

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของ กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

Genetic Relationship Assessment and Identification of *Coelogyne* Based on Nucleotide Sequence of *rpoC1* Gene and *trnH-psbA* Intergenic Spacer Region

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

ภัทรา หงษ์ทองดี, วรุณธร เชื้อบุญมี 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

Pattra Hongtongdee, Varundhorn Chuaboonmee and Theerachai Thanananta*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae เป็นกล้วยไม้ที่มีดอกสวยงามและมีกลิ่นหอม ปัจจุบันการจำแนกชนิดของกล้วยไม้ด้วยลักษณะสัณฐานทำได้ยากและมีความผิดพลาดสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* เพื่อระบุชนิดและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน 24 ชนิด โดยการเพิ่มปริมาณซันดีเอ็นเอของ *rpoC1* และ *trnH-psbA* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แล้วนำไปตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 ผลการศึกษาพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *rpoC1* และ *trnH-psbA* สามารถระบุชนิดของเอื้องเทียนได้ 7 และ 15 ชนิด ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 บริเวณ ร่วมกัน พบว่าสามารถจำแนกเอื้องเทียนได้เกือบทุกชนิด ยกเว้นเอื้องเทียนลำเขียวและเอื้องลำเทียนปากดำ

คำสำคัญ : กล้วยไม้; สกุลเอื้องเทียน; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; ยีน *rpoC1*; ชันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH-psbA*

Abstract

The *Coelogyne* is a sympodial epiphytes from the family Orchidaceae. The plants have beautiful and fragrant flowers. Currently, identification of orchid species based on morphology is difficult and high error. This research, the nucleotide sequences of specific sites were used to identify 24 samples of *Coelogyne*. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify *rpoC1* gene and *trnH-psbA* intergenic spacer. The PCR products of *rpoC1* gene and *trnH-psbA* intergenic spacer were sequenced and then the data were analyzed by ClustalW and MEGA 7.0. The results showed that nucleotide sequences of *rpoC1* gene and *trnH-psbA* intergenic spacer could distinguish 7 and 15 out of 24 orchids, respectively. The combined nucleotide sequences of *rpoC1* gene and *trnH-psbA* intergenic spacer were capable to identify most of *Coelogyne*, excepted *C. lentiginosa* and *C. brachyptera*.

Keywords: orchid; *Coelogyne*; genetic relationship; *rpoC1* gene; *trnH-psbA* intergenic spacer

1. คำนำ

กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนเป็นกล้วยไม้ป่าหายาก พบได้ทั้งในป่าผลัดใบและป่าไม่ผลัดใบ มีเขตกระจายพันธุ์ในประเทศไทย พม่า ลาว กัมพูชา มาเลเซีย เวียดนาม อินโดนีเซีย จัดเป็นกล้วยไม้ที่มีดอกสีส้มสวยงาม เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและนอกประเทศ ดังนั้นกล้วยไม้จึงเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย มีการส่งออกไปยังตลาดทั่วโลก ซึ่งมีมูลค่าสูงประมาณ 400 ล้านเหรียญ ส่วนใหญ่เป็นกล้วยไม้เขตร้อน มีตลาดรับซื้อกว่า 84 ประเทศ ที่สำคัญ ได้แก่ ญี่ปุ่น อิตาลี ฝรั่งเศส จีน อเมริกา เป็นต้น โดยเนเธอร์แลนด์เป็นแหล่งผลิตและส่งออกกล้วยไม้เขตหนาวอันดับ 1 ของโลก ส่วนไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกดอกกล้วยไม้เขตร้อนอันดับ 1 ของโลก (กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ, 2558) ปัจจุบันพบว่าแนวโน้มความต้องการของผู้บริโภคยังคงต้องการกล้วยไม้ที่มีดอกสีส้มสวยงาม ได้สายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่มีความหลากหลายมากขึ้น แต่ปัญหาที่เกิดขึ้น คือ มักมีความ

สับสนในการจำแนกพันธุ์ เนื่องจากการจำแนกกล้วยไม้จากลักษณะภายนอกหรือลักษณะสัณฐาน (morphology) ทำได้ยาก และมักมีอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ทำให้เกิดความผิดพลาดในการจำแนกสูง ดังนั้นการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ (specific site) ของยีน *rpoC1* และชันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* และ *psbA* เพื่อจำแนกและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนจึงสอดคล้องกับแนวทางการแก้ปัญหา เนื่องจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ในการจำแนกพันธุ์มีความถูกต้องและแม่นยำสูง เนื่องจากไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม ทำให้ในทุกช่วงระยะเวลาของการเจริญเติบโตของพืช และใช้ปริมาณตัวอย่างพืชเพียงเล็กน้อย จึงไม่ทำลายต้นพืช

โดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ตำแหน่งจำเพาะจัดเป็น molecular based identification system ที่ผสมผสานร่วมกับชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) เป็นการใช้ลำดับนิวคลีโอ-

ไทด์จากดีเอ็นเอบริเวณที่มีการประเมนแล้วว่ามีศักยภาพเพียงพอที่จะระบุ (identification) หรือจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต อาจใช้เพียงบริเวณเดียวหรือหลายบริเวณในจีโนมร่วมกัน แต่มักเป็นดีเอ็นเอช่วงสั้น ๆ แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณเดียวกันที่เก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ซึ่งเป็นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ทราบชื่อวิทยาศาสตร์แล้ว วิธีการนี้สามารถจะระบุสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว (Shneyer, 2009; Casiraghi *et al.*, 2010) โดยลำดับดีเอ็นเอในบริเวณที่ใช้เป็นรหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode) นั้นจะต้องมีความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ในระดับสปีชีส์ (species) หรือชนิด และมีตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved site) ขนาบข้างเพื่อเป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอช่วงสั้น ๆ เพื่อให้ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณ (Kress and Erickson, 2008)

ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) เมื่อนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) จะให้ข้อมูลได้ดีกว่าดีเอ็นเอในนิวเคลียส เนื่องจากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของต้นลูกส่วนใหญ่จะได้รับการถ่ายทอดมาจากแม่ฝ่ายเดียว (uniparental inheritance) ต้นลูกที่สืบเชื้อสายมาจากต้นบรรพบุรุษฝ่ายแม่จึงมีรูปแบบดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์แบบโฮโมไซกัส (homozygous) นอกจากนี้การตรวจสอบดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ยังมีข้อดีเหนือกว่านิวเคลียส คือ ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์จะมีจำนวนโมเลกุล (copy number) มากกว่าในนิวเคลียส ทำให้ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์และตรวจสอบได้ง่าย

trnH (tRNA^{His}) เป็นยีนที่ไม่ได้มีการแปลรหัส (translation) เป็นโปรตีน แต่จะมีการถอดรหัส

(transcription) ได้เป็น tRNA^{His} (GUG) และปลาย 3' จับกับกรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine, H) เพื่อนำไปต่อเป็นสายพอลิเพปไทด์ (polypeptide) ส่วน *psbA* (photosystem II protein D1) เป็นยีนกำหนดการสร้างโปรตีน D1 ซึ่งเป็นองค์ประกอบของรงควัตถุระบบแสงที่ 2 (photosystem II) ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) ของพืช เป็นดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของพืช เนื่องจากบริเวณนี้มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในระดับชนิดหรือสปีชีส์สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณอื่น

PoC1 เป็นยีนกำหนดการสร้างพอลิเพปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอร์ (RNA polymerase) โดยอินทรอน (intron) ที่พบในยีน *rhoC1* เป็นลักษณะปกติที่สามารถพบได้ในพืชดอก ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงแทนที่สูง รวมทั้งมีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเอ็กซอน (exon) และอินทรอนที่ให้ข้อมูลเพียงพอในพืชหลายชนิด เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลความผันแปรนี้จะบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ได้ (Liston, 1992; Downie *et al.*, 1996)

การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะเพียง 1 บริเวณ อาจให้ผลการจำแนกพืชชนิดต่าง ๆ ได้ไม่ถี่นัก อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยที่เคยรายงานมาก่อนเสนอว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะมากกว่า 1 บริเวณ มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ระบุพืชกลุ่มต่าง ๆ ได้ดีกว่าการใช้เพียงบริเวณเดียว โดยเสนอให้ใช้ร่วมกันเป็น 2-3 บริเวณ (Kress and Erickson, 2008; Newmaster *et al.*, 2008; CBOL Plant Working Group, 2009) หรือใช้ 3 บริเวณร่วมกัน (Chase *et al.*, 2007)

งานวิจัยครั้งนี้ได้เลือกนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะที่ศึกษามาแล้วว่ามีความเหมาะสมสำหรับการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกพันธุ์พืช ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

rpoC1 และซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ทั้งหมดฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI เพื่อใช้เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างกล้วยไม้

กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนที่ใช้ในงานวิจัยนี้จำนวน 24 ชนิด ได้แก่ (1) เอื้องเทียนใบแคบ (*Coelogyne Viscosa* Rchb. f.) (2) เอื้องเทียนลำเขียว (*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) เอื้องสายเสริด [*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) เอื้องเทียนพังงา (*Coelogyne pachystachya* Elis. George & J.C.George) (16) เอื้องเทียนใบบาง (*Coelogyne schilleriana* Rchb. f.) (17) เอื้องสายเสริดชมพู (*Coelogyne velutina* de Vogel) (18) เอื้องเทียนอินโด (*Coelogyne pandurata* Lindl.) (19) เอื้องเทียนลอเรนเซีย (*Coelogyne lawrenceana* Rolfe) (20) เอื้องเทียนใหญ่ (*Coelo-*

gyne assamica Linden & Rchb. f.) (21) เอื้องเทียนบอร์เนียว (*Coelogyne asperata* Lindl.) (22) เอื้องผาหมอกเขียว (*Coelogyne speciosa* Lindley) (23) เอื้องสายเสริดอินโด (*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) (ฐิติพร และคณะ, 2557)

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (จาตุรงค์ และคณะ, 2557)

2.3 การเพิ่มซันติเอ็นเอของยีน *rpoC1* และซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

นำดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนทั้ง 24 ชนิด ที่สกัดได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วเพิ่มซันติเอ็นเอของยีน *rpoC1* และซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ด้วยปฏิกิริยาถูกโซฟอลิเมอเรส โดยใช้ดีเอ็นเอ 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 *rpoC1* (5'-GTGGATACACTTCTTG ATAATGG-3' กับ 5'-TGAGAAAACATAAGTAAACGGG C-3' และไพรเมอร์จำเพาะต่อซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH-psbA* (5'-CGCGCATGGTGG ATTACAATCC-3' กับ 5'-GTTATGCATGAACG TAATGCTC-3') ปริมาณ 500 นาโนโมลาร์ และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (RBC Bioscience, Taiwan) 1 ยูนิต (Unit)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมี่ 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

ส่งผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในการเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Solgent (ประเทศเกาหลีใต้) เมื่อได้รับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว จึงนำมาประกอบเป็นสายเดียวกันและแก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ถูกต้อง โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาจัดเรียงและเปรียบเทียบตำแหน่ง (multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>) ทั้งนี้เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนแต่ละชนิด และนำผลที่ได้ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตามรูปแบบของ 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 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุล

เอื้องเทียนได้ทั้ง 24 ชนิด เมื่อตรวจสอบขนาดด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* มีขนาดประมาณ 575 และ 800 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐาน ข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ตรงกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ในพืชชนิดอื่น ๆ จึงได้ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ ในกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน ทั้ง 24 ชนิด ไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยมีหมายเลขเฉพาะของแต่ละลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 1

3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* มาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่ามีตำแหน่งที่เกิดการกลาย (mutation) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ การแทนที่นิวคลีโอไทด์แบบไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) พิวรีนทรานสิชัน (purine transition) และทรานสเวอร์ชัน (transversion) นอกจากนี้ยังพบว่ามีอินเดล (indel, insertion/deletion) กล่าวคือ มีการขาดหายไปหรือมีการเพิ่มขึ้นของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 2) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ neighbor joining และเลือกรูปแบบ Kimura's two parameter model ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เอื้องเทียนน้อย เอื้องเทียนขาว เอื้องเทียนใบแคบ เอื้องเทียนลำเขียว เอื้อง

หมาก เอื้องมัน เอื้องเทียนใหญ่ลาว เอื้องลำเทียน ปากดำ เอื้องเทียนส้ม เอื้องเทียนใบบาง เอื้องสาย เสริต เอื้องผาหมอก เอื้องเทียนหนู เอื้องเทียนบาร์ บาตา เอื้องเทียนหิน เอื้องเทียนใบรี เอื้องผาหมอก เขียว เอื้องเทียนอินโด เอื้องเทียนพังงา เอื้องสาย เสริตชมพู เอื้องเทียนลอเรนเซีย เอื้องเทียนใหญ่ และเอื้องสายเสริตอินโด กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เอื้องเทียน บอร์เนียว (รูปที่ 1ก) เมื่อพิจารณาการจัดกลุ่มตาม หมู่ของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* สามารถจำแนกได้ตรงตาม หมู่ (section) ของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน คือ หมู่ Tomentosae ได้แก่ เอื้องสายเสริตชมพู และเอื้องเทียนพังงา นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกเอื้องเทียน ได้ 7 ชนิด ได้แก่ เอื้องเทียนส้ม เอื้องเทียนหนู เอื้องเทียนบาร์บาตา เอื้องผาหมอกเขียว เอื้องเทียน พังงา เอื้องสายเสริตชมพู และเอื้องเทียนบอร์เนียว ซึ่งจะเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* สามารถจำแนกเอื้องเทียนได้เพียง 29 เปอร์เซ็นต์ มี ประสิทธิภาพในการจำแนกน้อย จึงไม่ควรใช้ลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* เพียงบริเวณเดียวหรือ อาจใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทอื่นมาร่วม วิเคราะห์ผลด้วย ตัวอย่าง เช่น การจำแนกเอื้องเทียน 14 ชนิด ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟิติ (HAT-RAPD, high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA) ซึ่ง พบว่า สามารถจำแนกเอื้องเทียนได้ 10 ชนิด (นฤมล และ คณะ, 2559) การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL* ซึ่งสามารถจำแนกเอื้องเทียนได้ 17 ชนิด (นฤมล และคณะ, 2559) เมื่อใช้เครื่องหมาย ดีเอ็นเอหลายชนิด หรือลำดับนิวคลีโอไทด์หลาย บริเวณจะสามารถเพิ่มโดยมีประสิทธิภาพมากกว่า การใช้ยีน *rpoC1* เพียงยีนเดียว สาเหตุที่ยีน *rpoC1* สามารถจำแนกชนิดของเอื้องเทียนได้น้อย เนื่องจากเป็นยีนที่มีขนาดสั้น จึงมีความผันแปรของ ลำดับนิวคลีโอไทด์น้อย ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์

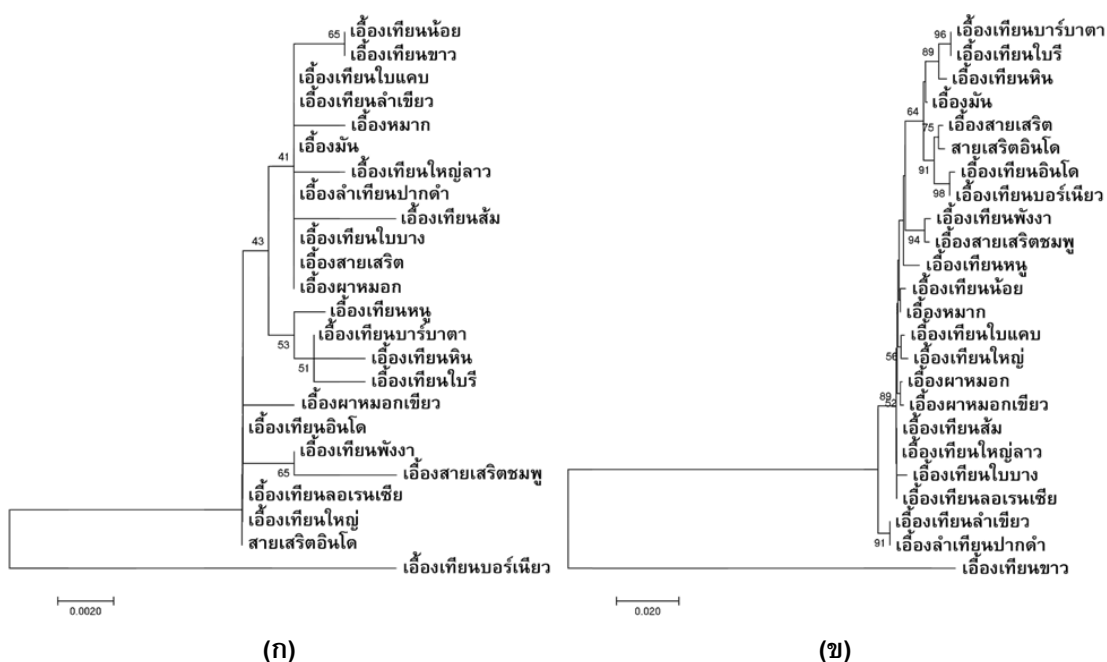
ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอื่น ๆ เพื่อเพิ่ม ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในการจำแนก ชนิดของเอื้องเทียน

ตารางที่ 1 หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอ- ไทด์ที่ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI

ชนิดกล้วยไม้	หมายเลขเฉพาะของ ลำดับนิวคลีโอไทด์	
	<i>rpoC1</i>	<i>trnH-psbA</i>
เอื้องเทียนใบแคบ	KP662080.1	KP694310.1
เอื้องเทียนลำเขียว	KP662081.1	KP694311.1
เอื้องเทียนหิน	KP662082.1	KP694312.2
เอื้องเทียนน้อย	KP662083.1	KP694313.1
เอื้องเทียนส้ม	KP662084.1	KP694314.1
เอื้องเทียนบาร์บาตา	KP662085.1	KP694315.1
เอื้องมัน	KP662086.1	KP694316.1
เอื้องหมาก	KP662087.1	KP694317.1
เอื้องเทียนขาว	KP662088.1	KP694318.2
เอื้องสายเสริต	KP662089.1	KP694319.1
เอื้องลำเทียนปากดำ	KP662090.1	KP694320.1
เอื้องเทียนใหญ่ลาว	KP662091.1	KP694321.1
เอื้องผาหมอก	KP662092.1	KP694322.1
เอื้องเทียนใบรี	KP662093.1	KP694323.1
เอื้องเทียนพังงา	KU219951.1	KU877828.1
เอื้องเทียนใบบาง	KU219952.1	KU877829.1
เอื้องสายเสริตชมพู	KU219953.1	KU877830.1
เอื้องเทียนอินโด	KU219954.1	KU877831.1
เอื้องเทียนลอเรนเซีย	KX037356.1	KU877832.1
เอื้องเทียนใหญ่	KX037360.1	KU877833.1
เอื้องเทียนบอร์เนียว	KX037361.1	KU877834.1
เอื้องผาหมอกเขียว	KX037357.1	KU877835.1
เอื้องสายเสริตอินโด	KX037358.1	KU877836.1
เอื้องเทียนหนู	KX037359.1	KU877837.1

ตารางที่ 2 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ในกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน 24 ชนิด ที่ให้ความแตกต่างระหว่างชนิดของเอื้องเทียน

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
พิวรีนทรานซิชัน	304, 311, 344, 461, 354, 408, 427 และ 460
ไพริมิดีนทรานซิชัน	50, 235, 301 และ 439
ทรานสเวอร์ชัน	46, 57, 289, 382, 386, 396, 417-418, 428 และ 448
อินเดล	23-31, 25-31, 50, 51-52, 74 และ 510-537



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* (ก) และชนิดเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* (ข)

3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชนิดเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่ามีการกลายเกิดขึ้นหลายแบบ ได้แก่ ไพริมิดีนทรานซิชัน พิวรีนทรานซิชัน ทรานสเวอร์ชัน และอินเดล (ตารางที่ 3) จากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม MEGA 7.0 ด้วยวิธี neighbor joining

สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน 24 ชนิด ได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เอื้องเทียนบาร์บาตา เอื้องเทียนโบแคบ เอื้องเทียนหิน เอื้องมัน เอื้องสาย-เสริต เอื้องสายเสริตอินโด เอื้องเทียนอินโด เอื้องเทียนบอร์เนียว เอื้องเทียนพังงา เอื้องสายเสริตชมพู เอื้องเทียนหนู เอื้องเทียนน้อย เอื้องหมาก เอื้องเทียนโบแคบ เอื้องเทียนใหญ่ เอื้องผาหมอก เอื้องผาหมอกเขียว เอื้องเทียนส้ม เอื้องเทียนใหญ่ลาว เอื้องเทียนใบบาง เอื้องเทียนลอเรนเซีย เอื้องเทียนลำเลียง เอื้องลำเลียงปากดำ

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เอื้องเทียนลำเขียว และเอื้องลำเทียนปากดำ และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ เอื้องเทียนขาว (รูปที่ 1ข) โดยพบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการจัดกลุ่มแบบ neighbor joining สามารถจัดกลุ่มได้ตรงตามหมู่ของเอื้องเทียน คือ (1) หมู่ Tomentosae ได้แก่ เอื้องสายเสริต เอื้องสายเสริตอินโด เอื้องเทียนพังงา และเอื้องสายเสริตชมพู (2) หมู่ Terrucosae ได้แก่ เอื้องเทียนอินโด และเอื้องเทียนบอร์เนียว (3) หมู่ Flaccidae ได้แก่ เอื้องเทียนน้อยและเอื้องหมาก (4) หมู่ Speciosae ได้แก่ เอื้องผาหมอกและเอื้องผาหมอกเขียว และ (5) หมู่ Ocellatae ได้แก่ เอื้องเทียนขาว นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกเอื้องเทียนได้ 15 ชนิด ได้แก่ เอื้องเทียนหิน เอื้องมัน เอื้องสายเสริต เอื้องสายเสริตอินโด เอื้องเทียนอินโด เอื้อง

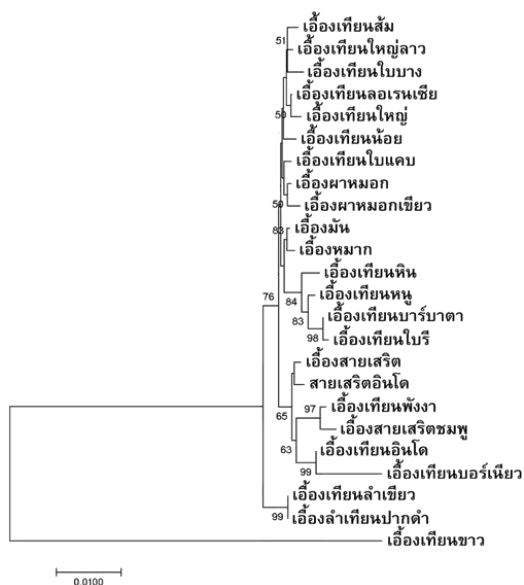
เทียนบอร์เนียว เอื้องเทียนหนู เอื้องเทียนน้อย เอื้องหมาก เอื้องเทียนใบแคบ เอื้องเทียนใหญ่ เอื้องผาหมอก เอื้องผาหมอกเขียว เอื้องเทียนใบบาง และเอื้องเทียนขาว มีประสิทธิภาพในการจำแนก 63 เปอร์เซ็นต์ จึงเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชั้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้ดีกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* เพราะมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างสูงและเพียงสำหรับการจำแนกชนิดของพืชได้ดี (Kress and Erickson, 2008) นอกจากนี้ชั้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* มีส่วนปลาย 2 ด้าน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นแบบอนุรักษ์สูง จึงสามารถออกแบบไพรเมอร์สากลสำหรับศึกษาในพืชได้หลายกลุ่ม (Taberlet *et al.*, 1991; Shaw *et al.*, 2005)

ตารางที่ 3 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของชั้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* และ *psbA* ในกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน 24 ชนิด ที่ให้ความแตกต่างระหว่างชนิดของเอื้องเทียน

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
พิวรีนทรานซิชัน	33, 35, 43, 48, 50, 278, 295, 306, 310, 386, 389, 414-415, 440, 442, 470, 477, 479, 484, 531, 554, 562, 624, 625, 793, 795, 833 และ 871
ไพริมิดีนทรานซิชัน	41, 52, 54, 220, 235, 249, 251, 260, 264, 290, 314, 328, 330, 337, 371, 425, 429, 447, 458, 493, 495, 498, 539, 635, 715 และ 812
ทรานสเวอร์ชัน	32, 37, 42, 46, 47, 53, 151, 197, 204, 217, 223, 227, 231, 233, 231, 239, 255, 259, 266, 270, 272, 282, 288, 293, 313, 317, 320, 322, 325, 336, 340, 343, 348, 352, 356, 360, 365, 367, 370, 373, 376, 380, 384, 395, 399, 403, 407, 409, 412, 420, 422, 431, 435, 437, 448, 450, 454, 460, 462-464, 467, 473, 475, 492, 532, 547, 555, 558, 578, 607, 619, 623, 713, 717, 719, 721, 723, 727, 730, 756, 772, 786 และ 802
อินเดล	31-46, 51, 55-100, 101-103, 106-130, 212, 504-528, 543, 579-587, 598-599, 612, 636-712, 739-754, 815 และ 862-870

3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชั้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชั้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* แล้วสร้างแผนภูมิความ



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tmH* กับ *psbA*

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ neighbor joining พบว่าสามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้ตรงกับลักษณะฐานตามหมู่ คือ (1) หมู่ Speciosae ได้แก่ เอื้องผาหมอก และเอื้องผาหมอกเขียว (2) หมู่ Tomentosae ได้แก่ เอื้องสายเสริต สายเสริตอินโด เอื้องสายเสริตชมพู และเอื้องเทียนพังงา (3) หมู่ verrucosae ได้แก่ เอื้องเทียนอินโด และเอื้องเทียนบอร์เนียว และ (4) หมู่ ocellatae ได้แก่ เอื้องเทียนขาว (รูปที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจำแนกพบว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* วิเคราะห์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tmH* กับ *psbA* มีประสิทธิภาพในการจำแนกสูงกว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงบริเวณเดียว โดยสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้ 22 ชนิด โดยพบว่ามีประสิทธิภาพในการ

จำแนก 92 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยังไม่สามารถแยกเอื้องเทียนลำเขียวและเอื้องลำเทียนปากดำออกจากกัน อย่างไรก็ตาม สามารถเอื้องเทียนทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวออกจากกันได้ด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ร่วมกับยีน *rbcL* (นฤมล, 2559) สอดคล้องกับรายงานการวิจัยที่ผ่านมา ซึ่งรายงานว่า การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงบริเวณเดียวอาจให้ประสิทธิภาพในการจำแนกต่ำ จึงมีการเสนอให้ใช้ร่วมกันอย่างน้อย 2 บริเวณ ขึ้นไป

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงประสิทธิภาพของการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้เช่นเดียวกับการศึกษาในพืชชนิดอื่น ๆ ได้แก่ มะม่วง (ปิยะดา และคณะ, 2558) ข้าวมีสี (นฤมล และคณะ, 2557) กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่มะเขี (จินต์ และคณะ, 2558) เป็นต้น

4. สรุป

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และยีน *tmH* กับ *psbA* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* จำแนกเอื้องเทียนได้เพียง 7 ชนิด และจัดกลุ่มได้ตรงตามหมู่ของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้เพียง 1 หมู่ คือ Tomentosae ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tmH* กับ *psbA* จำแนกเอื้องเทียนได้ 15 ชนิด และจัดกลุ่มได้ตรงตามหมู่ของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้ 5 หมู่ คือ Tomentosae, Verrucosae, Flaccidae, Speciosae และ Ocellatae เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *tmH* กับ *psbA* พบว่าจำแนกเอื้องเทียนได้ 22 ชนิด และจัดกลุ่มได้ตรงตามหมู่ของเอื้องเทียนได้ 4 หมู่ คือ หมู่

Speciosae, Tomentosae, Verrucosae และ Ocellatae ซึ่งพบว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างน้อย 2 บริเวณ ขึ้นไปนั้น มีประสิทธิภาพในการจำแนกมากกว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงบริเวณเดียว โดยผลการวิจัยที่ได้นี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนเพื่ออนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ใหม่ ๆ ต่อไป

5. รายการอ้างอิง

- เกียรติชัย แซ่ไต่, นฤมล ธนาคันต์ และธีระชัย ธนาคันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สังคโลกดอกตาหมูสังคโลกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 523-530.
- จาดุรงค์ สัมฤทธิ์, เปรมณัช ขุนปักษ์, ธีระชัย ธนาคันต์ และนฤมล ธนาคันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกผักกาดด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 3: 23-28.
- จินต์ ทองสม, นฤมล ธนาคันต์ และธีระชัย ธนาคันต์, 2558, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมูเข้มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และซินดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 994-1005.
- จิตติพร ไท้มโสภา, ธีระชัย ธนาคันต์, บุญหงษ์ จงคิด และนฤมล ธนาคันต์, 2557, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 3: 36-44.
- นฤมล ธนาคันต์, จาดุรงค์ สัมฤทธิ์ และธีระชัย ธนาคันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *rpoC1*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 674-682.
- นฤมล ธนาคันต์, ภัทรา หงษ์ทองดี และธีระชัย ธนาคันต์, 2559, การจำแนกชนิดและการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 5: 88-97.
- นฤมล ธนาคันต์, ภัทรา หงษ์ทองดี และธีระชัย ธนาคันต์, 2559, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และยีน *rbcL*, Thai J. Sci. Technol. 5: 169-180.
- ปิยดา บุสดี, นฤมล ธนาคันต์ และธีระชัย ธนาคันต์, 2559, การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *rbcL*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 983-993.
- อรรณพ ชัยกำพลเลิศ, 2558, สถานการณ์กล้วยไม้โลก, สำนักพัฒนาการค้าและธุรกิจการเกษตรและอุตสาหกรรม, กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ, กรุงเทพฯ.
- 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, A DNA barcode for land plants, 2003, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 16: 12794-12799.
- Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., van den Berg, C., Madriñan, S., Petersen, G., Seberg, O., Jørgensen, 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.
- Downie, S.R., Esmeralda, L. and Katz-Downie, D.S., 1996, Multiple independent losses of the *rpoC1* intron in angiosperm chloroplast DNA's, *Syst. Bot.* 21: 135-151.
- 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.
- Kress, W.J. and Erickson, D.L., 2008, DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 105: 2761-2762.
- Liston, A., 1992, Variation in the chloroplast genes *rpoC1* and *rpoC2* of the genus *Astragalus* (Fabaceae): Evidence from restriction site mapping of a PCR-amplified fragment, *Am. J. Bot.* 79: 953-961.
- Newmaster, S.G., Ibabaei, M.H. and Husband, B.C., 2008, Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers, *Mol. Ecol. Res.* 1: 130-139.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E. and Small, R.L., 2005, The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis, *Am. J. Bot.* 92: 142-166.
- Shneyer, V.S., 2009, DNA barcoding is a new approach in comparative genomics of plants, *Rus. J. Genet.* 45: 1267-1278.
- Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentini, A., Vermet, T., Corthier, G., Brochmann, C. and Willerslev, E., 2007, Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding, *Nucl. Acids Res.* 35(3): e14.