รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum spp.*) ในประเทศไทย

Development of a DNA Barcoding for *Paphiopedilum spp.* in Thailand

ดร.ปัทมา ศรีน้ำเงิน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายเงินได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

รหัสโครงการ -

สัญญาเลขที่ 8/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum spp.*) ในประเทศไทย

Development of a DNA Barcoding for *Paphiopedilum spp.* in Thailand

ดร.ปัทมา ศรีน้ำเงิน

คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

บทสรุปผู้บริหาร

(Executive Summary)

ข้าพเจ้า ดร.ปัทมา ศรีน้ำเงิน ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประเภทงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา เรื่องการพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum* spp.) ในประเทศไทย (Development of a DNA Barcoding for *Paphiopedilum* spp. in Thailand) รหัสโครงการ - สัญญาเลขที่ 8/2559 ได้รับงบประมาณรวมทั้งสิ้น ๓๖๑,๐๐๐ บาท (สามแสนหกหมื่นหนึ่งพันบาทถ้วน) ระยะเวลาดำเนินงาน 3 ปี 6 เดือน (31 มีนาคม 2559 ถึงวันที่ 15 กันยายน 2562)

บทคัดย่อ

กล้วยไม้รองเท้านารี อยู่ในอนุสัญญาการค้าระหว่างประเทศว่าด้วยสัตว์ป่าและพันธุ์พืช (CITES) บัญชีที่ 1 ระบุว่ารองเท้านารีอยู่ในบัญชีพืชใกล้สูญพันธุ์ ห้ามซื้อขาย ยกเว้นเพื่อการศึกษา หรือขยายพันธุ์เทียมเท่านั้น เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสร้าง DNA barcode ของกล้วยไม้รองเท้านารีของไทย จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor*), รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (*Paphiopedilum concolorvar.striatum*), รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ (*Paphiopedilum barbigerum var.vejvarutianum)*, รองเท้านารีเกาะช้าง (*Paphiopedilum simensis),* รองเท้านารีคางกอบคอแดง *(Paphiopedilum appletonianum*) ผลการศึกษาพบว่า ยีนมาตราฐาน *rbc*L, *mat*K, *rpo*B และ *rpo*C1 มีขนาดประมาณ 700 750 650 และ 550 คู่เบส ตามลำดับ โดยพบว่ายีนมาตราฐาน *rbc*L และ *mat*K, ดังกล่าวสามารถใช้นำมาพัฒนาเป็น barcoding เพื่อจำแนกชนิดพันธุ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด ด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล SCoT พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่ม มีค่า cophenetic correlation (*r*) 0.99 และกล้วยไม้ร้องเท้ารีเกาะช้างแสดงการมีพันธุกรรมเดียวกับกล้วยไม้รองเท้านารีคางคบคอแดงได้อย่างถูกต้อง ดังนั้นผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการช่วยจำแนกชนิดและการอนุรักษ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ: รองเท้านารี, การจำแนกชนิด, ดีเอ็นเอบาร์โค๊ต, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, เครื่องหมาย SCoT

Abstract

Lady slipper orchids is in the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) are red list of threatened at risk for extinction. The International trade in specimens of these species is prohibited except when the purpose of the import is not commercial, for instance for scientific research, or when the plants are artificially propagated such as tissue culture. Therefore, the objective of this research was to construct the DNA barcoding of 5 species of Thai lady slipper orchids as *Paphiopedilum concolor, Paphiopedilum concolorvar.striatum, Paphiopedilum barbigerum var.vejvarutianum, Paphiopedilum simensis* and *Paphiopedilum appletonianum*. The results showed that the *rbc*L, *mat*K, *rpo*B and *rpo*C1 were approximately 720, 900, 520 and 600 base pairs, respectively. The *rbc*L and *mat*K genes can be used to develop as a barcoding for identification of lady slipper species. In addition, SCoT molecular marker technique was investigated to determine the genetic relationships for all 5 species. The phylogenetic tree was classified into 2 groups with cophenetic correlation (*r*) 0.99. Interestingly, *Paphiopedilum simensis* and *Paphiopedilum appletonianum* showed same genetic relationship. Therefore, the results of this technics can be used to identify the species of lady slipper orchids and conservation as well.

Keywords: *Paphiopedilum spp*, Identification, DNA Barcoding, DNA fingerprint, SCoT marker

ผลผลิต (output) ที่ได้จากโครงการวิจัย

โครงการวิจัย การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum* spp.) ในประเทศไทย (Development of a DNA Barcoding for *Paphiopedilum* spp. in Thailand) ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 (เพิ่มเติม) มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาตินั้น สัญญาเลขที่ 8/2559 ผลผลิต (output) ที่ได้จากโครงการวิจัย มีดังนั้น

1. ได้องค์ความรู้ใหม่หรือได้สร้างฐานข้อมมูลเกี่ยวกับการนำ DNA barcode มาใช้ในการจำแนกชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารี โดยเฉพาะการที่สามารถระบุถึงประสิทธิภาพการนำยีนมาตราฐาน *rbc*L และ *mat*K มาใช้ในการจำแนกชนิด
2. การริเริ่มการทำแผนที่ตัดเอ็นไซม์ตัดจำเพาะของยีนมาตราฐานมาใช่ร่วมในการจัดจำแนกชนิดพันธุ์
3. ผลงานวิจัยชิ้นนี้สามารถเผยแพร่ได้ในวารสารทางวิชาการระดับชาติและนานาชาติ

ผลลัพท์ (outcome) ที่ได้จากโครงการวิจัย

กล้วยไม้รองเท้านารี เป็นกล้วยไม้ที่มีความสวยงาม ด้วยลักษณะของดอกที่มีกระเป๋าคล้ายรองเท้าของสตรี แตกต่างจากกล้วยไม้ทั่วไป อีกทั้งยังมีน้อยในธรรมชาติเนื่องจากอัตราการงอกที่ต่ำและเติบโตได้ช้า จึงทำให้กล้วยไม้ ชนิดนี้มีคุณค่าทั้งทางเศรษฐกิจ และยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศน์ได้เป็นอย่างดี ปัจจุบันนี้ กล้วยไม้รองเท้านารีนั้นอยู่ในภาวะถูกคุกคามอย่างหนักในธรรมชาติถึงแม้จะมีการขยายพันธุ์เทียมอย่างแพร่หลายก็ตาม อย่างไรก็ตาม กล้วยไม้รองเท้านารีแต่ละชนิดอาจมีรูปร่างลักษณะของลำต้นที่เหมือนกันจนไม่สามารถ จำแนกได้อย่างเช่น รองเท้านารีเหลืองตรัง รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีขาวสตูล เป็นต้น จะสามารถ จ่าแนกได้ก็ต่อเมื่อกล้วยไม้นั้นออกดอก กรอปกับล้วยไม้รองเท้านารี อยู่ในอนุสัญญาการค้าระหว่างประเทศว่าด้วยสัตว์ป่าและพันธุ์พืช (CITES) บัญชีที่ 1 ระบุว่ารองเท้านารีอยู่ในบัญชีพืชใกล้สูญพันธุ์ ห้ามซื้อขาย ยกเว้นเพื่อการศึกษา ดังนั้นการสร้างระบบการจำแนกชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีที่ดี จะช่วยให้สามารถวางแผนการอนุรักษ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

นอกจากนี้ผลงานวิจัยชิ้นนี้ยังเป็นฐานข้อมูลสำหรับนักวิชาการ นักวิจัย อาจารย์ นิสิต และผู้ที่สนใจงานทางด้านอนุกรรมวิธาน ความหลากหลายทางพันธุกรรม และยังประโยชน์ต่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ การแสดงสิทธิการคุ้มครองพันธุ์พืช รวมถึงการนำไปต่อยอดงานวิจัยหรือใช้ประกอบในการเรียนการสอนอีกทางหนึ่งด้วย

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยชิ้นนี้เป็นมุ่งหวังให้เป็นงานวิจัยเชิงพื้นฐาน (Basic Research) เพื่อพัฒนาระบบเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ด ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีซึ่งถูกบรรจุอยู่ในบัญชีอ้างอิงที่ 1 ของ CITES โดยระบุสถานะใกล้สูญพันธุ์ ห้ามทำการซื้อขายโดยเด็ดขาด ยกเว้นเพื่อการศึกษาและวิจัย ดังนั้นการสร้างดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดที่จำเพาะต่อสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี สามารถช่วยป้องกัน หรือปกป้องคุ้มครองสายพันธุ์ สามารรถใช้เป็นเครื่องมือเพื่อยืนยันสายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งถือว่ามีความถูกต้องมากที่สุด อันจะเป็นประโยชน์ต่อวงการกล้วยไม้ไทย และการอนุรักษ์สายพันธุ์กล้วยไม้ของไทยอีกทางหนึ่งด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 (เพิ่มเติม) มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 8/2559

Acknowledgment

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 8/2559).

คำนำ

กล้วยไม้รองเท้านารี เป็นกล้วยไม้สกุลหนึ่งที่มีลักษณะกระเป๋าของดอกคล้ายคลึงกับรองเท้าของสุภาพสตรี จึงรู้จักกันทั่วไปในนามของรองเท้านารีหรือ Lady's Slippers มีรูปร่างสวยงามแปลกตา และจัดเป็นกล้วยไม้อีกชนิดหนึ่งที่ปลูกเลี้ยงยาก และเป็นที่ต้องการตลาด ทำให้ในปัจจุบันกล้วยไม้รองเท้านารีปรากฏอยู่ในภาวะถูกคุกคามอย่างหนักในธรรมชาติ ถึงแม้จะมีการขยายพันธุ์เทียม เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกันอย่างแพร่หลายก็ตาม และยังปรากฏอยู่ในอนุสัญญาการค้าระหว่างประเทศว่าด้วยสัตว์ป่าและพันธุ์พืช (CITES) บัญชีที่ 1 ระบุว่ารองเท้านารีอยู่ในบัญชีพืชใกล้สูญพันธุ์ ห้ามซื้อขาย ยกเว้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า การวิจัยครั้งนี้ซึ่งเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ อันจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่ศึกษา และเพื่อเป็นแนวทางการศึกษาต่อ งานวิจัยต่อยอดในอนาคต

ปัทมา ศรีน้ำเงิน
กันยายน 2562

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	iii
สารบัญรูป	iv
บทที่ 1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
กรอบแนวคิดของการวิจัย	3
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง	3
กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี	4
ดีเอ็นเอบาร์โค๊ต (DNA Barcodes)	5
เครื่องหมายโมเลกุล SCoT	7
บทที่ 3 วิธีการศึกษาวิจัย	10
บทที่ 4 ผลการศึกษาวิจัยและอภิปราย	14
ส่วนที่ 1 การศึกษา DNA barcoding เพื่อระบุชนิดกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี	14
ส่วนที่ 2 การวิเคราะห์ความน่าจะเป็น DNA Barcoding ของยีนมาตราฐานในกล้วยไม้รองเท้านารีด้วยโปรแกรม DNA Subway	32
ส่วนที่ 3 การสร้างแผนที่ยีนมาตราฐานด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ	38
ส่วนที่ 4 วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด Start Codon Targeted (SCoT)	43
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาวิจัย	47
เอกสารอ้างอิง	49
ภาคผนวก	52
รายงานสรุปการเงิน	53
ภาพผนวกที่ 1	54
ภาพผนวกที่ 2	66
ประวัติผู้วิจัย	72

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ชนิดของกล้วยไม้กสุลรองเท้านารีที่พบในภาคตะวันออกของประเทศไทย	10
3.3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีน *ITS, matK, rbcL, rpoC1* และ *trnH-psbA intergenic spacer*	12
4.1	ค่าความเข้มข้นและความบริสุทธ์ของดีเอ็นเอจากกล้วยไม้รองเท้านารี 5 ชนิด	17
4.2	ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะกับเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อสร้าง barcoding ของ กล้วยไม้ร้องเท้านารีทั้ง 5 ชนิด	18
4.3	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอจากบริเวณอนุรักษ์ *rbc*L, *mat*K, *rpoB* และ *rpoC*$_1$ ของกล้วยไม้รองเท้านารีด้วยโปรแกรม BLASTN	30

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	กล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิดพันธุ์ที่ใกล้สูญพันธุ์ตามบัญชีอนุรักษ์ที่ 1 ของ CITES	6
2.2	ribosomal RNA แสดงบริเวณ *ITS*	7
4.1	กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน	14
4.2	กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกาญจน์	15
4.3	กล้วยไม้รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์	15
4.4	กล้วยไม้รองเท้านารีเกาะช้าง	16
4.5	กล้วยไม้รองเท้านารีคางกบคอแดง	16
4.6	จีโนมิคดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด บนเจลอะกาโรสอิเลคโตรโฟลิซิส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์	17
4.7	ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *ITS3* ขนาด 1,200 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด	19
4.8	ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *mat*K ขนาด 900 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด	20
4.9	ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *rbc*L174 ขนาด 700 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารี ทั้ง 5 ชนิด	22
4.10	ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *rpoC1* ขนาด 600 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารี ทั้ง 5 ชนิด	23
4.11	ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *rpo*B ขนาด 520 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด	24
4.12	ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *trn-H psbA trnH-F/trn psbA psbA-R* ขนาด 900 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด	25
4.13	ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *trn-H psbA trnH-F/trnH psbA-psbAF-R* ขนาด 850 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด	26
4.14	ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *trnH psbA-trnH2-F/trnH psb-psbA-R* ขนาด 900 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด	27
4.15	ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *trnH psbA-trnH2-F/ trnH psbA-psbAF-R* ขนาด 850 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด	28
4.16	แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตราฐาน *rbc*L ในการเป็น DNA Barcode ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYLIP ML ด้วยโปรแกรม DNA Subway	33

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.17	การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตราฐาน *rbc*L ในกล้วยไม้รองเท้านาร ทั้ง 5 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway	34
4.18	18 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตราฐาน *mat*K ในการเป็น DNA Barcode ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYLIP ML ด้วยโปรแกรม DNA Subway	35
4.19	การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตราฐาน *mat*K ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway	35
4.20	แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตราฐาน *rpo*B ในการเป็น DNA Barcode ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYLIP ML ด้วยโปรแกรม DNA Subway	36
4.21	การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตราฐาน *rpo*B ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway	36
4.22	แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตราฐาน *rpo*C1 ในการเป็น DNA Barcode ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYLIP ML ด้วยโปรแกรม DNA Subway	**37**
4.23	การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตราฐาน *rpo*C1 ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway	37
4.24	แผนที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีนมาตราฐาน *rbc*L ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nsp*I ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด	38
4.25	ขั้นตอนที่ 1 แผนที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีนมาตราฐาน *mat*K ด้วยเอนไซม์ตัด จำเพาะ *Hpa*II ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด	39
4.26	ขั้นตอนที่ 2 แผนที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีนมาตราฐาน *mat*K ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Psi*I + *Sau*96I ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด	**40**
4.27	แผนที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีนมาตราฐาน *rpo*B ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mn*lI ขั้นตอนที่ 1 ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด	41
4.28	แผนที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีนมาตราฐาน *rpo*C1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*XI ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.29	ผลผลิตพีซีอาร์ของไพร์เมอร์ S19 จากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCoT บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด	44
4.30	ผลผลิตพีซีอาร์ของไพร์เมอร์ S22 จากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCoT บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด	45
4.31	แผนภูมิพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5ชนิด เมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยใช้ UPGMA วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS 2.22c	46

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันกระแสความนิยมในการเลี้ยงกล้วยไม้เพื่อใช้เป็นไม้ประดับเพิ่มขึ้นอย่างมาก ทำให้เกิดธุรกิจการค้าที่เกี่ยวข้องกับกล้วยเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและต่อเนื่อง ทั้งกล้วยไม้เลี้ยงที่มีราคาไม่แพง เช่น กล้วยไม้สกุลหวาย (Dendrobium spp.) กล้วยไม้แคทลียา (Cattleya John Lindley) รวมไปถึงกล้วยไม้ที่มีราคาแพงขึ้น เช่น กล้วยไม้สกุลช้าง (Rhychostylis gigantean) กรอปกับรสนิยมผู้เลี้ยงที่ต้องการมีกล้วยไม้หายาก และกล้วยไม้ป่าไว้ในครอบครอง ทำให้เกิดการลักลอบนำกล้วยไม้ป่าออกมาจากป่า ซึ่งกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้อีกสกุลหนึ่งที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก มีราคาที่แพง หายาก และเป็นที่นิยมของคนทั่วไป ซึ่งปัจจุบันพบว่า กล้วยไม้ป่าสกุลรองเท้านารีพันธุ์แท้ลดลงไปมาก ซึ่งเสี่ยงต่อการใกล้สูญพันธุ์ และเมื่อมีกระแสความนิยมในตัวกล้วยไม้ร้องเท้านารีมาก นักปรับปรุงพันธุ์ หรือผู้เพาะเลี้ยงกล้วยไม้จึงได้มีการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อคัดเลือกลักษณะทรงต้น ใบ รูปทรงดอก สีสัน ให้ตรงกับความต้องการของผู้บริโภค ซึ่งอาจทำให้ลักษณะที่ดีบางอย่างของกล้วยไม้รองเท้านารีนั้น ๆ หายไป

ดังนั้นเพื่อความร่วมมือช่วยกันอนุรักษ์ความหลากหลายของกล้วยไม้รองเท้านารี หลายประเทศรวมทั้งประเทศไทยได้ร่วมมือกันในอันที่จะปกป้องและคุ้มครองเพื่ออนุรักษ์พืชป่าและสัตว์ป่าที่กำลังจะสูญพันธุ์ จึงได้มีอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศหรือ CITES (The Convention on International Trade in Endangered Species of Fauna and Flora: CITES) ขึ้น โดยมีข้อบัญญัติว่าประเทศสมาชิกต้องมีกฎหมายข้อบังคับในการคุ้มครองพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่า ซึ่งกล้วยไม้รองเท้านารีถูกจัดอยู่ในบัญชีอนุรักษ์แนบท้ายประเภทที่ 1 (ภาพที่ 1) ที่ระบุว่าใกล้สูญพันธุ์ นอกจากนี้ความที่กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ที่ได้รับความนิยมเลี้ยง ผู้ค้ากล้วยไม้จึงมีการพยายามสร้างกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสมขึ้นมากมายเพื่อจำหน่าย หรือผู้เลี้ยงกล้วยไม้ทำการผสมพันธุ์เอง บางครั้งก่อให้เกิดปัญหาหรือความสับสนในระบุชนิดของพันธุ์เมื่อใช้ลักษณะทางสัณฐาน และความชำนาญของผู้เลี้ยงเพียงอย่างเดียว

เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcodes) เป็นแนวความคิดใหม่ที่เกิดขึ้นได้ไม่นานโดยการใช้ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เรียงตัวอยู่บนบริเวณดีเอ็นเอมาตรฐานหรือบริเวณอนุรักษ์หรือในยีนบางชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดสั้น ๆ มาช่วยในการสนับสนุนการจัดจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ปัจจุบันดีเอ็นเอบาร์โค้ดกลายมาเป็นเครื่องมีสำคัญอย่างหนึ่งที่นำมาประยุกต์ใช้กับงานหรือการศึกษาทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) จากอดีตที่ผ่านมานักอนุกรมวิธาน (taxonomist) จำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยา บางครั้งจะเกิดข้อจำกัดบางประการทำให้การจัดจำแนกผิดพลาดไป หากสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ เกิดการปรับตัวหรือผันแปร

โครงสร้างภายนอก (phenotypic plasticity) หรือเกิดสปีชีส์ซ่อนเร้น (crypic species) ดังนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่อาศัยลักษณะทางพันธุกรรมที่ไม่ผันแปรไปตามสิ่งแวดล้อมมาช่วยสนับสนุนการจำแนก จะทำให้การะบุชนิดมีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น

การศึกษาเพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดในกล้วยไม้รองเท้านารี จึงนับว่ามีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์ ในขณะเดียวกันเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดนี้ยังสามารถนำมาใช้ตรวจสอบการเป็นพันธุ์แท้ หรือพันธุ์ผสม พร้อมทั้งนำมาประยุกต์เพื่อสร้างเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อการคุ้มครองสายพันธุ์ในอนาคตได้อีกด้วย ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อใช้ในการจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีโดยเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ITS *matK, rbcL, rpoC$_1$* และ *trnH-psbA intergenic spacer* ซึ่งจัดว่าเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพและเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไป พร้อมทั้งจัดทำระบบฐานข้อมูลที่เกี่ยวข้องกล้วยไม้รองเท้านารีเพื่อเผยแพร่แก่ผู้ที่สนใจต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรม และสร้างดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดที่จำเพาะต่อสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลรองเท้านารีที่พบในเขตภาคตะวันออกของประเทศไทย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ

1. ทราบความสัมพันธ์เชิงพันธุกรรมหรือวิวัฒนาการของกล้วยไม้รองเท้านารีในภาคตะวันออกของประเทศไทย
2. สามารถพัฒนาระบบดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีในประเทศไทยได้
3. เป็นฐานข้อมูลสำหรับนักวิชาการ นักวิจัย อาจารย์ นิสิต และผู้ที่สนใจงานทางด้านอนุกรรมวิธาน ความหลากหลายทางพันธุกรรม และยังประโยชน์ต่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ การแสดงสิทธิการคุ้มครองพันธุ์พืช รวมถึงการนำไปต่อยอดงานวิจัยหรือใช้ประกอบในการเรียนการสอนอีกทางหนึ่งด้วย

บทที่ 2

ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดจะมีสารพันธุกรรมพื้นฐานที่เหมือนกัน มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน หรือมีดีเอ็นเอที่เหมือนกัน แต่การจัดเรียงตัวที่ต่างกันของนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสิ่งมีชีวิต ทำให้เกิดความหลากหลายของรหัสพันธุกรรมจนกลายมาเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นหากต้องการเปรียบเทียบพันธุกรรมของสิ่งมีชวิตในระบบเดียวกัน จึงจำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานหรือยีนมาตรฐานมาตรวจสอบจึงเป็นที่มาของการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ด

จากความก้าวหน้าของเทคนิคทางอณูชีววิทยา คือปฏิกิริยาลูกโซ่หรือเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Polymerase Chain Reaction: PCR) ทำให้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่สนใจเป็นไปได้ง่ายขึ้น ในการทดลองนี้เลือกใช้ยีนมาตรฐานทั้งจากคลอโรพลาสต์ ซึ่งพบว่ามีโอกาสเกิดความผันแปรได้สูงระหว่างชนิดพันธุ์ (species) ดังนั้นจึงคาดว่ายีนมาตรฐาน *mat*K, *rbc*L, *rpo*C_1 และ *trn*H-*psb*A intergenic spacer และยีนที่กำหนดการสร้างไรโบโซมที่อยู่บริเวณนิวเคลียส คือ ยีน *ITS* (Internal transcribed spacer) จะสามารถระบุความแตกต่างระหว่างชนิดพันธุ์ของรองเท้านารีได้

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่จัดอยู่ในวงศ์ *Orchidaceae* เป็นพืชดอกที่ได้รับความนิยมเนื่องจากลักษณะดอก มีสีสันและลวดลายที่สวยงาม และมีความหลากหลายทั้งชนิดพันธุ์และสกุลมาก ปัจจุบันกล้วยไม้นับเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ โดยเฉพาะกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) เนื่องจากเป็นไม้ตัดดอกที่ได้รับความนิยมมากในต่างประเทศ นอกจากนี้แล้วกระแสการเลี้ยงกล้วยไม้เพื่อเป็นไม้ประดับก็ได้รับความนิยม มีการจัดตั้งกลุ่มหรือชมรมผู้เลี้ยงและผู้ค้ากล้วยไม้ขึ้น เพื่อแลกเปลี่ยนความรู้ วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์กล้วยไม้ เพื่อให้ตรงตามความต้องการของตลาดและผู้บริโภค กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ที่มีอีกชนิดหนึ่ง ความสำคัญทางเศรษฐกิจและเป็นที่นิยมของคนทั่วไป เนื่องเป็นกล้วยไม้ที่หายากและราคาแพงที่สุด ประเทศไทยเป็นถิ่นกำเนิดของรองเท้านารีพื้นเมืองหลายชนิด แต่ปัจจุบันมีการตัดไม้ทำลายป่า มีการเก็บจากป่ามาจำหน่าย นับวันจึงมีโอกาสสูญพันธุ์ได้ในที่สุด

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี

กล้วยไม้รองเท้านารี (lady's Slipper) เป็นกล้วยไม้ที่มีถิ่นกำเนิดและพบได้ทั้งในเขตหนาวและเขตร้อนของโลก พบได้ทั้งในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เอเชียตะวันออกและเอเชียใต้ ทั่วโลกพบกล้วยไม้รองเท้านารี 5 สกุล (Genus) รวม 137 ชนิด ตามหลักการจัดจำแนกทางพฤศาสตร์ คือ *Cypripedium*, *Paphiopedilum*, *Phragmipedium*, *Selenipedium* และ *Mexipedium* สำหรับในประเทศไทยพบเพียงสกุลเดียว คือ *Paphiopedilum*

กล้วยไม้รองเท้านารีที่พบในประเทศไทยเป็นกล้วยไม้รองเท้านารีเขตร้อนสกุล *Paphiopedilum* ซึ่งปัจจุบันที่ค้นพบแล้วมีทั้งหมด 17 ชนิด (อุไร 2549; จักรพันธ์ 2010) คือ รองเท้านารีคางกบแดง (*Paph. appletonianum*) รองเท้านารีม่วงสงขลา หรือรองเท้านารีคางกบใต้ (*Paph. barbalum*) รองเท้านารีฝาหอย (*Paph. bellatulum*) รองเท้านารีคางกบ หรือรองเท้านารีไทยแลนด์ (*Paph. callosum*) รองเท้านารีดอยตุง (*Paph charlesworthii*) รองเท้านารีเหลืองปราจีน หรือรองเท้านารีเหลือกาญน์ หรือรองเท้านารีเหลืองอุดร (*Paph. concolor*) รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paph.exul*) รองเท้านารีขาวชุมพร (*Paph. godefroyae)* รองเท้านารีเหลืองตรัง หรือรองเท้านารีเหลือพังงา (*Paph. godefroyae var leucochilum*) รองเท้านารีเหลืองเลย (*Paph. hirsutissimum var.esquirolei*) รองเท้านารีอินซิกเน่ (*Paph. insigne*) รองเท้านารีขาวสตูล (*Paph. niveum*) รองเท้านารีเมืองกาญจน์ หรือรองเท้านารีเชียงดาว (*Paph. parishii*) รองเท้านารีปีกแมลงปอ หรือรองเท้านารีสุขะกุล (*Paph. sukhalii*) รองเท้านารีอินทนนท์ (*Paph.villosum*) รองเท้านารีช่องอ่างทอง (*Paph. godefroyae var. ang-thong*) และรองเท้านารีเกาะช้าง (*Paph. parishii*) ในจำนวนนี้มีถึง 14 พันธุ์ที่ถูกระบุอยู่ในบัญชีอนุรักษ์ที่ 1 ของ CITES ว่าเป็นพืชที่ใกล้สูญพันธุ์ (ภาพที่ 2.1)

จากที่นานาประเทศตระหนักถึงการอนุรักษ์สัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้จะสูญพันธุ์ จึงได้ร่วมมือกันจัดตั้ง อนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งด้วยชนิดของสัตว์ป่าและพืชป่าที่ได้ใกล้จะสูญพันธุ์ ซึ่งเรียกโดยทั่วไปว่า อนุสัญญาไซเตส มีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 1 กรกฎาคม พ.ศ. 2518 ปัจจุบันมีประเทศสมาชิกจำนวน 173 ประเทศ จากการที่กล้วยไม้รองเท้านารีจัดอยู่ในบัญชีอนุรักษ์ที่ 1 หมายความว่า เป็นพืชชนิดพันธุ์ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ ห้ามทำการค้าโดยเด็ดขาด ยกเว้นเพื่อการศึกษาวิจัย หรือขยายพันธุ์เทียมซึ่งต้องได้รับความยินยอมจากประเทศที่นำเข้าเสียก่อน ประเทศส่งออกจึงจะออกใบอนุญาตให้ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงความอยู่รอดของพืชชนิดพันธุ์นั้น ๆ

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA Barcodes)

Hebert et al (2003) มีความคิดที่จะจำแนกสิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั่วโลกที่มีจำนวนมากกว่า 1,800,000 ชนิด โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ของบางยีนที่มีความคงตัว และเป็นมาตรฐาน มาสร้างเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อให้ง่ายต่อการจำแนก ตรวจสอบ และติดตามชนิดของสิ่งมีชีวิต และพบว่าลำดับ นิวคลีโอไทด์บางส่วนบริเวณปลายด้าน 5’ ของยีน *Cytochrome c oxidasesubunit 1 (Cox1* หรือ *COI)* ในสัตว์ที่อยู่บริเวณไมโตคอนเดรีย ที่มีขนาดประมาณ 648 คู่เบส มีความแตกต่างมากพอที่จะแยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันออกจากกันได้อย่างชัดเจน ในขณะที่สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีความแตกต่างกันน้อยมากหรือไม่มีเลย ทำให้มีความนิยมใช้ยีนนี้ในการจำแนกชนิดในสัตว์ ดังนั้น Hebert จึงได้เสนอคำว่าดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) เพื่อใช้สำหรับเรียกดีเอ็นเอบริเวณหนึ่ง ๆ ในจีโนมที่มีลำดับดีเอ็นเอเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด แต่ในพืชพบว่ายีน *COI* นี้ไม่สามารถใช้ในการจำแนกชนิดได้ เนื่องจากมีความแตกต่างระหว่างชนิดต่ำมาก หรือมีวิวัฒนาการต่ำ จึงมีมีการใช้ยีนอื่นๆ ที่อยู่ในคลอโรพาสต์แทนได้แก่ ยีน *maturaseK (matK), trnH-psbA intergenic spacer, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL)* เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการรายงานยีนบริเวณคลอโร

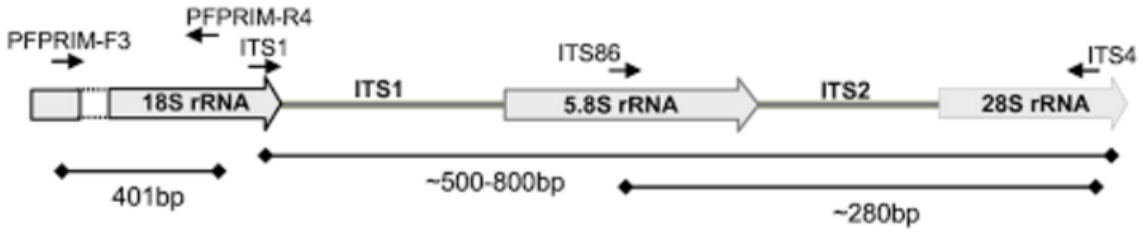
พลาสต์ที่มีความเหมาะสมในการใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพิ่มเติม ได้แก่ *atpF-atpH spacer, rpoB, rpoC1*และ *psbK-psbl spacer* (CBOL., 2009) ปัจจุบันมีนักวิทยาศาสตร์ทั่วโลกประมาณ 50 ประเทศ 150 หน่วยงาน ร่วมมือกันก่อตั้งองค์กรความร่วมมือระหว่างประเทศ Consortium for the Barcode of Life (CBOL) เพื่อศึกษา และรวบรวมข้อมูลเกี่ยวเกี่ยวดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชิต อันจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิวัฒนาการและความผันแปรของสิ่งมีชีวิตต่อไป

ภาพที่ 2.1 กล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิดพันธุ์ที่ใกล้สูญพันธุ์ตามบัญชีอนุรักษ์ที่ 1 ของ CITES

ที่มา ดัดแปลงจาก http://203.172.198.146/rice/rice_mix2/plant_thai_app.htm

Internal Transcribed Spacer (ITS)

ดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacers (ITSs) ของ ribosomal DNA (rDNA) (ภาพที่ 2.2) มักนิยมใช้กันโดยทั่วไปในการศึกษาเพื่อจำแนกหรือบ่งชี้ชนิดของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าดีเอ็นเอในบริเวณอื่น ๆ ของ rDNA ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์หรือภายในสายพันธุ์เดียวกันได้ ซึ่งในปัจจุบันมีการนำ ITS มาใช้เป็นเครื่องมือในการจัดจำแนกชนิด และศึกษาความหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีวิตกันอย่างแพร่หลาย



ภาพที่ 2.2 ribosomal RNA แสดงบริเวณ *ITS*

ที่มา http://hermes.bionet.nsc.ru/pg/32/42.htm

เครื่องหมายโมเลกุลสก็อต (SCoT)

เครื่องหมายสก็อต (SCoT, start codon targeted) ซึ่งเป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลแบบหนึ่งพัฒนาขึ้นโดย Collard และ Mackill (2009) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ขนาด 18 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวที่มีล่าดับเบส ATG เริ่มต้นในสายนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งจะให้ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและมีความหลากรูป (polymorphism) อีกทั้งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอ ปริมาณน้อย ไม่จ่าเป็นต้องทราบข้อมูลล่าดับเบสของดีเอ็นเอ ประหยัดค่าใช้จ่าย และให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ จ่าเพาะกับแต่ละพันธุ์ (ธีระชัย ธนานันต์, 2560)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พรรษา และคณะ 2556 รายงานการศึกษาการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของสมุนไพรแปรรูปสกุลขี้เหล็ก (*Senna*) จำนวน 14 ชนิด โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ 3 บริเวณ ได้แก่ *mat*K, *rbc*L และ *trn*H-*psb*A intergenic spacer พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดประจำชนิดพืชคือ *trn*H-*psb*A intergenic spacer และ *rbc*L สามารถระบุชนิดพืชได้โดยมีค่าความผันแปรของนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 0.029-0.647 และ 0.010-0.062 ตามลำดับ และพบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ด *trn*H-*psb*A intergenic สามารถใช้ระบุชนิดพืชได้ดีที่สุดโดยระบุชนิดได้ 71.43 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ *mat*K ไม่สามารถใช้ในการระบุชนิดของพืชได้ ซึ่งสอดคล้องการรายงานผลการวิจัยของ de Groot et al (2011) ระบุว่า ยีน *rbc*L และ *trn*H-*psb*A intergenic spacer สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ของเฟริน (NW-European fern) ได้เป็นอย่างดี ในขณะที่ยีน *mat*K ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้

Saunder (2005) รายงานผลการศึกษาเบื้องต้นของการนำยีน *Cox1* มาใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด เพื่อบ่งชี้ชนิดพันธุ์และศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรมของสาหร่ายชนิด red macroalgae ได้แก่ สปีชีส์ *Mazzaella, Dilsea, Neodilsea และ Asteromenia* ที่ขึ้นบริเวณทะเลแปซิฟิกเหนือ จำนวนทั้งหมด 37 สปีชีส์ ซึ่งผลการทดลองทดลองว่า ยีน *Cox1* มีแนวโน้มที่จะบ่งชี้สปีชีส์ของ red macroalgae ได้ดี และตรวจพบความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ แต่ยังต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อ เนื่องจาก ยีน *Cox1* เป็นยีนในไมโคคอนเดรียซึ่งมีความผันแปรต่ำ

Lucus et al (2012) ทำการพัฒนาระบบเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดในหญ้าทะเลจำนวน 14 ชนิดพันธุ์ที่พบบริเวณแถบชายฝั่งประเทศอินเดีย โดยการใช้ยีนจำเพาะ *rbc*L และ *mat*K ผลการทดลองพบว่า ยีน *mat*K มีประสิทธิภาพในการระบุหรือจำแนกสายพันธุ์ได้ดีกว่ายีน *rbc*L

Parveen et al (2012) รายงานการศึกษาการใช้ยีน *rpo*C1, *mat*K และ *ITS* เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ทเพื่อระบุชนิดพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีสายพันธุ์อินเดีย จำนวน 8 ชนิด จำนวน 35 ตัวอย่าง และกล้วยไม้รองเท้านารีลูกผสม จำนวน 3 ชนิด จำนวน 7 ตัวอย่าง พบว่ายีน *mat*K สามารถใช้แยกกล้วยไม้รองเท้านารีสายพันธุ์แท้ออกจากสายพันธุ์ลูกผสมได้อย่างชัดเจน เมื่อพิจารณาจากการจัดกลุ่มความใกล้ชนิดทางพันธุกรรม ในขณะที่พบบริเวณอนุรักษ์อีก 8 loci ที่มีความแตกต่างกันใน 8 ชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์แท้ ซึ่งคาดว่าจะสามารถนำมาพัฒนาเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไปได้

ปรียา พวงสาลี และคณะ (2560: 58-67) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพยุง *Dalbergia cochinchinensis* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Fabaceae โดยใช้เครื่องหมาย Start Codon Targeted (SCoT) ในการระบุความต่างทางพันธุกรรมของพะยูง 19 ตัวอย่างที่พบในพื้นที่สวนสัตว์อุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี และ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น พบว่า ไพรเมอร์ SCoT จานวน 5 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 33 แถบ ซึ่ง ทั้งหมดมีลักษณะเป็นโพลิมอร์ฟิก จ่านวนแถบที่เพิ่มปริมาณได้มีจานวนแตกต่างกันไปตั้งแต่ 2 (SCoT-22) จนถึง 11 (SCoT-4) แถบ โดยเฉลี่ย 6.6 แถบต่อไพรเมอร์และมีขนาดตั้งแต่ 135 ถึง 960 คู่เบส จากการวิเคราะห์โครงสร้าง ทางพันธุกรรมพบว่า จัดเป็นกลุ่มย่อยสองกลุ่มซึ่งคล้ายคลึงกับผลการวิเคราะห์ด้วยระบบ neighbour-joining (NJ) การวิเคราะห์

ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (molecular variance analysis, AMOVA) แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมมีความแตกต่างในกลุ่มประชากร (89 เปอร์เซ็นต์) มากกว่าระหว่างกลุ่มประชากร (11 เปอร์เซ็นต์) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เครื่องหมาย SCoT สามารถใช้ในการบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่าง *D. cochinchinensis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ทัศนีย์ สิงห์ศิลารักษ์ (2560) การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทุเรียนจ่านวน 30 พันธุ์ ที่ รวบรวมจากสวนบ้านเรา จังหวัดระยอง ด้วยเครื่องหมายสก๊อต ซึ่ง ข้อดีของเครื่องหมายนี้คือ สะดวก รวดเร็ว ราคา ถูก มีความหลากรูป และมีประสิทธิภาพสูง เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 80 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 19 ชนิด สามารถเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอแล้วให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจน จ่านวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ปรากฏรวม 277 แถบ มีขนาด ประมาณ 200-2,750คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความหลากรูป 219 แถบ คิดเป็น 79.06 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสร้าง แผนภูมิความสัมพันธ์จากข้อมูลแถบดีเอ็นเอและจัดกลุ่มแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e พบว่ามี ค่าดัชนีความเหมือน 0.67-0.89 สามารถแบ่งทุเรียนเป็น 2 กลุ่ม แต่ไม่สอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยลักษณะสัณฐานภายนอก และเมื่อวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเครื่องหมายสก๊อต แสดงให้เห็นถึงความใกล้ชิดทาง พันธุกรรมของทุเรียนในประเทศไทย แม้ว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงก็ตาม

กรองทอง ใจแก้วแดง (2557) การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของต้นรักแกนมอจ่านวน 96 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย Start Codon Targeted (SCoT) พบไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมจ่านวน 5 ไพรเมอร์ คือ SCoT46 SCoT47 SCoT48 SCoT52 และ SCoT55 สามารถให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 36 แถบ มีขนาดอยู่ในช่วง 800-3,000 คู่เบส โดย 34 แถบเป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้โพลีมอร์ฟิก คิดเป็น 94.44 เปอร์เซ็นต์ ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด ค่าเฮเตอโรไซโกซิตีมีค่าอยู่ในช่วง 0.21-0.39 เฉลี่ยเท่ากับ 0.28 ค่า polymorphic information content มีค่าอยู่ ในช่วง 0.299-0.375 และค่า coefficientof genetic differentiation มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.275 ผลการจัดกลุ่มด้วย วิธี unweighted pair group method with arithmeticaverage พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทาง พันธุกรรมที่ค่านวณด้วยสูตรของ Jaccard อยู่ในช่วง 0.130-0.923 สามารถแบ่งตัวอย่างต้นรักแกนมอที่ ท่าการศึกษาออกเป็น 10 กลุ่ม การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างต้นรักแกนมอมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมในประเทศไทยต่อไป

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เก็บรวบรวบพันธุ์และระบุชนิดกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี

สำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี ดังตารางที่ 3.1 ตามสถานที่ต่าง ๆ พร้อมทั้งระบุชนิด หรือสายพันธุ์กล้วยไม้เหล่านั้นตามลักษณะทางสัณฐานที่ปรากฏ รวมทั้งสอบถามข้อมูลจากผู้รู้ ผู้เลี้ยงกล้วยชนิดนั้น ๆ เมื่อระบุสายพันธุ์ของกล้วยไม้ได้แล้ว นำส่วนของใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอที่ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี

2. การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (Tiangen Biotech (Beijing) CO.LTD) โดย บดตัวอย่างในไนโตรเจนเหลวจนตัวอย่างละเอียด แล้วใส่ในไมโครทิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใส่ Buffer LP1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และใส่ RNase ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน 1 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ใส่ Buffer LP2 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสม 1 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ปิเปตส่วนใสใส่ไมโครทิวใหม่ ใส่ Buffer LP3 ปริมาตร 1.5 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน 15 วินาที ปิเปตส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน คอลัมน์CB3 ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 12000 รอบต่อนาที นาน 30วินาที หลังจากนั้นเทน้ำใน คอลัมน์CB3 ทิ้ง ใส่ Buffer PW ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 12000 รอบต่อนาที 30 วินาที หลังจากนั้นเทน้ำใน คอลัมน์ CB3 ทิ้ง ทำขั้นตอนที่ 7 ซ้ำอีก 2 รอบ ปั่นเหวี่ยงคอลัมน์เปล่าด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 12000 รอบ/นาที 2 นาที เปิดผาคอลัมน์ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จน DNA แห้ง นำคอลัมน์ CB3 ใส่ใน ไมโครทิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิเปต Buffer TE ปริมาตร 50-200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 12000 รอบต่อนาที 2 นาที เก็บตัวอย่าง DNA ที่สกัดไว้ได้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในขั้นตอนถัดไป

ตารางที่ 3.1 ชนิดของกล้วยไม้กสุลรองเท้านารีที่พบในภาคตะวันออกของประเทศไทย

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อท้องถิ่น
Paphiopedilum concolor	รองเท้านารีเหลืองปราจีน
Paphiopedilum appletonianum	รองเท้านารีคางกบคอแดง
Paphiopedilum simensis	รองเท้านารีเกาะช้าง
Paphiopedilum concolorvar.striatum	รองเท้านารีเหลืองกาญจน์
Paphiopedilum barbigerum var.vejvarutianum	รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์

3. การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่บริเวณยีน *ITS*, *mat*K, *rbc*L, *rpo*C_1 และ *trn*H-*psb*A intergenic spacer

ในการทดลองนี้จะทำการศึกษาการสร้างดีเอ็นเอบาร์โค้ด โดยการวิเคราะห์ยีนมาตรฐาน *ITS*, *mat*K, *rbc*L, *rpo*C_1 และ *trn*H-*psb*A intergenic spacer ตามวิธีของ Parveen et al (2012) โดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีนดังกล่าว ดังตารางที่ 2 ดังนี้ นำดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีที่สกัดได้ปริมาณ 20-30 นาโนกรัม มาเพิ่มปริมาณเฉพาะส่วนที่สนใจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะ ความเข้มข้น 2 ไมโครโมล 1x *Taq* buffer dNTP mix ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมล $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมล และเอนไซม์ *Taq* polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิต ต่อปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำด้วยเครื่อง DNA thermal cycle ด้วยระดับอุณหภูมิดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 pre-denature	94	องศาเซลเซียล นาน 5 นาที
ขั้นตอนที่ 2 denature	94	องศาเซลเซียล นาน 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 3 annealing	50-55	องศาเซลเซียล นาน 40 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 extension	72	องศาเซลเซียล นาน 1 นาที (ซ้ำ 35 รอบ)
ขั้นตอนที่ 5 final-extension	72	องศาเซลเซียล นาน 7 นาที

ตรวจสอบความแตกต่างของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีสความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซนต์ เลือกแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาบริเวณอนุรักษ์ ในขั้นตอนถัดไป

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากขั้นตอนที่ 3 จะถูกสกัดออกมาจากเจล เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบส เมื่อได้ลำดับเบสของดีเอ็นเอสังเคราะห์นั้น ๆ แล้ว นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLASTN เพื่อวิเคราะห์ค่าความเหมือนของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้กับฐานข้อมูลยีนสาธารณะ GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยเลือกใช้ megaBlast ที่ค่า cut off ของการตรวจสอบที่ *E-value* = 10^{-3} และวิเคราะห์ความน่าจะเป็นของ DNA barcodes ด้วยฐานข้อมูล *DNA subway* (www.dnasubway.org)

ตารางที่ 3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับยีน *ITS*, *mat*K, *rbc*L, *rpo*C_1 และ *trn*H-*psb*A intergenic spacer

Name of primer	Gene Primer (5'-3')		PCR product size (bp)	References
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGC		290	White et al., 1990
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC		290	White et al., 1990
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC		330	White et al., 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		700	White et al., 1990
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG		315	White et al., 1990
	Forward	**Reverse**		
trnH– psbA- trnH2	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC		296–1120	Tate et al., 2003
trnH– psbA- trn H	ACTGCCTTGATCCACTTGGC		296–1120	Tate et al., 2003
trnH– psbA- psbAF		GTTATGCATGAACGTAATGCTC	296–1120	Tate et al., 2003
trnH– psbA- psb A		CGAAGCTCCATCTACAAATGG	296–1120	Tate et al., 2003
rbcL-a	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	CTTCTGCTACAAATAAGAATCGATCTC	550-600	Kress et al., 2007
rbcL1-174	ATGTCACCACAAACAGAAAC	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	724	Fay et al., 1997
matK 390-1326	CGATCTATTCATTCAATATTTC	TCTAGCACACGAAAGTCGAAGT	930	Cuénoud et al., 2002
rpoC1	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	CCATAAGCATATCTTGAGTTGG	486	CBOL., 2009

5. การวิเคราะห์ความน่าจะเป็นของยีนมาตราฐานในการเป็น DNA barcode ของหญ้าทะเลด้วยโปรแกรม DNA subway

ชิ้นดีเอ็นเอของยีนมาตราฐาน *rbcL, rpoB, matK, ITS, trnH-psbA* และ *rpoC1* ที่ถูกต้องของกกจันทบูรจากขั้นตอนที่ 4 จะถูกสกัดออกมาจากเจล เพื่อวิเคราะห์หาลำดับเบส เมื่อได้ลำดับเบสของดีเอ็นเอสังเคราะห์นั้น ๆ แล้ว จะนำมาการศึกษาความน่าจะเป็นของการเป็น DNA barcode ด้วยโปรแกรม DNA subway (https://dnasubway.cyverse.org/) โดยเลือกการวิเคราะห์แบบ Determine Sequencing Relationship (blue line) เปรียบเทียบกับ reference data จาก common plant และ monocot และสร้างแผนภูมิพันธุกรรมแสดงความน่าจะเป็นของการเป็นดีเอ็นเอบาร์โค๊ดของยีนมาตราฐานเหล่านั้นด้วย Phylib Maximum Likelihoods (PHYLIP ML)

6. **วิเคราะห์แผนที่ยีนบริเวณอนุรักษ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ**

นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากขั้นที่ 5 วิเคราะห์จุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรม Web Cutter จากนั้นทำการตัดชิ้นแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากบริเวณเหล่านั้น เพื่อสร้างแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดพันธุ์ของรองเท้านารีต่อไป

7.วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด Start Codon Targeted (SCoT)

นำดีเอ็นเอของรองเท้านารีมาตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุล SCoT ตามวิธีของ Collard and Mackill. (2009) เลือกเฉพาะคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและทำซ้ำได้ นำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS โดยเลือกใช้ค่าวิเคราะห์ความเหมือนทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มพันธุกรรมชนิด unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ให้คะแนนแถบ DNA ที่ได้จากการแยกขนาด โดยพิจารณาจากการปรากฏของ DNA ซึ่งการปรากฏของแถบ DNA คือ 1 การไม่ปรากฏแถบ DNA คือ 0 จากนั้นนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยจัดกลุ่ม Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PAST program (โปรแกรมไม่มีลิขสิทธิ์) โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน Simple matching coefficient (SM) ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อจัดกลุ่มของตัวอย่างที่เหมือนกัน ซึ่งแสดงผลออกมาในรูปของ Phylogenetic tree โดยใช้ค่า SHAN แล้วตรวจสอบ Phylogenetic tree ที่ได้ว่าจัดกลุ่มได้ดีเพียงใดโดยการวิเคราะห์ค่า Coephenetic correlation (*r*)

Coephenetic correlation (Farris, 1969) เป็นค่าที่นิยมใช้บอกระดับของการจัดกลุ่มที่ได้ว่าอยู่ในเกณฑ์ใดโดยการคำนวณหาค่า coephenetic correlation ซึ่งค่า *r* ที่ได้จะแบ่งออกเป็นช่วงต่าง ๆ เพื่อแสดงถึงระดับของการจัดกลุ่มในงานทดลอง

r	มีค่ามากกว่า	0.9	ถือว่าจัดกลุ่มได้ดีมาก
r	มีค่าอยู่ระหว่าง	0.8-0.9	ถือว่าจัดกลุ่มได้ดี
r	มีค่าอยู่ระหว่าง	0.7-0.8	ถือว่าจัดกลุ่มปานกลาง
r	มีค่าน้อยกว่า	0.7	ถือว่าจัดกลุ่มไม่ดี

ค่า genetic distance หรือ ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม เป็นค่าที่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง species หรือ ระหว่างประชากรใน species นั้น ๆ โดยค่า genetic distance มีค่าน้อยจะหมายถึง มีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยหรือมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมมาก และค่า genetic distance มีค่ามากจะหมายถึงมีความแตกต่างทางพันธุกรรมมากหรือมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมน้อย (Nei and Li, 1979)

บทที่ 4

ผลการศึกษาวิจัย และการอภิปรายผล

ส่วนที่ 1 การศึกษา DNA barcoding เพื่อระบุชนิดกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี

1. **เก็บรวบรวบพันธุ์และระบุชนิดกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี**

ได้ดำเนินการสำรวจและเก็บกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิดคือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor*) รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (*Paphiopedilum concolorvar.striatum*) รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ (*Paphiopedilum barbigerum var.vejvarutianum*) รองเท้านารีเกาะช้าง (*Paphiopedilum simensis*) และ รองเท้านารีคางกบคอแดง (*Paphiopedilum appletonianum*) ซึ่งในการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ร้องเท้านารีดังกล่าวนั้นมีด้วยกันหลายช่อทางด้วยกัน คือ โดยรองเท้านารีเหลืองปราจีนปราจีนและรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ ได้รับจากเกษตรกรสมาชิกชมรมกล้วยไม้รองเท้านารีจังหวัดจันทบุรี รองเท้านารีเกาะช้างและรองเท้านารีคางกบคอแดง ได้จากป่าแถบจังหวัดตราดโดยได้ติดต่อกับชาวบ้านหรือเกษตรกรผู้ที่มีความรู้เรื่องกล้วยไม้เป็นอย่างดีในการนำทางเพื่อออกเก็บตัวอย่าง และรองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ ได้รับมาจากกลุ่มผู้รักกล้วยไม้จังหวัดเชียงใหม่ ภาพกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิดแสดงดังภาพ 4.1-4.5

ภาพที่ 4.1 กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน

ภาพที่ 4.2 กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกาญจน์

ภาพที่ 4.3 กล้วยไม้รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์

ภาพที่ 4.4 กล้วยไม้รองเท้านารีเกาะช้าง

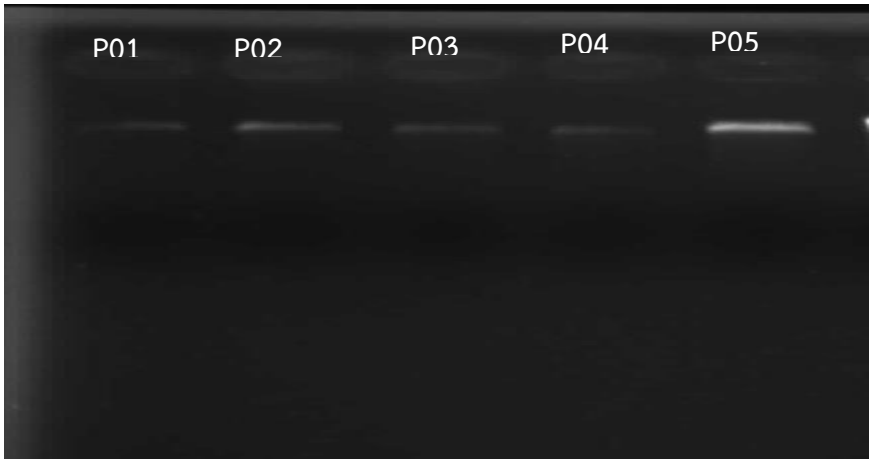
ภาพที่ 4.5 กล้วยไม้รองเท้านารีคางกบคอแดง

2. การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นจากกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิดโดยใช้ชุดสำเร็จแยกสกัดสารพันธุกรรม (ชุด Kit) Tian Gen (ประเทศจีน) เมื่อแยกสกัดดีเอ็นอได้แล้ว นำมาตรวจเชคคุณภาพและปริมาณด้วยเครื่อง Nanodrop ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และเจลอะกาโรสอิเลคโตรโฟลิซิสเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี โดยมีความบริสุทธ์อยู่ในช่วง 1.67-1.83 ซึ่งถือว่าคุณภาพดีมาก ปราศจากการปนเปื้อนด้วยอาร์เอ็นเอและโปรตีนที่เสียสภาพ ดังตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4. 6 ดั้งนั้นดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้นี้สามารถนำมาใช้ในขั้นตอนการทำ barcoding และ จำแนกชนิดพันธุ์ด้วยเทคนิคโมเลกุลเครื่องหมาย SCoT ต่อไป

ตารางที่ 4.1 ค่าความเข้มข้นและความบริสุทธ์ของดีเอ็นเอจากกล้วยไม้รองเท้านารี 5 ชนิด

ลำดับที่	ชื่อกล้วยไม้	รหัส	ความเข้มข้น (ng/µL)	ความบริสุทธิ์ ($OD_{260/280}$)
1	รองเท้านารีเหลืองปราจีน	P01	23.1	1.65
2	รองเท้านารีเหลืองกาญจน์	P02	24.8	1.67
3	รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์	P03	36.0	1.80
4	รองเท้านารีเกาะช้าง	P04	42.2	1.76
5	รองเท้านารีคางกบคอแดง	P05	54.0	1.75



ภาพที่ 4.6 จีโนมิคดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด บนเจลอะกาโรสอิเลคโตรโฟลิซิสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

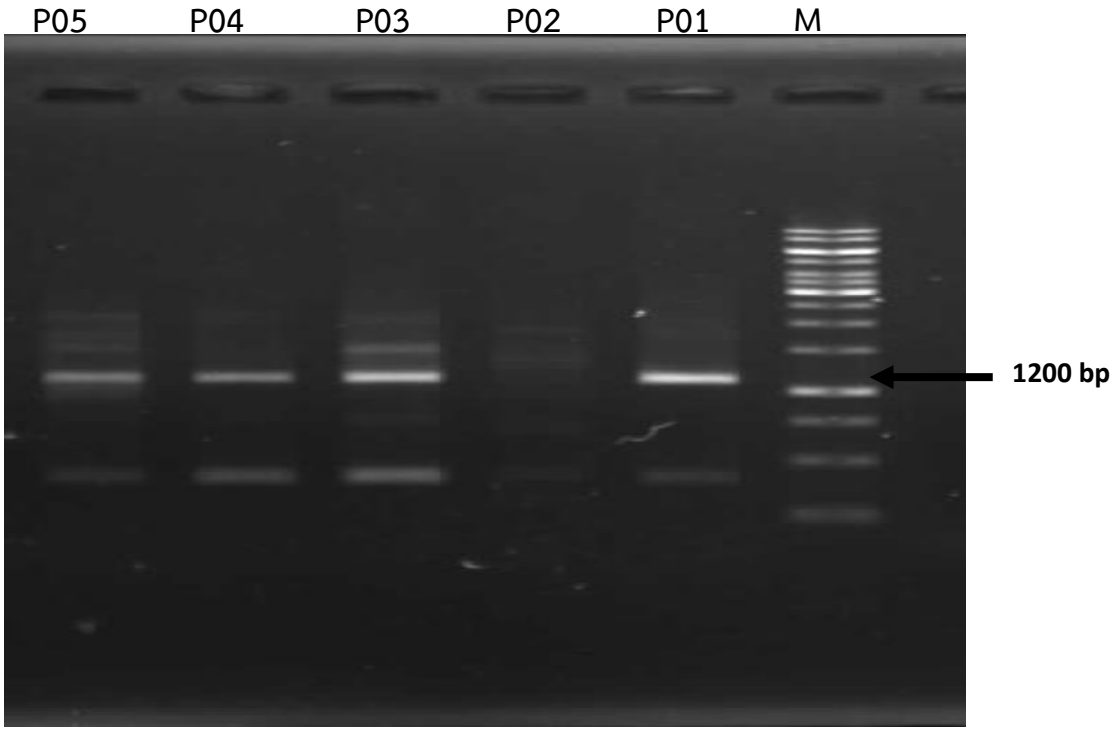
P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน
P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์
P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง
P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง
P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง

3. การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่บริเวณยีน *ITS*, *mat*K, *rbc*L, *rpoB, rpo*C_1 และ *trn*H-*psb*A intergenic spacer

ดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้ในขั้นตอนที่ 2 ถูกนำมาใช้ในสร้าง barcoding โดยใช้ยีน *ITS*, *mat*K, *rbc*L, *rpoB rpo*C_1 และ *trn*H-*psb*A intergenic spacer ซึ่งยีนเหล่านี้เป็นบริเวณอนุรักษ์ในพืช แต่มีความสามารถในการจำแนกชนิดพันธุ์ได้โดยอาศัยการเกิดการกลายพันธุ์บางตำแหน่งในสายพันธุกรรม ดังนั้นจากการทดลองพบว่า สามารถตรวจพบดีเอ็นเอเป้าหมายของกล้วยไม้รองเท้านารีที่จำเพาะกับยีนดังกล่าวด้วยเทคนิคพีซรอาร์ พบว่ามีเพียง ยีนมาตราฐาน *mat*K, *rbc*L, *rpoB* และ *rpo*C_1 เท่านั้นที่ให้ขนาดของดีเอ็นที่ถูกต้องและเกิดเพียงแบนเดียว ในขณะที่ยีนมาตราฐานชนิดอื่นคือ ITS และ *trn*H-*psb*A intergenic spacer ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่ถูกต้อง (ตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.7-4.15) และชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวได้ถูก recovery ออกมาจากเจลอะกาโรส พร้อมทั้งทำให้บริสุทธิ์ เมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโทด์เพื่อหาค่าความเหมือนด้วยโปรแกรม BLASTN ต่อไป

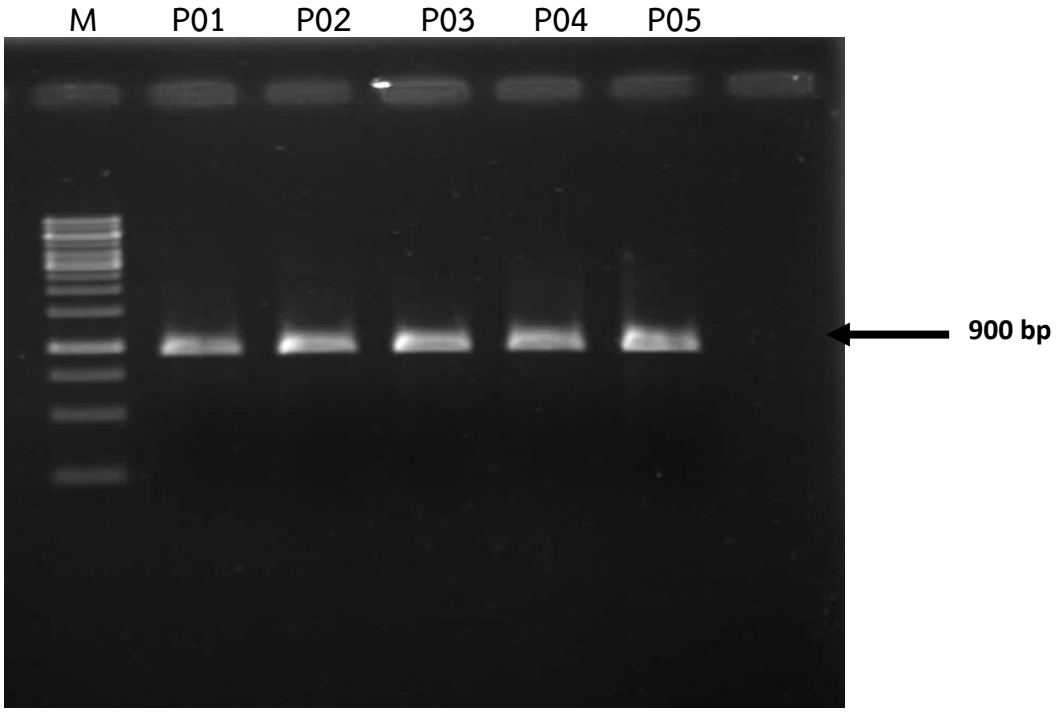
ตารางที่ 4.2 ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะกับเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อสร้าง barcoding ของกล้วยไม้ร้องเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

ลำดับที่	ชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นอ	ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ (bp)	Annealing tem. (°C)
1	*ITS2*	1,000	50
2	*ITS3*	1,200	50
3	*matK*	900	55
4	*rbcL*	720	55
5	*rbcL174*	700	52
6	*rpoC*$_1$	600	52
7	*rpoB*	520	52
8	*trn-H psbA trnH-F/trn psbA-psbA-R*	900	52
9	*trn-H psbA trnH-F/trnH psbA-psbAF-R*	850	52
10	*trnH psbA-trnH2-F/trnH psb-psbA-R*	900	52
11	*trnH psbA-trnH2-F/ trnH psbA-psbAF-R*	850	52



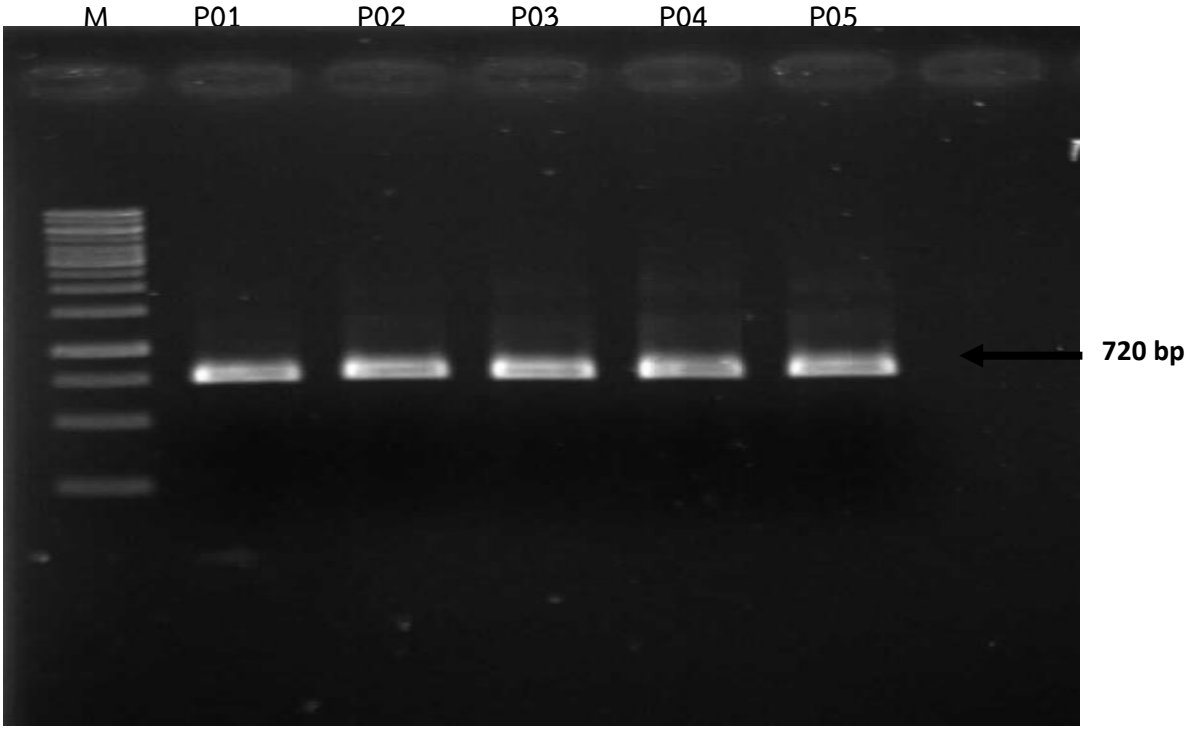
ภาพที่ 4.7 ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *ITS3* ขนาด 1,200 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน
P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์
P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง
P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง
P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง



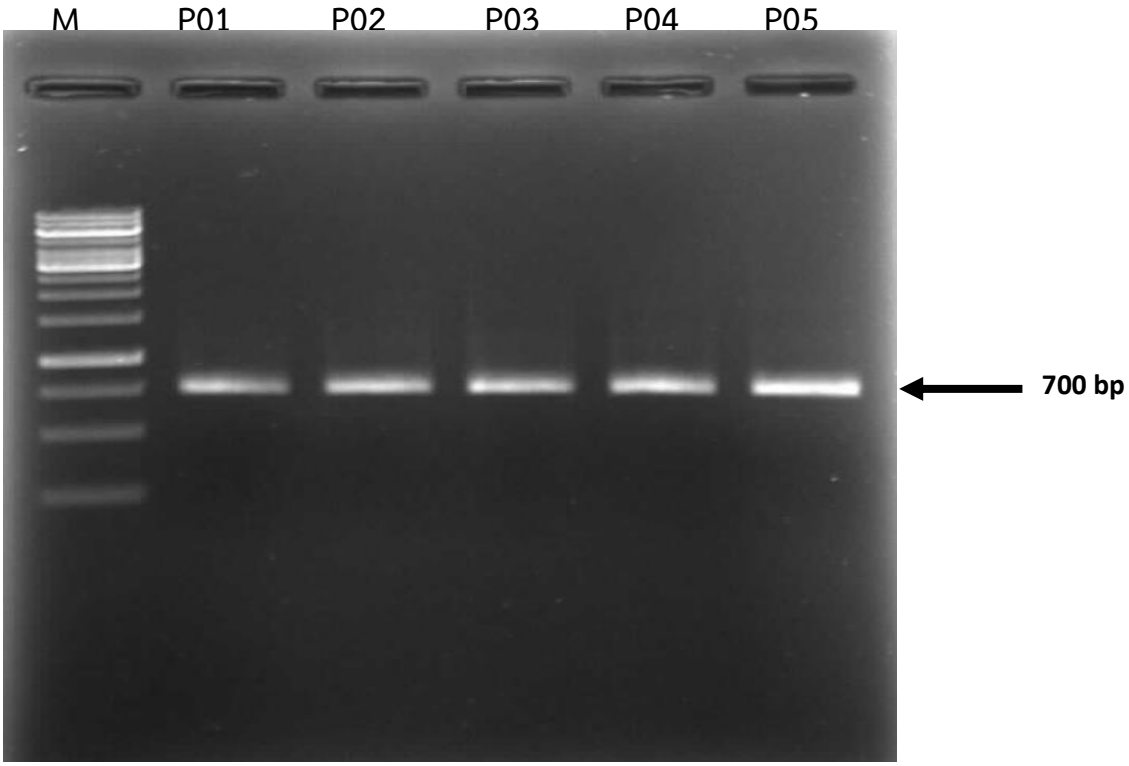
ภาพที่ 4.8 ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *mat*K ขนาด 900 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน
P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์
P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง
P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง
P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง



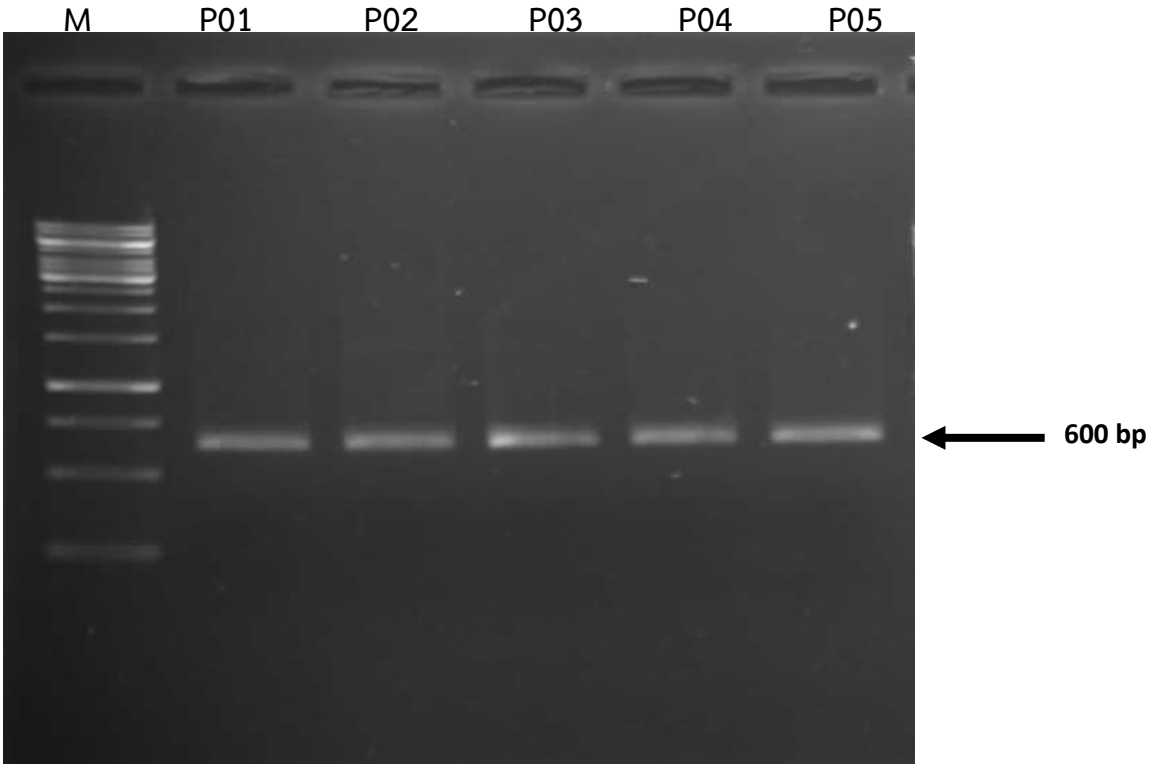
ภาพที่ 4.8 ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *rbc*L ขนาด 720 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน
P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์
P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง
P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง
P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง



ภาพที่ 4.9 ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *rbc*L174 ขนาด 700 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน
P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์
P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง
P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง
P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง



ภาพที่ 4.10 ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *rpoC1* ขนาด 600 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

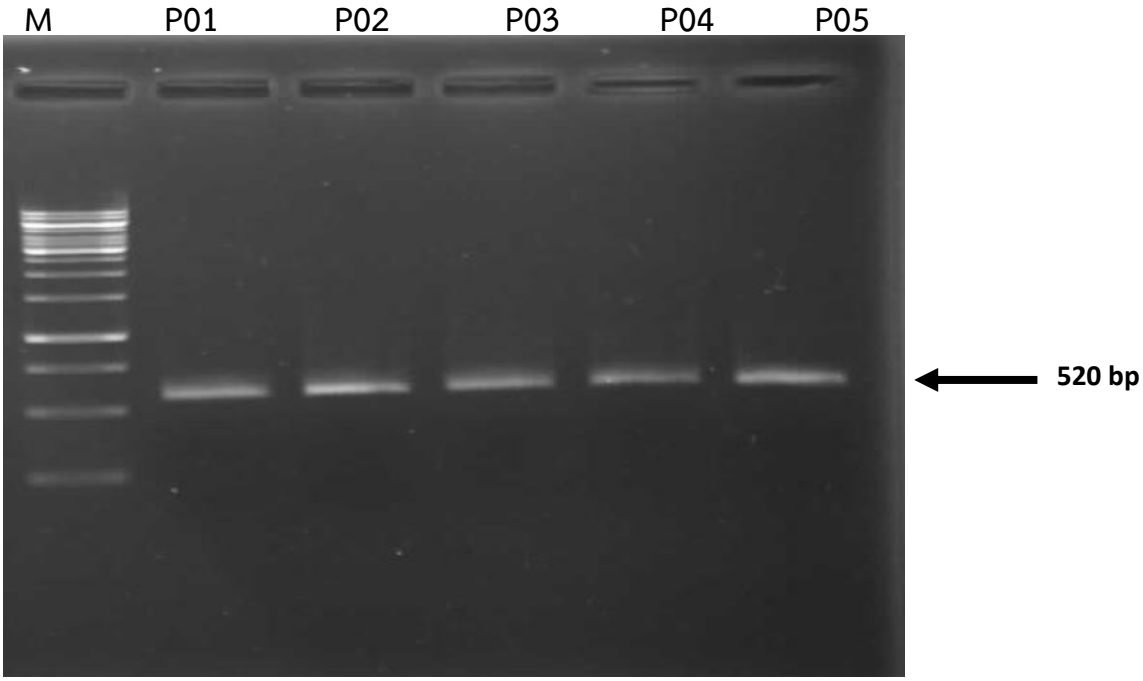
P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน

P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์

P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง

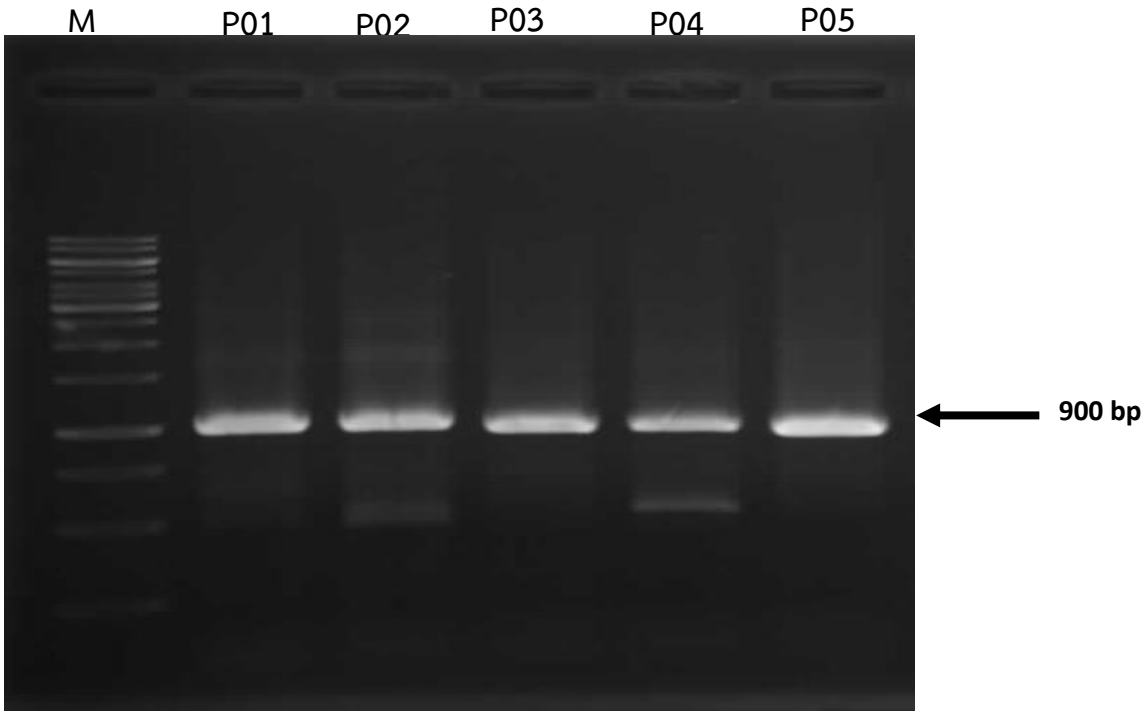
P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง

P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง



ภาพที่ 4.11 ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *rpo*B ขนาด 520 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน
P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์
P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง
P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง
P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง



ภาพที่ 4.12 ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *trn-H psbA trnH-F/trn psbA-psbA-R* ขนาด 900 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

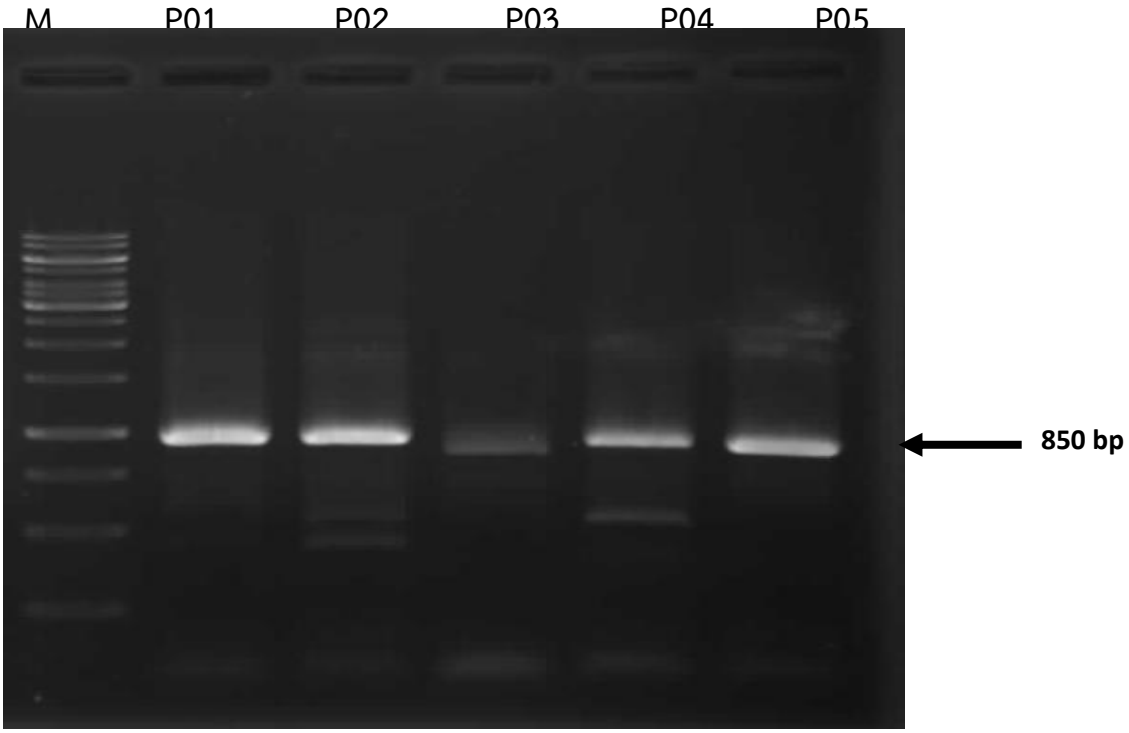
P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน

P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์

P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง

P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง

P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง



ภาพที่ 4.13 ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *trn-H psbA trnH-F/trnH psbA-psbAF-R* ขนาด 850 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

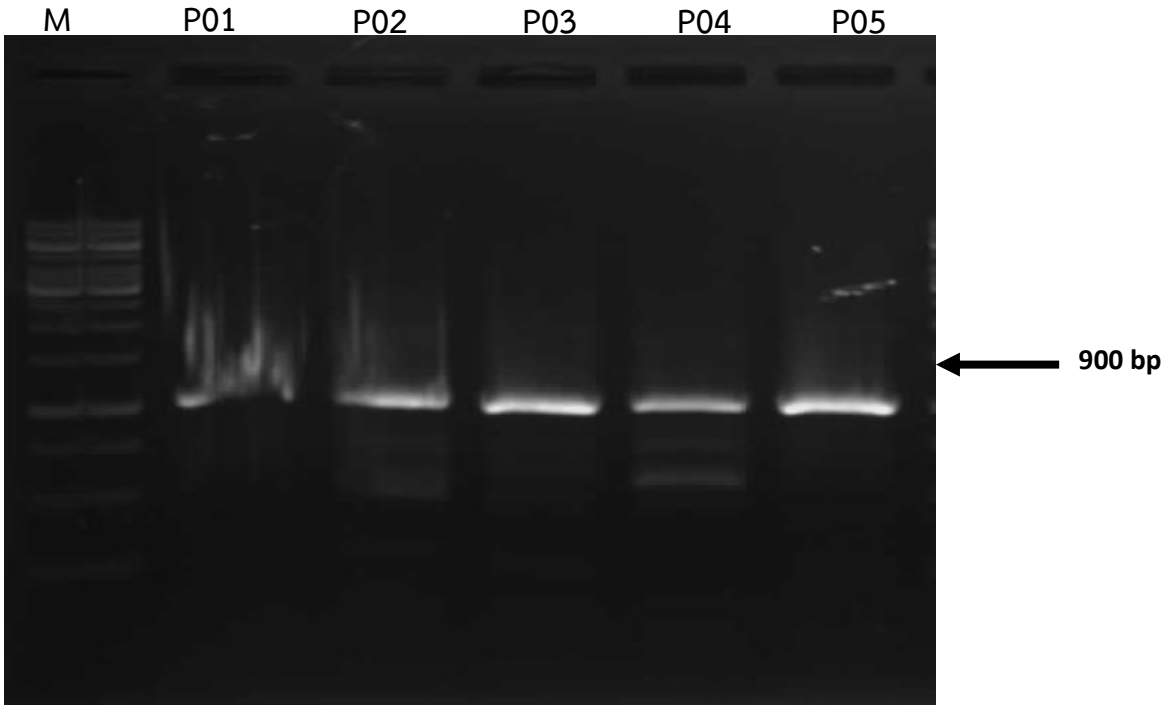
P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน

P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์

P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง

P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง

P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง



ภาพที่ 4.14 ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *trnH psbA-trnH2-F/trnH psb-psbA-R* ขนาด 900 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

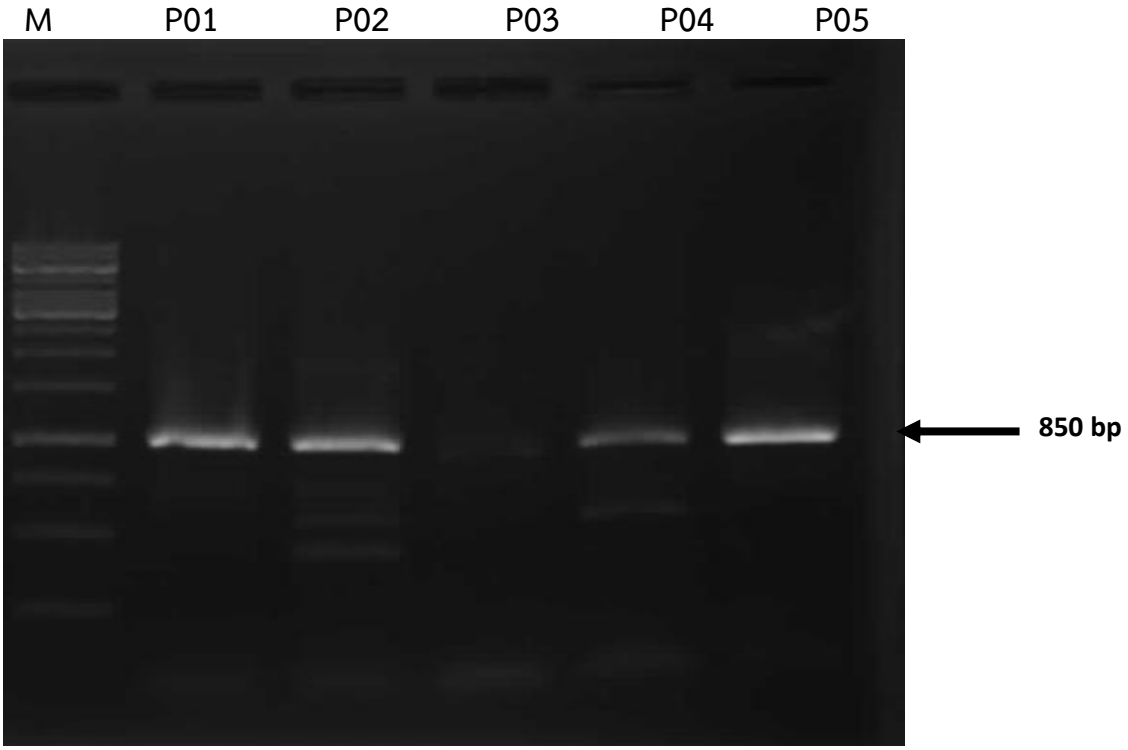
P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน

P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์

P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง

P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง

P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง



ภาพที่ 4.15 ผลผลิตของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด *trnH psbA-trnH2-F/ trnH psbA-psbAF-R* ขนาด 850 คู่เบส บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน

P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์

P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง

P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง

P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง

4._การวิเคราะห์ค่าความเหมือนโดยใช้โปรแกรม BLAST

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนบริเวณอนุรักษ์ *rbc*L, *mat*K, *rpoB* และ *rpo*C_1 ที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN และ algorithm ดังตารางที่ 4.3 พบว่า

1. ชิ้นดีเอ็นเอ rbcL-P01**,** rbcL-P02, rbcL-P03, rbcL-P04 และ rbcL-P05 ที่ได้จาการเพิ่มปริมาณในส่วนของยีนมาตราฐาน *rbc*L ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor*) รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (*Paphiopedilum concolorvar.striatum*) รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ (*Paphiopedilum barbigerum var.vejvarutianum*) รองเท้านารีเกาะช้าง (*Paphiopedilum simensis*) และ รองเท้านารีคางกบคอแดง (*Paphiopedilum appletonianum*) ตามลำดับ โดยพบมีขนาดประมาณ 720 คู่เบส และแสดงความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาตราฐาน *rbc*L ของกล้วยไม้ *Paphiopedilum purpuratum* ประมาณ 99.15 - 99.71 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทดค์มีความเหมือนกันมาก หรืออาจกล่าวได้ว่ามีลำดับเดียวคลีโอไทด์เดียวกัน

2. ชิ้นดีเอ็นเอ matK-P01, matK-P02, matK-P03, matK-P04 และ matK-P05 ที่ได้จาการเพิ่มปริมาณในส่วนของยีนมาตราฐาน *mat*K ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ รองเท้านารีเกาะช้าง และ รองเท้านารีคางกบคอแดง ตามลำดับ โดยพบมีขนาดประมาณ 900 คู่เบส และแสดงความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาตราฐาน *mat*K ของกล้วยไม้ *Paphiopedilum niveum*, *Paphiopedilum henryanum*, *Paphiopedilum appletonianum* และ *Paphiopedilum callosum* ประมาณ 99.55 -99.89 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทดค์มีความเหมือนกันมาก หรืออาจกล่าวได้ว่ามีลำดับเดียวคลีโอไทด์เดียวกัน

3. ชิ้นดีเอ็นเอ rpoB-P01**,** rpoB-P02, rpoB-P03, rpoB-P04 และ rpoB-P05 ที่ได้จาการเพิ่มปริมาณในส่วนของยีนมาตราฐาน *rpo*B ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ รองเท้านารีเกาะช้าง และรองเท้านารีคางกบคอแดง ตามลำดับ โดยพบมีขนาดประมาณ 520 คู่เบส และแสดงความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาตราฐาน *rpo*B ของกล้วยไม้ *Paphiopedilum x dalatense* และ *Paphiopedilum tranlienianum* ประมาณ 99.19 - 99.88 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทดค์มีความเหมือนกันมาก หรืออาจกล่าวได้ว่ามีลำดับเดียวคลีโอไทด์เดียวกัน

4. ชิ้นดีเอ็นเอ rpoC1-P01**,** rpo C1-P02, rpoC1-P03, rpoC1-P04 และ rpoC1-P05 ที่ได้จาการเพิ่มปริมาณในส่วนของยีนมาตราฐาน *rpo*C1 ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ รองเท้านารีเกาะช้าง และรองเท้านารีคางกบคอแดง ตามลำดับ โดยพบมีขนาดประมาณ 600 คู่เบส และแสดงความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนมาตราฐาน *rpo*B ของกล้วยไม้ *Cypripedium henryi Cypripedium calceolus* และ *Cypripedium japonicum* ประมาณ 97.41 -97.58 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทดค์มีความเหมือนกันมาก

ตารางที่ 4.3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอจากบริเวณอนุรักษ์ *rbc*L, *mat*K, *rpoB* และ *rpo*C_1 ของกล้วยไม้รองเท้านารีด้วยโปรแกรม BLASTN

Fragment	Length (bp)	GenBank Accession No.	Sequence Homology		
			Description	*E*-value	Identity
rbcL-P01	726	MK161066.1	*Paphiopedilum purpuratum* isolate 2114 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	0.0	99.15%
rbcL-P02	725	MK161066.1	*Paphiopedilum purpuratum* isolate 2114 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	0.0	99.71%
rbcL-P03	723	MK161066.1	*Paphiopedilum purpuratum* isolate 2114 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	0.0	99.71%
rbcL-P04	723	MK161066.1	*Paphiopedilum purpuratum* isolate 2114 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	0.0	99.71%
rbcL-P05	723	MK161066.1	*Paphiopedilum purpuratum* isolate 2114 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (rbcL) gene, partial cds; chloroplast	0.0	99.71%
matK-P01	917	KC692139.1	*Paphiopedilum niveum* voucher FRI 56091 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	0.0	99.55%
matK-P02	917	KC692139.1	*Paphiopedilum niveum* voucher FRI 56091 maturase K (matK) gene, partial cds; chloroplast	0.0	99.55%
matK-P03	917	KY966920.1	*Paphiopedilum henryanum* voucher KFBG3192 maturase K (matK) gene, partial cds; plastid	0.0	99.89%
matK-P04	918	KY966915.1	*Paphiopedilum appletonianum* voucher KFBGFS7092 maturase K (matK) gene, partial cds; plastid	0.0	99.66%
matK-P05	915	KY966917.1	*Paphiopedilum callosum* voucher KFBG2174A maturase K (matK) gene, partial cds; plastid	0.0	99.77%
rpoB-P01	529	MK876158.1	*Paphiopedilum x dalatense* voucher DAL_143 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds; chloroplast	0.0	99.40%
rpoB-P02	530	MK876158.1	*Paphiopedilum x dalatense* voucher DAL_143 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds; chloroplast	0.0	99.19%

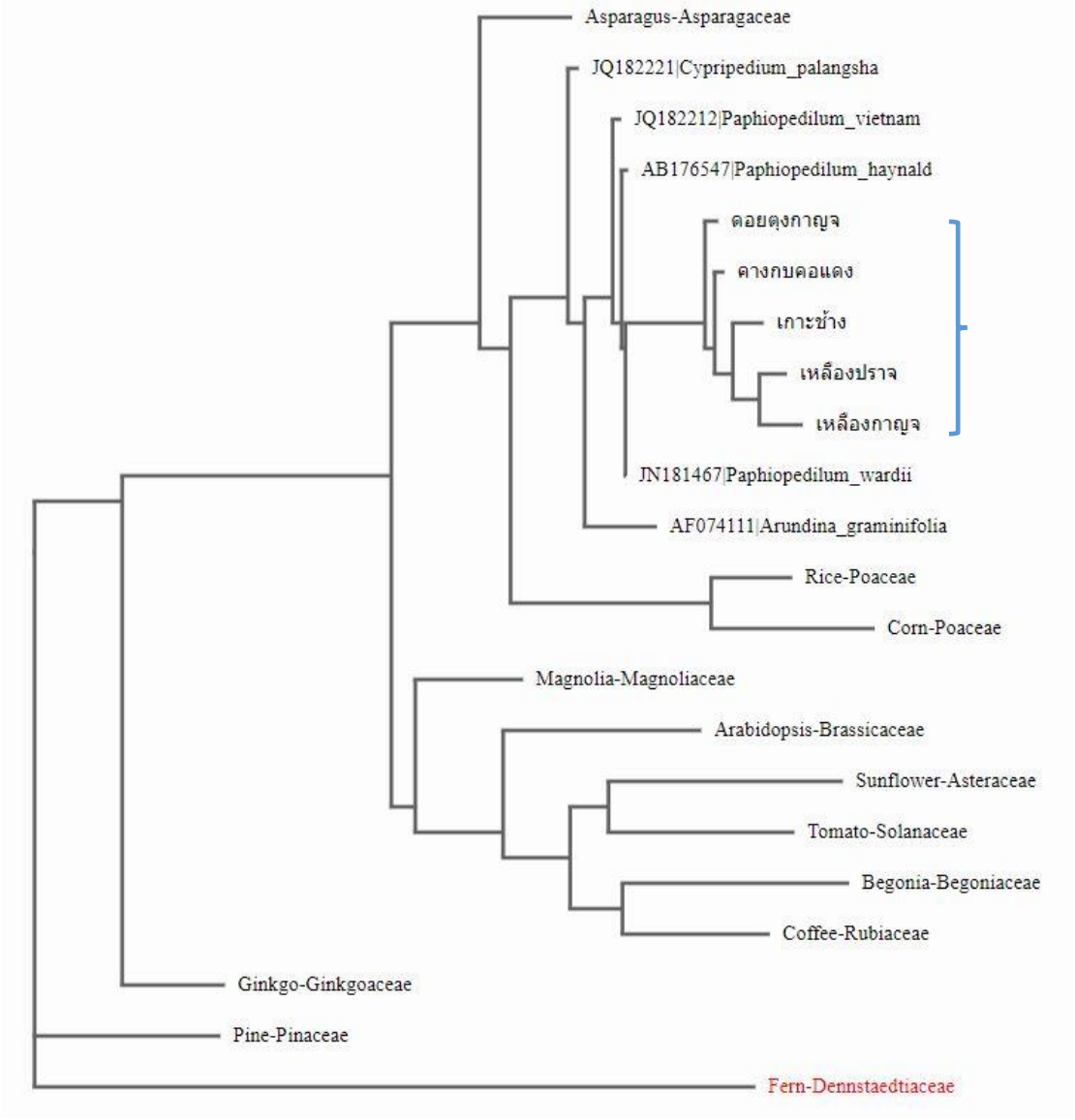
Fragment	Length (bp)	GenBank Accession No.	Sequence Homology		
			Description	*E*-value	Identity
rpoB-P03	528	MK876181.1	*Paphiopedilum tranlienianum* voucher TRA_178 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds; chloroplast	0.0	99.80%
rpoB-P04	528	MK876181.1	*Paphiopedilum tranlienianum* voucher TRA_178 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds; chloroplast	0.0	99.40%
rpoB-P05	528	MK876157.1	*Paphiopedilum x dalatense* voucher DAL_138 RNA polymerase beta subunit (rpoB) gene, partial cds; chloroplast	0.0	99.40%
rpoC1-P01	596	AM889880.1	*Cypripedium henryi* chloroplast partial rpoC1 gene for RNA polymerase beta' subunit	0.0	97.41%
rpoC1-P02	597	AM889880.1	*Cypripedium henryi* chloroplast partial rpoC1 gene for RNA polymerase beta' subunit	0.0	97.41%
rpoC1-P03	600	AM889879.1	*Cypripedium calceolus* chloroplast partial rpoC1 gene for RNA polymerase beta' subunit	0.0	97.58%
rpoC1-P04	596	LC086632.1	*Cypripedium japonicum* chloroplast rpoC1 gene for DNA-directed RNA polymerase beta' chain, partial cds, isolate: smsl42	0.0	97.58%
rpoC1-P05	595	LC086632.1	*Cypripedium japonicum* chloroplast rpoC1 gene for DNA-directed RNA polymerase beta' chain, partial cds, isolate: smsl42	0.0	97.41%

<u>ส่วนที่ 2 การวิเคราะห์ความน่าจะเป็น DNA Barcoding ของยีนมาตราฐานในกล้วยไม้รองเท้านารี ด้วยโปรแกรม DNA Subway</u>

การทำ DNA barcode มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นเครื่องมือช่วยในการระบุสิ่งมีชีวิต และมีความจำ เป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีนักอนุกรมวิธานในการสร้างระบบอ้างอิงที่ถูกต้องเพราะฐานข้อมูลจะต้องเป็นลำ ดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างที่มีการระบุชนิดอย่างถูกต้องโดยนักอนุกรมวิธานเท่านั้น DNA barcode จึงเป็นเครื่องมือวิเคราะห์อย่างง่ายที่มีพื้นฐานอยู่บนความรู้ของนักอนุกรมวิธานในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต (พรณรงค์ และอรุณรัตน์, 2554) โดยทำการออกแบบไพร์เมอร์ให้เข้าเกาะบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) และคลอบคลุมในส่วนที่ผันแปร เพื่อให้ผลผลิตที่เกิดจากการผันแปรนั้นมาใช้ในการจำแนกชนิด ซึ่งน่าจะเกิดขึ้นตามสายวิวัฒนาการ

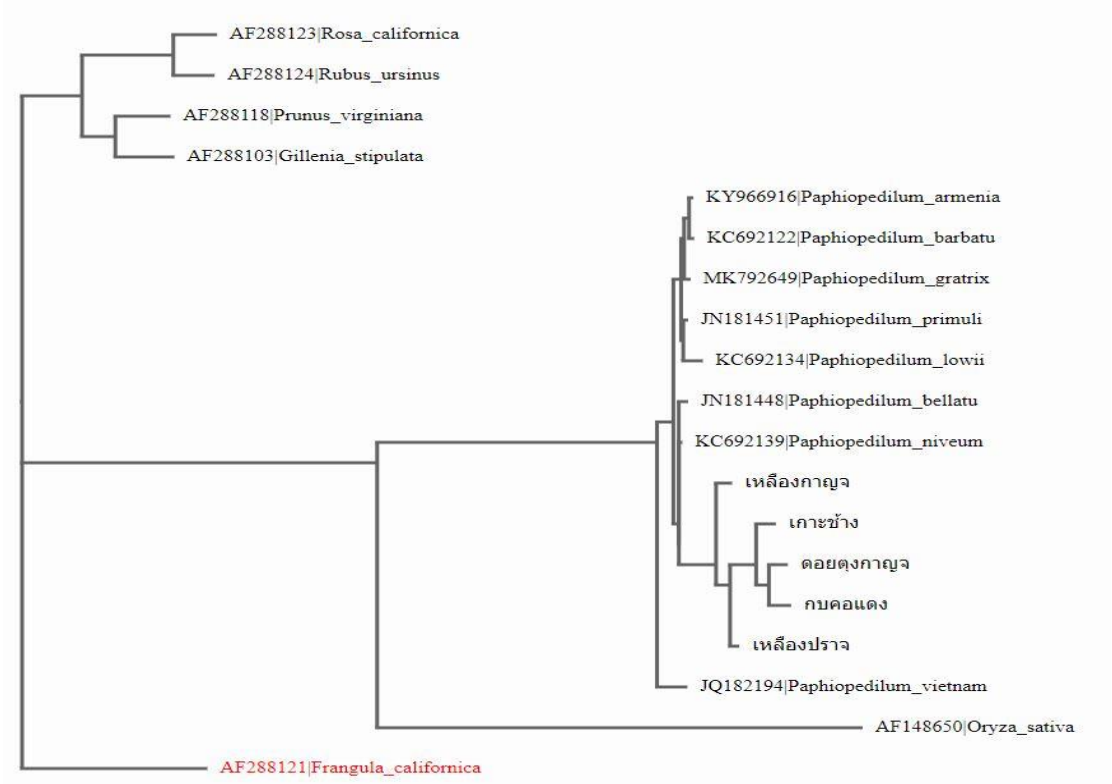
เมื่อทำการวิเคราะห์ความน่าจะเป็นของการเป็น DNA Barcoding ของยีนมาตราฐาน *rbc*L, *rpo*B, *mat*K และ *rpo*C1 ที่ถูกต้องของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิดนี้ คือ ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ รองเท้านารีเกาะช้าง และรองเท้านารีคางกบคอแดง ด้วยโปรแกรม DNA Subway พบว่า

1. ยีนมาตราฐาน *rbc*L สามารถแยกของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ รองเท้านารีเกาะช้าง และรองเท้านารีคางกบคอแดงออกจากกันได้ (ภาพที่ 4.16) และพบว่าบริเวณอนุรักษ์ (conserve sequence) นี้จะมีความแปรปรวนสูง โดยพบมีความกว้างประมาณ 550 คู่เบส (ภาพที่ 4.17)
2. ยีนมาตราฐาน *mat*K สามารถแยกของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ รองเท้านารีเกาะช้าง และรองเท้านารีคางกบคอแดงออกจากกันได้ (ภาพที่ 4.18) และพบว่าบริเวณอนุรักษ์ (conserve sequence) นี้จะมีความแปรปรวนสูง โดยพบมีความกว้างประมาณ 850 คู่เบส (ภาพที่ 4.19) การที่ยีนมาตราฐาน *mat*K มีช่วงผันแปร หรือมีช่วงแปรปรวนเป็นบริเวณกว้างจึงส่งผลให้เกิดการผันแปรในระหว่างสิ่งมีชีวิตได้มากเช่นเดียวกัน
3. ยีนมาตราฐาน *rpo*B สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกล้วยไม้รองเท้านารีทุกชนิดออกจากพืชอื่น ๆ ได้ แต่มีประสิทธิภาพต่ำในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ รองเท้านารีเกาะช้าง และรองเท้านารีคางกบคอแดง (ภาพที่ 4.20) และพบว่าบริเวณอนุรักษ์ (conserve sequence) นี้จะมีความแปรปรวนของยีนมาตราฐาน *rpo*B ความยาวประมาณ 520 คู่เบส (ภาพที่ 4.21)
4. ยีนมาตราฐาน *rpo*C1 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกล้วยไม้รองเท้านารีทุกชนิดออกจากพืชอื่น ๆ ได้ แต่มีประสิทธิภาพต่ำในการแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ รองเท้านารีเกาะช้าง และรองเท้านารีคางกบคอแดง (ภาพที่ 4.21) และพบว่าบริเวณอนุรักษ์ (conserve sequence) นี้จะมีความแปรปรวนของยีนมาตราฐาน *rpo*C1 ความยาวประมาณ 1,300 คู่เบส (ภาพที่ 4.22) แม้ว่าบริเวณอนุรักษ์ (conserve sequence) นี้จะมีความแปรปรวนของยีนมาตราฐาน *rpo*C1 จะมีช่วงกว้างมาก แต่ยังไม่สามารถกล่าวได้ว่ามีประสิทธิภาพในการนำมาใช้จำแนกชนิดพันธุ์ของพืช เนื่องจากในปัจจุบันยังพบว่าในฐานข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลยังมีข้อมูลของยีนนี้ไม่มากเท่ากับยีนมาตราฐาน *rbc*L และ *mat*K

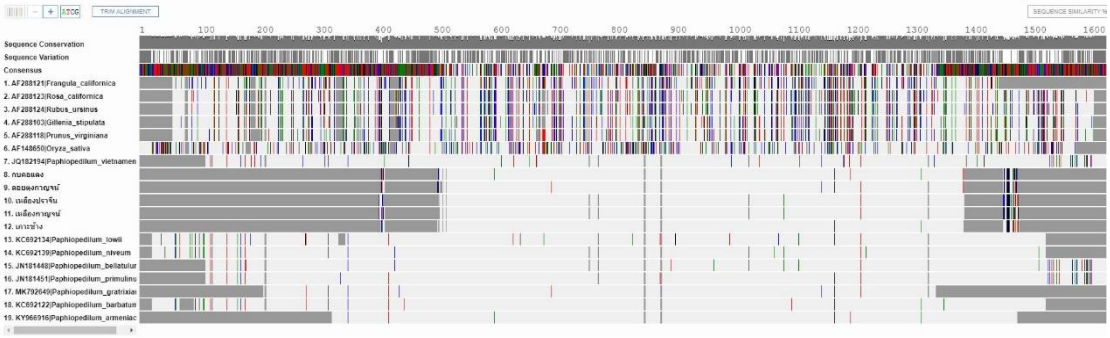


ภาพที่ 4.16 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตราฐาน *rbc*L ในการเป็น DNA Barcode ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYLIP ML ด้วยโปรแกรม DNA Subway

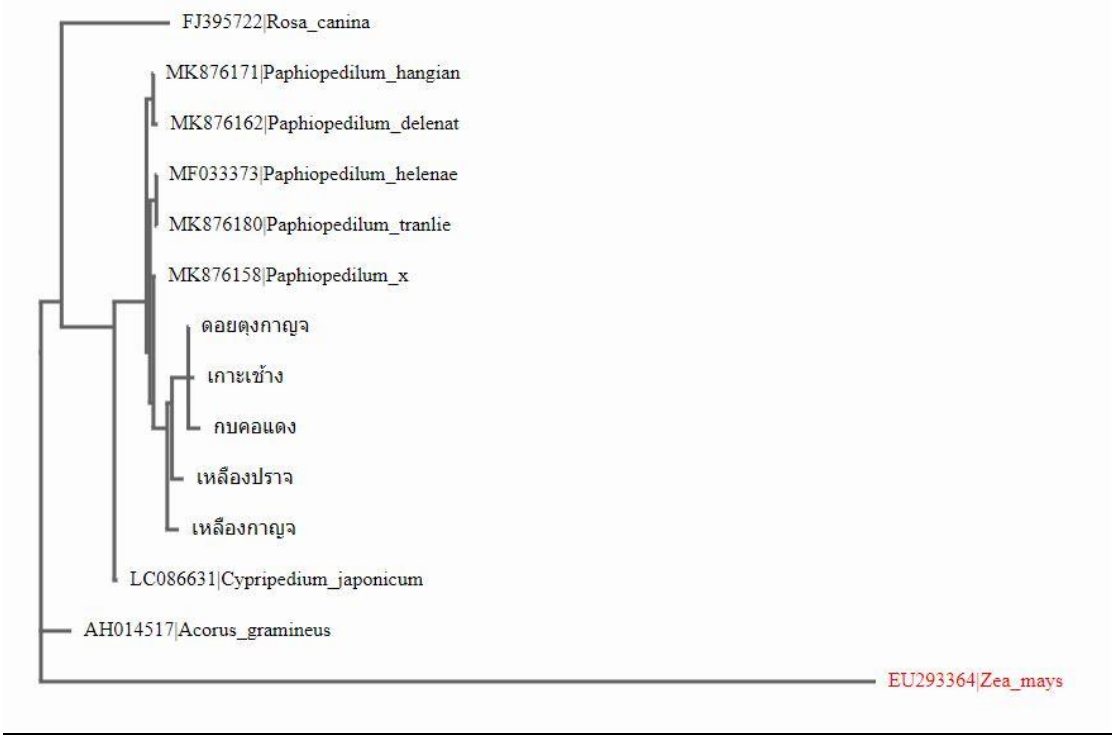
ภาพที่ 4.17 การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตราฐาน *rbc*L ในกล้วยไม้รองเท้านารี ทั้ง 5 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway



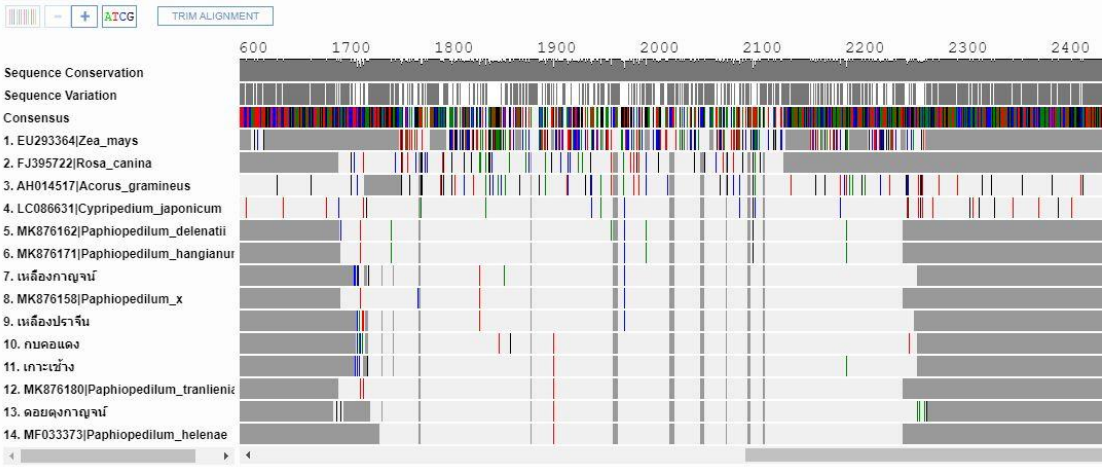
ภาพที่ 4.18 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตราฐาน *mat*K ในการเป็น DNA Barcode ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYLIP ML ด้วยโปรแกรม DNA Subway



ภาพที่ 4.19 การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตราฐาน *mat*K ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway

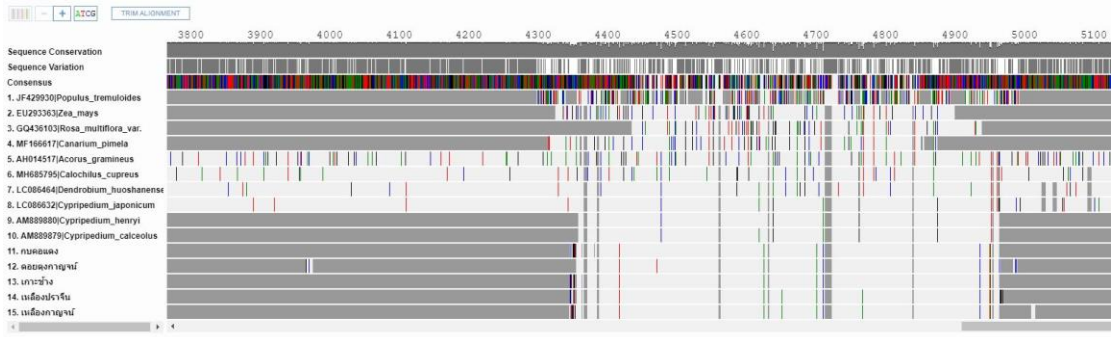


ภาพที่ 4.20 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตราฐาน *rpo*B ในการเป็น DNA Barcode ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYLIP ML ด้วยโปรแกรม DNA Subway



ภาพที่ 4.21 การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตราฐาน *rpo*B ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway

ภาพที่ 4.22 แผนภูมิพันธุกรรมแสดงความเหมือนของยีนมาตราฐาน *rpo*C1 ในการเป็น DNA Barcode ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด เมื่อวิเคราะห์ PHYLIP ML ด้วยโปรแกรม DNA Subway

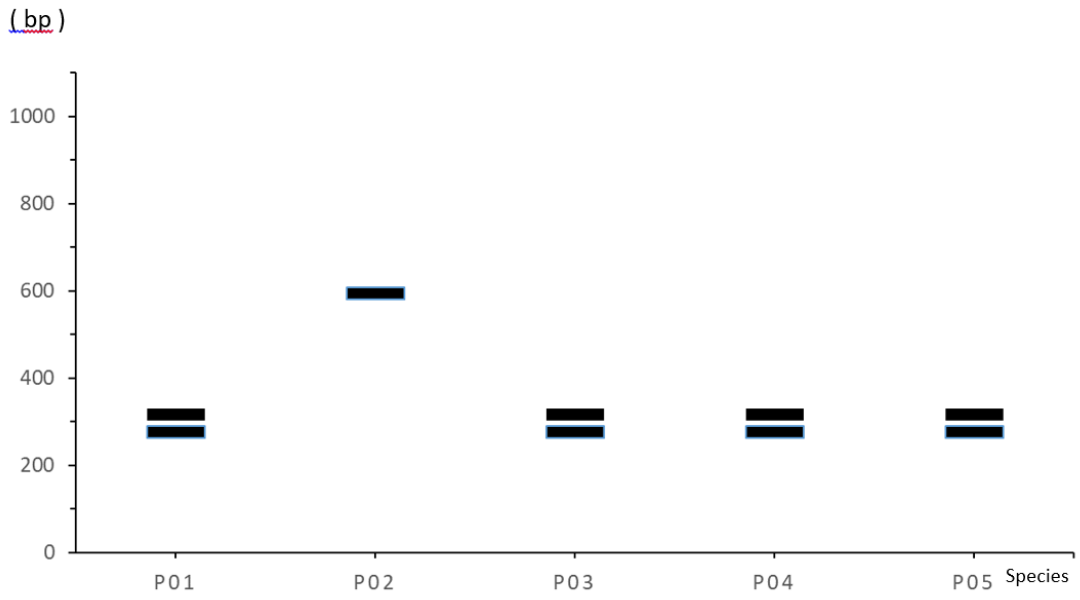


ภาพที่ 4.23 การวิเคราะห์ Consensus sequence ของยีนมาตราฐาน *rpo*C1 ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิดเทียบกับจีโนมอ้างอิง เมื่อวิเคราะห์ muscle ด้วยโปรแกรม DNA Subway

ส่วนที่ 3 การสร้างแผนที่ยีนมาตราฐานด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

ในการวิเคราะห์แผนที่ยีนมาตราฐานหรือบริเวณอนุรักษ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เพื่อสร้างเอกลักษณ์ของยีนต่าง ๆ ในสิ่งมีชวิต และสามารถนำไปใช้ในการจำแนกชนิดได้ เมื่อน้ำชิ้นส่วนของยีนของมาตราฐาน *rbc*L, *rpo*B, *mat*K และ *rpo*C1 ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิดนี้ คือ กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ รองเท้านารีเกาะช้าง และรองเท้านารีคางกบคอแดง มาวิเคราะห์จุดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรม web cutter (http://nc2.neb.com/NEBcutter2/ และภาคผนวกที่ 1) พบว่า

1. ยีนมาตราฐาน *rbc*L ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิดคือ กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ รองเท้านารีเกาะช้าง และรองเท้านารีคางกบคอแดง เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nsp*I พบว่า จะสามารถแยกกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (P02) ออกจากกล้วยไม้รองเท้านารีอื่น ๆ ได้ เนื่องจากยีนมาตราฐานของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ไม่มีจุดตัดของเอนไซม์ ชนิดนี้ ซึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอชิ้นเดียวที่มีขนาดประมาณ 596 คู่เบส ซึ่งแตกต่างยีนมาตราฐาน *rbc*L ของกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดอื่นที่มีจุดตัดของเอไซม์ชนิดนี้ โดยเมื่อตัดด้วยเอนไซม์ดังกล่าว จะทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอจำนวน 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 278 และ 318 คู่เบส (ภาพที่ 4.24)

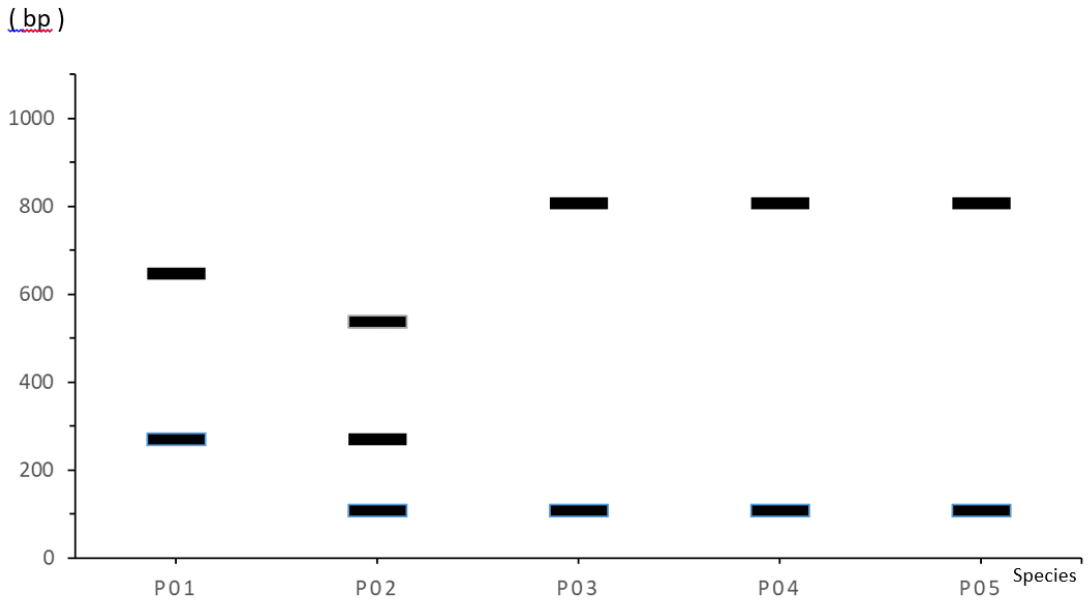


ภาพที่ 4.24 แผนที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีนมาตราฐาน *rbc*L ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nsp*I ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน
P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์
P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง
P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง
P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง

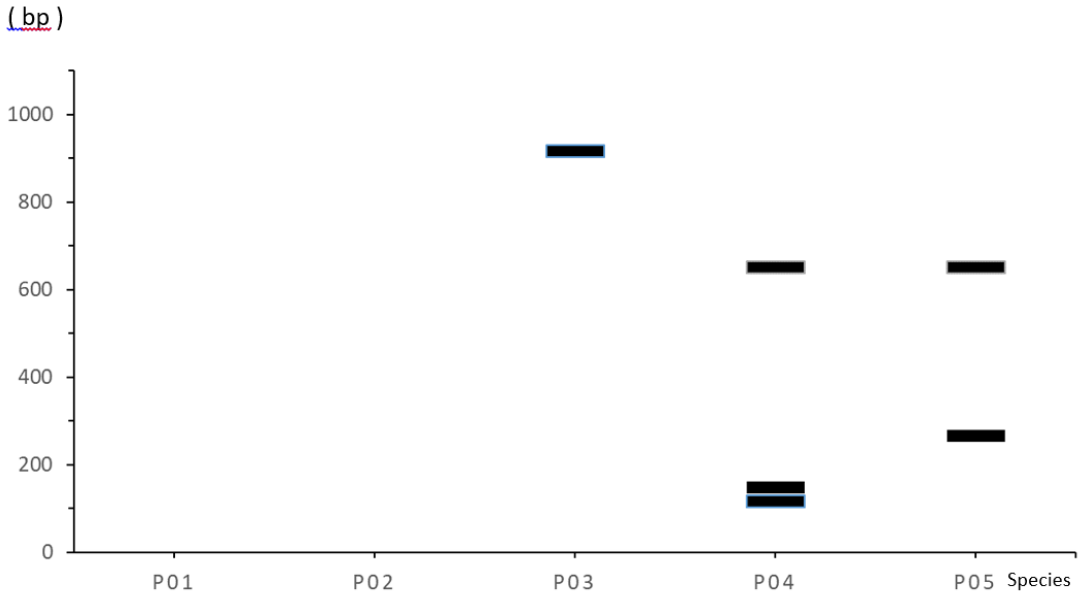
2. ยีนมาตราฐาน *mat*K การทำแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยขั้นตอนที่ 1 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*II จะสามารถแยกกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน (P01) และกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (P02) ออกจากกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดอื่นๆ ได้ โดยพบว่า กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน จะใช้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 270 และ 647 คู่เบส และกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ จะให้ชิ้นดีเอ็นเอจำนวน 3 ชิ้น ขนาดประมาณ 109 270 และ 538 คู่เบส ในขณะที่กล้วยไม้รองเท้านารีอื่น ๆ จะให้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 109 และ 808 คู่เบส (ภาพที่ 4.25)

ในขั้นตอนที่ 2 เพื่อแยกชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีที่เหลือ จะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดทำงานร่วมกันคือ *Psi*I และ *Sau96*I โดยพบว่ารองเท้านารีดอยตุง (P03) จะไม่มีจุดตัดของเอนไซม์ชนิดนี้ ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอจำนวน 1 ชิ้น ขนาดประมาณ 917 คู่เบส กล้วยไม้รองเท้านารีเกาะช้างจะพบชิ้นดีเอ็นเอจำนวน 3 ชิ้น ขนาดประมาณประมาณ 118 148 และ 651 คู่เบส ในขณะที่รองเท้านารีคางกบคอแดงจะพบชิ้นดีเอ็นเอจำนวน 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 266 และ 651 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 4.26)



ภาพที่ 4.25 ขั้นตอนที่ 1 แผนที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีนมาตราฐาน *mat*K ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa*II ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน
P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์
P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง
P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง
P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง



ภาพที่ 4.26 ขั้นตอนที่ 2 แผนที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีนมาตราฐาน *mat*K ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Psi*I + *Sau*96I ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน

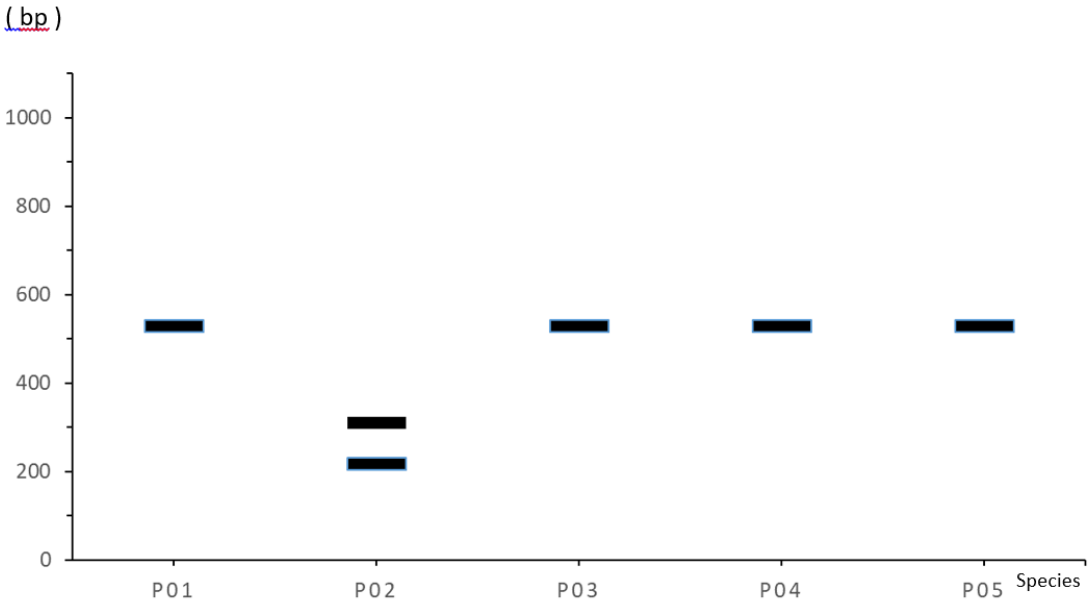
P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์

P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง

P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง

P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง

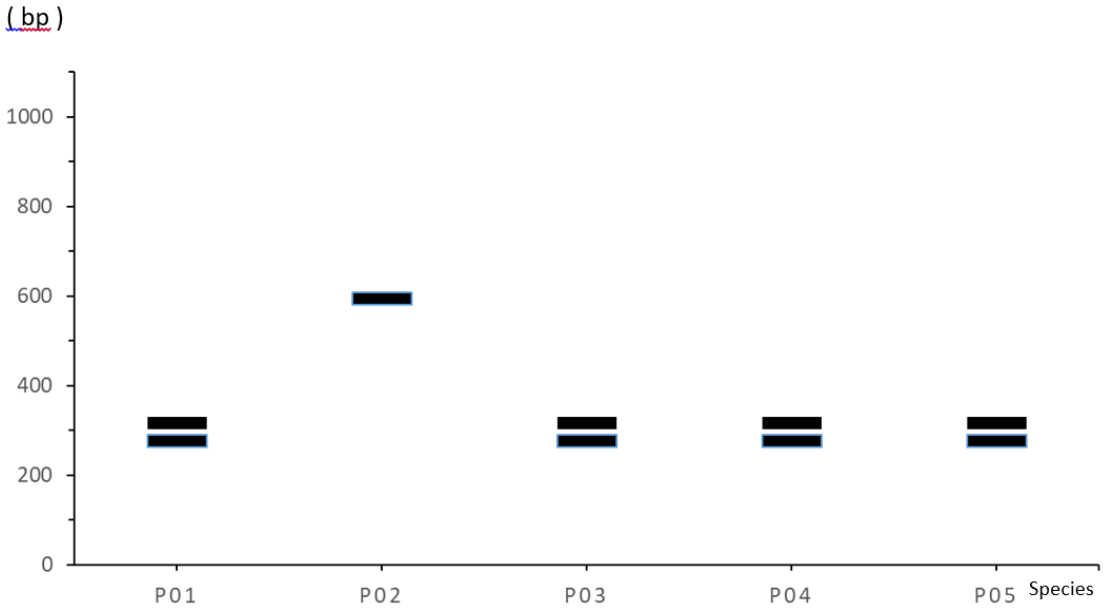
3. ยีนมาตราฐาน *rpo*B ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิดคือ กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ รองเท้านารีเกาะช้าง และรองเท้านารีคางกบคอแดง เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mn*lI พบว่า จะสามารถแยกกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (P02) ออกจากกล้วยไม้รองเท้านารีอื่น ๆ ได้ ซึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอจำนวน 2ชิ้น มีขนาดประมาณ 219 และ 310 คู่เบส ในขณะที่กล้วยไม้รองเท้านารีชนิดอื่นไม่มีจุดตัดของเนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนี้ ทกให้ได้ชิ้นดีเอ็นเพียง 1 ชิ้น ขนาดประมาณ 529 คู่เบส (ภาพที่ 4.27)



ภาพที่ 4.27 แผนที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีนมาตราฐาน *rpo*B ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mn*lI ขั้นตอนที่ 1 ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน
P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์
P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง
P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง
P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง

4. ยีนมาตราฐาน *rpo*C1 ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิดคือ กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ รองเท้านารีเกาะช้าง และรองเท้านารีคางกบคอแดง เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*XI พบว่า จะสามารถแยกกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (P02) ออกจากกล้วยไม้รองเท้านารีอื่น ๆ ได้ เนื่องจากกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกาญน์ไม่มีจุดตัดของเอนไซม์ชนิดนี้ จึงได้ชิ้นดีเอ็นเอจำนวน 1 ชิ้น มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส ในขณะที่กล้วยไม้รองเท้านารีชนิดอื่นๆ จะพบชิ้นดีเอ็นเอจำนสน 2 ชิ้น ขนาดประมาณ 213 และ 387 คู่เบส (ภาพที่ 4.27)



ภาพที่ 4.28 แผนที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีนมาตราฐาน *rpo*C1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*XI ในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน
P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์
P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง
P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง
P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง

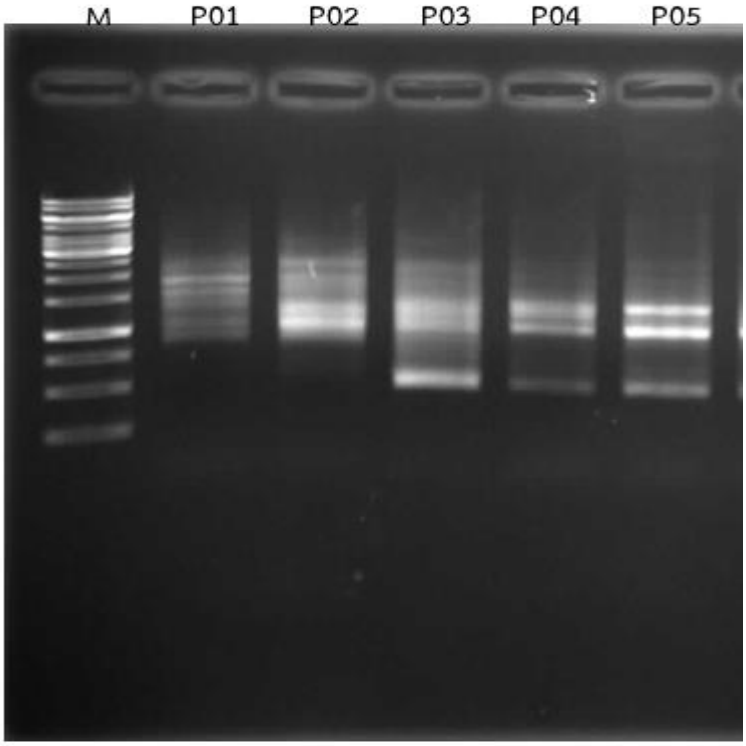
จากผลการทดลองการสร้างแผนที่ยีนมาตราฐานดังกล่าวด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่าอาจจังไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในกล้วยไม้รองเท้านารี เนื่องจากสาเหตุหลายประการ เช่น จุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะส่วนใหญ่จะคล้าย ๆ กัน หรือมีเหมือนกันทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอได้ และเอนไซม์ที่จะสามารถนำมาใช้สร้างแผนที่ได้ มักเป็นเอนไซม์ที่มีราคาสูง ซึ่งหากนำเทคนิคอื่นมาร่วมด้วย อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพได้ดีกว่านี้

<u>ส่วนที่ 4 วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลชนิด Start Codon Targeted (SCoT)</u>

ในส่วนของการพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์นั้น ได้ดัดแปลงเทคนิคการตรวจวิเคราะห์จาก Collard and Mackill. (2009) ดังนี้ นำดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีดังกล่าวปริมาณ 30-50 นาโนกรัม มาเพิ่มปริมาณเฉพาะส่วนที่สนใจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ใช้ไพร์เมอร์ SCoT (S1-S36) จำนวน 36 คู่ไพรเมอร์ (ภาพที่ 4.29-30) จากแผนภูมิพันธุกรรม (ภาพที่ 4.31) พบว่า แผนภูมิพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีนี้ แบ่งงอกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยมีค่า cophenetic correlation หรือค่า r – 0.99 ซึ่งซึ่งว่าเป็นการจัดกลุ่มที่ดีมาก ซึ่งกลุ่มที่ 1 ประกอบไปด้วยกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนและกล้วยไม้รองเท้านารีเหลือกาญจน์ และ กลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วยกล้วยไม้รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ รองเท้านารีเกาะช้างและรองเท้านารีคางกบคอแดง จะพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล SCoT นับเป็นเครื่องมือทีมีประสิทธิภาพมากในการจำแนกชนิดของพืช สอดคล้องกับ ธีระชัย ธนานันต์ (2560) ได้ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีด้วยเครื่องหมายสก๊อต โดยใช้ไพรเมอร์ 80 ชนิด ผลการวิจัยพบว่าไพรเมอร์ 17 ชนิด สามารถเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีทั้ง 15 ชนิดได้ และยังให้ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจน เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูป 219 แถบ เมื่อสร้าง แผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน ระหว่าง 0.7613 ถึง 0.3514 และสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีเป็น 3 กลุ่มซึ่งผลการวิจัยครั้ง นี้สามารถ นาไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมต่อไป

นฤมล ธนานันต์ (2560) การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลก้านก่อ 15 ชนิด ด้วยเครื่องหมายสก็อต โดยใช้ไพรเมอร์ 80 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 35 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดี เอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 21 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาวิเคราะห์และสร้างความหลากหลาย ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของกล้วยไม้สกุลก้านก่อทั้ง 15 ชนิด ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ กับพันธุ์ เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 พบว่าสามารถแบ่ง กล้วยไม้สกุลก้านก่อทั้ง 15 ชนิด เป็น 3 กลุ่ม มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.37 ถึง 0.64

จากภาพ 4.31 รองเท้านารีเกาะช้างแสดงการมีลักษณะทางพันธุกรรมเดียวกับรองเท้านารีคางกบคอแดง ซึ่งโดยตามธรรมชาติแล้ว รองเท้านารีเกาะช้างเป็นลูกผสมที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติระหว่างรองเท้านารีคางกบคอแดง และรองเท้านารีคางกบ ซึ่งพบว่ารองเท้านารีเกาะช้างเป็นลูกผสมที่พบได้ยากมาก และเป็นที่ต้องการของตลาดทำให้มีราคาแพงมาก ดังนั้นจึงทำให้มีการหลอกขายกล้วยไม้ชนิดนี้ในราคาที่สูง เนื่องจากหากกล้วยไม้ชนิดไม่ออกดอก จะเป็นการยากที่จะจำแนกออกจากรองเท้านารีคางกบคอแดงและรองเท้านารีคางกบ การใช้ลักษณะทางสัญฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ การสร้าง DNA barcoding เพื่อช่วยในการจำนวนจึงนับเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยจำแนกชชนิดและการอนุรักษ์พันธึกล้วยไม้ได้



ภาพที่ 4.29 ผลผลิตพีซีอาร์ของไพร์เมอร์ S19 จากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCoT บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

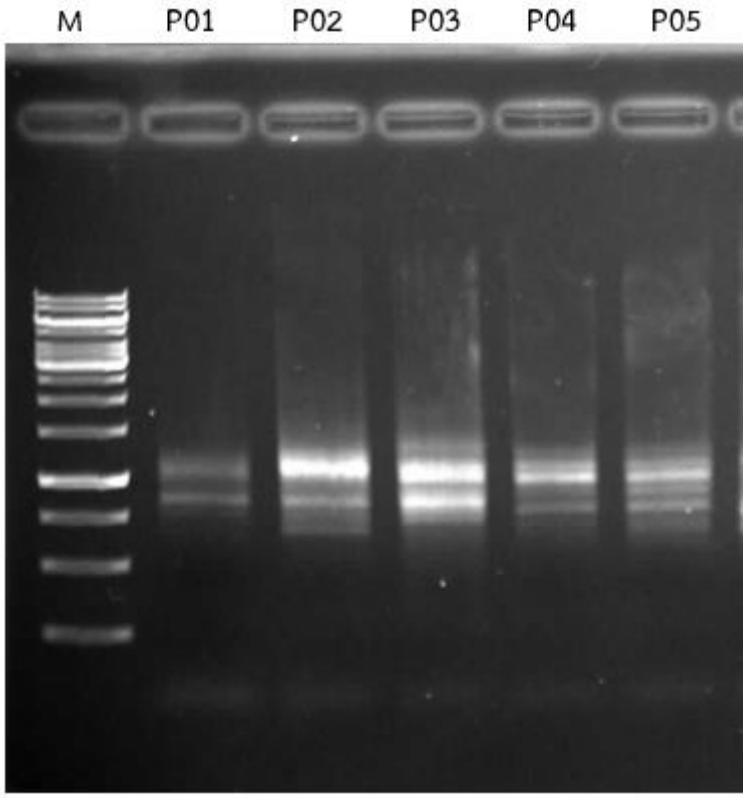
P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน

P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์

P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง

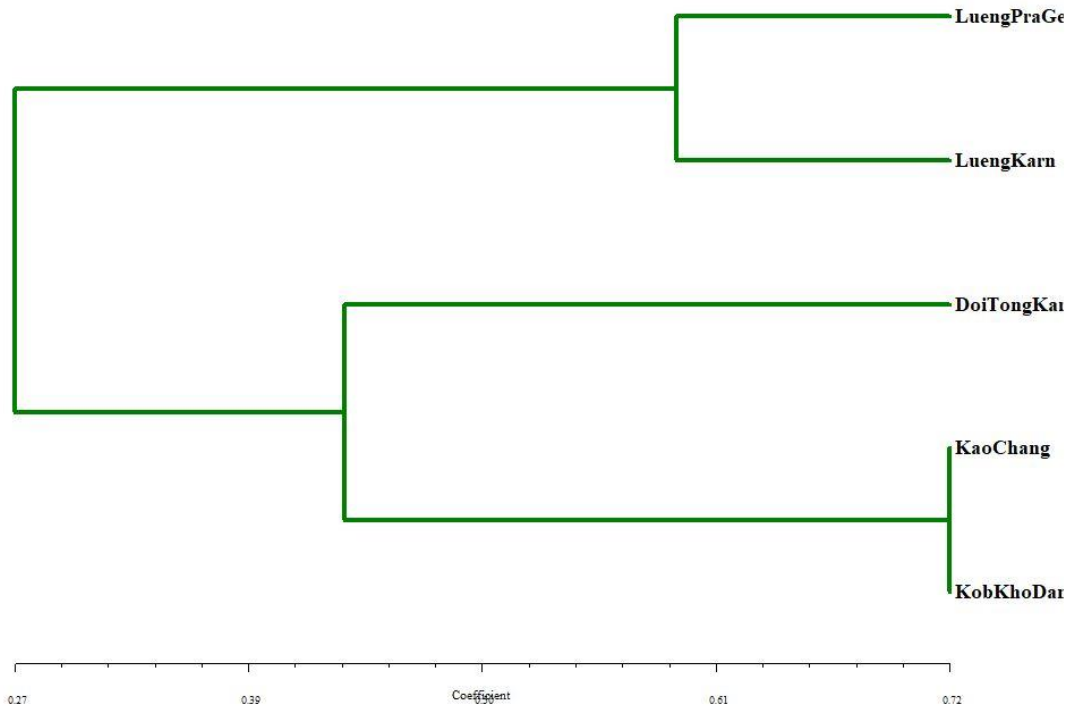
P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง

P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง



ภาพที่ 4.30 ผลผลิตพีซีอาร์ของไพร์เมอร์ S22 จากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCoT บนกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5 ชนิด

P01 คือ รองเท้านารีเหลืองปราจีน
P02 คือ รองเท้านารีเหลืองกาญจน์
P03 คือ รองเท้านารีดอยตุง
P04 คือ รองเท้านารีเกาะช้าง
P05 คือ รองเท้านารีคางกบคอแดง



ภาพที่ 4.31 แผนภูมิพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 5ชนิด เมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยใช้ UPGMA วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS 2.22c

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาวิจัย

ในการศึกษาวิจัยเรื่องการพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum* spp.) ในประเทศไทยจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor*), รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (*Paphiopedilum concolorvar.striatum*), รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ (*Paphiopedilum barbigerum var.vejvarutianum)*, รองเท้านารีเกาะช้าง (*Paphiopedilum simensis),* รองเท้านารีคางกอบคอแดง *(Paphiopedilum appletonianum*) ผลการศึกษา พบว่าสามารถสรุปได้ดังนี้

1. การศึกษา DNA barcoding ในกล้วยไม้รองเท้านารี พบว่า

1. ยีนมาตราฐาน *rbc*L ในรองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor*), รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (*Paphiopedilum concolorvar.striatum*), รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ (*Paphiopedilum barbigerum var.vejvarutianum)*, รองเท้านารีเกาะช้าง (*Paphiopedilum simensis),* รองเท้านารีคางกอบคอแดง *(Paphiopedilum appletonianum*) มีขนาด 726, 725, 723, 723 และ 723 คู่เบส ตามลำดับ (หรือประมาณ 720 คู่เบส)
2. ยีนมาตราฐาน *mat*K ในรองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor*), รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (*Paphiopedilum concolorvar.striatum*), รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ (*Paphiopedilum barbigerum var.vejvarutianum)*, รองเท้านารีเกาะช้าง (*Paphiopedilum simensis),* รองเท้านารีคางกอบคอแดง *(Paphiopedilum appletonianum*) มีขนาด 917, 917, 917, 917 และ 915 เบส ตามลำดับ (หรือประมาณ 900 คู่เบส)
3. ยีนมาตราฐาน *rpo*B ในหญ้าทะเล ในรองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor*), รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (*Paphiopedilum concolorvar.striatum*), รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ (*Paphiopedilum barbigerum var.vejvarutianum)*, รองเท้านารีเกาะช้าง (*Paphiopedilum simensis),* รองเท้านารีคางกอบคอแดง *(Paphiopedilum appletonianum*) มีขนาด 529, 530, 528, 528 และ 5298เบส ตามลำดับ (หรือประมาณ 520 คู่เบส)
4. ยีนมาตราฐาน *rpo*C1 ในรองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor*), รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (*Paphiopedilum concolorvar.striatum*), รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ (*Paphiopedilum barbigerum var.vejvarutianum)*, รองเท้านารีเกาะช้าง (*Paphiopedilum simensis),* รองเท้านารีคางกอบคอแดง *(Paphiopedilum appletonianum*) มีขนาด 596, 597, 600, 596 และ 595 เบสตามลำดับ (หรือประมาณ 600 คู่เบส)

2. การวิเคราะห์ความน่าจะเป็น DNA Barcoding ของยีนมาตราฐานในหญ้าทะเลด้วยโปรแกรม DNA Subway พบว่า ยีนมาตราฐาน *rbc*L และ *mat*K มีประสิทธิภาพในการนำมาสร้างเป็น DNA barcoding ที่จำเพาะต่อชนิดพันธุ์ของกล้วยไม้รองเท้านารี ส่วนยีนมาตราฐานชนิดอื่นคือ *rpo*B และ *rpo*C1 ยังมีประสิทธิภาพไม่เพียงพอ หากแต่ต้องใช้ร่วมกับยีนมาตราฐานชนิดอื่น จะสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดได้

3. การพัฒนาการสร้างแผนที่ตัดจำเพาะของยีนมาตราฐานด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่ายังไม่มีประสิทธิภาพมากพอ และมีค่าใช้จ่ายสูง

4. การสร้างแผนภูมิพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล SCoT พบว่ามีประสิทธิภาพ สามารถแยกกล้วยไม้แต่ละชนิดออกจากกันได้ และยังสามารถบ่งชี้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเกาะช้างและกล้วยไม้รองเท้านารีคางกบคอแดงได้อย่างถูกต้อง

เอกสารอ้างอิง

กรองทอง ใจแก้วแดง (2557) การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของต้นรักแกนมอในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมาย Start Codon Targeted (SCoT).คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร วารสารวนศาสตร์ 33 (2) : 19-27

จักพันธ์ วนิชกุล. 2558. กล้วยไม้รองเท้านารีในประเทศไทย Paphiopedilum spp. ออนไลน์ เข้าถึงได้จาก http://www.tonmai2u.com/topic%20paphiopedilum.html

นฤมล ธนานันต์ เกียรติชัย แซ่ไต่ และธีระชัย ธนานันต์. 2557. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตา หมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22(4): 523-530.

ทัศนีย์ สิงห์ศิลารักษ์ (2560) .การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจ าแนกทุเรียนด้วยเครื่องหมายสก๊อต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ศูนย์รังสิต.Thai Journal of Science and Technology : 213-222

พรรษา มนต์แข็ง, อรุณรัตน์ ฉวีราช, ธวัดชัย ธานี และ รุ่งลาวัลย์ สุดมูล. 2556. ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดสมุนไพรแปรรูปสกุลขี้เหล็ก (*Senna*). ว. มข. (บศ.) 13(2): 18-30

วุฒิพร มหาคำ. (2554) DNA barcodind ของพืช: หลักการพื้นฐานการประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด. ว.พฤกษาศาสตร์ไทย 3(1): หน้า 1-30

อุไร จิรมงคลการ. 2549. กล้วยไม้รองเท้านารี. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์บ้านและสวน สายธุรกิจโรงพิมพ์ บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน)

CBOL Plant working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 106: 12794-12797.

Collard, B. C. Y. and D. J. Mackil. 2009. Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A Simple, Novel DNA Marker Technique for Generating Gene-Targeted Markers in Plants. Plant Mol Biol Rep. 27(1): 86-93

Cuénoud, P., V. Savolainen, L. W. Chatrou, M. Powell, R. J. Grayer and M. W. Chase. 2002. Molecular phylogenetics of caryophyllales based on nuclear 18S rDNA and plastid *rbcL, atpB,* and *matK* DNA sequences. *Am. J. Bot*., **89**, 132–144.

de Groot G.A., H.J. During, J.W. Maas and H. Schneider. 2011. Use of *rbc*L and *trn*L-F as a two-locus DNA barcode for identification of NW-European ferns: an ecological perspective. PLoS One 6: e16371.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-14.Fay, M. F., S. M. Swensen and M. W. Chase. 1997. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). *Kew Bull.*, **52**, 111–120.

Farris, J.S. 1969. On the cophenetic correlation coefficient. Syst. Biolo. 18(3): 279-285.

Hebert, P. D. N., Aี Cywinska, S. L. Ball and J.R. deWaard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B 270: 313-321.

Kress, W. J. and D.L. Erickson. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: The coding *rbcL* gene complements the noncoding *trnH–psbA* spacer region. *PLoS ONE,* **2**, e508.

Lucas C., T. Thangaradjou and J. Papenbrock. 2012. Development of a DNA Barcoding System for Seagrasses: Successful but Not Simple. PLoS ONE 7(1): e29987.

Nei, M. & Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Science, Washington, 76**:**5269-5273.

Parveen I., H.K. Singh , S. Raghuvanshi , U.C. Pradhan and S.B. Babbar . 2012. DNA barcoding of endangered Indian Paphiopedilum species. Mol Ecol Resour. 2012 Jan; 12(1): 82-90.

Saunders, G.W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. Phil. Trans. R. Soc. B. 360, 1879–1888.

Tate, J. A. and B. B. Simpson.2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Syst. Bot*., 28, 723–737.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocol: A guide to methods and applications. Academic Press, pp. 315-322.

ภาคผนวก

รายงานสรุปการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) - สัญญาเลขที่ 8/2559 โครงการวิจัย ประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) เพิ่มเติม อพ.สธ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ การพัฒนาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum* spp.) ในประเทศไทย

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร.ปัทมา ศรีน้ำเงิน

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 31 มีนาคม 2559 ถึงวันที่ 15 กันยายน 2562

ระยะเวลาดำเนินการ.....3.....ปี ....6..... เดือน ตั้งแต่วันที่ 31 มีนาคม 2559

<u>รายรับ</u>

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 142,500 บาท เมื่อที่ 3 มีนาคม พ.ศ. 2559

งวดที่ 2 (40%) 114,000 บาท เมื่อวันที่ 5 มกราคม พ.ศ. 2560

งวดที่ 3 (10%) ..... บาท เมื่อวัน เดือน ปี.....

รวม 285,000 (สองแสนแปดหมื่นห้าพันบาทถ้วน)

<u>รายจ่าย</u>

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/เกิน
1.ค่าตอบแทน	24,000	24,000	0
2.ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย	72,000	72,000	0
3. ค่าวัสดุ	90,500	90,500	0
4. ค่าใช้สอย	70,000	70,000	0
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ -ค่าธรรมเนียมอุดหนุนสถาบัน	28,500	28,500	0
รวม	285,000	285,000	0

(.....ดร.ปัทมา ศรีน้ำเงิน.....)

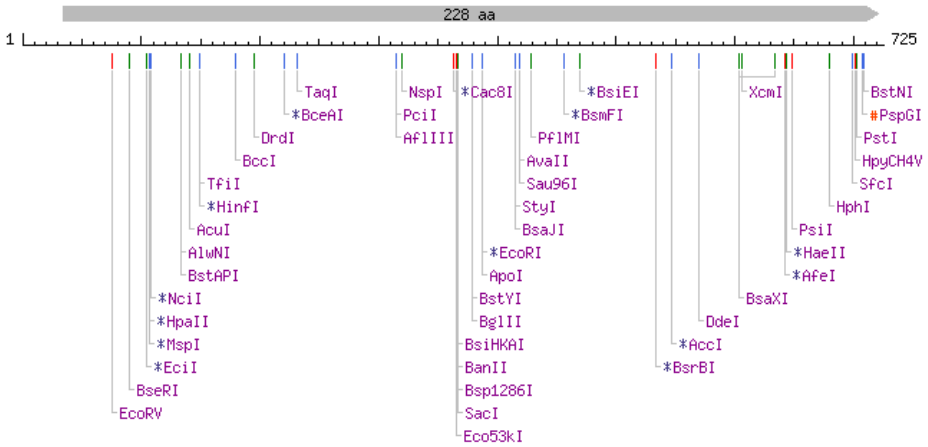
หัวหน้าโครงการวิจัย

ภาคผนวกที่ 2 ตำแหน่งการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ยีนมาตราฐาน *rbc*L

Linear Sequence: Pragene

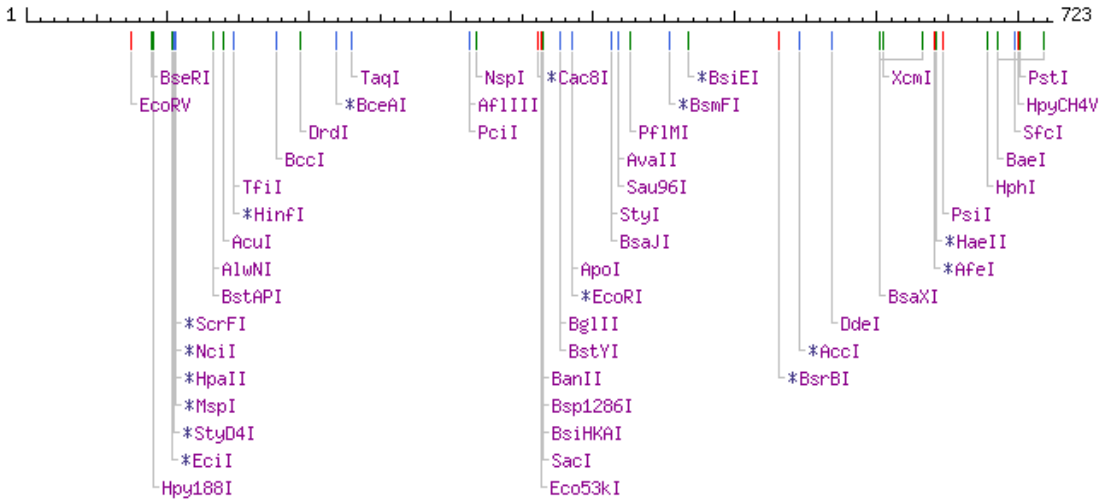
Linear Sequence: LungKarn



Linear Sequence: DoiTungKarn

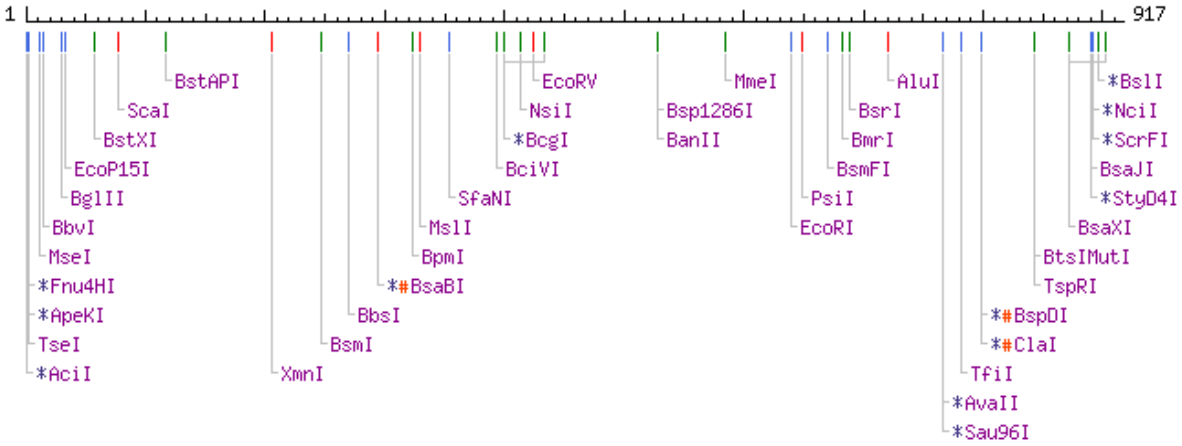
Linear Sequence: KhoChang

Linear Sequence: KahDang

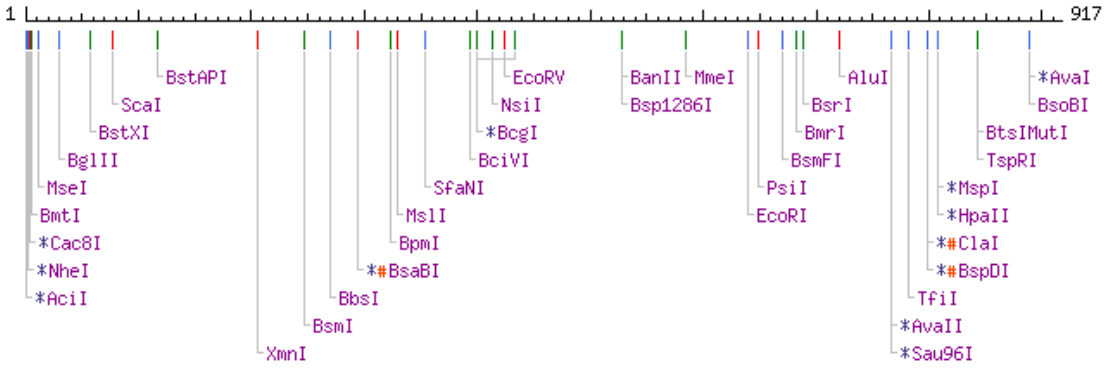


ยีนมาตราฐาน *mat*K

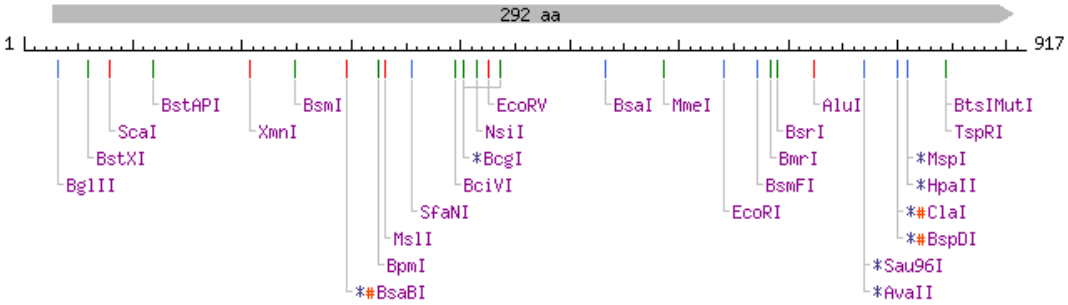
Linear Sequence: PraGene-MatK



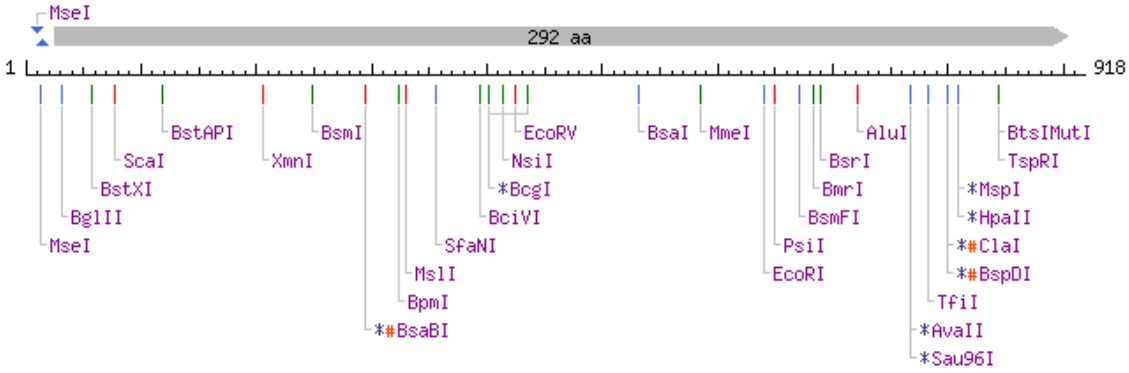
Linear Sequence: LungKarn-MatK



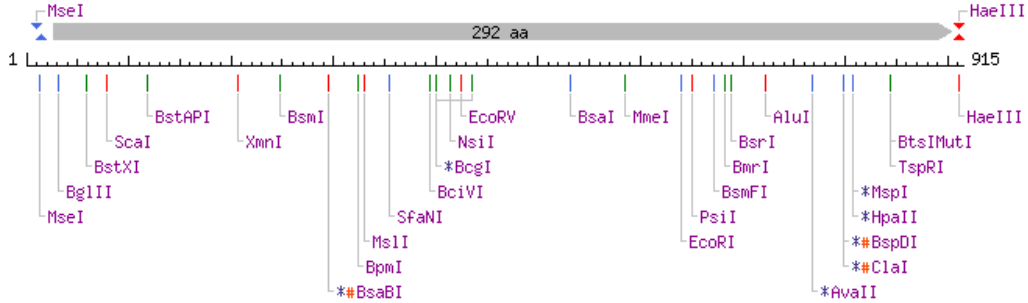
Linear Sequence: DoiTungKarn-matK



Linear Sequence: KhoChang-matK

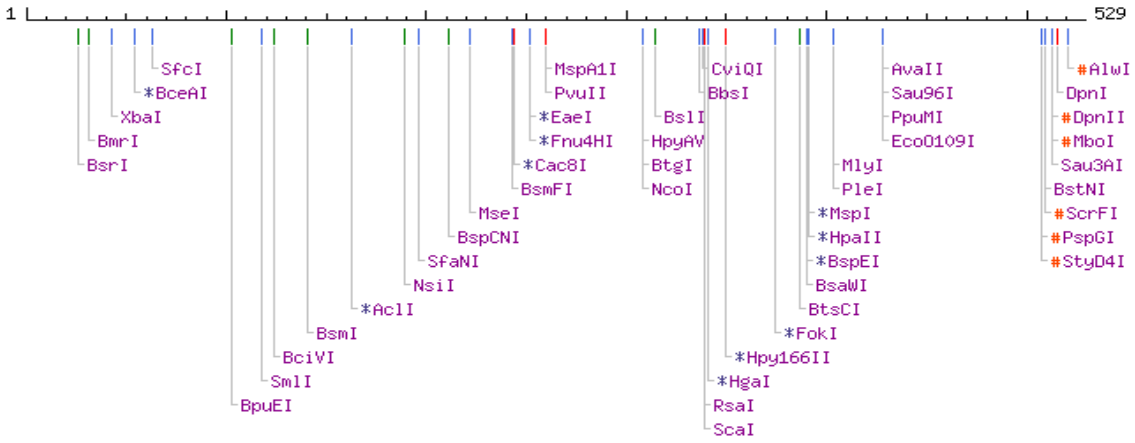


Linear Sequence: KobKodang-matK

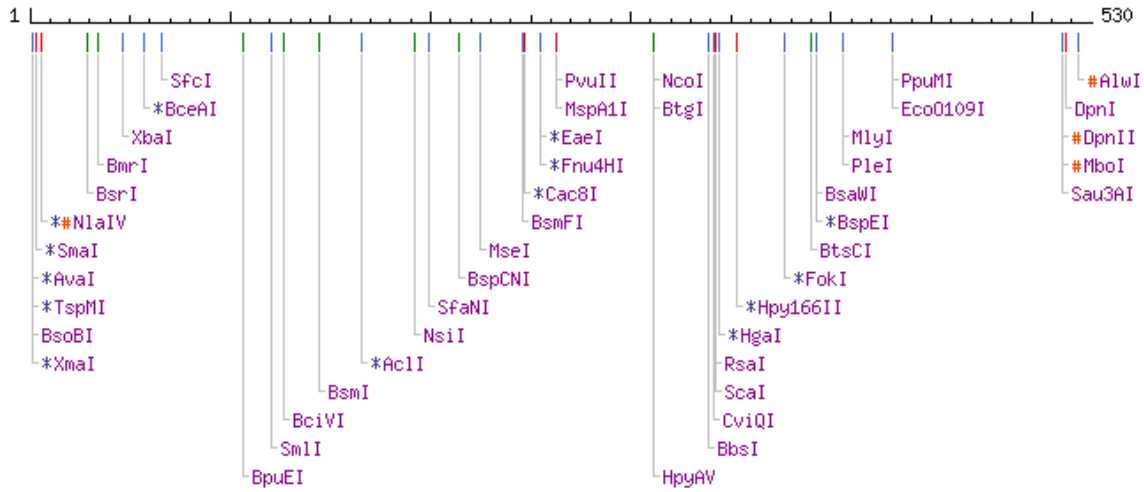


ยีนมาตราฐาน *rpo*B

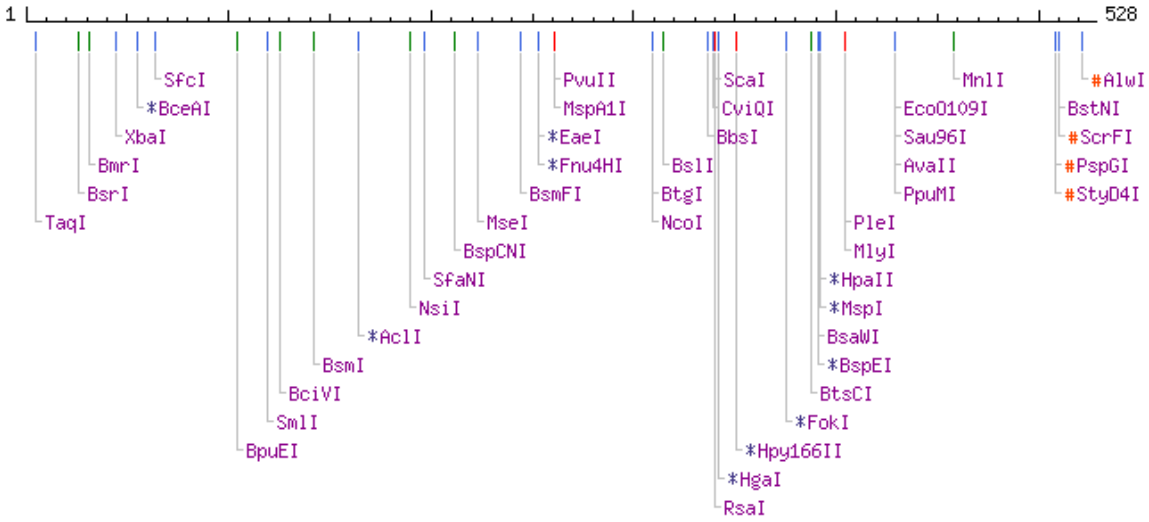
Linear Sequence: PraGene-rpoB



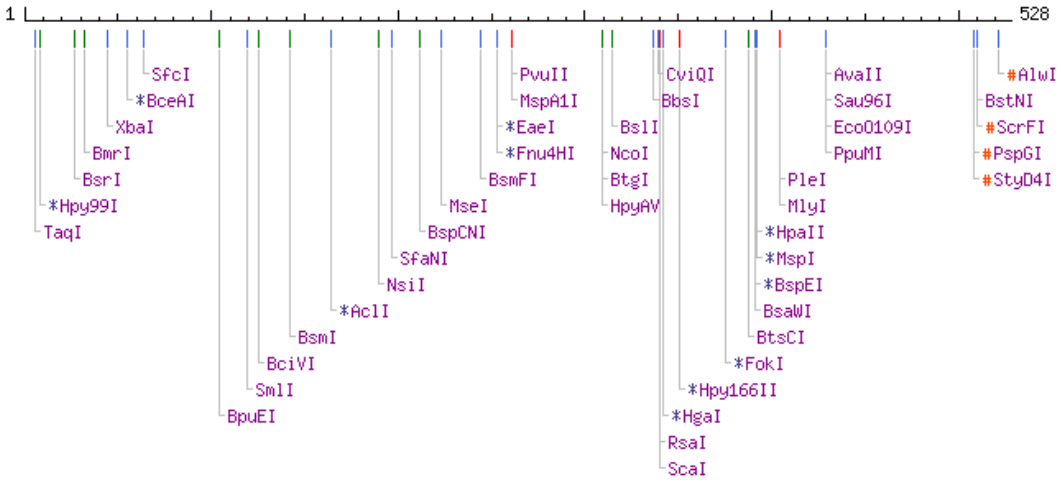
Linear Sequence: LungKarn-rpoB



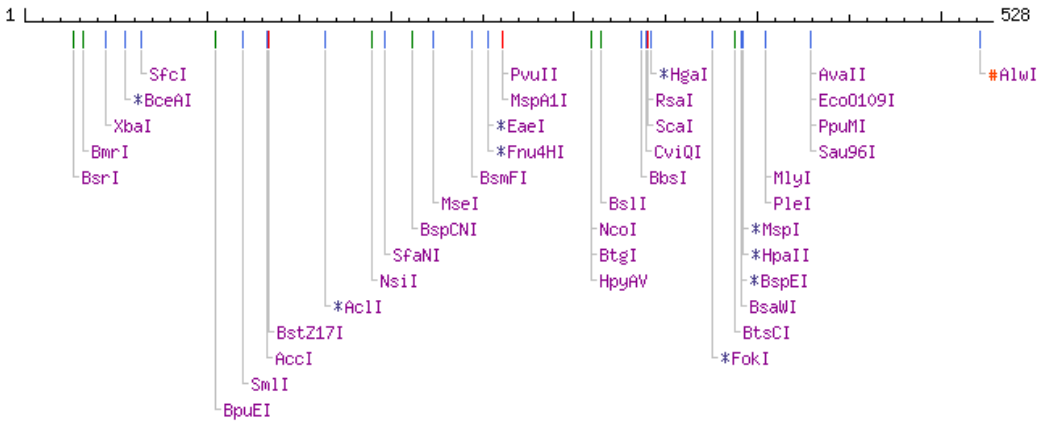
Linear Sequence: DoiTungKarn-rpoB



Linear Sequence: KhoChang-rpoB

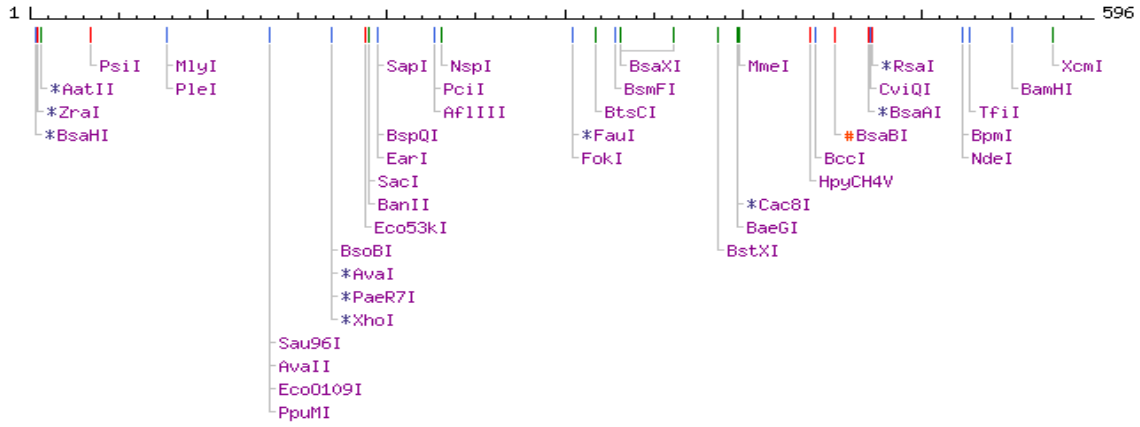


Linear Sequence: KobKodang-rpoB

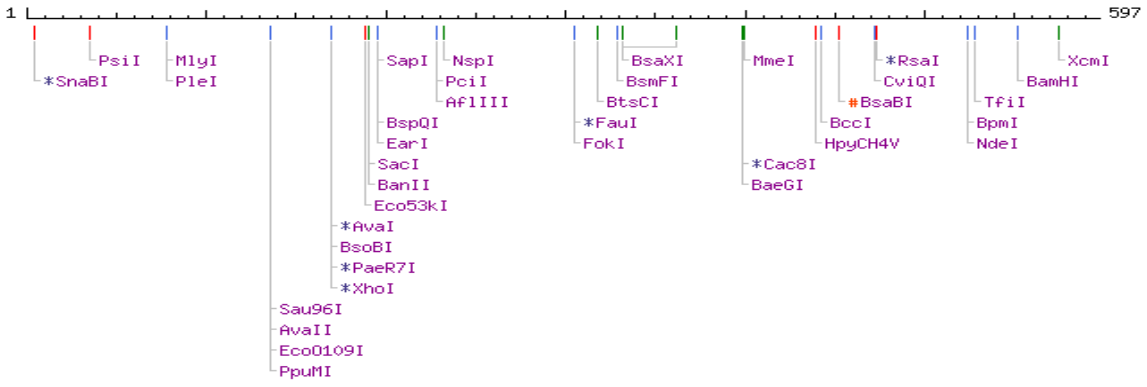


ยีนมาตราฐาน *rpo*C1

Linear Sequence: PraGene-rpoC1



Linear Sequence: LungKarn-rpoC1



Linear Sequence: DoiTungKarn-rpoC1

Linear Sequence: KhoChang-rpoC1

Linear Sequence: KobKodang-rpoC1