

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้
สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL*
และซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*
Phylogenetic Analysis of *Vanda* Section *Ascocentrum*
Based on Nucleotide Sequences of *rbcL* Gene and
trnH-psbA Intergenic Spacer Region

จันทน์ ทองสม, ภัทรพร คุ่มภัย และธีระชัย ธนานันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Jin Tongsom, Phataraporn Khumphai 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

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มที่พบในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้
สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ด้วยวิธี neighbor-
joining, maximum parsimony และ maximum likelihood เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนก
กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มด้วยลำดับดีเอ็นเอ พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์
ของซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* สามารถแยกชนิดกล้วยไม้ได้ดี แต่แผนภูมิความสัมพันธ์ทาง
พันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* มีประสิทธิภาพต่ำกว่า คือ สามารถแยกชนิดกล้วยไม้ได้น้อยกว่า
ซึ่งเกิดจากมีอัตราการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำ อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ

*ผู้รับผิดชอบบทความ : narumolpla@yahoo.com

ร่วมกันสามารถแยกชนิดกล้วยไม้เป็น 3 กลุ่ม ที่มีความสัมพันธ์กันภายในกลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสอดคล้องกับแหล่งแพร่กระจายพันธุ์ โดยข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอนุกรมวิธาน การอนุรักษ์พันธุกรรม และการปรับปรุงพันธุ์

คำสำคัญ : กล้วยไม้; สกุลแวนด้า; หมู่ม; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; ลำดับนิวคลีโอไทด์

Abstract

Phylogenetic trees of *Vanda* section *Ascocentrum* from Southeast Asia were constructed using nucleotide sequences of *rbcl* gene and *trnH-psbA* intergenic spacer region. The datasets were analyzed with neighbor-joining, maximum parsimony, and maximum likelihood method to study intraspecific relationships and molecular identification by DNA sequences. The phylogenetic tree constructed from nucleotide sequences of *trnH-psbA* intergenic region reveals effective discriminated each species, whereas nucleotide sequences of *rbcl* gene proposed lower separating capability because of low rate of nucleotide substitution. However, result of combined phylogeny can correlative grouped into 3 clades that demonstrated congruent genetic relationship with ecological resource. This research information can be applied to taxonomic investigation, plant genetic conservation and breeding.

Keywords: orchid; *Vanda*; *Ascocentrum*; genetic relationship; nucleotide sequence

1. บทนำ

สำนักพัฒนาการค้าและธุรกิจเกษตรและอุตสาหกรรม กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ รายงานสถานการณ์กล้วยไม้ไทย ปี พ.ศ. 2558 ว่าตลาดกล้วยไม้เขตร้อนขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างมาก โดยกล้วยไม้ส่งออกสำคัญของไทย ได้แก่ หวาย (*Dendrobium*) มอคคาร่า (*Mokara*) และ แวนด้า (*Vanda*) แต่พบว่ามีปัญหาที่สำคัญต่อการส่งออกกล้วยไม้ คือ ขาดความหลากหลายและมีความซ้ำซ้อนในการจำแนกพันธุ์ ดังนั้นการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้า หมู่มจึงสอดคล้องกับแนวทางแก้ปัญหานี้ โดยพืชในวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae) ที่แพร่กระจายพันธุ์อยู่ทั่วโลกนั้น ค้นพบแล้วประมาณ 25,000 ชนิด จำแนก

หมวดหมู่มเป็น 5 วงศ์ย่อย ได้แก่ Apostasioideae, Cypripedioideae, Epidendroideae, Orchidoideae และ Vanilloideae [1] โดยกล้วยไม้สกุลแวนด้า จัดอยู่ในวงศ์ย่อย (subfamily) Epidendroideae เผ่า (tribe) Vandae เผ่าย่อย (subtribe) Aeridinae ซึ่งพบแพร่กระจายพันธุ์ในแถบเขตร้อนชื้นทั่วทั้งภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย และออสเตรเลีย [2]

กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่มเดิมจัดอยู่ในสกุลเข็ม (*Ascocentrum*) ต่อมาเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของตำแหน่งจำเพาะบางบริเวณร่วมกันภายในเผ่าย่อย Aeridinae [3] พบว่าสกุลเข็มมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับสกุลแวนด้าสูง ดังนั้นจึงได้จัดจำแนกหมวดหมู่มใหม่ โดยให้สกุลเข็มรวมอยู่ในสกุลแวนด้า [4] ปัจจุบันกล้วยไม้สกุลแวนด้า

ประกอบด้วย 13 หมู่ ได้แก่ หมู่แวนด้า (Vanda) หมู่เข็ม (Ascocentrum) หมู่แอสโคเซนโทรซิส (Asco-centrosis) เป็นต้น [5]

กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มมีลักษณะเฉพาะที่ต่างจากกล้วยไม้ในสกุลแวนด้าชนิดอื่น คือ เตี้ยดอก (mentum) มีลักษณะเป็นถุงยาว สามารถผลิตน้ำหวานภายในถุงได้ โดยขนาดของปากดอก (labellum) และความยาวของเตี้ยดอกจะพอดีกับปากของนก อีกทั้งดอกมีเกดสีส้ม แดง และม่วง เป็นช่วงสีที่นกสามารถมองเห็นได้ง่าย ทั้งนี้เพื่อล่อให้นักช่วยผสมเกสร [6,7] โดยพบกระจายพันธุ์ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย 3 ชนิด คือ เข็มม่วง เข็มแดง และเข็มแสด พบกระจายพันธุ์เฉพาะแถบชายแดนทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และประเทศเวียดนามอีก 2 ชนิด คือ เข็มเวียดนามและเข็มยูนนาน

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรมพัฒนาขึ้นเพื่อใช้จำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ปัจจุบันนิยมใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่มีเทคนิคการทำงานง่ายและให้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่แสดงความคล้ายคลึง (monomorphic) และความหลากหลาย (polymorphic) ระหว่างสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถคำนวณตามหลักสมการอัลกอริทึม (algorithm) ทางคณิตศาสตร์และวิเคราะห์ด้วยแบบจำลอง (model) เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ที่สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ [8] นอกจากนี้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของตำแหน่งจำเพาะ (specific site) สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตได้อย่างแม่นยำ สะดวก และรวดเร็ว โดยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะในพืชที่ต้องการจำแนกหรือต้องการทราบชนิด ซึ่งใช้ปริมาณดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย นำมาเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอมาตรฐานด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

(polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์สากล (universal primer) แล้วนำผลผลิตที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นจึงสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

ขึ้นดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตำแหน่งจำเพาะสำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมักเลือกใช้บริเวณที่มีความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) สูง แต่ยังคงมีลำดับอนุรักษ์ (conserved sequence) ที่ปลาย 5' และ 3' อีกทั้งต้องมีขนาดไม่ยาวมาก โดยบริเวณที่เหมาะสมสำหรับวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสามารถใช้เป็นรหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode) สำหรับพืชคือดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ซึ่งมีตำแหน่งจำเพาะ ได้แก่ ยีน *rbcl*, *matK*, *rpoC1*, *rpoB* และขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* [9-14] อย่างไรก็ตาม บทความวิจัยที่เคยรายงานมาก่อน เสนอว่าสำหรับพืชควรใช้ตำแหน่งจำเพาะ 2-3 บริเวณ ร่วมกัน เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องและแม่นยำเพิ่มขึ้น ได้แก่ ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*, *rpoB* และ *MatK* ร่วมกัน หรือใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*, *matK* และ *trnH-psbA* ร่วมกัน หรือใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และ *trnH-psbA* ร่วมกัน [10,12-14] เป็นต้น

งานวิจัยนี้ได้เลือกตำแหน่งจำเพาะที่เสนอไว้ว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ผันแปร (variation) เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) และการจำแนกชนิด (molecular identification) ในพืช 2 บริเวณ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* เพื่อวิเคราะห์ในกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ซึ่ง

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ได้ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาด้านอนุกรมวิธานและการจำแนกชนิดกล้วยไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจในอนาคตต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 ตัวอย่างกล้วยไม้

กล้วยไม้สกุลแวนด้า 11 ชนิด ที่ใช้ในการวิจัยนี้แบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือ

2.1.1 กล้วยไม้หมู่เข็มที่พบในประเทศไทย 4 ชนิด ได้แก่ เข็มแสด [*Vanda garayi* (Lindl.) L.M. Gardiner] เข็มแดง [*V. curvifolia* (Lindl.) L.M. Gardiner] เข็มม่วง [*V. ampullacea* (Roxb.) L.M. Gardiner] และเข็มแสดใต้ [*V. miniata* (Lindl.) L.M. Gardiner]

2.1.2 กล้วยไม้หมู่เข็มหายาก 1 ชนิด ได้แก่ เข็มเวียดนาม [*V. chris-tensoniana* (Haager) L.M. Gardiner]

2.1.3 กล้วยไม้หมู่แอสโคเซนโทรซิส 1 ชนิด ได้แก่ เข็มยูนนาน [*V. nana* (Avar.) L.M. Gardiner]

2.1.4 กล้วยไม้หมู่ที่เกิดจากการกลาย (mutation) ซึ่งมีสีกลีบดอกเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม 4 ชนิด ได้แก่ เข็มม่วงเผือก (*V. ampullacea* var. *album*) เข็มม่วงดอกส้ม (*V. ampullacea* var. *aurantiacum*) เข็มม่วงดอกแดง (*V. ampullacea* var. *moulmeinense*) และเข็มเวียดนามดอกส้ม (*V. christensoniana* “orange”)

2.1.5 กล้วยไม้หมู่ลูกผสม (*V. hybrid*)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ด้วยวิธีที่ประยุกต์

Doyle และ Doyle [15] โดยบดใบกล้วยไม้ปริมาณ 2-3 กรัม ในบัฟเฟอร์สกัด (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 และเติมพอลิไวนิลไพโรลิโดน (PVP, polyvinylpyrrolidone) ปริมาณ 0.3 กรัม เมื่อบดจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกันแล้วจึงเทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เติมนิวคลีโอไทด์ (β-mercapto-ethanol) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยผสมด้วยการพลิกหลอไปมาเป็นระยะ ๆ เมื่อครบเวลาจึงนำออกมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 × g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมนิวคลีโอไทด์อะคริลามิด (linear polyacrylamide) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 × g เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล (ethanol) ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ทีอี (TE: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วถ่ายสารละลายใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ RNase A (10 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

อัตราส่วน 25:24:1 (phenol : chloroform : iso-amylalcohol = 25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 × g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิ ลิตร ใหม่ แล้วเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 × g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมนิเอียร์พอลิอะครีลาไมด์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate pH 5.2) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทั้งหมด และไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรทั้งหมด นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 × g เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ทีอี ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นจึงตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่-พอลิเมอเรส โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ของกลายไม้แต่ละชนิดเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ร่วมกับคูไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *rbcl* (*rbcl*-F คือ 5'-TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC-3' และ *rbcl*-R คือ 5'-GGC ACA AAA TAA GAA ACG ATC TC-3') และจำเพาะกับชิ้น

ดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* (*psbA*-F คือ 5'-CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC-3' และ *trnH*-R คือ 5'-GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C-3') ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายผสมสำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส คือ *Taq* DNA polymerase (5 U/μl) (RBC Bioscience, Taiwan) dNTP (2 mM) บัฟเฟอร์ (10X) และน้ำ รวมปริมาตรสุทธิ 40 ไมโครลิตร และกำหนดสภาวะการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที แล้วกำหนดให้เริ่มต้นปฏิกิริยาซ้ำที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที โดยให้ทำปฏิกิริยาจนครบ 35 รอบ แล้วสิ้นสุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

2.4 การวิเคราะห์ผล

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ในกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มพันธุ์ต่าง ๆ โดยนำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท Solgent (ประเทศเกาหลีใต้) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปตรวจสอบความถูกต้องด้วยการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST และฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไว้ในฐานข้อมูล GenBank ด้วย

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละบริเวณมาวิเคราะห์ด้วยการจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกัน (multiple alignment) ให้ถูกต้องตรงกันทุกชนิด โดยใช้โปรแกรม ClastalW ในฐานข้อมูลออนไลน์ [16] หลังจากนั้นจึงวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม MEGA 6.0

(Molecular Evolutionary Genetics Analysis) [17] และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มจากระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ที่ได้จากวิธี neighbor joining (NJ), maximum parsimony (MP) และ maximum likelihood (ML) แล้วเปรียบเทียบแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากแต่ละวิธี

3. ผลและวิจารณ์

เมื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbcl* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวในกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มได้ครบทุกตัวอย่าง และเมื่อนำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิสก็ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายเพียง 1 แถบ (band) ซึ่งมีขนาดตามที่คาดไว้ หลังจากนำส่งไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* มีขนาด 665-668 คู่เบส (base pairs) และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* มีขนาด 862-886 คู่เบส เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะนั้นในกล้วยไม้ชนิดอื่น จากนั้นได้ฝากเก็บลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ในฐานข้อมูล Genbank มีหมายเลขเฉพาะ (accession number) ดังตารางที่ 1

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ในกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มและหมู่แอลโคเซนโทรซิส รวม 11 ชนิด ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่ามีการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ (substitution) ในกล้วยไม้แต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยพบตำแหน่งผันแปร (variable site) ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* 31 ตำแหน่ง

ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ (parsimony information site) 19 ตำแหน่ง เป็นลำดับที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงครั้งเดียว (singleton) 12 ตำแหน่ง และพบตำแหน่งผันแปรในลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* 29 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ 22 ตำแหน่ง เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงครั้ง-

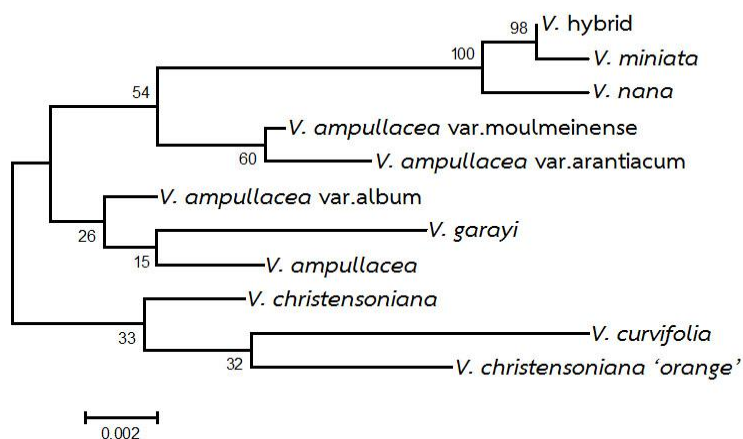
ตารางที่ 1 หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbcl* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ในกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มและหมู่แอลโคเซนโทรซิส

พันธุ์กล้วยไม้	หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์	
	<i>rbcl</i>	<i>trnH-psbA</i>
<i>V. curvifolia</i>	KP772706	KP297975
<i>V. garayi</i> 'yellow'	KP772707	KP297976
<i>V. garayi</i>	KP772708	KP297977
<i>V. ampullacea</i>	KP772709	KP297978
<i>V. ampullacea</i> var. <i>album</i>	KP772710	KP297979
<i>V. ampullacea</i> var. <i>moulmeinense</i>	KP772711	KP297980
<i>V. ampullacea</i> var. <i>aurantiacum</i>	KP772712	KP297981
<i>V. christensoniana</i>	KP772713	KP297982
<i>V. christensoniana</i> 'orange'	KP772714	KP297983
<i>V. nana</i>	KP772715	KP297984
<i>V. miniata</i>	KT581392	KT581391

เดียว 7 ตำแหน่ง นอกจากนั้นยังพบว่าการเพิ่มขึ้น (insertion) และขาดหายไป (deletion) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือเรียกว่าอินเดล (indel) ซึ่งให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วย โดยพบ 3 ตำแหน่ง ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และพบ 54 ตำแหน่ง ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 บริเวณ ไปวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 โดยวิธี NJ, MP และ ML พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ให้ค่าดัชนีความสอดคล้อง (consistency index) 0.645161 และค่าดัชนีการกักเก็บ (retention index) 0.738095 ซึ่งสามารถจำแนกชนิดกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้ง 11 ชนิดได้ แต่การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมยังไม่สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานและอนุกรมวิธาน โดยเข็มแสดได้และเข็มลูกผสมจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเขมยูนนานซึ่งเป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (out group) ส่วนเข็มม่วงแยกออกจากเข็มม่วงเผือก เข็มม่วงดอกแดง และเข็มม่วงดอกส้ม ทั้งที่น่าจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ดังรูปที่ 1 ซึ่งผลการจัดกลุ่มนี้แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอ-

ไทด์ของยีน *rbcL* ยังมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการหารหัสแท่งดีเอ็นเอในพืชดอกที่พบว่ายีน *rbcL* มีประสิทธิภาพในการแยกทางวิวัฒนาการต่ำที่สุด [18] นอกจากนี้ยังพบว่ามีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดกล้วยไม้สกุลหวายต่ำกว่ายีน *matK* เมื่อใช้ในการระบุชนิดกล้วยไม้สมุนไพรสกุลหวาย โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* มีอัตราการวิวัฒนาการต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอื่น ๆ เนื่องจากมีอัตราการแทนที่ต่ำ ดังนั้นจึงให้ข้อมูลในการวิเคราะห์เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมไม่เพียงพอ ส่งผลให้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดกล้วยไม้ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันไม่ถูกต้อง [19-21] อย่างไรก็ตาม ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* มีประสิทธิภาพในการจำแนกพืชหลายชนิดได้ในระดับวงศ์ รวมทั้งวงศ์กล้วยไม้ด้วย ดังนั้นจึงสามารถใช้จำแนกได้ดีในระดับเผ่า โดยสามารถแบ่งกล้วยไม้เป็น 5 เผ่าย่อย ได้อย่างถูกต้อง และยังสามารถจำแนกได้ถึงระดับสกุลที่แตกต่างกัน นอกจากนั้นยังพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างพืชดอกที่ใช้ศึกษา-

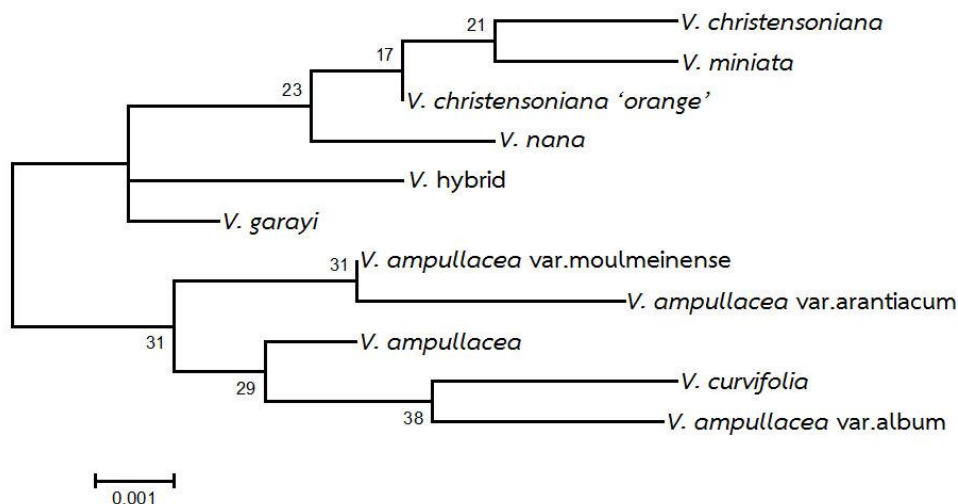


รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood

หารหัสแท่งดีเอ็นเอได้สูงถึง 98 % [18,20-22]

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* พบว่ามีค่าดัชนีความสอดคล้อง 0.535714 และค่าดัชนีการกักเก็บ 0.593750 สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มได้สอดคล้องกับแหล่งแพร่กระจายพันธุ์ เช่น เข้มแดงกับเข้มน่วงมักพบในบริเวณภาคเหนือตอนล่างและภาคอีสาน เข้มเวียดนามกับเข้มนูนานมักพบบริเวณภาคเหนือตอนบนและประเทศเวียดนามตอนบน แต่เมื่อพิจารณาผลการจำแนกในระดับชนิดพบว่ายังจัดกลุ่มได้ไม่ถูกต้องนัก เช่น เข้มเวียดนามน่าจะใกล้ชิดกับเข้มนูนานดอกส้มที่เป็นพันธุ์กลาย (mutant) ดังรูปที่ 2 อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ให้ผลดีกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* มีอินทรอน

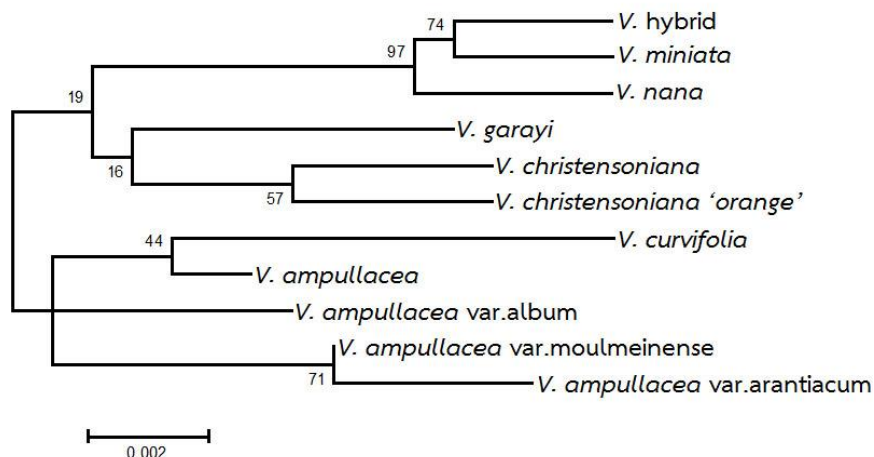
(intron) ที่ไม่มีการแปลรหัส (translation) ดังนั้นจึงมีโอกาสผันแปรสูงกว่า นอกจากนี้ยังอาจมีการเพิ่มขึ้นและขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์สูงกว่า ซึ่งผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานที่เสนอว่าชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* นั้น ส่วนอินทรอนจะเกิดการผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ขึ้นภายในบริเวณนี้ได้แม้ว่าจะอยู่ในสกุลเดียวกัน ส่งผลให้ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยรวมเกิดความผันแปรสูง ดังนั้นจึงแสดงความแตกต่างระหว่างพืชแต่ละชนิดและสามารถใช้ในการแยกพืชแต่ละชนิดออกจากกันได้มากที่สุด อีกทั้งยังสามารถระบุชนิดภายในวงศ์กล้วยไม้ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* นอกจากนี้ยังพบว่าพืชในวงศ์กล้วยไม้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำของยีน *rps19* แทรกอยู่ระหว่างลำดับอนุกรมวิธานที่เพิ่มขึ้นมาโดยมีผลต่อความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในวงศ์กล้วยไม้ ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการวิวัฒนาการที่ซับซ้อนของยีนที่อยู่บนส่วนลำดับซ้ำแบบกลับทิศ (inverted repeat) ในคลอโรพลาสต์ [18,23,24]



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood

อย่างไรก็ตาม การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณเดียวเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ดังนั้นจึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ มาวิเคราะห์ร่วมกัน ซึ่งทั้ง 2 บริเวณ เคยมีรายงานที่เสนอให้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับพืช โดยให้ใช้ร่วมกันหรือใช้ร่วมกับบริเวณอื่น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม [10,12-14,18,23,25,26] ผลการวิเคราะห์พบว่าค่าความสอดคล้อง 0.522388 และค่าค่าดัชนีการกักเก็บ 0.567568 โดยแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงให้เห็นว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของชนิดกล้วยไม้ได้ดีขึ้น โดยแบ่งกล้วยไม้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ที่สอดคล้องกับแหล่งแพร่กระจายพันธุ์ และมีการแบ่งกลุ่มย่อยลงไปตามลักษณะที่ใกล้ชิดกัน ดังรูปที่ 3 ซึ่งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแสดงให้เห็นว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *trnH* และ *psbA* มีประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้สกุล

แวนด้าหมู่เข็มแต่ละชนิดออกจากกันได้ สอดคล้องกับการจำแนกด้วยวิธีการตรวจสอบลักษณะสัณฐานอนุกรมวิธาน และผลการจัดกลุ่มของกล้วยไม้ในสกุลแวนด้า สกุลกุหลาบ และสกุลสิงโตกลอกตา [27-31] สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มได้ แม้ว่าเข็มแดดใต้และเข็มลูกผสมจะจัดกลุ่มรวมกับเข็มยูนนานที่เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม ซึ่งจัดอยู่ในสกุลเดียวกันแต่ต่างหมู่ แสดงให้เห็นว่า 2 กลุ่ม นี้มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกันมาก โดยผลการจัดกลุ่มที่ไม่สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานนี้อาจเกิดจากการมีความผันแปรทางพันธุกรรมไม่มากพอหรืออาจมีการวิวัฒนาการร่วมกันจากความใกล้ชิดของแหล่งแพร่กระจายพันธุ์ ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มให้สูงขึ้นควรใช้ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะอื่นเพิ่มเติม ได้แก่ ยีน *matK* ยีน *rpoC1* เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้ผลการจำแนกกลุ่มมีความถูกต้องและแม่นยำสูงขึ้น ซึ่งอาจต้องมีการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้-



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *trnH* กับ *psbA* ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี maximum likelihood

สกุลแวนด้าหมู่เข็มในงานวิจัยนี้ก็เป็นประโยชน์สำหรับใช้เป็นเครื่องมือในการระบุชนิดกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม การอนุรักษ์พันธุกรรม การปรับปรุงพัฒนาพันธุ์ และการศึกษาด้านอนุกรมวิธานต่อไปได้

4. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป” ปี พ.ศ. 2558 ฉบับที่ ทน ๒๑/๒๕๕๘

5. รายการอ้างอิง

- [1] Dressler, R.L., 2005, How many orchid species ?, *Selbyana* 26: 155-158.
- [2] Wilma, R. and Brian, R., 2009, *The Amazing World of Orchids*, Quadrille Publishing, Ltd., Aihambra house, London.
- [3] Gardiner, L.M., Kocyan, A., Motes, M., Roberts, D.L. and Emerson, B.C., 2013, Molecular phylogenetics of *Vanda* and related genera (Orchidaceae), *Bot. J. Linn. Soc.* 173: 549-572.
- [4] Gardiner, L.M., 2012, New combinations in the genus *Vanda* (Orchidaceae), *Phytotaxa* 61: 47-54.
- [5] Gardiner, L.M. and Cribb, P.C., 2013, *Vanda*, *Renziana* 3: 1-96.
- [6] Stpiczyn'ska, M., Davies, K.L. and Kaminska, M., 2011, Comparative anatomy of the nectary spur in selected species of Aeridinae (Orchidaceae), *Ann. Bot.* 107: 327-345.
- [7] Topik, H., Yukawa, T. and Ito, M., 2005, Molecular phylogenetics of subtribe Aeridinae (Orchidaceae): Insights from plastid *matK* and nuclear ribosomal ITS sequences, *J. Plant Res.* 118: 271-284.
- [8] Simson, M.G., 2012, *Plant Systematics*, 2nd Ed., Elsevier & Academic press, London.
- [9] 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. Nat. Acad. Sci.* 102: 8369-8374.
- [10] Chase, M.W., Cowan, R.S., Hollingsworth, P.M., Berg, C.V.D., Madriñán, S., Petersen, G., Seberg, O., Jørgensen, T., Cameron, K.M., Carine, M., Pedersen, N., Hedder-son, T.A.J., Conrad, F., Salazar, G.A., Richardson, J.E., Hollingsworth, M.L., Barracough, T.G., Kelly, L. and Wilkinson, M., 2007, A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants, *Taxon* 56: 295-299.
- [11] Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N. and Hickey, D.A., 2007, DNA barcoding: How it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics, *Trends genet.* 23: 167-172.
- [12] Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Timothy G. Barracough, and Savolainen, V., 2007, DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 105: 2923-2928.

- [13] Hollingsworth, P.M., 2008, DNA barcoding plants in biodiversity hot spots: Progress and outstanding questions, *Heredity* 101: 1-2.
- [14] Ford, C.S., Ayres, K.L., Toomey, N., Haider, N., Stahl, J.V.A., Kelly, L.J., Wikström, N., Hollingsworth, P.M., Duff, R.J., Hoot, S.B., Cowan, R.S., Chase, M.W. and Wilkinson, M.J., 2009, Selection of candidate coding DNA barcoding regions for use on land plants, *Bot. J. Linn. Soc.* 159: 1-11.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S., 2013, MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- [18] 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. Nat. Acad. Sci.* 102: 8369-8374.
- [19] 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.
- [20] Luo, J., Hou, B.W., Niu, Z.T., Liu, W., Xue, Q.Y. and Ding, X.Y., 2014, Comparative chloroplast genomes of photosynthetic orchids: Insights into evolution of the Orchidaceae and development of molecular markers for phylogenetic applications, *PLoS ONE* 9(6): e99016.
- [21] Freudenstein, J.V. and Chase, M.W., 2014, Phylogenetic relationships in Epidendroidae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: Progressive specialization and diversification, *Ann. Bot.* 115: 665-681.
- [22] Cameron, K.M., Chase, M.W., Whitten, W.M., Kores, P.J., Jarrell, D.C., Albert, V.A., Yukawa, T., Hills, H.G. and Goldman, D.H., 1999, A phylogenetic analysis of the Orchidaceae: Evidence from *rbcl* nucleotide sequences, *Am. J. Bot.* 86: 208-224.
- [23] 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 *trnH-psbA* spacer region, *PLoS ONE* 2(6): e508.
- [24] Štorchová, H., and Olson, M.S., 2007, The architecture of the chloroplast *psbA-trnH*

- non-coding region in angiosperms, *Plant Syst. Evol.* 268: 235-256.
- [25] Whitlock, B.A., Hale, A.M. and Groff .P.A., 2010, Intraspecific inversions pose a challenge for the *trnH-psbA* plant DNA barcode, *PLoS ONE* 5(7): e11533.
- [26] Tanee, T., Chadmuk, P., Sudmoon, R., Chaveerach, A. and Noikotr, K., 2012, Genetic analysis for identification, genomic template stability in hybrids and barcodes of the *Vanda* species (Orchidaceae) of Thailand, *Afr. J. Biotechnol.* 55: 11772-11781.
- [27] Kocyan, A., Vogel, E.F.D., Conti, E. and Gravendeel, B., 2008, Molecular phylogeny of *Aerides* (Orchidaceae) based on one nuclear and two plastid markers: A step forward in understanding the evolution of the Aeridinae, *Mol. Phylogenet. Evol.* 48: 422-443.
- [28] Zhang, G.Q., Liu, K.W., Chen, L.J., Xiao, X.J., Zhai, J.W., Li, L.Q., Cai, J., Hsiao, Y.Y., Rao, W.H., Huang, J., Ma, X.Y., Chung, S.W., Huang, L.Q., Tsai, W.C. and Liu, Z.J., 2013, A new molecular phylogeny and a new genus, *Pendulorchis*, of the *Aerides-Vanda* alliance (Orchidaceae: Epidendroideae), *PLoS ONE* 8(4): e60097.
- [29] Chase, M.W., Cameron, K.M., Freudenstein, J.V., Pridgeon, A.M., Salazar, G., Denber, C.V. and Schuiteman, A., 2015, An updated classification of Orchidaceae, *Bot. J. Linn. Soc.* 177: 151-174.
- [30] นฤมล ธนानันต์, วริศรา แทนสง่า และจีระชัย ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหลากหลายด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ, *ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 22: 664-673.
- [31] นฤมล ธนานันต์, เกียรติชัย แซ่ใต้ และจีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ, *ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 22: 523-530.