

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลก้านก่อด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL*

Assessment of Genetic Relationship and Identification of Orchids in the Genus *Eria* Using Nucleotide Sequences of *matK* and *rbcL* Genes

จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์ และธีระชัย ธานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Jutamas Jiemjuejun 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

การวิจัยนี้ได้สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลก้านก่อจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL* ด้วยวิธี maximum likelihood เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกชนิดกล้วยไม้สกุลก้านก่อ 30 ชนิด โดยเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของตำแหน่งจำเพาะทั้ง 2 บริเวณ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสึมนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากนั้นจึงวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW และ MEGA7 พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* แยกชนิดกล้วยไม้สกุลก้านก่อได้ดี แต่แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* มีประสิทธิภาพต่ำกว่า โดยแยกชนิดของกล้วยไม้สกุลก้านก่อได้น้อยกว่า เนื่องจากมีการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะทั้งสองร่วมกัน จะทำให้มีประสิทธิภาพในการจำแนกสูงขึ้น ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอนุกรมวิธาน การอนุรักษ์พันธุกรรม และการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้

คำสำคัญ : กล้วยไม้; สกุลก้านก่อ; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การจำแนก; ยีน *matK*; ยีน *rbcl*

Abstract

Phylogenetic trees of orchids in the genus *Eria* were constructed using nucleotide sequences of *matK* and *rbcl* genes. The datasets were analyzed by maximum likelihood method to study interspecific relationships and molecular identification of orchid in the genus *Eria* (30 species) using nucleotide sequences. Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify *matK* and *rbcl* gene fragments and after that the PCR products were sequenced. The nucleotide sequences were analyzed by ClustalW for multiple sequence alignment and phylogenetic tree were constructed by MEGA7. The phylogenetic tree constructed from nucleotide sequences of *matK* genes was effective for discrimination of each species, whereas the other from nucleotide sequences of *rbcl* gene revealed lower separating capability because of low rate of nucleotide substitution. However, result of combined sequences can be efficiently used for classification. However, this research information can be applied to taxonomic investigation, plant genetic conservation and breeding.

Keywords: orchid; *Eria*; genetic relationship; identification; *matK*; *rbcl*

1. บทนำ

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae เป็นไม้ตัดดอกที่ได้รับความนิยมเนื่องจากดอกของกล้วยไม้มีลักษณะดอก สี สัน และลวดลายสวยงาม กล้วยไม้ถือเป็นไม้ตัดดอกที่มีอายุการใช้งานได้นาน อีกทั้งกล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย เพราะเป็นไม้ส่งออกขายไปยังต่างประเทศ สร้างรายได้เข้าประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท และมีการปลูกเลี้ยงอย่างครบวงจร ตั้งแต่การผสมเกสร เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เลี้ยงลูกกล้วยไม้ เลี้ยงต้นกล้วยไม้ จนกระทั่งให้ดอก ตัดดอกบรรจุหีบห่อและส่งออก แหล่งกำเนิดกล้วยไม้ป่าที่สำคัญของโลกมี 2 แหล่งใหญ่ คือ ลาตินอเมริกา และเอเชียแปซิฟิก [1] ส่วนแหล่งกำเนิดกล้วยไม้ป่าในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิกนั้น ประเทศไทยถือเป็นศูนย์กลางของกล้วยไม้ จากการศึกษาพบว่าประเทศไทยมีพันธุ์กล้วยไม้ป่าเป็นจำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีสภาพแวดล้อม

เอื้ออำนวยต่อการเจริญงอกงามของกล้วยไม้ นอกจากนี้กล้วยไม้ป่าที่พบในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิกยังมีลักษณะโดดเด่นเป็นเอกลักษณ์แตกต่างจากกล้วยไม้ในภูมิภาคลาตินอเมริกา

กล้วยไม้สกุลก้านก่อหรือสกุลเอเรีย (*Eria*) ค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1825 โดย Lindley สำหรับชื่อสกุลมีรากศัพท์มาจากภาษากรีกว่า Erion (ขนแกะ) หมายถึงขนอ่อนนุ่มที่ด้านกลีบเลี้ยงที่พบได้ทั่วไปในกล้วยไม้สกุลนี้ ส่วนชื่อไทยมีหลากหลายชื่อ เช่น สกุลเอื้องบายศรี สกุลเอื้องนัม [1] ลักษณะโดยทั่วไปของกล้วยไม้สกุลก้านก่อเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย เจริญด้านข้าง ลำลูกกล้วยมีขนาดเล็กจนถึงมีขนาดใหญ่ มีหลายข้อปล้องและมีหลายรูปทรงบางชนิดกลม บางชนิดแบน และบางชนิดลดรูปลงจนปรากฏรูปทรงไม่เด่นชัด มีทั้งชนิดขึ้นชิดกันเป็นกอและขึ้นห่าง ๆ กันบนเหง้า [2] ใบมีหลายรูปทรง ออกที่ข้อหรือออกที่ใกล้ยอด มีหลายใบ เรียงสลับ โคนใบมักเป็นกาบ ใบอ่อน

พบตามแนวยาวช่อดอกเป็นช่อกระจะ ออกด้านข้าง หรือที่กล้วยัด มีตั้งแต่ช่อเดียวจนถึงหลายช่อ ตั้งตรง หรือทอดเอียง ดอกมีจำนวนน้อยจนถึงมาก เรียงเวียน บานจากโคนสู่ปลายช่อ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกแยก ออกเป็นอิสระ กลีบปากอยู่ทางด้านล่าง ไม่มีเดือย เส้า เกสรสั้นหรือยาว มีก้านยื่นยาว มีฝาคีบรอบ กลุ่มเรณูมี 8 กลุ่ม ไม่มีก้านและแป้นก้านกลุ่มเรณู [3] ซึ่งกล้วยไม้ สกุลนี้พบมากในเขตอบอุ่นและเขตร้อนของภูมิภาค เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยประเทศไทยพบ 63 ชนิด [1] ปัจจุบันนี้กล้วยไม้สกุลก้านก้อกำลังได้รับความ สนใจและเป็นที่ต้องการของตลาดเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากลักษณะดอกของกล้วยไม้สกุลนี้ที่โดดเด่นเป็น เอกลักษณะและแตกต่างจากกล้วยไม้สกุลอื่น ๆ อีกทั้งมี จำนวนค่อนข้างน้อยในธรรมชาติและจัดเป็นกล้วยไม้ ป่าหายาก ทำให้ต้องศึกษาในระดับโมเลกุลโดยใช้ เครื่องหมายดีเอ็นเอเข้ามาช่วย เพื่อวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดจำแนกพันธุ์ รวมทั้ง นำไปใช้ประโยชน์ในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์และ อนุรักษ์พันธุ์ต่อไป

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่นิยมใช้ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชนั้น มีการใช้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) หลายตำแหน่งที่มีความ ผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ค่อนข้างสูง แต่มีลำดับอนุรักษ์ (conserved sequence) ที่ส่วนปลาย และมีขนาดไม่ใหญ่มากนัก โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ในพืชมีความเหมาะสม เนื่องจากจีโนม (genome) ของพืชส่วนใหญ่มักเป็นพอลิพลอยด์ (polyploidy) แต่จีโนมของคลอโรพลาสต์นั้นมีเพียง อัลลีล (allele) เดียวจึงเหมาะสมมากกว่า ซึ่งลำดับ นิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเป็นเครื่องหมายที่ได้ แนวคิดมาจาการรหัสแท่งสินค้าหรือบาร์โค้ด (barcode) ที่ติดอยู่ข้างกล่องสินค้ามาใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิต ซึ่ง

สามารถจำแนกได้ทุกระยะการพัฒนาลำดับนิวคลีโอไทด์ในดีเอ็นเอ มาจำแนกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดออกจากกัน ซึ่งสมบัติของ บริเวณที่จะนำมาใช้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง จำเพาะ คือ ต้องมีความแตกต่างกันมากในสิ่งมีชีวิตต่าง ชนิดกัน แต่มีความแตกต่างภายในชนิดเดียวกันต่ำมาก หรือไม่มีเลย และต้องมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ซึ่งบริเวณอนุรักษ์นี้จะทำให้ใช้ไพรเมอร์สากล (universal primer) ได้ และสามารถเพิ่มปริมาณขึ้น ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส (polymerase chain reaction, PCR) [4]

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะนั้น นำมาใช้ครั้งแรกในการจำแนกสิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์ โดย ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาใช้ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน *Cytochrome c oxidase I (COI)* ที่อยู่ใน ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ซึ่งการจัดจำแนก สิ่งมีชีวิตจำพวกสัตว์ค่อนข้างประสบความสำเร็จอย่าง มาก หลังจากนั้นนักวิจัยจึงพยายามที่จะใช้ลำดับนิวคลี- โอไทด์ตำแหน่งจำเพาะมาจำแนกสิ่งมีชีวิตจำพวกพืช แต่จากการวิจัยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COI* ในไมโทคอนเดรียในพืชมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการต่ำ ทำให้มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่เพียงพอที่จะใช้ในการจำแนกชนิดพืช นักวิจัยจึงสนใจลำดับ นิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) โดยมี หลายกลุ่มได้เสนอลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่ง จำเพาะในคลอโรพลาสต์รวม 7 บริเวณ ประกอบด้วย 4 ยีน 3 ซีนดีเอ็นเอระหว่างยีน (spacer) มีศักยภาพ และเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard) ได้ดี ได้แก่ *rbcL*, *rpoC1*, *matK*, *rpoB*, *trnH-psbA*, *atpF-atpH* และ *psbK-psbI* [5]

การวิจัยนี้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และยีน *rbcL* เพื่อจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลก้านก้อ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อวิเคราะห์

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ได้ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (National Center for Biotechnology Information) เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยทางอนุกรมวิธาน และเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์กล้วยไม้สกุลก้านก้อต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลก้านก้อ

กล้วยไม้สกุลก้านก้อ 30 ชนิด ที่ใช้ในการวิจัยนี้แสดงดังตารางที่ 1

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลก้านก้อทั้ง 30 ชนิด ด้วยวิธีประยุกต์จากวิธีของ Doyle และ Doyle [6] ตามวิธีของ นฤมล และคณะ [7] จากนั้นตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร [8]

2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* และ *rbcl*

นำดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลก้านก้อทั้ง 30 ชนิด ที่สกัดได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) แล้วเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของตำแหน่งจำเพาะ คือ ชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* และ *rbcl* โดยทำปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์ส โดยใช้ดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH

9.1), 0.1 % Triton™ X-100 และ 2.5 mM MgCl₂) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์จำเพาะ 250 นาโนโมลาร์ (nM) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *matK* และ *rbcl* (ตารางที่ 2) เอนไซม์ Taq DNA polymerase (Vivantis technologies Sdn Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (Unit) และน้ำ รวมปริมาตรสุทธิ 40 ไมโครลิตร [7]

ปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์สมี 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 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ก่อนนำไปตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) และตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) โดยเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์สกับชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบขนาด (DNA ladder) หลังจากนั้นจึงส่งผลผลิตจากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์สไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท Bioneer (ประเทศเกาหลีใต้) [7]

2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลผลิตของปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์สที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* และ *rbcl* ในกล้วยไม้สกุลก้านก้อ นั้น ได้ส่งไปวิเคราะห์ยังบริษัท Bioneer (ประเทศเกาหลีใต้) เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาแล้ว นำมาตรวจสอบความถูกต้องด้วยการเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ด้วยโปรแกรม BLAST แล้วนำลำดับนิวคลี-

ตารางที่ 1 ชื่อสามัญและชื่อวิทยาศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลก้านก่อ 30 ชนิด หมายเลขจำเพาะและความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcl* ที่ฝากเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank

ลำดับ	ชื่อสามัญและชื่อวิทยาศาสตร์	หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์และความยาว (คู่เบส)	
		<i>matK</i>	<i>rbcl</i>
1	เอื้องดาวเรียง [<i>Eria javanica</i> (SW.) Blume]	KX7210104 (605)	KX721074 (554)
2	เอื้องนํมดอกเหลือง (<i>Eria bractescens</i> Lindl.)	KX7210105 (605)	KX721075 (554)
3	เอื้องคำหิน [<i>Eria lasiopetala</i> (Willd.) Ormerod]	KX7210106 (605)	KX721076 (554)
4	เอื้องเต่าทอง [<i>Eria ornata</i> (Blume) Lindl.]	KX7210107 (605)	KX721077 (554)
5	เอื้องช่องวงช้าง (<i>Eria densa</i> Ridl.)	KX7210108 (605)	KX721078 (554)
6	เอื้องหนวดปลาหมึก (<i>Eria sarcophylla</i> Schltr.)	KX7210109 (605)	KX721079 (554)
7	เอื้องนํมดอกน้อย (<i>Eria eriopsidobulbon</i> C.S.P. Parish & Rchb.f.)	KX7210110 (605)	KX721080 (554)
8	เอื้องอินจัน [<i>Eria biflora</i> (Griff.) Lindl.]	KX7210111 (605)	KX721081 (554)
9	เอื้องนํมกุหลาบ [<i>Eria coronaria</i> (Lindl.) Rchb.f.]	KX7210112 (605)	KX721082 (554)
10	เอื้องนํมมานรี (<i>Eria amica</i> Rchb.f.)	KX7210113 (611)	KX721083 (554)
11	เอื้องท่าทานใต้ (<i>Eria iridifolia</i> Hook.f.)	KX7210114 (605)	KX721084 (554)
12	เอื้องนํมตอยสุเทพ (<i>Eria sutepensis</i> Rolfe ex Downie)	KX7210115 (605)	KX721085 (554)
13	เอื้องนํมปากแดง (<i>Eria atrovinosa</i> Carr)	KX7210116 (605)	KX721086 (554)
14	เอื้องศรีประภา (<i>Eria cristata</i> Rolfe)	KX7210117 (605)	KX721087 (554)
15	เอื้องนํมมาเลย์ (<i>Eria xanthocheila</i> Ridl.)	KX7210118 (605)	KX721088 (554)
16	โรบัสตา [<i>Eria robusta</i> (Blume) Lindl.]	KX7210119 (605)	KX721089 (554)
17	เอื้องช่อเงินยวง (<i>Eria globulifera</i> Seidenf.)	KX7210120 (605)	KX721090 (554)
18	เอื้องดอกไม้เงิน (<i>Eria paniculata</i> Lindl.)	KX7210121 (605)	KX721091 (554)
19	เอื้องประคำร้อย (<i>Eria pellipes</i> Rchb.f. ex Hook.f.)	KX7210122 (605)	KX721092 (554)
20	เอื้องกระเพาะปลา (<i>Eria acervata</i> Lindl.)	KX7210123 (605)	KX721093 (554)
21	เอื้องแจกันเงิน (<i>Eria obesa</i> Lindl.)	KX7210124 (605)	KX721094 (554)
22	เอื้องแปรงสีฟันพระอินทร์ (<i>Eria siamensis</i> Schltr.)	KX7210125 (605)	KX721095 (554)
23	เอื้องสายฝน (<i>Eria mucronata</i> Lindl.)	KX7210126 (605)	KX721096 (554)
24	เอื้องตาลหิน (<i>Eria discolor</i> Lindl.)	KX7210127 (605)	KX721097 (554)
25	เอื้องนํมกุ (<i>Eria marginata</i> Rolfe)	KX7210128 (605)	KX721098 (554)
26	เอื้องนํมปากตัด (<i>Eria truncata</i> Lindl.)	KX7210129 (605)	KX721099 (554)
27	ยูนิโฟเลีย (<i>Eria unifolia</i> J.J.Sm.)	KX7210130 (605)	KX721100 (554)
28	โกลปีเฟรา (<i>Eria globifera</i> Rolfe)	KX7210131 (605)	KX721101 (554)
29	เอื้องนํมนาง (<i>Eria pannea</i> Lindl.)	KX7210132 (605)	KX721102 (554)
30	เนกลีคตา (<i>Eria neglecta</i> Ridl.)	KX7210133 (605)	KX721103 (554)

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์สากลที่ใช้เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* และ *rbcl*

ยีน	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	อ้างอิง
<i>matK</i>	Forward	TCTGGAGTCTTTCTTGAGCG	CBOL, 2009
	Reverse	GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG	CBOL, 2009
<i>rbcl</i>	Forward	TCACCACAAACAGAACTAAAGC	CBOL, 2009
	Reverse	GGCACAAATAAGAAACGATCTC	CBOL, 2009

โอไทด์ของแต่ละยีนมาวิเคราะห์ความคล้ายคลึงกันด้วยการจัดเรียงตำแหน่งเปรียบเทียบกันแบบหลายตัวอย่าง (multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม ClustalW [9] และวิเคราะห์หัตถด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 [10] เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยเลือกการวิธีการจัดกลุ่ม 4 วิธี ได้แก่ maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP), neighbor joining (NJ) และ unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) แล้วเลือกวิธีการจัดกลุ่มที่ให้ผลการจำแนกตรงกับ การจำแนกด้วยลักษณะสัณฐาน (morphology) มากที่สุด

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* และ *rbcl*

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* และ *rbcl* ในกล้วยไม้สกุลก้านก่อ จำนวน 30 ชนิด ด้วยไพรเมอร์สากล พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 30 ชนิด แถบดีเอ็นเอที่ได้มีความชัดเจนและมีความถูกต้องตามที่ต้องการ โดยชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มีขนาด 605-611 คู่เบส และชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbcl* ที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 554 คู่เบส จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้สกุลก้านก่อที่ได้แต่ละชนิดไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ใน

พืชอื่น (มีค่า identity 99 เปอร์เซ็นต์) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในพืชอื่น (มีค่า identity 99 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นั้นเป็นบริเวณที่ถูกต้อง โดยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้งสองในกล้วยไม้สกุลก้านก่อทั้ง 30 ชนิด ได้ฝากเก็บไว้ที่ฐานข้อมูล GenBank มีหมายเลขจำเพาะ (accession number) ดังตารางที่ 1 จากนั้นจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้สกุลก้านก่อทั้ง 30 ชนิด ด้วยโปรแกรม ClustalW ด้วยวิธี multiple alignment พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างในกล้วยไม้แต่ละชนิด ซึ่งเกิดจากความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) หรือเกิดการกลายระดับยีน (gene mutation) 4 รูปแบบ ได้แก่ อินเดล (indel, insertion/deletion) พิวรีนทรานสิชัน (purine transition) ไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) และทรานสเวอร์ชัน (transversion) โดยการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์นี้อาจส่งผลต่อวิวัฒนาการ (evolution) [10]

3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcl*

3.2.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK*

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* แบบ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *matK* ขนาด 605-611 นิวคลีโอไทด์ ต่างกัน

68 ตำแหน่ง (11.24 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 3) เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 พบว่ามีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม 0.000-0.030 แล้วเมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเลือกการจัดกลุ่ม 4 วิธี ได้แก่ ML, MP, NJ และ UPGMA พบว่าการจัดกลุ่มที่ให้ผลการจำแนกตรงกับผลการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานมากที่สุด คือ ML โดยให้ผลสอดคล้องกับหมู่ (section) ของกล้วยไม้สกุลก้านก่อ

เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ากล้วยไม้สกุลก้านก่อที่ใช้ในการวิจัยนี้ 30 ชนิด มี 21 ชนิด (70 เปอร์เซ็นต์) ที่สามารถจำแนก

ออกจากชนิดอื่น ได้แก่ เอื้องดอกไม้เงิน เอื้องทำทานใต้ เอื้องตาลหิน เอื้องน้มนอกน้อย เนกลีตา เอื้องน้วนาง เอื้องประคำร้อย ยูนิฟอเลีย โรบัสตา เอื้องสายฝน เอื้องน้มนวลทอง เอื้องคำหิน เอื้องแจกัน-เงิน เอื้องช่อเงินยวง เอื้องน้มน้อยสุเทพ เอื้องน้มนอก-เหลือง เอื้องเต่าทอง เอื้องน้มนง เอื้องน้มนมาเลย์ เอื้อง-น้มนานรดี และเอื้องกระเพาะปลา และมี 9 ชนิด (30 เปอร์เซ็นต์) ที่ไม่สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่น ได้แก่ เอื้องน้มนปาดตัด เอื้องอินจัน เอื้องแปรงสีฟันพระอินทร์ โกลปีเฟรา เอื้องหวดปลาหมึก เอื้องช่องวงช้าง เอื้อง-ศรีประภา เอื้องน้มนปากแดง และเอื้องดาวเรียง (รูปที่ 1)

ตารางที่ 3 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ที่มีความหลากหลาย

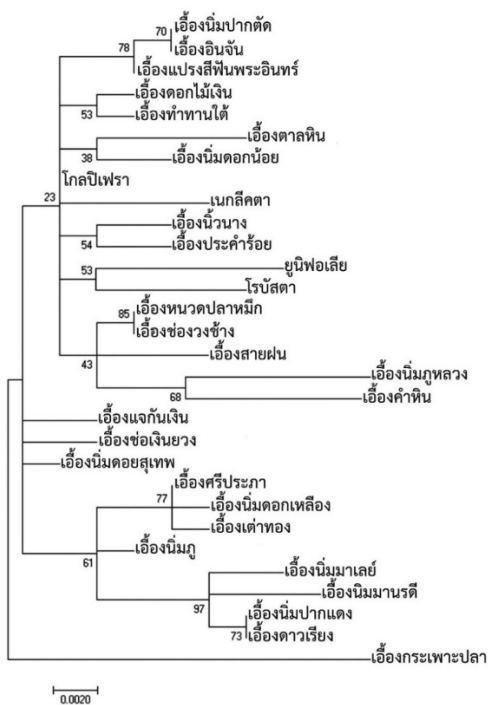
รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
อินเดล	249-254
พิวรีนทรานสชัน	39, 60, 65, 72, 86, 127, 138, 257, 383, 423, 442, 447, 468, 475, 478, 486, 506, 555, 570
ไพริมิดีนทรานสชัน	61, 88, 90, 99, 137, 142, 160, 267, 270, 355, 365, 404, 450, 459, 501, 543, 546, 553, 566
ทรานสเวอร์ชัน	56, 58, 60, 70, 72, 88, 114, 134, 195, 196, 226, 236, 238, 265, 296, 308, 316, 351, 356, 375, 388, 399, 417, 432, 494, 577, 579

นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ยังสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก่อได้ตรงตามหมู่ จำนวน 6 หมู่ คือ (1) หมู่ *Mycaranthes* ได้แก่ เอื้องดอกไม้เงิน และเอื้องทำทานใต้ (2) หมู่ *Aeridostachya* ได้แก่ ยูนิฟอเลีย และโรบัสตา (3) หมู่ *Urostachya* ได้แก่ เอื้องหวดปลาหมึก และเอื้องช่อวงช้าง (4) หมู่ *Strongylaria* ได้แก่ เอื้องน้วนาง และเอื้องประคำร้อย (5) หมู่ *Dendrolirium* ได้แก่ เอื้อง-น้มนมาเลย์ เอื้องน้มนานรดี และเอื้องน้มนปากแดง และ (6) หมู่ *Eria* ได้แก่ เอื้องแจกันเงิน และเอื้องช่อเงินยวง ซึ่งแสดงให้เห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK*

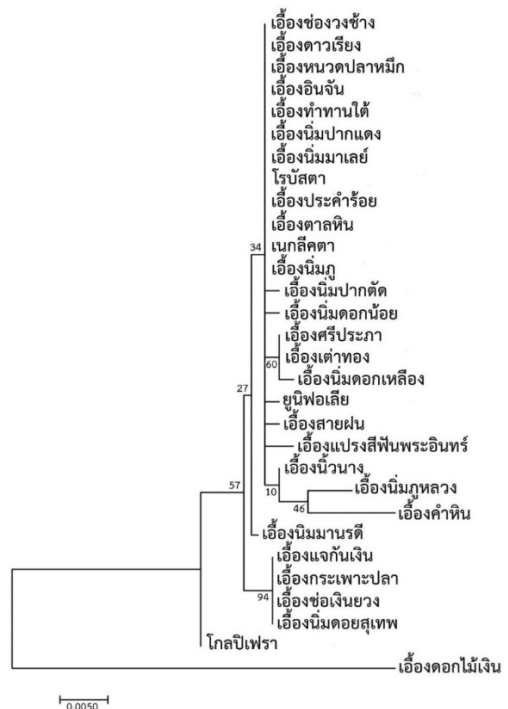
มีประสิทธิภาพในการประเมินความสัมพันธ์และการจำแนกทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลก้านก่อ

3.2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl*

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* แบบ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *rbcl* ขนาด 554 นิวคลีโอไทด์ ต่างกัน 52 ตำแหน่ง (9.39 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 4) เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 พบว่ามีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม 0.000-0.066 และเมื่อสร้างแผนภูมิ



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลก้านก้อที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ ML



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลก้านก้อที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ ML

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเลือกการจัดกลุ่ม 4 วิธี ได้แก่ ML, MP, NJ และ UPGMA พบว่าการจัดกลุ่มที่ให้ผลการจำแนกตรงกับการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานมากที่สุด คือ ML

เมื่อพิจารณาจากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ากล้วยไม้สกุลก้านก้อที่ใช้ในการวิจัยนี้ 30 ชนิด มี 10 ชนิด (33.33 เปอร์เซ็นต์) ที่สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่น ได้แก่ เอื้องนึ่งปากตัด เอื้องนึ่งดอกน้อย เอื้องนึ่งดอกเหลือง ยูนิฟอเลีย เอื้องสายฝน เอื้องแปรสีพื้นพระอินทร์ เอื้องนึ่งภูหลวง เอื้องคำหิน เอื้องนิมมานรดี และเอื้องดอกไม้เงิน และมี 20 ชนิด (66.67 เปอร์เซ็นต์) ที่ไม่สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่น ได้แก่ เอื้องช่องวงช้าง เอื้องดาวเรียง เอื้องหนวดปลาหมึก เอื้องอินจัน เอื้องทำทานใต้ เอื้องนึ่ง

ปากแดง เอื้องนึ่งมาเลย์ โรบัสตา เอื้องประคำร้อย เอื้องตาลหิน เนกสิคตา เอื้องนึ่งภู เอื้องศรีประภา เอื้องเต่าทอง เอื้องนึ่งนาง เอื้องแจกันเงิน เอื้องกระเพาะปลา เอื้องช่อเงินยวง เอื้องนึ่งดอยสุเทพ และโกลปีเฟรา (รูปที่ 2) ซึ่งเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* สามารถจะจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก้อแต่ละชนิดออกจากกันได้น้อย และการจัดจำแนกยังไม่ตรงตามหมู่ของกล้วยไม้สกุลก้านก้อ อย่างไรก็ตาม แม้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* จะไม่เหมาะสมในการใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แต่ก็สามารถใช้ในการจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลก้านก้อบางชนิด โดยสามารถประยุกต์ใช้เพื่อตรวจสอบและจำแนกพันธุ์พืชได้เช่นเดียวกับเครื่องหมายดีเอ็นเออื่น ๆ ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ร่วมกับลำดับ

ตารางที่ 4 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ที่มีความหลากหลาย

รูปแบบการกลาย	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
พิวรีนทรานสิชัน	50, 85, 93, 135, 150, 156, 243, 262, 276, 444, 480, 585, 600, 609, 615
ไพริมิดีนทรานสิชัน	27, 57, 81, 174, 183, 222, 263, 269, 342, 400, 409, 441, 447, 456, 459, 492, 501, 502, 540, 552, 592, 612, 618
ทรานสเวอร์ชัน	42, 81, 105, 144, 171, 222, 261, 262, 268, 279, 369, 420, 424, 425, 430, 525, 579

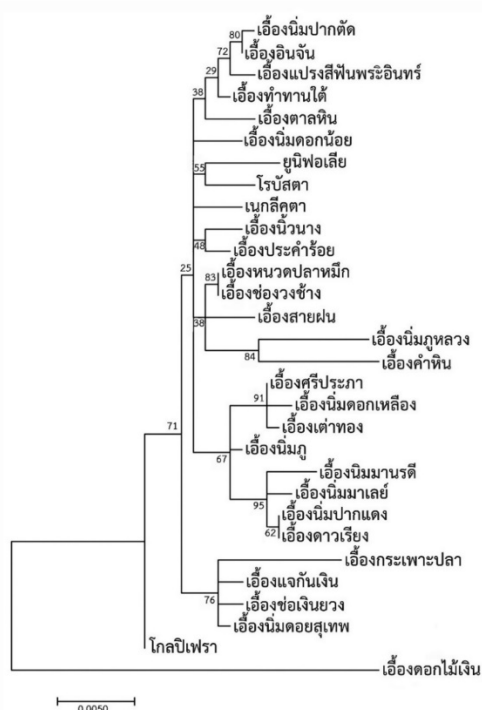
นิวคลีโอไทด์ของยีนอื่น ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลก้านก่อ

3.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *rbcl*

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcl* ร่วมกัน โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ multiple sequences alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW และนำข้อมูลที่ได้ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 โดยเลือกการจัดกลุ่มแบบ ML เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังกล่าวพบว่ากล้วยไม้สกุลก้านก่อที่ใช้ในการวิจัยนี้ 30 ชนิด มี 23 ชนิด (76.67 เปอร์เซ็นต์) ที่สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่น ได้แก่ เอื้องนัมปากตัด เอื้องแปรงสีฟันพระอินทร์ เอื้องทำทานได้ เอื้องตาลหิน เอื้องนัมดอกน้อย ยูนิฟอเลีย โรบัสตา เนกลีคตา เอื้องนัวนาง เอื้องประคำร้อย เอื้องสายฝน เอื้องนัมภูหลวง เอื้องคำหิน เอื้องนัมดอกเหลือง เอื้องเต่าทอง เอื้องนัมภู เอื้องนัมมานรติ เอื้องนัมมาเลย์ เอื้องกระเพาะปลา เอื้องแจกกันเงิน เอื้องช่อเงินยวง เอื้องนัมคดยสุเทพ และเอื้องดอกไม้เงิน และมี 7 ชนิด (23.33 เปอร์เซ็นต์) ที่ไม่สามารถจำแนกออกจากชนิดอื่น ได้แก่ เอื้องอินจัน เอื้องหวดปลาหมึก เอื้องช่อวงช้าง เอื้องศรีประภา เอื้องนัมปากแดง เอื้องดาวเรียง และโกลิปีเฟรา (รูปที่ 3)

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcl* ร่วมกัน สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุล

ก้านก่อได้ตรงตามหมู่ จำนวน 3 หมู่ คือ (1) หมู่ *Aeridostachya* ได้แก่ ยูนิฟอเลีย และโรบัสตา (2) หมู่ *Urostachya* ได้แก่ เอื้องหวดปลาหมึก และเอื้องช่อวงช้าง และ (3) หมู่ *Strongylaria* ได้แก่ เอื้องนัวนาง และเอื้องประคำร้อย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcl* ร่วมกันจะ



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลก้านก่อที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcl* ร่วมกัน โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ ML

มีประสิทธิภาพในการจำแนกและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลก้านก่อสูงขึ้น เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *matK* มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ที่ดี มีอัตราวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงกว่าบริเวณอื่น ๆ และมีอัตราการแทนที่นิวคลีโอไทด์สูง ดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพในการจำแนกและศึกษาวิวัฒนาการของพืช [11] แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ยังจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก่อแต่ละชนิดออกจากกันได้น้อย ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณอื่น ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ

โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และยีน *rbcl* ร่วมกัน มีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดกล้วยไม้สกุลก้านก่อได้ดีกว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียง 1 บริเวณ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกันหลายบริเวณ ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวาย กลุ่มเอื้องสาย [12] กล้วยไม้สกุลแวนด้า หมูเข็ม [13-14] กล้วยไม้สกุลกุหลาบ [15] กล้วยไม้สิงโตกลอกตา หมูสิงโตสยาม [16] ข้าวมีสี [17] และมะม่วง [18] เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะเพียงไม่กี่ตำแหน่ง ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะที่นำมาใช้ในการตรวจสอบดังกล่าวค่อนข้างจะมีขนาดเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของจีโนมพืชทั้งหมด จึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ไม่ดีเท่ากับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นที่นิยมใช้ในการตรวจสอบทั้งจีโนมพืช ได้แก่ แอสตอาร์เอพีดี (high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA, HAT-RAPD) สก็อต (start codon targeted, SCOT) ไอเอสเอสอาร์ (inter-simple sequence repeat, ISSR) เป็นต้น [19]

4. สรุป

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *matK* และ *rbcl* ในกล้วยไม้สกุลก้านก่อ 30 ชนิด ด้วยไพรเมอร์สากล พบว่าเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้ทั้ง 30 ชนิด เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ แสดงให้เห็นว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcl* มีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดกล้วยไม้ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* มีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดกล้วยไม้สกุลก้านก่อสูงกว่า สามารถแยกกล้วยไม้สกุลก้านก่อได้ 21 ชนิด และสามารถจำแนกตรงตามหมู่ของกล้วยไม้สกุลก้านก่อ 6 หมู่ ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* มีประสิทธิภาพต่ำกว่า ซึ่งจำแนกชนิดกล้วยไม้สกุลก้านก่อได้น้อยกว่า

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะร่วมกัน 2 บริเวณ โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcl* ร่วมกัน พบว่ามีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดกล้วยไม้สกุลก้านก่อสูงขึ้น เนื่องจากสามารถแยกกล้วยไม้สกุลก้านก่อได้ 23 ชนิด มีเพียงบางชนิดที่ไม่สามารถแยกได้อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยตรง พบว่าสามารถจำแนกชนิดกล้วยไม้สกุลก้านก่อได้ทั้งหมด เนื่องจากมีลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งที่มีความหลากหลาย (polymorphism) ที่เกิดจากการกลาย ซึ่งพบ 4 รูปแบบ ได้แก่ อินเดล พิวรีน-ทรานสิชัน ไพริมิดีนทรานสิชัน และทรานสเวอร์ชัน

5. รายการอ้างอิง

- [1] สลิล สิริสัจธรรม, 2549, กล้วยไม้ป่าเมืองไทย, สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.
- [2] วิชา ธิติประเสริฐ, 2543, คู่มือจำแนกกล้วยไม้ไทย (Manual for identification of Thai orchids), สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- [3] อารณ อุดมศิลป์, ทวีโชค จำรัสฉาย, รัชภัทร

- โกษณงค์ และวิเชียร พิพัฒน์มงคลสิน, 2552, กล้วยไม้ป่าเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง, กองคุ้มครองพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าตามอนุสัญญากรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช, กรุงเทพฯ.
- [4] วุฒิพงศ์ มหาคำ, 2554, DNA barcodes ของพืช : หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด, ว.พฤกษศาสตร์ไทย 1: 1-30.
- [5] CBOL Plant working Group, 2009, A DNA barcode for land plants, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 106: 12794-12797.
- [6] 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.
- [7] นฤมล ธนानันต์, วิชาการณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแอสตาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-188.
- [8] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- [9] 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.
- [10] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., 2013, MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0, Mol. Biol. Evol. 30: 2725-2729.
- [11] ธีระชัย ธนานันต์, 2553, พันธุศาสตร์โมเลกุล, พิมพ์ครั้งที่ 1, บริษัท แดเน็กซ์ อินเตอร์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.
- [12] นฤมล ธนานันต์, ฐิติพร โทมัสสา และธีระชัย ธนานันต์, 2558, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 1-10.
- [13] นฤมล ธนานันต์, จินต์ ทองสม, ชนิดโชติ ปิยพิทยานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2559, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24: 599-612.
- [14] จินต์ ทองสม, ภัทรพร คุ่มภัย, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และซินติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 994-1005.
- [15] นฤมล ธนานันต์, วริสรา แทนสง่า และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของตาแหน่งจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 664-673.
- [16] นฤมล ธนานันต์, เกียรติชัย แซ่ใต้ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง

- พันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 523-530.
- [17] นฤมล ธนानันต์, จาตุรงค์ สัมฤทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และ *rpoC1*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 674-682.
- [18] ปิยดา บุสดี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rpoC1* และ *rbcL*, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 983-993.
- [19] จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 113-122.