การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกทุเรียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1

Assessment of Genetic Relationship and Identification of Durian (*Durio zibethinus* Murr.) Using Nucleotide Sequences of *rpo*C1 Gene

ทัศนีย์ สิงห์ศิลารักษ์ และธีระชัย ธนานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Tassanee Singhsilarak 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

ประเทศไทยมีทุเรียนมากกว่า 200 พันธุ์ พันธุ์ที่นิยมปลูกในเชิงการค้าส่วนใหญ่จะเป็นหมอนทองและชะนี เพราะให้ผลผลิตสูงและรสชาติอร่อย แต่ปัจจุบันเริ่มมีการปลูกทุเรียนพันธุ์อื่น ๆ ในเชิงการค้ามากขึ้น ได้แก่ ก้านยาว หลงลับแล หลินลับแล พวงมณี เป็นต้น ดังนั้นการจำแนกพันธุ์ทุเรียนด้วยลักษณะสัณฐานภายนอกจึงมีความยุ่งยากมากขึ้น งานวิจัยนี้ได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 เพื่อจำแนกทุเรียน 40 พันธุ์ ที่นำมาจากสวนบ้านเรา จังหวัดระยอง แล้วหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7 ซึ่งผลการวิจัยพบว่าไม่สามารถแยกพันธุ์ทุเรียน 40 พันธุ์ ออกจากกันอย่างสมบูรณ์ แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้ไม่เหมาะสมสำหรับการจำแนกทุเรียน ควรเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะอื่น หรือใช้เครื่องหมายดีเอ็นเออื่น ทั้งนี้เพื่อให้การจำแนกพันธุ์ทุเรียนมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

คำสำคัญ : ทุเรียน; ยีน *rpo*C1; การจำแนก; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

**Corresponding author: narumolpla@yahoo.com*

DOI: 10.14456/tjst.2018.14

Abstract

There are more than 200 durian (*Durio zibethinus* Murr.) cultivars in Thailand. Most of the commercial cultivars are Monthong and Chani because of their high yield and good taste. At the present, more cultivars such as Kanyao, Longlap-lae, Linlap-lae, and Phuang Mani were sold on the market. The identification of durian varieties/cultivars by morphology was frustrated. This research, the nucleotide sequence of *rpo*C1 genes was used for identification of 40 durian cultivars, collected from Suan Ban Rao, Rayong province. Then, phylogenetic tree were constructed by MEGA7. The results showed that 40 durian cultivars could not be completely distinguished. It indicated that this nucleotide sequence of specific gene is not suitable for durian identification. The nucleotide sequence of other specific genes should be studied or using other DNA markers to increase the ability for an effective durian varieties/cultivars identification.

Keywords: durian; *Durio zibethinus*; *rpo*C1; identification; genetic relationship

1. คำนำ

ทุเรียน (*Durio zibethinus* Murr.) เป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของไทย จัดเป็นผลไม้เขตร้อนที่มีเฉพาะในภูมิภาค และมีศักยภาพในการผลิตเพื่อการบริโภคภายในประเทศและส่งออกไปจำหน่ายภายนอกประเทศ ซึ่งสร้างรายได้ให้เกษตรกรค่อนข้างสูง (ชวลิต และคณะ, 2551) สำหรับพื้นที่ปลูกทุเรียนพบได้เกือบทุกภาคของประเทศไทย แต่แหล่งปลูกที่สำคัญในเชิงการค้าจะอยู่ในภาคตะวันออก ภาคกลาง และภาคใต้ โดยจังหวัดที่ให้ผลผลิตปริมาณมาก ได้แก่ จันทบุรี ระยอง ชุมพร และตราด (พิทักษ์, 2550)

ทุเรียนที่นิยมปลูกในเชิงการค้าส่วนใหญ่จะเป็นพันธุ์หมอนทองและชะนี เพราะให้ผลผลิตสูงและรสชาติอร่อย แต่ปัจจุบันเริ่มมีการปลูกทุเรียนพันธุ์อื่น ๆ ในเชิงการค้ามากขึ้น ได้แก่ ก้านยาว หลงลับแล หลินลับแล สาลิกา พวงมณี ก้านยาว เป็นต้น ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีความหลากหลายของพันธุ์ทุเรียนในท้องตลาดมากขึ้น หากไม่ใช่ผู้เชี่ยวชาญด้านทุเรียนโดยตรง การมองด้วยตาเปล่านั้นบางครั้งอาจไม่สามารถจะระบุพันธุ์ทุเรียนอย่างแน่ชัด โดยในประเทศไทยพบทุเรียนพันธุ์พื้นเมืองมากกว่า 200 พันธุ์ ดังนั้นการจำแนกด้วยการใช้เพียงลักษณะสัณฐาน (morphology) ภายนอกนั้นจึงทำได้ยาก หากไม่มีความรมชำนาญเพียงพอ

ผู้เชี่ยวชาญด้านทุเรียนได้จัดแบ่งทุเรียนเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกบ กลุ่มลวง กลุ่มก้านยาว กลุ่มกำปั่น กลุ่มทองย้อย และกลุ่มเบ็ดเตล็ด (หิรัญ และคณะ, 2541) โดยจำแนกจากลักษณะสัณฐานภายนอกที่ปรากฏ ได้แก่ ทรงใบ ปลายใบ ฐานใบ ทรงผล และหนามผล ซึ่งจัดเป็นลักษณะเฉพาะพันธุ์ (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544) การจัดกลุ่มทุเรียนแบบนี้เป็นแนวทางที่ดีและทำให้ง่ายต่อการจำแนกพันธุ์ทุเรียนมากขึ้น แต่ก็ยังไม่ชัดเจน

การนำความรู้ทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมาช่วยในการจำแนกสิ่งมีชีวิตเริ่มแพร่หลายมากขึ้น และวิธีการหนึ่งที่นิยม คือ การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของตำแหน่งจำเพาะ ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้ศึกษาอนุกรมวิธานของสิ่งมีชีวิตที่ผสมผสานกับเครื่องมือทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) โดยเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณที่ผ่านการประเมินแล้วว่ามีศักยภาพเพียงพอที่จะใช้ระบุชนิด

ของสิ่งมีชีวิต นั่นคือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ ซึ่งควรมีขนาดไม่ยาวนักและพบได้ในทุกส่วนของพืช ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียจีโนม (mitochondrial genome) เช่น ยีน *Cytochrome c oxidase I* (*COI*) (Hebert *et al*., 2003) ซึ่งนิยมใช้ในการจำแนกสัตว์และพบว่ามีประสิทธิภาพดี

สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์จีโนม (chloroplast genome) ได้แก่ *mat*K , *rpo*C1, *rbc*L, *rpo*B, *trn*H-*psb*A, *atp*F-atpH และ *psb*K-*psb*I (Kress *et al*., 2005; Kress and Erickson, 2007; Fazekas *et al*., 2008; Newmaster *et al*., 2008; Wang *et al*., 2010) ซึ่งประกอบด้วย 4 ยีน และชิ้นส่วนระหว่างยีน (spacer) 3 บริเวณ โดยเคยมีงานวิจัยที่ใช้ศึกษาเพื่อการจำแนกสิ่งมีชีวิตและพบว่ามีศักยภาพและเหมาะที่จะนำมาเป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard) นอกจากนี้ยังพบบริเวณอื่น ๆ เช่น *trn*L (UAA) (Taberlet *et al*., 2007) *acc*D (Sass *et al*., 2007) *ndh*J และ *ycf*5 (Lahaye *et al*., 2008) ซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานได้เช่นกัน แต่ไม่นิยมเพราะประสิทธิภาพในการระบุชนิดของพืชยังไม่ดีพอ (Hollingsworth, 2008)

การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะในการจำแนกพืชและสัตว์ประสบผลสำเร็จมาแล้ว ดังเห็นได้จากงานวิจัยหลายเรื่อง (วุฒิพงศ์, 2554) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกยีน *rpo*C1 ที่เคยมีการศึกษามาแล้วว่ามีความเหมาะสมในการจำแนกพืช เพื่อประเมินความสัมพันธ์และจำแนกพันธุ์ทุเรียน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการแยกพันธุ์ทุเรียนให้มีความแม่นยำมากขึ้น

ยีน *rpo*C1 กำหนดการสร้างพอลิเพปไทด์ (polypeptide) ที่เป็นองค์ประกอบหนึ่งของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) ซึ่งพบในพลาสติด (plastid) (Serino and Maliga, 1998) โดยชิ้นดีเอ็นเอนี้สามารถเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอริเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) แล้วตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ง่ายและชัดเจน

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 พันธุ์ทุเรียน

ทุเรียนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จำนวน 40 พันธุ์ แบ่งเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มกบ 7 พันธุ์ กลุ่มลวง 6 พันธุ์ กลุ่มทองย้อย 5 พันธุ์ กลุ่มกำปั่น 4 พันธุ์ กลุ่มก้านยาว 5 พันธุ์ และกลุ่มเบ็ดเตล็ด 13 พันธุ์ โดยเก็บตัวอย่างใบทุเรียนที่ปลูกไว้ในสวนบ้านเรา ตำบลกระแสบน อำเภอแกลง จังหวัดระยอง(ตารางที่ 1)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบทุเรียนด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1978) (นฤมล และคณะ, 2555) แล้วตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (eletrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al.,* 1989)

2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1

เจือจางดีเอ็นเอทุเรียนให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) 100 นาโนกรัม ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 มิลลิโมลาร์ KCl, 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl pH 9.1, 0.1 % Triton™ X-100 และ 2.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$) โดยมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 2 มิลลิโมลาร์) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *rpo*C1 ปริมาณ 250 นาโนโมลาร์ (ตารางที่ 2) และเอนไซม์ *Taq* DNA poymerase

ตารางที่ 1 ทุเรียน 40 พันธุ์ ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้

กลุ่ม	ชื่อพันธุ์	กลุ่ม	ชื่อพันธุ์
กบ	กบวัดกล้วย (Kop Watklual)	ลวง	ลวงทอง (Luang Thong)
	กบเจ้าคุณ (Kop Choakhun)		ย่ำมะหวาด (Yammawat)
	กบชายน้ำ (Kop Chainam)		ชะนี (Chani)
	กบหน้าศาล (Kop Nasan)		ชะนีน้ำตาลทราย (Chani Namtansai)
	กบรัศมี (Kop Ratsami)		ชมพูพาน (Chomphu Phan)
	กบพิกุล (Kop Phikun)		ชมพูศรี (Chompu Sri)
	กบสุวรรณ (Kop Suwan)	ทองย้อย	นกหยิบ (Nokyip)
เบ็ดเตล็ด	ห้าลูกไม่ถึงผัว (Haluk Maithuengphua)		ทองย้อยฉัตร (Thongyoichat)
	ทองแดง (Thongdeang)		ฉัตรสีทอง (Chat Sithong)
	พวงมณี (Phuang Mani)		ธรณีไหว (Thoraniwai)
	หลงลับแล (Longlap-lae)		ทับทิม (Taptim)
	สาลิกา (Salika)	กำปั่น	กำปั่นเหลือง (Kampan Lueang)
	หลินลับแล (Linlap-lae)		กำปั่นเดิม (Kampan Doem)
	กะเทยเนื้อขาว (Kathoei Nueakhao)		หมอนทอง (Monthong)
	อีลีบนายทิพย์ (E-Lipnaithip)		กำปั่นพวง (Kampan Phuang)
	เม็ดในก้านยาว (Metnai Kanyao)	ก้านยาว	ก้านยาววัดสัก (Kanyao Watsak)
	จอกลอย (Chok-loi)		ก้านยาวสีนาค (Kanyao Si-nak)
	เมล็ดอารีย์ (Malet Ar-ri)		ก้านยาว (Kanyao)
	ก้านสั้น (Kansan)		ทองสุก (Thongsuk)
	กะเทยขั้วสั้น (Kathoei Khuasan)		ต้นใหญ่ (Tonyai)

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1

ตำแหน่งจำเพาะ	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′→3′)	เอกสารอ้างอิง
ยีน *rpo*C1	*rpo*C1-F	5′-GTG GAT ACA CTT CTT GAT AAT GG-3′	CBOL Plant Working Group, 2009
	*rpo*C1-R	5′-TGA GAA AAC ATA AGT AAA CGG GC-3′	

(Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (นฤมล และคณะ, 2557) สภาวะการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมี 3 ขั้นตอน ได้แก่ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 53 องศา

เซลเซียส นาน 30 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วนำผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่-พอลิเมอเรสนำมาตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ปิยดา และคณะ, 2558)

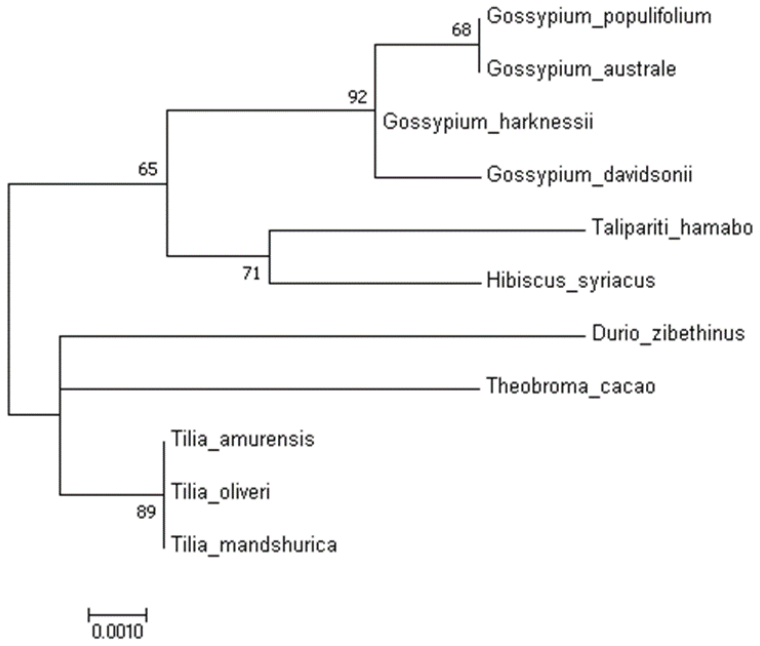
2.4 การตวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1 ที่เพิ่มปริมาณได้ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท Bioneer (ประเทศเกาหลีใต้) เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจึงตรวจสอบความถูกต้องโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) แล้วฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไว้ในฐานข้อมูล GenBank

2.5 การวิเคราะห์ผล

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของของยีน *rpo*C1 ในทุเรียน 40 พันธุ์ มาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม ClustalW (http://www.genome.jp/tools-bin/clustal w) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 (MEGA7) โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood และกำหนดค่า bootstrap เป็น 1,000 รอบ

การเลือกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ เพื่อเปรียบเทียบและวิเคราะห์นั้น จะเลือกจากการนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุเรียนไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม Nucleotide-Nucleotide BLAST (blastn, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn) แล้วเลือกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ใกล้เคียงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในทุเรียนสูงสุด 10 ชนิด



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียน (*Durio zibethinus* Murr.) ที่สร้างจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในทุเรียนเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกัน 10 ชนิด โดยใช้โปรแกรม MEGA7 และเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1

เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1 ในทุเรียน 40 พันธุ์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับสากล (universal primer) ของยีน *rpo*C1 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 566 คู่เบส

3.2 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อได้รับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในทุเรียน 40 พันธุ์ จากบริษัท Bioneer แล้วนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่าตรงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในสิ่งมีชีวิตอื่น จากนั้นได้ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไว้ในฐานข้อมูล GenBank และได้หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) โดยตัวอย่างหมายเลขจำเพาะของทุเรียนพันธุ์กบวัดกล้วย คือ MF139630

3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในทุเรียน 40 พันธุ์ แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7 พบว่าไม่สามารถจำแนกพันธุ์ทุเรียนออกจากกัน เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในทุเรียนทุกพันธุ์เหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในทุเรียนกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในสิ่งมีชีวิตอื่น 10 ชนิด ได้แก่ *Tilia oliveri* (KT894774.1), *Tilia mandshurica* (KT894773. 1), *Tilia amurensis* (KT894772. 1), *Gossypium harknessii* (KP221927. 1), *Gossypium davidsonii* (KP170501. 1), *Theobroma cacao* (KY085907. 1), *Hibiscus syriacus* (KR259989. 1), *Gossypium australe* (KP221928. 1), *Gossypium populifolium* (KP221924. 1) และ *Taliparitihamabo* (KR259988. 1) พบว่าทุเรียน (*Durio zibethinus*) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Theobroma cacao* และ *Tilia* spp. มากที่สุด (รูปที่ 1)

3.4 การอภิปราย

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน ควรเลือกดีเอ็นเอมาตรฐานที่ดีและเหมาะสมกับงาน เพราะลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะนั้นเป็นสิ่งสำคัญมาก และมีผลต่อการนำไปใช้ระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตให้มีความน่าเชื่อถือและถูกต้อง มีงานวิจัยที่เลือกศึกษายีน *COI* ในการจำแนกสัตว์แล้วประสบความสำเร็จ ทำให้การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ได้รับความนิยมแพร่หลายในสัตว์ แต่กลับไม่ประสบความสำเร็จในพืช เนื่องจากยีนนี้มีอัตราการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำมาก จึงไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้แยกและระบุชนิดพืชที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการห่างไกลกัน (ต่างสกุลหรือต่างวงศ์) (Ford *et al.*, 2009) ดังนั้นจึงต้องค้นหาดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีความเหมาะสมกับสิ่งมีชีวิตนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพต่อการระบุและจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต

เมื่อวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7 จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ของทุเรียน 40 พันธุ์ จะเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่มีความแตกต่างกัน ทำให้ไม่สามารถแยกพันธุ์ทุเรียนออกจากกัน เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 มีขนาดสั้นมาก (ประมาณ 500 คู่เบส) เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของจีโนมพืช อีกทั้งเป็นยีนที่กำหนดการสร้างพอลิเพปไทด์และสามารถแปลรหัส (translation) เป็นกรดอะมิโนได้ทั้งหมด จึงมีความอนุรักษ์สูง (high conservation) และมีโอกาสผันแปรของนิวคลีโอไทด์ต่ำมาก (Wynns and Lange, 2014) โอกาส

การกลาย (mutation) ของลำดับนิวคลีโอไทด์นี้จึงต่ำกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่มีขนาดยาว อีกทั้งทุเรียนที่เลือกศึกษานั้นเป็นพืชชนิด (species) เดียวกันทั้งหมด จึงมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง ดังนั้นจึงควรเลือกศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะอื่นที่เหมาะสมกว่า

เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนกับสิ่งมีชีวิตอื่น 10 ชนิด โดยเลือกจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในสิ่งมีชีวิตอื่นที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI ด้วยโปรแกรม blastn พบว่า *Theobroma cacao* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับทุเรียนมากที่สุด ซึ่งสิ่งมีชีวิตชนิดนี้ คือ โกโก้ ซึ่งเป็นพืชยืนต้นและเจริญได้ดีในสภาพภูมิอากาศเขตร้อนเช่นเดียวกับทุเรียน (ผานิต, 2548) ส่วน *Tilia* spp. จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในวงศ์ (family) เดียวกันกับทุเรียน เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุเรียนกับสิ่งมีชีวิตทั้ง 2 ชนิด คือ โกโก้ และ *Tilia* spp. พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 21 และ 19 ตำแหน่งตามลำดับ

ปัจจุบันลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะกำลังได้รับนิยมสำหรับใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA maker) โดยนำไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาวิวัฒนาการและประเมินความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ งานวิจัยที่ศึกษาในสัตว์ เช่น การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในปลาวงศ์เสือตอ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* (ดุจฤดี และนนทรี, 2557) ส่วนงานวิจัยที่ศึกษาในพืช เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในมะม่วงโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A (นฤมล และคณะ, 2559) การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และชิ้นส่วนของดีเอ็นเอระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A (นฤมล และคณะ, 2557)

เนื่องจากพันธุ์ทุเรียนที่นำมาศึกษาเป็นพืชชนิดเดียวกัน คือ *Durio Zibethinus* ดังนั้นความใกล้ชิดทางพันธุกรรมจึงมีมากกว่าพืชต่างชนิดกัน มีงานวิจัยที่ศึกษาในพืชชนิดเดียวกัน เช่น ข้าวมีสี (*Oryza sativa*) โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 พบว่ามีตำแหน่งที่ให้ความหลากรูป (polymorphism) เพียง 6 ตำแหน่ง (คิดเป็น 1.16 เปอร์เซ็นต์) (นฤมล และคณะ, 2557) และยังมีการศึกษาในมะม่วง (*Mangifera indica*) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C มีตำแหน่งที่ให้ความหลากรูปเพียง 13 ตำแหน่ง (คิดเป็น 0.54 เปอร์เซ็นต์) (ปิยดา และคณะ, 2558) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาในพืชต่างชนิด ได้แก่ ศึกษาในกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* และกล้วยไม้สกุล *Coelogyne* พบตำแหน่งที่เกิดความหลากรูป 4.32 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (นฤมล และคณะ, 2560a; นฤมล และคณะ, 2560b) ศึกษาในกล้วยไม้สกุลก้านก่อ 30 ชนิด พบว่าจำแนกได้ 12 ชนิด มีตำแหน่งที่เกิดการกลายและให้ความหลากรูป 61 ตำแหน่ง (คิดเป็น 9.2 เปอร์เซ็นต์) (จุฑามาศ และคณะ, 2560) ศึกษาในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 20 ชนิด พบว่าจำแนกได้ 3 ชนิด มีตำแหน่งการกลาย 4 ตำแหน่ง (คิดเป็น 0.7 เปอร์เซ็นต์) (พรประภา และคณะ, 2560) และศึกษาในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบลาย 20 ชนิด พบว่าจำแนกได้ 5 ชนิด มีตำแหน่งการกลาย 16 ตำแหน่ง (คิดเป็น 2.9 เปอร์เซ็นต์) (ทีปกา และคณะ, 2560)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจะเห็นว่าประสิทธิภาพในการจำแนกพืชชนิดเดียวกันโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ต่ำกว่าการจำแนกพืชต่างชนิดมาก ดังนั้นจึงไม่ควรเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพื่อวิเคราะห์ในพืชชนิดเดียวกัน แต่ควรใช้เครื่องหมายดีเอ็นเออื่น ได้แก่ อาร์เอพีดี (RAPD, random amplified poly-

morphic DNA) ไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter-simple sequence repeat) หรือสก๊อต (SCoT, start codon targeted) เป็นต้น (Gorji *et al*., 2011) ซึ่งจะช่วยให้การวิเคราะห์เพื่อจำแนกหรือระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

นอกจากนั้น มีงานวิจัยที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะอื่นวิเคราะห์ในทุเรียน เช่น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K (อรอนงค์, 2549) และมีงานวิจัยที่ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเออื่นวิเคราะห์ในทุเรียน ได้แก่ เอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphisms) (ฐิตาภรณ์ และคณะ, 2549) เอสเอสอาร์ (SSR, simple sequence repeat) หรือไมโครแซทเทลไลต์ (micro-satellite) (เอมอร และคณะ, 2556; ฮูดา และคณะ, 2557) อาร์เอพีดี (Ismi *et al*., 2009)

4. สรุป

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียน 40 พันธุ์ พบว่าเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ขนาด 566 คู่เบส และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้คล้ายคลึงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในพืชชนิดอื่น เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA7 โดยเลือกการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood พบว่าไม่สามารถจำแนกพันธุ์ทุเรียนออกจากกัน เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในทุเรียนทั้ง 40 พันธุ์ มีความเหมือนกัน 100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนนั้นยังไม่มีความเหมาะสม และไม่ควรใช้ศึกษาในตัวอย่างพืชที่จัดเป็นชนิดเดียวกัน

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างใบทุเรียนจาก คุณขจร พฤฒิสุขนิรันดร์ ซึ่งเป็นเจ้าของสวนทุเรียน สวนบ้านเรา ตำบลกระแสบน อำเภอแกลง จังหวัดระยอง

6. รายการอ้างอิง

จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก่อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A, Thai J. Sci. Technol. 6(4): 325-337.

ชวลิต หุ่นแก้ว, วันทนา บัวทรัพย์ และกิตติ สระแก้ว, 2551, การศึกษา : ศักยภาพการผลิตและการตลาดสินค้าผลไม้ไทย, สำนักส่งเสริมและจัดการสินค้าเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ฐิตาภรณ์ สุขโหตุ, อินทิรา จารุเพ็ง, ประไพ โมจรินทร์, อภิรดี เพิ่มผล, อรุณนี สระเก้า, ศิริวรรณ เทียนมงคล, ปิยรัษฎ์ ปริญญาพงษ์ และพรชัย จุฑามาศ, 2549,การจัดจำแนกทุเรียน (*Durio zibethinus* Murr.) โดยใช้เทคนิค AFLP, น. 405-410, การประชุมวิชาการทรัพยากรไทย : สรรพสิ่งล้วนพันเกี่ยว, โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี, กรุงเทพฯ.

ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์ และนนทรี ปานพรหมมินทร์, 2557, ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการจำแนกชนิดปลาวงศ์เสือตอ, ว.แก่นเกษตร 42(1): 743-748.

ทีปกา มีเสงี่ยม, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุล

รองเท้านารีกลุ่มใบลายด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A, Thai J. Sci. Technol. 6(4): 347-355.

นฤมล ธนานันต์, เกียรติชัย แซ่ไต่ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(4): 523-530.

นฤมล ธนานันต์, จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลาดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *rpo*C1, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(5): 674-682.

นฤมล ธนานันต์, จุฑาทิพย์ และธีระชัย ธนานันต์, 2560a, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A, Thai J. Sci. Technol. 6(1): 33-43.

นฤมล ธนานันต์, ปิยดา บุสดี และธีระชัย ธนานันต์, 2559, การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วงในประเทศไทย, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 24(1): 102-111.

นฤมล ธนานันต์, ภัทรา หงษ์ทองดี, วรุณธร เชื้อบุญมี และธีระชัย ธนานันต์, 2560b, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A, Thai J. Sci. Technol. 6(1): 22-32.

นฤมล ธนานันต์, วริสรา แทนสง่า และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(3): 317-326.

นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1(3): 169-188.

ปิยดา บุสดี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbc*L และ *rpo*C1, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23(6): 983-993.

ผานิต งานกรณาธิการ, 2548, การพัฒนาโกโก้ในประเทศไทย, ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 7, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

พรประภา ศิริเทพทวี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบสีเขียวด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A, Thai J. Sci. Technol. 6(4): 338-346.

พิทักษ์ ใจคง, 2550, ปฏิบัติการพืชเศรษฐกิจ : พืชผลไม้, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ, 437 น.

วุฒิพงศ์ มหาคำ, 2554, DNA barcode ของพืช : หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด, ว.พฤกษศาสตร์ไทย 3(1): 1-30.

สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ, 2544, ฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์ทุเรียน, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

หิรัญ หิรัญประดิษฐ์, สุขวัฒน์ จันทรปราณิก และ

เสริมสุข สลักเพ็ชร์, 2541, เทคโนโลยีการผลิตทุเรียน,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,กรุงเทพฯ.

อรอนงค์ หนูชูเชื้อ, 2549, การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับองค์ประกอบพอลีแซคคาไรด์ในทุเรียนต่างสายพันธุ์, วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

เอมอร รุ่งแจ้งสุวรรณ, ปิยรัษฎ์ เจริญทรัพย์, วิษุวัต สงนวล, อุษณีษ์ พิชกรรม, และศศิวิมล แสวงผล, 2556, การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์ทุเรียน (*Durio zibethinus* L.) ในจังหวัดนนทบุรีโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสเอสอาร์, น. 45, การประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 7, มหาวิทยาลัยราคำแหง, กรุงเทพฯ.

ฮูดา แก้วศรีสม, กรกช นาคคนอง, และจรัสศรี นวลศรี, 2557, การวิเคราะห์พันธุกรรมของทุเรียนพื้นบ้านในภาคใต้โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์, ว.แก่นเกษตร 42(3): 271-276.

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

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.

Ford, C.S., Ayres, K.L., Toomey, N., Haider, N., Van-Alpen-Stohl, J., Kelly, L.J., Wikstrom, N., Hollingsworth, P.M., Duff, R.J., Hoot, S.B., Cowan, R.S., Chase, M.W. and Wilkinson, M.J., 2009, Selection of candidate DNA barcoding regions for use on land plants, Bot. J. Linn. Soc. 159: 1-11.

Gorji, A.M., Poczai, P., Polgar, A. and Taller, J., 2011, Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato, Am. J. Potato Res. 88: 226-237

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and Dewaard, J.R., 2003, Biological identifications through DNA barcodes, Proc. Royal Soc. London B: Biol. Sci. 270: 313-321.

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

Ismi, R., Supriyadi, and Parjanto, 2009, Variability analysis of Sukun durian plant (*Durio zibethinus*) based on RAPD marker, Biosci. J. 1(2): 84-91.

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.

Kress, J.W. 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: e508.

Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Papulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G. and Savolainen, V., 2008, DNA barcoding the

floras of biodiversity hotspots, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 105: 2923-2928.

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

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

Sass, C., Little, D.P., Stevenson D.M., and Specht, C.D., 2007, DNA barcoding in the Cycadales: Testing the potential of proposed barcoding makers for species identification of cycads, PLoS ONE 2: e1154.

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.

Taberlet, P., Coissac, E., Pornpanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermat, T., Corthier, G., Brochmann, C., and Willerslev, E., 2007, Power and limitations of the chloroplast *trn*L (UAA) intron for plant DNA barcoding, Nucl. Acids Res. 35: e14.

Wang, W., Wu, Y., Yan, Y., Ermakova, M., Kerstetter, R., and Messing, J., 2010, DNA baecoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots, BMC Plant Biol. 10: 205.

Wynns, J.T. and Lange, C.B.A., 2014, A comparison of 16 DNA regions for use as phylogenetic markers in the pleurocarpous moss genus *Plagiothecium* (Hypnales), Am. J. Bot. 101: 652-669.