

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกชนิด
ของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์
ของยีน *matK* และ *rpoC1*

Assessment of Genetic Relationship and Identification
of *Vanda* section *Ascocentrum* by Using
Nucleotide Sequences of *matK* and *rpoC1* genes

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

จินต์ ทองสม, ชนิตโชติ ปิยพิทยานันต์ 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

Jin Tongsom, Chanitchote Piyapittayanun and Theerachai Thanananta*

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

บทคัดย่อ

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มที่พบเฉพาะในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งสร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และยีน *rpoC1* ด้วยวิธี neighbor-joining และ maximum likelihood พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถใช้จำแนกกลุ่มกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มได้ครบทุกชนิดและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ การจำแนกและการจัดกลุ่มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเพียงยีนเดียวนั้นมีความผันแปรไปจากผลที่คาดหวัง เนื่องจากมีข้อมูลไม่เพียงพอ เมื่อใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 2 บริเวณ ร่วมกัน พบว่ามีค่า CI และ RI เท่ากัน 0.62 และ 0.72 ตามลำดับ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองสามารถแสดงการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มได้อย่างน่าเชื่อถือมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานและการจัด

*ผู้รับผิดชอบบทความ : thana@tu.ac.th

กลุ่มใหม่ของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1* มีความเหมาะสมต่อการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มในระดับที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 2 บริเวณ ร่วมกันจะให้ข้อมูลเพียงพอต่อการศึกษาชนิดของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษารังนี้จึงสามารถนำไปใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ได้ รวมทั้งใช้เป็นข้อมูลสำหรับการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชและอนุกรมวิธานกล้วยไม้ในประเทศไทยต่อไป

คำสำคัญ : กล้วยไม้; แวนด้า; หมู่เข็ม; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การจำแนก; ยีน *matK*; ยีน *rpoC1*

Abstract

Phylogenetic trees of *Vanda* section *Ascocentrum* localized in Southeast Asia was constructed using *matK* and *rpoC1* genes followed neighbor-joining and maximum likelihood. It was shown that chloroplast DNA could be used as markers to classify all of *Vanda* section *Ascocentrum* and revealed genetic relationships among species. While grouping and classification by a single gene reached some limitations, combined two gene datasets could effective divide groups of *Vanda* section *Ascocentrum* with CI and RI value of 0.62 and 0.72, respectively and was also consistent with results from morphological classification. In addition, it was obvious that clustering of *Vanda* section *Ascocentrum* by using *matK* and *rpoC1* genes was instrumental to study genetic relationship among closed related orchid species. Knowledge obtained in this study provides a practical database of orchid genetic diversity that can be beneficial for various application including orchid taxonomy, breeding, as well as plant conservation as whole.

Keywords: orchid; *Vanda*; section *Ascocentrum*; genetic relationship; identification; *matK*; *rpoC1*

1. บทนำ

กล้วยไม้ (Orchidaceae) จัดเป็นพืชดอกวงศ์ใหญ่ ค้นพบแล้วประมาณ 25,000 ชนิด กระจายอยู่ทั่วโลก มีการจำแนกโดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมเป็น 5 วงศ์ย่อย ได้แก่ (1) Apostasioideae (2) Cypripedioideae (3) Epidendroideae (4) Orchidoideae และ (5) Vanilloideae แต่ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) และการจัดจำแนก (identification) กล้วยไม้อย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้เนื่องจากการค้นพบกล้วยไม้ชนิดใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นทุกปี

รวมทั้งเพื่อจัดจำแนกกล้วยไม้พันธุ์แท้กับลูกผสมให้ชัดเจนยิ่งขึ้น [1-3] โดยกล้วยไม้สกุลแวนด้า (*Vanda*) นั้นจัดอยู่ในวงศ์ย่อย (subfamily) Epidendroideae เผ่า (tribe) Vandae เผ่าย่อย (subtribe) Aeridinae เป็นกล้วยไม้ที่พบแพร่กระจายพันธุ์ในบริเวณเขตร้อนชื้นทั่วทั้งบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย และออสเตรเลีย เป็นพืชกลุ่มที่มีปัญหาในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและการจัดจำแนกภายในกลุ่ม ซึ่งหากมีการศึกษาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ในกล้วยไม้สกุลนี้จะทำให้

สามารถจำแนกกลุ่มได้ชัดเจนมากขึ้น [3] ปี พ.ศ. 2558 ตลาดกล้วยไม้เขตร้อนได้ขยายเพิ่มขึ้นมาก ซึ่งมีกล้วยไม้สกุลแวนด้ารวมอยู่ด้วย ดังนั้นการขาดข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการขาดวิธีการจำแนกกล้วยไม้ที่ถูกต้องนั้นจะเป็นปัญหาสำคัญต่อการส่งออกกล้วยไม้ โดยวิธีการจำแนกด้วยการพิจารณาเพียงลักษณะสัณฐานนั้นอาจเกิดความสับสนได้ง่ายและจำเป็นต้องอาศัยความเชี่ยวชาญ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มครั้งนี้จึงเป็นแนวทางในการแก้ปัญหา เพื่อให้สามารถจำแนกกลุ่มและมีข้อมูลความสัมพันธ์ที่มีความชัดเจนมากขึ้น

กล้วยไม้สกุลแวนด้าพบมากในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ การศึกษาพบว่ากล้วยไม้สกุลแวนด้ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันภายในสกุล เมื่อวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะบางบริเวณร่วมกันภายในเผ่าย่อย Aeridinae [4] จึงจัดกลุ่มใหม่ โดยกล้วยไม้สกุลเข็มเดิมถูกรวมไว้ในสกุลแวนด้าและจำแนกย่อยไว้ในหมู่เข็ม เป็นกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม [5] ซึ่งผลการศึกษานี้ยังจำแนกกล้วยไม้ในสกุลเข็มเดิมบางชนิดออกไปอยู่ในหมู่อื่น ได้แก่ หมู่แอสโคเซนโทรซิส (Ascocentrosis) โดยหมู่เข็มคงเหลืออยู่ 9 ชนิด ที่มีลักษณะเฉพาะของกล้วยไม้ในสกุลแวนด้าหมู่เข็ม ซึ่งแตกต่างจากหมู่อื่น ๆ เช่น เมื่อพิจารณาจากลักษณะสัณฐานพบว่าเดียดอกมีลักษณะเป็นถุงยาว สามารถผลิตน้ำหวานได้ภายในถุง มีขนาดของปากดอกและความยาวของเดียดอกติดกับปากนก และมีเขตสีส้มแดง ซึ่งเป็นช่วงสีที่นกสังเกตเห็นได้ง่ายเพื่อล่อให้นกช่วยผสมเกสร [6,7] นอกจากนี้พบว่าเข็มม่วง เข้มแดง และเข็มแสดมีการแพร่กระจายพันธุ์ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย เข้มเวียดนามและเขมยูนนานพบเฉพาะในบริเวณแถบชายแดนทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย รวมทั้งเวียดนาม ส่วนอีก 4 ชนิด พบในพม่า มาเลเซีย และอินโดนีเซีย

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต โดยนำข้อมูลทางพันธุกรรมมาแปลงเป็นค่าตัวเลขที่เป็นข้อมูลทางคณิตศาสตร์ตามหลักการของอัลกอริทึม (algorithm) หรือแบบจำลอง (model) และคำนวณความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (evolutionary relationships) แล้วสร้างเป็นแผนภูมิซึ่งมีการพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ขึ้นหลายแบบ ทั้งนี้เพื่อให้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกันและการวิเคราะห์วิวัฒนาการสอดคล้องกับความเป็นจริงมากที่สุด โดยการเลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) นั้นจะพิจารณาจากวัตถุประสงค์ของการศึกษา ถ้าต้องการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันมาก ควรเลือกใช้ข้อมูลลักษณะปรากฏ (phenotype) เช่น โปรตีน เนื่องจากมีความผันแปรน้อยกว่าและสามารถวิเคราะห์สิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์แบบห่างกันได้ แต่ถ้าต้องการศึกษาสิ่งมีชีวิตที่มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมาก ควรใช้ยีนโนไทป์ (genotype) หรือยีนจำเพาะ (specific gene) หรือตำแหน่งที่มีเพียงอัลลีล (allele) เดียว อย่างไรก็ตามตำแหน่งนั้นต้องมีความผันแปรมากพอที่จะให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของลักษณะปรากฏจะได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมและบางครั้งไม่ใช่ผลจากการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรม [8]

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่นิยมใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชนั้น มีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) หลายตำแหน่งที่มีความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ค่อนข้างสูง แต่มีลำดับอนุรักษ์ (conserved sequence) ที่ส่วนปลาย และมีขนาดไม่ใหญ่มากนัก โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ในพืชมีความเหมาะสม เนื่องจากจีโนมของพืชส่วนใหญ่มักเป็น

พอลิพลอยด์ (polyploidy) แต่จีโนมของคลอโรพลาสต์นั้นมีเพียงอัลลีลเดียวจึงเหมาะสมมากกว่า โดยมีการเสนอลำดับนิวคลีโอไทด์หลายตำแหน่ง ได้แก่ ยีน *rbcl* ยีน *matK* ยีน *rpoC1* ยีน *rpoB* และซินดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* เป็นต้น [9-14] และเสนอว่าสำหรับพืชบก (Embryophyte, land plants) ควรใช้ 2-3 ตำแหน่ง ร่วมกัน เพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือเพิ่มขึ้น เช่น *rpoC1* + *rpoB* + *MatK* หรือ *rpoC1* + *matK* + *trnH-psbA* หรือ *rbcl* + *trnH-psbA* [10-14]

การวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ 2 ตำแหน่ง คือ ยีน *matK* และ *rpoC1* เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม โดยจัดเรียงตำแหน่ง (alignment) แล้วใช้แบบจำลองคำนวณค่าระยะห่างทางวิวัฒนาการจากการกลาย (mutation) ที่ปรากฏ และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยการพิจารณาระยะห่าง (distance) และการพิจารณาลักษณะ (character) แล้วเปรียบเทียบแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างเปรียบเทียบกับข้อมูลการจำแนกที่มีรายงานมาก่อน และฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) เพื่อใช้ประโยชน์ทางอนุกรมวิธาน การจำแนกชนิดกล้วยไม้ และการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างกล้วยไม้

กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม 11 ตัวอย่าง ประกอบด้วยกล้วยไม้ที่พบทั่วไปในประเทศไทย 4 ชนิด ได้แก่ เข้มสด [*Vanda garayi* (Lindl.) L.M. Gardiner] เข้มแดง [*V. curvifolia* (Lindl.) L.M.

Gardiner] เข้มม่วง [*V. ampullacea* (Roxb.) L.M. Gardiner] เข้มแสดใต้ [*V. miniata* (Lindl.) L.M. Gardiner] กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มหายาก 1 ชนิด ได้แก่ เข้มเวียดนาม [*V. christensoniana* (Haager) L.M. Gardiner] และกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่แอลโคเซนโทรซิส 1 ชนิด ได้แก่ เข้มยูนนาน [*V. nana* (Avar.) L.M. Gardiner] ซึ่งพบบริเวณตอนเหนือของประเทศไทย รวมทั้งกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มพันธุ์กลาย (mutant) ซึ่งประกอบด้วยเข็มม่วงที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอก 3 ชนิด ได้แก่ เข้มม่วงเผือก (*V. ampullacea* var. *album*) เข้มม่วงดอกส้ม (*V. ampullacea* var. *aurantiacum*) เข้มม่วงดอกแดง (*V. ampullacea* var. *moulmeinense*) และเข็มเวียดนามที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอก 1 ชนิด ได้แก่ เข้มเวียดนามดอกส้ม (*V. christensoniana* 'orange') และเข็มพันธุ์ลูกผสม (*V. hybrid*) 1 ชนิด

2.2 สกัดดีเอ็นเอ

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 เมื่อบดจนละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงเทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เติมนิโคตอเอทานอล (β-mercaptoethanol) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปปั่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยผสมด้วยการพลิกหลอดไปมาเป็นระยะ ๆ เมื่อครบเวลาจึงนำออกมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1

(chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมนิเอียร์พอลิอะคริลาไมด์ (linear polyacrylamide) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล (ethanol) 70 เปอร์เซ็นต์ 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 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 25:24:1 (phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใหม่ แล้วเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมนิเอียร์พอลิอะคริลาไมด์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate pH 5.2) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทั้งหมด และไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่า ของปริมาตรทั้งหมด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30

นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ทีอี ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หลังจากนั้นจึงตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่-พอลิเมอไรส (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ของกล้วยไม้แต่ละชนิดเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ร่วมกับคู่ไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *matK* (*matK*-F คือ 5'-AATTTACGATCAATTCATTC-3' และ *matK*-R คือ 5'-TTCTAGCACAAAGA AAGTCG-3') และยีน *rpoC1* (*rpoC1*-F คือ 5'-GTGGATACACT TCTTGATAATGG-3' และ *rpoC1*-R คือ 5'-TGAGAA AACATAAGTAAACGGGC-3') ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายผสมสำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส คือ *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l) (RBC Bioscience, Taiwan) dNTP (2 mM) บัฟเฟอร์ (1X) และน้ำ รวมปริมาตรสุทธิ 40 ไมโครลิตร ซึ่งสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอคือ เริ่มต้นที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที และทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส 35 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที เมื่อทำปฏิกิริยาครบแล้ว สิ้นสุดที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5

นาที่ แล้วตรวจสอบขั้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทร-
โฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1* ในกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มพันธุ์ต่าง ๆ โดยนำผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท Solgent (ประเทศเกาหลีใต้) เมื่อได้รับผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่างแล้ว ตรวจสอบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการพิจารณากราฟของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดจากไฟล์นามสกุล .abi ด้วยโปรแกรม Mega 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) [16]

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มที่ตรวจสอบแล้วจะนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งเป้าหมายด้วยโปรแกรม BLAST ในเว็บไซต์ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนมาวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันด้วยการเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกันแบบหลายตัวอย่าง (multiple alignment) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์แบบออนไลน์ ClastalW [17] แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 โดยใช้ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี ClastalW มาใช้เป็นข้อมูลเพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากแบบจำลองสำหรับสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ซึ่งเลือกใช้วิธีการจัดกลุ่มจากระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ เช่น แบบจำลอง neighbor joining (NJ) และวิธีการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะข้อมูลพันธุกรรม เช่น แบบจำลอง maximum parsimony (MP) และแบบจำลอง maximum likelihood (ML) แล้วเปรียบเทียบผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยแผนภูมิความสัมพันธ์

ทางพันธุกรรมของทุกแบบจำลอง เปรียบเทียบผลการจำแนกกลุ่มของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม และพิจารณาเปรียบเทียบความสอดคล้องกับวิธีการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐาน รวมทั้งรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มต่อไป

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณขั้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสพบว่าได้ขั้นดีเอ็นเอตามขนาดที่คาดไว้ในกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มและหมู่แอสโคเซนโทรซิสได้ครบทุกตัวอย่าง เมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ที่มีความยาวประมาณ 957 คู่เบส และลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *rpoC1* ที่มีความยาวประมาณ 569 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์การปนเปื้อนของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าทุกตัวอย่างคล้ายกับยีนเป้าหมายที่พบในกล้วยไม้ในฐานข้อมูล GenBank จากนั้นจึงฝากเก็บลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1* ในกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มไว้ในฐานข้อมูล Genbank ซึ่งได้รับหมายเลขเฉพาะ (accession number) ดังตารางที่ 1

การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในทุกตัวอย่างของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มและหมู่แอสโคเซนโทรซิสทั้ง 11 ชนิด ด้วยการใช้โปรแกรม ClastalW พบว่าเกิดการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (substitution) ในแต่ละตัวอย่างของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม โดยยีน *matK* มีตำแหน่งผันแปร (variable site) ของนิวคลีโอไทด์ 45 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ (parsimony information site) 34 ตำแหน่ง เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงครั้งเดียว (singleton) 21 ตำแหน่ง และยีน *rpoC1* มีตำแหน่ง

ผันแปรของนิวคลีโอไทด์ 30 ตำแหน่ง เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ 22 ตำแหน่ง เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงครั้งเดียว 8 ตำแหน่ง นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มขึ้นและหายไปของนิวคลีโอไทด์ (indel) ซึ่งให้ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วย

ตารางที่ 1 หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1*

พันธุ์กล้วยไม้	หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์	
	<i>matK</i>	<i>rpoC1</i>
<i>V. curvifolia</i>	KP772696	KP297985
<i>V. garayi</i> 'yellow'	KP772697	KP297986
<i>V. garayi</i>	KP772698	KP297987
<i>V. ampullacea</i>	KP772699	KP297988
<i>V. ampullacea</i> var. <i>album</i>	KP772700	KP297989
<i>V. ampullacea</i> var. <i>moulmeinense</i>	KP772701	KP297990
<i>V. ampullacea</i> var. <i>aurantiacum</i>	KP772702	KP297991
<i>V. christensoniana</i>	KP772703	KP297992
<i>V. christensoniana</i> 'orange'	KP772704	KP297993
<i>V. nana</i>	KP772705	KP297994
<i>V. miniata</i>	KT581390	KT581393

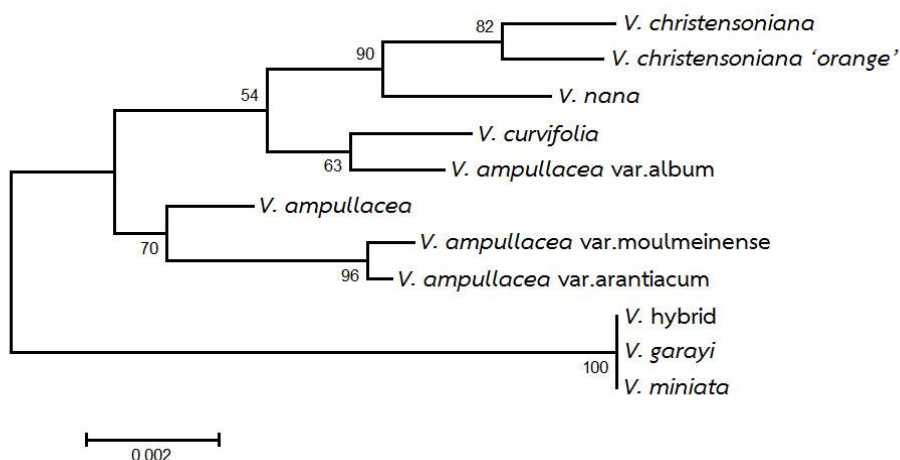
3.1 การวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มด้วย

โปรแกรม MEGA 6.0 โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1* ด้วยวิธี NJ, ML และ MP พบว่าสามารถใช้จำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มได้ผลการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *matK* พบว่ามีค่า consistency index เท่ากับ 0.827586 ค่า retention index เท่ากับ 0.9 แสดงว่าแต่ละตัวอย่างสามารถแยกจากกันชัดเจน โดยมีลักษณะที่มีร่วมกันในยีนนี้น้อยเมื่อพิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ให้ข้อมูลมาก ส่งผลให้แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้สอดคล้องกับข้อมูลเบื้องต้นที่ใช้พิจารณาอย่างยิ่ง เมื่อพิจารณาการจำแนกกลุ่มของกล้วยไม้พบที่สามารถจำแนกได้สอดคล้องกับวิธีจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานโดยแบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อยคือ กลุ่ม 1 ได้แก่ เข็มเวียดนาม เข็มเวียดนามดอกเหลือง และเข็มยูนนาน กลุ่ม 2 ได้แก่ เข็มแดง และเข็มม่วงดอกขาว กลุ่ม 3 ได้แก่ เข็มม่วง เข็มม่วงดอกแดง และเข็มม่วงดอกส้ม และกลุ่ม 4 ได้แก่ เข็มแสด เข็มแสดใต้ เข็มพันธุ์ผสม (รูปที่ 1) ซึ่งในกลุ่มนี้เครื่องหมาย *matK* ไม่สามารถจำแนกตัวอย่างทั้ง 3 ชนิด ออกจากกันได้ ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมสำหรับการใช้ยีนเพียงยีนเดียวเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มในระดับชนิด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่ายีน *matK* สามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชดอกบางวงศ์และในวงศ์กล้วยไม้บางกลุ่ม ได้แก่ ในเผ่า Epidendroideae เผ่าย่อย Aeridineae สกุลกุหลาบ สกุลโศลกอสซัม สกุลหวาย และสกุลแวนด้า เป็นต้น [7,18-26] อย่างไรก็ตาม พบว่าสามารถจำแนกชนิดได้ในกลุ่มตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดกันไม่มาก ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ดีสำหรับการแยกในระดับสกุลขึ้นไป และสามารถใช้ร่วมกับตำแหน่งอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกชนิดกล้วยไม้ได้ดีขึ้น เช่น ใช้

ร่วมกับตำแหน่ง *rbcl*, *rpoC1*, *trnL-F*, *nrITS* และ *trnH-psbA* [26-28] เป็นต้น โดยยีน *matK* จะแปลรหัสเป็นเอนไซม์ maturase ทำหน้าที่ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงหลังถอดรหัส โดยพบว่ามีอัตราการผันแปรที่ผิดปกติได้ทั้งนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน ซึ่งการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จะทำให้เกิดการเลื่อนกรอบการแปลรหัสไป ซึ่งอาจเป็นเหตุผลหนึ่ง

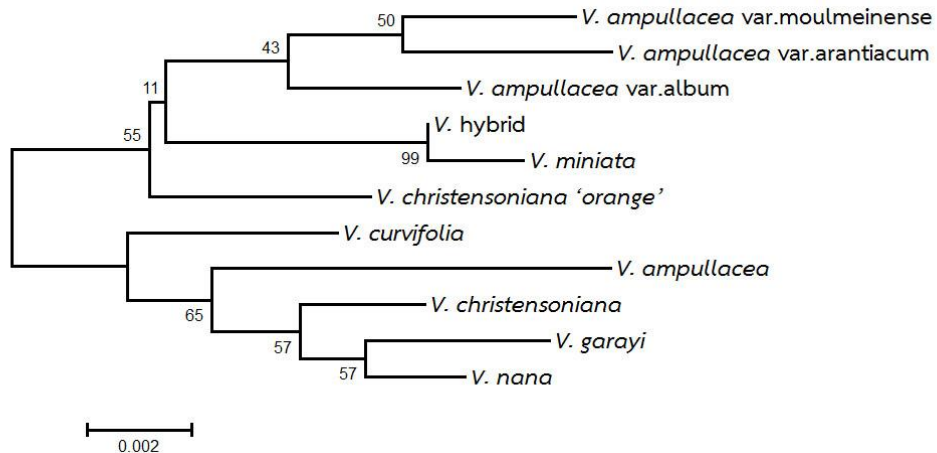
ที่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ไม่สมบูรณ์ในกล้วยไม้ โดยพบเป็นยีนเทียม (pseudogene) อันเป็นอิทธิพลจากอัตราการรับแสงและระยะการพัฒนาการในกล้วยไม้ ซึ่งควบคุมการวิวัฒนาการของยีนนี้ แต่ก็มีบางรายงานพบว่าผลจากอัตราการผันแปรที่สูงผิดปกตินี้ส่งผลให้ยีนมีความเหมาะสมต่อการเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ในพืช [29-32]



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มที่วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ด้วยแบบจำลอง neighbor joining

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* สามารถศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มได้ เมื่อวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีความ consistency index เท่ากับ 0.653846 ค่า retention index เท่ากับ 0.75 และการจัดกลุ่มของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มพันธุ์แท้ ได้แก่ เข้มแดง เข้มม่วง เข้มแสด เข้มเวียดนาม เข้มยูนนาน และเข้มเวียดนามดอกส้ม กับกลุ่มพันธุ์กลาย ได้แก่ เข้มม่วงเผือก เข้มม่วงดอกแดง เข้มม่วงดอกส้ม เข้มแสดใต้ และเข้มลูกผสม (รูปที่ 2) ซึ่งคลาดเคลื่อนไปจากกลุ่มที่ใกล้ชิดกันตามที่คาดไว้ โดยอาจมีสาเหตุจากการที่กล้วยไม้เป็นพืช

ชั้นสูงที่มีการวิวัฒนาการมากขึ้นจนลดรูปลักษณะหลายอย่างลง โดยอินทรอนที่แทรกอยู่ภายในเอกซอน (exon) ของยีน *rpoC1* อาจถูกกำจัดออกไป คล้ายกับในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิด (เช่น ข้าว ข้าวโพด) ส่งผลให้มีความผันแปรไม่เพียงพอต่อการวิเคราะห์ เนื่องจากอินทรอนที่แทรกอยู่เป็นลักษณะร่วมที่ปรากฏในกลุ่มพืชดอกและเป็นแหล่ง ข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตาม ยังสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อแยกตัวอย่างแต่ละชนิดได้ตามที่มีการแนะนำไว้ว่าสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความสัมพันธ์ของพืชบก พืชดอก และกล้วยไม้ โดยนำไปวิเคราะห์ร่วมกับยีนอื่น [10,13-14,33-34]



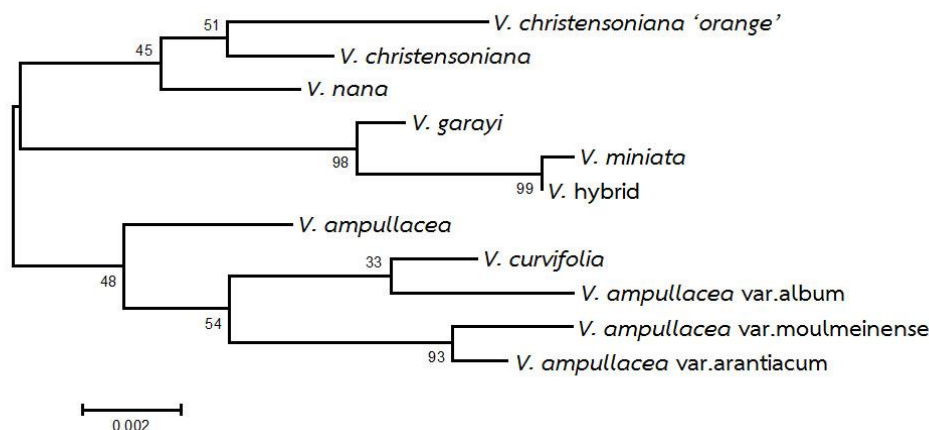
รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มที่วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน *rpoC1* ด้วยแบบจำลอง neighbor joining

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียงยีนเดียว พบว่ามีประสิทธิภาพในการจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ ไม่เพียงพอ ดังนั้นจึงนำชุดข้อมูลมารวมกันเพื่อเพิ่ม ประสิทธิภาพการวิเคราะห์ตามที่ข้อเสนอแนะ พบว่า เมื่อรวมกันแล้วมีค่า consistency index เท่ากับ 0.621212 ค่า retention index เท่ากับ 0.709302 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงตำแหน่ง เดียว กล่าวคือ มีลักษณะที่แสดงร่วมกันของลำดับ นิวคลีโอไทด์เพิ่มขึ้นเมื่อพิจารณาแยกแต่ละตัวอย่าง แต่เมื่อเปรียบเทียบจากชุดข้อมูลทุกตัวอย่างก็แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างมีลักษณะที่ใกล้ชิดกันและแบ่งกลุ่มย่อย ได้น่าเชื่อถือขึ้น โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ตามลักษณะที่สัมพันธ์ใกล้ชิดของตัวอย่าง สอดคล้อง กับลักษณะสัณฐานและปัจจัยสภาพแวดล้อมของแหล่ง กระจายพันธุ์ คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ เข็มแดง เข็มม่วง เข็ม ม่วงเผือก เข็มม่วงดอกส้ม เข็มม่วงดอกแดง กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เข็มแสด เข็มแสดใต้ และเข็มลูกผสม และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ เข็มเวียดนาม เข็มเวียดนามดอกส้ม และเข็ม ยูนนาน (รูปที่ 3) ซึ่งจะเห็นว่ากล้วยไม้แต่ละชนิดใน

กลุ่มเดียวกันมีข้อมูลทางพันธุกรรมร่วมกันที่แสดง ความใกล้ชิดเพิ่มขึ้นและสอดคล้องกับลักษณะปรากฏ ได้แก่ โครงสร้างดอก ลักษณะใบ และปัจจัยจากสภาพ แวดล้อมแหล่งที่พบ ส่งผลให้เกิดการวิวัฒนาการแยก จากกันของแต่ละกลุ่ม แต่ก็มีวิวัฒนาการที่แยกห่าง ออกจากกันที่ทำให้เกิดความแตกต่างกันของพันธุกรรม [6,19] เนื่องจากสภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยหลักที่ ควบคุมให้เกิดการวิวัฒนาการในสิ่งมีชีวิตเพื่อความอยู่ รอด โดยลักษณะปรากฏจะเปลี่ยนแปลงออกไปต้อง เปลี่ยนแปลงข้อมูลพันธุกรรมก่อน ซึ่งกล้วยไม้ในระดับ สกุลหรือชนิดที่มีความใกล้ชิดกันมากนั้น การใช้ลำดับ นิวคลีโอไทด์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอจึงมีความ เหมาะสม เพราะการเปลี่ยนแปลงในระดับนิวคลีโอไทด์ ให้ข้อมูลมากเพียงพอสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ เชิงวิวัฒนาการ [8, 36-37] โดยสนับสนุนการศึกษา ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืช เช่น การใช้ยีน *rbcL* เพื่อจำแนกพืชวงศ์กล้วยไม้ออกเป็น 5 เผ่าใหญ่ ได้ อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ผลการวิเคราะห์มีความ ผิดพลาดมากขึ้นเมื่อมีการจัดกลุ่มที่ต่ำลงมาในระดับ สกุล ซึ่งสอดคล้องกับผลการจำแนกกล้วยไม้สกุล

แวนด้าหมู่เข็มที่มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ และเมื่อใช้ ยีน *matK* หรือชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ ยีน *psbA* เพื่อจำแนกกล้วยไม้ในระดับเผ่า เผ่าย่อย สกุล และชนิดสามารถใช้ศึกษาได้ดีกว่า แต่ได้เฉพาะ บางกลุ่มยังไม่ครอบคลุมพืชทุกชนิด ดังนั้นการใช้ เครื่องหมายดีเอ็นเอหลายยีนร่วมกันจึงมีความ

เหมาะสมต่อการศึกษัพันธ์กรรมมากกว่า เนื่องจากให้ ข้อมูลเพียงพอและสามารถเลือกให้เหมาะกับระดับ ความสัมพันธ์ที่ศึกษา เช่น การเสนอให้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ 2-3 ตำแหน่ง ร่วมกัน [9-10, 12-14, 37-38]



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มที่วิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน *matK* ร่วมกับยีน *rpoC1* ด้วยแบบจำลอง maximum likelihood

4. สรุป

ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ยีน *matK* ร่วมกับยีน *rpoC1* เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มได้อย่างมี ประสิทธิภาพ สามารถแยกกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม แต่ละชนิดออกจากกันได้ และเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละ ชนิดมีประสิทธิภาพเหมาะสมต่อการใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมของกล้วยไม้ในระดับที่แตกต่างกัน เช่น ยีน *rpoC1* เหมาะสำหรับใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของพืชในระดับอันดับลงมาถึงระดับวงศ์ ยีน *rbcl* เหมาะสำหรับศึกษาความสัมพันธ์ในระดับวงศ์ถึง ระดับสกุล ยีน *matK* เหมาะสำหรับศึกษาความสัมพันธ์ในระดับเผ่าจนถึงสกุล และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* เหมาะสำหรับศึกษา

ความสัมพันธ์ในระดับต่ำกว่าสกุล อย่างไรก็ตาม พบว่า การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะหลาย ตำแหน่งร่วมกันเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรม มีความเหมาะสมมากกว่า เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม นอกจากนั้นยังพบว่าการศึกษาความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมของพืชที่มีความใกล้ชิดกันในระดับชนิดโดย ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ เช่น เครื่องหมายอาร์เอฟพีดี ไอ เอสเอสอาร์ มีความเหมาะสมมากกว่า ดังนั้นจึงต้องมี การศึกษาและเก็บข้อมูลความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรม ต่อไป เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการศึกษานุกรมวิธาน ความหลากหลายทางพันธุกรรม และใช้ปรับปรุงพันธุ์ กล้วยไม้ เพื่อยกระดับความรู้ เศรษฐกิจของประเทศให้ ทันนานาชาติ

5. เอกสารอ้างอิง

- [1] Dressler, R.L., 2005, How many orchid species?, *Selbyana* 26: 155-158.
- [2] Rittershausen, W. and Rittershausen, B., 2009, *The Amazing World of Orchids*, Quadrille Publishing, Ltd., London.
- [3] Gardiner, L.M. and Cribb, P.C., 2013, *Vanda*, *Renziana* 3: 1-96.
- [4] 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.
- [5] Gardiner, L.M., 2012, New combinations in the genus *Vanda* (Orchidaceae), *Phytotaxa* 61: 47-54.
- [6] Stpiczyn'ska, M., Davies, K.L. and Kaminska, M., 2011, Comparative anatomy of the nectary spur in selected species of Aseridinae (Orchidaceae), *Ann. Bot.* 107: 327-345.
- [7] Topik, H., Yukawa, T., Ito, M., 2005, Molecular phylogenetics of subtribe Aseridinae (Orchidaceae): Insights from plastid *matK* and nuclear ribosomal ITS sequences, *J. Plant Res.* 118: 271-284.
- [8] Xiong, J., 2006, *Essential Bioinformatics*, Cambridge University Press, New York.
- [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., van den Berg, C., Madriñán, S., Hedderson, 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, *Trend. Genet.* 23: 167-172.
- [12] Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barracough, T.G. 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. van 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., 1978, 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., 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., Filipski, A. and Kumar, S., 2013, MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, Mol. Biol. Evol. 30: 2725-2729.
- [18] Hilu, K.W., Borsch, T., Müller, K., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Savolainen, V., Chase, M.W., Powell, M.P., Alice, L.A., Evans, R., Sauquet, H., Neinhuis, C., Slotta, T.A.B., Rohwer, J.G., Campbell, C.S. and Chatrou, L.W., 2003, Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information, Am. J. Bot. 12: 1758-1776.
- [19] Carlswald, B.S., Whitten, W., Williams, N.H. and Bytebier, B., 2006, Molecular phylogenetics of Vandaeae (Orchidaceae) and the evolution of leaflessness, Am. J. Bot. 5: 770-786.
- [20] 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.
- [21] Fan, J., Qin, H.N., Li, de Z. and Jin, X.H., 2009, Molecular phylogeny and biography of *Holcoglossum* (Orchidaceae: Aeridinae) based on nuclear ITS, and chloroplast *trnL-F* and *matK*, Taxon 58: 849-861.
- [22] 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. 114: 1-17.
- [23] นฤมล ธนानันต์, จิตติพร ไท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2558, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1*, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 1-10.
- [24] นฤมล ธนานันต์, วริศรา แทนสง่า และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 664-673.
- [25] จินต์ ทองสม, ภัทรพร คุ่มภัย, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 994-1005.
- [26] Zou, L.H., Huang, J.X., Zhang, G.Q., Liu, Z.J. and Zhuang, X.Y., 2015, A molecular

- phylogeny of Aseridinae (Orchidaceae: Epidendroideae) inferred from multiple nuclear and chloroplast regions, *Mol. Phylo. Evol.* 85: 247-254.
- [27] Burgess, K.S., Fazekas, A.J., Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Husband, B.C., Newmaster, S.G., Percy, D.M., Hajibabaei, M. and Barrett, S.C.H., 2011, Discriminating plant species in a local temperate flora using the *rbcl* + *matK* barcode, *Methods Ecol. Evol.* 2: 333-340.
- [28] Zhang, G.Q., Liu, K.W., Chen, L.J., Xiao, X.J., Zhai, J.W., Li, L.Q., Hsiao, J.C.Y.Y., Rao, W.H., Huang, J., Ma, X.Y., Chung, S.W., Huang, L.Q., Tsai, W.C., Liu, Z.J., 2013, A new molecular phylogeny and a new genus, *Pendulorchis*, of the *Aerides-Vanda* alliance (Orchidaceae: Epidendroideae), *PLoS ONE* 8: e60097.
- [29] Hilu, K.W. and Lian, H., 1997, The *matK* gene: Sequence variation and application in plant systematics, *Am. J. Bot.* 84: 830-839.
- [30] Barthet, M.M. and Hilu, K.W., 2007, Expression of *matK*: Functional and evolutionary implication, *Am. J. of Bot.* 94: 1402-1412.
- [31] Hausner, G., Olson, R., Simon, D., Johnson, I., Sanders, E.R., Karol, K.G., McCourt, R.M. and Zimmerly, S., 2006, Origin and evolution of the chloroplast *trnK* (*matK*) intron: A model for evolution of group II intron RNA structures, *Mol. Biol. Evol.* 23: 380-391.
- [32] Kocyan, A., de Vogel, E.F., 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 Aseridinae, *Mol. Phylo. Evol.* 48: 422-443.
- [33] 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.
- [34] Downie, S.R., Llanas, E. and Katz-Downie, D.S., 1996, Multiple independent losses of the *rpoC1* intron in angiosperm chloroplast DNA's, *Syst. Bot.* 21: 135-151.
- [35] Samigullin, T.K., Martin, W.F., Troitsky, A.V. and Antonov, A.S., 1999, Molecular data from the chloroplast *rpoC1* gene suggest a deep and distinct dichotomy of contemporary spermatophytes into two Monophyla: Gymnosperms (including Gnetales) and angiosperms, *J. Mol. Evol.* 49: 310-315.
- [36] Fay, M.F. and Chase, M.W., 2009, Orchid biology: From Linnaeus via Darwin to the 21st century, *Ann. Bot.* 104: 359-364.
- [37] Simson, M.G., 2012, *Plant Systematics*, 2nd Ed., Elsevier, Academic Press, Boston.
- [38] 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: e508.

[39] 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: e11533.