การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ

Genetic Relationship Analysis of *Bulbophyllum* Section Sestochilus Using Nucleotide Sequences of Specific Genes

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

เกียรติชัย แซ่ไต่ และธีระชัย ธนานันต์*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Narumol Thananta

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

Kiattichai Saetai and Theerachai Thananta*

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

บทคัดย่อ

สิงโตกลอกตา (*Bulbophyllum*) เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ อยู่ในวงศ์ Orchidaceae พบเห็นได้ในป่าเขตร้อน ปัจจุบันกล้วยไม้กลุ่มนี้ลดปริมาณลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อจัดจำแนกชนิดและพันธุ์ในระดับโมเลกุล ซึ่งสามารถใช้วางแผนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป งานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์จีโนมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม 12 ชนิด โดยตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K, *rbc*L, *rpo*B, *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A พบว่าไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณใดที่สามารถแยกกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด ออกจากกันได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตาม การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rbc*L ร่วมกันสามารถแยกกล้วยไม้สิงโตสกุลกลอกตาหมู่สิงโตสยามออกจากกันได้ ยกเว้นสิงโตก้ามปูใหญ่และสิงโตก้ามปูแดงซึ่งสามารถแยกด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 หรือชิ้นดีเอ็นเอ *trn*H-*psb*A

คำสำคัญ : สิงโตกลอกตา; สิงโตสยาม; ยีนจำเพาะ; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** thana@tu.ac.th

Abstract

Bulbophyllum is a largest genus in Orchidaceae family and a well-known plant of tropical area. Currently, *Bulbophyllum* are reduced dramatically, it necessary to study the genetic diversity and DNA fingerprinting of molecular identification. Those results could be used to plan for conservation and breeding. In this research, genomic DNA among 12 species of *Bulbophyllum* section Sestochilus were analyzed the nucleotide sequences of *mat*K, *rbc*L, *rpo*B, *rpo*C1 and *trn*H-*psb*A, but non-regions can be specify among all of them. However, used the nucleotide sequences of *mat*K and *rbc*L together capable to identify most of *Bulbophyllum* section Sestochilus, excepted *B. macranthum* and *B. patens*, which can identify by using the nucleotide sequences of *rpo*C1 or *trn*H-*psb*A.

Keywords: *Bulbophyllum*; Sestochilus; specific gene; genetic relationship

1. บทนำ

สิงโตกลอกตา (*Bulbophyllum*) เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ จัดอยู่ในวงศ์ย่อย Epidendroideae พบในธรรมชาติมากกว่า 2,000 ชนิด มีการจัดเป็นกลุ่มด้วยลักษณะสัณฐานเป็น 15 กลุ่ม เพื่อให้จำแนกและตรวจสอบชนิดพันธุ์ได้ง่าย โดยในแต่ละกลุ่มมีลักษณะแตกต่างกันไป บางกลุ่มแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด บางกลุ่มแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย

ประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม (Sestochilus) 12 ชนิด ได้แก่ สิงโตประหลาด (*Bulbophyllum affine*) สิงโตขยุกขยุย (*B. dayanum*) สิงโตอีคอร์ (*B. ecornutum*) สิงโตสยาม (*B. lobbii*) สิงโตก้ามปูใหญ่ (*B. macranthum*) สิงโตก้ามปูแดง (*B. patens*) สิงโตงาม (*B. orectopetalum*) สิงโตเขี้ยวเชียงดาว (*B. pectinatum*) พญาสิงโต (*B. polystictum*) สิงโตปากนกแก้ว (*B. psittacoglossum*) สิงโตอาจารย์เต็ม (*B. smitinandii*) และสิงโตสุคิริน (*B. rugosum*) [1] โดยการจำแนกกล้วยไม้กลุ่มนี้ด้วยลักษณะสัณฐานทำได้ยากและต้องใช้ความเชี่ยวชาญสูง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดและพันธุ์ในระดับโมเลกุล ซึ่งสามารถใช้วางแผนอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

รหัสแท่งดีเอ็นเอหรือดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เป็นเทคนิคการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) บริเวณใดบริเวณหนึ่งหรือหลายบริเวณร่วมกันในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิต โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ใช้เป็นรหัสแท่งดีเอ็นเอต้องมีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่เกิดจากความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variability) ในระดับชนิดหรือสปีชีส์ (species) และมีบริเวณอนุรักษ์ขนาบข้าง (conserved flanking site) เพื่อใช้เป็นตำแหน่งเกาะของไพรเมอร์ (primer) สำหรับการทำพีซีอาร์ (PCR) หรือปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction) ซึ่งควรเป็นดีเอ็นเอช่วงสั้น ๆ เพื่อให้ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส [2]

การใช้รหัสแท่งดีเอ็นเอเพื่อระบุชนิดในพืชเริ่มมีการใช้มาไม่นาน โดยความร่วมมือกันระหว่างประเทศต่าง ๆ ได้ก่อตั้งโครงการจัดทำฐานข้อมูลรหัสแท่งดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต (The Barcode of Life Project) โดยศึกษาดีเอ็นเอ 7 บริเวณ ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์

ของยีนกำหนดการสร้างโปรตีน 4 บริเวณ ได้แก่ *matK, rbcL, rpoB* และ *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน 3 บริเวณ ได้แก่ *atp*F-*atp*H, *trn*H-*psb*A และ *psb*K-*psb*I โดยพบว่าการใช้ยีน *mat*K ร่วมกับ *rbc*L มีความเหมาะสมมาก เนื่องจากสามารถใช้ได้กับพืชเกือบทุกชนิด ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีคุณภาพดี และใช้แยกความแตกต่างระหว่างชนิดของพืชได้ [3]

ยีน *mat*K (*maturase* K) รายงานครั้งแรกในต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) [4] มีขนาดประมาณ 1,550 คู่เบส ซึ่งเมื่อแปลรหัส (translation) จะได้ชิ้นพอลิเพปไทด์ (polypeptide) ของเอนไซม์แมทัวเรส (maturase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างกรดอะมิโนไลซีน (lysine: K) [5] โดยมีรายงานว่ายีน *mat*K มีวิวัฒนาการเร็วที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) และเป็นยีนที่สามารถเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ง่าย

ยีน *rbc*L (*ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase* large subunit) ในพืชมีหลากหลายขนาด เช่น 1,428, 1,431 หรือ 1,434 คู่เบส เป็นยีนที่ไม่มีอินทรอน (intron) สอดแทรกอยู่ภายใน เมื่อลอกรหัส (transcription) และแปลรหัสจะได้หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) ของเอนไซม์รูบิสโก (rubisco) หรือ ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide fixation) ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (photosyntesis) มีรายงานว่าการใช้ยีน *mat*K ร่วมกับ *rbc*L เป็นรหัสแท่งดีเอ็นเอจะทำให้การจัดกลุ่มและการพิสูจน์เอกลักษณ์ชัดเจนขึ้น [6]

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามที่พบในประเทศไทย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K, *rbc*L, *rpo*B, *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม

กล้วยไม้ที่ใช้ในการวิจัยนี้คือกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม 12 ชนิด ที่พบในประเทศไทย ได้แก่ สิงโตก้ามปูใหญ่ สิงโตก้ามปูแดง สิงโตประหลาด สิงโตอาจารย์เต็ม พญาสิงโต สิงโตสยาม สิงโตงาม สิงโตอีคอร์ สิงโตขยุกขยุย สิงโตเขี้ยวเชียงดาว สิงโตปากนกแก้ว และสิงโตสุคิริน

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดแยกดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle [7] โดยชั่งชิ้นส่วนใบประมาณ 6 กรัม เติมสารละลายบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer; 4 % CTAB, 2.5 M NaCl, 0.6 % SDS, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM tris-HCl pH 8.0 และ 0.1 % sodium metabisulfite) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และพอลิไวนิลไพโรลิโดน (polyvinyl pyrolidone) 0.3 กรัม แล้วบดใบกล้วยไม้ให้ละเอียด เติมเบตาเมอแคปโทเอทานอล (β-mercaptoethonol) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol) 24: 1 ปริมาตร 1 เท่า นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมลิเนียร์พอลิอะครีลาไมด์ (linear polyacrylamide) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และไอโซโพพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่า นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนบนทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ตะกอนแห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทีอี (TE buffer, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1.0 mM EDTA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมอาร์เอ็นเอสเอ

(RNase A) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol) 25: 24: 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนลงสู่หลอดใหม่ แล้วเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 24: 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมลิเนียร์พอลิอะครีลาไมด์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมอะซีเตต (sodium acetate) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทั้งหมด เติมไอโซโพพานอล ปริมาตร 1 เท่า นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ทำให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทีอี ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ [8]

2.3 การสร้างรหัสแท่งดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอตัวอย่างกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *mat*K, *rpo*C1, *rpo*B, *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในบัฟเฟอร์ (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 2.5 mM $MgCl_2$) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 μM ไพรเมอร์ชนิดที่มีลำดับสากล (universal primer) สายฟอร์เวิร์ด (forward primer) และสายรีเวิร์ส (reverse primer) สายละ 250 nM และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™ life technology, Brazil) 1 ยูนิต [9]

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

2.4 การวิเคราะห์ผล

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามแต่ละชนิดที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยบริษัท Solgent (เกาหลีใต้) หลังจากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละบริเวณที่ได้มาเปรียบเทียบกันด้วยการใช้โปรแกรม ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม แล้วนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ neighbor joining

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่มี

ความจำเพาะกับยีน *mat*K, *rbc*L และ *rpo*B พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวได้ทั้ง 12 ตัวอย่าง โดยให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 900, 650 และ 400 คู่เบส ตามลำดับ

ตารางที่ 1 หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอของยีน *mat*K, *rbc*L และ *rpo*B ในกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม

ชนิดของกล้วยไม้	หมายเลขเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน		
	*mat*K	*rbc*L	*rpo*B
สิงโตก้ามปูใหญ่	KJ462084	KJ462096	KJ462108
สิงโตก้ามปูแดง	KJ462085	KJ462097	KJ462109
สิงโตประหลาด	KJ462086	KJ462098	KJ462110
สิงโตอาจารย์เต็ม	KJ462087	KJ462099	KJ462111
พญาสิงโต	KJ462088	KJ462100	KJ462112
สิงโตสยาม	KJ462089	KJ462101	KJ462113
สิงโตงาม	KJ462090	KJ462102	KJ462114
สิงโตอีคอร์	KJ462091	KJ462103	KJ462115
สิงโตขยุกขยุย	KJ462092	KJ462104	KJ462116
สิงโตเขี้ยวเชียงดาว	KJ462093	KJ462105	KJ462117
สิงโตปากนกแก้ว	KJ462094	KJ462106	KJ462118
สิงโตสุคิริน	KJ462095	KJ462107	KJ462119

3.2 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K, *rbc*L และ *rpo*B ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนในพืช จากนั้นได้ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K, *rbc*L และ *rpo*B ของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด ไว้ในฐานข้อมูล NCBI และได้รับหมายเลขเฉพาะ (accession number) ดังตารางที่ 1

3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

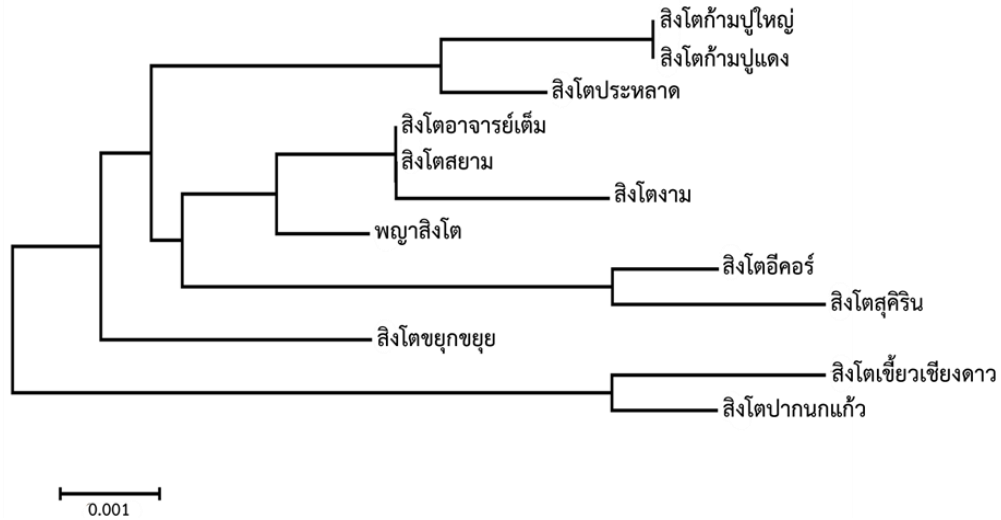
เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K, *rbc*L และ *rpo*B ในกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด ด้วยโปรแกรม ClustalW2 แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ไม่สามารถแยกสิงโตก้ามปูใหญ่กับสิงโตก้ามปูแดง และสิงโตอาจารย์เต็มกับสิงโตสยามออกจากกัน (รูปที่ 1) อย่างไรก็ตาม พบว่ามีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างชนิดของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้งหมด 29 ตำแหน่ง (ตารางที่ 2) ที่เกิดการแทนที่นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมี 10 ตำแหน่ง ที่แสดงเอกลักษณ์ของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามแต่ละชนิด โดยมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิด 0.000-0.016

ตารางที่ 2 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ที่ให้ความแตกต่างระหว่างชนิดของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม

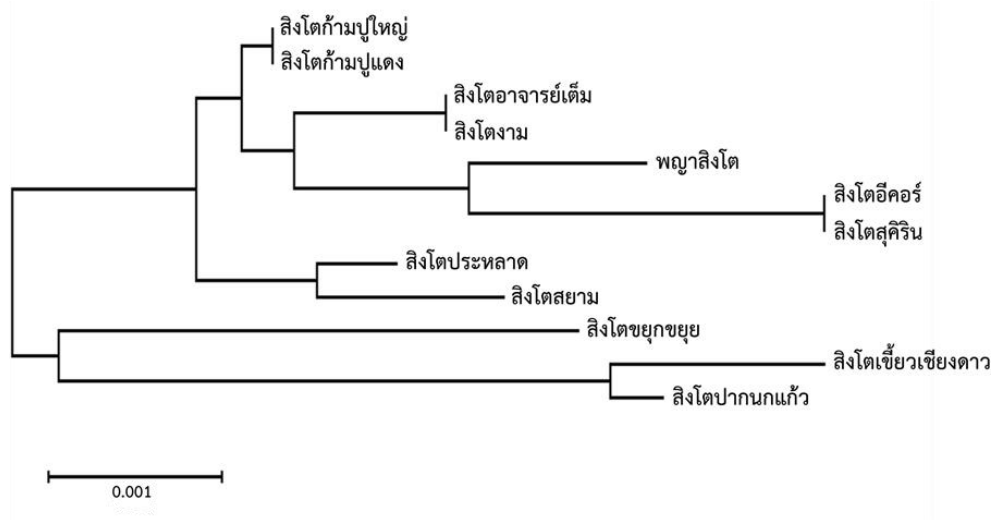
รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K เกิดการแทนที่นิวคลีโอไทด์
ไพริมิดีนทรานสิชัน	284, 566, 599, 785, 825 และ 875
พิวรีนทรานสิชัน	356, 398, 623 และ 868
ทรานสเวอร์ชัน	72, 117, 164, 209, 291, 312, 347, 390, 428, 533, 602, 641, 648, 681, 758, 774, 776, 784 และ 794

ยีน *rbc*L ไม่สามารถแยกกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามออกจากกันได้ 3 คู่ (รูปที่ 2) ได้แก่ สิงโตก้ามปูใหญ่กับสิงโตก้ามปูแดง สิงโตอาจารย์เต็มกับสิงโตงาม และสิงโตอีคอร์กับสิงโตสุคิริน อย่างไร

ก็ตาม พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน 8 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3) ที่ให้ความแตกต่างระหว่างชนิดของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโต โดยมีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมี 2 ตำแหน่ง ที่แสดงเอกลักษณ์ของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามแต่ละชนิด ซึ่งสามารถใช้ระบุชนิดได้ มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิด 0.000-0.009 โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B ไม่สามารถแยกกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามออกจากกัน เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันทั้งหมด ดังนั้นจึงไม่สามารถนำผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามที่สร้างจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามที่สร้างจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L

ตารางที่ 3 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ที่ให้ความแตกต่างระหว่างชนิดของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K เกิดการแทนที่นิวคลีโอไทด์
ไพริมิดีนทรานสิชัน	262, 440 และ 491
พิวรีนทรานสิชัน	158 และ 261
ทรานสเวอร์ชัน	261, 262, 267, 278 และ 420

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rbc*L สามารถแยกกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามเกือบทุกชนิดยกเว้นสิงโตก้ามปูใหญ่กับสิงโตก้ามปูแดง ดังนั้นจึงได้ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A โดยมีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 550 และ 850 คู่เบสตามลำดับ ซึ่งสามารถแยกสิงโตก้ามปูใหญ่และสิงโตก้ามปูแดงออกจากกันได้ เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันที่ตำแหน่ง 251 และ 738 ตามลำดับ

3.4 อภิปรายผล

การตรวจสอบกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด เมื่อสกัดแยกดีเอ็นเอและนำมาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยการใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *mat*K, *rbc*L และ *rpo*B แล้วตรวจสอบและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายีน *mat*K ไม่สามารถแยกสิงโตก้ามปูใหญ่กับสิงโตก้ามปูแดง และสิงโตอาจารย์เต็มกับสิงโตสยามออกจากกัน ยีน *rbc*L ไม่สามารถแยกสิงโตก้ามปูใหญ่กับสิงโตก้ามปูแดง สิงโตอาจารย์เต็มกับสิงโตงามและสิงโตอีคอร์กับสิงโตสุคิรินออกจากกัน และยีน *rpo*B ไม่สามารถแยกกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามออกจากกัน เมื่อวิเคราะห์ผลการใช้ยีน *mat*K ร่วมกับยีน *rbc*Lพบว่าสามารถแยกกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามได้เกือบทั้งหมด ยกเว้นสิงโตก้ามปูใหญ่และสิงโตก้ามปูแดง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่กล่าวว่าการใช้ยีน *mat*K ร่วมกับยีน *rbc*L ทำให้การจำแนกได้ดีขึ้น [3] เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A พบว่าสามารถแยกสิงโตก้ามปูใหญ่และสิงโตก้ามปูแดงออกจากกันได้

4. สรุป

การตรวจสอบกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามด้วยรหัสแท่งดีเอ็นเอ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K, *rbc*L และ *rpo*B สามารถแยกกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด ได้เกือบทั้งหมด ยกเว้นสิงโตก้ามปูใหญ่และสิงโตก้ามปูแดง ซึ่งสามารถแยกได้ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 หรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการจำแนกชนิดกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างน้อย 3 บริเวณ คือ ยีน *mat*K, *rbc*L และ *rpo*C1 หรือ *mat*K, *rbc*L และ *trn*H-*psb*A

5. รายการอ้างอิง

[1] สลิล สิทธิสัจจธรรม, 2553, กล้วยไม้สิงโตกลอกตาในประเทศไทย, สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ, 255 น.

[2] Kress, W.J. and Erickson, D.L., 2008, DNA Barcodes: Genes, genomics and bioinformatics, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 105: 2761-2762.

[3] CBOL Plant working Group, 2009, A DNA barcode for land plants, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 106: 12794-12797.

[4] Sugita, M., Shinozaki, K. and Sugiura, M., 1985, Tobacco chloroplast tRNA Lys (UUU) gene contains a 2.5-kilobase-pair intron: An open reading frame and a conserved boundary sequence in the intron, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 82: 3557-3561.

[5] Soltis, D.E., Soltis, P.S. and Doyle, J.J., 1998, Molecular Systematic of Plants II: DNA Sequencing, Kluwer Academic Press, Boston.

[6] Plunkett, G.M., Soltis, D.E. and Soltis, P.S., 1997, Clarification of the relationship between Apiaceae and Araliaceae based on *mat*K and *rbc*L sequence data, Amer. J. Bot. 84: 565-580.

[7] 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.

[8] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1626 p.

[9] นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-188.