การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบสีเขียวด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

Genetic Relationship Assessment and Identification of Strap-Leaf *Paphiopedilum* Using Nucleotide Sequences of *rpo*C1 Gene and *trn*H-*psb*A Intergenic Spacer Region

พรประภา ศิริเทพทวี และธีระชัย ธนานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Pornprapa Siritheptawee and Theerachai Thanananta

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

Narumol Thanananta*

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

บทคัดย่อ

ประเทศไทยพบรองเท้านารีเพียงสกุลเดียว คือ *Paphiopedilum* จากทั้งหมด 6 สกุล ที่พบทั่วโลก ซึ่งได้รับความนิยมในการปลูกเป็นอย่างมาก เนื่องด้วยลักษณะที่สวยงามจึงมีการปลูกเพื่อการค้า โดยรองเท้านารีแต่ละชนิดมีลักษณะคล้ายกัน ดังนั้นการจัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานเพียงอย่างเดียวจึงค่อนข้างยาก งานวิจัยนี้ได้จำแนกกล้วยไม้รองเท้านารี 20 ชนิด ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 บริเวณ ร่วมกัน และจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood โดยใช้โปรแกรม MEGA7 พบว่าประสิทธิภาพในการจัดจำแนกสูงกว่าการใช้เพียงบริเวณเดียว อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ยังจำแนกได้ไม่ครบทุกชนิด ดังนั้นจึงควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นร่วมด้วย ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกให้สูงขึ้น

คำสำคัญ : สกุลรองเท้านารี; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การจำแนก; ยีน *rpo*C1; ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

**Corresponding author: narumolpla@yahoo.com*

Abstract

In Thailand, there is only one genus of *Paphiopedilum* from six genera worldwide which are very popular in planting due to their attractiveness and commercial point of view. Most of *Paphiopedilum* are similar in morphological characters hence it is very difficult to classify them using morphology. This research aims to identify and assess the genetic relationship of 20 *Paphiopedilum* species using nucleotide sequences of *rpo*C1 gene and *trn*H-*psb*A intergenic spacer region. According to analyzing data of two regions combining, and grouping by maximum likelihood method using MEGA7, it revealed an improve efficiency of *Paphiopedilum* classification, compared to that of one region. However, this study cannot be applied to identify 20 species, other promising nucleotide sequences should be introduced to increase efficiency of classification.

Keywords: *Paphiopedilum*; genetic relationship; identification; *rpo*C1 gene; *trn*H-*psb*A intergenic spacer region

1. คำนำ

กล้วยไม้จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีลักษณะสีสันสวยงามและรู้จักกันอย่างแพร่หลาย มีการนำมาปลูกเป็นไม้ประดับและปรับปรุงพันธุ์ให้มีความหลากหลาย ให้มีลักษณะที่แปลกตา บานทนและมีสีสันสวยงามยิ่งขึ้น ความต้องการกล้วยไม้จึงมีมากขึ้น ทำให้ในปัจจุบันประชากรของกล้วยไม้ในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องมาจากมีการเก็บกล้วยไม้มาขายและถิ่นอาศัยของกล้วยไม้ถูกทำลาย ซึ่งทำให้กล้วยไม้บางชนิดสูญพันธุ์ไปแล้ว บางชนิดก็ใกล้จะสูญพันธุ์ (อบฉันท์, 2543)

รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมในการปลูกเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งในประเทศไทยค้นพบแล้ว 18 ชนิด จากทั่วโลกที่พบแล้วประมาณ 136 ชนิด โดยในประเทศไทยพบเพียงสกุลเดียว คือ *Paphiopedilum* เป็นรองเท้านารีที่อยู่ในเขตร้อนและมีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ดินหรืออิงอาศัยก็ได้ ไม่มีลำลูกกล้วยเหมือนกล้วยไม้ประเภทอื่น ลำต้นขนาดเล็ก ใบอาจมีลายหรือไม่มีลายก็ได้ ลักษณะเด่นของรองเท้านารี คือ มีกลีบดอกด้านล่าง 1 กลีบ ที่มีลักษณะคล้ายกับกระเป๋า บางพันธุ์กลีบดอกข้างบิดเป็นเกลียวยาวสวยงาม (เศรษฐมันตร์, 2551)

การใช้ลักษณะสัณฐานในการจำแนกพืชนั้นมีความยากลำบาก เนื่องจากขึ้นกับสภาพแวดล้อมและต้องอาศัยผู้ชำนาญ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เข้ามาช่วยระบุหรือจำแนกพืช และใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิด ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) และการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ตำแหน่งจำเพาะ เป็นต้น (Wolff and Rijn, 1993; Deng *et al*., 1995; Garcia *et al*., 1995; Debener and Mattiesch, 1998)

CBOL Plant Working Group (2009) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ (chloroplast genome) จำนวน 7 บริเวณ ได้แก่ *rbc*L, *rpo*B, *rpo*C1, *mat*K, *trn*H-*psb*A, *atp*F-*atp*H และ *psb*K-*psb*I เพื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (standard DNA) ในการสร้างดีเอ็นเอบาร์โคด (DNA barcode) ซึ่งมีศักยภาพในการจำแนกสิ่งมีชีวิต โดย

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาตรฐานในพืชแต่ละชนิด

ยีน *rpo*C1 กำหนดการสร้างพอลิเพปไทด์ (polypeptide) ที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) ซึ่งอยู่ในคลอโรพลาสต์ (วุฒิพงศ์, 2554)

ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H-*psb*A เป็น intergenic spacer โดยยีน *psb*A กำหนดการสร้างพอลิเพปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของ photosystem II ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง และยีน *trn*H กำหนดการสร้างอาร์เอ็นเอถ่ายโอน (transfer RNA, tRNA) ชนิด $tRNA^{his}$ (GUG) ซึ่งจะนำกรดอะมิโนฮีสทิดีน (histidine, H) ไปต่อเป็นสายพอลิเปปไทด์

งานวิจัยนี้ได้ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบสีเขียวด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A นอกจากนี้ยังเก็บลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI เพื่อใช้ในการศึกษาในอนาคตต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 20 ชนิด ได้แก่ (1) อินทนนท์ [*P. villosum* (Lindl.) Stein] (2) อินทนนท์คอแดง (*P. barbigerum* var. Coccineum) (3) อินทนนท์ใบกว้าง [*P. insigne* (Wallich ex Lindley) Pfitzer] (4) อินทนนท์ลาว [*P. gratrixianum* (Mast.) Guillaumin] (5) เหลืองเลย (*P. hirsutissimum* var. Esquirolei) (6) เหลืองกระบี่ [*P. exul* (Ridl) Rolfe] (7) โรธสคิลเดียนุม [*P. rothschildianum* (Rchb.f.) Stein] (8) ไพรมุเรียนุม (*P. primulinum* M.W.Wood & P.Taylor) (9) ดอยตุงกาญจน์ (*P. vejvarutianum* O.Gruss & Roellke) (10) สไปเซเรียนุม [*P. spicerianum* (Rchb.f) Pfitz.] (11) เมืองกาญจน์ [P. parishii (Rchb.f) Stein] (12) ดอยตุง [*P. charlesworthii* (Rolfe) Pfitzer] (13) เชียงดาว (*P. dianthum* Tang & Wang) (14) เฮนรียานุม (*P. henryanum* Braem) (15) เฮเลเน (*P. helenae* f. aureum O.Gruss & Roeth) (16) ทรานเลียนอนุม (*P. tranlienianum* O.Gruss & H.Perner) (17) แพรสแทนส์ [*P. praestans* (Rchb.f) Pfitz] (18) ฟิลิปปินส์เอนซิส [*P. philippinense* (Rchb.f) Stein] (19) ซุปาร์ดิไอ (*P. supardii* Braem & Lob) และ (20) กลัวโคไฟลลุม (*P. glaucophyllum* J.J.Smith)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบสีเขียวด้วยวิธีที่ประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธีของนฤมล และคณะ (2555) แล้วตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet, UV) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (nm) ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (Sambrook *et al*., 1989)

2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว 20 ชนิด โดยนำดีเอ็นเอแต่ละชนิดที่สกัดได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/µl) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR, polymerase chain reaction) ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม (ng) ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 10 mM

Tris-HCl pH 9.1, 0.1 % Triton™ X-100 และ 2.5 mM $MgCl_2$) และมีนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์ (primer) ปริมาณ 500 นาโนโมลาร์ (nM) ซึ่งมีความจำเพาะต่อยีน *rpo*C1 (5′-GTGGATACACTTCTTGATAATGG-3′ กับ 5′-TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC-3′) และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ p*sb*A (5′-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3′ กับ 5′-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3′) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (Unit) โดยมีปริมาตรรวม 40 ไมโครลิตร (เกียรติชัย และคณะ, 2557)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสมี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ (เกียรติชัย และคณะ, 2557)

หลังจากนั้นตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

2.4 การวิเคราะห์ผล

ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้นั้นส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Bioneer (ประเทศเกาหลีใต้) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว ทั้ง 20 ชนิด มาเปรียบเทียบกันเพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยโปรแกรม ClustalW (http://www.genome.jp/tools/clustalw) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7) (http://www.megasoftware.net) โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood และกำหนดค่า bootstrap 1,000 ครั้ง

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว ทั้ง 20 ชนิด พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอครบทุกชนิด โดยชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1 มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส (base pairs) และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส

3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1

เมื่อวิคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ในรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว ทั้ง 20 ชนิด พบว่ามีขนาด 554 คู่เบส และฝากเก็บลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยมีหมายเลขจำเพาะ (accession number) ดังตารางที่ 1

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ด้วย MEGA7 พบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว ทั้ง 20 ชนิด เท่ากับ 0.000-0.004 และเมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood (รูปที่ 1) พบว่าไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีแต่ละชนิดออกจากกันครบทั้งหมด ทั้งนี้อาจเนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก โดยมีตำแหน่งที่เกิดการกลาย (mutation) เพียง 4 ตำแหน่ง ทำให้ผลการวิเคราะห์มีความ

เหมือนกันมาก ซึ่งพบรูปแบบการกลายเพียงรูปแบบเดียว คือ ทรานสเวอร์ชัน (transversion) (ตารางที่ 2) จึงทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์นั้นมีความเหมือนกันมาก และเมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจึงไม่สามารถแยกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 20 ชนิด ออกจากกัน

3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว ทั้ง 20 ชนิด พบว่ามีขนาด 242-1102 คู่เบส และฝากเก็บลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI ซึ่งมีหมายเลขจำเพาะดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบสีเขียวที่ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank

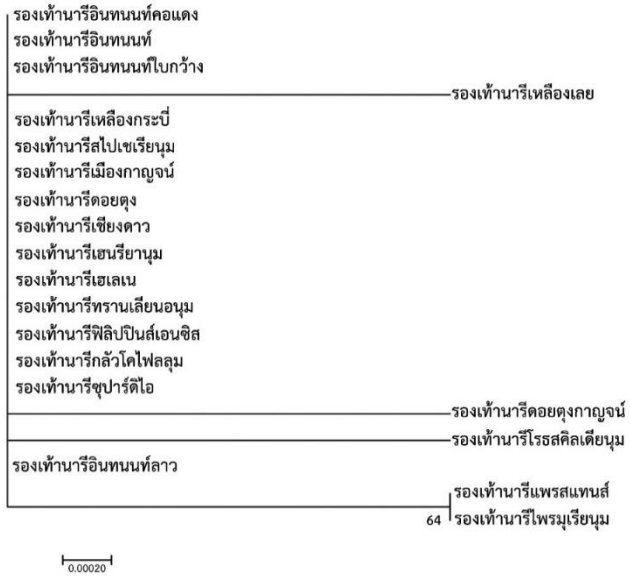
ลำดับ	ชื่อสามัญและชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์	
		*rpo*C1	*trn*H-*psb*A
1	อินทนนท์ [*P. villosum* (Lindl.) Stein]	KX755509	KX977091
2	อินทนนท์คอแดง (*P. barbigerum* var. Coccineum)	KX755510	KX977092
3	อินทนนท์ใบกว้าง [*P. insigne* (Wallich ex Lindley) Pfitzer]	KX755511	KX977093
4	อินทนนท์ลาว [*P. gratrixianum* (Mast.) Guillaumin]	KX755512	KX977094
5	เหลืองเลย (*P. hirsutissimum* var. Esquirolei)	KX755513	KX977095
6	เหลืองกระบี่ [*P. exul* (Ridl) Rolfe]	KX755514	KX977096
7	โรธสคิลเดียนุม [*P. rothschildianum* (Rchb.f.) Stein]	KX755515	KX977097
8	ไพรมุเรียนุม (*P. primulinum* M.W.Wood & P.Taylor)	KX755516	KX977098
9	ดอยตุงกาญจน์ (*P. vejvarutianum* O.Gruss & Roellke)	KX755517	KX977099
10	สไปเซเรียนุม [*P. spicerianum* (Rchb.f) Pfitz.]	KX755518	KX977100
11	เมืองกาญจน์ [P. parishii (Rchb.f) Stein]	KX755519	KX977101
12	ดอยตุง [*P. charlesworthii* (Rolfe) Pfitzer]	KX755520	KX977102
13	เชียงดาว (*P. dianthum* Tang & Wang)	KX755521	KX977103
14	เฮนรียานุม (*P. henryanum* Braem)	KX755522	KX977104
15	เฮเลเน (*P. helenae* f. aureum O.Gruss & Roeth)	KX755523	KX977105
16	ทรานเลียนอนุม (*P. tranlienianum* O.Gruss & H.Perner)	KX755524	KX977106
17	แพรสแทนส์ [*P. praestans* (Rchb.f) Pfitz]	KX755525	KX977107
18	ฟิลิปปินส์เอนซิส [*P. philippinense* (Rchb.f) Stein]	KX755526	KX977108
19	ซุปาร์ดิไอ (*P. supardii* Braem & Lob)	KX755527	KX977109
20	กลัวโคไฟลลุม (*P. glaucophyllum* J.J.Smith)	KX755528	KX977110

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ด้วย MEGA7 พบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว ทั้ง 20 ชนิด จำนวน 20 ชนิด เท่ากับ 0.000-0.059 และเมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเลือกวิธีจัด

กลุ่มแบบ maximum likelihood (รูปที่ 2) พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีบางชนิดออกจากกัน แต่ยังมีบางชนิดที่ไม่สามารถแยกออกจากกันอย่างชัดเจน ได้แก่ เมืองกาญจน์ เชียงดาว เฮนรียานุม ทรานเลียนอนุม อินทนนท์ อินทนนท์ลาว ดอยตุงกาญจน์ สไปเชเรียนุม และเฮเลเน อย่างไรก็ตามพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีการเปลี่ยนแปลง 970 ตำแหน่ง มีการกลาย 4 รูปแบบ คือ อินเดล (indel, insersion/deletion) พิวรีนทรานสิชัน (purine transition) ไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) และทรานสเวอร์ชัน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 ที่มีการเปลี่ยนแปลง

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
ทรานสเวอร์ชัน	147, 235, 381 และ 447



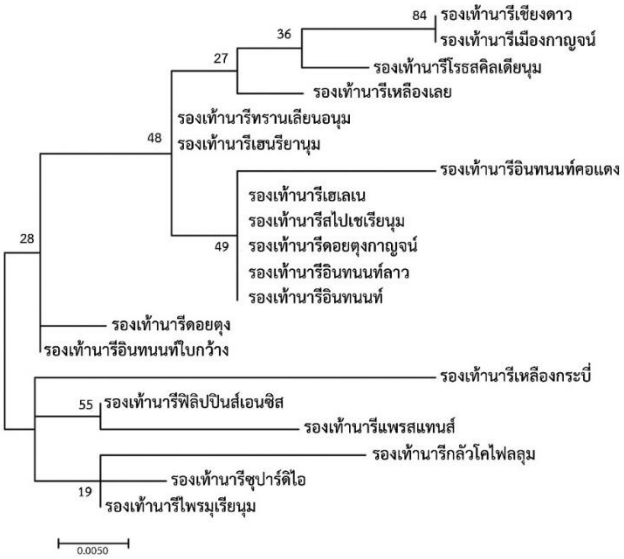
รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบสีเขียวที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1

ตารางที่ 3 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ที่มีการเปลี่ยนแปลง

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
อินเดล	20-46, 87-994, 1047-1052, 1072-1074, 1089-1091 และ 1092
พิวรีนทรานสิชัน	51, 888, 895, 956, 962, 966, 992, 1015, 1019, 2001, 2005, 2012, 2019, 2029 และ 2033
ไพริมิดีนทรานสิชัน	10, 890, 891, 952, 953, 965, 967, 987, 1016, 1047 และ 1059
ทรานสเวอร์ชัน	63, 81, 82, 889, 892, 950, 951, 953, 955, 957, 960, 963, 968, 971, 979-980, 983, 1021, 1045, 1065, 1066, 1076, 1088, 2013 และ 2014

นอกจากนี้ยังพบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในรองเท้านารีเหลืองเลยมีขนาดเพียง 242 คู่เบส ซึ่งมีขนาดสั้นกว่าปกติ โดยมีการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น

จำนวนมาก เมื่อตรวจสอบในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ในกล้วยไม้ *Paphiopedilum argus* (Rchb. f.) Stein ก็มีขนาดเพียง 481 คู่เบส (หมายเลขจำเพาะ JQ660920) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 900 คู่เบส เช่นกัน เนื่องจากมีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดสูง (นฤมล และคณะ, 2560)

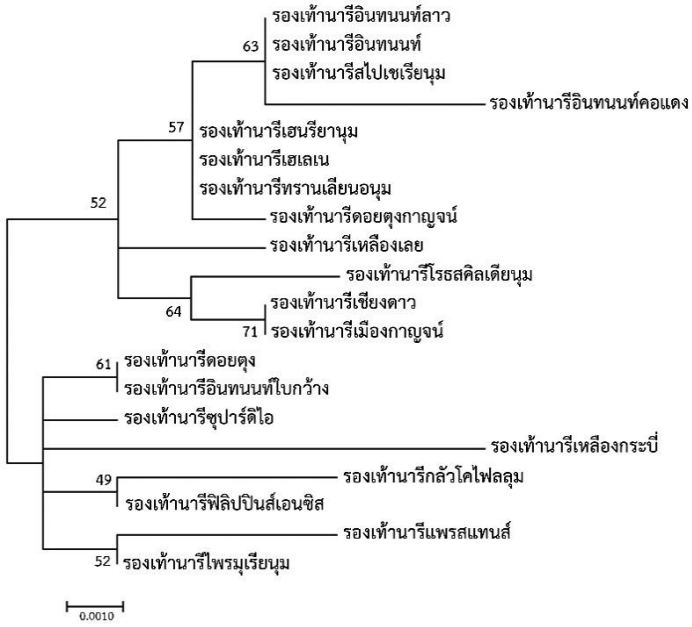


รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบสีเขียวที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A

3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*Aร่วมกัน

เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว ทั้ง 20 ชนิด จากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ร่วมกัน โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood (รูปที่ 3) พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีคล้ายกับแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สร้างจากวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A เพียงบริเวณเดียว อย่างไรก็ตาม สามารถแยกรองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ออกจากรองเท้านารีชนิดอื่น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะหลายบริเวณร่วมกันนั้น บางครั้งอาจไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากยีน *rpo*C1 มีความหลากรูป (polymorphism) ต่ำ อย่างไรก็ตาม นอกจากจะใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H และ *psb*A แล้ว ควรวิเคราะห์ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะอื่น เช่น ยีน *rbc*L และ *mat*K (วุฒิพงศ์, 2554) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนก

นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยอื่นที่แสดงประสิทธิภาพของการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกพืช ได้แก่ กล้วยไม้สิงโตกลอกตา (เกียรติชัย, 2557) กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (นฤมล และคณะ, 2557) กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย (นฤมล และคณะ, 2558) กล้วยไม้สกุลแว้นด้าหมู่เข็ม (จินต์ และคณะ, 2558) กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (นฤมล และคณะ, 2560) ข้าวมีสี (นฤมล



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบสีเขียวที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A ร่วมกัน

และคณะ, 2557) และมะม่วง (ปิยะดา และคณะ, 2558) เป็นต้น

4. สรุป

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี กลุ่มใบสีเขียว จำนวน 20 ชนิด ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A พบว่ายีน *rpo*C1 ยังไม่สามารถจำแนกรองเท้านารีออกจากกันครบทั้ง 20 ชนิด ส่วนชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A จำแนกรองเท้านารีได้มากกว่าการใช้ยีน *rpo*C1 เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A มีความหลากรูปของนิวคลีโอไทด์สูงกว่ามาก โดยพบตำแหน่งหลากรูป 970 ตำแหน่ง จึงมีประสิทธิภาพการจำแนกสูงกว่า แต่เมื่อนำตำแหน่งจำเพาะทั้ง 2 บริเวณ มาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้มีความคล้ายกับแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A เพียงบริเวณเดียว อย่างไรก็ตาม ควรวิเคราะห์ตำแหน่งจำเพาะบริเวณอื่นร่วมด้วย ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกให้สูงยิ่งขึ้น

5. รายการอ้างอิง

เกียรติชัย แซ่ไต่, นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 523-530.

จินต์ ทองสม, นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2558, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 994-1005.

นฤมล ธนานันต์, จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L และ *rpo*C1, ว.วิทยาศาสตร์

และเทคโนโลยี 22: 674-682.

นฤมล ธนานันต์, ฐิติพร โท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2558, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rpo*C1, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 1-10.

นฤมล ธนานันต์, ภัทรา หงษ์ทองดี, วรุณธร เชื้อบุญมี และธีระชัย ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A, Thai J. Sci. Technol. 6: 22-32.

นฤมล ธนานันต์, วริสรา แทนสง่า และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 664-673.

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

ปิยดา บุสดี, นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2559, การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpo*C1 และ *rbc*L, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 983-993.

วุฒิพงศ์ มหาคำ, 2554, DNA barcodes ของพืช: หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้และข้อจำกัด, ว.พฤกษศาสตร์ไทย 3: 1-30.

เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล, 2551, ร้อยพรรณพฤกษา รองเท้านารี,สำนักพิมพ์เศรษฐศิลป์,กรุงเทพฯ.

อบฉันท์ ไทยทอง, 2543, กล้วยไม้เมืองไทย, สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.

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

Debener, T. and Mattiesch, L., 1998, Effective pairwise combination of long primers for RAPD analyses in roses, Plant Breed. 117: 147-151.

Deng, Z.N., Gentile, A., Nicolosi, E., Domina, F., Vardi, A. and Tribulato, E., 1995, Identification of in vivo and in vitro lemon mutants by RAPD markers, J. Hort. Sci. 70: 117-125.

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.

Garcia, G.M., Stalker, H.T. and Kochert, G., 1995, Introgression analysis of an interspecific hybrid population in peanuts (*Arachis hypogaea* L.) using RFLP and RAPD markers, Genome 38: 166-176.

NCBI, *Paphiopedilum argus*, Available Source: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/402502997, April 7, 2017.

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

Wolff, K. and Rijn, J.P.V., 1993, Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers, Heredity 71: 335-341.