

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
และการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา
ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *matK*
Assessment of Genetic Relationship
and Identification of *Dendrobium* Section Callista
Using Nucleotide Sequences of *rpoC1* and *matK* Genes

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

จิตาพร มณีเนตร, ภัทรพร คุ่มภัย และธีระชัย ธนานันต์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ 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

Thitaporn Maneenet, Phataraporn Khumphai and Theerachai Thanananta*

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

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลหวายเป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่นิยมปลูกเลี้ยงกันเป็นจำนวนมากและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ปัจจุบันการจำแนกชนิดของกล้วยไม้ด้วยลักษณะสัณฐานทำได้ยากและสามารถเกิดการผิดพลาดสูง จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการจำแนก งานวิจัยนี้จึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *matK* เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา 17 ชนิด โดยเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *matK* ด้วยปฏิกิริยาแลงคาชเชอร์-โพลีเมอเรส ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7 ผลการศึกษาพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *matK* สามารถจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่แคลิสตา 8 และ 11 ชนิด ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีน ร่วมกัน พบว่าจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายหมู่แคลิสตาได้ 15 ชนิด

คำสำคัญ : กล้วยไม้สกุลหวาย; หมูแคลิสตา; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; ยีน *rpoC1*; ยีน *matK*

Abstract

Dendrobium is the largest genus of orchid. Currently, identification of orchid species based on morphology is difficult, high error and need the specialists to identify. This research, the nucleotide sequences of the specific sites of plastid genes were used to identify 17 species of *Dendrobium* Section Callista. The plastid genes, *rpoC1* and *matK* were amplified and sequenced, after those nucleotide sequences of 17 species of *Dendrobium* were analyzed by ClustalW and MEGA7. The phylogenetic tree constructing based on the nucleotide sequences of *rpoC1* and *matK* could distinguish 8 and 11 out of 17 species, respectively. However, when analyzing both genes together, we found that 15 out of 17 species were differentiated.

Keywords: *Dendrobium*; Callista; genetic relationship; *rpoC1*; *matK*

1. คำนำ

กล้วยไม้มีความหลากหลายทั้งสีสันลวดลาย ขนาด รูปทรง และกลิ่น ทำให้เป็นไม้ตัดดอกยอดนิยมไปทั่วโลก ข้อมูลจากกระทรวงพาณิชย์พบว่า กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย สามารถทำรายได้เข้าประเทศ ซึ่งปัจจุบันตลาดกล้วยไม้ขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างมาก โดยกล้วยไม้ส่งออกสำคัญของไทย ได้แก่ หวาย (*Dendrobium*) มอคาร่า (*Mokara*) และแวนด้า (*Vanda*) จากการสำรวจพบว่ากล้วยไม้สกุลหวายเป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุด เป็นที่รู้จักและนิยมปลูกกันเป็นจำนวนมาก และในประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลหวายในธรรมชาติมากกว่า 130 ชนิด มีรูปร่างลักษณะของดอก ใบ และลำลูกกล้วยต่างกันไป บางชนิดมีสีและใบคล้ายกัน แต่มีดอกต่างกัน จึงมักสับสนได้ง่าย (มาลินี, 2538) ทำให้เกิดปัญหาต่อการส่งออกกล้วยไม้

การจำแนกพืชโดยใช้ลักษณะฐานนั้น มีความยุ่งยากสับสน เนื่องจากลักษณะฐานมักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม ซึ่งต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการจำแนก ดังนั้นจึงมีแนวคิดในการจำแนกชนิด

ของสิ่งมีชีวิตโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) และมีโครงการจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA Barcode) ของสิ่งมีชีวิต หรือ The Barcode of Life Project (Hebert *et al.*, 2003) ต่อมาความร่วมมือกันจนเกิดเป็น Consortium for the Barcode of Life (CBOL) ซึ่งได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมในคลอโรพลาสต์ (chloroplast genome) เพื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard DNA) สำหรับการจำแนกสิ่งมีชีวิต

งานวิจัยนี้ใช้ตำแหน่งมาตรฐาน 2 บริเวณ คือ ชันดีเอ็นเอของยีน *matK* ซึ่งกำหนดการสร้างเอนไซม์ maturase สำหรับใช้ในกระบวนการตัดแต่งชิ้นอาร์เอ็นเอ (RNA splicing) (Barthel, 2006) และชันดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* ซึ่งกำหนดการสร้างพอลิเปปไทด์ (polypeptide) ที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) (Serino and Maliga, 1998) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวาย หมูแคลิสตา โดยสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดจากงานวิจัยนี้ ซึ่งฝากเก็บไว้ใน

ฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาและการจำแนกชนิดกล้วยไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจในอนาคต โดยขึ้นดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีน นี้เป็นตำแหน่งจำเพาะ (specific site) ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) สำหรับจำแนกพืชได้ โดย Chase และคณะ (2007) เสนอ

ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *matK* สามารถใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตได้ดี

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา

กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา 17 ชนิด แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา 17 ชนิด ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ลำดับ	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์	
			<i>rpoC1</i>	<i>matK</i>
1	เอื้องมัจฉา	<i>D. palpebrae</i> Lindl.	MF139711	MF409018
2	เอื้องมัจฉาหนู	<i>D. farmer</i> Paxton	MF139712	MF409019
3	เอื้องมัจฉาเหลือง	<i>D. griffithianum</i> Lindl.	MF139713	MF409020
4	เอื้องม่อนไข่	<i>D. thyrsiflorum</i> Rchb.f.	MF139714	MF409021
5	เอื้องม่อนไข่เหลือง	<i>D. densiflorum</i> Lindl.	MF139715	MF409022
6	เอื้องคำ	<i>D. chrysotoxum</i> Lindl.	MF139716	MF409023
7	เอื้องคำตาดำ	<i>D. chrysotoxum</i> var. <i>suavissimum</i>	MF139717	MF409024
8	เอื้องผึ้ง	<i>D. lindleyi</i> Steud.	MF139718	MF409032
9	เอื้องจำปานาน	<i>D. sulcatum</i> Lindl.	MF139719	MF409025
10	เอื้องคำฝอยพาย	<i>D. brymerianum</i> Rchb.f.	MF139720	MF409033
11	เอื้องผาเวียง	<i>D. albosanguineum</i> Lindl.	MF139721	MF409026
12	เอื้องคำปากไก่	<i>DD. trigonopus</i> Rchb.f.	MF139722	MF409027
13	เอื้องคำป๊อก	<i>D. harveyanum</i> Rchb.f.	MF139723	MF409028
14	เอื้องคำผักปราบ	<i>D. ochreatum</i> Lindl.	MF139724	MF409034
15	เอื้องคำฝอยอินเดีย	<i>D. harveyanum</i> Rchb.f.	MF139725	MF409029
16	เอื้องม่อนไข่ชมพู	<i>D. amabile</i> Lindl.	MF139726	MF409030
17	เอื้องผึ้งจิ๋ว	<i>D. jenkinsii</i> Wall.ex Lindl.	MF139727	MF409031

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตาด้วยวิธีที่ประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธีของ นฤมล และคณะ (2555) หลังจากนั้นตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วย

เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (nm) (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *matK*

เจี๊จางดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวาย หมู แคลิสตา ทั้ง 17 ชนิด ให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/μl) เพื่อเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะ คือ ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *matK* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ในบัฟเฟอร์ (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.1), 0.1 % Triton™ X-100 และ 2.5 mM MgCl₂) มีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* (5'-GTGGATACACTTCTTGATAATGG-3' กับ 5'-TGA GAAACATAA GTAAACGGGC-3') และ *matK* (5'-TAATTTACGATCAATTCATTC-3' กับ 5'-GTTCTAGCACAGA AAGTCG-3') ปริมาณ 250 นาโนโมลาร์ (nM) เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis technologies Sdn Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (Unit) และน้ำรวมปริมาตรสุทธิ 40 ไมโครลิตร (นฤมล และคณะ, 2558)

2.4 การวิเคราะห์ผล

ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ที่ได้ ส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Bioneer (ประเทศเกาหลีใต้) แล้วตรวจสอบความถูกต้อง โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank ของฐานข้อมูล NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) และฝากเก็บข้อมูลไว้ หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาเทียบ (alignment) กันด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) และใช้โปรแกรม MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7) วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยวิธี maximum likelihood

โดยกำหนดค่า bootstrap 1,000 รอบ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *matK*

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *matK* ในกล้วยไม้สกุลหวาย หมู แคลิสตา 17 ชนิด ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ พบว่าสามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอได้ทั้ง 17 ชนิด โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความชัดเจนและมีขนาดที่ตรงตามที่คาดไว้ กล่าวคือ ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส และชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส

3.2 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *matK* ในกล้วยไม้สกุลหวาย หมู แคลิสตา ทั้ง 17 ชนิด แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองมีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะดังกล่าวในกล้วยไม้สกุลหวาย 94-100 เปอร์เซ็นต์ จึงยืนยันว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นั้นถูกต้อง และได้ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ใน GenBank ของ NCBI โดยมีหมายเลขจำเพาะ (accession number) ดังตารางที่ 1

3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *matK*

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ ในกล้วยไม้สกุลหวาย หมูแคลิสตาทั้ง 17 ชนิด พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือการกลายระดับยีน (gene mutation) เกิดขึ้น โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* มีการกลายเกิดขึ้น 3 รูปแบบ คือ ไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) 5 ตำแหน่ง ไพวรีนทรานสิชัน (purine transition) 6 ตำแหน่ง และทรานสเวอร์ชัน

(transversion) 3 ตำแหน่ง (ตารางที่ 2) ส่วนชั้นดีเอ็นเอของยีน *matK* มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 รูปแบบ ได้แก่ พิวรีนทรานสชัน 12 ตำแหน่ง ไพริมิดีนทรานสชัน 13 ตำแหน่ง ทรานสเวอร์ชัน 34 ตำแหน่ง และอินเดล (indel, insertion/deletion) 41 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3)

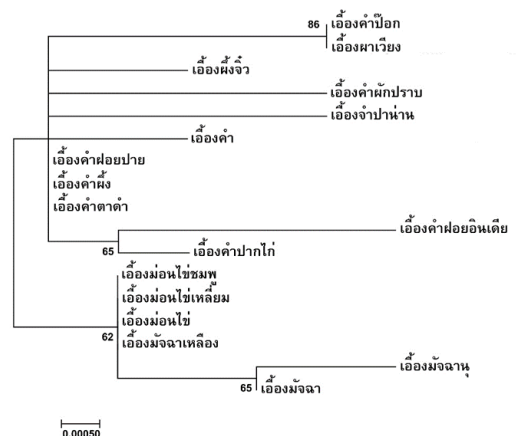
ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ที่พบความแตกต่างในกล้วยไม้สกุลหวาย หมูแคลิสตาแต่ละชนิด

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rpoC1</i> ที่พบการเปลี่ยนแปลง
พิวรีนทรานสชัน	24, 60, 120, 219, 360, 423
ไพริมิดีนทรานสชัน	78, 156, 162, 291, 429
ทรานสเวอร์ชัน	279, 291, 372

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ที่พบความแตกต่างในกล้วยไม้สกุลหวาย หมูแคลิสตาแต่ละชนิด

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rpoC1</i> ที่พบการเปลี่ยนแปลง
พิวรีนทรานสชัน	103, 225, 446, 485, 521, 528, 650, 662, 710, 805, 848, 905
ไพริมิดีนทรานสชัน	33, 51, 94, 218, 229, 293, 421, 432, 488, 606, 612, 635, 733
ทรานสเวอร์ชัน	37, 38, 40-42, 49, 58, 106, 111, 135, 136, 157, 167, 194, 201, 227, 321, 388, 389, 399, 542, 632, 657, 658, 700, 704, 711, 716, 740, 761, 824, 833, 836
อินเดล	22-29, 36, 114-126, 187, 273-278, 762-765, 824-831

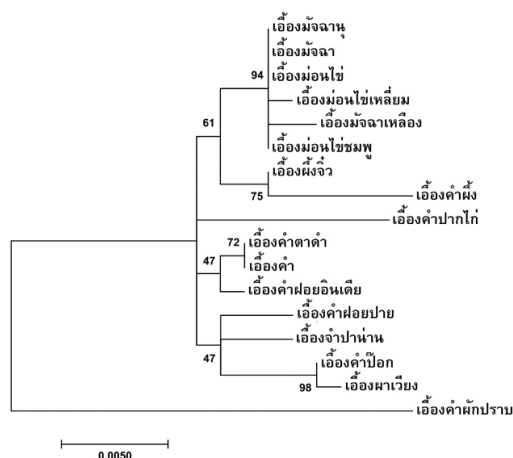
เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ด้วยโปรแกรม MEGA7 โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood ได้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังรูปที่ 1 ซึ่งจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมูแคลิสตาได้ 8 ชนิด คือ เอื้องผึ้งจิ๋ว เอื้องคำฝักปราบ เอื้องจำปานาน เอื้องคำ เอื้องคำฝอยอินเดีย เอื้องคำปากไก่ เอื้องมัจฉา และเอื้องมัจฉานุ



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย หมูแคลิสตาที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*

เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ด้วยโปรแกรม MEGA7 โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood ได้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังรูปที่ 2 ซึ่งจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมูแคลิสตาได้ 11 ชนิด ได้แก่ เอื้องมอนไชเหลี่ยม เอื้องมัจฉาเหลือง เอื้องผึ้งจิ๋ว เอื้องคำฝักปราบ เอื้องคำปากไก่ เอื้องคำฝอยอินเดีย เอื้องคำฝอยปราบ เอื้องจำปานาน เอื้องคำฝักปราบ เอื้องคำฝัก และเอื้องคำ

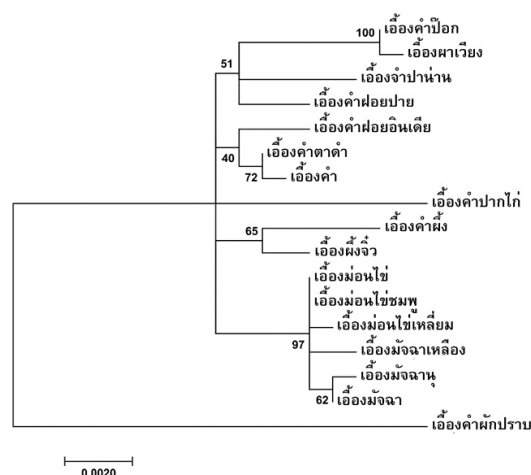
โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* สามารถจำแนกได้ดีกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* เนื่องจากพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกันมากกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะชนิดเอ็นเอ็มอีมีขนาดยาวกว่า



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตาที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK*

เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *matK* ร่วมกัน พบว่าได้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังรูปที่ 3 ซึ่งจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตาได้ 15 ชนิด ได้แก่ เอื้องคำปอก เอื้องผาเวียง เอื้องจำปานาน เอื้องคำฝอยอินเดีย เอื้องคำฝอยพาย เอื้องคำ เอื้องคำตาดำ เอื้องคำปากไก่ เอื้องคำผึ้ง เอื้องผึ้งจั่ว เอื้องมอนไซเหลียม เอื้องมัจฉาเหลือง เอื้องมัจฉา เอื้องมัจฉา และเอื้องคำผักปราบ โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองร่วมกันนี้ ทำให้มีประสิทธิภาพในการจำแนกสูงขึ้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ นฤมล และคณะ (2559) ที่ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

และจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลแวนด้า หมู่เข็ม โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1* ร่วมกัน ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย ตามลักษณะความสัมพันธ์ฟีโลเจเนติกของตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานและปัจจัยสภาพแวดล้อมของแหล่งกระจายพันธุ์ นอกจากนี้ ยังมีรายงานการวิจัยอื่นที่แสดงประสิทธิภาพของการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะมากกว่าบริเวณเดียว สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกพืช โดยให้ผลดีกว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงบริเวณเดียว ได้แก่ กล้วยไม้สิงโตกลอกตา (เกียรติชัย, 2557) กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (นฤมล และคณะ, 2557) มะม่วง (ปิยะดา และคณะ, 2558) กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (นฤมล และคณะ, 2560) กล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบลาย (ทิปกา และคณะ, 2560) กล้วยไม้สกุลก้านก่อ (จุฑามาศ และคณะ, 2560) และกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบสีเขียว (พรประภา และคณะ, 2560)



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตาที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *matK* ร่วมกัน

4. สรุป

การตรวจสอบกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา 17 ชนิด ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *matK* สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่แคลิสตา 8 และ 11 ชนิด ตามลำดับ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณร่วมกัน พบว่าจำแนกได้ 15 ชนิด โดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ มาวิเคราะห์ร่วมกันนั้น มีประสิทธิภาพในการจำแนกสูงกว่าใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงบริเวณเดียว

5. รายการอ้างอิง

เกียรติชัย แซ่ไต้, นฤมล ธนาคันต์ และธีระชัย ธนาคันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สังคโลกดอกตาหมูสังคโลกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 523-530.

จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์, ธีระชัย ธนาคันต์ และ นฤมล ธนาคันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก่อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซีนติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*, Thai J. Sci. Technol. 6: 324-337.

ทีปกา มีแสงี่ยม, ธีระชัย ธนาคันต์ และนฤมล ธนาคันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มไบลาด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซีนติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*, Thai J. Sci. Technol. 6: 347-357.

นฤมล ธนาคันต์, จินต์ ทองสม, ชนิดโชติ ปิยพิทยานันต์ และธีระชัย ธนาคันต์, 2559, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกชนิด

ของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24: 599-612.

นฤมล ธนาคันต์, ภัทธา หงษ์ทองดี, วรณธร เชื้อบุญมี และธีระชัย ธนาคันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซีนติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*, Thai J. Sci. Technol. 6: 22-32.

นฤมล ธนาคันต์, วริศรา แทนสง่า และธีระชัย ธนาคันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 664-673.

นฤมล ธนาคันต์, วิกาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนาคันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-179.

ปิยดา บุสดี, นฤมล ธนาคันต์ และธีระชัย ธนาคันต์, 2559, การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *rbcL*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 983-993.

พรประภา ศิริเทพทวี, ธีระชัย ธนาคันต์และนฤมล ธนาคันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มไบสีเขียวด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซีนติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*, Thai J. Sci. Technol. 6: 338-346.

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

- Barthet, M., 2006, Expression and Function of the Chloroplast-encoded Gene *matK*, Ph.D. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia.
- Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., van der Berg, C., Madrinan, S., Petersen, G., Seberg, O., Jorgensen, T., Cameron-Kenneth, M., Carine, M., Pedersen, N., Hedderson-Terry, H., Conrad, F., Salazar-Gerardo, A., Richardson-James, E., Hollingsworth-Michelle, L., Barraclough-Timothy, G., Kelly, L. and Wilkinson, M., 2007, A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants, *Taxon* 56: 295-299.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and Deward, J.R., 2003, Biological identifications through DNA barcodes, *Proc. Royal Soc. B.* 270: 313-321.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1626 p.
- 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.