ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) มีความแปรปรวนน้อย

Low Nucleotide Sequence Variation in the Region of ITS1 of Para Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

น้ำอ้อย ใจแสน และ ชูตา บุญภักดี*

Numoi Chaisan and Chuta Boonphakdee*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Biology Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 11 June 2017

Accepted : 13 July 2017

Published online : 25 July 2017

บทคัดย่อ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญที่ประเทศไทยส่งเป็นสินค้าออกอันดับหนึ่งของโลก ปัจจุบันการระบุสายพันธุ์ของยางพาราทำได้โดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาซึ่งจำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการตรวจสอบ งานวิจัยนี้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) ของยางพาราจำนวน 10 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) และอ่านลำดับเบส เพื่อพัฒนาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในระดับสายพันธุ์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ของยางพาราทุกสายพันธุ์มีขนาด 503 คู่เบส บริเวณ ITS1 มีขนาดเท่ากับ 226 คู่เบส มีลำดับเบสต่างกัน 2 ตำแหน่ง 0.88 เปอร์เซ็นต์ (2/226) แสดงว่าบริเวณ ITS1 ระหว่างสายพันธุ์ของยางพารามีความแปรปรวนต่ำ ดังนั้นบริเวณ ITS1 ไม่สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการระบุสายพันธุ์ยางพาราได้

คำสำคัญ : เครื่องหมายดีเอ็นเอ ยางพารา Internal Transcribed Spacer 1 ITS1 PCR

Abstract

Para rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) is an important economic crop of Thailand which currently is the world's top exporter. However, the conventional morphological characterization of the para rubber tree requires specialists. This study aims to use molecular genetic analysis of the Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) region of ten para rubber cultivars by using Polymerase chain reaction (PCR) technique and sequencing as a cultivar DNA marker. The PCR products of all cultivars were 503 base pairs in length and size of the ITS1 region is 226 base pairs, with 0.88% difference (2/226) indicating low variation between cultivars. Therefore, the ITS1 region is not a suitable DNA marker for the para rubber tree identification at the cultivar level.

Keywords : DNA marker, rubber tree, Internal Transcribed Spacer 1, ITS1, PCR

***Corresponding author. E-mail** : chuta@buu.ac.th

บทนำ

ยางพารา (para rubber tree, *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) เป็นพืชที่ลำต้นให้น้ำยาง (latex crops) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ ที่ประเทศไทยส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของโลก (Sawatdikarn, 2014) ปัจจุบันมีความต้องการใช้ยางพาราและผลิตภัณฑ์จากยางในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง Rubber Authority of Thailand (2016) จำแนกยางพาราตามวัตถุประสงค์ของการใช้ประโยชน์โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มพันธุ์ยางเพื่อผลผลิตน้ำยาง เป็นพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตน้ำยางสูง เช่น สายพันธุ์ BPM24, RRIT251 และ RRIT226 2) กลุ่มพันธุ์ยางเพื่อผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้ เป็นพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตน้ำยางและเนื้อไม้สูง เช่น สายพันธุ์ PB235 และ PB260 และ 3) กลุ่มพันธุ์ยางเพื่อผลผลิตเนื้อไม้ เป็นพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตเนื้อไม้สูง เช่น สายพันธุ์ AVROS2307 และ BPM1 จากการที่ยางพาราแต่ละสายพันธุ์มีข้อจำกัดของการใช้ประโยชน์แตกต่างกัน ฉะนั้นเกษตรกรผู้ปลูกยางพาราจึงมีความจำเป็นต้องคัดเลือกพันธุ์ให้ถูกต้องและตรงตามลักษณะที่ต้องการ แต่อย่างไรก็ตามการคัดเลือกพันธุ์ยางพาราโดยใช้ลักษณะภายนอก เช่น รูปร่างใบ สีของใบ ลักษณะของฉัตร รูปร่างทรงพุ่ม การแตกกิ่ง ความต้านทานต่อโรค และความต้านทานต่อสภาพแวดล้อม จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญ และใช้เวลานาน

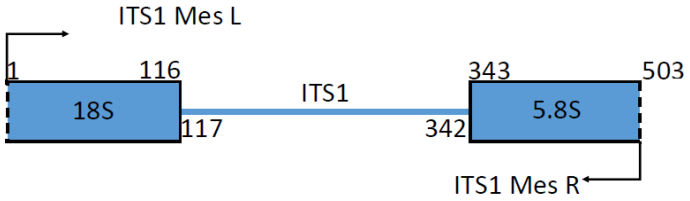
ในปัจจุบัน มีการประยุกต์ใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมของพืชในการจัดจำแนกและระบุชนิดที่ทำได้รวดเร็ว และมีความถูกต้องแม่นยำมากกว่าการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา (Kress & Erickson, 2012; Li *et al*., 2015) โดยเฉพาะข้อความพันธุกรรมบริเวณ ITS1 (internal transcribed spacer 1) ที่อยู่ระหว่างไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (rDNA) ชนิด 18S และ 5.8S ซึ่งเป็นช่วงดีเอ็นเอที่มีความยาวไม่มากนัก และข้อมูลพันธุกรรมมีความแปรผันที่สามารถใช้จำแนกชนิดในพืชได้หลายชนิด (Wang *et al*., 2015) รวมถึงระดับสายพันธุ์ได้ เช่น *Ficus carica* L. (Ghada *et al*., 2009) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ที่สมบูรณ์ของยางพาราจำนวน 10 สายพันธุ์ เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ เพิ่มเติมจากที่มีการศึกษาไว้แล้ว (Chaiprasit & Boonphakdee, 2014) ในบางส่วนของบริเวณ ITS1 ที่มีขนาดประมาณ 60 คู่เบส ไรโบโซมอลดีเอ็นเอชนิด 5.8S และบางส่วนของบริเวณ ITS2 (ระหว่าง 5.8S และ 28S) และพบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของยางพาราเพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้น

วิธีดำเนินการวิจัย

สายพันธุ์ยางพาราที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพันธุ์ยางพารา ตำบลลาดกระทิง อำเภอสนามชัยเขต จังหวัดฉะเชิงเทรา ได้แก่ สายพันธุ์ 1) PB235 2) PB255 3) PB260 4) BPM24 5) RRIT226 6) RRIT251 7) RRIT402 8) RRIT408 9) BANGPID และ 10) SONGKRA36 และตัวอย่างนอกกลุ่มที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เดียวกันกับยางพาราอีก 2 ชนิด คือ มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) และละหุ่ง (*Ricinus communis* L.) และพืชต่างวงศ์ 1 ชนิด คือ ถั่วเขียว (*Vigna radiata* L.)

ทำการเตรียมดีเอ็นเอทั้งหมด (Total DNA) จากใบอ่อนของพืชโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จ SP Plant DNA Kit (Omega biotek, USA) ภายหลังตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอแล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ด้วยไพรเมอร์ ITS1 Mes L 5’ TCG CTC CTA CCG ATT GAA TG 3’ และ ITS1 Mes R 5’ GCA ACT TGC GTT CAA AGA CTC 3’ ที่ออกแบบขึ้นใหม่ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลัง (GenBank accession no. JQ743203) โดยมีขั้นตอน pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94ºC เป็นเวลา 2 นาที denaturation ที่อุณหภูมิ 94ºC เป็นเวลา 45 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 62ºC เป็นเวลา 10 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72ºC เป็นเวลา 20 วินาที ปฏิกิริยาทำจำนวนทั้งหมด 30 รอบ และ final extension อุณหภูมิ 72ºC เป็นเวลา 7 นาที แล้วนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย 1%

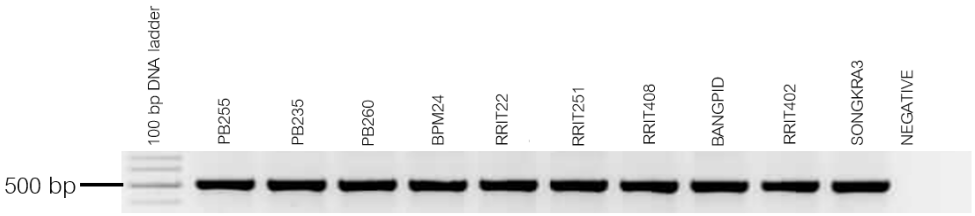
อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสที่ความต่างศักย์ 60 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas, Germany) ผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์ส่งวิเคราะห์อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์ ที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้งแล้วเทียบเคียงความเหมือนกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ผ่านระบบเครือข่ายอินเตอร์เน็ต (www.ncbi.nlm.nih.gov/) และเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของยางพาราทั้งหมด 10 สายพันธุ์ วิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยโปรแกรม MEGA version 6 (Tamura *et al*., 2013)



ภาพที่ 1 ตำแหน่งของไพรเมอร์ (ITS1 Mes L และ ITS1 Mes R) และบริเวณ ITS1 ระหว่างยีน 18S และ 5.8S *rRNA* ของยางพารา

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ ITS Mes L และ ITS Mes R และอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ของยางพาราทุกตัวอย่างมีขนาดเท่ากับ 503 คู่เบส (ภาพที่ 1) เมื่อนำมาเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank ของ *Plukenetia loretensis* (accession no. KP794453) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เช่นเดียวกับยางพารา พบว่าบริเวณ ITS1 ของยางพารามีขนาดเท่ากับ 226 คู่เบส โดยทั้ง 10 สายพันธุ์มีลำดับเบสแตกต่างกัน 2 ตำแหน่ง (0.88%) คือ ตำแหน่งที่ 114 พบเบส T ในยางพาราสายพันธุ์ PB235, RRIT226, RRIT251, RRIT402 และ BANGPID และตำแหน่งที่ 226 พบเบส T ในยางพาราสายพันธุ์ PB235, RRIT251, RRIT402, RRIT408 และ BANGPID (ภาพที่ 3) มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0-0.005 แสดงว่าภายในชนิดเดียวกันมีความแปรปรวนต่ำ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับพืชในวงศ์เดียวกัน คือมันสำปะหลัง ละหุ่ง และ *P. loretensis* มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.118-0.410 และพืชต่างวงศ์ คือถั่วเขียว และองุ่นแดง (*Vitis vinifera* L.) (GenBank accession no. AF365988) พบว่ามีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.738-1.033 ดังตารางที่ 1 จะเห็นว่าบริเวณ ITS1 ของยางพารานั้นไม่สามารถใช้แยกระหว่างสายพันธุ์ได้ สอดคล้องกับ Chaiprasit and Boonphakdee (2014) ที่ศึกษาบางส่วนของ ITS1 และ ITS2 และไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ และมีตัวอย่างการใช้บริเวณ ITS1 เพื่อระบุชนิดของพืช เช่น เครื่องยาเร่วน้อย (*Amomum uliginosum*) (Rinthong *et al*., 2014) เร่วใหญ่ (Rinthong *et al*., 2013) หรือใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ บริเวณ ITS1 ร่วมกับยีน *matK* ระบุชนิดของ *Hypericum perforatum* และ *H. androsaemum* (Costa *et al*., 2016) นอกจากนี้ บริเวณ ITS ยังถูกนำมาใช้เพื่อจำแนกชนิดของพืชดอก (China Plant BOL Group, 2011) ในวงศ์ดอกดิน (Pterygiella) (Dong *et al*., 2011) และวงศ์ค่าหด (Juglandeceae) ได้ (Xiang *et al*., 2011) เป็นต้น ในขณะที่มีตัวอย่างการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *caffeate O-methyl-transferas* และยีน *Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase* สามารถจำแนกยางพาราได้ 7 สายพันธุ์ (Yameun & Boonphakdee, 2013) และ 8 สายพันธุ์ (Waraput & Boonphakdee, 2013) จากจำนวนทั้งหมด 10 สายพันธุ์



ภาพที่ 2 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนในปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ ITS1 Mes L และ ITS1 Mes R ขนาด 503 คู่เบส ของยางพารา 10 สายพันธุ์ ตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสที่ความเข้มข้น 1% ความต่างศักย์ 60 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

```
                10        20        30        40        50        60        70        80
                |....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
PB255           TCGAAACCTG CTCCGCAGAA CGACCCGCGA ACGCGTCCAC AAACGCGGGG ACCGCGGGGG CCTTCGGTCC CCCGTCGCCC  80
PB235           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  80
RRIT226         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  80
RRIT402         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  80
RRIT251         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  80
BANGPID         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  80
RRIT408         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  80
PB260           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  80
SONGKLA36       .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  80
BPM24           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  80

                90        100       110       120       130       140       150       160
                |....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
PB255           CGAAAGGTCG GGGAAGCAGG CTGGGCCTCG CCCCGCCGGC TCTCCGCGGC CCTAACAACC AACCCCGGCG CGAGAAGCGC  160
PB235           .......... .......... .......... ...T...... .......... .......... .......... ..........  160
RRIT226         .......... .......... .......... ...T...... .......... .......... .......... ..........  160
RRIT402         .......... .......... .......... ...T...... .......... .......... .......... ..........  160
RRIT251         .......... .......... .......... ...T...... .......... .......... .......... ..........  160
BANGPID         .......... .......... .......... ...T...... .......... .......... .......... ..........  160
RRIT408         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  160
PB260           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  160
SONGKLA36       .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  160
BPM24           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ..........  160

                170       180       190       200       210       220
                |....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|.
PB255           CAAGGAACAT GAAACGAAAA AGAGCGCGCT CCCGTTCGGG ACGCGTCGTC CTCTTTCGAG AACCAG 226
PB235           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .....T 226
RRIT226         .......... .......... .......... .......... .......... .......... ...... 226
RRIT402         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .....T 226
RRIT251         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .....T 226
BANGPID         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .....T 226
RRIT408         .......... .......... .......... .......... .......... .......... .....T 226
PB260           .......... .......... .......... .......... .......... .......... ...... 226
SONGKLA36       .......... .......... .......... .......... .......... .......... ...... 226
BPM24           .......... .......... .......... .......... .......... .......... ...... 226
```

ภาพที่ 3 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของยางพาราขนาด 226 คู่เบส สัญลักษณ์จุด (.) หมายถึง ลำดับนิวคลีโอไทด์ชนิดเดียวกันในตำแหน่งตรงกัน

ตารางที่ 1 ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1 ของยางพาราเปรียบเทียบกับพืชในวงศ์ Euphorbiaceae เดียวกันและต่างวงศ์ คือ Vitaceae และ Fabaceae

Cultivar	Family Euphorbiaceae			Family Vitaceae	Family Fabaceae
	Manihot esculenta	*Plukenetia loretensis*	*Ricinus communis*	*Vitis vinifera*	*Vigna radiata*
PB235 RRIT226 RRIT402 RRIT251 BANGPID	0.123	0.378	0.410	0.752	1.033
PB255 RRIT408 PB206 SONGKLA36 BPM24	0.118	0.369	0.401	0.738	1.012

สรุปผลการวิจัย

บริเวณ ITS1 ของยางพาราทั้ง 10 สายพันธุ์มีขนาดเท่ากันคือ 226 คู่เบส มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 2 ตำแหน่ง แสดงว่าบริเวณ ITS1 ของยางพารามีความแปรปรวนต่ำ ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการระบุเอกลักษณ์ในระดับสายพันธุ์ได้

เอกสารอ้างอิง

Chaiprasit, L. & Boonphakdee, C. (2014). Internal transcribed spacer sequences of the para rubber tree. In *Proceedings The 6th National Science Research Conference, 20-21 March, 2014*. (pp166-169). Burapha University, Chonburi, Thailand. (in Thai)

China Plant BOL Group. (2011). Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(49), 19641-19646.

Costa, J., Campos, B., Amaral, J.S., Nunes, M.E., Oliveira, M.B., & Mafra, I. (2016). HRM analysis targeting ITS1 and matK loci as potential DNA mini-barcodes for the authentication of *Hypericum perforatum* and *Hypericum androsaemum* in herbal infusions. *Food Control*, *61*, 105-114.

Dong, L., Wortley, A., Wang, H., Li, D., & Lu, L. (2011). Efficiency of DNA barcodes for species delimitation: A case in *Pteryfuella* Oliv. (Orobanchaceae). *Journal of Systematics and Evolution*, *49*(3), 189-202.

Ghada, B., Olfa, S., Khaled, C., Messaoud, M., Mohamed, M., Mokhtat, T., & Amel, S.H. (2009). Sequence analysis of the internal transcribed spacers (ITSs) region of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) in fig cultivars (*Ficus carica* L.). *Scientia Horticulture*, *120*, 34-40.

Kress, W.J., & Erickson, D.L. (Eds.). (2012). *DNA Barcodes: Methods and Protocols,* Human Press, New York.

Li, X., Yang, Y., Henry, R.J., Rossetto, M., Wang, Y., & Chen, S. (2015). Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biological Review*, *90*, 157-166.

Rinthong, P., Paktipat W., Lertsatitthanakorn, P., & Caichompoo, W. (2014). Identification of reo noi (*Amomum uliginosum* K.D. Koenig) crude drug using ITS1 DNA marker of nuclear DNA. *Isan Journal of Pharmaceutical Sciences*, *10*(1), 32-41. (in Thai)

Rinthong, P., Pianchana, P., & Caichompoo, W. (2013). Botanical origin of reoyai based on the internal transcribed spacer 1 nucleotide sequence data of nuclear DNA. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*, *8*(3), 93-97. (in Thai)

Rubber Authority of Thailand. (2016). Recommended Rubber tree verities. *Para Rubber electronic bullettin*, *37*(2), 2-41. (in Thai)

Sawatdikarn, S. (2014). *Industrial field crop.* Bangkok: Odian Store Limited Partnership. (in Thai)

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology Evol*ution, *30*(12), 2725-2729.

Wang, X., Liu, C., Huang, L., Bengtsson-Palme, J., Chen, H., Zhang, J., Cai, D., & Li, J. (2015). ITS1: a DNA barcode better than ITS2 in eukaryotes?. *Molecular Ecology Resources*, *15*, 573-586.

Waraput, O., & Boonphakdee, C. (2013). Genetic Diversity of the Para Rubber Tree (*Heveabra silliensis Muell* Arg.) Base on partial sequence of Cinnamyl alcohol dehydrogenase gene. *Thai Journal of Genetics*, *S1*, 218-221. (in Thai)

Xiang, X., Zhang, J., Lu, A., & Li, R. (2011). Molecular identification of species in Juglandaceae: A tired method. *Journal of Systematics and Evolution*, *49*(3), 252-260.

Yameun, N., & Boonphakdee, C. (2013). DNA fingerprint of the para rubber trees (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) based on partial sequences of the caffeate o-methyl-transferase gene. *Thai Journal of Genetics*, *S*1, 262-265. (in Thai)