



รายงานการวิจัย

เครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะกับพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย

Species specific markers of the genus *Piper* in Thailand

รศ.ดร.อรุณรัตน์ ฉวีราช

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

600253344

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



248916

รายงานการวิจัย

เครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะกับพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย

Species specific markers of the genus *Piper* in Thailand

รศ.ดร.อรุณรัตน์ ฉวีราช

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น



ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552
จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น

พืชสกุลพริกไทย (genus *Piper*) หลายชนิดมีความสำคัญอย่างมากทางด้านเศรษฐกิจและวัฒนธรรม มีการรายงานความหลากหลายชนิดและข้อมูลด้านพฤกษศาสตร์พื้นบ้านของพืชสกุลนี้ในประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง บางชนิดได้นำมาใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้าน ด้วยประโยชน์นานัปการและความยุ่งยากในการระบุชนิดพืชผู้วิจัยจึงได้รวบรวมตัวอย่างพืชตามที่มีรายงานไว้พร้อมกับได้สำรวจชนิดใหม่เพิ่มเติมด้วยในช่วงแรกของงานวิจัยนี้ผู้วิจัยเก็บตัวอย่างพืชได้ทั้งหมด 73 ตัวอย่าง จาก 37 ชนิด และสกัดดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้วเพื่อสร้างเครื่องหมายพันธุกรรมต่อไป การค้นพบที่สำคัญของผู้วิจัยคือ ได้พบ *P. rubroglandulosum* Chaveer. & Mokkamul ซึ่งเพิ่งรายงานเป็นพืชชนิดใหม่เมื่อไม่นานมานี้แต่ไม่มีรายละเอียดของต้นพืชเปีย ใน การสำรวจครั้งนี้ผู้วิจัยพบต้นพืชเปียที่ศูนย์พัฒนาและส่งเสริมการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าเขาพระแหวง จังหวัดภูเก็ต ในภาคใต้ของไทย ผู้วิจัยจึงได้บรรยายลักษณะช่อดอกพืชเปีย ลักษณะดอก รวมทั้งผลด้วย นอกจากนี้ผู้วิจัยยังพบพืชชนิดใหม่อีกหนึ่งชนิดคือ *P. protrusum* Chaveer. & Tanee, sp. nov. ซึ่งพืชชนิดนี้ผู้วิจัยได้พบตั้งแต่ปี พ.ศ. 2547 ที่ภาคใต้ของไทย แต่ไม่เคยพบดอกหรือผลเลย จึงได้เดินทางไปสำรวจในแหล่งที่พบหลายครั้งจนกระทั่งพบดอกในการสำรวจครั้งนี้ พืชชนิดใหม่นี้มีลักษณะเด่นคือมีกิ่งสามแบบซึ่งมีลักษณะใบแตกต่างกัน มีเอกลักษณ์คือฐานรองดอกนูนขึ้นรองรับใบประดับที่แต่ละอันมีเกสรเพศผู้ 9 อัน เมื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยข้อมูลสายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับพืชที่มีลักษณะใกล้เคียงกันอีก 5 ชนิด ได้ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดใหม่กับชนิดอื่นๆ มีค่าระหว่าง 0.25 ถึง 0.34 ซึ่งข้อมูลระดับโมเลกุลนี้สนับสนุนลักษณะทางสัณฐานวิทยาว่าพืชนี้เป็นพืชชนิดใหม่ ดังนั้นผู้วิจัยจึงบรรยายลักษณะพืชพร้อมทั้งได้สร้างข้อมูลเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA barcoding) ไว้เพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นได้บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ใน accession numbers GU980898 สำหรับจีน *rpoB*, GU980899 สำหรับจีน *rpoC1* และ GU980900 สำหรับบริเวณ *psbA-trnH* จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าแม้จะมีการสำรวจพืชสกุลนี้มากกว่า 10 ปี แต่ก็ยังมีการค้นพบข้อมูลใหม่และพืชชนิดใหม่อยู่เสมอ ผู้วิจัยจึงคิดว่ายังมีตัวอย่างพืชอีกมากที่ยังสำรวจไม่พบ นอกจากนั้นแล้วควรจะได้มีการรวบรวมข้อมูลการใช้ประโยชน์และข้อมูลระดับโมเลกุลของพืชแต่ละชนิดไว้ในฐานข้อมูลที่เปิดเผยต่อสาธารณชนด้วย ในช่วงต่อไปของงานวิจัยนี้ต้องสร้างเครื่องหมายพันธุกรรมที่จำเพาะกับพืชแต่ละชนิด ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้กับงานที่ยังมีงานอีกมากที่ต้องทำในพืชกลุ่มนี้

คำสำคัญ พืชสกุลพริกไทย พืชชนิดใหม่ เครื่องหมายดีเอ็นเอ บาร์โค้ด

Many species in genus *Piper* are of great economic and cultural importance. Species diversity and ethnobotany of the genus in Thailand have been continuously reported. Some of them have been used as traditional medicines. Because of their importance and difficulty for identification we collected the samples followed the previous reports for molecular study. Additional species diversity record was taken into account. In the first period of this study, 73 samples of 37 species have been collected and DNA extracted. Interestingly, *P. rubroglandulosum* Chaveer. & Mookamul recently published as a new species without pistillate plant data was explored. The pistillate spike, pistillate flowers and fruits were described and illustrated based on pistillate plants found in the Khao Phra Thaeo Wildlife Conservation Development and Extension Center, Phuket Province, southern Thailand. Moreover, *P. protrusum* Chaveer. & Tanee, sp. nov. had been discovered. It was found in the areas of southern Thailand since 2004 without reproductive parts. The investigated sites have been revisited for several times, finally its flowers have been observed. The new species dominantly comprises of three branching types with three different types of leaf blades, bases and apexes. The critical distinguished character is the protruded receptacle having a bract and 9 stamens on it. Phylogenetic analysis of the new species and five similar species was performed based on DNA fingerprinting. The genetic distances between the new species and five similar species range from 0.25 to 0.34 supporting new species designation. Molecular data conform to morphological data that it is surely a new species. Additionally, its DNA barcodes have been provided for further identification incase of contiguous. The sequence data have been submitted to the GenBank database under accession numbers GU980898 (*rpoB* gene), GU980899 (*rpoC1* gene) and GU980900 (*psbA-trnH* region). Although the genus has been investigated for over ten years in Thailand, new species, new varieties and new records are continuously found. We expected that there are some more specimens that have not been explored. Additionally, their usages and molecular data should be provided and made available for publicity. Further period of this study, genetic markers will be performed for each species which is useful for many works have to be conducted on this account.

Keywords *Piper*, new species, DNA marker, Barcode

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
วัตถุประสงค์การวิจัย	6
ขอบเขตการวิจัย	6
สรุปวิธีดำเนินการวิจัยและแนวคิดในการวิจัย	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
วิธีดำเนินการวิจัย	7
แผนการดำเนินงานโครงการวิจัย	7
การเก็บตัวอย่างและการระบุชนิด	8
การสกัดดีเอ็นเอ	8
การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	10
การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด	11
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	12
ผลการวิจัย	13
ความหลากหลายของพืชสกุลพริกไทย	13
การค้นพบรายละเอียดเพิ่มเติมของ <i>Piper rubroglandulosum</i>	19
การค้นพบพืชชนิดใหม่ <i>Piper protrusum</i>	21
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอให้ข้อมูลเพื่อประกอบการระบุชนิด	24
เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด	33
อภิปรายผลการวิจัย	37
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย	39
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	43
ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติฉบับที่ 1	43
ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติฉบับที่ 2	47

สารบัญตาราง

	หน้า	
รูปที่ 1	แผนที่แบ่งเขตภูมิศาสตร์พืชพรรณแสดงแหล่งกระจายพันธุ์	14
รูปที่ 2	ตัวอย่างพืช	16
รูปที่ 3	ต้นเพศเมียของ <i>Piper rubroglandulosum</i> Chaveer. & Mokkamul	19
รูปที่ 4	ภาพลายเส้นของ <i>Piper rubroglandulosum</i> Chaveer. & Mokkamul	20
รูปที่ 5	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ P1, P2, P3 และ P4 ของพืชชนิดใหม่ (<i>Piper</i> sp. 2) และชนิดที่นำมาเปรียบเทียบ	25
รูปที่ 6	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ P5, P6, P7 และ C4 ของพืชชนิดใหม่ (<i>Piper</i> sp. 2) และชนิดที่นำมาเปรียบเทียบ	26
รูปที่ 7	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ C5, C6, C7 และ R8 ของพืชชนิดใหม่ (<i>Piper</i> sp. 2) และชนิดที่นำมาเปรียบเทียบ	27
รูปที่ 8	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ R9, R10, R11 และ R12 ของพืชชนิดใหม่ (<i>Piper</i> sp. 2) และชนิดที่นำมาเปรียบเทียบ	28
รูปที่ 9	เดนโตรแกรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 16 ไพรเมอร์ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Fingerprinting II (Bio-Rad) แสดงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการของพืชชนิดใหม่ (<i>P. protrusum</i>) และชนิดที่นำมาเปรียบเทียบ	29
รูปที่ 10	ต้นเพศผู้ของ <i>Piper protrusum</i> Chaveer. & Tanee	31
รูปที่ 11	ภาพลายเส้นของ <i>Piper protrusum</i> Chaveer. & Tanee	32
รูปที่ 12	แถบดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดจากบริเวณ <i>rpoB</i> , <i>rpoC1</i> และ <i>psbA-trnH</i> ของพืชชนิดใหม่ <i>Piper protrusum</i>	33
รูปที่ 13	ข้อมูลใน GenBank database ของบริเวณจีน <i>rpoB</i> จาก <i>Piper protrusum</i>	34
รูปที่ 14	ข้อมูลใน GenBank database ของบริเวณจีน <i>rpoC1</i> จาก <i>Piper protrusum</i>	35
รูปที่ 15	ข้อมูลใน GenBank database ของบริเวณ <i>psbA-trnH</i> intergenic spacer จาก <i>Piper protrusum</i>	36

สารบัญญภาพ

	หน้า	
ตารางที่ 1	แผนการดำเนินงานตลอดระยะเวลา 2 ปี	7
ตารางที่ 2	ส่วนประกอบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	10
ตารางที่ 3	ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด	11
ตารางที่ 4	ส่วนประกอบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันเพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด	11
ตารางที่ 5	ชนิดพืช จำนวนตัวอย่างที่เก็บได้ และสถานที่เก็บตัวอย่าง	15
ตารางที่ 6	เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>Piper</i> sp. 2 กับพืชอีก 5 ชนิด ซึ่งมีลักษณะคล้ายกัน รวมทั้งอีก 1 ชนิด ที่ไม่คล้ายกันเลย	22
ตารางที่ 7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชัดเจนในทุกตัวอย่างที่ศึกษา	24
ตารางที่ 8	ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก 16 ไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม Fingerprinting II (Bio-Rad)	30