

การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ

Identification and Genetic Relationship Analysis of *Aerides* Using Nucleotide Sequences of Specific Sites

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

วริศรา แทนสง่า และธีระชัย ธนานันต์*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ 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

Warisara Tansa-nga and Theerachai Thanananta*

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

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

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลกุหลาบเป็นกล้วยไม้ที่มีความสำคัญและได้รับความนิยม เนื่องจากมีดอกสวยงามและกลิ่นหอม ปัจจุบันการจำแนกพันธุ์ตามลักษณะสัณฐานมีความยุ่งยาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้จำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลกุหลาบ 12 พันธุ์ และสกุลหวดพราหมณ์ 1 พันธุ์ ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ โดยเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ บริเวณ ITS ยีน *matK* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่า บริเวณ ITS ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของกล้วยไม้ได้ครบทั้ง 13 พันธุ์ เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม ClustalW2 และ MEGA 4.0 พบว่ายีน *matK* และ ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* สามารถจำแนกพันธุ์กล้วยไม้ออกจากกันได้ 11 พันธุ์ โดยไม่สามารถแยก เอื้องกุหลาบชมพูกระป๋องกับเอื้องกุหลาบนำนออกจากกัน อย่างไรก็ตาม ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *rpoB* สามารถจำแนกเอื้องกุหลาบชมพูกระป๋องกับเอื้องกุหลาบนำนออกจากกันได้

คำสำคัญ : สกุลกุหลาบ; การจำแนก; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; ยีนจำเพาะ

*ผู้รับผิดชอบบทความ : thana@tu.ac.th

Abstract

Aerides is an important and most popular orchid because its flower is beautiful and fragrance. At present, identification base on morphology have been difficult. This research, the nucleotide sequences of specific sites were used to identify 12 *Aerides* and 1 *Seidenfadenia* varieties. The *matK* and *trnH-psbA* intergenic spacer were suitable to use because all DNA samples were amplified by polymerase chain reaction (PCR), while ITS was unsuitable. The PCR products of *matK* and *trnH-psbA* intergenic spacer were used to nucleotide sequencing and then the data were analyzed by ClustalW2 and MEGA 4.0. These results show that nucleotide sequences of *matK* and *trnH-psbA* intergenic spacer could distinguish 11 out of 13 orchids varieties, excepted *A. krabiense* and *A. rosea*. However, the nucleotide sequences of *rpoC1* and *rpoB* were used to identify both of *A. krabiense* and *A. rosea*.

Keywords: *Aerides*; identification; genetic relationship; specific gene

1. บทนำ

กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) เป็นกล้วยไม้ที่พบตามธรรมชาติในป่าทั่วทุกภาคของประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเกาะอาศัยอยู่ตามต้นไม้ อาจขึ้นเป็นต้นเดี่ยวหรือขึ้นเป็นกลุ่มใหญ่ มีต้นกลมยาว ต้นแก่มีจะแตกกิ่งใกล้โคนต้น รากใหญ่ ยาว เป็นระบบรากอากาศ ใบรูปขอบขนานเรียงสลับ ข้างขวา โคนใบเป็นกาบหุ้มต้น ช่อดอกเกิดตามซอกใบ เอนเล็กน้อยหรือห้อยลง ส่วนใหญ่ดอกในช่อค่อนข้างดก ดอกมีขนาดประมาณ 2-3 เซนติเมตร บานทนหลายวัน โดยจะมีดอกในช่วงฤดูร้อนถึงต้นฤดูฝน กลีบเลี้ยงและกลีบดอกคล้ายกัน กลีบปากมีเดือยซึ่งมักจะงอและเบนออกทางด้านหน้า เส้าเกสรค่อนข้างสั้นและส่วนปลายมีจะงอยแหลม ในธรรมชาติพบขึ้นตามป่าเบญจพรรณ ป่าดิบ บางชนิดพบตามป่าชายหาด และป่าชายเลน เป็นกล้วยไม้ที่เลี้ยงง่าย มีบทบาทสำคัญในการผสมพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่ากล้วยไม้อิงอาศัยทุกชนิดในสกุลนี้ที่พบในประเทศไทยล้วนสวยงามและมีกลิ่นหอม ซึ่งนิยมนำมาปลูกเลี้ยงกันทั่วไป [1]

รหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode) เป็นเทคนิคใหม่ที่กำลังได้รับความนิยมและนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิต มีแนวคิดมาจากรหัสแท่งสินค้าหรือบาร์โค้ด (barcode) ที่อยู่ข้างกล่องสินค้า ซึ่งสามารถจำแนกได้ในทุกระยะการพัฒนาลูกค้า ซึ่งสามารถพัฒนาขึ้นจากการเลือกใช้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดสั้นบริเวณตำแหน่งจำเพาะ (specific site) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันมากพอที่จะทำให้สามารถแยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกัน แต่ต้องมีความแตกต่างภายในชนิดเดียวกันต่ำมากหรือไม่มีเลย และต้องมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ที่สามารถใช้เป็นไพรเมอร์สากล (universal primer) เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอนั้นด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์หรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) สำหรับนำมาใช้เป็นรหัสแท่งดีเอ็นเอ [2] การวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) และจำแนกพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ (specific site) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่นิยมใช้ในการสร้างรหัสแท่งดีเอ็นเอ

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กล้วยไม้สกุลกุหลาบ

กล้วยไม้สกุลกุหลาบในประเทศไทย 12 พันธุ์ ประกอบด้วยเอื้องกุหลาบแดง (*Aerides crassifolia* C.S.P. Parish ex Burb.) เอื้องกุหลาบมาลัยแดง (*Aerides multiflora* Roxb. var. *multiflora*) เอื้องกุหลาบขาว (*Aerides odorata* var. *albino*) เอื้องกุหลาบกระเป๋าคิด (*Aerides odorata* Lour.) เอื้องกุหลาบกระเป๋าคิด (*Aerides odorata* Lour.) เอื้องกุหลาบกระเป๋าคิด (*Aerides falcata* Lindl. & Paxton) เอื้องกุหลาบพวงชมพู (*Aerides falcata* var. *puangchompoo*) เอื้องกุหลาบเหลืองโคราช (*Aerides houlettiana* Rchb. f.) เอื้องกุหลาบอินทจักร (*Aerides flabellata* Rolfe ex Downie) เอื้องกุหลาบชมพูกระเป๋าคิด (*Aerides krabiense* Seidenf.) เอื้องกุหลาบนำน (*Aerides rosea* Lodd. ex Lindl. & Paxton) เอื้องกุหลาบลอเลนเซีย (*Aerides lawrenceae* Rchb. f.) และเอื้องกุหลาบควินควิลเนอรา (*Aerides quinquevulnera* Lindl.) รวมทั้งกล้วยไม้สกุลหวดพราหมณ์ 1 พันธุ์ คือ เอื้องหวดพราหมณ์ [*Seidenfadenia mitrata* (Rchb. f.) Garay] ซึ่งเดิมจัดอยู่ในสกุลกุหลาบก่อนแยกเป็นสกุลใหม่ โดยรวบรวมและนำมาปลูกเลี้ยงจนกระทั่งออกดอก หลังจากนั้นตรวจสอบและจำแนกชนิด/พันธุ์ด้วยลักษณะสัณฐานโดย รองศาสตราจารย์ ดร. ชีระชัย ธนาคำนธ์

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ทั้ง 13 พันธุ์ ด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle [3] โดยบดใบกล้วยไม้ 3-4 กรัม ในบัฟเฟอร์สกัด [extraction buffer; 4 % cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), 0.6 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 M NaCl, 20 mM ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA), 100 mM Tris-

HCl pH 8.0 และ 0.1 % sodium meta-bisulfite] 20 มิลลิลิตร ที่มีเมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercapto ethanol) 20 ไมโครลิตร และพอลิไวนิลไพร์โรลิโดน (polyvinylpyrrolidone, PVP) 0.3 กรัม โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแยกสารละลายในส่วนบนมาเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ (linear polyacrylamide) 140 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ล้าง (washing buffer; 10 mM sodium acetate pH 5.2 และ 70 % ethanol) ปล่อยให้แห้งแล้วละลายตะกอนในบัฟเฟอร์อาร์เอ็นเอส (RNase buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 15 mM NaCl) 500 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอ (RNase A 10 mg/ml) 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลากัดด้วย ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25:24:1) 1 ครั้ง และสกัดด้วย คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) อีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นจึงย้ายสารละลายในส่วนบนมาใส่หลอดใหม่ แล้วเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ 70 ไมโครลิตร เติมโซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) ให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร และเติมไอโซโพรพานอลให้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70

เปอร์เซ็นต์ และผึ่งตากจนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ทีอี (TE buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1.0 mM EDTA) ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นจึงตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ [4]

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอกล้วยไม้ทั้ง 13 พันธุ์ ที่สกัดได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะ ได้แก่ ขึ้นดีเอ็นเอบริเวณ ITS ยีน *matK*, *rpoC* 1, *rpoB*, และขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม (ng) ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 0.25 mM $MgCl_2$) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์ที่จำเพาะ 500 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™ life technology, Brazil) 1 ยูนิต โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ ดังนี้ (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 แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ [5]

2.4 การวิเคราะห์ผล

ส่งผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Solgent

ประเทศเกาหลีใต้ เมื่อได้รับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กลับมาแล้วจึงเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะในกล้วยไม้สกุลกุหลาบแต่ละพันธุ์โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 4.0

3. ผลและวิจารณ์

3.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบริเวณ ITS ยีน *matK* และขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ในกล้วยไม้ 13 พันธุ์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน *matK* และขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ได้ครบทั้ง 13 พันธุ์ โดยได้แถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและมีขนาดประมาณ 900 และ 800 คู่เบสตามลำดับ ซึ่งมีขนาดตรงตามที่คาดไว้ แต่ไม่สามารถเพิ่มขึ้นดีเอ็นเอของบริเวณ ITS ได้ครบทุกพันธุ์ ดังนั้นบริเวณ ITS นี้จึงไม่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบขั้นต่อไป เมื่อตรวจสอบและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *matK* และขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้ออกจากกันได้ 11 พันธุ์ อีก 2 พันธุ์ จำแนกออกจากกันไม่ได้ คือ เอื้องกุหลาบชมพูกระปี่กับเอื้องกุหลาบนำน

ดังนั้นจึงเลือกตรวจสอบยีน *rpoC*1 และ *rpoB* เพิ่มเติมเฉพาะเอื้องกุหลาบชมพูกระปี่และเอื้องกุหลาบนำน โดยใช้เอื้องกุหลาบอินทจักรเป็นพันธุ์ควบคุม (control) ซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 3 พันธุ์ ที่เลือกมาตรวจสอบ โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความชัดเจนและมีขนาดประมาณ 500 และ 400 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดตรงตามที่คาดไว้

3.2 การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ

เมื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK*, *rpoC1*, *rpoB* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ในกล้วยไม้ 13 พันธุ์ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับพืชอื่น โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

matK, *rpoC1*, *rpoB* และลำดับนิวคลีโอไทด์ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ในกล้วยไม้ 13 พันธุ์ มีความเหมือนกัน (identity) สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับพืชอื่นและกล้วยไม้อื่นเป็น 99, 98, 99 และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นั้นเป็นชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่ถูกตัด หลังจากนั้นได้ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะในกล้วยไม้ทั้ง 13 พันธุ์ ไว้ในฐานข้อมูล Genbank ของ NCBI ซึ่งได้รับหมายเลขเฉพาะ (accession numbers) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK*, *rpoC1*, *rpoB* และ *trnH-psbA*

กล้วยไม้	หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์			
	<i>matK</i>	<i>trnH-psbA</i>	<i>rpoC1</i>	<i>rpoB</i>
เอื้องกุหลาบแดง	KJ028766	KJ093258	-	-
เอื้องกุหลาบมาลัยแดง	KJ028767	KJ093259	-	-
เอื้องกุหลาบขาว	KJ028768	KJ093260	-	-
เอื้องกุหลาบกระเป๋าคิด	KJ028769	KJ093261	-	-
เอื้องกุหลาบกระเป๋าคิด	KJ028770	KJ093262	-	-
เอื้องกุหลาบพวงชมพู	KJ028771	KJ093263	-	-
เอื้องกุหลาบเหลืองโคราช	KJ028772	KJ093264	-	-
เอื้องกุหลาบอินทจักร	KJ028773	KJ093265	KJ403733	KJ403736
เอื้องกุหลาบชมพูกระปิ	KJ028774	KJ093266	KJ403734	KJ403737
เอื้องกุหลาบน่าน	KJ028775	KJ093267	KJ403735	KJ403738
เอื้องกุหลาบลอลนเซีย	KJ028776	KJ093268	-	-
เอื้องหวดพราหมณ์	KJ028777	KJ093269	-	-
เอื้องกุหลาบควินควิลนอรา	KJ028778	KJ093270	-	-

3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้ทั้ง 13 พันธุ์ มาเปรียบเทียบกับโปรแกรม ClustalW2 พบว่ายีน *matK* มีขนาด 877 นิวคลีโอไทด์ พบ 43

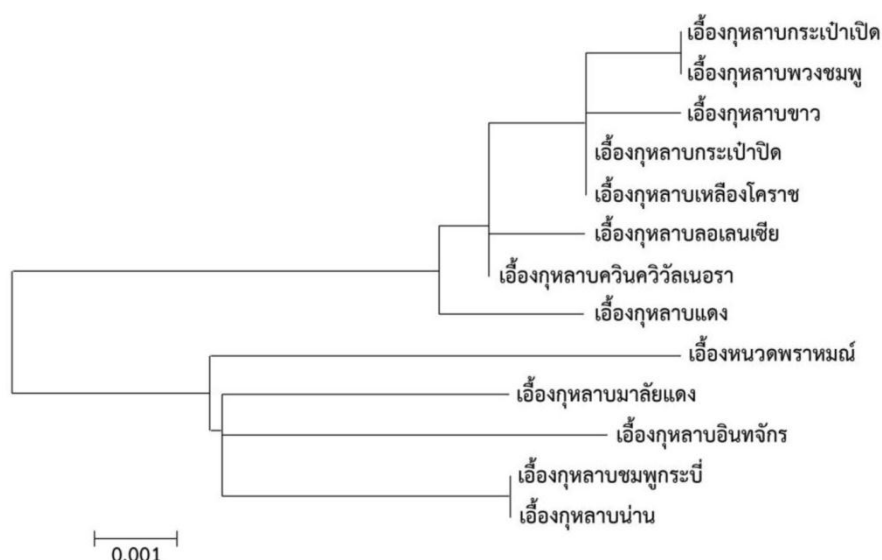
ตำแหน่ง ที่มีความแตกต่างกันในกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ (ตารางที่ 2) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 4.0 โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ neighbor-joining ได้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังรูปที่ 1 โดยมีค่า

สัมประสิทธิ์ความแตกต่าง (distance coefficient) อยู่ระหว่าง 0.000 ถึง 0.016 ซึ่งพบว่าไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้ 6 พันธุ์ ออกจากกัน ได้แก่ เอื้องกุหลาบกระเปาะเปิดกับเอื้องกุหลาบพวงชมพู เอื้องกุหลาบกระเปาะปิดกับเอื้องกุหลาบเหลืองโคราช และเอื้องกุหลาบชมพูกระเปาะกับเอื้องกุหลาบน่าน อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงจะสามารถจำแนกเอื้องกุหลาบพวงชมพูกับเอื้องกุหลาบชมพูกระเปาะได้ เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งมีความหลากหลาย (polymorphism) ที่เกิดจากการกลาย (mutation) ซึ่งพบ 4 รูปแบบ ได้แก่ อินเดล (indel, insertion/deletion) พิวรีนทรานสิชัน (purine transition) ไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine

transition) และทรานสเวอร์ชัน (transversion) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ที่มีความหลากหลาย

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
อินเดล	1-13, 832, 854 และ 872
พิวรีนทรานสิชัน	109, 125, 296, 433, 700, 706 และ 819
ไพริมิดีนทรานสิชัน	23, 235, 648, 675 และ 829
ทรานสเวอร์ชัน	67, 115-116, 186, 324 330, 338, 367, 392, 484, 569, 646, 658, 850 และ 870



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ 13 พันธุ์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK*

ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* มีขนาด 889 นิวคลีโอไทด์ พบ 166 ตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันในกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ (ตารางที่ 3) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 4.0 โดยเลือกวิธี

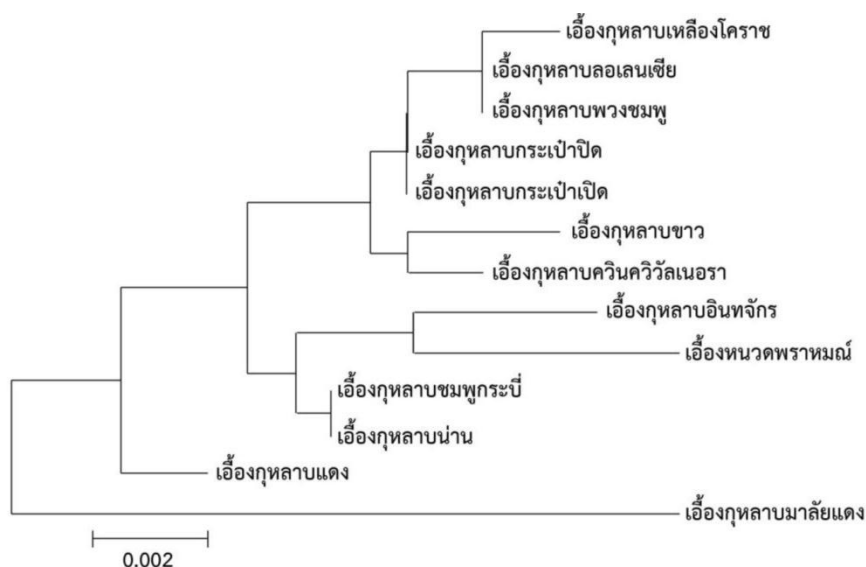
จัดกลุ่มแบบ neighbor-joining ได้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังรูปที่ 2 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างอยู่ระหว่าง 0.000 ถึง 0.024 ซึ่งพบว่าไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้ 6 พันธุ์ ออกจากกัน ได้แก่ เอื้องกุหลาบลอลเลนเซียกับเอื้องกุหลาบพวงชมพู เอื้อง

กุหลาบกระเป๋ากับเอื้องกุหลาบกระเป๋เปิด และ
เอื้องกุหลาบชมพูกระปี้กับเอื้องกุหลาบน่าน อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาที่ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรงจะสามารถจำแนกเอื้องกุหลาบลอลเลนเซียกับเอื้องกุหลาบ
พวงชมพูและเอื้องกุหลาบชมพูกระปี้กับเอื้องกุหลาบ

น่านได้ เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งมีความหลากหลายที่เกิดจากการกลาย ซึ่งพบ 4 รูปแบบ ได้แก่ อินเดล พิวรีนทรานสิชัน ไพริมิดีนทรานสิชัน และทรานสเวอร์ชัน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของซินดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ที่มีความหลากหลายรูปแบบ

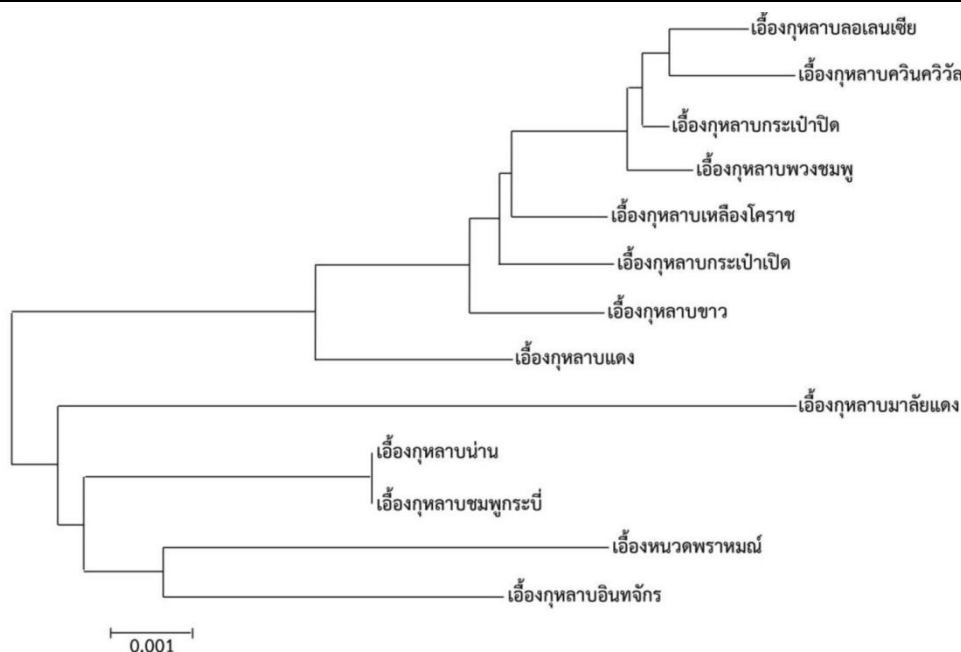
รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
อินเดล	1-7, 14, 22, 27, 40 และ 130
พิวรีนทรานสิชัน	476, 483, 541-542, 553-561, 645-650, 723, 736, 751, 779-792, 798, 868, 869, 871, 876-878 และ 884-886
ไพริมิดีนทรานสิชัน	412, 491, 530, 568, 574, 637-644, 651-656, 658-696, 766-767, 770, 772-778, 820, 836, 861, 872, 873, 875, 879-881, 883 และ 887-888
ทรานสเวอร์ชัน	13, 190, 467, 471, 474, 481, 503-518, 590, 657, 771, 854, 874, 882 และ 889



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ 13 พันธุ์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของซินดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ 2 ตำแหน่ง ดังกล่าวร่วมกัน โดยสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ดังรูปที่ 3 พบว่าไม่สามารถจำแนกเอื้องกุหลาบชมพูกระปี้กับเอื้องกุหลาบ
น่านออกจากกัน ดังนั้นจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ของยีน *rpoC1* และ *rpoB* เพิ่มเติม ซึ่งยีน *rpoC1* มีขนาด 529 นิวคลีโอไทด์ พบ 15 ตำแหน่ง ที่มีความแตกต่างกันในกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ (ตารางที่ 4) และยีน *rpoB* มีขนาด 362 นิวคลีโอไทด์ พบ 7 ตำแหน่ง ที่มีความแตกต่างกันในกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ (ตารางที่ 5)



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ 13 พันธุ์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *trnH* กับ *psbA*

ตารางที่ 4 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ที่มีความหลากหลาย

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
อินเดล	1-2, 11, 12 และ 529
พวรีนทรานสิชัน	3, 9-10, 322 และ 334
ทรานสเวอร์ชัน	6-8, 13 และ 22

ตารางที่ 5 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoB* ที่มีความหลากหลาย

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
อินเดล	1 และ 2
พวรีนทรานสิชัน	6
ไพริมิดีนทรานสิชัน	215, 302 และ 321
ทรานสเวอร์ชัน	7

เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ของยีน *rpoC1* และ *rpoB* (รูปที่ 4 และ 5) พบว่ายีนทั้งสองสามารถจำแนกเอื้องกุหลาบขนพูกระบีกับเอื้องกุหลาบขนพูกระบีออกจากกันได้ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างอยู่ระหว่าง 0.010 ถึง 0.023 และ 0.006 ถึง 0.011 ตามลำดับ

3.4 อภิปรายผล

การวิจัยเกี่ยวกับการสร้างรหัสแท่งดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุล *Holcoglossum* ซึ่งเป็นสกุลที่ใกล้เคียงกับสกุลกุหลาบ โดยเลือกใช้ตำแหน่งจำเพาะ 3 ตำแหน่ง คือ ยีน *matK* ขึ้นดีเอ็นเอของบริเวณ ITS และขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* โดยพบว่าตำแหน่งจำเพาะที่สามารถจำแนกพันธุ์กล้วยไม้ในสกุล *Holcoglossum* ได้ดีที่สุด คือ ยีน *matK* ขึ้นดีเอ็นเอของบริเวณ ITS และขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ตามลำดับ [6] โดยให้ผลต่างจากการวิจัยครั้งนี้ที่ศึกษาในกล้วยไม้สกุลกุหลาบ ซึ่งพบว่าขึ้นดีเอ็นเอของบริเวณ ITS ไม่เหมาะสม เนื่องจากไม่

สามารถเพิ่มปริมาณได้ครบทุกพันธุ์ ทั้งนี้เนื่องจากตำแหน่งที่ใช้เป็นไพรเมอร์สากลเกิดการเปลี่ยนแปลงจนไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าไปจับ นอกจากนั้นยังพบว่า ซีนติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* สามารถจำแนกพันธุ์กล้วยไม้ในสกุลกุหลาบได้ดีกว่ายีน *matK*

อย่างไรก็ตาม ผลการวิจัยในครั้งนี้นี้ยังพบว่ายีน *matK* และซีนติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ก็ยังไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้ทั้ง 13 พันธุ์ แม้ว่าจะนำผลมาวิเคราะห์ร่วมกันก็ยังคงไม่สามารถจำแนกเอื้องกุหลาบชมพูกระป๋กับเอื้องกุหลาบนำนออกจากกัน ดังนั้นจึงได้ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *rpoB* เพิ่มเติม โดยจะเห็นได้ว่าตำแหน่งจำเพาะเพียงตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งไม่สามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ของกล้วยไม้ทั้ง 13 พันธุ์ ออกจากกันได้ทั้งหมด จำเป็นต้องใช้หลายตำแหน่งร่วมกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของณัฐกร และคณะ ที่ศึกษาในพืชสกุล *Alpinia* Roxb. (Zingiberaceae) โดยการใช้ยีน *rpoB* และ *rpoC1* เพียงลำดับจะจำแนกพืชได้ไม่ดี แต่เมื่อใช้ตำแหน่งจำเพาะหลายตำแหน่งมาวิเคราะห์ร่วมกันจะสามารถจำแนกพืชได้ดีขึ้น [7]

เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจะเห็นได้ว่าเอื้องหมวดพราหมณ์มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับกล้วยไม้สกุลกุหลาบมาก ทั้ง ๆ ที่เอื้องหมวดพราหมณ์อยู่ในสกุลหมวดพราหมณ์ซึ่งที่สอดคล้องกับงานวิจัยของณฤมล และคณะ [9] ทั้งนี้เนื่องจากเอื้องหมวดพราหมณ์เดิมจัดอยู่ในสกุลกุหลาบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1864 โดย Heinrich Gustav Reichenbach แต่ปัจจุบันจัดอยู่ในสกุลหมวดพราหมณ์โดย Gunnar Seidenfaden ในปี ค.ศ. 1972 [8] แสดงให้เห็นว่าการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะสัณฐานเพียงอย่างเดียวอาจเกิดปัญหาขึ้นได้

กล้วยไม้สกุลกุหลาบชนิดหรือสปีชีส์ (species) เดียวกันแต่ต่างพันธุ์ (variety) ได้แก่ เอื้องกุหลาบ

กระเปาเปิดกับเอื้องกุหลาบพวงชมพู และเอื้องกุหลาบกระเปาปิดกับเอื้องกุหลาบขาว ควรจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน แต่จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สร้างขึ้นพบว่าไม่เป็นเช่นนั้น ทั้งนี้เนื่องจากการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียงไม่กี่ตำแหน่งซึ่งมีขนาดเล็กมากเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของจีโนม (genome) พืชทั้งหมด ดังนั้นจึงไม่สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ดีเท่ากับเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ชนิดอื่นที่นิยมใช้ในการตรวจสอบทั้งจีโนมพืช ได้แก่ แฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA) หรือ ไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter-simple sequence repeat) เป็นต้น [9]

นอกจากนี้ยังพบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *matK* ให้ผลใกล้เคียงกับลักษณะสัณฐานมากกว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากซีนติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่ใช้ยีน *matK* และซีนติเอ็นเอของตำแหน่งจำเพาะอื่น ๆ ในการจำแนกพันธุ์กล้วยไม้ โดยพบว่ายีน *matK* มีความสามารถในการจำแนกมากกว่าตำแหน่งจำเพาะอื่น ๆ เช่น งานวิจัยของ Asahina และคณะ พบว่ายีน *rbcl* มีความสามารถในการจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายได้น้อยกว่ายีน *matK* [10]

4. สรุป

การจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลกุหลาบ 12 พันธุ์ และสกุลหมวดพราหมณ์ 1 พันธุ์ โดยตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ 3 ตำแหน่ง คือ ซีนติเอ็นเอบริเวณ ITS ยีน *matK* และซีนติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* พบว่าบริเวณ ITS ไม่สามารถเพิ่มปริมาณซีนติเอ็นเอของกล้วยไม้ได้ครบทั้ง 13 พันธุ์ จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ เมื่อตรวจสอบลำดับ

นิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 และ MEGA 4.0 พบว่ายีน *matK* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* สามารถจำแนกพันธุ์กล้วยไม้ได้ 11 พันธุ์ แต่ไม่สามารถแยกเอื้องกุหลาบชมพูกระป๋องกับเอื้องกุหลาบนำนออกจากกัน แต่เมื่อตรวจสอบและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *rpoB* เพิ่มเติมจึงสามารถจำแนกเอื้องกุหลาบชมพูกระป๋องกับเอื้องกุหลาบนำนออกจากกันได้

5. เอกสารอ้างอิง

- [1] อบฉันท ไททอง, 2543, กล้วยไม้เมืองไทย, พิมพ์ครั้งที่ 1, บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.
- [2] Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L. and de Waard, J.R., 2003, Biological identifications through DNA barcodes, *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 313-321.
- [3] 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.
- [4] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [5] Siripiyasing, P., Kaenratana, K., Mookamul, P., Tanee, T., Sudmoon, R. and Chaveerach, A., 2011, Species diversity and molecular markers as barcodes of the *Cymbidium* species (Orchidaceae) in Thailand, *Afr. J. Agric. Res.* 7: 393-400.
- [6] Xiang, X.G., Hu, H., Wang, W. and Jin, X.H., 2011, DNA barcoding of the recently evolved genus *Holcoglossum* (Orchidaceae: Aridinae): A test of DNA barcode candidates, *Mol. Ecol. Resour.* 11: 1012-1021.
- [7] อนุรักษ์ เพชรชา, ดวงกมล แม้นศิริ และสุรพล แสนสุข, 2554, การประเมินดีเอ็นเอในพลาสติกบริเวณ *rpoC1* และ *rpoB* ในการใช้เป็น DNA Barcode และกรณีศึกษาในพืชสกุล *Alpinia* Roxb. (Zingiberaceae), pp. 554-563, ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 12, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- [8] Harvard University, 1932, *Botanical Museum Leaflets*, Cambridge, Mass.
- [9] นฤมล ธนาคันต์, วิสรา แทนสง่า และธีระชัย ธนาคันต์, 2557, การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟที, *ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 22: 317-326.
- [10] Asahina, H., Shinozaki, J., Masuda, K., Morimitsu, Y. and Satake, M. 2010, Identification of medicinal *Dendrobium* species by phylogenetic analyses using *matK* and *rbcL* sequences, *J. Nat. Med.* 64: 133-138.