยีนที่เหมาะสมดังงานวิจัยของ Kress et al. (2005) ทำการจำแนกพืชดอกจากยีนทั้งหมด 10 ยีน พบว่ามี 2 ยีนที่เหมาะสมในการจำแนกได้แก่ยีน *ITS* และ *psbA-trnH* Yang et al. (2012) ทำการจำแนกพืชในสกุล *Pamassia* โดยศึกษาใน 4 ยีนได้แก่ *rbcL*, *matK*, *ITS* และ *psbA-trnH* พบว่ายีนที่ใช้จำแนกได้ผลดีคือยีน *ITS* และ *psbA-trnH* เท่ากับ 86.7 และ 73.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ Kritpetcharat et al. (2011) สามารถจำแนกพืชสมุนไพร 2 ชนิด *S. China* กับ *S. glabra* โดยใช้ยีน *psbA-trnH* Chen et al. (2010) ทำการศึกษาพืชสมุนไพรทั้งหมด 4,800 ชนิด โดยทำการจำแนกจาก 7 ยีนที่นิยมใช้เป็น DNA bar-codes ในพืชเปรียบเทียบกับได้แก่ยีน *trnH-psbA*, *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, *ycf5*, *ITS1* และ *ITS2* พบว่ายีน *ITS2* สามารถจำแนกได้ดีที่สุดที่ 92.7 เปอร์เซ็นต์ จากงานวิจัยที่กล่าวมาจึงเลือกใช้ยีน *ITS2* ใน Nuclear DNA และยีน *psbA-trnH* ใน Plastid DNA มาจำแนกชนิดและศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของผักหวานป่า

วิธีการทดลอง

เก็บรวบรวมใบผักหวานป่าที่มีรูปร่างโค้งมนจากสระบุรี และใบรูปร่างปลายแหลมจากสกลนครที่รวบรวมไว้ที่สถานีวิจัยลำตะคอง นำมาสกัด genomic DNA ทั้งหมด 10 ตัวอย่างโดยวิธีการสกัดดีเอ็นเอปรับปรุงจากวิธีการของ Dellaporta (1983) แต่ผักหวานป่าจากสกลนคร มีปริมาณน้อยจึงใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit ของบริษัท Thermo Scientific ในการสกัดดีเอ็นเอแทน ไพรเมอร์ยีน *ITS2* มีลำดับเบสดังนี้ ITS2-F (5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3'), ITS2-R (5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3') (Chen et al., 2010) และไพรเมอร์ยีน *psbA-trnH* คือ *psbA-trnH*-F (5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'), *psbA-trnH*-R (5'-CGCGCATGGTGGATTACAAATC-3')

(Sang et al., 1997) นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ของผักหวานป่ามาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *ITS2* และ *psbA-trnH* ด้วยวิธี PCR โดยปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *ITS2* มีขั้นตอนตามลำดับดังนี้ Initial Denature 94 C° เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ, Denature 94 C° เป็นเวลา 30 วินาที, Annealing 56 C° เป็นเวลา 30 วินาที, Extension 72 C° เป็นเวลา 45 วินาที ตั้งแต่ขั้น Denature ถึง Extension ทำซ้ำทั้งหมด 40 รอบ และ Final extension 72 C° เป็นเวลา 10 นาที 1 รอบ ส่วนปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน *psbA-trnH* มีขั้นตอนตามลำดับดังนี้ Initial Denature 94 C° เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ, Denature 94 C° เป็นเวลา 1 นาที, Annealing 55 C° เป็นเวลา 1 นาที, Extension 72 C° เป็นเวลา 90 วินาที ตั้งแต่ขั้น Denature ถึง Extension ทำซ้ำทั้งหมด 30 รอบ และ Final extension 72 C° เป็นเวลา 7 นาที 1 รอบ ตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี Electrophoresis เมื่อได้ PCR product ที่ต้องการ ทำการตัดเจลในตำแหน่งดังกล่าวของแต่ละตัวอย่าง นำเจลที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป QIAquick Gel Extraction kit ของบริษัท QIAGEN ส่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *ITS2* และยีน *psbA-trnH* ของผักหวานป่าไปวิเคราะห์หาลำดับเบสโดยบริษัท MacroGen ที่ประเทศเกาหลี นำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์กับฐานข้อมูลของ NCBI ด้วยโปรแกรม Blast N, Alignment ยีน *ITS2* กับยีน *psbA-trnH* ด้วยโปรแกรม ClustalW และสร้าง Phylogenetic tree โดยวิธี neighbor-joining ด้วยโปรแกรม MEGA4 ทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ (Tamura et al., 2007) สำหรับ Out group ของยีน *ITS2* และ *psbA-trnH* ใช้ลำดับเบสของ *A. racemosa* และ *T. maclurei* ในการเปรียบเทียบตามลำดับ

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบผักหวานป่าสามารถใช้วิธีการสกัดที่ปรับปรุงมาจากวิธีการของ Dellaporta (1983) และชุดสกัดสำเร็จรูป GeneJET Plant Ge-

nomc DNA Purification Mini Kit ได้ผลสำเร็จทั้ง 2 วิธีการ genomic DNA ที่ได้มีคุณภาพดีสามารถใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบได้แต่ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้แตกต่างกัน ซึ่งการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีของ Dellaporta (1983) จะได้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าการสกัดด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปเนื่องจากใช้ปริมาณใบผักหวานป่ามากกว่าในการสกัด นำ genomic DNA ไปใช้เป็นตัวต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR บริเวณยีน *ITS2* และ *psbA-trnH* ขนาด PCR product ที่ได้ของแต่ละยีนมีขนาด 500 คู่เบส (Figure 1) ส่งตัวอย่างไปหาลำดับเบสและวิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้ของผักหวานป่าบริเวณยีน *ITS2* และยีน *psbA-trnH* โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI พบว่ายีน *ITS2* ของผักหวานป่ามีลำดับเบสคล้ายคลึงกับพืช *Ehretia laevis* โดยมีความเหมือนกันที่ 98 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยีน *psbA-trnH* มีลำดับเบสคล้ายคลึงกับพืช *Cordia sp.* โดยมีความเหมือนกันที่ 96 เปอร์เซ็นต์ นำลำดับเบสมา Alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW เพื่อตรวจสอบความเหมือนของ

ลำดับเบสในยีนเดียวกัน พบว่ายีน *ITS2* ของผักหวานป่าจาก 2 จังหวัดที่ศึกษามีความเหมือนกันของลำดับเบสอยู่ในช่วง 86.58-97.89 เปอร์เซ็นต์ โดยกลุ่มผักหวานป่าจากสกลนครจะมีความใกล้เคียงกันภายในกลุ่มอยู่ในช่วง 95.31-96.61 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มผักหวานป่าจากสระบุรีจะมีความใกล้เคียงกันภายในกลุ่มอยู่ในช่วง 95.53-97.89 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยีน *psbA-trnH* เมื่อ Alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่ามีความเหมือนกันของลำดับเบสอยู่ในช่วง 83.55-95.21 เปอร์เซ็นต์ โดยผักหวานป่าจากสกลนครจะมีความใกล้เคียงกันภายในกลุ่มอยู่ในช่วง 87.98-93.05 เปอร์เซ็นต์ และผักหวานป่าจากสระบุรีจะมีความใกล้เคียงกันภายในกลุ่มอยู่ในช่วง 91.77-95.21 เปอร์เซ็นต์ ผลจากโปรแกรม ClustalW แสดงให้เห็นว่าผักหวานป่าที่มาจากจังหวัดเดียวกันมีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมสูงกว่าผักหวานป่าที่มาจากคนละจังหวัดกัน ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกันทั้งยีน *ITS2* และยีน *psbA-trnH*

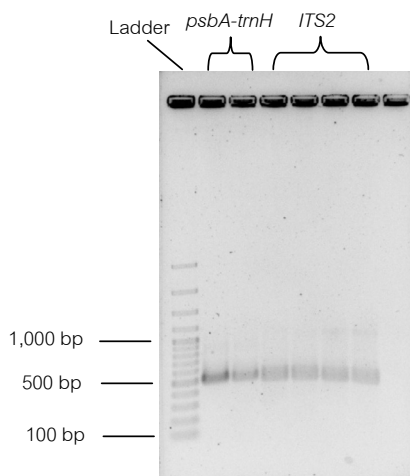


Figure 1 DNA bands of *psbA-trnH* and *ITS2* from *Melientha suavis* Pierre (lane 1 = 100 bp ladder DNA)

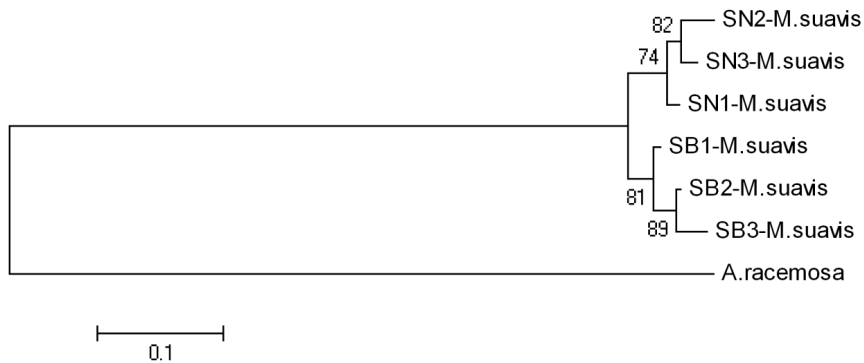


Figure 2 Phylogenetic tree of the *Melientha suavis* Pierre species constructed using ITS2.

หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการสร้าง Phylogenetic tree ของผักหวานป่าทั้ง 2 แหล่ง โดยวิเคราะห์ลำดับเบสยีน *ITS2* ด้วยโปรแกรม MEGA4 โดยวิธี neighbor-joining (Figure 2) โดย SN1-*M. suavis*, SN2-*M. suavis* และ SN3-*M. suavis* คือ ตัวอย่างผักหวานป่าจากจังหวัดสกลนคร SB1-*M. suavis*, SB2-*M. suavis* และ SB3-*M. suavis* คือ ตัวอย่างผักหวานป่าจากจังหวัดสระบุรี และ *A. racemosa* เป็น Out Group ซึ่งเป็นพืชใน Family เดียวกันกับผักหวานป่า ได้ลำดับเบสมาจากฐานข้อมูล NCBI หมายเลขตัวอย่าง >gi|84657338|gb|DQ333868.1|

จาก Figure 2 สามารถแบ่งประชากรได้เป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย SN1-*M. suavis*, SN2-*M. suavis* และ SN3-*M. suavis* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย SB1-*M. suavis*, SB2-*M. suavis* และ SB3-*M. suavis* และกลุ่มที่ 3 คือ *A. racemosa* จาก Phylogenetic tree แสดงว่าผักหวานป่าที่นำมาศึกษาเป็นชนิดเดียวกันเนื่องจากระยะห่างทางพันธุกรรมในยีน *ITS2* ระหว่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 มีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 3 ที่เป็น Out group แต่ผักหวานป่าจากสกลนคร (กลุ่ม 1) กับผักหวานป่าจากสระบุรี (กลุ่ม 2) มีการแยกออกเป็นประชากรคนละกลุ่มกัน

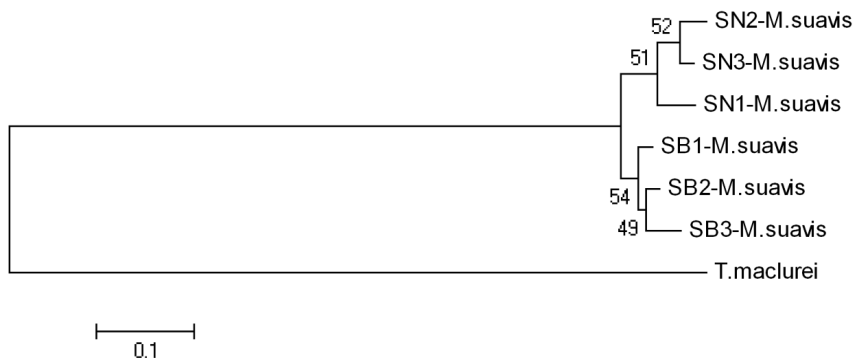


Figure 3 Phylogenetic tree of the *Melientha suavis* Pierre species constructed using *psbA-trnH*.

วิเคราะห์ลำดับเบสยีน *psbA-trnH* จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA4 โดยวิธี neighbor-joining (Figure 3) ตัวอย่าง *T. maclurei* เป็น Out Group ซึ่งเป็นพืชใน Order เดียวกันกับผักหวานป่า ลำดับเบสได้จากฐานข้อมูล NCBI หมายเลข >gi|332293818|gb|HQ317842.1| จาก Figure 3 สามารถแบ่งประชากรได้เป็น 3 กลุ่มเช่นเดียวกันกับยีน *ITS2* โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย SN1-*M.suavis*, SN2-*M.suavis* และ SN3-*M.suavis* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย SB1-*M.suavis*, SB2-*M.suavis* และ SB3-*M.suavis* และกลุ่มที่ 3 คือ *T. maclurei* จาก Phylogenetic tree แสดงว่าผักหวานป่าที่นำมาศึกษาเป็นชนิดเดียวกันเนื่องจากระยะห่างทางพันธุกรรมในยีน *psbA-trnH* ระหว่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 มีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 3 ที่เป็น Out group แต่ผักหวานป่าจากสกลนคร (กลุ่มที่ 1) กับผักหวานป่าจากสระบุรี (กลุ่มที่ 2) มีการแยกออกเป็นประชากรคนละกลุ่มกัน (Figure 3) ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับเบสสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันทั้งยีน *psbA-trnH* และยีน *ITS2*

สรุป

จากผลการศึกษาลำดับเบสของยีน *ITS2* และ *psbA-trnH* ของผักหวานป่าจากสระบุรีกับสกลนคร สรุปได้ว่าผักหวานป่าจาก 2 แหล่งดังกล่าวเป็นชนิดเดียวกัน แต่แบ่งกลุ่มออกเป็น 2 ประชากร ตามลักษณะภูมิประเทศที่แยกจากกันในธรรมชาติทำให้มีความผันแปรทางพันธุกรรมแตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรูปร่างใบผักหวานป่า โดยผลสรุปจากการวิเคราะห์ลำดับเบสสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกันทั้ง 2 ยีนที่ศึกษา ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้วิธีการดังกล่าวในการจำแนกชนิดของพืชสมุนไพรและพืชพื้นเมืองภายในประเทศได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณคุณมนตรี แก้วดวง ผู้อำนวยการสถานีวิจัยลำตะคอง สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่ให้ข้อมูลและช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างผักหวานป่าที่ศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- Chen, S., H. Yao, J. Han, C. Liu, J. Song, L. Shi, Y. Zhu, X. Ma, T. Gao, X. Pang, K. Luo, Y. Li, X. Li, X. Jia, Y. Lin and C. Leon. 2010. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA barcodes for Identifying Medicinal Plant species. PLoS ONE. 5(1):1-8.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A Plant DNA Miniprep: Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1:19-21.
- Kress, W. J., K. J. Wurdack, E. A. Zimmer, L. A. Weight and D. H. Janzen. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. PNAS. 102(23):8369-8374.
- Kritpetcharat, O., N. khemtonglang, P. Kritpetcharat, J. Daduag, S. Daduag, K. Suwamungrang, N. Bletter, R. Sudmoon and A. Chaveerach. 2011. Using DNA markers and barcoding to solve the common problem of Identifying dried medicinal plants with the examples of Smilax and Cissus in Thailand. J. Med. Plant. Res. 5(15):3480-3487.
- Sang, T., D. J. Crawford and T. F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, Reticulate evolution, and Biogeography of Paeonia (Paeoniaceae). Am. J. Bot. 84(9):1120-1136.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24:1596-1599.
- Tianpech, N., P. Swatsitang and S. Tanpanich. 2008. Antioxidant Capacity and Nutritional Values of Pak-Wanpa (*Melientha suavis* Pierre.). KKU. Sci. J. 36(supplement):75-82.
- Yang, J., Y. Wang, M. Moller, L. Gao and D. Wu. 2012. Applying plant DNA barcodes to identify species of *Parnassia* (Parnassiaceae). Mol. Ecol. Resources. 12:267-275.