

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิด
กล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบสีเขียวด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์
ของยีน *rbcL* และ *matK*

Genetic Relationship Assessment and Identification of
Strap-Leaf *Paphiopedilum* Base on Nucleotide Sequences
of *rbcL* and *matK* Genes

พรประภา ศิริเทพทวี และ วีระชัย ธนานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Pornprapa Siritheptawee 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

รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ที่มีความสวยงาม ซึ่งได้รับความนิยมในการปลูกเป็นอย่างมาก โดยรองเท้านารีมีหลากหลายชนิดและบางชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกัน ดังนั้นการจัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานจึงทำได้ยาก การวิจัยครั้งนี้ได้จำแนกชนิดกล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 20 ชนิด ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *matK* เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองร่วมกันและจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้คล้ายกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* เพียงยีนเดียว โดยผลการวิจัยครั้งนี้สามารถจัดจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 7 จาก 20 ชนิด ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะในบริเวณอื่นร่วมด้วย เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการจำแนกมากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ : กล้วยไม้; รองเท้านารี; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การระบุชนิด; ยีน *matK*; ยีน *rbcL*

Abstract

Paphiopedilum is one of the beautiful orchids that is very popular in the plant. It has varieties and similar characteristics so classification of species by using morphology are difficult. In this research, identification and assessment of genetic relationship 20 species of *Paphiopedilum* with nucleotide sequences genes of *rbcl* and *matK*. Analyzing data of nucleotide sequences of two genes together and grouping by maximum likelihood method, phylogenetic tree similar phylogenetic tree form nucleotide sequences of *matK* gene only. In this research show that analysis data of nucleotide sequences of two genes together were classify 7 species form all 20 species. Therefore, other nucleotide sequences of specific sites should be used to increase efficiency of classification.

Keywords: orchid; *Paphiopedilum*; genetic relationship; identification; *matK*; *rbcl*

1. บทนำ

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารีมีชื่อสามัญว่า Lady's slipper จัดเป็นกล้วยไม้ประเภทหนึ่งที่มีความนิยมในการปลูกเพื่อการค้าหรือปลูกเพื่อความสวยงาม มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อน ได้แก่ แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย อินโดนีเซีย ภาคตะวันออกเฉียงใต้ของจีน ฟิลิปปินส์ และหมู่เกาะโซโลมอน ในประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 18 ชนิด จากทั้งหมดทั่วโลก 136 ชนิด โดยกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีมีความหลากหลายของดอกเป็นอย่างมาก แต่มีลักษณะฐานอื่น ๆ ใกล้เคียงกัน [1]

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี เป็นกล้วยไม้ที่ขึ้นตามพื้นดิน ชอบขึ้นตามใบไม้และแสงส่อง ลักษณะของกล้วยไม้สกุลนี้ คือ มีลำต้นสั้น ใบเรียงตัวสลับสองข้างต้น ดอกมีกลีบนอก 2 กลีบ กลีบในมี 2 กลีบคู่ข้าง และ 1 กลีบปาก ซึ่งมีลักษณะเป็นถุง คล้ายหั่วรองเท้านารี จึงเรียกกล้วยไม้สกุลนี้ว่ารองเท้านารี ช่อดอกจะอยู่ที่ยอด อาจมีจำนวนดอกไม่มากนักหรืออาจมีแค่ 1 ดอก ใบมีลักษณะสีเขียวและรี [2]

ลักษณะดอกและใบของรองเท้านารีมีความคล้ายกัน จึงส่งผลให้จำแนกชนิดโดยใช้เพียงลักษณะ

สัณฐานภายนอกนั้นทำได้ยาก การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของตำแหน่งจำเพาะเข้ามาช่วยระบุชนิดและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ต่อการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มีข้อดี คือ ไม่ขึ้นอยู่กับกับสภาพแวดล้อม ทำได้ทุกช่วงระยะเวลาการเจริญเติบโตของพืช ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย และไม่ทำให้พืชตาย [3]

การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะพบว่ามีความเหมาะสมในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต ตำแหน่งจำเพาะที่ใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard) สำหรับการจำแนกหรือระบุชนิดของพืช ได้แก่ *atpF-atpH*, *matK*, *rbcl*, *rpoB*, *rpoC1*, *psbK-psbI* และ *trnH-psbA* ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) [4] อย่างไรก็ตาม การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะร่วมกันตั้งแต่ 2 บริเวณ ขึ้นไปจะมีประสิทธิภาพในการจำแนกพืชได้ดีขึ้น

ยีน *rbcl* อยู่ในจีโนมของคลอโรพลาสต์ (chloroplast genome) ทำหน้าที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/

oxygenase (RubisCO) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาวัฏจักรคัลวิน (Calvin cycle) มีขนาดประมาณ 1,400 คู่เบส ซึ่งพืชแต่ละชนิดอาจมีขนาดไม่เท่ากัน

ยีน *matK* ทำหน้าที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ maturase ซึ่งเกี่ยวข้องกับ group I intron splicing มีความยาวประมาณ 1,500 คู่เบส ข้อดีของยีนนี้ คือ มีความผันแปรสูง ซึ่งเหมาะที่จะนำมาใช้ แต่มีข้อเสีย คือ การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีนนี้มีโอกาสน้อยมากในกลุ่มพืชไร้เมล็ดและพืชไร้ดอก (gymnosperm) โดยให้ผลดีที่สุดในพื้นที่ดอก [5]

งานวิจัยนี้ได้ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและระบุชนิดกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcl*

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว จำนวน 20 ชนิด แสดงดังตารางที่ 1

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบของกล้วยไม้รองเท้านารีด้วยวิธีที่ประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) [6] ตามวิธีของ นฤมล และคณะ [7] จากนั้นตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร [8]

2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbcl* และ *matK*

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbcl* และ *matK* ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

(polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์สากล (universal primer) ที่ใช้มีความจำเพาะต่อยีน *rbcl* (5'-TCACCACAAACAGAACTAAAGC-3' กับ 5'-GGCACAAAATAAGAAACGATCTC-3') และ *matK* (5'-TAATTTACGATCAATTCATTC-3' กับ 5'-GTTCTAGCACAAGAAAGTCG-3')

ตารางที่ 1 กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว จำนวน 20 ชนิด ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์
1. อินทนนท์	<i>P. villosum</i> (Lindl.) Stein
2. อินทนนท์คอแดง	<i>P. barbigerrum</i> var. <i>coccineum</i>
3. อินทนนท์ใบกว้าง	<i>P. insigne</i> (Wallich ex Lindley) Pfitzer
4. อินทนนท์ลาว	<i>P. gratrixianum</i> (Mast.) Guillaumin
5. เหลืองเลย	<i>P. hirsutissimum</i> var. <i>esquirolei</i>
6. เหลืองกระบี่	<i>P. exul</i> (Ridl) Rolfe
7. โรสคิลเดียนัม	<i>P. rothschildianum</i> (Rchb.f.) Stein
8. ไพรมูเรียนัม	<i>P. primulinum</i> M.W.Wood & P.Taylor
9. ดอยตุงกาญจน์	<i>P. vejvarutianum</i> O.Gruss & Roellke
10. สไปเชเรียนัม	<i>P. spicerianum</i> (Rchb.f.) Pfitz.
11. เมืองกาญจน์	<i>P. parishii</i> (Rchb.f) Stein
12. ดอยตุง	<i>P. charlesworthii</i> (Rolfe) Pfitzer
13. เชียงดาว	<i>P. dianthum</i> Tang & Wang
14. เฮนรียานัม	<i>P. henryanum</i> Braem
15. เฮเลน	<i>P. helenae</i> f. <i>aureum</i> O.Gruss & Roeth
16. ทรานเลียนัม	<i>P. tranlienianum</i> O.Gruss & H.Perner
17. แพรสแทนส์	<i>P. praestans</i> (Rchb.f.) Pfitz
18. ฟิลิปปีนส์เอนซิส	<i>P. philippinense</i> (Rchb.f) Stein
19. ซูปาร์ดีโอ	<i>P. supardii</i> Braem & Lob
20. กลัวโคไฟลลัม	<i>P. glaucophyllum</i> J.J.Smith

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.1, 0.1 % Triton™ X-100 และ 2.5 mM MgCl₂) นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์ชนิดละ 250 นาโนโมลาร์ (nM)

และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (Unit)

ปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์มี 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

หลังจากนั้นตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

2.4 การวิเคราะห์ผล

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท Bioneer (ประเทศเกาหลีใต้) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และ *matK* ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว ทั้ง 20 ชนิด มาเปรียบเทียบกับโปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle>) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 (MEGA7, Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0) (<http://www.megasoftware.net>) โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbcl* และ *matK*

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbcl* และ *matK* ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 20 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์สากล พบว่าสามารถเพิ่ม

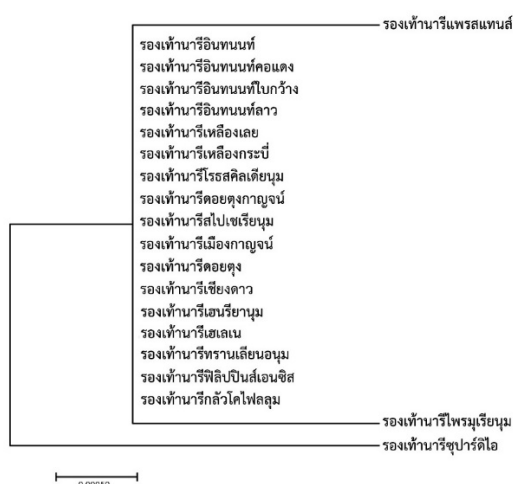
ปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของทั้ง 2 ยีน ครบทั้งหมด โดยชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbcl* มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส และชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส

ตารางที่ 2 หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และ *matK* ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 20 ชนิด ที่ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว	หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์	
	<i>rbcl</i>	<i>matK</i>
อินทนนท์	KX755529	KX755549
อินทนนท์คอแดง	KX755530	KX755550
อินทนนท์ใบกว้าง	KX755531	KX755551
อินทนนท์ลาว	KX755532	KX755552
เหลืองเลย	KX755533	KX755553
เหลืองกระบี่	KX755534	KX755554
โรสคิลเดียนุม	KX755535	KX755555
ไพรม์เรียนุม	KX755536	KX755556
ดอยตุงกาญจน์	KX755537	KX755557
สไปเซเรียนุม	KX755538	KX755558
เมืองกาญจน์	KX755539	KX755559
ดอยตุง	KX755540	KX755560
เชียงดาว	KX755541	KX755561
เฮนรียานุม	KX755542	KX755562
เฮเลน	KX755543	KX755563
ทรานเลียนอนุม	KX755544	KX755564
แพรสแทนส์	KX755545	KX755565
ฟิลิปปินส์เอนซิส	KX755546	KX755566
ซูปาร์ดีโอ	KX755547	KX755567
กล้วยไม้ไฟลุ่ม	KX755548	KX755568

3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl*

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 20 ชนิด พบว่ามีขนาด 663 คู่เบส และได้ฝากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) ซึ่งมีหมายเลขจำเพาะ (accession number) ดังตารางที่ 2



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 20 ชนิด ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 พบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 20 ชนิด เท่ากับ 0.000-0.005 เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood (รูปที่ 1) พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 3 ชนิด ได้แก่

แพรสแทนส์ ไพรมูเรียม และซูปาร์ติโอ แต่ไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีชนิดอื่น เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้นมีการเปลี่ยนแปลงน้อย คือ มีการกลาย (mutation) เพียง 4 ตำแหน่ง โดยพบรูปแบบการเปลี่ยนแปลง 2 รูปแบบ คือ ทรานสเวอร์ชัน (transversion) และไพริมิดินทรานสิชัน (pyrimidine transition) (ตารางที่ 3) ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกันมาก แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จึงไม่สามารถแยกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 20 ชนิด ออกจากกันทั้งหมด

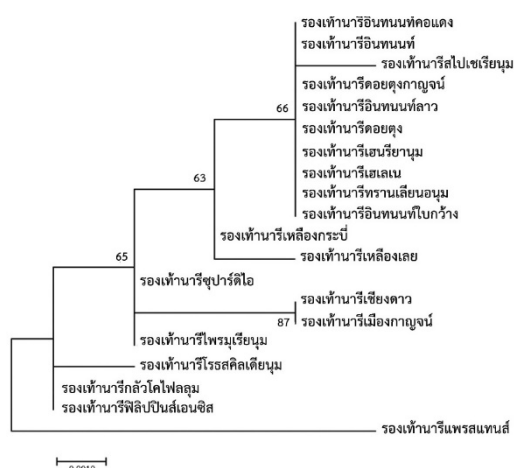
ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ที่มีการเปลี่ยนแปลง

ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลง	รูปแบบการเปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
159	G เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
421	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
492	C เป็น T	ไพริมิดินทรานสิชัน
501	C เป็น T	ไพริมิดินทรานสิชัน

3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK*

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 20 ชนิด พบว่ามีขนาด 605 คู่เบส และได้ฝากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI ซึ่งมีหมายเลขจำเพาะ (accession number) ดังตารางที่ 2

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 พบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 20 ชนิด เท่ากับ 0.000-0.015 เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood (รูปที่ 2) ซึ่งพบว่า



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 20 ชนิด ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 7 ชนิด ได้แก่ สไปเซเรียนัม เหลืองกระบี่ เหลืองเลย สุพรรณดิไอ ไพร่เรียนัม โรสคิลเดียนัม และพรสแทนส์ นอกจากนี้ยังสามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีสกุลย่อย *Paphiopedilum* เป็นกลุ่มเดียวกัน ได้แก่ อินทนนท์คองคัง อินทนนท์ สไปเซเรียนัม คองคัง-กาญจน์ อินทนนท์ลาว คองคัง เฮนริยานัม เฮเลน ทรานเลียนอนัม อินทนนท์ใบกว้าง เหลืองกระบี่ และ เหลืองเลย แต่ไม่สามารถแยกบางชนิดออกจากกัน พบตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลง 13 ตำแหน่ง โดยพบการกลาย 3 รูปแบบ คือ พิวรีนทรานสิชัน (purine transition) ทรานสเวอร์ชัน และไพริมิดิน-ทรานสิชัน (ตารางที่ 4)

เมื่อวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 20 ชนิด ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood (รูป

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ที่มีการเปลี่ยนแปลง

ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลง	รูปแบบการเปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
34	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
78	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
96	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
186	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
193	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
315	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
349	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
363	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
378	T เป็น C	ไพริมิดินทรานสิชัน
390	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
500	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
506	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
556	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
34	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน

ที่ 3) พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 7 ชนิด ได้แก่ สไปเซเรียนัม เหลืองกระบี่ เหลืองเลย สุพรรณดิไอ ไพร่เรียนัม โรสคิลเดียนัม และพรสแทนส์ ซึ่งเหมือนกับแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* เพียงยีนเดียว แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ (หรือจำนวนยีน) อาจไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนก ทั้งนี้เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* มีการเปลี่ยนแปลงต่ำ ทำให้จำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีได้เพียงบางชนิด เมื่อนำมาวิเคราะห์ร่วมกับยีน *matK* ที่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จึงเหมือนกับแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *matK* เพียงยีนเดียว อย่างไรก็ตาม มีรายงานการวิจัยของ นฤมล และคณะ [3] ที่ได้

แสดงถึงประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะร่วมกัน 2 บริเวณขึ้นไป พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้ดีกว่าการใช้ตำแหน่งจำเพาะเพียง 1 บริเวณ

นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยอื่นที่แสดงถึงประสิทธิภาพของการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของพืช ได้แก่ มะม่วง [9] ข้าวมีสี [8] กล้วยไม้สกุลแวนด้า หมูเข็ม [11] กล้วยไม้สกุลหวาย กลุ่มเอื้องสาย [12] กล้วยไม้สกุลหวาย หมู ไนโกรเฮอร์ชูเอ และลูกผสม [13] เป็นต้น

4. สรุป

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 20 ชนิด ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *matK* พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 3 ชนิด เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงต่ำ พบการกลายเพียง 4 ตำแหน่ง ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีได้ดีกว่าเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *matK* ร่วมกัน พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 7 ชนิด เหมือนกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* เพียงยีนเดียว แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มตำแหน่งจำเพาะหรือจำนวนยีนอาจไม่ได้เพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนก อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะร่วมกันตั้งแต่ 2 บริเวณขึ้นไป อาจเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีให้ดียิ่งขึ้น

5. รายการอ้างอิง

[1] เศรษฐมนต์ กาญจนกุล, 2551, ร้อยพรรณ

พฤษภา ร่องเท้านารี, สำนักพิมพ์เศรษฐกิจศิลป์, กรุงเทพฯ.

[2] ขวลิต ดาบแก้ว, 2542, การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สำหรับผู้แรกเริ่ม, สำนักพิมพ์ โอ.เอส.พรินต์ติ้งเฮ้าส์, กรุงเทพฯ.

[3] นฤมล ธนาคันต์, ภัทรา หงษ์ทองดี, วรณธร เชื้อบุญมี และธีระชัย ธนาคันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*, Thai J. Sci. Technol 6: 22-32.

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

[5] วุฒิพงศ์ มหาคำ, 2554, DNA barcodes ของพืช : หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด, ว.พฤกษศาสตร์ไทย 3: 1-30.

[6] Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1978, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 1115.

[7] นฤมล ธนาคันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนาคันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟที, Thai J. Sci. Technol 1: 169-188.

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

[9] ปิยดา บุสดี, นฤมล ธนาคันต์ และธีระชัย ธนาคันต์, 2559, การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทย

- จากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *rbcl*, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 983-993.
- [10] นฤมล ธนानันต์, จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และ *rpoC1*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 674-682.
- [11] จินต์ ทองสม, นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2558, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 994-1005.
- [12] นฤมล ธนานันต์, ฐิติพร ไท่มโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2558, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1*, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 1-10.
- [13] ธีระชัย ธนานันต์, จุฑาทิพย์ พันธุ์รูปท้าว และนฤมล ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ชูเช และลูกผสมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcl*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 25: 579-590.