การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตาด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

Assessment of Genetic Relationship and Identification of *Dendrobium* Section Callista Using Nucleotide Sequences of *rbc*L Gene and *trn*H-*psb*A Intergenic Spacer Region

ฐิตาพร มณีเนตร และธีระชัย ธนานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Thitaporn Maneenet and Theerachai Thanananta

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Narumol Thanananta*

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,
Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลหวายเป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่นิยมปลูกเลี้ยงกันเป็นจำนวนมาก และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ปัจจุบันการจำแนกชนิดของกล้วยไม้ด้วยลักษณะสัณฐานทำได้ยาก และสามารถเกิดความผิดพลาดสูง ซึ่งจำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการจำแนก งานวิจัยนี้จึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา จำนวน 17 ชนิด โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แล้วตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW จากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7 ผลการศึกษาพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A สามารถจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา 7 และ 15 ชนิด ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีน ร่วมกัน พบว่าจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายหมู่แคลิสตาได้ทั้ง 17 ชนิด

*Corresponding author: narumolpla@yahoo.com

คำสำคัญ : กล้วยไม้สกุลหวาย; หมู่แคลิสตา; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; ยีน *rbc*L; ชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

Abstract

Dendrobium is the largest genus of orchid. Besides requiring the specialists, morphological identification of orchid species is quite difficult with high error. Therefore, the nucleotide sequences of the specific sites of plastid genes were used to identify 17 species of *Dendrobium* Section Callista. The plastid genes, *rbc*L gene and *trn*H-*psb*A intergenic spacer region were amplified and sequenced. All sequences were aligned by ClustalW and analyzed genetic relationship using MEGA7. The phylogenetic tree constructing based on the nucleotide sequences of *rbcL* gene *and trnH-psbA* intergenic spacer region could distinguish 7 and 15 out of 17 species, respectively. However, when analyzing both genes together, we found that all of 17 species were distinguished.

Keywords: *Dendrobium*; Callista; genetic relationship; *rbc*L; *trn*H-*psb*A

1. คำนำ

กล้วยไม้มีความหลากหลายทั้งสีสัน ลวดลาย ขนาด รูปทรง และกลิ่น จึงเป็นไม้ตัดดอกยอดนิยมไปทั่วโลก โดยข้อมูลจากกระทรวงพาณิชย์ระบุว่ากล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ทำรายได้เข้าประเทศหลายพันล้านบาทต่อปี และตลาดกล้วยไม้ยังสามารถขยายตัวเพิ่มขึ้นได้อีกมาก ซึ่งจากการสำรวจกล้วยไม้ส่งออกที่สำคัญของประเทศไทย พบว่ากล้วยไม้สกุลหวายเป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุด และนิยมปลูกกันเป็นจำนวนมาก ประเทศไทยสำรวจพบกล้วยไม้สกุลหวายในธรรมชาติมากกว่า 130 ชนิด มีรูปร่างลักษณะทั้งดอก ใบ และลำลูกกล้วยต่างกันไป บางชนิดมีสีและใบคล้ายกัน แต่มีดอกแตกต่างกัน ดังนั้นจึงมักสับสนได้ง่าย (มาลินี, 2538) ทำให้เกิดปัญหาต่อการส่งออกกล้วยไม้

ปัจจุบันการจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยใช้ลักษณะสัณฐานมักมีความยากลำบาก จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการจำแนก นอกจากนั้นลักษณะสัณฐานยังขึ้นกับสภาพแวดล้อม ดังนั้นจึงมีแนวคิดในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) และมีโครงการจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ของสิ่งมีชีวิต (Hebert *et al.*, 2003) เพื่อใช้ระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ในทุกระยะของการเจริญเติบโตและไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อนักอนุกรมวิธานและบุคคลทั่วไปที่ไม่มีความชำนาญในการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐาน ต่อมามีการร่วมมือกันมากขึ้นและเกิดเป็นองค์กรทางวิชาการชื่อว่า Consortium for the Barcode of Life (CBOL) ซึ่งจะศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์จีโนม (chloroplast genome) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard DNA) สำหรับจำแนกสิ่งมีชีวิต

ในคลอโรพลาสต์มีตำแหน่งมาตรฐาน 2 บริเวณ คือ ยีน *rbc*L ซึ่งกำหนด การสร้างเอนไซม์ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) หน่วยย่อยใหญ่ (large subunit) ของเอนไซม์ RubisCO และเมื่อรวมกับหน่วยย่อยเล็กแล้วจะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ RuBP กับ CO_2 ในวัฏจักรคาลวิน (Calvin's

cycle) (Soltis and Soltis, 1998) และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A เป็นส่วนปลายของยีน *trn*H ที่กำหนดการสร้าง $tRNA^{his}$ (GUG) ซึ่งจับกับกรดอะมิโนฮีสทิดีน (histidine, H) และส่วนต้นของยีน *psb*A ที่กำหนดการสร้างพอลิเพปไทด์ (polypeptide) ที่เป็นองค์ประกอบของ photosystem II โดยชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A เป็นบริเวณที่นิยมนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งมีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงกว่าตำแหน่งอื่น ๆ ในคลอโรพลาสต์จีโนมประมาณ 3-4 เท่า (Kress *et al.*, 2005; Kress and Erickson, 2007)

การใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานเพียงบริเวณเดียว (single locus) เพื่อระบุชนิดพืชชนิดต่าง ๆ ให้ผลไม่ดีนัก อย่างไรก็ตาม กลุ่มนักวิจัยต่าง ๆ พบว่าการใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานมากกว่า 1 บริเวณ (multi loci) มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ระบุพืชกลุ่มต่าง ๆ ได้ดีกว่า ดังนั้นจึงเสนอให้ใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานร่วมกันเป็น 2-3 บริเวณ (Kress and Erickson, 2007; Newmaster *et al.*, 2008; CBOL Plant WorkingGroup, 2009)

การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ซึ่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้นฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและการจำแนกชนิดกล้วยไม้ในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการ

1.1 ตัวอย่างกล้วยไม้ที่ใช้ในการศึกษา

กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา จำนวน 17 ชนิด ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้แสดงดังตารางที่ 1

1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ด้วยวิธีที่ประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธีของนฤมล และคณะ (2555) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) (Sambrook *et al.*, 1989)

1.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

เจือจางดีเอ็นเอของกล้วยไม้ที่สกัดได้ทั้ง 17 ชนิด ให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/µl) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะ คือ ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A โดยทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR, polymerase chain reaction) ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.1), 0.1 % Triton™ X-100 และ 2.5 mM $MgCl_2$) มีนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (µM) ไพรเมอร์สากล (universal primer) ที่จำเพาะ 250 นาโนโมลาร์ (nM) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *rbc*L (*rbc*L-F: 5′-TCACCACAAACAGAAACTAAAGC-3′, *rbc*L-R: 5′-GGCACAAAATAAGAAACGATCTC -3′) และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A (*trn*H: 5′-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3′, *psb*A: 5′- GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3′) ปริมาณ 250 นาโนโมลาร์ (nM) เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis Technologies Sdn Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (Unit) และน้ำ รวมปริมาตรสุทธิ 40 ไมโครลิตร (นฤมล และคณะ, 2558)

1.3 การวิเคราะห์ผล

ตารางที่ 1 ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา 17 ชนิด ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ลำดับ	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์	
			*rbc*L	*trn*H-*psb*A
1	เอื้องมัจฉา	*D. palpebrae* Lindl.	KU574243	MF437021
2	เอื้องมัจฉานุ	*D. farmer* Paxton	KU574244	MF437022
3	เอื้องมัจฉาเหลือง	*D. griffithianum* Lindl.	KU574245	MF437023
4	เอื้องม่อนไข่	*D. thyrsiflorum* Rchb.f.	KU574246	MF579381
5	เอื้องม่อนไข่เหลี่ยม	*D. densiflorum* Lindl.	KU574247	MF579382
6	เอื้องคำ	*D. chrysotoxum* Lindl.	KU574248	MF437024
7	เอื้องคำตาดำ	*D. chrysotoxum* var. suavissimum	KU574249	MF437025
8	เอื้องผึ้ง	*D. lindleyi* Steud.	KU574250	MF437026
9	เอื้องจำปาน่าน	*D. sulcatum* Lindl.	KU574251	MF579383
10	เอื้องคำฝอยป่าย	*D. brymerianum* Rchb.f.	KU574252	MF579384
11	เอื้องผาเวียง	*D. albosanguineum* Lindl.	KU574253	MF579385
12	เอื้องคำปากไก่	*DD. trigonopus* Rchb.f.	KU574254	MF579386
13	เอื้องคำป๊อก	*D. harveyanum* Rchb.f.	KU574255	MF437027
14	เอื้องคำผักปราบ	*D. ochreatum* Lindl.	KU574256	MF437028
15	เอื้องคำฝอยอินเดีย	*D. harveyanum* Rchb.f.	KU574257	MF579387
16	เอื้องม่อนไข่ชมพู	*D. amabile* Lindl.	KU574258	MF437029
17	เอื้องผึ้งจิ๋ว	*D. jenkinsii* Wall.ex Lindl.	MF579380	MF579388

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดย บริษัท Bioneer (ประเทศเกาหลีใต้) และตรวจสอบความถูกต้องโดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) แล้วฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไว้ใน GenBank จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม ClustalW (http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw) และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA7 (molecular evolutionary genetics analysis version 7.0) วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตาแต่ละชนิด เลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood และกำหนดค่า bootstrap 1,000 รอบ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา 17 ชนิด ด้วยไพรเมอร์สากล พบว่าเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา ได้ทั้ง 17 ชนิด โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความชัดเจนและมีขนาดตรงตามที่คาดไว้ กล่าวคือ ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbc*L ขนาด

ประมาณ 600 คู่เบส และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ขนาดประมาณ 700-800 คู่เบส

3.2 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา ทั้ง 17 ชนิด แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะดังกล่าวในกล้วยไม้สกุลหวาย 94-100 เปอร์เซ็นต์ จึงยืนยันได้ว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นั้นถูกต้อง จากนั้นได้ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI มีหมายเลขจำเพาะ (accession number) ดังตารางที่ 1

3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ ในกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา ทั้ง 17 ชนิด พบว่ามีการกลายระดับยีน (gene mutation)

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ที่พบความแตกต่างในกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตาแต่ละชนิด

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ที่พบการเปลี่ยนแปลง
พิวรีนทรานสิชัน	222, 262, 388, 395, 414, 426, 567
ไพริมิดีนทรานสิชัน	245, 402, 404, 407, 414, 477, 480
ทรานสเวอร์ชัน	53, 57, 244, 250, 261, 341, 371, 383, 432, 438, 448, 479, 488, 501, 506, 552

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ที่พบความแตกต่างในกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตาแต่ละชนิด

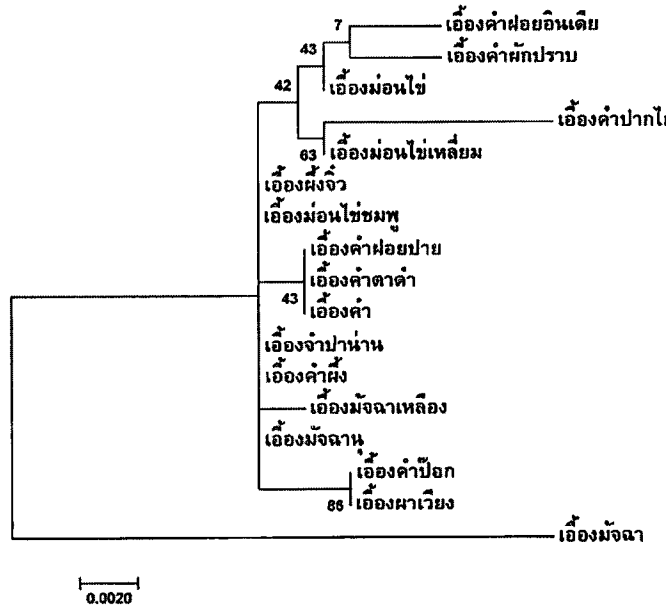
รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ที่พบการเปลี่ยนแปลง
พิวรีนทรานสิชัน	24, 29, 35, 77, 78, 132, 173, 177, 178, 206, 713, 715, 721, 722, 726, 735, 737, 748, 774, 818, 834, 835
ไพริมิดีนทรานสิชัน	27, 28, 30, 33, 41, 45, 47, 50, 59, 60, 66, 68, 83, 84, 111, 131, 156, 219, 221, 604, 608, 633, 718, 824, 827, 828
ทรานสเวอร์ชัน	29, 34-40, 42-49, 51-54, 75, 103, 108-110, 127, 129, 134, 135, 139, 141, 165, 170, 171, 188, 195, 428, 518, 522, 526, 558, 606, 612, 622, 626, 695, 711, 712, 719, 720, 730, 731, 733, 734, 742, 745-747, 756, 766, 774, 795, 800, 802, 819, 831, 834, 844
อินเดล	24-57, 65, 82, 85-103, 121, 122, 132, 133, 145, 148, 164, 170, 177, 180-182, 198, 217, 218, 257, 316, 320, 501-505, 519-554, 624-769, 786, 807, 821, 822, 826, 846, 853, 858, 866, 873-880

เกิดขึ้น โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L มีการกลายเกิดขึ้น 3 รูปแบบ คือ ไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) 7 ตำแหน่ง พิวรีนทรานสิชัน (purine transition) 7 ตำแหน่ง และทรานสเวอร์ชัน (transversion) 16 ตำแหน่ง (ตารางที่ 2)

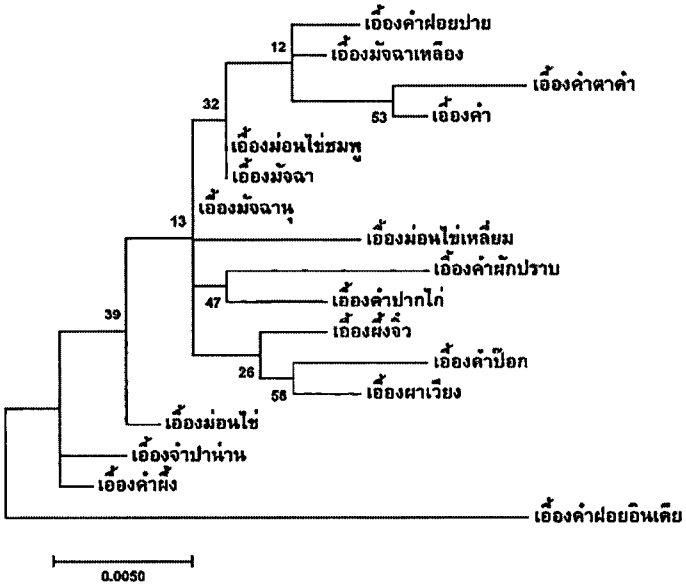
ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A มีการกลายเกิดขึ้น 4 รูปแบบ ได้แก่ พิวรีนทรานสิชัน 22 ตำแหน่ง ไพริมิดีนทรานสิชัน 26 ตำแหน่ง ทรานสเวอร์ชัน 68 ตำแหน่ง และอินเดล (indel, insertion/deletion) 277 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3)

เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 โดยเลือกการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood ได้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังรูปที่ 1 ซึ่งจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา ได้ 7 ชนิด คือ เอื้องคำฝอยอินเดีย เอื้องคำผักปราบ เอื้องม่อนไข่ เอื้องคำปากไก่ เอื้องม่อนไข่เหลี่ยม เอื้องมัจฉาเหลือง และเอื้องมัจฉา

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood ได้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังรูปที่ 2 ซึ่งจำแนกในกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา ได้ 15 ชนิด ได้แก่ เอื้องคำฝอยปาย เอื้องมัจฉาเหลือง เอื้องคำตาดำ เอื้องคำ เอื้องมัจฉานุ เอื้องม่อนไข่เหลี่ยม เอื้องคำผักปราบ เอื้องคำปากไก่ เอื้องผึ้งจิ๋ว เอื้องคำป๊อก เอื้องผาเวียง เอื้องม่อนไข่ เอื้องจำปาน่าน เอื้องคำผึ้ง และเอื้องคำฝอยอินเดีย ซึ่งจะเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A จำแนกได้ดีกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A มีความยาวมากกว่าและเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ซึ่งมีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างสูง จึงใช้จำแนกและระบุชนิดของพืชได้ดีกว่า

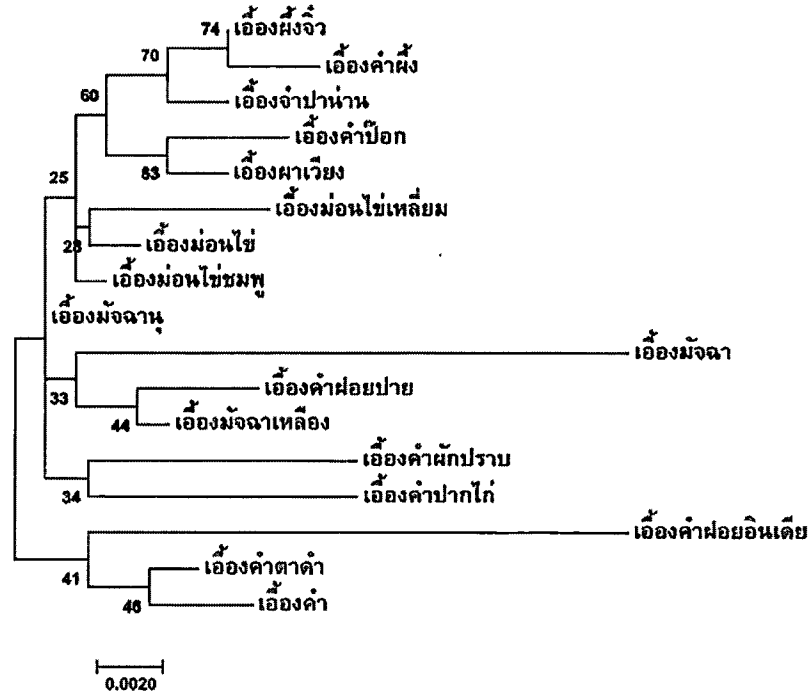


รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ร่วมกัน พบว่าได้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังรูปที่ 3 ซึ่งจำแนกกล้วยไม้ได้ทั้ง 17 ชนิด แต่ก็มีบางชนิดที่แยกออกจากกันได้ไม่ดีนัก เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก บางชนิดไม่มีความแตกต่างกันเลย จึงทำให้ผลการวิเคราะห์มีค่าบูทสแตรปต่ำ อย่างไรก็ตาม การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 2 บริเวณ มาวิเคราะห์ร่วมกันนี้ ทำให้มีประสิทธิภาพในการจำแนกสูงขึ้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ จินต์ และคณะ (2558) ซึ่งศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้า หมู่เข็ม ที่พบในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ซึ่งพบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L มีประสิทธิภาพต่ำกว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A กล่าวคือ จำแนกชนิดกล้วยไม้ได้น้อยกว่า ซึ่งเกิดจากมีอัตราการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำกว่า และเมื่อใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณร่วมกัน สามารถจำแนกชนิดกล้วยไม้เป็น 3 กลุ่ม ที่มีความสัมพันธ์กันภายในกลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับแหล่งแพร่กระจายพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีการวิจัยอื่นที่แสดงประสิทธิภาพของการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะร่วมกันมากกว่าบริเวณเดียว ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกพืช ซึ่งพบว่าได้ผลดีกว่าการใช้ตำแหน่งจำเพาะเพียงบริเวณเดียว ได้แก่ กล้วยไม้สิงโตกลอกตา (เกียรติชัย, 2557) กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (นฤมล และคณะ, 2557) มะม่วง (ปิยะดา และคณะ, 2558) กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (นฤมล และคณะ, 2560) กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย (ทีปกา และคณะ, 2560) กล้วยไม้สกุลก้านก่อ (จุฑามาศ และคณะ, 2560) และกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว (พรประภา และคณะ, 2560)



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ร่วมกัน

4. สรุป

การตรวจสอบกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตาด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A จำแนกกล้วยไม้สกุลหวายหมู่แคลิสตาได้ 7 และ 15 ชนิด ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณมาวิเคราะห์ร่วมกัน สามารถจำแนกได้ทั้ง 17 ชนิด ซึ่งสามารถสรุปว่าการใช้ชิ้นดีเอ็นเอทั้ง 2 บริเวณ มาวิเคราะห์ร่วมกัน มีประสิทธิภาพในการจำแนกสูงกว่า

5. รายการอ้างอิง

เกียรติชัย แซ่ไต่, นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตา หมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 523-530.

จินต์ ทองสม, ภัทรพร คุ้มภัย, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้า หมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*Lและชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 994-1005.

จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก่อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A, Thai J. Sci. Technol 6: 324-337.

ทีปกา มีเสงี่ยม, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบลายด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A, Thai J. Sci. Technol. 6: 347-357.

นฤมล ธนานันต์, ภัทรา หงษ์ทองดี, วรุณธร เชื้อบุญมี และธีระชัย ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยลาดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A, Thai J. Sci. Technol. 6: 22-32.

นฤมล ธนานันต์, วริสรา แทนสง่า และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 664-673.

นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-179.

ปิยดา บุสดี, นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2559, การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1 และ *rbc*L, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 983-993.

พรประภา ศิริเทพทวี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบสีเขียวด้วยลาดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A, Thai J. Sci. Technol. 6: 338-346.

มาลินี อนุพันธ์สกุล, 2538, กล้วยไม้, พิมพ์ครั้งที่ 1, สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., VanderBerg, C., Madrinan, S., Petersen, G., Seberg, O., Jorgsensen, T., Cameron-Kenneth, M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson-Terry, H., Conrad, F., Salazar-Gerardo, A., Richardson- James, E., Hollingsworth- Michelle, L., Barraclough-Timothy, G., Kelly, L. and Wilkinson, M., 2007, A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants, Taxon 56: 295-299.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 11-15.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and Deward, J.R., 2003, Biological identifications through DNA barcodes, Proc. Royal Soc. B. 270: 313-321.

Kress, W.J. and Erickson, D.L., 2007, A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbc*L gene complements the non-coding *trn*H-*psb*A spacer region, PLoS One 2(6): e508.

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, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 23: 8369-8374.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1626 p.

Soltis, D.E. and Soltis, P.S., 1998, Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis, pp.1-42, In Soltis, D.E., Soltis, P.S. and Doyle, J.J. (Eds.), Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing, Springer, New York.