

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์ของ
กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ในโครเฮอร์ชูเอ และลูกผสม
ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ
ซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

Assessment of Genetic Relationship and Identification of
Dendrobium Section *Nigrohirsutae* and their Hybrids
Base on Nucleotide Sequences of *rpoC1* Gene
and *trnH-psbA* Intergenic Spacer Region

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

จุฑาทิพย์ พันธุ์รูปท้าว 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

Jutatip Phanroopthaw and Theerachai Thanananta*

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

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

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลหวายเป็นกล้วยไม้ที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นสินค้าส่งออกของประเทศไทย ดังนั้นจึงมีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ใหม่ ๆ เพื่อตอบสนองต่อความต้องการผู้บริโภค ปัจจุบันจึงพบกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมจำนวนมาก และมีการละทิ้งกล้วยไม้พันธุ์พื้นเมืองดั้งเดิมหรือพันธุ์แท้ ดังนั้นการจำแนกพันธุ์และการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต โดยการวิจัยครั้งนี้ได้จำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ในโครเฮอร์ชูเอ และลูกผสม จำนวน 21 พันธุ์ ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน

tmH กับ *psbA* พบว่าสามารถจำแนกได้ 18 พันธุ์ ดังนั้นจึงควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นร่วมด้วย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการจำแนกมากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ : สกุหลาว; หมูไนโกรเฮอริชูเร; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; ยีน *rpoC1*; ชันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง ยีน *tmH* กับ *psbA*

Abstract

Dendrobium is an important orchid, since it becomes the export goods of Thailand. The breeding development for customers' demand will generate new varieties. Currently, these orchids have many hybrids *Dendrobium* and lead to abandonment of the native *Dendrobium*. The identification and assessment of genetic relationship are able to conserve and improve orchid's breeding by biomolecules. The research for identification and assessment of genetic relationship among section *Nigrohirsutae* of *Dendrobium* and their hybrids (21 cultivars) use nucleotide sequences of *rpoC1* and *tmH-psbA*, which can identify the 18 cultivars. Therefore, it is suggested that the regions other indicated the greater effectiveness for identification.

Keywords: *Dendrobium*; *Nigrohirsutae*; genetic relationship; *rpoC1* gene; *tmH-psbA* intergenic spacer

1. คำนำ

กล้วยไม้สกุลเด็นโดรเบียม (*Dendrobium*) หรือสกุหลาวเป็นกล้วยไม้ที่มีแหล่งกำเนิดอยู่ในเขตร้อนของทวีปเอเชีย เช่น ไทย พม่า ลาว กัมพูชา มาเลเซีย โดยประเทศไทยเป็นศูนย์กลางที่พบความหลากหลายทางชีวภาพของกล้วยไม้สกุลสกุหลาว ซึ่งมีจำนวนมากกว่า 150 พันธุ์ (อบจันทร์, 2542) สามารถพบกล้วยไม้สกุลสกุหลาวตามธรรมชาติทั้งในป่าผลัดใบและป่าไม่ผลัดใบทั่วทุกภาค ส่วนใหญ่จะพบบริเวณภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยมีลักษณะอิงอาศัยอยู่กับต้นไม้ใหญ่ ลำต้นเจริญทางด้านข้าง ลำลูกกล้วยมีหลายขนาดและมีหลายลักษณะ ตั้งแต่ทรงกลมจนถึงทรงกระบอกเรียวยาว มีหลายข้อปล้อง โดยใบจะแตกออกที่ข้อตั้งแต่โคนจนถึงมาก เรียงสลับกัน ใบมีหลายรูปร่างตามแต่ละชนิด/พันธุ์ ส่วนใหญ่ใบเป็นรูปหอกหรือรูปรีแกมรูปไข่ ส่วนใบอ่อนจะพับตามแนวยาวและใบจะมีอายุเพียงฤดูเดียว ออกดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อดอกตาม

ข้อ มักออกดอกเวลาที่จะทิ้งใบ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีขนาดและรูปร่างที่ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้กลีบปากมักมีสีสันที่สวยงาม (สลิล, 2549) เป็นกล้วยไม้ที่มีกลิ่นหอมและมีอายุในการปักแจกันนาน ดังนั้นจึงมีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ คือ ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อผสมพันธุ์ให้เกิดลูกผสมต่าง ๆ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ตำแหน่งจำเพาะ (specific site) ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) สำหรับการจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งให้ความถูกต้องและแม่นยำสูง เพราะเป็นการถ่ายทอดสารพันธุกรรมภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์สืบพันธุ์ฝ่ายแม่ ก่อนที่จะเกิดการผสมกับเซลล์สืบพันธุ์ฝ่ายพ่อ ซึ่งเป็นลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยหน่วยพันธุกรรมที่อยู่นอกโครโมโซม จึงมีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ (กิตติพัฒน์, 2549) และมีบริเวณที่เป็นลำดับอนุรักษ์ (conserved

sequence) ดังนั้นจึงสามารถประยุกต์ใช้บริเวณนี้เป็นที่จับของไพรเมอร์สากล (universal primer) โดยบริเวณที่มีการเสนอให้เป็นตำแหน่งดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับการระบุพืช ได้แก่ ยีน *rbcl*, *matK*, *rpoB*, *rpoC1* รวมทั้งซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH-psbA*, *atpF-atpH* และ *psbK-psbI* (CBOL Plant Working Group, 2009)

ยีน *rpoC1* เป็นยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) (Downie et al., 1996) ส่วนซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* (*trnH-psbA*) เป็นบริเวณที่เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง โดยยีน *trnH* เป็นยีนกำหนดการสร้างอาร์เอ็นเอขนส่ง (tRNA) ชนิด His (GUG) ซึ่งจะจับกับกรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine) ยีน *psbA* เป็นยีนกำหนดการสร้างโปรตีน D1 เพื่อจับกับโปรตีน D2 ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) ด้วยรงควัตถุระบบแสงที่ 2 (photosystem II) (Xiaohui et al., 2012)

ด้วยความต้องการของผู้บริโภคที่มีสูงมากขึ้นเป็นลำดับ ปัจจุบันจึงพบกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมที่เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์มีจำนวนเพิ่มขึ้นมากทุกปี ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องอนุรักษ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์พื้นเมืองดั้งเดิมหรือพันธุ์แท้ และนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต การวิจัยครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ในโครเซอร์ซูเร และลูกผสมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างกล้วยไม้

เก็บรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้จำนวน 21 พันธุ์ แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ

2.1.1 กล้วยไม้พันธุ์แท้ (native species)

ซึ่งเป็นกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่เด็นโตรเบียม ได้แก่ เอื้องสีตาล (*Dendrobium heterocarpum* Lindl.)

2.1.2 กล้วยไม้พันธุ์แท้ ได้แก่ (1) เอื้อง

ปากนกแก้ว (*Dendrobium cruentum* Rchb.f.) (2) เอื้องเงินหลวง (*Dendrobium formosum* Roxb. Ex Lidl.) (3) เอื้องแซะหอม (*Dendrobium scabrilique* Lindl.) (4) เอื้องเงิน (*Dendrobium draconis* Rchb.f.) (5) เอื้องทอง (*Dendrobium ellipsophyllum* Tang & Wang) (6) เอื้องตาเหิน (*Dendrobium infundibulum* Lindl.) (7) เอื้องนางชี (*Dendrobium kontumense* Gagnep.) (8) เอื้องแซะภูกระตัง (*Dendrobium christyanum* Rchb. f.) (9) เอื้องเงินแสด (*Dendrobium williamsonii* Day & Rchb. f.) (10) เอื้องตาเหินเวียตนาม (*Dendrobium longicornu* Lindl.) (11) เอื้องเงินแดง (*Dendrobium cariniferum* Rchb.f.) (12) เอื้องแซะหม่น (*Dendrobium bellatulum* Rolfe)

2.1.3 กล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์การค้า ได้แก่

(1) ดอนมารี (Dawn Maree = เอื้องปากนกแก้ว x เอื้องเงินหลวง) (2) รุ่งกมล เวศย์วรุณ (Roongkamol Vejvarut = ดอนมารี x เอื้องเงินหลวง) (3) กรีนแลนเทิร์น (Green Lanturn = ดอนมารี x เอื้องปากนกแก้ว) (4) ลูกผสมดอนมารี (Dawn Maree hybrid = ดอนมารี x เอื้องแซะหอม) (5) เอื้องแซะหอม x เอื้องทอง (6) เอื้องเงินหลวง x เอื้องทอง (Wunderbar's Formosae) (7) ฟรอสต์ดอนปากแดง [Frosty Dawn var. red labellum = ดอนมารี x ไลม์ฟรอส (เอื้องปากนกแก้ว x เอื้องแซะหอม)] ฟรอสต์ดอนปากเหลือง [Frosty Dawn. var. yellow labellum = ดอนมารี x ไลม์ฟรอส (เอื้องปากนกแก้ว x เอื้องแซะหอม)]

นำมาเพาะปลูกจนกระทั่งออกดอก 2 ครั้ง แล้วจำแนกพันธุ์ด้วยการตรวจสอบลักษณะสัณฐาน (morphology) โดย รองศาสตราจารย์ ดร.

ธีระชัย ธนานันต์

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่โนโกรเฮอร์ชูเร และลูกผสมทั้ง 21 พันธุ์ ด้วยวิธีประยุกต์ของ Doyle และ Doyle (1987) (จุฬาทิพย์ และคณะ, 2559) แล้วตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA*

เจือจางดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่โนโกรเฮอร์ชูเร และลูกผสมทั้ง 21 พันธุ์ ที่สกัดได้ ให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วเพิ่มปริมาณยีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) 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 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH-psbA* (ตารางที่ 1) ปริมาณ 500 นาโนโมลาร์ และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (RBC Bioscience, Taiwan) 1 ยูนิต (Unit)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมิ 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)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH-psbA*

ยีน	ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	อ้างอิง
<i>rpoC1</i>	forward	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	CBOL, 2009
	reverse	TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC	CBOL, 2009
<i>tmH-psbA</i>	forward	CGCGCATGGTGGATTCAATCC	Tate and Simpson, 2003
	reverse	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang <i>et al.</i> , 1997

2.4 การวิเคราะห์ผล

นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Solgent (ประเทศเกาหลีใต้) แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องของยีนเป้าหมายด้วยการเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) แล้ววิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>) และทดสอบโมเดลที่เหมาะสมก่อนการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 และเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ neighbor joining โดยวิเคราะห์ bootstrap 1,000 รอบ

แล้ววิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>) และทดสอบโมเดลที่เหมาะสมก่อนการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 และเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ neighbor joining โดยวิเคราะห์ bootstrap 1,000 รอบ

ตารางที่ 2 หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI

ชนิดกล้วยไม้	หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์	
	<i>rpoC1</i>	<i>tmH-psbA</i>
เอื้องปากนกแก้ว	KP762080	KP762140
เอื้องเงินหลวง	KP762081	KP762141
ดอนมारी	KP762134	KP762142
รุ่งกมล เวศย์วุฒม์	KP762082	KP762143
กรีนแลนด์เทิร์น	KP762083	KP762144
ลูกผสมดอนมारी	KP762135	KP762145
เอื้องแซะหอม	KP762084	KP762146
เอื้องแซะหอม x เอื้องทอง	KP762139	KP762147
เอื้องเงิน	KP762085	KP762148
เอื้องทอง	KP762086	KP762149
เอื้องเงินหลวง x เอื้องทอง	KP762136	KP762150
เอื้องตาเหิน	KP762087	KP762151
เอื้องนางชี	KP762088	KP762152
เอื้องแซะภูกระดึง	KP762089	KP762153
ฟรอสต์ดอนปากแดง	KP762137	KP762154
ฟรอสต์ดอนปากเหลือง	KP762138	KP762155
เอื้องเงินแสง	KP762090	KP762156
เอื้องสีตาล	KP762091	KP762157
เอื้องตาเหินเวียดนาม	KP762092	KP762158
เอื้องเงินแดง	KP762093	KP762159
เอื้องแซะหม่น	KU647191	KU647192

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ ซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ด้วย ปฏิกริยาอุกโชฟอลิเมอเรส พบว่ามีขนาดประมาณ

500 และ 900 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งเป็นขนาดที่ คาดคะเนไว้

เมื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* และเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่าทั้ง 2 ยีน มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้ สกุล *Dendrobium* ประมาณ 97-99 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นได้ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI และมีหมายเลข เฉพาะ (accession number) ดังตารางที่ 2

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *rpoC1* พบว่าซันดีเอ็นเอมีขนาด 545 นิวคลีโอไทด์ มีตำแหน่งที่เกิดการกลาย 24 ตำแหน่ง (คิดเป็น 4.32 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 3) และมี 11 ตำแหน่ง ที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน แต่มีเพียง 8 ตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนข้ามกลุ่ม (ตารางที่ 4) เมื่อคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความ แตกต่าง (distance coefficient) พบว่ามีค่า 0.000 ถึง 0.032 และเมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมพบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้ตัวอย่างได้ เพียง 6 พันธุ์ (คิดเป็น 28.4 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ รุ่งกมล เวศย์วุฒม์ กรีนแลนด์เทิร์น ลูกผสมดอนมारी เอื้องทอง เอื้องแซะภูกระดึง และเอื้องเงินแดง (รูปที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของซัน ดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* พบว่าซัน ดีเอ็นเอมีขนาด 905 นิวคลีโอไทด์ มีลำดับนิวคลีโอ- ไทด์ที่เกิดการกลาย 127 ตำแหน่ง (คิดเป็น 13.70 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 5) ซึ่งมี 5 ตำแหน่ง ที่ส่งผล ต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน แต่มีเพียง 4 ตำแหน่ง ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนข้ามกลุ่ม (ตารางที่ 6) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 887- 919 มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์และสามารถใช้ ระบุเอื้องเงินแสง แต่การแปลรหัส (translation) เป็น

ตารางที่ 3 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ในกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ชูเช และลูกผสม 21 พันธุ์ ที่พบการเปลี่ยนแปลง

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
อินเดล	52
พิวรีนทรานสิชัน	33, 45 และ 47
ไพริมิดีนทรานสิชัน	41, 267, 512 และ 513
ทรานสเวอร์ชัน	29, 30, 40, 42, 48, 51, 55, 291, 434, 510, 511, 515, 516, 518, 519 และ 523

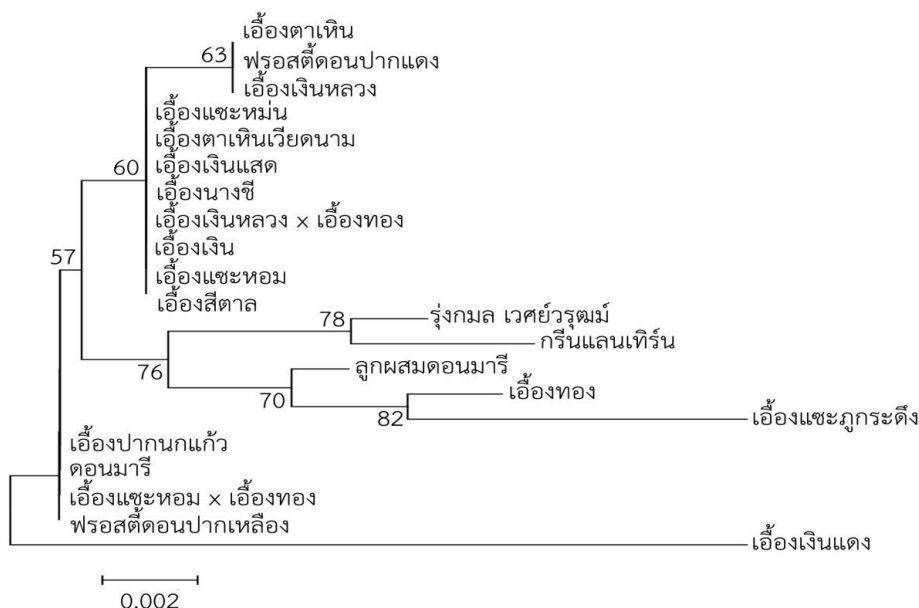
ตารางที่ 4 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ในกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ชูเช และลูกผสม 21 พันธุ์ ที่พบการกลายและส่งผลต่อลำดับกรดอะมิโนที่เปลี่ยนกลุ่ม

ตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์	พันธุ์กล้วยไม้*	การเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน
41	4, 6 และ 10	T เป็น C	Met เป็น Thr
48	4, 5 และ 14	T เป็น A	Asp เป็น Gly
55	10 และ 14	T เป็น G	His เป็น Glu
291	2, 12 และ 15	G เป็น T	Arg เป็น Ile
510	20	T เป็น A	Leu เป็น Typ
512	20	T เป็น C	Ser เป็น Leu
515	20	T เป็น G	Leu เป็น Glu
518	20	G เป็น T	Glu เป็น Ser

*1-21 คือ (1) เอื้องปากนกแก้ว (2) เอื้องเงินหลวง (3) ดอนมारी (4) รุ่งกมล เวศย์วิรุฬห์ (5) กรีนแลนเทิร์น (6) ลูกผสมดอนมारी (7) เอื้องแซะหอม (8) เอื้องแซะหอม x เอื้องทอง (9) เอื้องเงิน (10) เอื้องทอง (11) เอื้องเงินหลวง x เอื้องทอง (12) เอื้องตาเหิน (13) เอื้องนางชี (14) เอื้องแซะภูกระดึง (15) ฟรอสต์ดอนปากแดง (16) ฟรอสต์ดอนปากเหลือง (17) เอื้องเงินแสง (18) เอื้องสีตาล (19) เอื้องตาเหินเวียตนาม (20) เอื้องเงินแดง และ (21) เอื้องแซะหม่น

11 กรดอะมิโน ให้กรดอะมิโนชนิดเดิม 5 กรดอะมิโน และอีก 6 กรดอะมิโน มีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไรก็ตาม ยังเป็นกรดอะมิโนในกลุ่มเดียวกัน 4 กรดอะมิโน และเป็นกรดอะมิโนต่างกลุ่มเพียง 2 กรดอะมิโน และเมื่อคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง พบว่ามีค่า 0.000 ถึง 0.019 และเมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถ

จำแนกกล้วยไม้ตัวอย่างได้เพียง 11 พันธุ์ (คิดเป็น 52.3 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ ฟรอสต์ดอนปากแดง เอื้องเงินหลวง เอื้องทอง เอื้องเงินแสง เอื้องเงิน เอื้องแซะหอม เอื้องตาเหิน เอื้องนางชี เอื้องตาเหินเวียตนาม เอื้องแซะภูกระดึง และเอื้องสีตาล (รูปที่ 2)



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชูเร และลูกผสมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* เมื่อคำนวณจากโมเดล Jukes-Cantor และสร้างด้วยวิธี neighbor joining

ตารางที่ 5 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *tmH* กับ *psbA* ในกล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชูเร และลูกผสม 21 พันธุ์ ที่พบการเปลี่ยนแปลง

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
อินเดล	26-53, 492-495, 510-526, 541-549, 556-564, 646, 721-740, 827, 830-832, 875 และ 887
พวรีนทรานสิชัน	24, 229, 524, 634, 699, 768, 828, 883, 888 และ 899
ไพริมิดีนทรานสิชัน	79, 145, 512, 582, 676, 698, 718-719, 723, 737, 820, 858 และ 874
ทรานสเวอร์ชัน	90, 409, 502, 506, 523, 716-717, 720, 722, 725-728, 739-741, 792, 794, 796, 824 และ 878

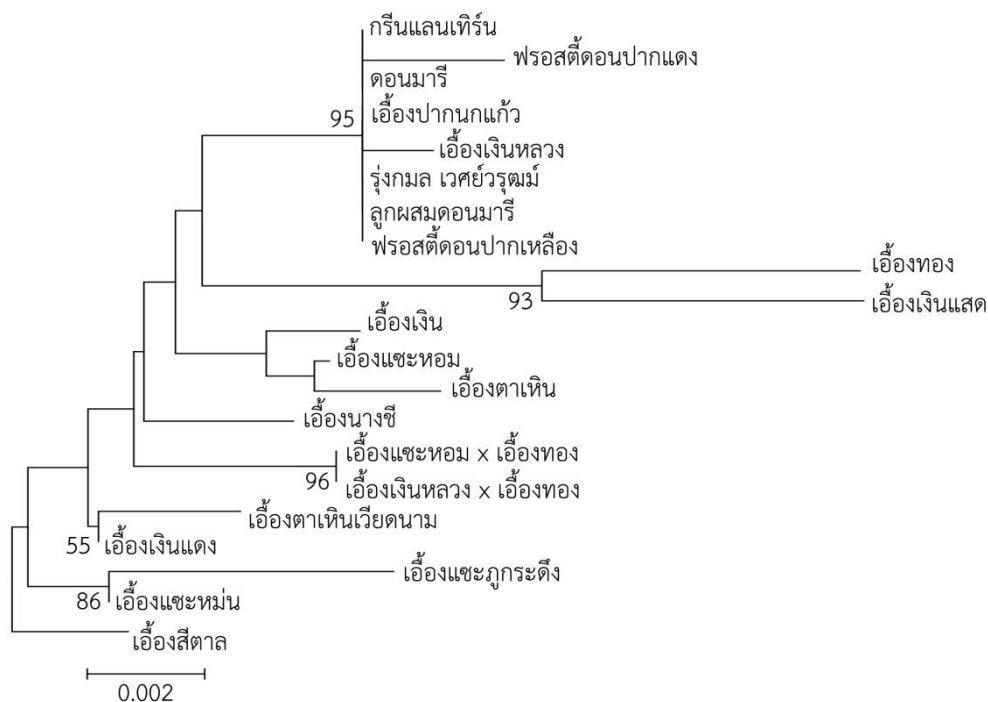
ผลการวิเคราะห์ดังกล่าวข้างต้น พบว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเพียงตำแหน่งเดียวนั้น ให้ประสิทธิภาพการจำแนกน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 2 ตำแหน่งมาวิเคราะห์ร่วมกัน แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้ได้เพิ่มขึ้นเป็น 18 พันธุ์ (คิดเป็น 85.71 เปอร์เซ็นต์)

ได้แก่ ลูกผสมดอนมารี รุ่งกมล เวศย์วรุฒม์ กรีนแลนเทิร์น เอื้องเงินหลวง ฟรอสต์ตอนปากแดง เอื้องทอง เอื้องเงินแสง เอื้องเงิน เอื้องแซะหอม เอื้องตาเหิน เอื้องตาเหินเวียดนาม เอื้องเงินแดง เอื้องนางชี เอื้องแซะหอม x เอื้องทอง เอื้องเงินหลวง x เอื้องทอง เอื้องแซะภูกระตัง เอื้องแซะหม่น เอื้องสีตาล (รูปที่ 3)

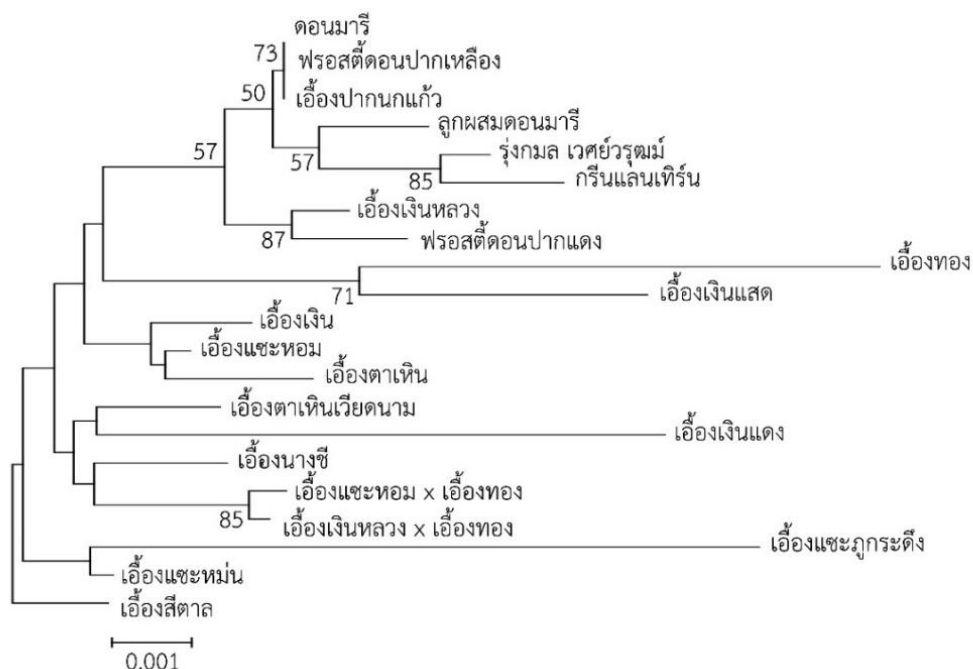
ตารางที่ 6 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของซีเอ็นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ในกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่โนโกรเซอร์ซูเซ และลูกผสม 21 พันธุ์ ที่พบการกลายและส่งผลต่อลำดับกรดอะมิโนที่เปลี่ยนกลุ่ม

ตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์	พันธุ์กล้วยไม้*	การเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน
858	10	C เป็น T	Gly เป็น Arg
878	14	A เป็น T	Phe เป็น Ser
887	17	อินเดล	เปลี่ยนแปลงจำนวน 11 กรดอะมิโน**
899	14	A เป็น G	Phe เป็น Ser

*1-21 คือ (1) เอื้องปากนกแก้ว (2) เอื้องเงินหลวง (3) ดอนมारी (4) รุ่งกมล เวศย์วรุณม (5) กรีนแลนเทิร์น (6) ลูกผสมดอนมारी (7) เอื้องแซะหอม (8) เอื้องแซะหอม x เอื้องทอง (9) เอื้องเงิน (10) เอื้องทอง (11) เอื้องเงินหลวง x เอื้องทอง (12) เอื้องตาเหิน (13) เอื้องนางชี (14) เอื้องแซะภูกระดัง (15) ฟรอสต์ตอนปากแดง (16) ฟรอสต์ตอนปากเหลือง (17) เอื้องเงินแสง (18) เอื้องสีตาล (19) เอื้องตาเหินเวียดนาม (20) เอื้องเงินแดง และ (21) เอื้องแซะหม่น; **จาก Leu-Ala-Ser-Val-Glu-Ala-Pro-Ser-Ile-Asn-Gly เป็น Gln-Ala-Ala-Trp-Ser-Ser-Ile-Tyr-Lys-Trp-Ile



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่โนโกรเซอร์ซูเซ และลูกผสมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ซีเอ็นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* เมื่อคำนวณจากโมเดล Tamura 3-parameter และสร้างด้วยวิธี neighbor joining



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ซุเช และลูกผสมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* วิเคราะห์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ขั้นต้นเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* เมื่อคำนวณจากโมเดล Tamura 3-parameter และสร้างด้วยวิธี neighbor joining

กล้วยไม้แต่ละพันธุ์ซึ่งพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลายอาจส่งผลต่อการเกิดวิวัฒนาการ (evolution process) (ธีระชัย, 2553) เนื่องจากกระบวนการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนเพื่อสร้างพอลิเพปไทด์ (polypeptide) โดยการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนข้ามกลุ่มจะส่งผลกระทบต่อการเข้าจับของโปรตีนและเกิดการแสดงออกในลักษณะฟีโนไทป์ (phenotype) ที่แตกต่างกันในกล้วยไม้แต่ละพันธุ์

เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ซุเช และลูกผสมทั้ง 21 พันธุ์ ที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะของยีน *rpoC1* และขั้นต้นเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* พบว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะในคลอ-

โรพลาสต์เพียง 1 ยีน สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ซุเช และลูกผสมได้เพียงบางพันธุ์ ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการจำแนกจึงควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะร่วมกันมากกว่า 1 ยีน โดยการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะร่วมกัน 2 ยีน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการจำแนกได้ ซึ่งสอดคล้องกับการพัฒนาเครื่องหมายรหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode) ของกล้วยไม้สกุลหวายในประเทศจีนที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะร่วมกัน 3-4 ยีน ซึ่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการจัดจำแนกได้มากยิ่งขึ้น (Songzhi et al., 2015)

อย่างไรก็ตาม การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะร่วมกันของยีน *rpoC1* และขั้น

ดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ร่วมกันแล้ว ก็ยังไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้ตัวอย่างได้ทั้งหมด จึงควรเพิ่มชุดข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์หรือเลือก ตำแหน่งจำเพาะอื่น (เช่น *matK*, *rbcl*, *rpoB*) มาร่วมกันวิเคราะห์เพิ่มขึ้น เช่น งานวิจัยก่อนหน้านี้ ที่วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชสกุลต่าง ๆ ที่ พบในประเทศไทย (จินต์ และคณะ, 2558; ปิยดา และคณะ, 2558; นฤมล และคณะ, 2559)

4. สรุป

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* พบว่าตำแหน่งการกลายของลำดับนิวคลีโอ- ไทด์ในแต่ละยีนแสดงความจำเพาะที่สามารถนำไป ประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการระบุ ชนิด/พันธุ์ สำหรับการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หนูในโกรเซอร์ชูเร และลูกผสม 21 พันธุ์ นอกจากนี้ การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 1 ตำแหน่ง สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หนูใน- โกรเซอร์ชูเร และลูกผสมได้น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ตำแหน่ง ร่วมกัน สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการ จำแนกได้มากถึง 85.71 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการวิจัย ครั้งนี้สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการ นำไปพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการจำแนก ชนิด/พันธุ์ กล้วยไม้สกุลหวาย หนูในโกรเซอร์ชูเร และลูกผสมได้ในอนาคต

5. รายการอ้างอิง

เกียรติชัย แซ่ไต่, นฤมล ธนानันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สังโตกลอกตาหนู สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน จำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 523-530.

กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ, 2549, พันธุศาสตร์, พิมพ์ครั้งที่ 1, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี.

จินต์ ทองสม, นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2558, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุ กรรมของกล้วยไม้สกุลหวายหนูเข็มโดยใช้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และซันดีเอ็น เอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*, ว.วิทยา ศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 994-1005.

จุฑาทิพย์ พันธุ์รูปท้าว, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2559, การศึกษาความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายหนูในโกร เซอร์ชูเรและลูกผสมด้วยแฮตอาร์เอฟพีดี, Thai J. Sci. Technol. 5: 77-87.

ธีระชัย ธนานันต์, 2553, พันธุศาสตร์โมเลกุล, พิมพ์ ครั้งที่ 1, บริษัท แดเน็กซ์ อินเทอร์เน็ตปอเรชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

ปิยดา บุสดี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทย จากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpoC* และ *rbcl*, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 983-993.

นฤมล ธนานันต์, ปิยดา บุสดี และธีระชัย ธนานันต์, 2559, การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* และซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ มะม่วงในประเทศไทย, ว.วิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี 24: 102-111.

สลิล สิทธิสังธรรม, 2549, กล้วยไม้ป่าเมืองไทย, สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.

อบฉันท ไททอง, 2542, กล้วยไม้เมืองไทย, สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.

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

Downie, S.R., Katz, D.S. and Cho, K.J., 1996,

- Phylogenetic analysis of *Apiaceae* subfamily Apiodeae using nucleotide sequences from the chloroplast *rpoC1* intron, Mol. Phylogent. Evol. 6: 1-18.
- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sang, T., Crawford, D.J. and Stuessy, T.F., 1997, Chloroplast DNA phylogeny reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae), Am. J. Bot. 84: 1120-1136.
- Songzhi, X., Dezhu, L., Jianwu, L., Xiaoguo, X., Weitao, J., Weichang, H., Xiaohua, J. and Luqi, H., 2015, Evaluation of the DNA barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from Mainland Asia, PLoS ONE 10: e0115168.
- Tate, J.A. and Simpson B.B., 2003, Paraphly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species, Syst. Bot. 28: 723-737.
- Xiaohui, P., Chang, L., Linchun, S., Rui, L., Dong, L., Huan, L., Stacey, S.C. and Shilin, C., 2012, Utility of the *trnH-psbA* intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: A meta-analysis, PLoS ONE. 7: e48833.