

การจัดจำแนกกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีบริเวณดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์

Identification of *Aerides* orchids using polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) based on chloroplast DNA

มลิวรรณ นาคขุนทด*, ศิริรัตน์ อุดอินทร์, อนุพันธ์ กองบังเกิด

Maliwan Nakkuntod*, Sirirat Aud-in, Anupan Kongbungkerd

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Phisanulok 65000, Thailand

*Corresponding author: lotharmali@yahoo.com

บทคัดย่อ

การจัดจำแนกกล้วยไม้สกุลกุหลาบ 7 ชนิด ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีในบริเวณดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ 2 บริเวณ พบว่าจากเอนไซม์ตัดจำเพาะ 14 ชนิด มีเอนไซม์ที่สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ได้ 5 ชนิด โดยเอนไซม์ *EcoRI* สามารถตัดและทำให้เกิดความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างได้ ขณะที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิดที่สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณอินทรอนของ *trnL* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ได้ โดยมีเอนไซม์ 6 ชนิดที่สามารถตัดและเกิดรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เมื่อทำการวิเคราะห์พบว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดทั้งหมด 52 แถบ ซึ่งมีขนาดอยู่ระหว่าง 100 ถึง 1,200 คู่เบส และมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่างชนิดอยู่ระหว่าง 0.481 ถึง 1.000 จากนั้นเมื่อนำมาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์แบบ unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) พบว่าสามารถแยกกล้วยไม้สกุลกุหลาบออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการกระจายพันธุ์

ABSTRACT

Identification of 7 *Aerides* species using polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of 2 chloroplast DNA regions revealed that 5 out of 14 restriction enzymes

could digest DNA in *psbA-trnH* intergenic spacer region; however, only the *EcoRI* could give polymorphism. On the other hand, total of 7 enzymes could digest DNA in *trnL-trnF* region, while only 6 enzymes could reveal polymorphism. The total of 52 bands ranging between 100–1,200 bp were scored. The similarity index in interspecific level ranged from 0.481 to 1.000. Cluster analysis using unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) algorithm produced a dendrogram with 2 main clusters of *Aerides* which was in good agreement with their morphology and distribution data.

คำสำคัญ: กล้วยไม้สกุลกุหลาบ; คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ; การจัดจำแนก; พีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

Keywords: *Aerides*; chloroplast DNA; identification; PCR-RFLP

บทนำ

กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (Genus *Aerides*) หรือเอื้องกุหลาบเป็นกล้วยไม้ที่พบได้ตามธรรมชาติในป่าทั่วทุกภาคของประเทศไทยและในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยในประเทศไทยพบ 7 ชนิด ซึ่งมีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจ เนื่องจากมีความสวยงาม ปลูกเลี้ยงง่าย ดำรงชีวิตแบบอิงอาศัยและมีลักษณะที่สำคัญคือ มีเกสร

เพศผู้ 1 อันมีเดือยดอก (spur) และกลีบปากมี 3 แฉก นอกจากนี้ยังมีเกสรเพศเมียอยู่บริเวณปลายของเส้าเกสรที่มีลักษณะคล้ายรูปนก (beak-like column) ช่อดอกส่วนมากเป็นทรงกระบอกมีทั้งชนิดที่ช่อดอกตั้งและช่อโค้งห้อยลงมีการกระจายพันธุ์ในเขตร้อนหรือกึ่งร้อนกล้วยไม้สกุลกุหลาบนั้นสามารถผสมติดได้ทั้งภายในสกุลเดียวกันและข้ามสกุล (อบฉันท, 2543) เนื่องจากมีช่วงการบานของดอกในเวลาเดียวกันหรือใกล้เคียงกันและสามารถพบได้ในบริเวณใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงทำให้เกิดความหลากหลายขึ้นจนยากที่จะจัดจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกเพียงอย่างเดียว ดังนั้นเทคนิคทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถช่วยในการจัดจำแนกหรือตรวจสอบชนิดที่แท้จริงของกล้วยไม้สกุลนี้ได้

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนั้นมีการนำส่วนของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอมาใช้เป็นข้อมูลกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความคงที่ของขนาดและโครงสร้างของสารพันธุกรรม และยังสามารถถ่ายทอดจากแม่ไปสู่รุ่นลูกด้วย ซึ่งในพืชแต่ละชนิดจะมีลำดับดีเอ็นเอที่ต่างกัน โดยเฉพาะบริเวณระหว่างยีนซึ่งเป็นส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วจึงสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมได้ เนื่องจากเกิดความผันแปรหรือที่เรียกว่าเกิดความหลากหลายหรือความแตกต่าง (polymorphism) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอนั้นเอง (สุรินทร์, 2545) ซึ่งเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้มีการพัฒนาขึ้นมาหลายแบบด้วยกัน สำหรับการศึกษาในกล้วยไม้สกุลกุหลาบนั้นมีรายงานการนำเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (High Annealing Temperature-Random Amplified Polymorphic DNA : HAT-RAPD) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 8–12 นิวคลีโอไทด์มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) และเทคนิคไอเอสเอสอาร์ (Inter Simple Sequence Repeat : ISSR) ที่เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ 2 ตำแหน่ง มาใช้ในการจัดจำแนกกลุ่ม นอกจากนี้ยังใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ และมีการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี ซึ่งพบว่าในบาง

ตัวอย่างนั้นยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ และขาดการประเมินสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยา (วริศรา และคณะ, 2557; นฤมล และคณะ, 2557ก; 2557ข) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้เพื่อมาจัดจำแนกและประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกล้วยไม้สกุลกุหลาบในประเทศไทย ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นพื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลกุหลาบต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีดัดแปลง Doyle and Doyle (1987) จากใบอ่อนที่เก็บไว้ในซิลิกาเจลทั้งหมด 23 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างทั้งหมดได้ทำการเก็บรวบรวมพันธุ์มาจากธรรมชาติแล้วนำมาปลูกเลี้ยงในโรงเรือน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงต่อไป ซึ่งประกอบด้วยกล้วยไม้สกุลกุหลาบ 21 ตัวอย่าง ทั้งที่ทราบชนิดแน่นอนและที่คาดว่าจะปลูกผสมตามธรรมชาติ รวมถึงตัวอย่างเอื้องอินทจักร (*Vanda flabellate* (Rolfe ex. Downie)) อีก 2 ตัวอย่างเพื่อเป็นชนิดเปรียบเทียบ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* (Kim et al., 1999) และบริเวณอินทอรอนของ *trnL* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* (Taberlet et al., 1991) ด้วยเครื่องพีซีอาร์ Bio-Rad T100™ Thermal Cycler ซึ่งในปฏิกิริยาต้องใช้ความเข้มข้นของสารเคมีต่างๆ รวมถึงอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสมกับไพรเมอร์ที่ใช้ โดยในช่วง annealing จะกระทำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสสำหรับไพรเมอร์ *psbA-trnH* และ 52 องศาเซลเซียสสำหรับไพรเมอร์ *trnL-trnF* จากนั้นตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ แล้วนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตแล้วถ่ายภาพ

การทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

ทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จ HiYield[®] Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience) และเช็คผลอีกครั้งด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณดีเอ็นเอก่อนทดลองต่อไป

การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR-RFLP

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้ง 2 บริเวณมาตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 14 ชนิดได้แก่ *RsaI*, *TaqI*, *HaeIII*, *MseI*, *HindIII*, *MspI*, *BamHI*, *EcoRV*, *VspI*, *XbaI*, *AluI*, *HinfI*, *EcoRI* และ *PstI* จากนั้นนำมาแยกด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าความต่างศักย์ 50 โวลต์ แล้วนำไปตรวจสอบและถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยแปลงข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอทั้งหมดคือ ให้สัญลักษณ์เป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอและให้สัญลักษณ์เป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ จากนั้นนำมาคำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยมือ แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.20e (Rohlf, 2000) เพื่อสร้างแผนภาพด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic average

(UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการสกัดดีเอ็นเอพบว่าดีเอ็นเอกล้วยไม้ทุกตัวอย่างที่สกัดได้มีขนาดมากกว่า 10 กิโลเบส และสารละลายดีเอ็นเอมีคุณภาพและปริมาณที่เพียงพอในการนำไปใช้ต่อไป และเมื่อนำไปทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ได้ขนาดประมาณ 800 คู่เบส (นฤมล และคณะ, 2557) ส่วนอินทรอนของ *trnL* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* นั้นพบว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 1,000 และ 1,200 คู่เบส แสดงให้เห็นว่าบริเวณนี้มีความผันแปรค่อนข้างสูงในกลุ่มของกล้วยไม้ ซึ่งเคยมีรายงานว่ากล้วยไม้หลายชนิดมีขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวนี้ผันแปรได้ตั้งแต่ 900 – 1,300 คู่เบส (Kocyanet *et al.*, 2008)

และเมื่อศึกษารูปแบบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี พบว่าบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* มีเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิดที่สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณนี้ได้ โดย *TaqI*, *HaeIII*, *MseI* และ *HinfI* จะให้รูปแบบดีเอ็นเอรูปแบบเดียว แต่ *EcoRI* จะเกิดรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (Figure1) และชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณอินทรอนของ *trnL* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* มีเอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิดที่สามารถตัดบริเวณนี้ได้ โดย *BamHI* เมื่อตัดแล้วจะได้รูปแบบเดียว แต่ *RsaI*, *MseI*, *VspI*, *HinfI*, *EcoRI* และ *TaqI* (Figure2) ตัดแล้วทำให้เกิดรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

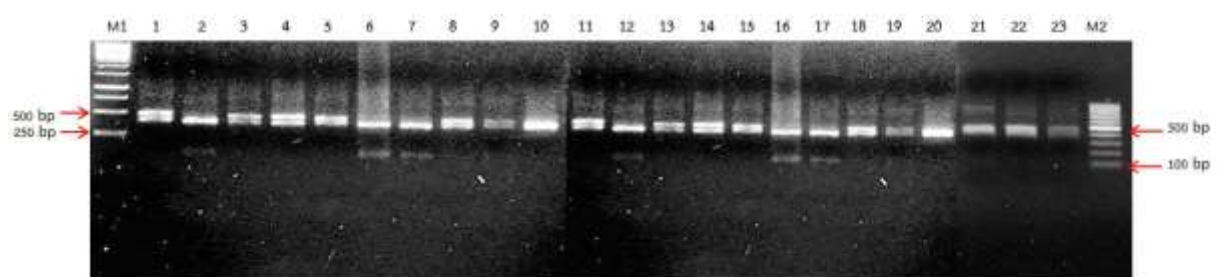


Figure 1 PCR-RFLP patterns of *psbA-trnH* of *Aerides* orchids after digestion with *EcoRI*. The number above each lane represents *Aerides* samples namely *A. odorata*1, *A. odorata*2, *A. falcata*1, *A. falcata*2, *A. falcata*3, *A. odorata*3, *A. odorata*4, *A. rosea*1, *A. rosea*2, *A. rosea*3, *A. crassifolia*1, *A. crassifolia*2, *A. multiflora*1, *A. multiflora*2, *A. multiflora*3, *A. houlletiana*1, *A. houlletiana*2, *A. houlletiana*3, *V. flabellata*1, *V. flabellata*2, *A. krabiensis*, *Aerides* sp.1 and *Aerides* sp.2. M1 and M2 are 1 kb and 100 bp DNA ladders, respectively.

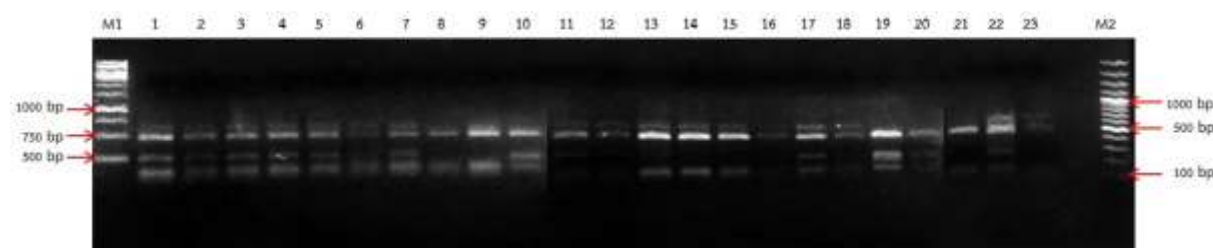


Figure 2 PCR-RFLP patterns of *trnL* intron and *trnL-trnF* of *Aerides* orchids after digestion with *TaqI*. The number above each lane represents *Aerides* samples namely *A. odorata*1, *A. odorata*2, *A. falcata*1, *A. falcata*2, *A. falcata*3, *A. odorata*3, *A. odorata*4, *A. rosea*1, *A. rosea*2, *A. rosea*3, *A. crassifolia*1, *A. crassifolia*2, *A. multiflora*1, *A. multiflora*2, *A. multiflora*3, *A. houletiana*1, *A. houletiana*2, *A. houletiana*3, *V. flabellata*1, *V. flabellata*2, *A. krabiensis*, *Aerides* sp.1 and *Aerides* sp.2. M1 and M2 are 1 kb and 100 bp DNA ladders, respectively.

เมื่อพิจารณาจากทุกเอนไซม์ที่ตัดชิ้นส่วน ดีเอ็นเอและให้ความแตกต่างแล้ว จะได้แถบดีเอ็นเอ ทั้งหมด 52 แถบ มีขนาดอยู่ในช่วง 100 – 1,200 คู่เบส และเมื่อนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนของแต่ละตัวอย่างพบว่าค่าดัชนีความเหมือนระหว่างชนิดที่คล้ายกันมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 1.000 คือ *Aerides odorata* และ *Aerides falcata* (Table1) ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วพบว่ากล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิดนี้มีลักษณะของลำต้นและสีดอกที่คล้ายคลึงกันมาก ต่างกันเพียงลักษณะกลีบปาก โดย *A. odorata* นั้นกลีบข้างทั้งสองข้างของกลีบปากจะบิดเข้ามาคลุมส่วนของเส้าเกสรไว้ จึงเรียกกันโดยทั่วไปว่าเอื้องกุหลาบกระเป๋าคิด ขณะที่ *A. falcata* นั้นกลีบข้างทั้งสองข้างของกลีบปากจะเปิดออก จึงได้ชื่อว่าเอื้องกุหลาบกระเป๋าคิด นอกจากนี้ยังพบว่าค่าดัชนีความเหมือนระหว่างชนิดที่แตกต่างกันมากที่สุดมีค่าน้อยที่สุดเท่ากับ 0.481 คือ *Aerides rosea* และ *Aerides* sp.1 (Table1) ซึ่งจากลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกนั้นทำให้ทราบว่าตัวอย่างที่เราไม่ทราบชนิดนั้นอยู่ในสกุล *Aerides* แต่ที่แตกต่างกันมากน่าจะเนื่องจากกล้วยไม้สกุลนี้มีความผันแปรทางชนิดสูง

เมื่อนำข้อมูลทางดีเอ็นเอมาใช้ในการจัดกลุ่มพบว่ากล้วยไม้สกุลกุหลาบสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *A. odorata*, *A. falcata*, *Aerides houletiana* และ *Aerides crassifolia* รวมถึง *Aerides* sp. 1 และ 2 ด้วย ซึ่งในกลุ่มนี้มีลักษณะสัณฐานวิทยาร่วมกันคือการมีกลีบข้างของกลีบปากขนาดใหญ่ เห็นชัดเจน และ *A. houletiana* จะใกล้เคียงกับ

A. odorata และ *A. falcata* มากที่สุด รวมถึง *Aerides* sp. 1 ด้วย เนื่องจาก *A. houletiana* มีลักษณะคล้ายกับ *A. falcata* มาก ต่างกันเพียงสีของกลีบดอก โดย *A. houletiana* จะมีกลีบดอกสีเหลือง มีกลิ่นหอมคล้ายตะไคร้ และพบกระจายพันธุ์ในแถบจังหวัดนครราชสีมา จึงได้ชื่อว่ากล้วยไม้กุหลาบโคราช ขณะที่ *A. crassifolia* จะมีลักษณะต่างจาก 3 ชนิดข้างต้นคือโคนกลีบข้างของกลีบปากจะแคบ นอกจากนี้ *Aerides* sp.1 และ 2 ถ้าดูจากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจะไม่สามารถบอกได้ว่าใกล้เคียงกับชนิดใด จึงอาจกล่าวได้ว่าทั้งสองตัวอย่างนี้อาจจะเป็นกล้วยไม้สกุลกุหลาบคนละชนิดกับที่นำมาศึกษาทั้งหมด และยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า *A. odorata* 1 และ 2 มีความใกล้เคียงกับ *A. falcata* มากกว่าที่จะใกล้เคียงกับ *A. odorata* 3 และ 4 เนื่องจาก *A. odorata* 1 และ 2 มีการกระจายพันธุ์ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ขณะที่ *A. falcata* สามารถกระจายพันธุ์ได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย และมีลักษณะของลำต้น ใบและสีดอกที่คล้ายกันมาก ซึ่งต่างจาก *A. odorata* 3 และ 4 ที่มีการกระจายพันธุ์ทางภาคใต้ของประเทศไทยเท่านั้น นอกจากนี้ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาของ *A. odorata* 1 และ 2 และ *A. odorata* 3 และ 4 ก็แตกต่างกันมากในเรื่องของทรงต้น ใบ และสีดอก โดย *A. odorata* 1 และ 2 จะมีทรงต้นถี่และแน่นกว่า รวมไปถึงใบจะสั้นและป้อมกว่า กลีบดอกสีขาวมีแถบสีชมพูที่ปลายกลีบและกลางกลีบปาก ขณะที่ *A. odorata* 3 และ 4 จะมีทรงต้นที่ห่าง ใบจะแคบและยาวกว่า และกลีบดอกมีสีขาวทั้งหมด ซึ่งในอนาคตอาจแยกเป็นชนิดใหม่ได้ ถ้ามีข้อมูลทางดีเอ็นเอที่มากขึ้นและกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *A. rosea*, *A. Multiflora*

และ *Aerides krabiensis* รวมถึง *Vanda flabellate* ด้วย ซึ่งในกลุ่มนี้มีลักษณะสัณฐานวิทยาเหมือนกันคือกลีบข้างของ กลีบปากจะมีขนาดเล็กมาก ทำให้กลีบปากมีขนาดใหญ่ (Christenson, 1987) โดย *A. multiflora* และ *A. rosea* จะพบกระจายพันธุ์ในภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ ขณะที่ *A. krabiensis* จะพบกระจายพันธุ์ทางภาคใต้ โดยพบครั้งแรกที่ จ.กระบี่ จึงได้ชื่อว่าเอื้องกุหลาบกระบี่ แต่เมื่อพิจารณาที่ลักษณะสัณฐานวิทยากลับพบว่า *A. rosea* คล้ายกับ *A. krabiensis* ต่างกันเพียงขนาดของใบ โดย *A. krabiensis* จะมีใบที่เล็กกว่า *A. rosea* ขณะที่ *A. multiflora* นั้นจะต่างจากชนิดอื่นๆ คือเดียวที่กลีบปาก (spur) จะชี้ไปทางด้านหลังส่วนกล้วยไม้กุหลาบชนิดอื่นๆ นั้นจะชี้ไปทางด้านหน้า นอกจากนี้ *V. flabellata* ที่ถูกจัด อยู่ในกลุ่มนี้ด้วยเนื่องจากเดิมนั้นกล้วยไม้ชนิดนี้เคยถูกจัด อยู่ในสกุล *Aerides* แต่ต่อมาด้วยข้อมูลทางพันธุกรรม พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุล *Vanda* มากกว่า ปัจจุบันจึงถูกย้ายออกไปจากสกุล *Aerides* และด้วยข้อมูล ทางสัณฐานวิทยาที่กลีบปากของ *V. flabellata* นั้นมีกลีบ ปากกว้าง และไม่แยกเป็น 3 ส่วน รวมถึงมีเดือยดอกที่สั้น มาก แต่ถ้าพิจารณาเฉพาะลักษณะภายนอกอย่างเดียวก็

ยังคล้ายคลึงกันมาก (Garay, 1972; Seidenfaden, 1973; Christenson, 1987; Motes, 1997; Kocyanet *et al.*, 2008) (Figure3) แต่อย่างไรก็ตามจากการที่ *V. flabellata* ถูกจัด อยู่ในกลุ่มกล้วยไม้สกุลกุหลาบก็น่าจะเนื่องจากการจัด กลุ่มที่อาศัยข้อมูลชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (fragment based) เพียง 2 บริเวณ และใช้ตัวอย่างจากต่างสกุล (outgroup) เพียงชนิดเดียวจึงทำให้ตัวอย่างสามารถแทรกเข้าไปอยู่ ภายในกลุ่มได้ ดังนั้นในการจัดกลุ่มโดยอาศัยข้อมูล ลักษณะนี้ควรมีตัวอย่างต่างสกุลมากกว่า 1 ตัวอย่าง เช่น ถ้าเพิ่มเติมตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าหรือกล้วยไม้สกุล ช้าง ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *V. flabellata* มากกว่า กล้วยไม้สกุลกุหลาบก็น่าจะสามารถแยก *V. flabellata* ออกจากกล้วยไม้สกุลกุหลาบได้และจากผลการศึกษา กล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเทคนิคอื่นๆ ก่อนหน้านี้พบว่าผล การศึกษาออกมาสอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน โดยกลุ่มของ *A. odorata*, *A. falcata*, *A. houlletiana* และ *A. crassifolia* จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ขณะที่ *A. rosea* และ *A. krabiensis* จัดอยู่ใกล้ชิดกันร่วมกับ *A. multiflora* (วิริสรา และคณะ, 2557; นฤมล และคณะ, 2557ก; 2557ข) จึงทำให้ผลการจัดกลุ่มเป็นที่น่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

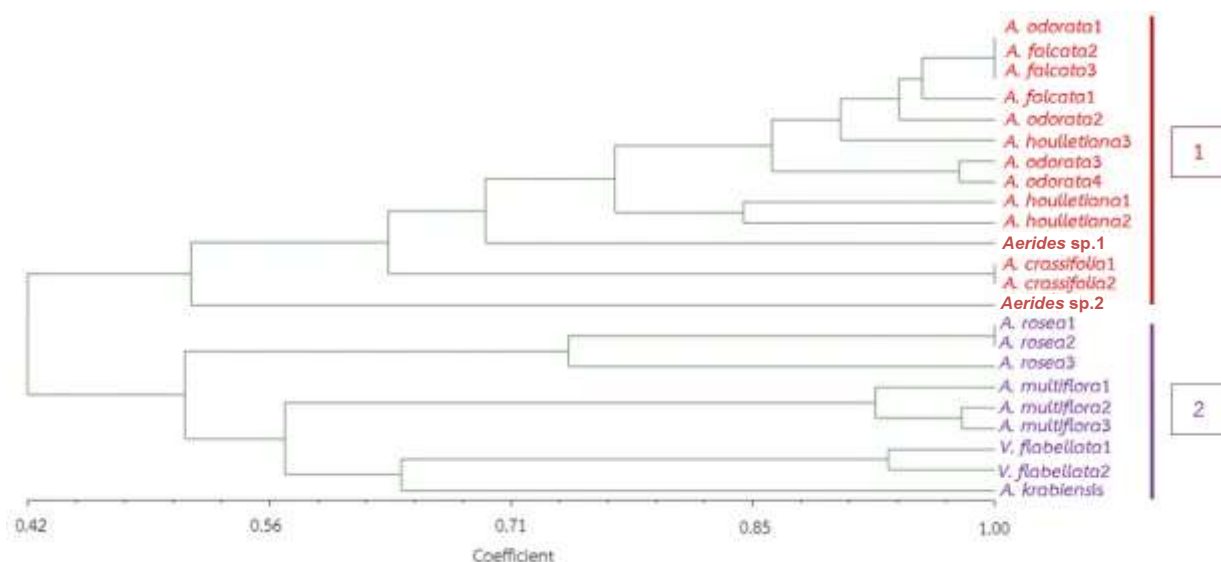


Figure 3 Dendrogram of 23 *Aerides* orchid samples constructed using UPGMA based cluster analysis on genetic similarities of DNA fingerprint from PCR-RFLP of cpDNA digested with *Bam*HI, *Rsa*I, *Mse*I, *Vsp*I, *Hinf*I, *Eco*RI and *Taq*I enzymes. Number 1 and 2 indicate two main clusters in the dendrogram.

Table1 Similarity index among *Aerides* orchidsamples.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	18	19	21	22	23
1	1.000																						
2	0.962	1.000																					
3	0.962	0.923	1.000																				
4	1.000	0.962	0.962	1.000																			
5	1.000	0.962	0.962	1.000	1.000																		
6	0.904	0.942	0.904	0.904	0.904	1.000																	
7	0.885	0.923	0.904	0.885	0.885	0.981	1.000																
8	0.596	0.558	0.595	0.596	0.596	0.538	0.558	1.000															
9	0.596	0.558	0.595	0.596	0.596	0.538	0.558	1.000	1.000														
10	0.500	0.538	0.500	0.500	0.500	0.519	0.538	0.865	0.865	1.000													
11	0.788	0.750	0.750	0.788	0.788	0.769	0.750	0.615	0.615	0.519	1.000												
12	0.788	0.750	0.750	0.788	0.788	0.769	0.750	0.615	0.615	0.519	1.000	1.000											
13	0.635	0.615	0.673	0.635	0.635	0.577	0.558	0.692	0.692	0.538	0.577	0.577	1.000										
14	0.673	0.635	0.673	0.673	0.673	0.577	0.558	0.692	0.692	0.577	0.615	0.615	0.942	1.000									
15	0.654	0.615	0.654	0.654	0.654	0.558	0.538	0.673	0.673	0.558	0.615	0.615	0.942	0.981	1.000								
16	0.865	0.846	0.827	0.865	0.865	0.788	0.750	0.654	0.654	0.519	0.731	0.731	0.654	0.731	0.712	1.000							
17	0.865	0.827	0.827	0.865	0.865	0.769	0.750	0.654	0.654	0.558	0.731	0.731	0.712	0.769	0.750	0.885	1.000						
18	0.942	0.904	0.904	0.942	0.942	0.846	0.827	0.654	0.654	0.558	0.808	0.808	0.692	0.692	0.673	0.865	0.885	1.000					
19	0.673	0.635	0.673	0.673	0.673	0.615	0.596	0.731	0.731	0.635	0.615	0.615	0.692	0.654	0.673	0.712	0.731	0.731	1.000				
20	0.712	0.692	0.731	0.731	0.731	0.673	0.654	0.750	0.750	0.654	0.673	0.673	0.673	0.673	0.654	0.750	0.712	0.788	0.962	1.000			
21	0.615	0.577	0.615	0.635	0.635	0.519	0.500	0.750	0.750	0.635	0.558	0.558	0.712	0.673	0.692	0.673	0.635	0.673	0.769	0.769	1.000		
22	0.788	0.750	0.750	0.788	0.788	0.731	0.750	0.577	0.577	0.481	0.635	0.635	0.615	0.577	0.596	0.654	0.731	0.769	0.635	0.596	0.558	1.000	
23	0.750	0.712	0.712	0.750	0.750	0.673	0.654	0.654	0.654	0.519	0.654	0.462	0.654	0.654	0.673	0.808	0.731	0.731	0.673	0.635	0.673	0.750	1.000

Note:

1: *A. odorata*1

2: *A. odorata*2

3: *A. falcata*1

4: *A. falcata*2

5: *A. falcata*3

6: *A. odorata*3

7: *A. odorata*4

8: *A. rosea*1

9: *A. rosea*2

10: *A. rosea*3

11: *A. crassifolia*1

12: *A. crassifolia*2

13: *A. multiflora*1

14: *A. multiflora*2

15: *A. multiflora*3

16: *A. houletiana*1

17: *A. houletiana*2

18: *A. houletiana*3

19: *V. flabellata*1

20: *V. flabellata*2

21: *A. krabiensis*

22: *Aerides* sp.1

23: *Aerides* sp.2

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยสรุปได้ว่ากล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 7 ชนิดสามารถจัดกลุ่มได้ เมื่ออาศัยข้อมูลทางดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยา รวมถึงสามารถบอกได้ว่าตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิดทั้ง 2 ตัวอย่างน่าจะเป็นกล้วยไม้สกุลกุหลาบชนิดอื่น และจากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทำให้ทราบว่ากล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 7 ชนิดนี้มีความสัมพันธ์ร่วมกัน และสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาและการกระจายพันธุ์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ กองบริหารการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2558 ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่อนุเคราะห์สถานที่และสารเคมี และขอขอบคุณ ผศ.ดร.คงศักดิ์ พรหมเทพ และ คุณสมภาพ พิณีจ สำหรับความอนุเคราะห์ตัวอย่างในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

นฤมล ธนानันต์วิริสา แทนสง่า ชีระชัย ธนानันต์ (2557ก) การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเครื่องหมายแอสเตอร์เอพีดี. ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 317–326.

นฤมล ธนानันต์วิริสา แทนสง่า ชีระชัย ธนानันต์ (2557ข) การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ. ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22:664–673.

วิริสา แทนสง่าชีระชัย ธนानันต์นฤมล ธนานันต์ (2557) การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเทคนิคแอสเตอร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์. Thai J SciTechnol 3: 102–112.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล (2545)จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ:ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อบฉันท์ ไทยทอง (2543) กล้วยไม้เมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

Christenson E (1987) The taxonomy of *Aerides* and related genera. In: Proceedings of the 12th World Orchid Conference, Tokyo, pp 35–40.

Doyle J, Doyle J (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull 19:11–15.

Garay LA (1972) On the systematics of the monopodial orchids I. Botanical Museum Leaflets Harvard University 23:149–212.

Kim SC, Crawford DJ, Jansen RK, Guerra AS (1999) The use of a non-coding region of chloroplast DNA in phylogenetic studies of the subtribe Sonchinae (Asteraceae: Lactuceae). Pl Syst Evol 215:85–99.

Kocyan A, de Vogel EF, Conti E, Gravendeel B (2008) Molecular phylogeny of *Aerides* (Orchidaceae) based on one nuclear and two plastid markers: a step forward in understanding the evolution of the Aeridinae. Mol. PhylogenetEvo 48: 422–43.

Motes MR (1997) Vandas: their botany, history, and culture. Portland: Timber Press, Portland.

Rohlf FJ (2000) NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.02e. User Guide. Exeter Software, Se tauket, New York.

Seidenfaden G (1973) Contributions to the orchid flora of Thailand V. *Aerides*. BotaniskTidsskrift 68:68–80.

Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy. Freeman and Co., San Francisco.

Taberlet P, Gielly L, Pautou G (1991) Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of Chloroplast DNA. Plant MolBiol17:1105–1109.