

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนก กล้วยไม้สกุลก้านก้อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

Genetic Relationship Assessment and Identification of Orchids in the Genus *Eria* Using Nucleotide Sequences of *rpoC1* Gene and *trnH-psbA* Intergenic Spacer Region

จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์ และธีระชัย ธนานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Jutamas Jiemjuejun 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

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลก้านก้อ 30 ชนิด ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* จำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก้อได้ 12 ชนิด ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* จำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก้อได้ 15 ชนิด อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองบริเวณร่วมกันสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก้อได้ดีขึ้น โดยผลการวิจัยครั้งนี้สนับสนุนแนวความคิดการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนหลายตำแหน่งร่วมกันสำหรับการจำแนกพืช

คำสำคัญ : สกุลก้านก้อ; กล้วยไม้; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การจำแนก; ยีน *rpoC1*; ซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

Abstract

The nucleotide sequences of *rpoC1* gene and *tmH-psbA* intergenic spacer region were used to assess the genetic relationship among 30 orchid species in the genus *Eria*. This research found that the nucleotide sequences of *rpoC1* gene could be applied to distinguish 12 species, while *tmH-psbA* intergenic spacer region could be used to differentiate 15 species. In addition, when combining both of the nucleotide sequences together, it showed higher potential to distinguish up to 30 orchid species in the genus *Eria*. These research results support the idea of exploiting multilocus barcodes for plant identification.

Keywords: *Eria*; orchid; genetic relationship; identification; *rpoC1* gene; *tmH-psbA* intergenic spacer region

1. คำนำ

กล้วยไม้สกุลก้านก่อ (*Eria*) มีลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์และต่างจากกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ คือ มีขนอ่อนนุ่มที่บริเวณกลีบเลี้ยง ซึ่งพบเฉพาะกล้วยไม้สกุลนี้ (สลิล, 2549) ลักษณะโดยทั่วไปของกล้วยไม้สกุลก้านก่อเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย เจริญทางด้านข้าง ลำลูกกล้วยมีขนาดเล็กจนถึงมีขนาดใหญ่ มีหลายข้อปล้องและมีหลายรูปทรง บางชนิดกลม บางชนิดแบน และบางชนิดดรูปลงจนปรากฏรูปทรงไม่เด่นชัด (วิชา, 2543) ใบมีหลายรูปทรง ออกที่ข้อหรือใกล้ยอด ช่อดอกเป็นช่อกระจุก มีตั้งแต่ช่อเดียวจนถึงหลายช่อ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกแยกออกเป็นอิสระ กลีบปากอยู่ทางด้านล่าง ไม่มีเดือย เส้าเกสรสั้นหรือยาว มีคางยื่นยาว มีฝาคีบ กลีบเรณูมี 8 กลุ่ม ไม่มีก้านและแบ้นก้านกลุ่มเรณู (อาภรณ์ และคณะ, 2552) กล้วยไม้สกุลก้านก่อพบมากในเขตอบอุ่นและเขตร้อนของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยประเทศไทยพบแล้ว 63 ชนิด (สลิล, 2549) ปัจจุบันนี้กล้วยไม้สกุลก้านก่อกำลังเป็นที่ต้องการของตลาดเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากลักษณะดอกมีความเป็นเอกลักษณ์และต่างจากกล้วยไม้สกุลอื่น ๆ อีกทั้งมีจำนวนค่อนข้างน้อยในธรรมชาติ และยังจัดเป็นกล้วยไม้ป่าหายาก ทำให้ต้องศึกษาใน

ระดับโมเลกุลเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดจำแนกพันธุ์ เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์ต่อไป

Hebert และคณะ (2003) ได้เสนอแนวคิดเกี่ยวกับการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) หรือที่เรียกว่าดีเอ็นเอบาร์โคด (DNA barcode) ซึ่งใช้เรียกดีเอ็นเอบริเวณหนึ่งในจีโนมที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด สามารถใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดออกจากกัน โดยนักวิจัยกลุ่มนี้ใช้ดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) บริเวณยีน *Cytochrome c oxidase subunit 1* (*Cox1* หรือ *COI*) ในการจำแนกชนิดสัตว์ พบว่าสามารถจำแนกชนิดสัตว์หลายกลุ่มอย่างมีประสิทธิภาพ ต่อมา มีโครงการจัดทำฐานข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โคดของสิ่งมีชีวิตหรือ The Barcode of Life Project ซึ่งเริ่มต้นในปี ค.ศ. 2003 (Hebert *et al.*, 2003) และได้รับการสนับสนุนอย่างต่อเนื่องจากหน่วยงานที่เกิดขึ้นจากความร่วมมือของนานาชาติ ได้แก่ Consortium for the Barcode of Life (CBOL) ปัจจุบันประกอบด้วยสมาชิก 43 ประเทศ (http://www.barcoding.si.Edu/CBOL/Members_details.htm) และพบว่า

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ใช้จำแนกชนิดสัตว์ได้ดี แต่ยีน *COI* ในพืชมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการต่ำ ทำให้มีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เพียงพอที่จะใช้ในการจำแนกชนิดพืชได้ นักวิจัยจึงหันมาสนใจลำดับนิวคลีโอไทด์ในพลาสติดจีโนม (plastid genome) โดยบริเวณที่เหมาะสมสำหรับการใช้จำแนกพืชควรมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรต่างชนิด (interspecific variation) สูงกว่าความผันแปรภายในชนิดเดียวกัน (intraspecific variation) ซึ่งได้เสนอลำดับนิวคลีโอไทด์ 7 บริเวณที่เหมาะสมสำหรับการจำแนกชนิดพืช ได้แก่ ยีน *matK*, *rbcL*, *rpoB*, *rpoC1*, *psbK-psbI* spacer, *atpF-atpH* spacer และ *trnH-psbA* spacer ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้พิจารณาความเหมาะสม คือ วิธีการได้มาซึ่งลำดับดีเอ็นเอ คุณภาพของข้อมูล และความสามารถในการจำแนกชนิด (CBOL Plant Working Group, 2009)

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ 2 บริเวณ เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลก้านก่อ ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ซึ่งเป็นยีนกำหนดการสร้างพอลิเปปไทด์ (polypeptide) ที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) ในคลอโรพลาสต์ และอินทรอนที่อยู่ภายในยีน *rpoC1* เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบได้ในพืชดอกที่มีบรรพบุรุษร่วมกัน มีประสิทธิภาพในการจำแนกพืชบางชนิดและสามารถใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืช (Liston, 1992; Downie *et al.*, 1996) และอีกบริเวณ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ขนาดประมาณ 450-900 คู่เบส (base pairs) โดยยีน *trnH* เป็นยีนกำหนดการสร้าง tRNA^{His} ส่วนยีน *psbA* เป็นยีนกำหนดการสร้างโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ photosystem II ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Kress *et al.*, 2005) โดยชั้น

ดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างสูงและเพียงพอที่จะใช้จำแนกพืชได้ (Kress *et al.*, 2005; Kress and Erickson, 2007) นอกจากนี้ซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ยังมีส่วนปลายทั้ง 2 ด้านที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอนุรักษ์สูง (highly conserved sequence) จึงสามารถพัฒนาไพรเมอร์สากล (universal primer) เพื่อใช้ศึกษาในพืชหลายกลุ่ม (Taberlet *et al.*, 1991; Shaw *et al.*, 2005)

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลก้านก่อ

กล้วยไม้สกุลก้านก่อ 30 ชนิด ที่ใช้ในการวิจัยนี้ แสดงดังตารางที่ 1

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลก้านก่อ 30 ชนิด ด้วยวิธีประยุกต์จากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธีของ นฤมล และคณะ (2555) จากนั้นตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณอัตราส่วนระหว่างการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (Sambrook *et al.*, 1989)

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

นำดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลก้านก่อ 30 ชนิด ที่สกัดได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นเทมเพลตดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) จากนั้นเพิ่มปริมาณซันติเอ็นเอตำแหน่งจำเพาะคือซันติเอ็นเอของยีน *rpoC1* และซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ดีเอ็นเอ 100 นาโน

ตารางที่ 1 กล้วยไม้สกุลก้านก้อที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ จำนวน 30 ชนิด

ลำดับ	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์
1	เอื้องดาวเรียง	<i>Eria javanica</i> (SW.) Blume
2	เอื้องน้มดอกเหลือง	<i>Eria bractescens</i> Lindl.
3	เอื้องคำหิน	<i>Eria lasiopetala</i> (Willd.) Ormerod
4	เอื้องเต่าทอง	<i>Eria ornata</i> (Blume) Lindl.
5	เอื้องช่องวงช้าง	<i>Eria densa</i> Ridl.
6	เอื้องหนวดปลาหมึก	<i>Eria sarcophylla</i> Schltr.
7	เอื้องน้มดอกน้อย	<i>Eria eriopsidobulbon</i> C.S.P. Parish & Rchb.f.
8	เอื้องอินจัน	<i>Eria biflora</i> (Griff.) Lindl.
9	เอื้องน้มภูหลวง	<i>Eria coronaria</i> (Lindl.) Rchb.f
10	เอื้องนิมมานรดี	<i>Eria amica</i> Rchb.f.
11	เอื้องทำทานใต้	<i>Eria iridifolia</i> Hook.f.
12	เอื้องน้มดอยสุเทพ	<i>Eria sutepensis</i> Rolfe ex Downie
13	เอื้องน้มปากแดง	<i>Eria atrovinosa</i> Carr
14	เอื้องศรีประภา	<i>Eria cristata</i> Rolfe
15	เอื้องน้มมาเลย์	<i>Eria xanthocheila</i> Ridl.
16	โรบัสตา	<i>Eria robusta</i> (Blume) Lindl.
17	เอื้องช่อเงินยวง	<i>Eria globulifera</i> Seidenf.
18	เอื้องดอกไม้เงิน	<i>Eria paniculata</i> Lindl.
19	เอื้องประคำร้อย	<i>Eria pellipes</i> Rchb.f. ex Hook.f.
20	เอื้องกระเพาะปลา	<i>Eria acervata</i> Lindl.
21	เอื้องแจก้นเงิน	<i>Eria obesa</i> Lindl.
22	เอื้องแปรงสีฟันพระอินทร์	<i>Eria siamensis</i> Schltr.
23	เอื้องสายฝน	<i>Eria mucronata</i> Lindl.
24	เอื้องตาลหิน	<i>Eria discolor</i> Lindl.
25	เอื้องน้มภู	<i>Eria marginata</i> Rolfe
26	เอื้องน้มปากตัด	<i>Eria truncata</i> Lindl.
27	ยูนิฟอเลีย	<i>Eria unifolia</i> J.J.Sm.
28	โกลปีเฟรา	<i>Eria globifera</i> Rolfe
29	เอื้องน้วนาง	<i>Eria pannea</i> Lindl.
30	เนกลีคตา	<i>Eria neglecta</i> Ridl.

กรัม ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.1), 0.1 % Triton™ X-100 และ 2.5 mM MgCl₂) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์จำเพาะ 250 นาโนโมลาร์ (nM) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่

อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* (ตารางที่ 2) ปริมาณ 500 นาโนโมลาร์ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis technologies Sdn Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (Unit) และน้ำ รวมปริมาตรสุทธิ 40 ไมโครลิตร (นฤมล และคณะ, 2555)

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งจำเพาะของยีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA*

ตำแหน่งจำเพาะ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	อ้างอิง
<i>rpoC1</i>	<i>rpoC1_f</i>	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	CBOL, 2009
	<i>rpoC1_r</i>	TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC	CBOL, 2009
<i>tmH-psbA</i>	<i>psbA3_F</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Shaw <i>et al.</i> , 2005
	<i>tmHf_05</i>	CGCGCATGGTGGATTCAATCC	Shaw <i>et al.</i> , 2005

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 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ก่อนนำไปตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) แล้วตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet, UV) โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสกับแถบดีเอ็นเอที่ทราบขนาดต่าง ๆ (DNA ladder) จากนั้นนำผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสนั้นส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Bioneer (ประเทศเกาหลีใต้) (นฤมล และคณะ, 2555)

2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

ตำแหน่งจำเพาะ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ของกล้วยไม้สกุลก้านก้อที่ได้บริษัท Bioneer ไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLAST ในเว็บไซต์ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) แล้ววิเคราะห์ความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบแบบหลายตัวอย่าง (multiple alignment) ด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw>) (Tamura *et al.*, 2013) ซึ่งเป็นการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของกล้วยไม้สกุลก้านก้อแต่ละชนิด จากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 (MEGA7) (Kumar *et al.*, 2016) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและเลือกวิธีการจัดกลุ่ม

4 แบบ ได้แก่ maximum likelihood, maximum parsimony, neighbor joining และ unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) แล้วเลือกวิธีการจัดกลุ่มที่ให้ผลการจำแนกที่สอดคล้องกับลักษณะพื้นฐานของกล้วยไม้สกุล ก้านก้อมมากที่สุด

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพิ่มปริมาณซีดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และซีดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

การเพิ่มปริมาณซีดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และซีดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ในกล้วยไม้สกุลก้านก้อมทั้ง 30 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้ง 30 ชนิด ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและมีความถูกต้องตามที่ต้องการ โดยซีดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* มีขนาดประมาณ 663 คู่เบส และซีดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* มีขนาดประมาณ 591-913 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งทั้งสองในกล้วยไม้สกุลก้านก้อมแต่ละชนิดไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่าเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ในพืช โดยมีค่า identity ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของซีดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ในพืช โดยมีค่า identity ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าซีดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นั้นถูกต้อง โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองบริเวณในกล้วยไม้สกุลก้านก้อมทั้ง 30 ชนิด ได้ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI และมีหมายเลขจำเพาะ (accession number) ดังตารางที่ 3

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซีดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ในกล้วยไม้สกุลก้านก้อมทั้ง 30 ชนิด โดยใช้

โปรแกรม ClustalW พบความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ที่เกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลก้านก้อมแต่ละชนิด ซึ่งเกิดจากการกลายในระดับยีน (gene mutation) ทั้งหมด 4 รูปแบบ คือ อินเดล (indel, insertion/deletion) พิวรีนทรานสิชัน (purine transition) ไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) และทรานสเวอร์ชัน (transversion) ซึ่งการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์นี้อาจส่งผลต่อการเกิดวิวัฒนาการ (evolution process) (ธีระชัย, 2553)

3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซีดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

3.2.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ในกล้วยไม้สกุลก้านก้อมทั้ง 30 ชนิด ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 663 เบส (base) มีความแตกต่างกัน 61 ตำแหน่ง คิดเป็น 9.20 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วย MEGA7 พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.000-0.081 และเมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและเลือกการจัดกลุ่ม 4 แบบ พบว่าวิธีการจัดกลุ่มที่สอดคล้องกับลักษณะพื้นฐานของกล้วยไม้สกุลก้านก้อมมากที่สุด คือ maximum likelihood

เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ากล้วยไม้สกุลก้านก้อมที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ทั้ง 30 ชนิด มีจำนวน 12 ชนิด หรือคิดเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่น ได้แก่ เอื้องน้่มมาเลย์ เอื้องเต่าทอง เอื้องแจกันเงิน เอื้องช่อเงินยวง เอื้องน้่มภูหลวง เอื้องคำหิน เอื้องสายฝน เนกสิคตา โกลปีเฟรา เอื้องแปรงสีฟันพระอินทร์ เอื้องน้่มดอกน้อย และเอื้องดอกไม้เงิน และมีจำนวน 18 ชนิด หรือคิดเป็น 60

เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่นได้แก่ เอื้องน้มนู เอื้องดาวเรียง เอื้องน้มนปากแดง เอื้องน้มนานรดี เอื้องศรีประภา เอื้องน้มนดอกเหลือง เอื้องน้มนดอกสุเทพ เอื้องกระเพาะปลา ยูนิโฟเลีย

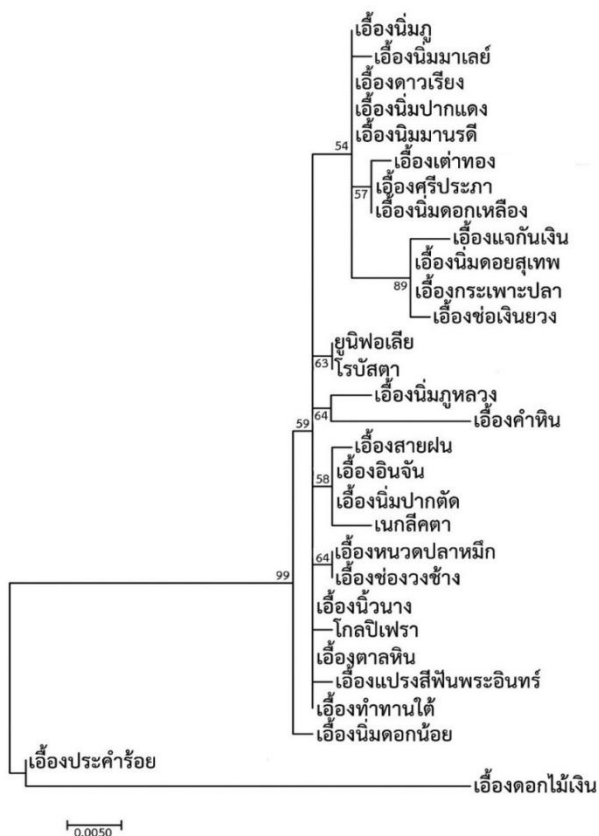
โรบัสตา เอื้องอินจัน เอื้องน้มนปากตัด เอื้องหนดปลาหมึก เอื้องช่องวงช้าง เอื้องน้มนาง เอื้องตาลหิน เอื้องทำทานใต้ และเอื้องประคำร้อย (รูปที่ 1)

ตารางที่ 3 หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์และขนาดของยีน *rpoC1* และยีนเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ในกล้วยไม้สกุลก้านก้อที่ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank

ลำดับ	ชื่อสามัญและชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์และขนาด (คู่เบส)	
		<i>rpoC1</i>	<i>tmH-psbA</i>
1	เอื้องดาวเรียง (<i>Eria javanica</i> (SW.) Blume)	KX7210134 (663)	KX840365 (879)
2	เอื้องน้มนดอกเหลือง (<i>Eria bractescens</i> Lindl.)	KX7210135 (663)	KX840366 (890)
3	เอื้องคำหิน (<i>Eria lasiopetala</i> (Willd.) Ormerod)	KX7210136 (663)	KX840367 (591)
4	เอื้องเต่าทอง (<i>Eria ornata</i> (Blume) Lindl.)	KX7210137 (663)	KX840368 (889)
5	เอื้องช่องวงช้าง (<i>Eria densa</i> Ridl.)	KX7210138 (663)	KX840369 (875)
6	เอื้องหนดปลาหมึก (<i>Eria sarcophylla</i> Schltr.)	KX7210139 (663)	KX840370 (891)
7	เอื้องน้มนดอกน้อย (<i>Eria eriopsidobulbon</i> C.S.P. Parish & Rchb.f.)	KX7210140 (663)	KX840371 (876)
8	เอื้องอินจัน (<i>Eria biflora</i> (Griff.) Lindl.)	KX7210141 (663)	KX840372 (901)
9	เอื้องน้มนกลวง (<i>Eria coronaria</i> (Lindl.) Rchb.f.)	KX7210142 (663)	KX840373 (875)
10	เอื้องน้มนานรดี (<i>Eria amica</i> Rchb.f.)	KX7210143 (663)	KX840374 (881)
11	เอื้องทำทานใต้ (<i>Eria iridifolia</i> Hook.f.)	KX7210144 (663)	KX840375 (876)
12	เอื้องน้มนดอกสุเทพ (<i>Eria sutepensis</i> Rolfe ex Downie)	KX7210145 (663)	KX840376 (896)
13	เอื้องน้มนปากแดง (<i>Eria atrovinosa</i> Carr)	KX7210146 (663)	KX840377 (879)
14	เอื้องศรีประภา (<i>Eria cristata</i> Rolfe)	KX7210147 (663)	KX840378 (913)
15	เอื้องน้มนมาเลย์ (<i>Eria xanthocheila</i> Ridl.)	KX7210148 (663)	KY069284 (886)
16	โรบัสตา (<i>Eria robusta</i> (Blume) Lindl.)	KX7210149 (663)	KX840379 (874)
17	เอื้องช่อเงินยวง (<i>Eria globulifera</i> Seidenf.)	KX7210150 (663)	KY069285 (893)
18	เอื้องดอกไม้เงิน (<i>Eria paniculata</i> Lindl.)	KX7210151 (663)	KY069286 (817)
19	เอื้องประคำร้อย (<i>Eria pellipes</i> Rchb.f. ex Hook.f.)	KX7210152 (663)	KX840380 (719)
20	เอื้องกระเพาะปลา (<i>Eria acervata</i> Lindl.)	KX7210153 (663)	KX840381 (888)
21	เอื้องแจก้นเงิน (<i>Eria obesa</i> Lindl.)	KX7210154 (663)	KX840382 (879)
22	เอื้องแปรงสีฟันพระอินทร์ (<i>Eria siamensis</i> Schltr.)	KX7210155 (663)	KX840383 (874)
23	เอื้องสายฝน (<i>Eria mucronata</i> Lindl.)	KX7210156 (663)	KX840384 (899)
24	เอื้องตาลหิน (<i>Eria discolor</i> Lindl.)	KX7210157 (663)	KX840385 (890)
25	เอื้องน้มนู (<i>Eria marginata</i> Rolfe)	KX7210158 (663)	KY069287 (853)
26	เอื้องน้มนปากตัด (<i>Eria truncata</i> Lindl.)	KX7210159 (663)	KX840386 (898)
27	ยูนิโฟเลีย (<i>Eria unifolia</i> J.J.Sm.)	KX7210160 (663)	KX840387 (877)
28	โกลปีเฟรา (<i>Eria globifera</i> Rolfe)	KX7210161 (663)	KY069288 (859)
29	เอื้องน้มนาง (<i>Eria pannea</i> Lindl.)	KX7210162 (663)	KY069289 (836)
30	เนกลีคตา (<i>Eria neglecta</i> Ridl.)	KX7210163 (663)	KX840388 (882)

ตารางที่ 4 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ที่มีความหลากหลาย (polymorphism)

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
พิวรีนทรานสิชัน (purine transition)	31, 45, 69, 99, 120, 144, 160, 174, 244, 254, 262, 318, 336, 344, 360, 372, 399, 420, 426, 471, 516, 528, 531
ไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition)	30, 93, 111, 135, 153, 173, 222, 243, 275, 291, 375, 378, 405, 411, 429, 462, 468, 480, 495, 501
ทรานสเวอร์ชัน (transversion)	39, 44, 72, 78, 132, 147, 162, 187, 204, 219, 222, 252, 259, 312, 315, 327, 339, 357, 462, 513



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลก้านก้อที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ซึ่งเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

นอกจากนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน *rpoC1* สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลกันก่อได้ ตรงตามหมู่ (section) จำนวน 2 หมู่ คือ (1) หมู่ *Aeridostachya* ได้แก่ ยูนิฟอเลีย และโรบัสตา และ (2) หมู่ *Urostachya* ได้แก่ เอื้องหวดปลาหมึก และเอื้องช่องวงช้าง เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบตำแหน่งที่แตกต่างกันที่สามารถใช้จำแนก

กล้วยไม้สกุลก้านก้อทั้ง 30 ชนิด ออกจากกัน
อย่างไรก็ตาม ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*
จำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก้อแต่ละชนิดออกจากกัน
ได้น้อย จึงควรวิเคราะห์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์
ของยีนอื่น ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนก
กล้วยไม้สกุลก้านก้อ เช่นเดียวกับงานวิจัยที่
ประยุกต์ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*

ร่วมกับยีนอื่น ๆ ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย (นฤมล และคณะ, 2558) กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม (นฤมล และคณะ, 2559) กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (นฤมล และคณะ, 2560) กล้วยไม้สกุลหวาย (นฤมล และคณะ, 2560) และข้าวมีสี (นฤมล และคณะ, 2557) เป็นต้น

3.2.2 การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของชั้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA*

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชั้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ใน

กล้วยไม้สกุลก้านก้อทั้ง 30 ชนิด ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 591-913 เบส มีความแตกต่างกัน 651 ตำแหน่ง คิดเป็น 71.30 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วย MEGA7 พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.000-0.132 และเมื่อสร้างแผนภูมิความ สัมพันธ์ทางพันธุกรรมและเลือกการจัดกลุ่ม 4 แบบ พบว่าวิธีการจัดกลุ่มที่สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานของกล้วยไม้สกุลก้านก้อมากที่สุด คือ maximum likelihood

ตารางที่ 5 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของชั้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ที่มีความหลากหลาย

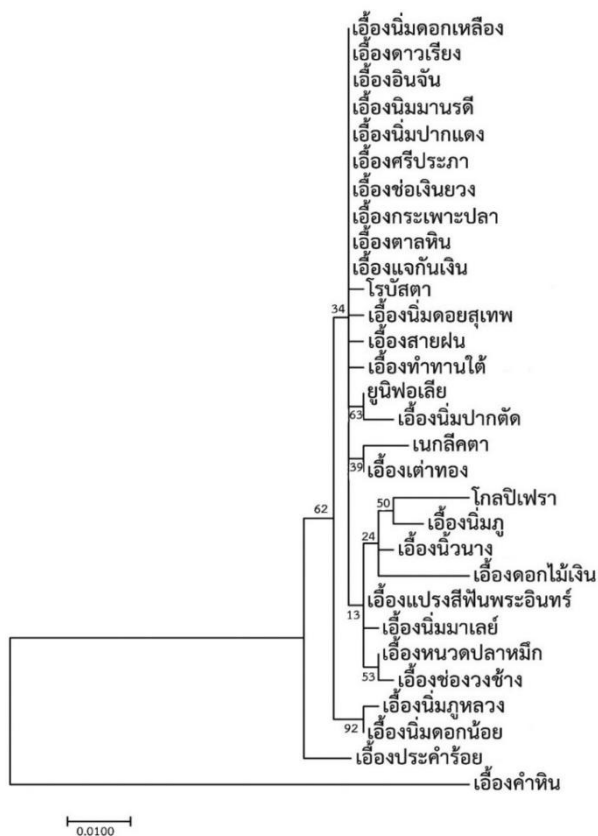
รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
อินเดล (indel)	26-52, 56-60, 62-63, 72, 75, 82, 93, 96-103, 130-136, 147, 153, 386-395, 409, 423-424, 429-434, 444-445, 454, 479-568, 572-612, 617-622, 624, 627-650, 655-663, 672-681, 686-746, 748-786, 788-1006
พิวรีนทรานสิชัน (purine transition)	24-25, 32, 51, 72, 76-78, 138, 236, 239-401, 416, 428, 437, 441, 450, 462, 485, 487-488, 490-492, 523, 525, 546, 550, 612-614, 633-634, 659, 661, 664, 671, 679, 722, 724, 731, 760-761, 766, 785, 793, 795, 801-802, 831, 896, 898, 905, 907, 917, 943, 947, 949, 950, 973, 979
ไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition)	30, 35, 50, 54-56, 58, 61, 91, 140, 143, 419, 420, 426, 451, 457, 460, 468, 472, 484, 495, 527-528, 600, 615-616, 625, 637, 642, 643, 665, 667, 668, 672-674, 689, 727, 728, 729, 748, 758, 759, 764, 783, 788, 789, 792, 803, 811, 815, 855, 900, 935, 945, 968
ทรานสเวอร์ชัน (transversion)	25, 27-29, 33-34, 50-51, 53, 57, 66, 79, 104, 110, 156, 165, 345, 397, 405, 411-413, 417, 459, 461, 464-466, 475-476, 479-480, 482-483, 486, 494, 496, 504, 519, 529, 537, 543, 554, 571, 601, 605, 607-608, 610-611, 636, 645, 651-653, 655-656, 663, 669, 670, 673, 676, 684-685, 687, 690, 704, 710, 712-719, 725, 730, 732, 733, 737, 746, 747, 756-767, 784-794, 809-810, 817-818, 821, 823, 825, 828, 833, 835, 852, 880, 895, 898, 900, 905, 906, 908, 910, 922, 930, 938, 942, 944, 950, 961

เมื่อพิจารณาจากแผนภูมิความ สัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ากล้วยไม้สกุลก้านก้อที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ทั้ง 30 ชนิด มีจำนวน 15 ชนิด

หรือคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่น ได้แก่ โรบัสตา เอื้องน้มดอยสุเทพ เอื้องสายฝน เอื้องท่าทานใต้ เอื้องน้มปากตัด

เนกลีคตา โกลปีเฟรา เอื้องนัมภู เอื้องนัวนาง เอื้องดอกไม้เงิน เอื้องนัมมาเลย์ เอื้องชองวงช้าง เอื้องนัมภูหลวง เอื้องประคำร้อย และเอื้องคำหิน และมีจำนวน 15 ชนิด หรือคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่น ได้แก่ เอื้องนัมดอกเหลือง เอื้องดาวเรียง เอื้องอินจัน เอื้อง

นิมมานรดี เอื้องนัมปากแดง เอื้องศรีประภา เอื้องชองเงินยวง เอื้องกระเพาะปลา เอื้องตาลหิน เอื้องแจกันเงิน ยูนิฟอเลีย เอื้องเต้าทอง เอื้องแปรงสีฟัน พระอินทร์ เอื้องหนวดปลาหมึก และเอื้องนัมดอกน้อย (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลก้านก่อที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ซึ่งเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

นอกจากนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ยังสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก่อได้ตรงตามหมู่จำนวน 1 หมู่ คือ หมู่ *Urostachya* ได้แก่ เอื้องหนวดปลาหมึก และเอื้องชองวงช้าง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบตำแหน่งที่แตกต่างกันที่สามารถใช้จำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก่อทั้ง 30 ชนิด ออกจากกัน อย่างไรก็ตาม เพื่อเพิ่ม

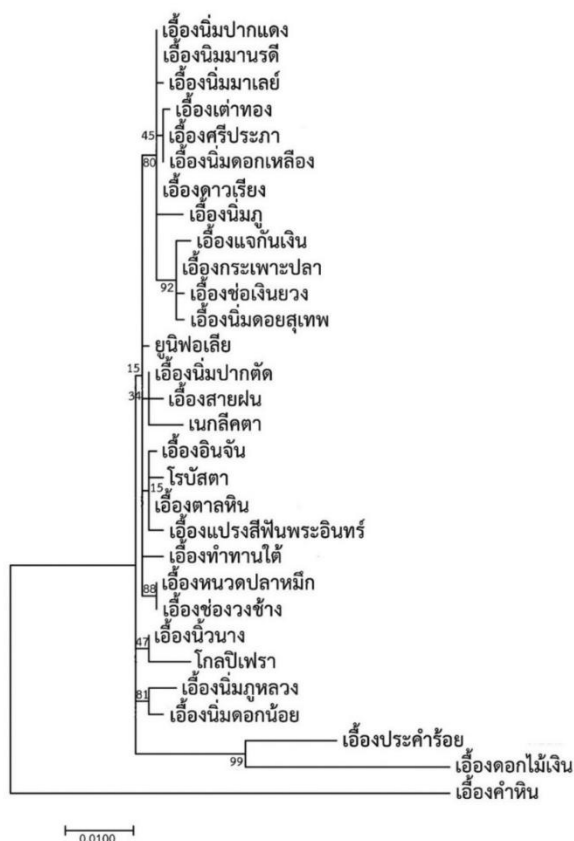
ประสิทธิภาพในการจัดจำแนกจึงควรวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอื่น ๆ เช่นเดียวกับงานวิจัยที่ประยุกต์ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ร่วมกับยีนอื่น ๆ ได้แก่ กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม (จินต์ และคณะ, 2558) กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (นฤมล และคณะ, 2560) กล้วยไม้สกุลหวาย (นฤมล และคณะ, 2560) และมะม่วง

(นฤมล และคณะ, 2559) เป็นต้น

3.2.3 การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะของยีน *rpoC1* และซีเอ็นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ร่วมกัน

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซีเอ็นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ร่วมกันด้วยโปรแกรม ClustalW และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วย MEGA7 โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood พบว่ากล้วยไม้สกุลก้านก้อที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ทั้ง 30 ชนิด มีจำนวน 19 ชนิด หรือคิดเป็น 63.33 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่น ได้แก่

เอื้องนั้มาเลย์ เอื้องเต่าทอง เอื้องนั้มกุ เอื้องแจกันเงิน เอื้องช่อเงินยวง เอื้องนั้มคดยสุเทพ ยูนิฟอเลีย เอื้องสายฝน เนกลีศดา เอื้องอินจัน โรบัสตา เอื้องแปรงสีฟันพระอินทร์ เอื้องทำทานใต้ โกลปีเฟรา เอื้องนั้มกุหลวง เอื้องนั้มคดยน้อย เอื้องประคำร้อย เอื้องดอกไม้เงิน และเอื้องคำหิน และมีจำนวน 11 ชนิด หรือคิดเป็น 36.67 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่น ได้แก่ เอื้องนั้มปากแดง เอื้องนั้มมานรี เอื้องนั้มาเลย์ เอื้องเต่าทอง เอื้องศรีประภา เอื้องนั้มคดยเหลือง เอื้องดาวเรียง เอื้องนั้มกุ เอื้องแจกันเงิน เอื้องกระเพาะปลา เอื้องช่อเงินยวง เอื้องนั้มคดยสุเทพ ยูนิฟอเลีย เอื้องนั้มปากตัด เอื้องสายฝน เนกลีศดา เอื้องอินจัน โรบัสตา เอื้องตาลหิน เอื้องแปรงสีฟันพระอินทร์ เอื้องทำทานใต้ เอื้องหนวดปลาหมึก เอื้องช่อวงช้าง เอื้องนั้วนาง โกลปีเฟรา เอื้องนั้มกุหลวง เอื้องนั้มคดยน้อย เอื้องประคำร้อย เอื้องดอกไม้เงิน และเอื้องคำหิน (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลก้านก้อที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซีเอ็นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ร่วมกัน ซึ่งเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

นอกจากนั้น เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซีเอ็นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ร่วมกัน สามารถจำแนก

กล้วยไม้สกุลก้านก้อได้ตรงตามหมู่ *Urostachya* ได้แก่ เอื้องหนวดปลาหมึก และเอื้องช่อวงช้าง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ

ยีน *rpoC1* และซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ร่วมกัน สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก้อได้ดีกว่า ซึ่งนักวิจัยส่วนใหญ่นิยมเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ก่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะอื่น ทั้งนี้เนื่องจากมีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างสูง (Kress et al., 2005; Kress and Erickson, 2008)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* มาวิเคราะห์ร่วมกับ พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก้อได้มากกว่าการใช้ยีนเพียงบริเวณเดียว ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยที่วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ร่วมกันในพืชอื่น ได้แก่ กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (นฤมล และคณะ, 2560) และกล้วยไม้สกุลหวาย (นฤมล และคณะ, 2560) เป็นต้น ดังนั้นการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะหลายบริเวณร่วมกันจึงมีความเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมากกว่า เนื่องจากให้ข้อมูลเพียงพอและสามารถเลือกให้เหมาะกับระดับความสัมพันธ์ที่ศึกษา

4. สรุป

การเพิ่มปริมาณซันติเอ็นเอของยีน *rpoC1* และซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* ในกล้วยไม้สกุลก้านก้อทั้ง 30 ชนิด ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 30 ชนิด เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะทั้งสอง พบว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกกล้วยไม้ โดยซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA* นั้นมี

ประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก้อแต่ละชนิดมากกว่า เพราะจำแนกได้ 15 ชนิด และสามารถจำแนกตรงตามหมู่ *Urostachya* ในขณะที่ยีน *rpoC1* มีประสิทธิภาพต่ำกว่า กล่าวคือ จำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก้อได้น้อยกว่า เพราะจำแนกได้เพียงบางชนิด และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะทั้งสองร่วมกัน พบว่าให้ผลการจัดจำแนกที่ดี เนื่องจากสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก้อได้ 19 ชนิด อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก้อครบทั้ง 30 ชนิด

5. รายการอ้างอิง

- จินต์ ทองสม, ภัทรพร คุ่มภัย, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 994-1005.
- ชีระชัย ธนานันต์, 2553, พันธุศาสตร์โมเลกุล, พิมพ์ครั้งที่ 1, บริษัท แดเน็กซ์ อินเตอร์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.
- นฤมล ธนานันต์, จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และชีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และ *rpoC1*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 674-682.
- นฤมล ธนานันต์, จินต์ ทองสม, ชนิดโชติ ปิยพิทยานันต์ และชีระชัย ธนานันต์, 2559, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24: 599-612.

- นฤมล ธนาคันต์, จุฑาทิพย์ พันธุ์รูปท้าว และธีระชัย ธนาคันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย หมูในโครเซอร์ชูเร และลูกผสมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *ซีดีเอ็นเอ* ที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*, Thai J. Sci. Technol. 6: 33-43.
- นฤมล ธนาคันต์, วิฑิตพร ไท้มโสภา และธีระชัย ธนาคันต์, 2558, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1*, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 1-10.
- นฤมล ธนาคันต์, ปิยดา บุสดี และธีระชัย ธนาคันต์, 2559, การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* และ *ซีดีเอ็นเอ* ที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วงในประเทศไทย, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24: 102-111.
- นฤมล ธนาคันต์, ภัทรา หงษ์ทองดี, วรุณธร เชื้อบุญมี และธีระชัย ธนาคันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *ซีดีเอ็นเอ* ที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*, Thai J. Sci. Technol. 6: 22-32.
- นฤมล ธนาคันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนาคันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-188.
- วิชา ธิติประเสริฐ, 2543, คู่มือจำแนกกล้วยไม้ไทย (Manual for Identification of Thai Orchids), สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- สลิล สิทธิธรรม, 2549, กล้วยไม้ป่าเมืองไทย, สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.
- CBOL Plant working Group, 2009, A DNA barcode for land plants, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106: 12794-12797.
- Downie, S.R., Esmeralda, L. and Deborah, S.K.D., 1996, Multiple independent losses of the *rpoC1* intro 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.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and Deward, J.R., 2003, Biological identifications through DNA barcodes, Proc. Royal Soc. B. 270: 313-321.
- Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J., 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucl. Acids Res. 22: 4673-4680.
- 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(6): e508.
- Kress, W.J. and Erickson, D.L., 2008, DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105: 2761-2762.
- 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.

- Natl. Acad. Sci. USA. 102: 8369-8374.
- 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. , 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. , Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 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.
- 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.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. , 2016, MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets, Mol. Biol. Evol. 33: 1870-1874.