การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rpo*C1

Identification and Genetic Relationship Analysis of *Dendrobium*, Ueang Sai Group, Using DNA Sequences of *mat*K and *rpo*C1 Genes

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

ฐิติพร โท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Narumol Thanananta

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

Titiporn Thomsopa and Theerachai Thanananta*

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

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายเป็นไม้ประดับเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งปัจจุบันการจำแนกชนิดและพันธุ์กล้วยไม้ด้วยลักษณะสัณฐานมักมีความยุ่งยากและเกิดการสับสนได้ง่ายเนื่องจากมีลูกผสมมากมายหลายชนิด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพื่อตรวจสอบกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายจำนวน 13 ตัวอย่าง โดยเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *mat*K และ *rpoC*1 ในพลาสติด และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 และ MEGA 4.0 จากนั้นจึงสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *mat*K สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายได้ 7 ชนิด ส่วนแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *rpo*C1 สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุล

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** thana@tu.ac.th

หวายกลุ่มเอื้องสายได้ทั้ง 13 ชนิด ซึ่งให้ค่าสัมประสิทธิ์ความต่างเป็น 0.000-0.027 และ 0.002-0.014 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายแต่ละชนิดนั้นมีความแตกต่างกัน ซึ่งสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายออกจากกันได้ทั้ง 13 ชนิด

คำสำคัญ : สกุลหวาย; เอื้องสาย; การจำแนก; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; ยีนจำเพาะ

Abstract

Ueang Sai is a group of genus *Dendrobium* which one of the most important Thai orchids. The currently, to identify the orchid species, varieties and hybrids based on morphology are difficult and confusion from many new hybrids. This research, the nucleotide sequences of specific site were used to identify 13 samples of Ueang Sai. The plastid genes, *mat*K and *rpo*C1 were amplified and sequenced, after that all nucleotide sequences were analyzed by ClustalW2 and MEGA 4.0. The phylogenetic tree constructed base on the nucleotide sequences of *mat*K and *rpo*C1 could distinguish 7 and 13 out of 13 species, which the distance coefficients ranging 0.000-0.027 and 0.002-0.014, respectively. However, when analyzed the nucleotide sequences directly, the nucleotide sequences of both genes from each Ueang Sai were differences and could distinguish 13 out of 13 species.

Keywords: *Dendrobium*; Ueang Sai; identification; genetic relationship; specific gene

1. บทนำ

กล้วยไม้เป็นพืชดอกที่มีความหลากหลายมากและมีหลายสกุล (genus) ด้วยกัน กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) เป็นสกุลที่มีจำนวนชนิด (species) มากที่สุด ปัจจุบันพบว่ากล้วยไม้สกุลนี้มีมากกว่า 1,000 ชนิด นักพฤกษศาสตร์จำแนกกล้วยไม้สกุลหวายออกเป็น 41 หมู่ (section) ได้แก่ ฟาแลนแนนเธ (Phalaenanthe) เซอราโทเบียม (Ceratobium) ยูจิแนนเธ (Eugenanthe) แคลลิสตา (Callista) ไนโกรเฮอร์ซูเธ (Nigrohirsutae) เป็นต้น [1] โดยในประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลนี้ตามธรรมชาติมากกว่า 150 ชนิด ซึ่งทุกชนิดเป็นกล้วยไม้อิงอาศัยและลำต้นมีลักษณะแตกต่างกันไป ได้แก่ เป็นลำกลมยาว รูปลูกกล้วย รูปกระสวย รูปเหลี่ยม และลำต้นผอมยาวคล้ายเส้นลวด [2] กล้วยไม้กลุ่มเอื้องสาย (Ueang Sai) จัดอยู่ในสกุลหวายหมู่ยูจิแนนเธ [3]

กล้วยไม้ที่ประเทศไทยส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ เป็นกล้วยไม้สกุลหวายและลูกผสมของสกุลหวาย ด้วยความสำคัญดังกล่าว การวิจัยนี้จึงได้ศึกษาเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลที่สามารถใช้ในการจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotid) ของยีน (gene) *mat*K และ *rpo*C1 ซึ่งเป็นตำแหน่งจำเพาะ (specific site) ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) สำหรับจำแนกสิ่งมีชีวิต โดยสามารถ

ตรวจสอบได้ในทุกระยะการพัฒนาการของสิ่งมีชีวิต [4] โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดสั้น ๆ ในบางบริเวณ โดยข้อดีในการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะคือเป็นเครื่องหมายที่ใช้ได้ทั่วไป ข้อมูลที่ได้เป็นที่ยอมรับทั่วโลก เนื่องจากใช้ตำแหน่งหรือยีนเดียวกันเป็นมาตรฐาน ผลที่ได้มีประสิทธิภาพ สามารถทำซ้ำได้ รวมทั้งมีขั้นตอนไม่ซับซ้อน สะดวก และรวดเร็ว

การวิจัยนี้เลือกใช้ตำแหน่งมาตรฐาน 2 บริเวณ คือ (1) ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *mat*K ซึ่งเป็นยีนที่แทรกอยู่ในส่วนอินทรอน (intron) ของยีน *trn*K ในพลาสติด (plastid) มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ทำหน้าที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ mutarase สำหรับใช้ในกระบวนการตัดแต่ง (splicing) ของอินทรอนกลุ่มที่ 2 [5] และ (2) ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1 ซึ่งเป็นยีนที่อยู่ในพลาสติด มีขนาดประมาณ 2,800 คู่เบส ทำหน้าที่กำหนดการสร้างพอลิเพปไทด์ (polypeptide) ที่เป็นส่วนประกอบของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) [6] ทั้งนี้เนื่องจากเคยมีรายงานมาแล้วว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K มีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกพืช รวมทั้งตำแหน่งจำเพาะทั้งสองเป็นบริเวณที่ง่ายต่อการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) และเหมาะสมสำหรับเป็นรหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode)

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย

ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย (*Dendrobium*, Ueang Sai group) ในประเทศไทย 13 ชนิด ได้แก่ (1) เอื้องสายไหม [*D. aphyllum* (Roxb.) Fischer] (2) เอื้องสายม่านพระอินทร์ (*D. devonianum* Paxt.) (3) เอื้องสายม่วง (*D. lituiflorum* Lindl.) (4) เอื้องสายน้ำผึ้งไทย (*D. primulinum* Lindl.) (5) เอื้องสายน้ำนม (*D. cretaceum* Lindl.) (6) เอื้องสายมรกต (*D. chrysanthum* Lindl.) (7) เอื้องสายน้ำเขียว (*D.* crepidatum Lindl. & Paxton) (8) เอื้องสายน้ำครั่ง (*D. parishii* Rchb. f.) (9) เอื้องสายหลวง *(D. anosmum* Lindl.) (10) เอื้องสายนางนวล (*D. crocatum* Hook. f.) (11) เอื้องไม้เท้าฤาษี (*D. pendulum* Roxb.) (12) เอื้องสายสามสี (*D. crystallinum* Rchb. f.) และ (13) เอื้องสายสี่ดอก (*D. cumulatum* Lindl.) ซึ่งเก็บรวบรวมจากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย นำมาปลูกจนออกดอก เพื่อตรวจสอบพันธุ์ด้วยลักษณะสัณฐาน (morphology)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด ด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle [7] โดยบดใบกล้วยไม้ 3-4 กรัม ในบัฟเฟอร์สกัด [extraction buffer; 4 % cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), 0.6 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 M NaCl, 20 mM ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA), 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 0.1 % sodium meta-bisufite] 20 มิลลิลิตร ที่มีเมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercapto ethanol) 20 ไมโครลิตร และพอลิไวนิลไพรโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone, PVP) 0.3 กรัม โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแยกสารละลายใสส่วนบนมาเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ (linear polyacrylamide) 140 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ล้าง (washing buffer; 10 mM sodium acetate pH 5.2 และ 70 % ethanol) ปล่อยให้แห้ง แล้วละลายตะกอนในบัฟเฟอร์อาร์เอ็นเอส (RNase buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 15 mM NaCl) 500 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอ (RNase A 10 mg/ml) 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาสกัดด้วย ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25:24:1) 1 ครั้ง และสกัดด้วย คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) อีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นจึงย้ายสารละลายใสส่วนบนมาใส่หลอดใหม่ แล้วเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ 70 ไมโครลิตร เติมโซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) ให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร และเติมไอโซโพรพานอลให้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และผึ่งตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ทีอี (TE buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1.0 mM EDTA) ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นจึงตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ [8]

2.3 การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *mat*K และ *rpo*C1

นำดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด ที่สกัดได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะ คือ ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *mat*K และ *rpo*C1 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 0.25 mM $MgCl_2$) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *mat*K (5′- TAA TTT ACG ATC AAT TCA TTC -3′ กับ 5′- GTT CTA GCA CAA GAA AGT CG -3′ และ *rpo*C1 (5′- GTG GAT ACA CTT CTT GAT AAT GG -3′ กับ 5′- TGA GAA AAC ATA AGT AAA CGG GC -3′) ปริมาณ 500 นาโนโมลาร์ และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™ life technology, Brazil) 1 ยูนิต

โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที จำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ [9]

2.4 การวิเคราะห์ผล

เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีน *mat*K และ *rpo*C1 โดยบริษัท Solgent (ประเทศเกาหลีใต้) แล้ว นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายแต่ละชนิด นำผลการ

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 4.0 (molecular evolutionary genetics analysis version 4.0)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *mat*K และ *rpo*C1

การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *mat*K และ *rpo*C1 ในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย 13 ชนิด ด้วยไพรเมอร์จำเพาะพบว่าสามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอได้ทั้ง 13 ชนิด โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความชัดเจนและมีขนาดที่ตรงตามที่คาดไว้ กล่าวคือ ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *mat*K ขนาดประมาณ 900 คู่เบส ส่วนชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1 ขนาดประมาณ 500 คู่เบส

3.2 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rpo*C1

เมื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK และ rpoC1* ในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองมีความเหมือนกับพืชอื่น ซึ่งยืนยันว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นั้นถูกต้อง แล้วได้ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) และมีหมายเลขจำเพาะ (accession number) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 หมายเลขจำเพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rpo*C1 ในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายที่ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank

ชื่อพื้นเมืองและชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์และขนาด (คู่เบส)	
	*mat*K	*rpo*C1
เอื้องสายไหม [*D. aphyllum* (Roxb.) Fischer]	KF957841 (921)	KF976979 (526)
เอื้องสายม่านพระอินทร์ (*D. devonianum* Paxt.)	KF957842 (897)	KF976980 (524)
เอื้องสายม่วง (*D. lituiflorum* Lindl.)	KF957843 (869)	KF976981 (524)
เอื้องสายน้ำผึ้งไทย (*D. primulinum* Lindl.)	KF957844 (875)	KF976982 (525)
เอื้องสายน้ำนม (*D. cretaceum* Lindl.)	KF957845 (866)	KF976983 (524)
เอื้องสายมรกต (*D. chrysanthum* Lindl.)	KF957846 (875)	KF976984 (524)
เอื้องสายน้ำเขียว (*D.* crepidatum Lindl. & Paxton)	KF957847 (877)	KF976985 (524)
เอื้องสายน้ำครั่ง (*D. parishii* Rchb. f.)	KF957848 (877)	KF976986 (522)
เอื้องสายหลวง *(D. anosmum* Lindl.)	KF957849 (878)	KF976987 (525)
เอื้องสายนางนวล (*D. crocatum* Hook. f.)	KF957850 (890)	KF976988 (524)
เอื้องไม้เท้าฤๅษี (*D. pendulum* Roxb.)	KF957851 (873)	KF976989 (523)
เอื้องสายสามสี (*D. crystallinum* Rchb. f.)	KF957852 (876)	KF976990 (523)
เอื้องสายสี่ดอก (*D. cumulatum* Lindl.)	KF957853 (871)	KF976991 (524)

3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *mat*K และ *rpo*C1

3.3.1 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด มาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม ClustalW2 พบว่ายีน *mat*K มีขนาด 871 นิวคลีโอไทด์ พบ 27 ตำแหน่ง ที่มีความแตกต่างกันในกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ (ตารางที่ 2) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 4.0 โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ neighbor-joining ได้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังรูปที่ 1 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง (distance coefficient) อยู่ระหว่าง 0.000 ถึง 0.027 ซึ่งสามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย 13 ชนิด เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ เอื้องสายนางนวล เอื้องสายสี่ดอก เอื้องสายสามสี เอื้องไม้เท้าฤาษี เอื้องสายมรกต และเอื้องสายน้ำเขียว กลุ่ม 2 ได้แก่ เอื้องสายน้ำครั่ง เอื้องสายหลวง เอื้องสายม่วง เอื้องสายน้ำผึ้งไทย และเอื้องสายน้ำนม กลุ่ม 3 ได้แก่ เอื้องสายไหม และกลุ่ม 4 ได้แก่ เอื้องสายม่านพระอินทร์ โดยไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย 6 ชนิด ออกจากกัน ได้แก่ เอื้องสายมรกตกับเอื้องสายน้ำเขียว เอื้องสายน้ำครั่งกับเอื้องสายหลวง และเอื้องสายน้ำผึ้งไทยกับเอื้องสายสายน้ำนม

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงพบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายได้ เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งมีความหลากรูป (polymorphism) ที่เกิดจากการกลาย (mutation) ซึ่งพบ 4 รูปแบบ ได้แก่ อินเดล (indel, insersion/deletion) พิวรีนทรานสิชัน (purine transition) ไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) และทรานสเวอร์ชัน (transversion) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ที่มีความหลากรูป

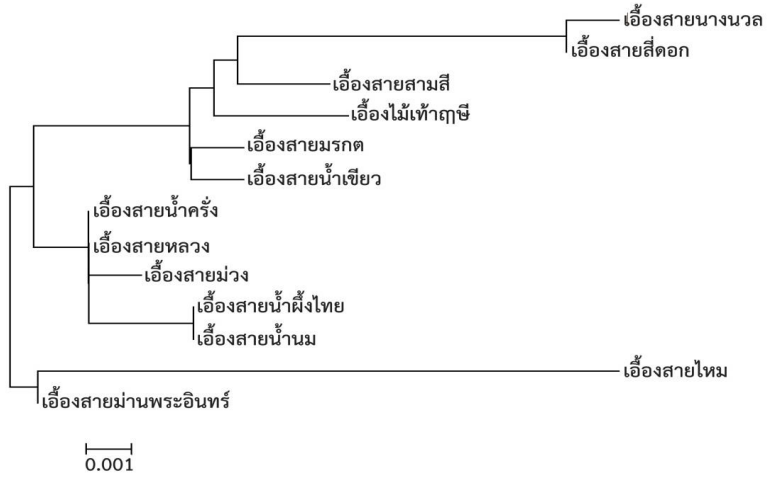
รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
อินเดล	1, 857 และ 861
พิวรีนทรานสิชัน	41, 285, 460, 600 และ 852
ไพริมิดีนทรานสิชัน	237, 364, 374, 606, 750 และ 795
ทรานสเวอร์ชัน	104, 195, 240, 304, 350, 439, 463, 506, 581, 588, 589, 744 และ 850

ตารางที่ 3 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ที่มีความหลากรูป

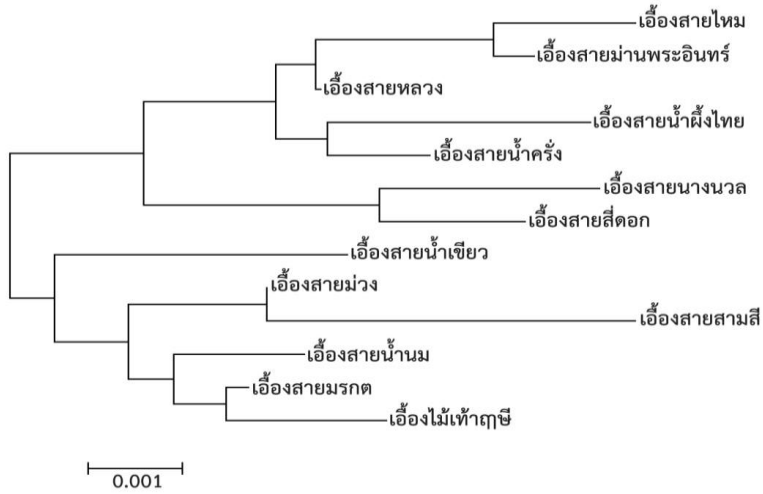
รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
อินเดล	1-3, 9, 12 และ 514
พิวรีนทรานสิชัน	5, 7, 264 และ 372
ไพริมิดีนทรานสิชัน	3, 4, 6, 9 และ 142
ทรานสเวอร์ชัน	2-6, 8, 9, 20, 138, 222, 297 และ 514-516

3.3.2 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด มาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม ClustalW2 พบว่ายีน *rpo*C1 มีขนาด 507 นิวคลีโอไทด์ พบ 29 ตำแหน่ง ที่มีความแตกต่างกันในกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ (ตารางที่ 3) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 4.0 โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ neighbor-joining ได้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังรูปที่ 2 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างอยู่ระหว่าง 0.002 ถึง 0.014 ซึ่งสามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย 13 ชนิด เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ เอื้องสายไหม เอื้องสายม่าน

พระอินทร์ เอื้องสายหลวง เอื้องสายน้ำผึ้งไทย และเอื้องสายน้ำครั่ง กลุ่ม 2 ได้แก่ เอื้องสายนางนวล และเอื้องสายสี่ดอก กลุ่ม 3 ได้แก่ เอื้องสายน้ำเขียว กลุ่ม 4 ได้แก่ เอื้องสายม่วง และเอื้องสายสามสี และกลุ่ม 5 ได้แก่ เอื้องสายน้ำนม เอื้องสายมรกต และเอื้องไม้เท้าฤษี โดยสามารถจำแนกไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย 13 ชนิด ออกจากกันได้ทั้งหมด เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงพบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายได้ เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งมีความหลากรูปเช่นเดียวกับยีน *mat*K (ตารางที่ 3)



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย 13 ชนิด ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย 13 ชนิด ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น ดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *rpo*C1

3.3 อภิปรายผล

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่วิเคราะห์ได้จากยีน *mat*K และ *rpo*C1 แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 มีประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย 13 ชนิด ได้ดีกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K แต่เมื่อพิจารณาจากความหลากรูปของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงพบว่ายีนทั้งสองสามารถใช้ในการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด ออกจากกันได้ ทั้งนี้ผลการจำแนกที่แตกต่างกันระหว่างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับการจำแนกโดยดูจากความหลากรูปของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงนั้นเกิดจากขั้นตอนวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนั้นจะให้น้ำหนักคะแนนไม่เท่ากันในแต่ละรูปแบบการกลาย โดยให้น้ำหนักรูปแบบการกลายแบบอินเดลมากที่สุด รองลงมาคือแบบทรานสเวอร์ชัน พิวรีนทรานสิชัน และไพริมิดีนทรานสิชัน ตามลำดับ [10] โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 จะพบการกลายแบบอินเดลมากกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K

นอกจากนั้นยังพบว่าความหลากรูปของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีตำแหน่งที่จำเพาะต่อกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายแต่ละชนิด โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*k พบตำแหน่ง 850, 852, 853, 854, 857, 861, 864 และ 865 จำเพาะต่อเอื้องสายไหม ตำแหน่ง 1 และ 463 จำเพาะต่อเอื้องสายม่วง ตำแหน่ง 588 จำเพาะต่อเอื้องสายน้ำเขียว ตำแหน่ง 237 จำเพาะต่อเอื้องสายนางนวล และตำแหน่ง 506 และ 581 จำเพาะต่อเอื้องไม้เท้าฤษี และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 พบตำแหน่ง 9 จำเพาะต่อเอื้องสายม่วง ตำแหน่ง 8 จำเพาะต่อเอื้องสายน้ำผึ้งไทย ตำแหน่ง 3 จำเพาะต่อเอื้องสายมรกต ตำแหน่ง 5, 6 และ 138 จำเพาะต่อเอื้องสายน้ำเขียว ตำแหน่ง 3 จำเพาะต่อเอื้องสายน้ำครั่ง ตำแหน่ง 9 จำเพาะต่อเอื้องสายหลวง และตำแหน่ง 20, 142 และ 297 จำเพาะต่อเอื้องสายสามสี ซึ่งตำแหน่งที่จำเพาะเหล่านี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายต่อไป

เมื่อพิจารณาการแบ่งกลุ่มตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองนั้น พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองสามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด ได้ต่างกัน โดยสมาชิกในแต่ละกลุ่มที่แบ่งได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *mat*K มีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกันมากกว่าสมาชิกในแต่ละกลุ่มที่แบ่งได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *rpo*C1 ทั้งนี้มีความสอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายในงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาถึงการประเมินความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลหวายในกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature-random amplification polymorphic DNA) [11] อย่างไรก็ตาม แม้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 จะไม่เหมาะสมในการนำไปใช้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ก็สามารถนำไปใช้เพื่อจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายได้ ซึ่งสามารถประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบและจำแนกพันธุ์พืชได้เช่นเดียวกับเครื่องหมายดีเอ็นเออื่น ๆ

4. สรุป

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ไปวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ 13 ชนิด ออกจากกันได้ 7 ชนิด

ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 เมื่อนำไปวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด ออกจากกันได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองสามารถใช้จำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายได้ และสามารถประยุกต์ใช้ในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด มาเปรียบเทียบกัน พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K มีความแตกต่างกัน 30 ตำแหน่ง และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 มีความแตกต่างกัน 20 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายได้

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี โดยผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ 2558

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Baker, M.L. and Baker, C.O., 1996, Orchid species culture: *Dendrobium*, Timber Press, Portland, 852 p.

[2] อบฉันท์ ไทยทอง, 2543, กล้วยไม้เมืองไทย, บมจ. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, พิมพ์ครั้งที่ 1, กรุงเทพฯ, 12 น.

[3] ทวีพงศ์ สุวรรณโร, การปลูกเลี้ยงและดูแลกล้วยไม้สกุลหวาย, แหล่งที่มา : http://www.tjorchid.com/technic, 19 กันยายน 2554.

[4] Herbert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L. and deWaard, J.R., 2003, Biological identifycations through DNA barcodes, Proc. Royal Soc. London 270: 313-321.

[5] Barthet, M., 2006, Expression and Function of the Chloroplast-encoded Gene *mat*K, Ph.D. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia.

[6] ณัฐกร เพชรชา, ดวงกมล แม้นศิริ และสุรพล แสนสุข, 2554, การประเมินดีเอ็นเอในพลาสติดบริเวณ *rpo*C1 และ *rpo*B ในการใช้เป็น DNA barcode และกรณีศึกษาในพืชสกุล *Alpinia* Roxb. (Zingiberaceae), น. 554-563, รายงานการประชุมเสนอผลงานวิจัย ระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

[7] 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.

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

[9] Siripiyasing, P., Kaenratana, K., Mokkamul, P., Tanee, T., Sudmoon, R. and Chaveerach, A., 2012, DNA barcoding of the *Cymbidium* species (Orchidaceae) in Thailand, Afr. J. Agri. Res. 7: 393-404.

[10] Koichiro, T., Masatoshi, N. and Sudhir, K., 2004, Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining

method, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 101: 11030-11035.

[11] นฤมล ธนานันต์, ฐิติพร โท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21: 99-108.