การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบลายด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

Genetic Relationship Assessment and Identification of Mottled-Leaf *Paphiopedilum* Using Nucleotide Sequences of *rpo*C1 Gene and *trn*H-*psb*A Intergenic Spacer Region

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

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมีประโยชน์ต่อการจำแนกสิ่งมีชีวิตในระดับโมเลกุล ปัจจุบันการจำแนกกล้วยไม้มักมีความยุ่งยากและความสับสน อีกทั้งการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญ งานวิจัยนี้จึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในการจำแนกพันธุ์และประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ เมื่อวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 หรือชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A เพียงบริเวณเดียว พบว่าไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีบางพันธุ์ ดังนั้นจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ร่วมกัน ซึ่งยังคงพบว่าไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีครบทุกพันธุ์ แต่การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 บริเวณ ร่วมกัน มีประสิทธิภาพในการจำแนกมากกว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงบริเวณเดียว

*Corresponding author: narumolpla@yahoo.com

คำสำคัญ : สกุลรองเท้านารี; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การจำแนก; ยีน *rpo*C1; ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

Abstract

Genetic relationship is useful for molecular identification of organism. The conventional orchid identification based mainly on morphology is difficult and confused. Besides, an expert for morphological classification is required. In this research, 22 samples of mottled-leaf *Paphiopedilum* were used to identify and analyze genetic relationship using DNA sequences of *rpo*C1 genes and *trn*H-*psb*A intergenic spacer region. The results revealed that, the phylogenetic tree constructed based on the nucleotide sequences of *rpo*C1 or *trn*H-*psb*A intergenic spacer region could not be employed to classify some varieties of *Paphiopedilum*. When data of *rpo*C1 gene and *trn*H-*psb*A intergenic spacer region were combined, some varieties of *Paphiopedilum* remained unidentified. However, combination data of the two loci showed more efficiency for identification among mottled-leaf *Paphiopedilum* samples than that of only single locus.

Keywords: *Paphiopedilum*; genetic relationship; identification; *rpo*C1 gene; *trn*H-*psb*A intergenic spacer region

1. คำนำ

ประเทศไทยจัดเป็นศูนย์กลางการกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้ในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เนื่องจากมีกล้วยไม้หลากหลายชนิดที่กระจายตัวอยู่ทั่วภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วประเทศ (มลิวัลย์, 2539; สำอางค์, 2549) อีกทั้งประเทศไทยยังเป็นผู้ผลิตและผู้ส่งออกดอกกล้วยไม้เขตร้อนมากเป็นอันดับ 1 ของโลก สามารถผลิตและส่งออกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum*) ได้ในปริมาณมาก (วิเคราะห์โดยกรมส่งเสริมการเกษตร) ปัจจุบันกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีถือว่าเป็นมรดกทางธรรมชาติที่มีอยู่ในประเทศไทย มีราคาค่อนข้างแพงและหายาก (อุไร, 2541)

การศึกษาพบว่าในกล้วยไม้รองเท้านารีมีสารสติลบีน (stilbene) ซึ่งเป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) สามารถต้านเซลล์มะเร็งในปอด (Lertnitikul *et al*., 2016) การอักเสบ แบคทีเรีย และไวรัส (Naphat-sawan *et al*., 2016) ดอกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีมีความหลากหลายมาก แต่ลักษณะสัณฐานอื่น ๆ มีความใกล้เคียงกัน ส่งผลให้ยากต่อการจำแนกพันธุ์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ของกล้วยไม้สกุลนี้

ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่กำหนดลักษณะของสิ่งมีชีวิต สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะคล้ายกันมากกว่าสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน จึงได้นำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิต เพื่อเพิ่มความถูกต้อง รวดเร็ว และประสิทธิภาพในการระบุสิ่งมีชีวิต อีกทั้งยังเป็นที่ยอมรับและได้รับความร่วมมือกันระหว่างประเทศต่าง ๆ เกิดเป็นโครงการในการระบุสิ่งมีชีวิต (The Barcode of Life Project) (พรณรงค์ และอรุณรัตน์, 2554) ซึ่งบริเวณตำแหน่งจำเพาะที่เสนอให้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (standardized DNA) ในการระบุและจำแนกสิ่งมีชีวิตมีหลายข้อเสนอ เช่น (1) ยีน *rbc*L ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน

*trn*H กับ *psb*A (Kress and Erickson, 2007) (2) ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A, ยีน *rpo*C1, ยีน *rbc*L และยีน *mat*K โดยเลือกวิเคราะห์ร่วมกัน 3 บริเวณ (Hollingsworth, 2008) (3) ยีน *mat*K ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A (Newmaster *et al*., 2008) โดยสรุปพบว่าการใช้ตำแหน่งจำเพาะหลายบริเวณร่วมกันจะมีความแม่นยำและมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น (Chase *et al*., 2007; Lahaye *et al*., 2007; Hollingsworth, 2008, Guo *et al*., 2015)

ยีน *rpo*C1 กำหนดการสร้างพอลิเพปไทด์ (polypeptide) ที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) (Serino and Maliga, 1998) สำหรับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A นั้น เป็นส่วนปลายของยีน *trn*H ที่กำหนดการสร้าง $tRNA^{his}$ (GUG) ซึ่งจับกับกรดอะมิโนฮีสทิดีน (histidine, H) และต้นส่วนต้นของยีน *psb*A ที่กำหนดการสร้างพอลิเพปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของ photosystem II โดยชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A เป็นบริเวณที่นิยมนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง (Kress *et al*., 2005; Kress and Erickson, 2007)

งานวิจัยนี้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในการเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ จากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณเดียวและของทั้ง 2 บริเวณร่วมกัน ซึ่งผลการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์และการคุ้มครองพันธุ์กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี รวมถึงการวางแผนปรับปรุงพันธุ์และผลิตเพื่อการค้าต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จำนวน 22 พันธุ์ แสดงดังตารางที่ 1

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย ด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธีของ นฤมล และคณะ (2555) แล้วตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (eletrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose) ความเข้มข้น 0.8 % (Sambrook *et al*., 1989) และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 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) โดยใช้ไพรเมอร์สากล (universal primer) ที่จำเพาะกับยีน *rpo*C1 (*rpo*C1-F : 5′-GTGGATACACTTCTTGATAATGG-3′, *rpo*C1-R : 5′-TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC-3′) และไพรเมอร์สากลที่จำเพาะกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A (*trn*H-F : 5′-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3′, *psb*A-R : 5′-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3′) (CBOL Plant Working Group, 2009) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (Unit) (เกียรติชัย และคณะ, 2557)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสมี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 54 และ 56 องศาเซลเซียส (สำหรับยีน *rpo*C1 และ ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ตามลำดับ) นาน 30 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5 % และเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอที่ทราบขนาดต่าง ๆ (DNA ladder) (นฤมล และคณะ, 2555)

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. var. 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) (*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

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ที่เพิ่มปริมาณได้ โดยบริษัท Bioneer (ประเทศเกาหลีใต้) แล้วตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลใน

ฐานข้อมูลGenBank ของ NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov) และฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle)

วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0) โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood และกำหนดค่า bootstrap 1,000 รอบ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์สากล พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครบทุกพันธุ์ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A เพียง 1 แถบ ตามความคาดหวัง ซึ่งมีขนาดประมาณ 500 และ 900 คู่เบส ตามลำดับ

3.2 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ แล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะดังกล่าวในกล้วยไม้รองเท้านารี 92-100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นั้นถูกต้อง และได้ฝากเก็บลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยมีหมายเลขจำเพาะ (accession number) ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ ที่ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI

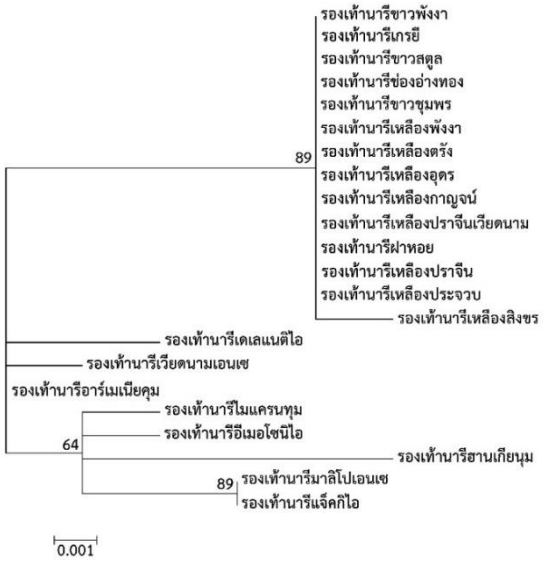
กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย	หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ (คู่เบส)	
	*rpo*C1	*trn*H-*psb*A
นารีฝาหอย	KU201366 (554)	KU201394 (931)
เหลืองปราจีน	KU201367 (554)	KU201395 (940)
เหลืองปราจีนเวียดนาม	KU201368 (554)	KU201396 (939)
เหลืองกาญจน์	KU201369 (554)	KU201397 (941)
เหลืองอุดร	KU201370 (554)	KU201398 (947)
เหลืองสิงขร	KU201371 (554)	KU201399 (939)
เหลืองตรัง	KU201372 (554)	KU201400 (937)
เหลืองพังงา	KU201373 (554)	KU201401 (937)
ขาวชุมพร	KU201374 (554)	KU201402 (935)
ช่องอ่างทอง	KU201375 (554)	KU201403 (938)
ขาวสตูล	KU201376 (554)	KU201404 (938)
ขาวพังงา	KU201377 (554)	KU201405 (937)
เกรยี	KU201378 (554)	KU201406 (941)
เหลืองประจวบ	KU201379 (554)	KU201407 (932)
มาลิโปเอนเซ	KX265000 (554)	KX265008 (922)
แจ็คกิไอ	KX265001 (554)	KX265009 (919)
ไมแครนทุม	KX265002 (554)	KX265010 (910)
เวียดนามเอนเซ	KX265003 (554)	KX265011 (927)
เดเลแนติไอ	KX265004 (554)	KX265012 (915)
อาร์เมเนียคุม	KX265005 (554)	KX265013 (913)
อีเมอร์โซนิไอ	KX265006 (554)	KX265014 (922)
ฮานเกียนุม	KX265007 (554)	KX265015 (919)

3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

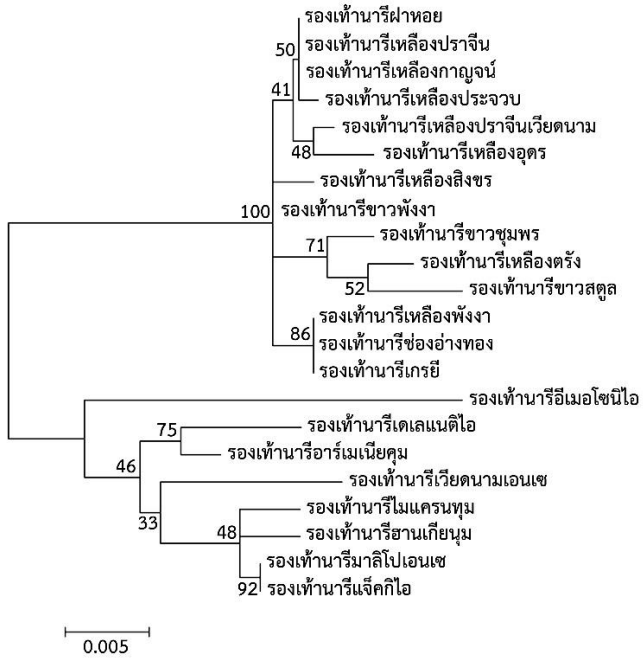
เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ พบว่ามีการกลายระดับยีน (gene mutation) เกิดขึ้น โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 มีการกลายเกิดขึ้น 2 รูปแบบ คือ ไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) 5 ตำแหน่ง และพิวรีนทรานสิชัน (purine transition) 11 ตำแหน่ง ส่วนชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A มีการกลายเกิดขึ้น 4 รูปแบบ ได้แก่ อินเดล (indel, insertion/deletion) 62 ตำแหน่ง ทรานสเวอร์ชัน (transversion) 67 ตำแหน่ง พิวรีนทรานสิชัน 20 ตำแหน่ง และไพริมิดีนทรานสิชัน 20 ตำแหน่ง

เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ รองเท้านารี 14 พันธุ์ ที่จัดอยู่ในสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ Brachypetalum และกลุ่มที่ 2 คือ รองเท้านารี 8 พันธุ์ ที่จัดอยู่ในสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ Parvisepalum และหมู่ Emersonianum (ตารางที่ 1)

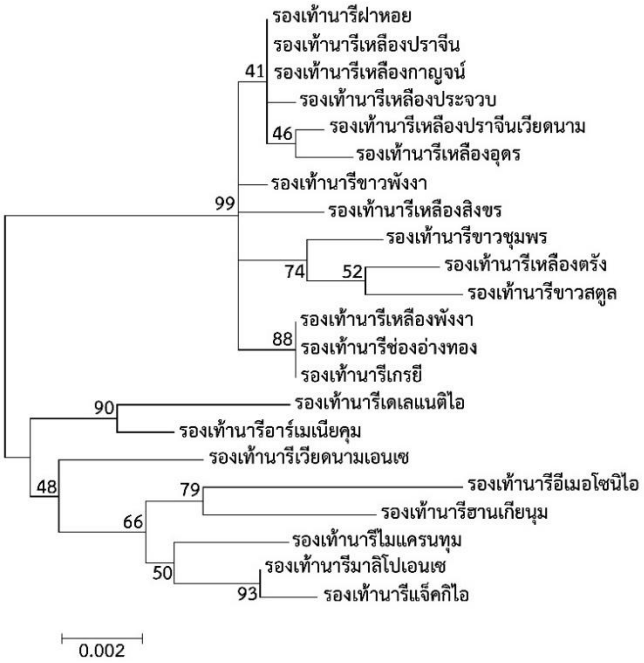
โดยแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 (รูปที่ 1) พบว่ากลุ่มที่ 1 จำแนกรองเท้านารีเหลืองสิงขรได้ ส่วนที่เหลือไม่สามารถจำแนก กลุ่มที่ 2 ไม่สามารถจำแนกรองเท้านารีมาลิโปเอนเซและแจ็คกิไอออกจากกัน สำหรับแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A (รูปที่ 2) จำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีในกลุ่มที่ 1 บางพันธุ์ได้ แต่ยังไม่สามารถจำแนกรองเท้านารีฝาหอย เหลืองปราจีน และเหลืองกาญจน์ออกจากกัน และไม่สามารถแยกรองเท้านารีเหลืองพังงา ช่องอ่างทอง และเกรยีออกจากกัน ส่วนกลุ่มที่ 2 ไม่สามารถจำแนกรองเท้านารีมาลิโปเอนเซและแจ็คกิไอออกจากกัน เช่นเดียวกับแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ซึ่งจะเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H และ *psb*A สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ ได้ดีกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 เนื่องจากยีน *rpo*C1 มีการกลายเกิดขึ้นน้อยกว่าชิ้นดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H และ *psb*A



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ร่วมกัน

เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A (รูปที่ 3) พบว่าสามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ เป็น 2 กลุ่มเช่นเดียวกัน โดยกลุ่มที่ 1 ยังไม่สามารถจำแนกรองเท้านารีฝาหอย เหลืองปราจีน เหลืองกาญจน์ เหลืองพังงา ช่องอ่างทอง และเกรยีออกจากกัน

ส่วนกลุ่มที่ 2 จำแนกรองเท้านารีมาลิโปเอนเซและแจ็คกิไออกจากกันได้ ดังนั้นถ้าวิเคราะห์ยีนหลายบริเวณร่วมกันจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีมากขึ้น

3.4 อภิปรายผล

การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณต่าง ๆ ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) นิยมใช้สำหรับการจำแนกพืช โดยบริเวณที่เป็นดีเอ็นเอมาตราฐาน (standard DNA) คือ ยีน *rpo*B, *rpo*C1, *rbc*L, *mat*K, ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *atp*F กับ *atp*H, *psb*K กับ *psb*I และ *trn*H กับ *psb*A (CBOL Plant Working Group, 2009) ซึ่งงานวิจัยต่าง ๆ พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A มีประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย สูงกว่ายีน *rpo*C1 เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A เป็นบริเวณที่มีการผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง (Kress *et al*., 2005; Kress and Erickson, 2007) และยังเป็นบริเวณที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดหรือสปีชีส์ (species) ได้ดีที่สุดอีกด้วย (CBOL Plant Working Group, 2009; Pang *et al*., 2011)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 2 บริเวณมาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่ามีประสิทธิภาพในการจำแนกสูงขึ้น เช่นเดียวกับงานวิจัยที่เคยรายงานมาก่อน ได้แก่ นฤมล และคณะ (2560) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A พบว่ามีประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องสาย 92 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งดีกว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียงบริเวณเดียว นฤมล และคณะ (2557) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A พบว่าสามารถแยกกล้วยไม้สิงโตก้ามปูใหญ่และสิงโตก้ามปูแดงออกจากกัน อย่างไรก็ตาม การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียง 1 หรือ 2 บริเวณ ก็ยังไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ ออกจากกันครบทั้งหมด ดังนั้นควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะหลายบริเวณร่วมกัน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนก (Hilu *et al*., 2003) ดังนั้นจึงมีการเสนอให้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานหลายบริเวณร่วมกันเพื่อใช้สำหรับการระบุพันธุ์ของพืช (Fazekas *et al*., 2008)

ปัจจุบัน งานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว โดยนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในพืชหลายชนิด ได้แก่ มอส (Mosses) (Liu *et al*., 2010) พืชวงศ์กุหลาบ (Rosaceae) (Pang *et al*., 2011) กล้วยไม้สิงโตกลอกตา หมู่สิงโตสยาม (นฤมล และคณะ, 2557) ข้าวมีสี (นฤมล และคณะ, 2557) กล้วยไม้สกุลแวนด้า หมู่เข็ม (จินต์ และคณะ, 2558) กล้วยไม้สกุลหวาย กลุ่มเอื้องสาย (นฤมล และคณะ, 2558) กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ (ธีระชัย และคณะ, 2560) และกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (Venus slipper) (Guo *et al*., 2016) เป็นต้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเป็นวิธีที่มีประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์และการจำแนกพืช

4. สรุป

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ เป็น 2 กลุ่ม ตามสกุลย่อย ยังไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีภายในกลุ่มบางพันธุ์ ดังนั้นจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สร้างได้ แบ่งกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ เป็น 2 กลุ่ม

เช่นเดียวกัน และยังคงมีบางพันธุ์ที่ไม่สามารถจำแนกออกจากกัน แต่มีประสิทธิภาพในการจำแนกสูงกว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงบริเวณเดียว

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี โดยผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ 2559

6. รายการอ้างอิง

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

จินต์ ทองสม, ภัทรพร คุ้มภัย, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A, Thai J. Sci. Tech. 23: 994-1005.

ธีระชัย ธนานันต์, จุฑาทิพย์ พันธ์รูปท้าว และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rbc*L, Thai J. Sci. Tech. 25: 579-590.

นฤมล ธนานันต์, เกียรติชัย แซ่ไต่ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ, Thai J. Sci. Tech. 22: 523-530.

นฤมล ธนานันต์, จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *rpo*C1, Thai J. Sci. Tech. 22: 674-682.

นฤมล ธนานันต์, ฐิติพร โท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2558, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rpo*C1, Thai J. Sci. Tech. 23: 1-10.

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

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

พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์ และอรุณรัตน์ ฉวีราช, 2554, ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต กรณีศึกษา: จีน Cytochrome c Oxidase I (COI) ในสัตว์, ว.มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม 5(2): 205-210.

มลิวัลย์ พรหมรักษา, 2539, กล้วยไม้, พิมพ์ครั้งที่ 1, ห้างหุ้นส่วนจำกัด ยูนิเวอร์แซลกราฟฟิค, กรุงเทพฯ.

สำอางค์ เนตรนารี, 2549, กล้วยไม้, พิมพ์ครั้งที่ 5, เกษตรสยามบุ๊คส์, กรุงเทพฯ.

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

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

Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., Berg, C.V.D., Madriñán, S., Petersen, G., Seberg, O., Jørgsensen, T., Cameron, K.M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson, T.A.J., Conrad, F., Salazar, G.A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M.L., Barraclough, T.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.

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 plant species equally well, PLoS One 3: e2802.

Guo, Y.Y., Huang, L.Q., Liu, H.J. and Wang, X.Q., 2015, Promise and Challenge of DNA Barcoding in Venus Slipper (*Paphiopedilum*), PLoS One 11(1): e0146880.

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 *mat*K sequence information, Am. J. Bot. 90: 1758-1776.

Hollingsworth, P.M., 2008, DNA barcoding plants in biodiversity hotspots: Progress and outstanding questions, Heredity, 101: 1-2.

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.

Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Timothy G. Barraclough, and Savolainen, V., 2007, DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots, Proc. Nat. Acad. Sci. UAS. 105: 2923-2928.

Lertnitikul, N., Jittham, P., Khankhampoch, L., Pattamadilok, C., Sukrong, S. and Suttisri, R., 2016, Cytotoxic stilbenes from the roots of *Paphiopedilum godefroyae*, J. Asian. Sian. Nat. Prod. Res. 18: 1143-1150.

Liu, Y., Yan, H.F., Cao, T. and Ge, X.J., 2010, Evaluation of 10 plant barcodes in Bryophyta (Mosses), J. Syst. Evol. 1: 36-46.

Naphatsawan, P., Nonthalert, L., Rutt, S. and Suchada, S., 2016, Stilbenes from *Paphiopedilum exul* roots, Thai J. Pharm. Sci. 40: 116-119.

Newmaster, S.G., Fazekas, A.J., Steeves, R.A.D. and Janovec, J, 2008, Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae, Mol. Ecol. 8: 480-490.

Pang, X., Song, J., Zhu, Y., Xu, H., Huang, L.

and Chen, S., 2011, Applying plant DNA barcodes for *Rosaceae* species identification, Cladistics 27: 165-170.

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

Serino, G. and Maliga, P., 1998, RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme, Plant Physiol. 117: 1165-1170.