

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนก กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

ของยีน *matK* และ *rbcL*

Genetic Relationship Assessment and Identification of *Coelogyne* Using Nucleotide Sequences of *matK* and *rbcL* Gene

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

ภัทรา หงษ์ทองดี 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

Pattra Hongtongdee and Theerachai Thanananta

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

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากมีลักษณะของดอกที่มีความสวยงามและมีกลิ่นหอม อย่างไรก็ตาม การจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยลักษณะสัณฐานนั้นทำได้ยาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะของยีน *matK* และยีน *rbcL* เพื่อจำแนกและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน 24 ชนิด โดยเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* และ *rbcL* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 ผลการศึกษาพบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *matK* และ *rbcL* สามารถจำแนกเอื้องเทียนได้ 17 และ 6 ชนิด ตามลำดับ โดยไม่สามารถจำแนกเอื้องเทียนทั้ง 24

ชนิด ออกจากกันได้ ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอื่น ๆ ร่วมด้วย เพื่อเพิ่มความผันแปร และเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดของเอื้องเทียน

คำสำคัญ : กล้วยไม้; สกุลเอื้องเทียน; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; ยีน *matK*; ยีน *rbcL*

Abstract

The *coelogyne* are among the most highly prized of ornamental plants because the flowers are beautiful and fragrant. However, a method to identify the *coelogyne* with high genetic diversity by morphology study was difficult. This research, the nucleotide sequences of specific site were used to identify 24 samples of *coelogyne*. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify the *matK* and the *rbcL* fragments. After that the PCR products were sequenced and analyzed by ClustalW for multiple sequence alignment and phylogenetic tree was constructed by MEGA 7.0. The results show that phylogenetic tree constructed base on the nucleotide sequences of *matK* and *rbcL* could distinguish 17 and 6 strains of *coelogyne*, respectively and could not be used to identify all 24 strains of them. Therefore, further analysis with more nucleotide sequence, other than *matK* and *rbcL*, to increase variable and informative sites for distinguishing *coelogyne*, is suggested.

Keywords: orchid; *Coelogyne*; genetic relationship; *matK*; *rbcL*

1. คำนำ

กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (*Coelogyne*) เป็นพืชอิงอาศัยที่มีดอกขนาดใหญ่และสวยงาม จัดเป็นกล้วยไม้ที่พบตามธรรมชาติได้ยาก เนื่องจากมีปัจจัยจำกัดหลายด้านที่ส่งผลต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโต ปัจจุบันพบว่าเอื้องเทียนในธรรมชาติลดปริมาณลงอย่างรวดเร็วและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ อีกทั้งการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐาน (morphology) ทำได้ยากและเกิดการผิดพลาดได้ง่ายหากดูเพียงลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ภายนอก เนื่องจากมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ทำให้ผลการจำแนกไม่เป็นไปตามลักษณะพันธุกรรม (genotype) ที่แท้จริง จึงต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญที่มีประสบการณ์ นอกจากนี้การจำแนกชนิดโดยการดูเพียงลักษณะสัณฐาน เช่น ดอก ใบ ลำต้น มีข้อจำกัด เนื่องจากดอกของพืชมีจำนวนน้อย บางชนิดใช้เวลาในการออกดอกนาน

ทำให้ตัวอย่างที่ใช้ตรวจวิเคราะห์ไม่เพียงพอต่อการจำแนกชนิด ซึ่งหากใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) จะช่วยให้การจำแนกพืชมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพราะไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง จึงคัดเลือกได้ตรงตามลักษณะที่ต้องการ เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอมีปริมาณไม่จำกัดต่อการวิเคราะห์ เพราะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายเท่าด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR, polymerase chain reaction) และยังสามารถเก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ได้เป็นเวลานาน

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของตำแหน่งจำเพาะ (specific site) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้จำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ผสมผสานกับชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) โดยเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความผันแปรของ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน (interspecific variation) สูงกว่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน (intraspecific variation) ซึ่งผ่านการประเมินศักยภาพมาแล้วว่าสามารถใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานในบริเวณเดียวกัน ซึ่งบันทึกเก็บไว้ในฐานข้อมูลรหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode) ซึ่งเป็นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แล้ว วิธีการนี้จะทำให้สามารถจำแนกสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว (Shneyer, 2009; Casiraghi *et al.*, 2010)

ปัจจุบันมีผู้ศึกษาการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะมากขึ้น ได้แก่ การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1* (นฤมล และคณะ, 2557ก) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* (จินต์ และคณะ, 2558) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ (เกียรติชัย และคณะ, 2557) โดยสมาคม Consortium for the Barcode of Life (CBOL) ได้เสนอว่า การใช้ยีน *matK* ร่วมกับยีน *rbcl* มีความเหมาะสมมาก เนื่องจากสามารถใช้ได้กับพืชเกือบทุกชนิด ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพดี และใช้แยกความแตกต่างระหว่างชนิดของพืชได้ดี

ยีน *rbcl* อยู่ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ซึ่งกำหนดการสร้างหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) ของเอนไซม์ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) โดยเอนไซม์

RubisCO มีหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ RuBP กับ CO₂ ในวัฏจักรคัลวิน (Calvin's cycle) (Soltis and Soltis, 1998) จากการศึกษาพบว่าความยาวของยีน *rbcl* ในพืชแต่ละชนิดมีความแปรผันเล็กน้อย โดยทั่วไปมีความยาวเฉลี่ย 1,400 คู่เบส (Ford *et al.*, 2009) ซึ่งการนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อสร้างรหัสแท่งดีเอ็นเอนั้นจะใช้เพียงบางส่วนของยีน มีความยาว 500-700 คู่เบส (Kress and Erickson, 2007; Gonzalez *et al.*, 2009; Ebihara *et al.*, 2010)

ยีน *matK* มีความยาวประมาณ 1,500 คู่เบส กำหนดการสร้างเอนไซม์ maturase ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับ group II introns splicing (Hilu and Liang, 1997) ข้อดีของยีนนี้ คือ มีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงเพียงพอที่จะนำมาใช้จำแนกชนิดพืชได้ดี อีกทั้งยังให้คุณภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในเกณฑ์ดีเช่นเดียวกับยีน *rbcl*

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ ลดความผิดพลาด และมีความรวดเร็วในการจำแนกสิ่งมีชีวิตยิ่งขึ้น หลักการคือ สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีสารพันธุกรรมที่แสดงลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ ซึ่งต่างจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น โดยสามารถใช้จำแนกได้ทุกระยะของพัฒนาการชีวิต (วิชัย, 2552)

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcl* โดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างกล้วยไม้

กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนที่ใช้ในงานวิจัยนี้จำนวน 24 ชนิด ได้แก่ (1) เอื้องเทียนใบแคบ (*Coelogyne Viscosa* Rchb. f.) (2) เอื้องเทียนลำ

เขี้ยว (*Coelogyne lentiginosa* Lindl.) (3) เอื้องเทียนหิน (*Coelogyne calcicola* Kerr.) (4) เอื้องเทียนน้อย (*Coelogyne lactea* Rchb. f.) (5) เอื้องเทียนส้ม (*Coelogyne fuscescens* var. *brunnea*) (6) เอื้องเทียนบาร์บาตา (*Coelogyne barbata* Lindl. ex Griff.) (7) เอื้องมัน (*Coelogyne cumingii* Lindl.) (8) เอื้องหมาก (*Coelogyne trinervis* Lindl.) (9) เอื้องเทียนขาว [*Coelogyne nitida* (Wall. Mss.) Lindl.] (10) เอื้องสายเสริต [*Coelogyne rochussenii* (de Vriese) Kuntze] (11) เอื้องลำเทียนปากดำ (*Coelogyne brachyptera* Rchb. f.) (12) เอื้องเทียนใหญ่ลาว (*Coelogyne eberhardtii* Gagnep.) (13) เอื้องผาหมอก (*Coelogyne xyrekes* Ridl.) (14) เอื้องเทียนใบรี (*Coelogyne fimbriata* Lindl.) (15) เอื้องเทียนพังกา (*Coelogyne pachystachya* Elis.George & J.C.George) (16) เอื้องเทียนใบบาง (*Coelogyne schilleriana* Rchb.f.) (17) เอื้องสายเสริตชมพู (*Coelogyne velutina* de Vogel) (18) เอื้องเทียนอินโด (*Coelogyne pandurata* Lindl.) (19) เอื้องเทียนลอเรนเซีย (*Coelogyne lawrenceana* Rolfe) (20) เอื้องเทียนใหญ่ (*Coelogyne assamica* Linden & Rchb. f.) (21) เอื้องเทียนบอร์เนียว (*Coelogyne asperata* Lindl.) (22) เอื้องผาหมอกเขี้ยว (*Coelogyne speciosa* Lindley) (23) เอื้องสายเสริตอินโด (*Coelogyne pulverula* Teijsm. & Binn.) และ (24) เอื้องเทียนหนู (*Coelogyne schultesii* S.K.Gen & S.Das)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนทั้ง 24 ชนิด ด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1978) (จิตติพร และคณะ, 2557)

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส

(agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (จาตุรงค์ และคณะ, 2557)

2.3 การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* และ *rbcl*

นำดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนทั้ง 24 ชนิด ที่สกัดได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* และ *rbcl* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 2.5 mM MgCl₂) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *matK* (5'-TAATTTACGATCAATTCATTC-3' กับ 5'-GTTCTAGCACAGAAA GTCG-3' และ *rbcl* (5'-TCACCACAAACAGAAA CTAAAGC-3' กับ 5'-GGCACAAAATAAGAAAC GATCTC-3') ปริมาณ 500 นาโนโมลาร์ และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (RBC Bioscience, Taiwan) 1 ยูนิต

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมี 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 (เกียรติชัย, 2557)

2.4 การวิเคราะห์ผล

ส่งผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้จากการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* และ *rbcl* ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยบริษัท Solgent (ประเทศเกาหลีใต้) เมื่อได้รับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจึงนำมาประกอบเป็นสาย

เดียวกันและแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ถูกต้อง แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาจัดเรียงและเปรียบเทียบตำแหน่ง (multiple sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนแต่ละชนิด จากนั้นนำผลที่ได้ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ตามรูปแบบของ Kimura's two parameter model เลือกการจัดกลุ่มแบบ Neighbor-Joining และสุ่มข้อมูลซ้ำด้วยวิธี Bootstrap 1,000 ครั้ง โดยใช้โปรแกรม MEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net>)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพิ่มชั้นดีเอ็นเอของยีน *matK* และ *rbcL*

เมื่อเพิ่มปริมาณชั้นดีเอ็นเอของยีน *matK* และยีน *rbcL* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชั้นดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้ 24 ชนิด เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส พบว่ามีขนาดประมาณ 950 และ 650 คู่เบสตามลำดับ

3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK*

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่าคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในพืชอื่น และได้ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนทั้ง 24 ชนิด ไว้ใน GenBank โดยมีหมายเลขเฉพาะ (accession number) ของแต่ละลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 1

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK*

มาเปรียบเทียบกับโปรแกรม ClustalW พบว่าการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ การแทนที่แบบไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidines transition)

ตารางที่ 1 หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI

ชนิดกล้วยไม้	หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน	
	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
เอื้องเทียนใบแคบ	KP675987.1	KU219955.1
เอื้องเทียนลำเขี้ยว	KP675988.1	KU219956.1
เอื้องเทียนหิน	KP675989.1	KU219957.1
เอื้องเทียนน้อย	KP675990.1	KU219958.1
เอื้องเทียนส้ม	KP675991.1	KU219959.1
เอื้องเทียนบาร์บาดา	KP675992.1	KU219960.1
เอื้องมัน	KP675993.1	KU219961.1
เอื้องหมาก	KP675994.1	KU219962.1
เอื้องเทียนขาว	KP675995.1	KU219965.1
เอื้องสายเสริต	KP675996.1	KU219963.1
เอื้องลำเทียนปากดำ	KP675997.1	KU219964.1
เอื้องเทียนใหญ่ลาว	KP675998.1	KU219967.1
เอื้องผาหมอก	KP675999.1	KU219966.1
เอื้องเทียนใบรี	KP676000.1	KU219968.1
เอื้องเทียนพังกา	KU877838	KU219969.1
เอื้องเทียนใบบาง	KU877839	KU219970.1
เอื้องสายเสริตชมพู	KU877840	KU219971.1
เอื้องเทียนอินโด	KU877841	KU219972.1
เอื้องเทียนลอเรนเซีย	KU877842	KU877822.1
เอื้องเทียนใหญ่	KU877843	KU877823.1
เอื้องเทียนบอร์เนียว	KU877844	KU877824.1
เอื้องผาหมอกเขียว	KU877845	KU877825.1
เอื้องสายเสริตอินโด	KU877846	KU877826.1
เอื้องเทียนหนู	KU877847	KU877827.1

พิวรีนทรานสิชัน (purines transition) และทรานส-เวอร์ชัน (transversion) นอกจากนั้นยังพบอินเดล (indel, insertion/deletion) คือ มีการเพิ่มขึ้นหรือ

ขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ โดยตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงแสดงในตารางที่ 2

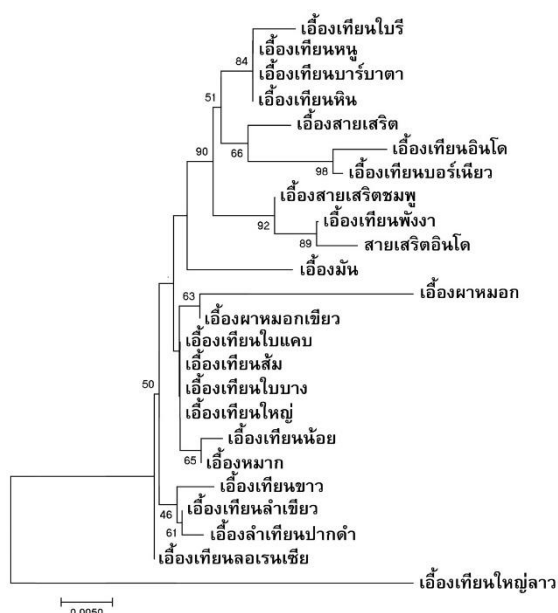
ตารางที่ 2 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน 24 ชนิด ที่ให้ความแตกต่างระหว่างชนิดของเอื้องเทียน

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
อินเดล	21-100, 101-350, 108, 270, 311-319, 386, 394, 412-413, 427-437, 439, 456, 759, 783, 801, 818, 881, 897, 921-927, 934-940, 945 และ 964-1,164
ไพริมิดีนทรานสิชัน	107, 132, 297, 299, 303, 310, 326, 332, 336, 344, 367, 373, 387, 389, 397, 423, 435, 444, 465, 593, 618, 620, 631, 708, 761, 846, 868, 913, 932, 944 และ 953
พิวรีนทรานสิชัน	289, 321, 324, 346, 558, 362, 369, 417, 428-429, 432, 636, 789, 800, 838, 856, 876, 896, 912, 917, 926, 928, 952 และ 956
ทรานสเวอร์ชัน	101, 212, 234, 245, 250, 284, 285, 292, 295, 290-291, 298, 301, 304, 307, 309, 323-324, 326-329, 333, 336, 338, 340, 341-343, 347-349, 357, 360-361, 365-366, 371-372, 374, 383-384, 388, 392, 398, 422, 433, 438-439, 441, 445, 452, 458, 499, 569, 604, 629, 635, 684-685, 694, 696, 723, 742-743, 745, 799, 844, 859-860, 869, 877, 879, 885, 888, 900, 906, 909, 911, 915-916, 918, 920, 921-923, 933, 943, 974, 951, 955, 957, 960

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถจัดแบ่งได้ 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เอื้องเทียนใบรี เอื้องเทียนหนู เอื้องเทียนบาร์บาตา เอื้องเทียนหิน เอื้องสายเสริด เอื้องเทียนอินโด เอื้องเทียนบอร์เนียว เอื้องสายเสริดชมพู เอื้องเทียนพังงา เอื้องสายเสริดอินโด และเอื้องมัน กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เอื้องผาหมอก เอื้องผาหมอกเขียว เอื้องเทียนใบแคบ เอื้องเทียนส้ม เอื้องเทียนใบบาง เอื้องเทียนใหญ่ เอื้องเทียนน้อย และเอื้องหมาก กลุ่มที่ 3 ได้แก่ เอื้องเทียนขาว เอื้องเทียนลำเขียว และเอื้องลำเทียนปากดำ กลุ่มที่ 4 ได้แก่ เอื้องเทียนลอเรนเซีย และกลุ่มที่ 5 ได้แก่ เอื้องเทียนใหญ่ลาว โดยสามารถจำแนกเอื้องเทียนได้ 17 ชนิด ได้แก่ เอื้องเทียนใบรี เอื้องสายเสริด เอื้องเทียนอินโด เอื้อง

เทียนบอร์เนียว เอื้องสายเสริดชมพู เอื้องเทียนพังงา เอื้องสายเสริดอินโด เอื้องมัน เอื้องผาหมอก เอื้องผาหมอกเขียว เอื้องเทียนน้อย เอื้องหมาก เอื้องเทียนขาว เอื้องเทียนลำเขียว เอื้องลำเทียนปากดำ เอื้องเทียนลอเรนเซีย และเอื้องเทียนใหญ่ลาว มีประสิทธิภาพการจำแนกชนิด 71 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาหมู่ (section) ของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน พบว่ากล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนที่สามารถจัดกลุ่มได้ตรงตามหมู่ ได้แก่ (1) หมู่ *verrucosae* ได้แก่ เอื้องเทียนอินโด และเอื้องเทียนบอร์เนียว (2) *speciosae* ได้แก่ เอื้องผาหมอก และเอื้องผาหมอกเขียว (3) *flaccidae* ได้แก่ เอื้องเทียนน้อย และเอื้องหมาก และ (4) หมู่ *tomentosae* ได้แก่ เอื้องสายเสริดชมพู เอื้องเทียนพังงา และเอื้องสายเสริดอินโด (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้
จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK*

เมื่อวิเคราะห์การสร้างสรรค์ตะมิโนพบว่า การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งมีผลต่อการสร้างสรรค์ตะมิโน (ตารางที่ 3)

ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์
ของยีน *matK* สามารถจำแนกเอื้องเทียนได้ดีกว่า
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* รวมทั้งการจำแนก
ด้วยแฮตดาร์เอฟิติและไอเอสเอสอาร์ (ภัทรา และ
คณะ, 2559ก) เนื่องจากยีน *matK* มีคุณภาพของ
ลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในเกณฑ์ดี มีอัตราการ
วิวัฒนาการสูงกว่ายีนอื่น ๆ จึงมีประสิทธิภาพใน
การจำแนกและหาวิวัฒนาการของพืช (Tamura *et*
al., 2013)

3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน *rbcL*

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ
ยีน *rbcl* กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ที่มีผลต่อการสร้างกรดอะมิโน

ตำแหน่ง	จำนวนชนิดของเอ็งเทียน	การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน
30	18	G เป็น A	Lys เป็น Gln
63	10	G เป็น A	Ser เป็น Tyr
225	9	C เป็น A	Ser เป็น Tyr
327	5	C เป็น A	Gln เป็น Lys
394	11	G เป็น T	Gln เป็น His
448	18	G เป็น T	Lys เป็น Asn
475	12	A เป็น T	Tyr เป็น Phe
580	12	A เป็น T	Gln เป็น Leu
643	6	C เป็น A	Pro เป็น His
663	3	C เป็น A	Pro เป็น His
669	14	C เป็น A	Pro เป็น Asn
687	11	A เป็น T	Lys เป็น Ile
718	12	A เป็น T	Lys เป็น Met
721	10	G เป็น T	Lys เป็น Asn
756	13	C เป็น A	Gln เป็น Lys

GenBank ของ NCBI พบว่าคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในพืชอื่น และได้ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนทั้ง 24 ชนิด ไว้ใน GenBank โดยมีหมายเลขเฉพาะของแต่ละลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 1

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* มาเปรียบเทียบกับโปรแกรม ClustalW พบว่าการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ การแทนที่แบบไพริมิตินทรานสิชัน พิวรีนทรานสิชัน และทรานสเวอร์ชัน (ตารางที่ 4) และเมื่อวิเคราะห์การสร้างกรดอะมิโนพบว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอ

ไทด์บางตำแหน่งมีผลต่อการสร้างกรดอะมิโน (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน 24 ชนิด ที่ให้ความแตกต่างระหว่างชนิดของเอื้องเทียน

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
ไพริมิตินทรานสิชัน	228, 258, 263 และ 492
พิวรีนทรานสิชัน	25 และ 600
ทรานสเวอร์ชัน	42, 45 และ 79

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ที่มีผลต่อการสร้างกรดอะมิโน

ตำแหน่ง	จำนวนชนิดของเอื้องเทียน	การเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน
25	14	A เป็น G	Ser เป็น Gly
79	15, 17	G เป็น C	Asp เป็น His
263	15, 17, 23	T เป็น C	Val เป็น Ala

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถจัดแบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เอื้องเทียนส้ม เอื้องมัน เอื้องเทียนใบบาง เอื้องเทียนใบแคบ เอื้องเทียนบาร์บาตา เอื้องผาหมอก เอื้องผาหมอกเขียว เอื้องหมาก เอื้องเทียนใบรี เอื้องเทียนหิน เอื้องเทียนใหญ่ เอื้องเทียนใหญ่ลาว เอื้องเทียนลอเรนเซีย เอื้องเทียนน้อย เอื้องเทียนหนู เอื้องเทียนลำเขี้ยว เอื้องเทียนขาว และเอื้องลำเทียนปากดำ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เอื้องเทียนอินโด และเอื้องเทียนบอร์เนียว และกลุ่มที่ 3 คือ เอื้องสายเสริตอินโด เอื้องสายเสริต เอื้องเทียนพังงา และเอื้องสายเสริตชมพู โดยสามารถจำแนกเอื้องเทียนได้ 6 ชนิด ได้แก่ เอื้องเทียนส้ม เอื้องมัน เอื้องเทียนใบรี เอื้องเทียนใหญ่ เอื้องสายเสริตอินโด และเอื้องสายเสริต

ซึ่งมีประสิทธิภาพการจำแนกชนิด 25 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพิจารณาหมู่ของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน พบว่ากล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนที่สามารถจัดกลุ่มได้ตรงตามหมู่ ได้แก่ (1) หมู่ *speciosae* ได้แก่ เอื้องผาหมอก และเอื้องผาหมอกเขียว (2) หมู่ *lawrenceanae* ได้แก่ เอื้องเทียนใหญ่ลาว และเอื้องเทียนลอเรนเซีย (3) หมู่ *verrucosae* ได้แก่ เอื้องเทียนอินโด และเอื้องเทียนบอร์เนียว และ (4) หมู่ *tomentosae* ได้แก่ เอื้องสายเสริต เอื้องสายเสริตชมพู เอื้องสายเสริตอินโด และเอื้องเทียนพังงา (รูปที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และยีน *rbcl* พบว่ายีน *rbcl* สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้ตรงตามหมู่ จำนวน 4

(2008) Newmaster และคณะ (2008) และ CBOL Plant Working Group (2009) ที่ได้เสนอว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ 2-3 บริเวณร่วมกัน จะมีความเหมาะสมต่อการจำแนกพืชได้ดีกว่าการใช้เพียงบริเวณเดียว เนื่องจากการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียงบริเวณเดียวอาจไม่เพียงพอ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์มีขนาดเล็กมากเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดจีโนมของพืช (นฤมล และคณะ, 2557ข)

4. สรุป

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *matK* และ *rbcl* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเอียงเทียบได้ครบทุกชนิด มีขนาดประมาณ 950 และ 650 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีนทั้งสอง พบว่าไม่สามารถจำแนกเอียงเทียบได้ครบทุกชนิด แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *matK* จำแนกได้ 17 ชนิด ซึ่งมากกว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *rbcl* ที่จำแนกได้เพียง 6 ชนิด โดยแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *matK* แบ่งเอียงเทียบเป็น 4 กลุ่ม ส่วนแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *rbcl* แบ่งเอียงเทียบเป็น 3 กลุ่ม

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* พบว่าสามารถจำแนกชนิดของเอียงเทียบได้ดีขึ้นกว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเพียงยีนเดียว อย่างไรก็ตาม ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcl* ยังไม่สามารถจำแนกเอียงเทียบได้ครบทั้ง 24 ชนิด การเพิ่มประสิทธิภาพการจำแนกเอียงเทียบให้มากยิ่งขึ้นนั้นจะต้องเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะอื่น ๆ ร่วมด้วย

5. รายการอ้างอิง

- เกียรติชัย แซ่ใต้, นฤมล ธนानันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลดอกดาหลู่มงีสโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 523-530.
- จาดุรงค์ สัมฤทธิ์, เปรมณัช ขุนปักชี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกผักกาดด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 3: 23-28.
- จินต์ ทองสม, นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2558, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหลู่มงีสโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 994-1005.
- จิตติพร ไท่มโสภา, ธีระชัย ธนานันต์, บุญหงษ์ จงคิด และนฤมล ธนานันต์, 2557, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 3: 36-44.
- นฤมล ธนานันต์, จิตติพร ไท่มโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอียงสายด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดี, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 102-108.
- นฤมล ธนานันต์, จิตติพร ไท่มโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอียงสายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1*, ว.

- วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 664-673.
- ภัทรา หงษ์ทองดี, นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2559ก, การจำแนกชนิดและการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยเครื่องหมายแอสอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 5: 88-97.
- ภัทรา หงษ์ทองดี, นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2559ข, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24: 342-350.
- วิชัย ไชสิตรัตน, 2552, แท่งรหัสดีเอ็นเอ (DNA Barcode) : รหัสจำแนกสิ่งมีชีวิต, ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร AG-BIO 1(3): 14-15.
- Casiraghi, M., Labra, M., Ferri, E., Galimberti, A. and de Mattia, F., 2010, DNA barcoding: A six question tour to improve users' awareness about the method, Brief. Bioinform. 11: 440-453.
- CBOL Plant Working Group, 2009, A DNA barcode for land plants, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106: 12794-12797.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1978, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 11-15.
- Ebihara, A., Nitta, J.H. and Ito, M., 2010, Molecular species identification with rich floristic sampling: DNA barcoding the pteridophyte flora of Japan, PLoS ONE 5: e15136.
- Ford, C.S., Ayres, K.L., Toomey, N., Haider, N., van Alphen Stahl, 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 coding DNA barcoding regions for use on land plants, Bot. J. Lin. Soc. 159: 1-11.
- Gonzalez, M.A., Baraloto, C., Engel, J., Mori, S.A., Pétronelli, P., Riéra, B., Roger, A., Thébaud, C. and Chave, J., 2009., Identification of Amazonian trees with DNA barcodes, PLoS ONE 4: e7483.
- Kress, W.J. and Erickson, D.L., 2007, A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcl* gene complements the non-coding region *trnH-psbA* spacer region, PLoS ONE 2: e508,
- Kress, W.J. and Erickson, D.L., 2008, DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105: 2761-2762.
- Mattia, F.D., Bruni, I., Galimberti, A., Cattaneo, F., Casiraghi, M. and Labra, M., 2011, A comparative study of different DNA barcoding markers for the identification of some members of *Lamiaceae*, Food Res. Int. 44: 693-702.
- Newmaster, S.G., Ibabaei, M.H. and Husband, B.C., 2009, Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers?, Mol. Ecol. Res. 9: 130-139.
- Shneyer, V.S., 2009, DNA barcoding is a new approach in comparative genomics of plants, Russ. J. Genet. 45: 1267-1278.
- Soltis, D.E. and Soltis, P.S., 1998, Choosing an approach and an appropriate gene for

phylogenetic analysis, pp.1-42, In Soltis, D.E., Soltis, P.S. and Doyle, J.J. (Eds.), *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing*, Kluwer Academic Publishers, Boston.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., 2013, MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.