

การวิเคราะห์ระดับโมเลกุลและเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุล *Allamanda*

Molecular Analysis and DNA Barcode of the Genus *Allamanda*

สโรชา อังคปัทมากุล (Sarocha Aungkapattamagul)* ดร.อรุณรัตน์ ณีวีราช (Dr. Arunrat Chaveerach)**

ดร.ทวัชชัย ธานี (Dr. Tawatchai Tanee)*** ดร.รุ่งลาวัลย์ สุธมม (Dr. Runglawan Sudmoon)****

บทคัดย่อ

พืชสกุล *Allamanda* หรือบานบุรีได้รับความนิยมในการปลูกประดับเนื่องจากออกดอกได้ตลอดปี โดยมีทั้งชนิดของไทยและชนิดที่นำเข้า งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์พันธุกรรมและสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุลนี้ได้สำรวจและระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 5 ชนิด ได้แก่ *A. blanchetii*, *A. cathartica*, *A. neriifolia*, *A. schottii* และ *A. violacea* จึงสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) และวิเคราะห์เพื่อสร้างแผนโคโรแกรม พบว่าพืชชนิดเดียวกันและต่างชนิดมีความเหมือนทางพันธุกรรม 0.92-0.93 และ 0.50-0.76 ตามลำดับ ต่อมาได้สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดจากบริเวณ *matK*, *rbcL* และ *trnH-psbA* spacer ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดเป็น 0.000-0.227, 0.000-0.041, 0.005-0.501 ตามลำดับ ลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ได้เก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ accession numbers KC110849-53, JX683834-38, JX244894-98 ตามลำดับ

ABSTRACT

Allamanda species, both native and imported species, are popular ornamental for their blooming throughout the year. This research aims to analyze genetics and provide DNA barcodes for the plants. From investigation and morphologically identification, five species including *A. blanchetii*, *A. cathartica*, *A. neriifolia*, *A. schottii* and *A. violacea* were found. DNA fingerprinting by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) was done and fingerprints analyzed for dendrogram construction. The genetic similarity levels within and among species are 0.92-0.93 and 0.50-0.76, respectively. DNA barcodes were done with *matK*, *rbcL* and *trnH-psbA* spacer regions yielding genetic distance values between species of 0.000-0.227, 0.000-0.041, 0.005-0.501, respectively. These tag sequences were deposited in GenBank database under accession numbers KC110849-53, JX683834-38, JX244894-98.

คำสำคัญ : บานบุรี ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

Key Words: *Allamanda*, DNA fingerprints, DNA barcodes

*นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

***ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะสิ่งแวดล้อมและทรัพยากรศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

****นักวิจัยห้องปฏิบัติการ Plant Systematics ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

พืชสกุล *Allamanda* เป็นพืชดอกจัดอยู่ในวงศ์ Apocynaceae มีรายงานพบในประเทศไทย 3 ชนิด คือ บานบุรีเหลือง *A. cathartica* L. บานพารา *A. schottii* Pohl และ บานบุรีม่วงและบานบุรีสีกุหลาบ *A. violacea* Gardner & Field (เต็ม, 2544) และพบอีกหลายชนิดที่นำเข้ามาจากต่างประเทศได้แก่ *A. blanchetii* A.DC. และ *A. nerifolia* Hook. ซึ่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ทวีปอเมริกา แอพอเมริกาใต้ และบราซิล นิยมปลูกเป็นไม้ประดับทั่วไป เนื่องจากมีสีสันสวยงาม และออกดอกได้ตลอดทั้งปี นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งเพราะมีสารที่มีความสำคัญทางด้านสมุนไพร มีรายงานว่าบานบุรีเหลือง มีสรรพคุณเป็นยาระบายทำให้กล้ามเนื้อของลำไส้หดเกร็ง แก้อักเสบ ช่วยทำให้อาเจียน (ลิณา, 2522) ซึ่งสอดคล้องกับตำรายาแผนโบราณและยังพบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของบานบุรีอีกว่า มีฤทธิ์ยับยั้งการเกาะกลุ่มของเซลล์ ด้านเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย ด้านเนื้องอกซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวยังต้องศึกษาวิจัยต่อไป

ในปัจจุบันได้มีการใช้ข้อมูลและวิธีการทางชีวโมเลกุลในการระบุชนิด จัดจำแนกหมวดหมู่ และวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางพันธุกรรม การใช้ข้อมูลระดับโมเลกุลเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถช่วยระบุชนิดของพืชได้ วิธีการสร้างเครื่องหมายทางโมเลกุลมีหลากหลายวิธีเช่น การใช้ microsatellite DNA, DNA barcoding, DNA fingerprinting แต่ละวิธีนี้มีความเหมาะสมและข้อจำกัดแตกต่างกันไป การศึกษาด้วยวิธีการ Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) เป็นเทคนิคที่ใช้เพียง 1 ไพรมเมอร์ ต่อ 1 ปฏิกริยา ISSR เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างส่วนของไมโครแซทเทลไลต์สองบริเวณ ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตทั่วไปประกอบด้วยส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะ (unique sequence DNA) ซึ่งพบเพียง 1 ครั้งต่อจีโนม (หรืออาจมากกว่า 1 แต่มีจำนวนไม่มาก) และส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ (repetitive sequence DNA) ซึ่งพบ

หลายบริเวณต่อจีโนมในจีโนมของพืชโดยทั่วไปพบลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำถึง 90% ส่วนที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำมีหลายรูปแบบแตกต่างกันด้วยจำนวนเบสที่ซ้ำกันและจำนวนชุดต่อจีโนม แต่การจำแนกและการเรียกชื่อค่อนข้างสับสน ลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์ ประกอบด้วย เบสซ้ำสั้นๆ ตั้งแต่ 1 ถึง 6 เบส (หรืออาจถึง 10 เบส) ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีจำนวนชุดซ้ำแตกต่างกันไป พบกระจายอยู่ทั่วไปทั้งจีโนมและมีความหลากหลายสูงมาก ซึ่งทำให้มีประโยชน์มากในการใช้เป็นเครื่องหมายระดับโมเลกุล (molecular marker) ในการศึกษาสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์หลายกลุ่ม นอกจากนี้การใช้วิธีการ ISSR ยังมีประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันในระดับประชากร การตรวจหาอัลลีลที่จำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตชนิดใดๆ เป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และต้นทุนไม่สูงมาก (อรุณรัตน์, 2552) DNA barcode นักวิทยาศาสตร์ได้นำแนวคิดการทำบาร์โค้ดในสินค้าต่างๆ มาประยุกต์ใช้ในการระบุชนิดและจำแนกสิ่งมีชีวิต เพื่อลดความผิดพลาด และมีความรวดเร็ว ง่ายต่อการนำมาใช้ นักวิทยาศาสตร์จึงได้เลือกลำดับนิวคลีโอไทด์สั้นๆ ของดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดสูงแต่มีความต่างระหว่างชนิดเดียวกันต่ำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดในการจำแนกสิ่งมีชีวิต ปัจจุบันองค์กร The Consortium for the Barcode of Life (CBOL), Canadian Centre for DNA Barcoding, Global Biodiversity Information Facility (GBIF) กำลังจัดทำมาตรฐาน และคู่มือในการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด รวบรวมและจัดทำฐานข้อมูลกลาง ของดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่แสดงความสัมพันธ์ของลำดับดีเอ็นเอในบาร์โค้ดกับชนิดต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต มาตรฐานที่จัดทำขึ้นใช้ส่วนของยีน cytochrome C oxidase I (COI) ของไมโทคอนเดรียเป็นบาร์โค้ดสำหรับสัตว์และค่อนข้างประสบความสำเร็จมาก (Hebert et al., 2003) สำหรับกลุ่มพืชนั้นอยู่ในขั้นตอนของการทดลองหาบริเวณที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพลาสติด

เนื่องจากเชื่อถือน่าจะมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการเพียงพอที่จะทำให้เกิดความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วยให้งานนักพืชคนละชนิดออกจากกันได้ คือ *matK*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*, *accD*, *ndhA*, *ndhJ*, *ndhK*, *YCF5*, *YCF9* และ *rbcl* ในปี ค.ศ. 2007 Chase *et al.* ได้เสนอให้มีการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนและบริเวณที่ไม่ถอดรหัสของพืช 3 บริเวณต่อพืช 1 ชนิด โดยเสนอทางเลือกเป็น 2 แนวทาง คือ *rpoC1*, *matK* และ *trnH-psbA* spacer หรือ *matK*, *rpoB* และ *rpoC1* ล่าสุด Hollingsworth *et al.* (2009) ได้เสนอบริเวณมาตรฐาน 2 บริเวณ คือ *rbcl* และ *matK* เป็น core barcode regions

ผู้วิจัยมีความสนใจและมุ่งที่จะศึกษาการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Allamanda* แต่ละชนิดที่พบ สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุล *Allamanda* เพื่อใช้ในการระบุชนิดครั้งต่อไปได้อย่างรวดเร็วและถูกต้อง

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อวิเคราะห์พันธุกรรมและสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุล *Allamanda*

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างและการระบุชนิดพืช

สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชสกุล *Allamanda* ชนิดที่มีรายงานพบในประเทศไทย รวมทั้งชนิดที่นำเข้ามาจากต่างประเทศเท่าที่หาได้ ระบุชนิดด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาโดยใช้เอกสารอ้างอิงต่างๆ ได้แก่ Flora of China (Pingtao, 1995) และ Flora of Thailand (Middleton, 1999)

2. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช (Porebski *et al.*, 1997) อุ่น extraction buffer ที่อุณหภูมิ 65°C ประมาณ 3-5 นาที ตัดตัวอย่างใบพืชสดขนาด 0.5 cm² ลงในโกร่ง เติม extraction buffer ปริมาตร 600 µl แล้วบดจนละเอียด จากนั้นย้ายตัวอย่างที่บดเรียบร้อยแล้วลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml เติม RNase A 5 µl (10 mg/ml) ลงในหลอดตัวอย่าง จากนั้นนำไปอุ่นที่

อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และกลับหลอดทุกๆ 10 นาที นำหลอดตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยง 6,000 rpm 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสขึ้นบนใส่ในหลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารตัวอย่าง ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยง 6,000 rpm 5 นาที ดูดส่วนใสขึ้นบนใส่หลอดใหม่ เติม isopropyl alcohol ที่แช่เย็นไว้ที่ -20°C ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารตัวอย่างที่ได้ จากนั้นแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำหลอดตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยง 6,000 rpm 10 นาที เท isopropyl alcohol ที่เจือจางนั้นเติม 70 % ethanol 500 µl นำมาปั่นเหวี่ยง 6,000 rpm 1 นาที เท ethanol ที่เจือจางและตั้งทิ้งไว้ให้ ethanol ระเหยให้หมด เติม 10 mM Tris-HCl ที่อุณหภูมิประมาณ 3-5 นาทีที่อุณหภูมิ 65°C ปริมาตร 50-100 µl ขึ้นกับตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอละลายสมบูรณ์ ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis

3. การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)

เตรียมสารที่เป็นองค์ประกอบสำหรับการทำ PCR ดังต่อไปนี้ sterile H₂O 4.3 µl, 2X GoTaq Master Mix (Promega) 5.0 µl, 50 µM primer 0.2 µl และ DNA (~20 ng/µl) 0.5 µl (ปริมาตรรวม 10 µl) จากนั้นผสมสาร 3 อย่างแรก ตามจำนวนตัวอย่างที่จะทำลงในหลอดที่มีขนาดพอเหมาะ ผสมให้เข้ากัน โดยการดีดหลอดทดลองและนำไปใส่เครื่อง spindown จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 0.2 ml หลอดละ 9.5 µl แล้วจึงเติมดีเอ็นเอ และนำไปเข้าเครื่อง PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้ ขึ้นแรก 1 รอบ อุณหภูมิ 94°C 3 นาที ขึ้นที่ 2 35 รอบ 94°C 30 วินาที 50°C 45 วินาที 72°C 2 นาที ขึ้นที่ 3 จำนวน 1 รอบ 72°C 7 นาที จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis และบันทึกรูปถ่ายลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ผลต่อไป

4. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของพืชสกุล *Allamanda* ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10 (Rohlf, 1998)

5. การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดบริเวณ *matK*, *rbcL* และ *trnH-psbA* spacer regions

เตรียมสารที่เป็นองค์ประกอบสำหรับการทำ PCR ตามรายการดังต่อไปนี้ sterile H₂O 16.2 µl, 5X Flexi buffer 6.0 µl, 25 mM MgCl₂ 3.0 µl, 10 mM dNTP 1.8 µl, GoTaq Flexi (Promega) 0.3 µl, 50 µM primer F 0.6 µl, 50 µM primer R 0.6 µl และ DNA (~20 ng/µl) 1.5 µl (ปริมาตรรวม 30 µl) ผสมสาร 7 อย่างแรกตามจำนวนตัวอย่างที่จะทำลงในหลอดที่มีขนาดพอเหมาะ ผสมให้เข้ากัน โดยการดีดหลอด ทดลองและนำไปใส่เครื่อง spindown จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 0.2 ml หลอดละ 28.5 µl แล้วจึงเติมดีเอ็นเอ และนำไปเข้าเครื่อง PCR กำหนดอุณหภูมิและเวลาดังนี้ ขึ้นแรก จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 94°C 3 นาที ขึ้นที่ 2 จำนวน 35 รอบ 94°C 30 วินาที 50°C 52 วินาที 72°C 2 นาที ขึ้นที่ 3 จำนวน 1 รอบ 72°C 7 นาที

หลังจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจผลด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis บันทึกรูปถ่าย ส่งผลผลิต PCR ที่เหลือไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) ของแต่ละตัวอย่างศึกษาเพื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดไปรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank แล้วจะได้รับ GenBank accession number เป็นหมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชแต่ละชนิด ซึ่งนักวิจัยจากทั่วโลกสามารถเข้าถึง

และนำหมายเลขรวมทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาและอ้างอิงต่อไป

ผลการวิจัย

1. พืชสกุล *Allamanda* ที่พบในประเทศไทย

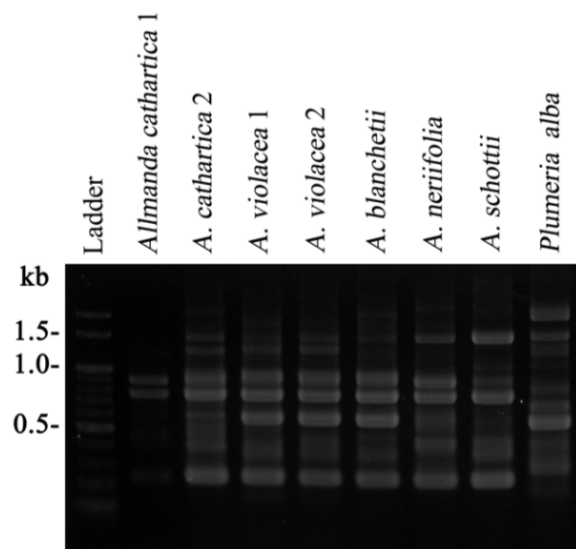
จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชสกุล *Allamanda* พร้อมทั้งระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้ตัวอย่างทั้งหมด 7 ตัวอย่าง ระบุชนิดได้เป็น 5 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่มีรายงานพบในประเทศไทย 3 ชนิด คือ *A. cathartica* *A. schottii* และ *A. violacea* และชนิดที่นำเข้ามาจากต่างประเทศได้แก่ *A. blanchetii* และ *A. neriifolia* (ภาพที่ 1)

2. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Allamanda*

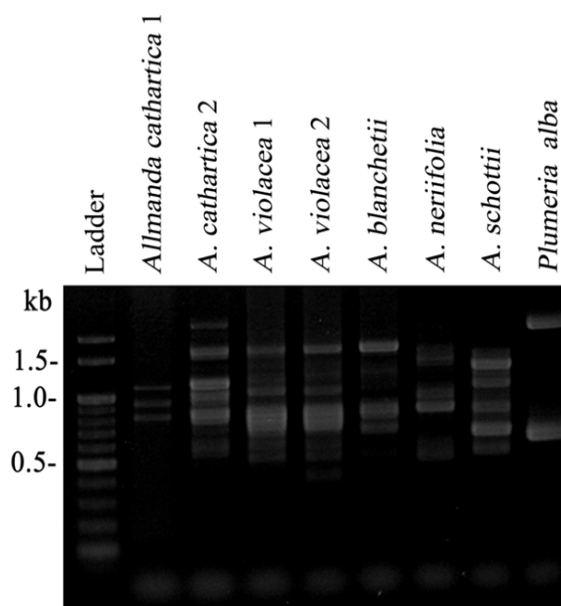
สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ISSR ด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 31 แบบ ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดแถบดีเอ็นเอชัดเจนจากไพรเมอร์ 16 แบบ ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 2-3 นับจำนวนแถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 505 แถบ นำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดที่ศึกษาได้ผลเดนโดรแกรม ดังภาพที่ 4 พบว่าในชนิดเดียวกันมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ที่ 0.92-0.93 ต่างชนิดกันมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ที่ 0.50-0.76 (ดังแสดงในตารางที่ 1)



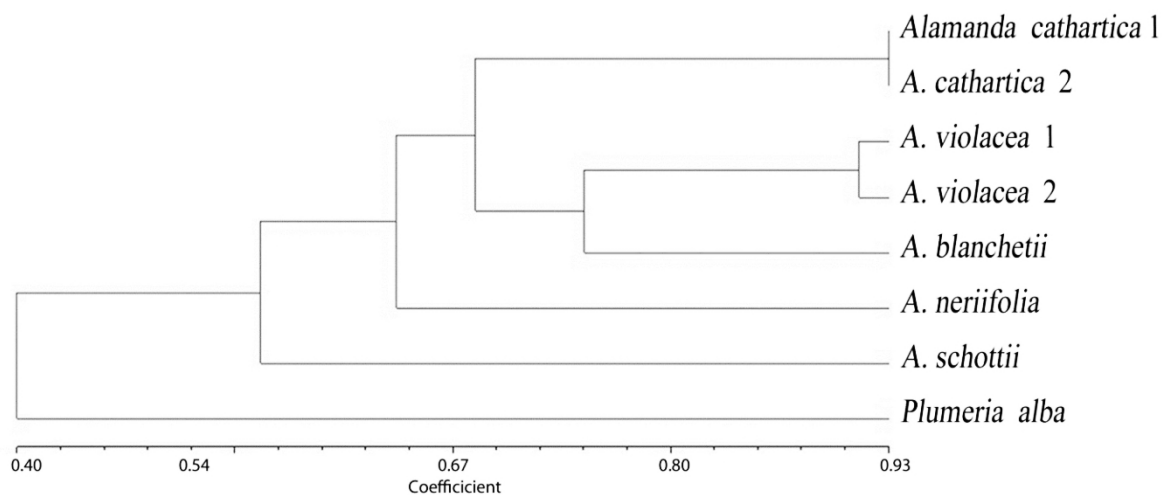
ภาพที่ 1 ลักษณะพื้นฐานวิทยาของ *Allamanda cathartica* (a)/ *A. violacea* (b)/ *A. blanchetii* (c) / *A. neriifolia* (d) และ *A. schottii* (e)



ภาพที่ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ (GT)₆CC



ภาพที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ (ACTG)₄



ภาพที่ 4 เดนโดแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Allamanda* จากการวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ISSR จากไพรเมอร์ 16 แบบ ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10

ตารางที่ 1 ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Allamanda* จากการวิเคราะห์ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ISSR จากไพรเมอร์ 16 แบบ ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.10

	<i>A. cathartica</i> (1)	<i>A. cathartica</i> (2)	<i>A. violacea</i> (1)	<i>A. violacea</i> (2)	<i>A. blanchetii</i>	<i>A. neriifolia</i>	<i>A. schottii</i>	<i>P. alba</i>
<i>Allmanda cathartica</i> (1)	1.00							
<i>A. cathartica</i> (2)	0.93	1.00						
<i>A. violacea</i> (1)	0.69	0.72	1.00					
<i>A. violacea</i> (2)	0.66	0.69	0.92	1.00				
<i>A. blanchetii</i>	0.67	0.65	0.74	0.76	1.00			
<i>A. neriifolia</i>	0.65	0.63	0.59	0.62	0.67	1.00		
<i>A. schottii</i>	0.52	0.50	0.53	0.56	0.60	0.59	1.00	
<i>Plumeria alba</i>	0.36	0.32	0.32	0.37	0.46	0.44	0.55	1.00

3. เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุล

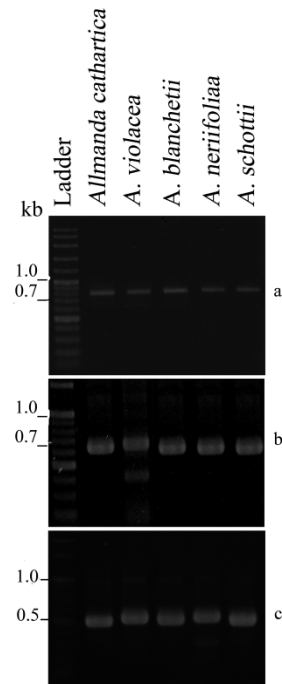
Allamanda

แถบดีเอ็นเอของบริเวณ *rbcL*, *matK* และ *trnH-psbA* spacer ดังแสดงในภาพที่ 5 และเมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของพืชสกุล *Allamanda* ได้ผลการศึกษาดังต่อไปนี้

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *matK* ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดเป็น 0.000-0.227 เก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ accession numbers KC110849-53

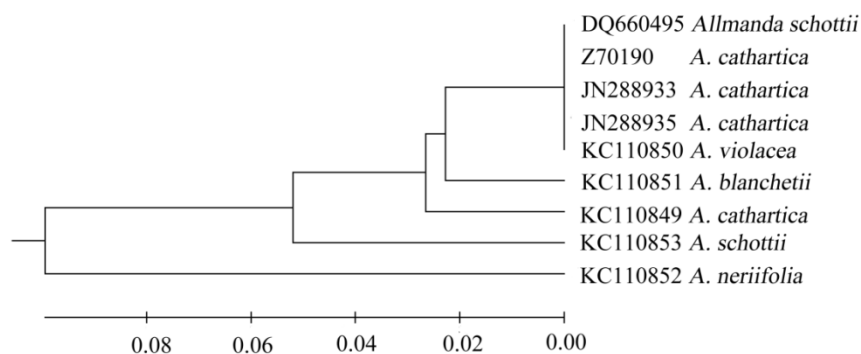
ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *rbcL* ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดเป็น 0.000-0.041 เก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ accession numbers JX683834-38

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnH-psbA* spacer ให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดเป็น 0.005-0.501 เก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ accession numbers JX244894-98

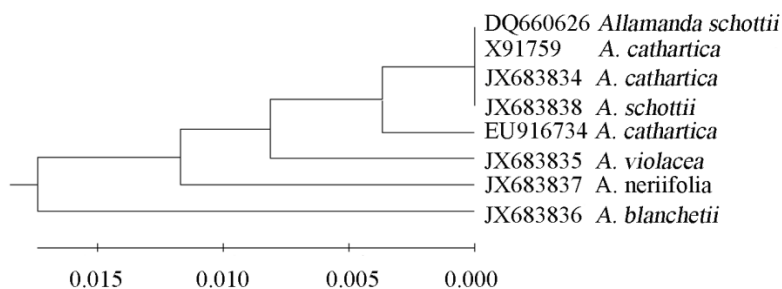


ภาพที่ 5 เครื่องหมายแบบบาร์โค้ดจากบริเวณ *matK*

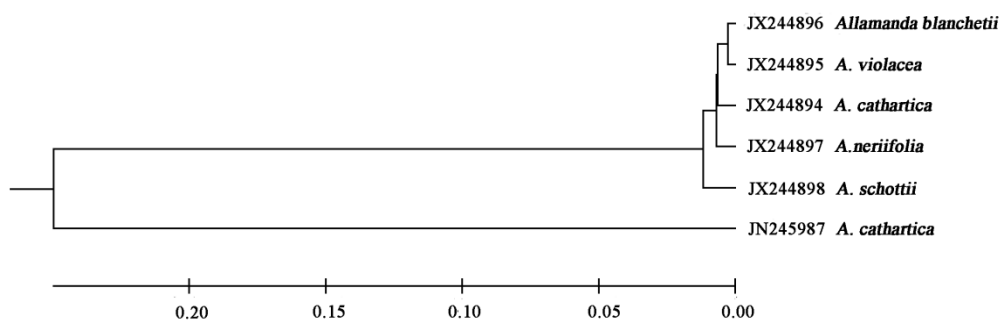
(a), *rbcL* (b) และ *trnH-psbA* spacer (c)



ภาพที่ 6 เดนโดแกรมของพืชสกุล *Allamanda* สร้างด้วยโปรแกรม MEGA5.05 จากข้อมูลค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม ของบริเวณ *matK*



ภาพที่ 7 เคนโดแกรมของพืชสกุล *Allamanda* สร้างด้วยโปรแกรม MEGA5.05 จากข้อมูลค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของบริเวณ *rbcL*



ภาพที่ 8 เคนโดแกรมของพืชสกุล *Allamanda* สร้างด้วยโปรแกรม MEGA5.05 จากข้อมูลค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของบริเวณ *trnH-psbA* spacer

ตารางที่ 2 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Allamanda* วิเคราะห์จากความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *matK* gene

	KC110849	KC110850	KC110851	KC110852	KC110853	JN228935	JN228933	DQ660495	Z70190
KC110849 <i>Allamanda cathartica</i> (Thailand)	0.000								
KC110850 <i>A. violacea</i> (Thailand)	0.045	0.000							
KC110851 <i>A. blanchetii</i> (Thailand)	0.091	0.045	0.000						
KC110852 <i>A. nerifolia</i> (Thailand)	0.227	0.182	0.227	0.000					
KC110853 <i>A. schottii</i> (Thailand)	0.136	0.091	0.136	0.227	0.000				
JN228935 <i>A. cathartica</i> (India)	0.045	0.000	0.045	0.182	0.091	0.000			
JN228933 <i>A. cathartica</i> (India)	0.045	0.000	0.045	0.182	0.091	0.000	0.000		
DQ660495 <i>A. schottii</i> (Switzerland)	0.045	0.000	0.045	0.182	0.091	0.000	0.000	0.000	
Z70190 <i>A. cathartica</i> (France)	0.045	0.000	0.045	0.182	0.091	0.000	0.000	0.000	0.000

ตารางที่ 3 ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Allamanda* วิเคราะห์จากความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ *rbcL* gene

	JX683834	JX683835	JX683836	JX683837	JX683838	EU916734	DQ660626	X91759
JX683834 <i>Allamanda cathartica</i> (Thailand)	0.000							
JX683835 <i>A. violacea</i> (Thailand)	0.015	0.000						
JX683836 <i>A. blanchetii</i> (Thailand)	0.033	0.037	0.000					
JX683837 <i>A. nerifolia</i> (Thailand)	0.022	0.022	0.033	0.000				
JX683838 <i>A. schottii</i> (Thailand)	0.000	0.015	0.033	0.022	0.000			
EU916734 <i>A. cathartica</i> (China)	0.007	0.022	0.041	0.030	0.007	0.000		
DQ660626 <i>A. schottii</i> (Switzerland)	0.000	0.015	0.033	0.022	0.000	0.007	0.000	
X91759 <i>A. cathartica</i> (Sweden)	0.000	0.015	0.033	0.022	0.000	0.007	0.000	0.000

ตารางที่ 4 ตารางแสดงค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Allamanda* จากบริเวณ *trnH-psbA* spacer

	JX244894	JX244895	JX244896	JX244897	JX244898	JN245987
JX244894 <i>Allamanda cathartica</i> (Thailand)	0.000					
JX244895 <i>A. violacea</i> (Thailand)	0.013	0.000				
JX244896 <i>A. blanchetii</i> (Thailand)	0.013	0.005	0.000			
JX244897 <i>A. nerifolia</i> (Thailand)	0.016	0.013	0.013	0.000		
JX244898 <i>A. schottii</i> (Thailand)	0.026	0.023	0.023	0.021	0.000	
JN245987 <i>A. cathartica</i> (India)	0.501	0.501	0.499	0.499	0.499	0.000

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชสกุล *Allamanda* พร้อมทั้งระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 5 ชนิด สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี ISSR พบว่าค่าความเหมือนทางพันธุกรรมภายในชนิดเดียวกันและต่างชนิดในสกุลเดียวกันอยู่ในระดับใกล้เคียงกับที่ Weier *et al.* (1982) เสนอไว้คือ 0.85 และ 0.60 ตามลำดับ แสดงว่าเครื่องหมาย ISSR นี้สามารถใช้ระบุชนิดของบานบุรีได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Benharrat *et al.* (2002) ที่ระบุชนิดของพืชสกุล

Orobanchaceae ได้ด้วย ISSR งานวิจัยของ Chaveerach *et al.* (2008) ได้ระบุชนิดและตั้งชื่อพืชชนิดใหม่ 2 ชนิด ในสกุล *Curcuma* ด้วยข้อมูลสนับสนุนจาก ISSR นอกจากนี้ Chaveerach *et al.* (2011) ยังได้ใช้วิธีการนี้ช่วยในการระบุพืชสกุล *Nymphaea* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากทั้ง 3 บริเวณ ที่ศึกษา พบว่า ไม่ตรงตามคำนิยามของดีเอ็นเอบาร์โค้ด คือ ดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างชนิดสูงแต่มีความต่างภายในชนิดเดียวกันต่ำ (อรุณรัตน์, 2552)

เพราะบริเวณ *matK* และ *rbcL* ไม่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างพืชบางชนิด (ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเป็น 0.000) เช่น บริเวณ *matK* ใน *A. cathartica* (India), *A. cathartica* (France) และ *A. schottii* (Switzerland) และบริเวณ *rbcL* ใน *A. schottii* (Thailand), *A. schottii* (Switzerland) และ *A. cathartica* (Sweden) ส่วนบริเวณ *trnH-psbA* spacer นั้นให้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดอยู่ในช่วง 0.005-0.501 ในขณะที่ภายในชนิดเดียวคือ *A. cathartica* จากประเทศไทย และ อินเดีย มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงถึง 0.501 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าทั้ง 3 บริเวณนี้ ไม่มีประสิทธิภาพในการระบุชนิดของพืชสกุล *Allamanda* ถึงแม้ว่าจะใช้ได้ผลดีในพืชกลุ่มอื่นๆ (เช่น Kress *et al.*, 2005, Newmaster *et al.*, 2008, Chaveerach *et al.* 2011) ดังนั้นจึงต้องทำการศึกษาบริเวณอื่นที่เหมาะสมต่อไป

อย่างไรก็ตามลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณมาตรฐานที่ศึกษาในพืชสกุล *Allamanda* ที่เก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) นักวิจัยจากทั่วโลกสามารถเข้าถึงและนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปีการศึกษา 2555 บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น และขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่สนับสนุนอุปกรณ์และเอื้อเฟื้อสถานที่ในการดำเนินการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

เต็ม สมิตินันท์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย.

สำนักพิมพ์บริษัทประชาชน จำกัด, กรุงเทพฯ.

ลีนา ผู้พัฒนางศ์. 2522. สมุนไพรไทยตอนที่ 2. หอ

พรรณไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

อรุณรัตน์ จวีราษ. 2552. อนุกรมวิธานระดับโมกุลของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

Benharrat, H., Veronesi, C., Theodet, C. and Thalouarn, T. 2002. *Orobanch* species and population discrimination using intersimple sequence repeat (ISSR). *Weed Research* 42: 470-475.

Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., Van den Berg, C., Madrinan, S., Petersen, G., Seberg, O., Jorgensen, T., Cameron, K.M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T.A.J., Conrad, F., Salazar, G.A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M.L., Barraclough, T.G., Kelly, L. and Wilkinson, M. 2007. New trends in plant systematics: a proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. *Taxon* 56(2): 295-299.

Chaveerach, A., Sudmoon, R., Tane, T., Mookamul, P., Sattayasai, N. and Sattayasai, J. 2008. Two new species of *Curcuma* (Zingiberaceae) used as cobra-bite antidotes. *Journal of Systematic and Evolution* 46(1): 80-88.

Chaveerach, A., Tane, T. and Sudmoon, R. 2011. Molecular identification and barcodes for the genus *Nymphaea*. *Acta Biologica Hungarica* 62(3): 328-340.

Chaveerach, A., Kritpetcharat, O., Khemtonglang, N., Kritpetcharat, P., Daduang, J., Daduang, S., Suwanrungruang, K., Bletter N. and Sudmoon, R. 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. *Medicinal Plants Research* 5(15): 3480-3487.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and De Waard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the*

- Royal Society of London, Series B, Biological Sciences 270: 313-321.
- Hollingsworth, P.M., Forrest, L.L., Spouge, J.L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M.W., Cowan, R.S., Erickson, D.L., Fazekas, A.J., Graham, S.W., James, K.E., Kim, K.J., Kress, W.J., Schneider, H., van Alphen Stahl, J., Barrett, S.C., van den Berg, C., Bogarin, D., Burgess, K.S., Cameron, K.M., Carine, M., Chacón, J., Clark, A., Clarkson, J.J., Conrad, F., Devey, D.S., Ford, C.S., Hedderson, T.A., Hollingsworth, M.L., Husband, B.C., Kelly, L.J., Kesanakurti, P.R., Kim, J.S., Kim, Y.D., Lahaye, R., Lee, H.L., Long, D.G., Madriñán, S., Maurin, O., Meusnier, I., Newmaster, S.G., Park, C.W., Percy, D.M., Petersen, G., Richardson, J.E., Salazar, G.A., Savolainen, V., Seberg, O., Wilkinson, M.J., Yi, D.K. and Little, D.P. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 12794-12797.
- Kress, W.J., Wurdack, K. J., Zimmer, E.A, Weigt, L.A. and Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 102(23): 8369-8374.
- Middleton, D.J. 1999. Apocynaceae - *Allamanda*. *Flora of Thailand*. 7(1): 70- 72.
- Newmaster, S.G., Fazekas, A.J., Steeves, A.J. and Janovec, J. 2008. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Mol. Ecol. Resou* 8: 480-490.
- Pingtao, L., Leeuwenberg, A.J.M. and Middleton, D.J. 1995. Apocynaceae. *Flora of Chaina*. 16: 143-188.
- Porebski, S., Bailey, L.G. and Baum B.R. 1997. Modification of a CTAB extraction protocol for plants containing high polysaccharides and polyphenol component. *Plant Molecular Biology Reporter* 15: 8-15.
- Rohlf F.J. 1998. NTSYS_pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Applied Biostatistics Inc., New York.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011).MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods . *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731-2739.
- Weier, T.E., Stocking, C.R, Barbour, M.G. and Rost, T.L. 1982. *Botany: An Introduction to Plant Biology*. John Wiley & Sons, New York.