การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบลายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *mat*K

Genetic Relationship Assessment and Identification of Mottled-Leaf *Paphiopedilum* Base on Nucleotide Sequences of *rbc*L and *mat*K Genes

ทีปกา มีเสงี่ยม และธีระชัย ธนานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Teepaka Meesangiem 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

กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของไทย ปัจจุบันการจำแนกและการระบุพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีมีความสำคัญ แต่การจำแนกและการระบุพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีด้วยลักษณะสัณฐานทำได้ยาก อีกทั้งกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะของยีน *rbc*L และ *mat*K โดยใช้ไพรเมอร์สากลเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbc*L และ *mat*K ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แล้วตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 จากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7 พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rbc*L และ *mat*K มีประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีต่ำ จึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีน มาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่า

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** narumolpla@yahoo.com
doi: 10.14456/tstj.2018.9

ประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีเพิ่มขึ้น โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์หลายบริเวณร่วมกัน จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีให้ดียิ่งขึ้น

คำสำคัญ : กล้วยไม้รองเท้านารี; การจำแนก; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; ลำดับนิวคลีโอไทด์

Abstract

Lady's slipper is one of the most economically important orchid in Thailand. At present, identification of orchid species is important but identification based on morphology is difficult. Besides, *Paphiopedilum* are risky to be extincted. So, we analyzed the phylogenetic tree and identification of 22 varieties of mottled-leaf *Paphiopedilum* base on nucleotide sequences of *rbc*L and *mat*K genes. The universal primer sets were used to amplify *rbc*L and *mat*K genes by polymerase chain reaction (PCR) and the PCR products were sequenced. Then, the multiple sequence alignment were analyzed by ClustalW and the phylogenetic tree were constructed base on the nucleotide sequences by MEGA7. The phylogenetic tree constructed from single-locus resulting in low effective power for identification. When combination of *rbc*L and *mat*K sequences were used, the effective power for identification were better than single-locus. Therefore, the combination of multi-locus were recommended to improve the effectiveness of identification of mottled-leaf *Paphiopedilum*.

Keywords: Lady's slipper; *Paphiopedilum*; identification; genetic relationship; nucleotide sequence

1. บทนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้เขตร้อนที่สำคัญ สามารถส่งออกดอกกล้วยไม้เขตร้อนสูงเป็นอันดับ 1 ของโลก และเป็นศูนย์กลางของกล้วยไม้ในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิค โดยพบพันธุ์กล้วยไม้ป่าหลากหลายชนิด เพราะมีสภาพแวดล้อมเอื้ออำนวยต่อการเจริญงอกงามของกล้วยไม้ นอกจากนี้กล้วยไม้ป่าที่พบยังมีลักษณะโดดเด่นเป็นเอกลักษณ์เฉพาะถิ่น

กล้วยไม้รองเท้านารี (Lady' s slipper) มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนและเขตหนาวของโลก จุดเด่นของกล้วยไม้สกุลนี้ คือ ลักษณะของกลีบปากที่งองุ้มเป็นกระเป๋า ซึ่งคล้ายกับปลายรองเท้าไม้ของชาวดัตช์ ประเทศไทยซึ่งอยู่ในเขตร้อนพบกล้วยไม้รองเท้านารีพื้นเมืองเพียงสกุลเดียว คือ *Paphiopedilum* รวม 18 ชนิด จากทั่วโลกที่พบแล้ว 70 ชนิด [1] โดยได้นำมาปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์เพื่อการค้าอย่างกว้างขวาง [2] อย่างไรก็ตาม กล้วยไม้รองเท้านารีจัดเป็นพืชที่ใกล้สูญพันธุ์ ห้ามนำไม้ป่ามาค้าขายโดยเด็ดขาด [3] ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลนี้

องค์กร Consortium for the Barcode of Life (CBOL) เสนอว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของตำแหน่งจำเพาะ (specific site) เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการระบุพันธุ์พืช โดยมีไพรเมอร์สากล (universal primer) ที่ใช้ได้กับพืชทุกชนิด มีฐานข้อมูล และมีการร่วมมือกันขององค์กรระดับโลก

ดังนั้นจึงมีมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับทั่วโลก (นฤมล, 2558) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเริ่มจากการใช้ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *Cytochrome c oxidase I* (*COI*) ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ของสัตว์ แต่พบว่ายีน *COI* ในไมโทคอนเดรียของพืชมีอัตราการวิวัฒนาการต่ำ ต่อมาจึงได้มีการศึกษาโดยใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ซึ่งประสบความสำเร็จอย่างมากในพืช โดยตำแหน่งจำเพาะที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในพืชที่กำหนดโดย CBOL ได้แก่ *rpo*B, *rpo*C1 , *rbc*L, *mat*K, *atp*F-*atp*H, *psb*K-*psb*I และ *trn*H-*psb*A [4]

งานวิจัยนี้ได้เลือกศึกษายีนในคลอโรพลาสต์ 2 ยีน คือ *rbc*L และ *mat*K

ยีน *rbc*L ไม่มีอินทรอน (intron) โดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 1,400 คู่เบส ส่วนในพืชมีหลากหลายขนาด [5] เป็นยีนกำหนดการสร้างหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) ของเอนไซม์ ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) [6] ซึ่งองค์กร CBOL เสนอว่ายีน *rbc*L เหมาะสมต่อการใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard) มากที่สุด [4]

ยีน *mat*K มีขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส เป็นยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์ maturase ซึ่งมีการวิวัฒนาการของนิวคลีโอไทด์และอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างสูง จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการจำแนกและหาวิวัฒนาการของพืชได้ [7,8] Guo และคณะ แนะนำให้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K วิเคราะห์ร่วมกับบริเวณอื่น ๆ จะทำให้การจำแนกพืชมีประสิทธิภาพมากขึ้น [9]

การวิจัยที่เคยมีรายงานมาก่อน พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะสามารถใช้จำแนกและระบุพันธุ์พืชหลายชนิด ได้แก่ ข้าวมีสี [10] กล้วยไม้สิงโตกลอกตา หมู่สิงโตสยาม [5] กล้วยไม้สกุลแวนด้า หมู่เข็ม [11] กล้วยไม้สกุลหวาย กลุ่มเอื้องสาย [12] และกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ [13] เป็นต้น งานวิจัยนี้จึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *mat*K ซึ่งผล การวิจัยนี้สามารถใช้ประโยชน์ในการระบุพันธุ์ หรือใช้ในการตรวจสอบพันธุ์เพื่อคุ้มครองกล้วยไม้รองเท้านารี อีกทั้งสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีอีกด้วย

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 กล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลาย

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จำนวน 22 พันธุ์ แสดงดังตารางที่ 1

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้รองเท้านารีด้วยวิธีประยุกต์จากวิธีของ Doyle และ Doyle [14] ตามวิธีของ นฤมล และคณะ [15] จากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (eletrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose) ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 และคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) [16] และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbc*L และ *mat*K

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbc*L และ *mat*K ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) 100 นาโนกรัม ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.1, 0.1

% Triton™ X-100 และ 2.5 mM $MgCl_2$) และมีนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ชนิดละ 2 มิลลิโมลาร์ (mM) ไพรเมอร์ 250 นาโนโมลาร์ (nM) โดยใช้ไพรเมอร์สากลที่จำเพาะกับยีน *rbc*L (*rbc*L-F: 5′-TCACCACAAACAGAAACTAAAGC-3′ และ *rbc*L-R: 5′-GGCACAAAATAAGAAACGATCTC-3′) [4] และไพรเมอร์สากลที่จำเพาะกับยีน *mat*K (*mat*K-F: 5′-TAATTTACGATCAATTCATTC-3′ และ *mat*K-R: 5′-GTTCTAGCACAAGAAAGTCG-3′) [4] และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (Unit) โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, บ่มที่อุณหภูมิ 52 และ 54 องศาเซลเซียส (สำหรับยีน *mat*K และ *rbc*L ตามลำดับ) นาน 30 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 1.5 เปรียบเทียบกับชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบขนาด (DNA ladder)

ตารางที่ 1 กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย ที่ใช้ในงานวิจัย จำนวน 22 พันธุ์

ชื่อสามัญและชื่อวิทยาศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย	สกุลย่อย	หมู่
(1) ฝาหอย [*P. bellatulum* (Rchb.f) Stein]	*Brachypetalum*	Brachypetalum
(2) เหลืองปราจีน [*P. concolor* subsp. *reynieri* (Rchb.f.) Fowlie]	*Brachypetalum*	Brachypetalum
(3) เหลืองปราจีนเวียดนาม [*P. concolor* var. tonkinese (God.-Leb.) Pfitzer]	*Brachypetalum*	Brachypetalum
(4) เหลืองกาญจน์ [*P. concolor* (Bateman) Pfitzer]	*Brachypetalum*	Brachypetalum
(5) เหลืองอุดร (*P. concolor* subsp. *hennisianum* Fowlie)	*Brachypetalum*	Brachypetalum
(6) เหลืองสิงขร [*P. concolor* var. longipetalum (Rolfe) Pfitzer]	*Brachypetalum*	Brachypetalum
(7) เหลืองตรัง [*P. godefroyae* (God.-Leb.) Stein]	*Brachypetalum*	Brachypetalum
(8) เหลืองพังงา [*P. godefroyae* var. leucochilum (Masters) Hallier ‘Yellow’]	*Brachypetalum*	Brachypetalum
(9) ขาวชุมพร [*P. godefroyae* var. leucochilum (Masters) Hallier ‘White’]	*Brachypetalum*	Brachypetalum
(10) ช่องอ่างทอง [*P. godefroyae* var. ang-thong (Fowlie) Braem]	*Brachypetalum*	Brachypetalum
(11) ขาวสตูล [*P. niveum* (Rchb.f) Stein]	*Brachypetalum*	Brachypetalum
(12) ขาวพังงา (*P. thaianum* lamwir.)	*Brachypetalum*	Brachypetalum
(13) เกรยี (*P.* ‘Greyi’)	*Brachypetalum*	Brachypetalum
(14) เหลืองประจวบ [*P. concolor* var. chlorophyllum (Rchb.f.) Pfitzer]	*Brachypetalum*	Brachypetalum
(15) มาลิโปเอนเซ (*P. malipoense* Chen & Tsi.)	*Parvisepalum*	Parvisepalum
(16) แจ็คกิไอ [*P. malipoense* var. jackii (Hua) Averyanov]	*Parvisepalum*	Parvisepalum
(17) ไมแครนทุม (*P. micranthum* Tang & Wang)	*Parvisepalum*	Parvisepalum
(18) เวียดนามเอนเซ (*P. vietnamense* O. Gruss & Perner)	*Parvisepalum*	Parvisepalum
(19) เดเลแนติไอ (*P. delenatii* Guillaumin)	*Parvisepalum*	Parvisepalum
(20) อาร์เมเนียคุม (*P. armeniacum* S.C. Chen & F.Y. Liu)	*Parvisepalum*	Parvisepalum
(21) อีเมอร์โซนิไอ (*P. emersonii* Koop. & P.J. Cribb)	*Parvisepalum*	Emersonianum
(22) ฮานเกียนุม (*P. hangianum* Perner & Oruss)	*Parvisepalum*	Emersonianum

2.4 การวิเคราะห์ผล

ส่งผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท Bioneer (ประเทศเกาหลีใต้) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้อง โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ด้วยโปรแกรม Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 22 พันธุ์ มาเปรียบเทียบกันทั้งหมดด้วยโปรแกรม ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle) และวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0) (http://www.megasoftware.net) เลือกการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood (ML) และกำหนดค่า bootstrap เป็น 1,000 รอบ

เปรียบเทียบแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *mat*K รวมทั้งแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะทั้งสองร่วมกัน จากนั้นฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *mat*K ในกล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ ไว้ในฐานข้อมูล GenBank

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbc*L และ *mat*K ในกล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์สากล พบว่าเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ทั้ง 22 พันธุ์ และปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายเพียง 1 แถบ (band) โดยมีความชัดเจนและมีขนาดที่ถูกต้องตามที่คาดหวัง ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbc*L ที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส ส่วนชิ้นดีเอ็นเอของยีน *mat*K ที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 850 คู่เบส

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีน มีความคล้ายคลึงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวในกล้วยไม้รองเท้านารี 85-100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นได้ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *mat*K ในกล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลาย ทั้ง 22 พันธุ์ ไว้ที่ฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยมีหมายเลขจำเพาะ (accession number) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 2

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ในกล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ พบว่าชิ้นดีอ็นเอมีขนาด 663 นิวคลีโอไทด์ แตกต่างกัน 6 ตำแหน่ง (0.90 เปอร์เซ็นต์) โดยรูปแบบการกลาย (mutation) ที่พบ ได้แก่ ทรานสเวอร์ชัน (transversion) 3 ตำแหน่ง พิวรีนทรานสิชัน (purine transition) 1 ตำแหน่ง และไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) 3 ตำแหน่ง ดังตารางที่ 3

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ในกล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ พบว่าชิ้นดีเอ็นเอมีขนาด 863 นิวคลีโอไทด์ แตกต่างกัน 139 ตำแหน่ง (16.11 เปอร์เซ็นต์) โดยรูปแบบการกลายที่พบ ได้แก่ อินเดล (indel, insertion/deletion) 45 ตำแหน่ง ทรานสเวอร์ชัน 70 ตำแหน่ง พิวรีนทรานสิชัน 24 ตำแหน่ง และไพริมิดีนทรานสิชัน 25 ตำแหน่ง ดังตารางที่ 4

เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 เลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ

ตารางที่ 2 หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *mat*K ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ ที่ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย	หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ (คู่เบส)	
	*rbc*L	*mat*K
นารีฝาหอย	KU183624 (663)	KU201380 (850)
เหลืองปราจีน	KU183625 (663)	KU201381 (849)
เหลืองปราจีนเวียดนาม	KU183626 (663)	KU201382 (850)
เหลืองกาญจน์	KU183627 (663)	KU201383 (849)
เหลืองอุดร	KU183628 (663)	KU201384 (849)
เหลืองสิงขร	KU183629 (663)	KU201385 (847)
เหลืองตรัง	KU183630 (663)	KU201386 (849)
เหลืองพังงา	KU183631 (663)	KU201387 (850)
ขาวชุมพร	KU183632 (663)	KU201388 (850)
ช่องอ่างทอง	KU183633 (663)	KU201389 (851)
ขาวสตูล	KU183634 (663)	KU201390 (850)
ขาวพังงา	KU183635 (663)	KU201391 (849)
เกรยี	KU183636 (663)	KU201392 (849)
เหลืองประจวบ	KU183637 (663)	KU201393 (849)
มาลิโปเอนเซ	KX264992 (663)	KX352824 (857)
แจ็คกิไอ	KX264993 (663)	KX352829 (857)
ไมแครนทุม	KX264994 (663)	KX352825 (855)
เวียดนามเอนเซ	KX264995 (663)	KX352830 (858)
เดเลแนติไอ	KX264996 (663)	KX352831 (856)
อาร์เมเนียคุม	KX264997 (663)	KX352826 (856)
อีเมอร์โซนิไอ	KX264998 (663)	KX352827 (829)
ฮานเกียนุม	KX264999 (663)	KX352828 (830)

ML พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rbc*L (รูปที่ 1) และยีน *mat*K (รูปที่ 2) ให้ผลที่คล้ายคลึงกัน คือ จำแนกกล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ เป็น 2 กลุ่ม อย่างชัดเจน คือ กลุ่มที่ 1 คือ รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ Brachypetalum 14 พันธุ์ ได้แก่ ขาวพังงา เกรยี เหลืองตรัง เหลืองสิงขร เหลืองพังงา ช่องอ่างทอง ขาวสตูล ขาวชุมพร ฝาหอย เหลืองปราจีน เหลืองกาญจน์ เหลืองประจวบ เหลืองปราจีนเวียดนาม และเหลืองอุดร

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ที่พบการเปลี่ยนแปลง

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
ทรานสเวอร์ชัน	162, 432, และ 456
ไพริมิดีนทรานสิชัน	174 และ 447
พิวรีนทรานสิชัน	261

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เวียดนามเอนเซ เดเลแนติไอ มาลิโปเอนเซ แจ็คกิไอ อีเมอร์โซนิไอ ไมแครนทุม ฮานเกียนุม และอาร์เมเนียคุม ซึ่งเป็นรองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ Parvisepalum 6 พันธุ์ และหมู่ Emersonianum 2 พันธุ์

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีในกลุ่มที่ 1 ออกจากกัน ส่วนในกลุ่มที่ 2 แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย และไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้ภายในกลุ่มนั้น

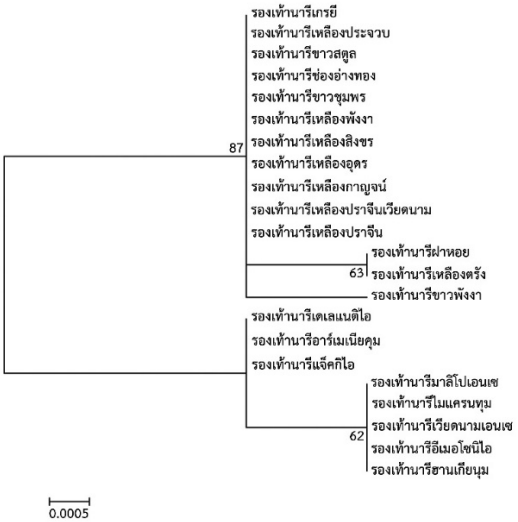
แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K สามารถจำแนกกลุ่มที่ 1 บางพันธุ์ ส่วนกลุ่มที่ 2 สามารถจำแนกออกจากกันทุกพันธุ์

ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K จึงมีประสิทธิภาพในการจำแนกสูงกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L อย่างไรก็ตาม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ จึงได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีน ร่วมกัน

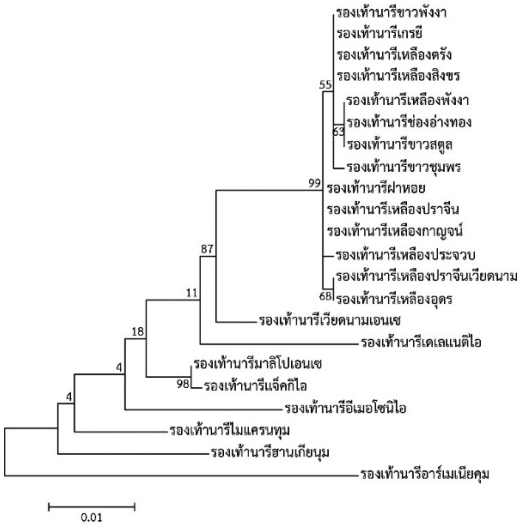
ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ที่พบการเปลี่ยนแปลง

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
อินเดล	22-31, 34-36, 44, 54, 760, 767, 777, 779, 802-808, 810, 817-838 และ 843
ทรานสเวอร์ชัน	47, 122, 154, 155, 214, 253, 360, 421, 529, 539, 559, 585, 586, 626, 629, 637, 638, 642, 652, 653, 655, 656, 661-663, 671, 678, 679, 692, 704, 707, 714, 715, 728, 730, 734, 737, 739, 752, 765, 766, 774, 778, 781, 783, 784, 790, 791, 794, 797-800, 805, 808, 813, 819, 822, 823, 826, 831, 835, 840 และ 841
ไพริมิดีนทรานสิชัน	32, 33, 35, 69, 110, 150, 151, 176, 325, 344, 586, 729, 730, 736, 755, 788, 808, 811, 819-821, 823, 839, 840 และ 843
พิวรีนทรานสิชัน	203, 214, 215, 249, 334, 472, 496, 583, 595, 628, 647, 654, 664, 725, 733, 751, 777, 790, 806, 807, 812-814 และ 841

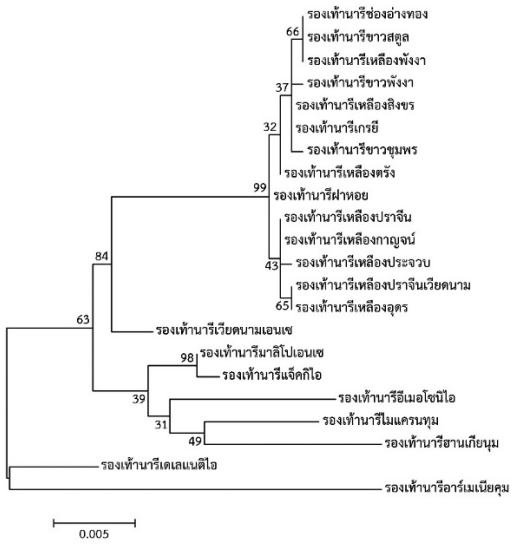
(รูปที่ 3) พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ เป็น 2 กลุ่ม เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L หรือ *mat*K ซึ่งจะเห็นว่ากล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มที่ 1 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L หรือ *mat*K จะไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารี เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองร่วมกัน สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีดีขึ้น แต่ก็ยังมีบางพันธุ์ที่ไม่สามารถจำแนกออกจากกันได้ ดังนั้นหากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะร่วมกันมากขึ้น (เช่น 3 หรือ 4 บริเวณ) อาจเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีให้ดียิ่งขึ้น



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *mat*K ร่วมกัน

ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K เป็นบริเวณที่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์สูง จัดเป็นตำแหน่งจำเพาะพื้นฐานที่แนะนำให้ใช้ในการจำแนกพืชที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน [17] แต่ยังไม่สามารถจำแนกพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลายบางชนิดออกจากกันได้ ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L มีความสามารถในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลายค่อนข้างต่ำ เนื่องจากมีอัตราการวิวัฒนาการและการแทนที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอื่น ๆ [18] กล่าวคือ ยีน *rbc*L สามารถใช้ในการจำแนกพืชระดับวงศ์หรือเหนือกว่าระดับวงศ์ [19] จึงมีความสามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลาย ในสกุลย่อยเดียวกันได้น้อยกว่ายีน *mat*K

การเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกสามารถทำได้โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะหลายบริเวณร่วมกัน จึงมีการเสนอให้วิเคราะห์ตำแหน่งจำเพาะหลายบริเวณร่วมกัน ซึ่งเป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการระบุพันธุ์พืช [20] โดย Guo และคณะ [9] แนะนำให้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ร่วมกับบริเวณอื่น ๆ ซึ่งจะทำให้การจำแนกหรือการระบุพืชมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ร่วมกับยีน *rbc*L เป็นบริเวณให้ผลดีที่สุดสำหรับพืชบก [4,18] นอกจากนั้นรายงานการวิจัยที่วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ร่วมกับยีน *rbc*L พบว่ามีความสามารถในการจำแนกมากกว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียง 1 บริเวณ

อย่างไรก็ตาม ในการวิจัยครั้งนี้พบว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ร่วมกับยีน *rbc*L ก็ยังไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลาย ครบทุกพันธุ์ บางพันธุ์ยังไม่สามารถแยกออกจากกัน โดยส่วนใหญ่เป็นกล้วยไม้รองเท้านารีที่อยู่ในชนิดหรือสปีชีส์ (species) เดียวกัน แสดงให้เห็นว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชระดับชนิดหรือสปีชีส์เดียวกันทำได้ยาก เนื่องจากมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะจึงเหมาะสมกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชสกุลเดียวกัน แต่ต่างชนิดกัน [21]

4. สรุป

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบลาย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *mat*K พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากยีน *mat*K มีความสามารถในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีได้ดีกว่าการใช้ยีน *rbc*L เนื่องจากยีน *mat*K เป็นบริเวณที่มีการแทนที่นิวคลีโอไทด์สูง จัดเป็นบริเวณพื้นฐานที่เหมาะสมในการจำแนกพืชที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน

มาก ส่วนยีน *rbc*L มีความสามารถในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีต่ำ เนื่องจากมีอัตราการวิวัฒนาการและอัตราการแทนที่ต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งเพียง 1 บริเวณนั้นยังมีประสิทธิภาพต่ำ จึงได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *mat*K ร่วมกัน พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้มีความสามารถในการจำแนกดีขึ้น แต่ก็ยังไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีบางพันธุ์ออกจากกัน ดังนั้นถ้าหากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะหลายบริเวณร่วมกัน อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีให้ดียิ่งขึ้น

5. รายการอ้างอิง

[1] อุไร จิรมงคลการ, 2541, กล้วยไม้รองเท้านารี, พิมพ์ครั้งที่ 1, บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน), กรุงเทพฯ.

[2] วิชรุจญ์ ทองคำ, ณัฐา โพธาภรณ์ และฉันทลักษณ์ ติยายน. 2558. ความสามารถในการผสมข้ามสกุลย่อยของกล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิด, ว.เกษตร 3: 241-249.

[3] กรมวิชาการเกษตร, 2518, คู่มือจำแนกพืชอนุรักษ์ตาม พ.ร.บ., หน้า ข-จ, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

[4] CBOL Plant working Group, 2009, A DNA barcode for land plants, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106: 12794-12797.

[5] นฤมล ธนานันต์, เกียรติชัย แซ่ไต่ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามโดยใช้ลาดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 523-530.

[6] Wolfe, A.D. and de Pamphilis, C.W., 2016, The effect of relaxed functional constraints on the photosynthetic gene *rbc*L in photosynthetic and nonphotosynthetic parasitic plants, Mol. Biol. Evol. 15: 1243-1258.

[7] Hilu, K.W., Borsch, T., Muller, K., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Savolainen, V., Chase, M.W., Powell, M.P., Alice, L.A., Evans, R., Saquet, H., Neinhuis, C., Slotta, T.A.B., Rohwer, J.G., Campbell, C.S. and Chatrou, L.W., 2003, Angiosperm phylogeny based matK sequence information, Am. J. Bot. 90: 1758-1776.

[8] Selvaraj, D., Sarma, R.K. and Sathishkumar, R., 2008, Phylogenetic analysis of chloroplast *mat*K genefrom Zingiberaceae for plant DNA barcoding, Bioinformation 3: 24-27.

[9] Guo, Y.Y., Huang, L.Q., Liu, H.J. and Wang, X.Q., 2016, Promise and challenge of DNA barcoding in Venus Slipper (*Paphiopedilum*), PLoS One, 11: 1-13.

[10] นฤมล ธนานันต์, จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *rpo*C1, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 674-682.

[11] จินต์ ทองสม, ภัทรพร คุ้มภัย, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 994-

1005.

[12] นฤมล ธนานันต์, ฐิติพร โท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2558, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายโดยใช้ลาดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rpo*C1, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 1-10.

[13] ธีระชัย ธนานันต์, จุฑาทิพย์ พันธ์รูปท้าว และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rbc*L, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 25: 579-590.

[14] 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.

[15] นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และสายพันธุ์ปรับปรุงจากสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-179.

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

[17] Parveen, I., Singh, H.K., Raguvanshi, S., Pradhan, U.C. and Babbar, S.B., 2012, DNA barcoding of endangered Indian *Paphio-pedilum* species, Mol. Ecol. Resour 12: 82-90.

[18] 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. Nat. Acad. Sci. USA. 102: 8369-8374.

[19] Gielly, L. and Taberlet, P., 1994, The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: Noncoding versus *rbc*L sequences, Mol. Biol. Evol. 5: 769-777.

[20] Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G., Husband,B.C., Percy, D.M., Hajibabaei, M. and Barrett, S.C.H., 2008, Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plantspecies equally well, PLoS One 3: e2802.

[21] Chemisquy, M.A. and Morrone, O., 2012, Molecular phylogeny of Gavilea (Chloraeinae: Orchidaceae) using plastid and nuclear markers, Mol. Phylogenet. Evol. 62: 889-897.