ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุล *Barleria* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*L-*trn*F

Phylogenetic Relationships in The Genus *Barleria* Inferred from The *trn*L-*trn*F Sequences Region

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม[1]*, วิภารัตน์ ศิริพงษ์[1] , ชัยวัฒน์ ฤทธิเดชากุล[1], ดวงทิพย์ อภิรัตน์มนตรี[1] และ วินัย สมประสงค์[2]

Supattra Poeaim[1]*, Wiparat Siripong[1], Chaiwat Rittidechakul[1] Duangthip Apiratmontree[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: poeaim@hotmail.com*

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 16 ตัวอย่าง และพืชนอกสกุล *Barleria* จำนวน 2 ตัวอย่าง คือทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) และฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata*) เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสบริเวณ *trn*L-*trn*F ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ พบชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 930-967 คู่เบส และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 7 กลุ่ม ที่แยกตามชนิดได้อย่างชัดเจน ยกเว้นระงับพิษ (*B. siamensis*) ที่แสดงความใกล้ชิดกับทองพันชั่ง (*R. nasutus*) รวมทั้งหญ้าหัวนาค (*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 *trn*L-*trn*F 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, หญ้าหัวนาค, บริเวณ *trn*L-*trn*F

Keywords: *Barleria* sp., Sang korani (*Barleria strigosa*), Ya hua nak (*Barleria strigosa var. polytricha*), *trn*L-*trn*F region

บทนำ

ในปัจจุบันประเทศไทยให้ความสำคัญกับตัวยาที่เป็นพืชสมุนไพร เพราะมีผลข้างเคียงน้อยกว่าตัวยาที่ทำจากสารเคมี พืชวงศ์ Acanthaceae เช่น ฟ้าทะลายโจร เสลดพังพอนตัวผู้ และสังกรณี เป็นต้น นิยมนำมาใช้เป็นพืชสมุนไพร สกุล *Barleria* อยู่ในวงศ์ Acanthaceae เช่นกัน ในประเทศไทยพบพืชสกุลนี้บริเวณพื้นที่แห้งแล้ง รกร้าง ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็งรัง และป่าดิบแล้ง ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ จากการประชุมสัมมนาพิพิธภัณฑ์สิรินธรกับการพัฒนาการเกษตร และสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย ประจำปี 2552 เรื่องการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชของกรมวิชาการเกษตร และสถานการณ์การอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ทรัพยากรพันธุกรรมพืชในประเทศไทย แสดงให้เห็นว่าพืชสกุล *Barleria* มีอย่างน้อย 8 ชนิด คือ อังกาบเขา (*B. biloba*), อังกาบ (*B. cristata*), เท้าฤาษี (*B. longflora*), สังกรณี (*B. strigosa*), *B. polytricha*, เสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*), ระงับพิษ (*B. siamensis*) และอังกาบหนู (*B. prionitis*) โดยเชื่อว่าอังกาบเขา และระงับพิษเป็นแหล่งพรรณไม้ในประเทศไทย ซึ่งการศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเฉพาะสีดอก และการออกดอกยากต่อการบ่งชี้ และระบุชื่อที่แน่นอน รวมทั้งบางชนิดมีลักษณะใบใกล้เคียงกับสมุนไพรอื่น เช่น อังกาบ (*B. cristata*) มีลักษณะใบเหมือนกับทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus*) อีกทั้งปัญหาของชื่อพ้อง (homonym) และชื่อท้องถิ่น จึงควรมีการระบุสายพันธุ์ ศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลของพืชในสกุล *Barleria* ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการอนุรักษ์พันธุกรรม ตลอดจนศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของพืชในสกุล *Barleria* ในประเทศไทย

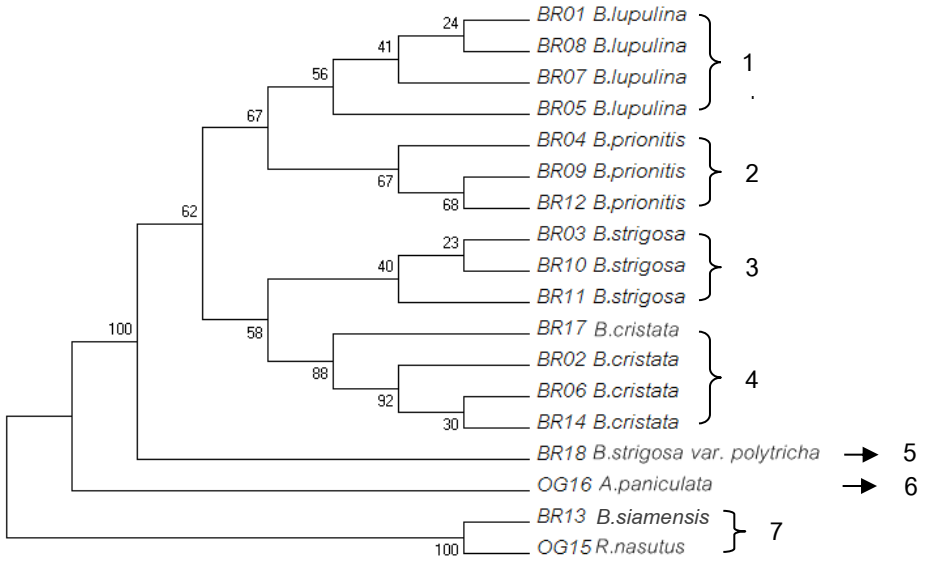
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ในพืชนิยมศึกษาในบริเวณ *trn*L(UAA) 5'exon และ*trn*L(UAA) 3'exon ของคลอโรพลาสต์ ด้วยคู่ไพรเมอร์ C และ D แต่พบข้อจำกัดในการศึกษา เนื่องจากมีชิ้นดีเอ็นเอขนาดสั้นและเป็นส่วนเฉพาะ intron ของ *trn*L จึงนิยมบริเวณ *trn*L(UAA)-*trn*F(GAA) ซึ่งมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ยาวขึ้น และประกอบด้วย intron ของ *trn*L และ intergenic spacer (IGS) ระหว่าง 3'exon *trn*L และ *trn*F exon

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บตัวอย่างพืชในสกุล *Barleria* จากทุกภูมิภาคของประเทศไทย โดยได้รับการจำแนกและระบุชนิดจากคุณวินัย สมประสงค์ หัวหน้ากลุ่มวิจัยเพื่อการคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร สกัดดีเอ็น-เอจากเนื้อเยื่อส่วนใบของพืชด้วยวิธี CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1990) วัดคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) บริเวณตำแหน่ง *trn*L-*trn*F 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 และดี-เอ็นเอต้นแบบ 6 ng/µl โดยใช้สภาวะ ดังนี้ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 ºC เป็นเวลา 2 นาที ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 ºC เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 55 ºC เป็นเวลา 2 นาที และอุณหภูมิ 72 ºC เป็นเวลา 2 นาที ทำซ้ำในขั้นที่ 2 จำนวน 35 รอบ ขั้นตอนสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 72 ºC เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบ (alignment) ด้วยโปรแกรม Bioedit และวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining จากโปรแกรม MEGA 5 โดยสุ่มค่า bootstrap เท่ากับ 1,000 (Tamura *et al*., 2011)

ผลการทดลองและวิจารณ์

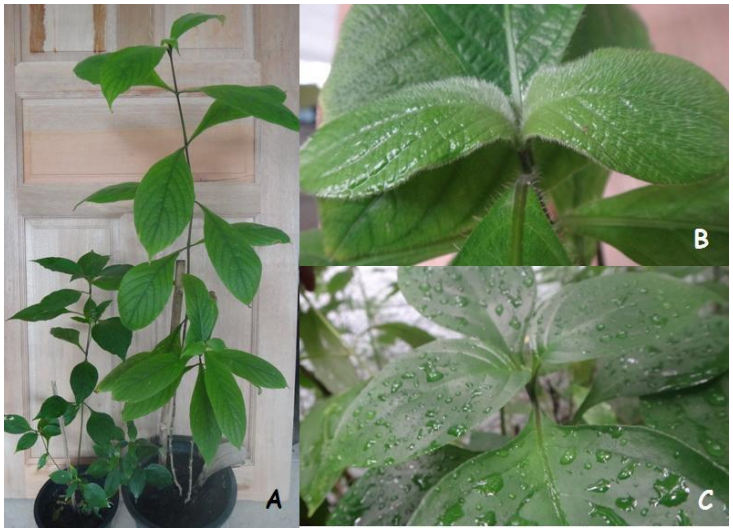
ตัวอย่างพืชในสกุล *Barleria* ที่นำมาศึกษาสามารถแบ่งออกเป็น 5 ชนิด คืออังกาบ (*B. cristata*) อังกาบหนู (*B. prionitis*) เสลดพังพอนตัวผู้ (*B. lupulina*) สังกรณี (*B. strigosa*) และระงับพิษ (*B. siamensis*) แสดงจำนวนของตัวอย่างตามรูปที่ 1 นอกจากนี้ยังนำทองพันชั่ง (*R. nasutus*) และฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) มาเป็น outgroup โดยทุกตัวอย่างสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ C/F ได้พบชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 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 หัวนาค (*B. strigosa var. polytricha*) และฟ้าทะลายโจร (*A. paniculata*) ตามลำดับ และกลุ่มที่ 7 แสดงความใกล้ชิดกันระหว่างระงับพิษ (*B. siamensis*) กับทองพันชั่ง (*R. nasutus*) ซึ่งเป็น outgroup มากกว่าพืชในสกุล *Barleria*



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

จากการศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีไอไทด์บริเวณ intron ของ *trn*L และ intergenic spacer (IGS) ระหว่าง 3'exon *trn*L และ *trn*F exon ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ พบว่าหญ้าหัวนาคแสดงความสัมพันธ์กับสังกรณีในระดับต่ำ แม้ว่าเป็นพืชชนิดเดียวกัน ซึ่งสังกรณี (*B. strigosa*) เป็นไม้พุ่ม สูง 0.3-1 เมตร แตกกอเป็นพุ่มขนาดเล็ก ใบของสังกรณีมีโคนใบสอบเรียว ก้านใบยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร ขนสั้นหยาบประปราย ใบรูปไข่กว้าง ปลายใบเรียวแหลม ดอกเป็นช่อแบบช่อลดรูป 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 ซ้อนทับหยักวงกลีบขนาดใหญ่ 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 ซึ่งต่างจากหญ้าหัวนาค (*B. strigosa var. polytricha*) ที่เป็นไม้พุ่ม สูง 1-3 เมตร ไม่แตกกอ โคนใบรูปลิ่ม ก้านใบยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ขนสั้นหยาบหนาแน่น ใบรูปไข่แคบ โคนใบรูปลิ่ม ปลายใบแหลม ดอกมีลักษณะคล้ายกับสังกรณี ยกเว้นพบขนสั้น

หนาแน่นบริเวณใบและใบประดับ ดังนั้นแม้ว่ามีการตั้งชื่อซ้ำชนิดกัน แต่โครงสร้างภายนอกของสังกรณี (*B. strigosa* Willd.) พบมีความแตกต่างจากหญ้าหัวนาค (*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 ขี้ไฟนกคุ่ม เทิ่งดี หญ้าหงอนไก่ และหญ้าหัวนาค เป็นต้น ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาข้อมูลด้านโมเลกุลเพิ่มเติม และทบทวนเรื่องการจัดจำแนกของพืชชนิดนี้ต่อไป



รูปที่ 2 เปรียบเทียบลักษณะของสังกรณีและหญ้าหัวนาค (A) ความสูงของสังกรณี (ซ้าย) และหญ้าหัวนาค (ขวา) (B) ใบมีขนสั้นหยาบหนาแน่นของหญ้าหัวนาค และ (C) ใบมีขนสั้นปริมาณเล็กน้อยของสังกรณี

สรุปผลการทดลอง

ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในสกุล *Barleria* จำนวน 16 ตัวอย่าง และนอกสกุล *Barleria* จำนวน 2 ตัวอย่าง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*L-*trn*F ของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ สามารถแบ่งพืชสกุล *Barleria* ออกได้ตามชนิด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าหญ้าหัวนาค (*B. strigosa var. polytricha*) ที่จัดให้อยู่ในพืชชนิดเดียวกันกับสังกรณี (*B. strigosa*) แสดงความสัมพันธ์กันในระดับต่ำ จึงควรมีการศึกษาข้อมูลด้วยเทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ หรือศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอื่นเพิ่มเติม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง งบประมาณประจำปี 2555 และขอขอบคุณพิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร 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.