การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสม ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rbc*L

Assessment of Genetic Relationship and Identification of *Dendrobium* Section Nigrohirsutae and their Hybrids Base on Nucleotide Sequences of *mat*K and *rbc*L Genes

ธีระชัย ธนานันต์ และจุฑาทิพย์ พันธ์รูปท้าว

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Theerachai Thanananta and Jutatip Phanroopthaw

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

กล้วยไม้สกุลหวายเป็นกล้วยไม้ที่มีความสำคัญ เนื่องจากได้รับความนิยมทั้งภายในประเทศและเป็นสินค้าส่งออกไปยังต่างประเทศ ดังนั้นจึงมีการพัฒนากล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ใหม่ ๆ เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของผู้บริโภค ทำให้เกิดกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมมากมายและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง การวิจัยครั้งนี้ได้ระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสม รวม 21 ชนิด/พันธุ์ ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rbc*L เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของยีนทั้งสองร่วมกัน แล้วคำนวณด้วยโมเดล Tamura 3-parameter และจัดกลุ่มแบบ neighbor joining พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการระบุพันธุ์ให้สูงขึ้นได้ แต่ระบุได้เพียง 15 ชนิด/พันธุ์ ซึ่งคิดเป็น 71.4 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นร่วมด้วย ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการระบุพันธุ์ให้สูงยิ่งขึ้น

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** narumolpla@yahoo.com

doi: 10.14456/tstj.2017.49

คำสำคัญ : สกุลหวาย; หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ; ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ; ยีน *mat*K; ยีน *rbc*L

Abstract

Dendrobium is the most important orchid, since it is popularly used from local consumers and exported to foreign countries. New varieties with more genetic diversities were developed under the customers' demand. In this research, identification and assessment of genetic relationship among *Dendrobium* in the section Nigrohirsutae and their hybrids (21 varieties/cultivars) were studied based on nucleotide sequences of *mat*K and *rbc*L genes. The combine data of *mat*K and *rbc*L sequences indicated the more effective power for identification among *Dendrobium* section Nigrohirsutae and their hybrids by using Tamura 3-parameter and neighbor joining method. Then, 15 varieties/cultivars (71.4 %) of *Dendrobium* were identified. Therefore, it is suggested that the other regions should be added for greater effectiveness for identification.

Keywords: *Dendrobium*; Nigrohirsutae; specific nucleotide sequence; *mat*K; *rbc*L

1. บทนำ

กล้วยไม้จัดเป็นพืชดอก (angiosperm) ที่มีความหลากหลายในธรรมชาติมากที่สุด พบแล้วประมาณ 24,500 ชนิด (species) ซึ่งกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) เป็นสกุลใหญ่ที่พบมากกว่า 1,500 ชนิด มีการแพร่กระจายพันธุ์ทั่วทั้งทวีปเอเชีย โดยการเจริญเติบโตหลายมีรูปแบบ เช่น เจริญเติบโตบนกิ่งไม้ พื้นหิน พื้นดิน และที่ชื้นแฉะ สำหรับประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลหวายมากกว่า 150 ชนิด ซึ่งจัดจำแนกตามลักษณะสัณฐาน (morphology) ได้ 41 หมู่ [1] โดยมีความหลากหลายทั้งสีสัน กลิ่น ขนาด และรูปร่าง ซึ่งประเทศไทยมีการส่งออกกล้วยไม้สกุลหวายเพิ่มมากขึ้นทุกปี [2]

ดังนั้นเพื่อตอบสนองความต้องการของตลาดกล้วยไม้โลก จึงมีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้เกิดกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมจำนวนมาก ปัจจุบันกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมกลายเป็นสินค้าหลักในตลาดกล้วยไม้โลก ซึ่งยิ่งส่งผลให้นักปรับปรุงพันธุ์พัฒนากล้วยไม้พันธุ์ใหม่ ๆ เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและแพร่หลาย โดยพบว่ามีการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ลูกผสมแบบเดิมมากกว่าหนึ่งครั้ง ดังนั้นจึงเกิดความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) สูงยิ่งขึ้น ด้วยเหตุนี้การอนุรักษ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์พื้นเมือง (native species) หรือชนิดดั้งเดิมจึงเป็นเรื่องที่ควรทำอย่างเร่งด่วน เพื่ออนุรักษ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์พื้นเมืองไว้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในอนาคต

ปัจจุบัน CBOL (Consortium for the Barcode of Life) เสนอว่าชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่งจำเพาะ (specific site) เหมาะสมสำหรับการระบุพันธุ์พืช โดยตำแหน่งนั้นต้องประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) แบบลำดับอนุรักษ์ (conserved sequence) สำหรับเป็นที่จับของไพรเมอร์สากล (universal primer) และส่วนที่มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง เพื่อให้จำเพาะกับพืชแต่ละพันธุ์ ทั้งนี้ CBOL เสนอตำแหน่งที่เหมาะสม คือ ชิ้นดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ได้แก่ ยีน *mat*K, *rpo*B, *rpo*C1, *rpo*C2, *acc*D, *ndh*A, *ndh*J, *ndh*K, *YCF*5, *YCF*9 และ *rbc*L และได้เสนอตำแหน่งมาตรฐาน 2 ยีน คือ ยีน *mat*K และ *rbc*L [3] โดย

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชสามารถเลือกใช้ชิ้นดีเอ็นเอสั้น ๆ ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในแต่ละชนิด (หรือพันธุ์) เดียวกันต่ำ แต่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิด (หรือพันธุ์) สูง ดังนั้นการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะนี้จึงให้ความแม่นยำสูง สะดวก และรวดเร็ว โดยงานวิจัยนี้ได้เลือกศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะในคลอโรพลาสต์ 2 ยีน คือ ยีน *mat*K และ *rbc*L ซึ่งแต่ละยีนมีความสำคัญ ดังนี้

ยีน muturaseK (*mat*K) เป็นยีนกำหนดการสร้างเอนไซม์แมทัวเรส (maturase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการตัดแต่งอาร์เอ็นเอ (RNA splicing) [4]

ยีน ribulose bisphosphate carboxylase (*rbc*L) เป็นยีนกำหนดการสร้างโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์ RuBisCO (ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ในการกระบวนสังเคราะห์ด้วยแสง (photosynthesis) ดังนั้นจึงนิยมใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) สำหรับศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการในพืชหลายชนิด [5]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) รวมทั้งระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสม รวม 21 ชนิด/พันธุ์ โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rbc*L ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสม ใช้วางแผนการผสมเพื่อปรับปรุงพันธุ์ รวมทั้งใช้ตรวจสอบ ชนิด/พันธุ์ เพื่อการคุ้มครองและการอนุรักษ์กล้วยไม้พันธุ์พื้นเมืองของไทยที่มักจะถูกลักลอบเก็บมาขายโดยผิดกฎหมายได้อีกด้วย

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างกล้วยไม้

กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ จำนวน 21 ชนิด/พันธุ์ ซึ่งเก็บรวบรวมจากแหล่งเพาะปลูกต่าง ๆ ของประเทศไทย แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือ กล้วยไม้พันธุ์พื้นเมืองที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ เป็นกล้วยไม้ที่พบในป่าตามภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย นำมาเพาะปลูกและขยายพันธุ์แบบธรรมชาติโดยไม่ใช้เพศ จำนวน 13 ชนิด (ตารางที่ 1) และกลุ่มที่ 2 คือ กล้วยไม้ลูกผสมที่เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการผสมข้ามพันธุ์ (specific cross) จำนวน 8 พันธุ์ (ตารางที่ 2) โดยตัวอย่างกล้วยไม้ทั้งหมดได้เพาะเลี้ยงจนกระทั่งออกดอก 2 ครั้ง เพื่อระบุ ชนิด/พันธุ์ ด้วยลักษณะสัณฐานโดย รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระชัย ธนานันต์

ตารางที่ 1 กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ พันธุ์พื้นเมืองที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์

ลำดับ	ชื่อสามัญ/ชื่อวิทยาศาสตร์
1	เอื้องสีตาล/*D. heterocarpum* Lindl.
2	เอื้องปากนกแก้ว/*D. cruentum* Rchb. f.
3	เอื้องเงินหลวง/*D. formosum* Roxb. Ex Lidl.
4	เอื้องแซะหอม/*D. scabrilingue* Lindl.
5	เอื้องเงิน/*D. draconis* Rchb. f.
6	เอื้องทอง/*D. ellipsophyllum* Tang & Wang
7	เอื้องตาเหิน/*D. infundibulum* Lindl.
8	เอื้องนางชี/*D. kontumense* Gagnep.
9	เอื้องแซะภูกระดึง/*D. christyanum* Rchb. f.
10	เอื้องเงินแสด/*D. williamsonii* Day & Rchb. f.
11	เอื้องตาเหินเวียดนาม/*D. longicornu* Lindl.
12	เอื้องเงินแดง/*D. cariniferum* Rchb. f.
13	เอื้องแซะหม่น/*D. bellatulum* Rolfe

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมด้วยวิธีประยุกต์ของ Doyle และ Doyle [6-8] แล้วตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) [9] ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเตรียมสารละลายดีเอ็นเอเพื่อใช้สำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR, polymerase chain reaction)

ตารางที่ 2 กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ ลูกผสมที่ขายทางการค้า

ลำดับที่	ชื่อกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ ลูกผสม	คู่ผสม (แม่พันธุ์ x พ่อพันธุ์)
1	ดอนมารี (Dawn Maree)	เอื้องปากนกแก้ว x เอื้องเงินหลวง
2	รุ่งกมล เวศย์วรุฒม์ (Roongkamol Vejvarut)	ดอนมารี x เอื้องเงินหลวง
3	กรีนแลนเทิร์น (Green Lanturn)	ดอนมารี x เอื้องปากนกแก้ว
4	ลูกผสมดอนมารี (Dawn Maree hybrid)	ดอนมารี x เอื้องแซะหอม
5	เอื้องแซะหอม x เอื้องทอง	เอื้องแซะหอม x เอื้องทอง
6	เอื้องเงินหลวง x เอื้องทอง (Wunderbar's Formosae)	เอื้องเงินหลวง x เอื้องทอง
7	ฟรอสตี้ดอนปากแดง (Frosty Dawn ‘Red Labellum’)	ดอนมารี x ไลม์ฟรอส*
8	ฟรอสตี้ดอนปากเหลือง (Frosty Dawn ‘Yellow Labellum’)	ดอนมารี x ไลม์ฟรอส*

*ไลม์ฟรอส (Lime Frost) เกิดจากคู่ผสมระหว่างเอื้องปากนกแก้วกับเอื้องแซะหอม

2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอและการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม (ng) ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (10 mM KCl, 0.25 mM $MgCl_2$, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$ และ 0.1 mg/ml BSA) มีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์สากล (universal primer) 250 นาโนโมลาร์ (nM) ที่จำเพาะกับยีน *mat*K (*mat*K-F: 5′-TAATTTACGATCAATTCATTC-3′ และ *mat*K-R: 5′-TCGGAGTCTTTCTTGAGCG-3′) [3] หรือไพรเมอร์สากลที่จำเพาะยีน *rbc*L (*rbc*L-F: 5′-TCACCACAAACAGAAACTAAAGC-3′ และ *rbc*L-R: 5′-GGCACAAAATAAGAAACGATCTC-3′) [3] และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต (Unit) (RBC Bioscience, Taiwan)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.0 เปอร์เซ็นต์ [10] โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA) ซึ่งต้องปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายของยีน *mat*K

และ *rbc*L ขนาดประมาณ 900 และ 600 คู่เบส (bp) ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสนี้ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Solgent (ประเทศเกาหลีใต้)

2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rbc*L ในกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมแต่ละ ชนิด/พันธุ์ มาตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อยืนยันความถูกต้องด้วยการเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) โดยใช้โปรแกรม BLASTX (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

หลังจากนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rbc*L ของกล้วยไม้สกุลหวายแต่ละพันธุ์มาเปรียบเทียบด้วยการจัดให้ตรงตำแหน่ง (alignment) โดยใช้โปรแกรม ClustalW (http://www.genome.jp/tools/clustalw) และทดสอบโมเดลที่เหมาะสมก่อนการนำไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป MEGA รุ่น 7.0 (http://www.megasoftware.net/mega7) โดยคำนวณอัลกอริทึม (algorithm) 2 วิธี คือ วิธี character-base ด้วยการจัดกลุ่มแบบ maximum likehood (ML) และวิธี distance-base ด้วยการจัดกลุ่มแบบ neighbor joining (NJ) โดยวิเคราะห์ bootstrap 1,000 รอบ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *mat*K และ *rbc*L ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอทั้ง 2 ยีน ในกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอซูเธ และลูกผสมได้ครบทั้ง 21 ชนิด/พันธุ์ โดยผลิตผลจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้มีขนาดประมาณ 900 และ 600 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทป์ พบว่าชิ้นดีเอ็นเอของยีน *mat*K มีขนาด 615 ถึง 948 คู่เบส ส่วนชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbc*L มีขนาด 660 ถึง 663 คู่เบส

ตารางที่ 3 หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rbc*L ที่ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank

ชื่อพันธุ์กล้วยไม้	หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน	
	*mat*K	*rbc*L
เอื้องปากนกแก้ว	KP762108	KP762094
เอื้องเงินหลวง	KP762109	KP762095
ดอนมารี	KP762110	KP762128
รุ่งกมล เวศย์วรุฒม์	KP762111	KP762096
กรีนแลนเทิร์น	KP762112	KP762097
ลูกผสมดอนมารี	KP762113	KP762129
เอื้องแซะหอม	KP762114	KP762098
เอื้องแซะหอม x เอื้องทอง	KP762115	KP762133
เอื้องเงิน	KP762116	KP762099
เอื้องทอง	KP762117	KP762100
เอื้องเงินหลวง x เอื้องทอง	KP762118	KP762130
เอื้องตาเหิน	KP762119	KP762101
เอื้องนางชี	KP762120	KP762102
เอื้องแซะภูกระดึง	KP762123	KP762103
ฟรอสตี้ดอนปากแดง	KP762121	KP762131
ฟรอสตี้ดอนปากเหลือง	KP762122	KP762132
เอื้องเงินแสด	KP762124	KP762104
เอื้องสีตาล	KP762125	KP762105
เอื้องตาเหินเวียดนาม	KP762126	KP762106
เอื้องเงินแดง	KP762127	KP762107
เอื้องแซะหม่น	KU647193	KU647190

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทป์ของยีน *mat*K และ *rbc*L ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าทั้ง 2 ยีน มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวในกล้วยไม้สกุลหวาย 97-99 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นได้ฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งมีหมายเลขเฉพาะ (accession number) ดังตารางที่ 3

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอซูเธ และลูกผสมทั้ง 21 ชนิด/พันธุ์ ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่ามีความผันแปรทางพันธุกรรมจากความแตกต่างในตัวอย่างกล้วยไม้แต่ละ ชนิด/พันธุ์ ที่เกิดจากการกลายระดับยีน (gene mutation) 3 รูปแบบ คือ การแทนที่นิวคลีโอไทด์ใหม่ (base-pair substitution) แบบทรานซิชัน (transition) ทรานสเวอร์ชัน (transversion) และอินเดล (indel, insertion/deletion) โดยการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์อาจส่งผลต่อการเกิดวิวัฒนาการ (evolution process) [11] เนื่องจากอาจทำให้การแปลรหัส (translation) เพื่อสร้างกรดอะมิโน (amino acid) ที่เป็นส่วนประกอบของพอลิเพปไทด์ (polypeptide) เปลี่ยนไป

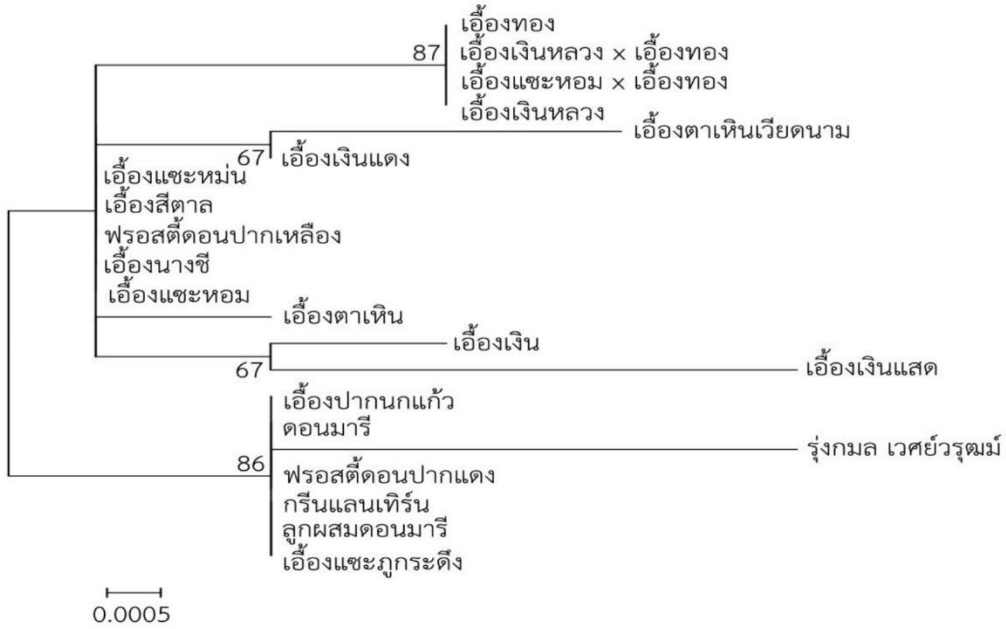
ยีน *mat*K มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลาย 339 ตำแหน่ง (คิดเป็น 35.53 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 4) และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ด้วยโปแกรม MEGA รุ่น 7.0 พบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (distance coefficient) เท่ากับ 0.000 ถึง 0.015 ซึ่งโมเดลที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ คือ Tamura 3-parameter เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 2 วิธี ได้แก่ maximum likelihood (รูปที่ 1) และ neighbor joining (รูปที่ 2) พบว่าสามารถระบุกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอซูเธ และลูกผสมที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้ 6 ชนิด/พันธุ์ (คิดเป็น 28.6 เปอร์เซ็นต์) และ 8 ชนิด/พันธุ์ (คิดเป็น 38.1 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ที่พบความแตกต่างในแต่ละพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสม

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ที่พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์
อินเดล	22-323, 325-360 และ 924
พิวรีนทรานสิชัน	324, 367, 530 และ 774
ไพริมิดีนทรานสิชัน	30, 31, 34, 35, 423, 550 และ 619
ทรานส-เวอร์ชัน	49, 169, 202, 250, 264, 375, 594, 714, 718, 745, 771, 811, 863, 875 และ 919

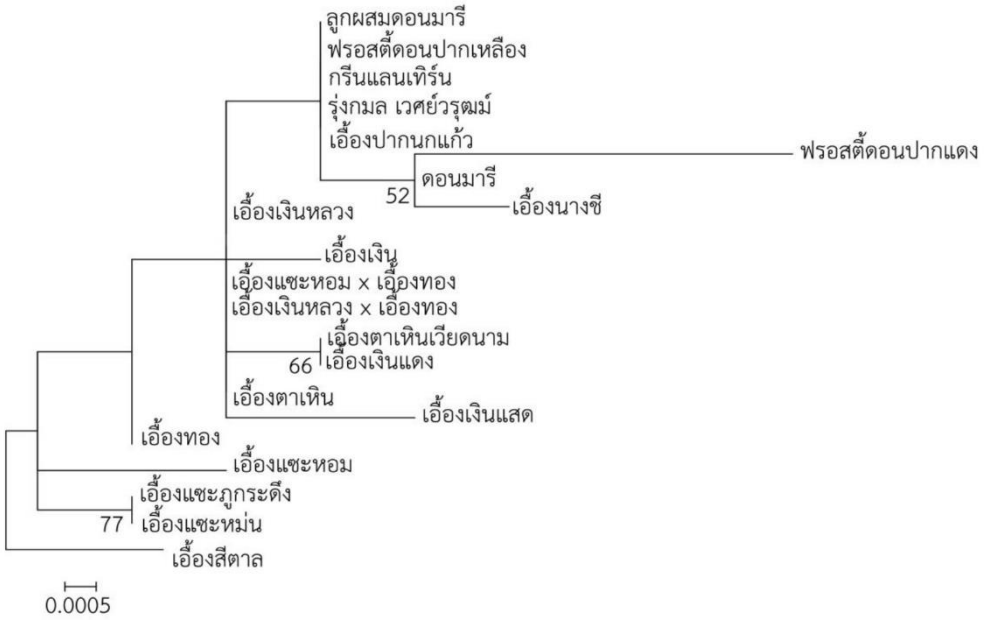
ตารางที่ 5 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ที่พบความแตกต่างในแต่ละพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสม

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ที่พบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์
อินเดล	30 และ 49
พิวรีนทรานสิชัน	562 และ 640
ไพริมิดีนทรานสิชัน	148, 264, 334 และ 421
ทรานส-เวอร์ชัน	31, 35, 38, 43, 46, 76, 80, 82, 280 และ 421

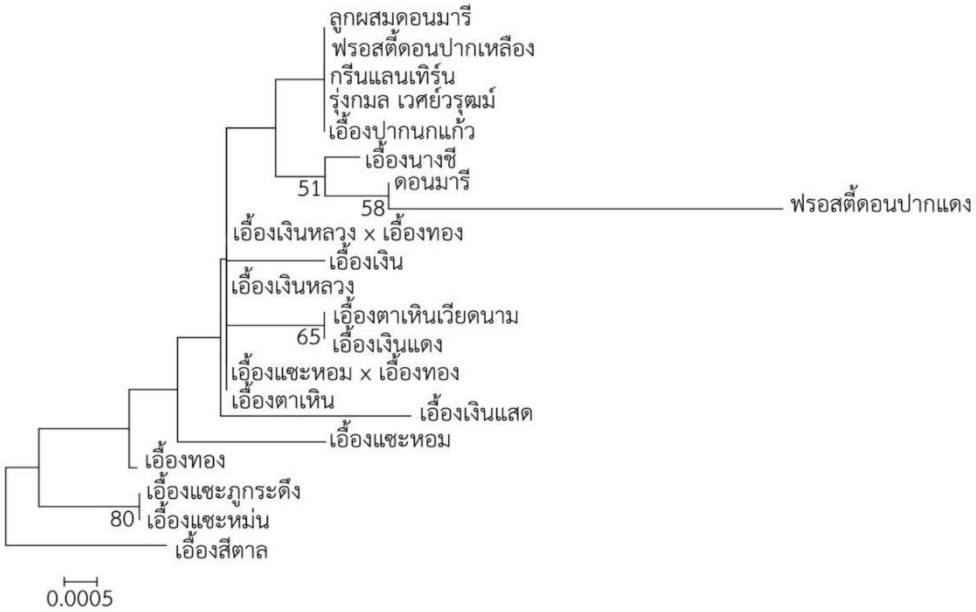


รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ด้วยวิธีคำนวณจากโมเดล Tamura 3-parameter และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี maximum likelihood

รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ด้วยวิธีคำนวณจากโมเดล Tamura 3-parameter และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี neighbor joining



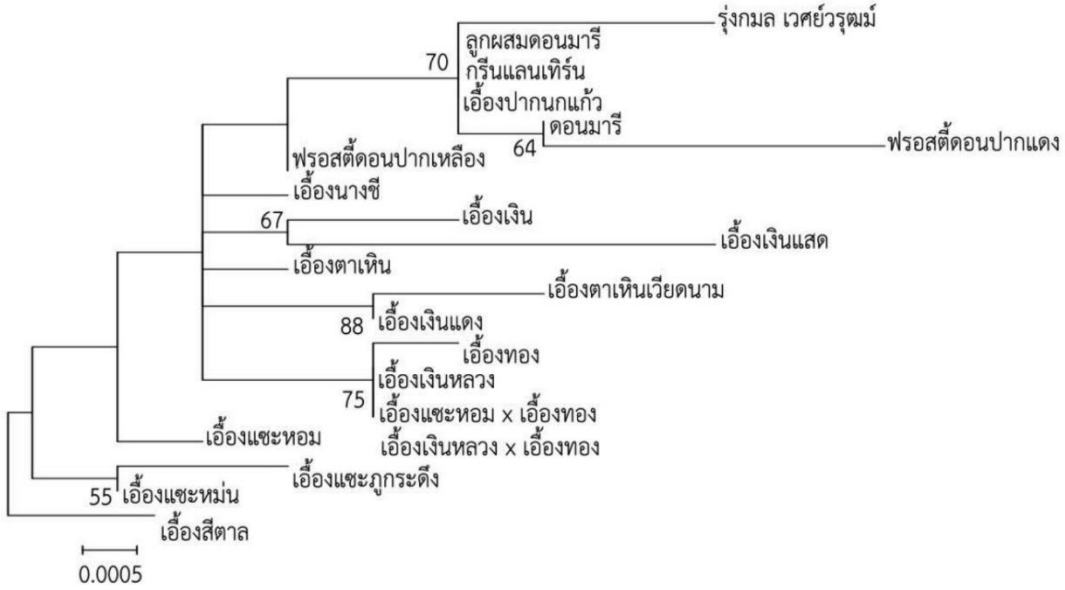
รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ด้วยวิธีคำนวณจากโมเดล Jukes-Cantor และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี maximum likelihood



รูปที่ 4 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ด้วยวิธีคำนวณจากโมเดล Jukes-Cantor และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี neighbor joining

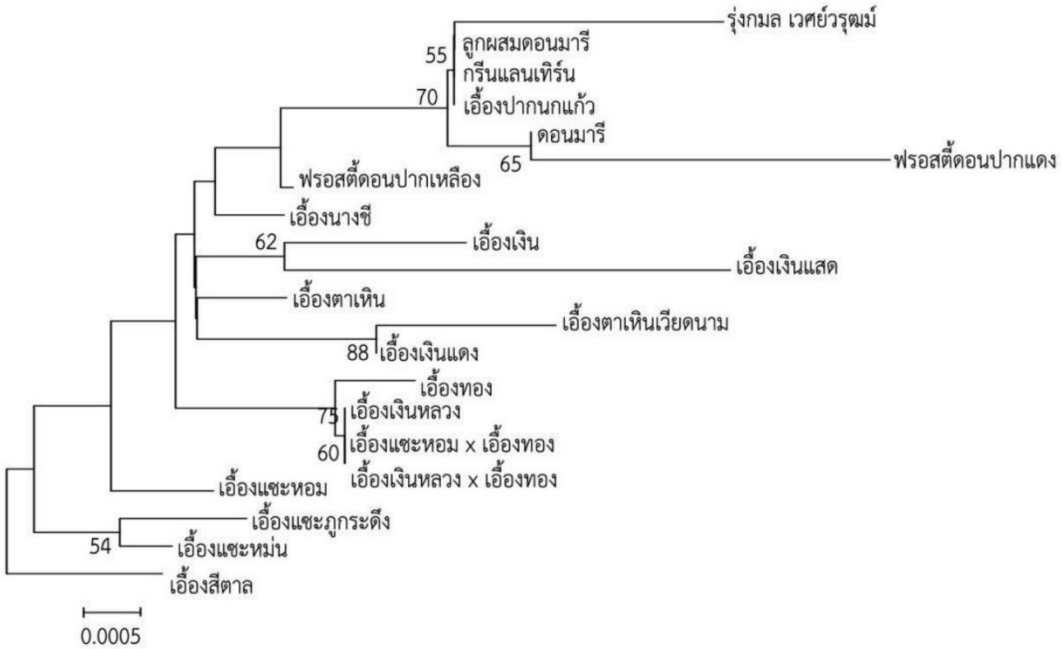
ยีน *rbc*L มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการกลาย 16 ตำแหน่ง (คิดเป็น 2.41 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 5) และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ด้วยโปแกรม MEGA รุ่น 7.0 พบค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.000 ถึง 0.015 ซึ่งโมเดลที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ คือ Jukes-Cantor เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 2 วิธี ได้แก่ maximum likelihood (รูปที่ 3) และ neighbor joining (รูปที่ 4) ซึ่งทั้ง 2 วิธี สามารถระบุกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอซูเธ และลูกผสมที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้ 10 ชนิด/พันธุ์ (คิดเป็น 47.6 เปอร์เซ็นต์)

อย่างไรก็ตาม ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองยีนยังไม่สามารถระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอซูเธ และลูกผสม ครบทั้ง 21 ชนิด/พันธุ์ แต่ละยีนนั้นให้ประสิทธิภาพในการจำแนกต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเกิดจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเพียงตำแหน่งเดียวมีขนาดไม่ยาวนัก จึงยังให้ข้อมูลที่ไม่เพียงพอสำหรับการระบุพันธุ์ ด้วยเหตุนี้จึงได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 2 ยีน มาวิเคราะห์ร่วมกัน แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยโมเดลที่เหมาะสม คือ Tamura 3-parameter เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี maximum likelihood (รูปที่ 5) และ neighbor joining (รูปที่ 6) พบว่าทั้ง 2 วิธี สามารถระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอซูเธ และลูกผสมได้ 15 ชนิด/พันธุ์ (คิดเป็น 71.4 เปอร์เซ็นต์)



รูปที่ 5 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ร่วมกับ *rbc*L ด้วยวิธีคำนวณจากโมเดล Tamura 3-parameter และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี maximum likelihood

ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะของยีนในคลอโรพลาสต์จำนวน 1 ยีน หรือ 2 ยีน ร่วมกันนั้น เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมให้ผลในทำนองเดียวกัน คือ สามารถระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสม จำนวน 21 ชนิด/พันธุ์ ได้เพียงบาง



รูปที่ 6 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K ร่วมกับ *rbc*L ด้วยวิธีคำนวณจากโมเดล Tamura 3-parameter และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี neighbor joining

ชนิด/พันธุ์ อย่างไรก็ตาม การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะร่วมกัน 2 ตำแหน่ง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการจัดจำแนกพืชได้มากกว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว เช่นเดียวกับงานวิจัยที่เคยรายงานมาก่อน [12-17] หรือการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะของยีน *mat*K ร่วมกับ *rbc*L ยังไม่สามารถจัดจำแนกกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสม จำนวน 21 ชนิด/พันธุ์ ได้ทั้งหมด เนื่องจากตัวอย่างกล้วยไม้ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้เป็นลูกผสม จำนวน 8 พันธุ์ ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากแม่พันธุ์เดียวกัน (เอื้องปากนกแก้ว) ส่งผลให้จีโนมของคลอโรพลาสต์ในกล้วยไม้ลูกผสมนั้นมีความคล้ายกับต้นแม่พันธุ์มาก ด้วยเหตุนี้จึงควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะที่พบความผันแปรทางพันธุกรรมสูง เช่น ยีน *rpo*C1 หรือชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A โดยการเพิ่มประสิทธิภาพในการระบุพันธุ์ควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะมากกว่า 2 ยีน ร่วมกัน ตัวอย่าง เช่น การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ของกล้วยไม้สกุลหวายในประเทศจีน ซึ่งใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะร่วมกัน 3-4 ยีน โดยสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการระบุพันธุ์ได้มากยิ่งขึ้น [18]

4. สรุป

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสม 21 ชนิด/พันธุ์ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะของยีน *mat*K และ *rbc*L พบว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 1 ยีน นั้นจะให้

ประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ยีนร่วมกัน ซึ่งโมเดล Tamura 3-parameter และวิธีการจัดกลุ่มแบบ neighbor joining เหมาะสมที่สุด โดยสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการจำแนกได้มากถึง 71.4 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างน้อย 2 บริเวณ โดยผลการวิจัยสามารถนำไปใช้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเพื่อการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนี้สามารถนำไปใช้วางแผนการอนุรักษ์และการผสมพันธุ์เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

5. รายการอ้างอิง

[1] อบฉันท์ ไทยทอง, 2542, กล้วยไม้เมืองไทย, สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.

[2] สำนักพัฒนาการค้าและธุรกิจการเกษตรและอุตสาหกรรมกรมการส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ, แหล่งที่มา : http://www.ditp.go.th/contents_attach/92375/92375.pdf, 21 ธันวาคม 2558.

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

[4] Reimo, Z., Oren, O., Thomas, B., Christian and Schmitz, L., 2006, Analysis of the regulation of *mat*K gene expression *Endocytobiosis*, Cell Res. 19: 127-135.

[5] Schuettpelz, E., Korall, P. and Pryer, K.M., 2006, Plastid at data provide improved support for deep relationships among ferns, Taxon 55: 897-906.

[6] 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.

[7] จุฑาทิพย์ พันธ์รูปท้าว, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2559, การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมด้วยแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 77-87.

[8] ธีระชัย ธนานันต์, จุฑาทิพย์ พันธ์รูปท้าว และนฤมล ธนานันต์, 2559, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ซูเธ และลูกผสมด้วยไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 5: 181-189.

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

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

[11] ธีระชัย ธนานันต์, 2553, พันธุศาสตร์โมเลกุล, พิมพ์ครั้งที่ 1, บริษัท แดเน็กซ์ อินเตอร์คอร์ปอเรชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

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

[13] นฤมล ธนานันต์, จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และธีระชัย

ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcL และ rpoC1, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 674-682.

[14] ปิยดา บุสดี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpo*C และ *rbc*L, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 983-993.

[15] จินต์ ทองสม, ภัทรพร คุ้มภัย, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcL และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน trnH กับ psbA, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 23: 994-1005.

[16] นฤมล ธนานันต์, ปิยดา บุสดี และธีระชัย ธนานันต์, 2559, การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*B และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วงในประเทศไทย, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24: 102-111.

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

[18] Songzhi, X., Dezhu, L., Jianwu, L., Xiaoguo, X., Weitao, J., Weichang, H., Xiaohua, J. and Luqi, H., 2015, Evaluation of the DNA barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from Mainland Asia, PLoS One 10: e0115168.