

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและประสิทธิภาพของยีน *rbcl* ในการจัดจำแนกกล้วยไม้ไทย จากแหล่งอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิด

Genetic Relationship and Classification Efficiency of *rbcl* Gene in Thai Orchids from *Ex-Situ* Conservation

ประดิษฐ์ ทองแถม ณ อยุธยา* กุลทีราณัฐ พูลแก้ว ปณาลี ทวีสุข วรารัตน์ ง่วนชู และ วุฒิชัย ฤทธิ

Pradipunt Thongtam na Ayudhaya*, Kulteeranut Poonkeaw, Panalee Taweek, Varangrat Nguanchoo and Wuttichai Ritti

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ตำบลนาวัน อำเภอมือง จังหวัดเพชรบุรี 76000

Biology Division, Faculty of Science and Technology, Phetchaburi Rajabhat University, Nawung, Muang, Phetchaburi, 76000

*Corresponding author; E-mail: pradipunt.t@gmail.com

Received: 10 March 2022 /Revised: 11 April 2022/Accepted: 23 May 2022

บทคัดย่อ

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากมีความสวยงามและความหลากหลายของสายพันธุ์สูง จึงจำเป็นต้องมีการจำแนกสายพันธุ์กล้วยไม้แต่ละชนิดออกจากกันได้อย่างถูกต้อง ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้หายากด้วยลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcl* สำหรับนำไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายบาร์โค้ดดีเอ็นเอเพื่อบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์กล้วยไม้หายากได้ถูกต้อง โดยรวบรวมสายพันธุ์กล้วยไม้หายากที่ปลูกไว้ที่แหล่งอนุรักษ์นอกถิ่น ณ หน่วยวิจัยชีววิทยาพืช มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ผลวิจัยพบว่าการนำดีเอ็นเอของกล้วยไม้หายากจำนวน 30 ชนิด ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbcl* ในบริเวณส่วนหน้าของยีน ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อนำดีเอ็นเอไปตรวจสอบและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ามีลำดับดีเอ็นเอของกล้วยไม้จำนวน 9 ชนิด ที่ยังไม่เคยมีรายงานลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcl* ในบริเวณนี้ ส่วนยีน *rbcl* ในกล้วยไม้ชนิดอื่นที่เคยมีรายงานแล้วนั้น พบว่ามีลำดับดีเอ็นเอที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีความเหมือนกับลำดับในฐานข้อมูลไม่ต่ำกว่าร้อยละ 94 และมีลำดับตำแหน่งสลับ 92 ตำแหน่ง แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากบริเวณส่วนต้นยีน *rbcl* ขนาดประมาณ 600 คู่เบส สามารถจัดกลุ่มของกล้วยไม้ในระดับเผ่าได้อย่างถูกต้อง สามารถจำแนกกล้วยไม้ไทยได้อย่างน้อย 30 ชนิด และคาดว่าจะสามารถนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปได้ในอนาคต

คำสำคัญ: ยีน *rbcl* กล้วยไม้ แหล่งอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิด แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

Abstract

Orchid is one of the most important flowering plants in Thailand, despite the splendor and variety of species are great. Hence, it is essential to classify and identify the orchid species. In this research, the genetic relationship and identification of rare Thai orchid species were performed via the *rbcL* nucleotide sequences. These sequences were applied as DNA barcoding to indicate the differentiation of orchid species. Rare Thai orchid species were collected from an *ex-situ* conservation at Plant Biology Research Unit, Phetchaburi Rajabhat University. The 5' coding fragments of *rbcL* gene were amplified with the polymerase chain reaction. The nucleotide sequences were examined and compared with the GenBank database, the phylogenetic tree was constructed. The results showed that the approximately 600 base pairs of *rbcL* sequences from 9 orchid species had been newly deposited on the GenBank database while the remaining sequences revealed the similarity over 94% and the SNP haplotype is 92 positions. The partial 5' coding fragments *rbcL* gene sequences have the efficiency to clustering orchids at tribe level and identify at least 30 Thai orchid species and will be used in further study.

Keywords: *rbcL* gene, Orchid, Ex situ conservation, Phylogenetic tree

บทนำ

กล้วยไม้เป็นพืชดอกที่มีจำนวนชนิดมากและมีรายงานพบไม่น้อยกว่า 25,000 ชนิด ในประเทศไทยกล้วยไม้จัดเป็นพืชวงศ์ที่ใหญ่ที่สุด นักพฤกษศาสตร์ตรวจสอบชื่อถูกต้องแล้ว มีจำนวน 180 ถึง 190 สกุล และ 1,300 ชนิด กระจายอยู่ทั่วประเทศ¹ เนื่องจากประเทศไทยตั้งอยู่บริเวณเส้นศูนย์สูตร มีสภาพภูมิอากาศแบบเขตร้อน จึงมีความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกล้วยไม้ แต่ปัจจุบันความสมดุลของธรรมชาติเริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่เสื่อมโทรมอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะป่าและพรรณพืชโดนคุกคามอย่างหนักทั้งจากมนุษย์และจากภัยธรรมชาติ ประกอบกับการลักลอบเก็บกล้วยไม้ออกจากแหล่งธรรมชาติมากขึ้นยากที่จะฟื้นคืนได้ ซึ่งกล้วยไม้หลายชนิดตกอยู่

สภาพใกล้สูญพันธุ์² อีกทั้งการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐาน (Morphology) ทำได้ค่อนข้างยากและอาจเกิดความผิดพลาดได้เมื่อพิจารณาเพียงลักษณะที่ปรากฏ ทั้งนี้อิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องทำให้ผลการจำแนกไม่เป็นไปตามลักษณะพันธุกรรมที่แท้จริง ซึ่งจำเป็นต้องใช้ผู้ที่มีความเชี่ยวชาญและประสบการณ์ นอกจากนี้การจำแนกชนิดของกล้วยไม้อาศัยลักษณะสัณฐานของดอกเป็นส่วนใหญ่แต่ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากดอกของกล้วยไม้บางชนิดใช้เวลาในการออกดอกนานหรือมีจำนวนน้อย ซึ่งการใช้ลักษณะสัณฐานอื่น ๆ เพียงอย่างเดียว เช่น ดอก ใบ หรือ ลำต้น อาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ง่าย การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) จึงเข้ามามีบทบาทในการช่วยจำแนก ซึ่งในงานทดลองนี้ใช้ลำดับดีเอ็นเอสายสั้นที่เรียกว่า บาร์โค้ดดีเอ็นเอ (DNA



Barcode) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณจากปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอร์เชน (Polymerase Chain Reaction) ในการจัดจำแนก

บาร์โค้ดดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) เป็นวิธีการที่ระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ ซึ่งได้เข้ามามีบทบาทในงานด้านพันธุศาสตร์ เนื่องจากการจัดกลุ่มหรือการจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาทำได้ยาก โดยเฉพาะพืชซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน³ จึงทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์พืชบางชนิดที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรม การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์พืช (Varietal identification) ได้เข้ามาช่วยในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ให้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น โดยการใช้ลำดับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการทราบชนิดมาเปรียบเทียบกับลำดับดีเอ็นเอที่ทราบชนิดแล้ว^{4, 5} Consortium for the Barcode of Life (CBOL) เสนอว่าขึ้นดีเอ็นเอตำแหน่งจำเพาะ (Specific site) เหมาะสำหรับการระบุชนิดพืชโดยตำแหน่งที่เหมาะสมคือขึ้นดีเอ็นเอคลอโรพลาสต์ (Chloroplast) และได้เสนอตำแหน่งมาตรฐาน 2 ยีน คือ ยีน *matK* และ *rbcL*⁶ ซึ่งงานวิจัยนี้ได้เลือกศึกษายีนในคลอโรพลาสต์ ได้แก่ ยีน *rbcL* ซึ่งไม่มีอินตรอน (Intron) โดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 1,400 คู่เบส เป็นยีนกำหนดการ สร้างหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (Large subunit) ของเอนไซม์ ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) ซึ่งมีหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการรวมตัวของ RuBP กับ CO₂ ในวัฏจักรคัลวิน⁷ ซึ่งองค์กร CBOL เสนอว่ายีน *rbcL* เหมาะสมต่อการใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard) มาก

ที่สุด เนื่องจากมีวิวัฒนาการของดีเอ็นเอและอัตราการแทนที่ของดีเอ็นเอค่อนข้างสูง จึงทำให้มีประสิทธิภาพในการจำแนกและหาวิวัฒนาการของพืชได้ โดยยีน *rbcL* นี้มีประสิทธิภาพ ในการจำแนกพืชได้หลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น กาแฟ⁸ ว่านน้ำทอง⁹ ตีนตุ๊กแก¹⁰ เป็นต้น

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกกล้วยไม้ไทยด้วยลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* รวมไปถึงความสอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับกล้วยไม้เพื่อการตรวจสอบชนิดของกล้วยไม้หายาก รวมถึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวางแผนอนุรักษ์กล้วยไม้หายากในประเทศไทย อีกทั้งยังนำไปใช้เป็นฐานข้อมูลดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการอ้างอิงสายพันธุ์และเปรียบเทียบกับกล้วยไม้สายพันธุ์ต่างประเทศ

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างกล้วยไม้

ชนิดพืชที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เป็นกล้วยไม้ป่า ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในวงศ์ Orchidaceae ที่มีการปลูกอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิดที่สามารถระบุชนิดได้อย่างแน่ชัด ณ หน่วยวิจัยชีววิทยาพืช มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี จำนวน 30 ชนิด ได้แก่ (1) กุหลาบกระเปาะเปิด (*Aerides falcata* Lindl. & Paxton) (2) เชื้องเข็มแดง (*Ascocentrum curvifolium* Lindl.) (3) สิงโตกำมู่ใบใหญ่ (*Bulbophyllum macranthum* Lindl.) (4) สิงโตฟันจักร (*Bulbophyllum dentiferum* Ridl.) (5) สิงโตนักกล่อม (*Bulbophyllum lasiochilum* E.C.Parish & Rchb.f.) (6) สิงโตงาม (*Bulbophyllum*



affine Wall. ex Lindl.) (7) เอื้องมัน (*Coelogyne cumingii* Lindl.) (8) กระร่ำกระร่อน (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw.) (9) กระร่ำกระร่อนปากเปิด (*Cymbidium finlaysonianum* Lindl.) (10) เอื้องผึ้ง (*Dendrobium lindleyi* Steud.) (11) เอื้องกระเจี๊ยบ (*Dendrobium amplum* Lindl.) (12) เหลืองจันทบูร (*Dendrobium friedericksianum* Rchb.f.) (13) เอื้องสายม่านพระอินทร์ (*Dendrobium devonianum* Paxton) (14) เอื้องเงินหลวง (*Dendrobium formosum* Roxb. ex Lindl.) (15) เอื้องแปรงสีฟัน (*Dendrobium secundum* (Blume) Lindl. ex Wall.) (16) เอื้องทอง (*Dendrobium ellipsophyllum* Tang & F.T.Wang) (17) เพชรหึง (*Grammatophyllum speciosum* Blume) (18) เอื้องกาบดอก (*Pholidota imbricata* Lindl.) (19) เอื้องลำต้อ (*Pholidota articulata* Lindl.) (20) ช้างกระ (*Rhynchostylis gigantea* Ridl.) (21) เขาแกะ (*Rhynchostylis coelestis* A.H.Kent) (22) ไอยเรศ (*Rhynchostylis retusa* Blume) (23) สามปอยขุนตาล (*Vanda denisoniana* Benson & Rchb.f.) (24) เอื้องมะลิ (*Dendrobium crumenatum* Swartz) (25) เอื้องปีกไก่ใหญ่ (*Agrostophyllum planicaule* Rchb.f.) (26) หมวกลิง (*Eulophia andamanensis* Rchb.f.) (27) เถาญเขียว (*Vanilla aphylla* Blume) (28) เอื้องสายล่องแล่ง (*Dendrobium aphyllum* C.E.C. Fisch.) (29) เอื้องกุหลาบแดง (*Aerides crassifolia* C.S.P.Parish ex Burb.) และ (30) เอื้องหนวดพราหมณ์ (*Seidenfadenia mitrata* (Rchb.f.) Garay)

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ทั้ง 30 ชนิด โดยนำตัวอย่างจากใบกล้วยไม้ตัดเป็นชิ้นเล็กขนาด

ประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร จากนั้นสกัดแยกด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle and Doyle (1978)¹¹ ทำการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (Agarose) ความเข้มข้น 1% และหาความบริสุทธิ์โดยการคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร¹²

การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbcL*

นำดีเอ็นเอกล้วยไม้ที่ผ่านการสกัดแยกดีเอ็นเอทั้ง 30 ชนิด มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (T-100 Thermal Cycler, สหรัฐอเมริกา) โดยใช้ดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม ใน PCR master mix 2 เท่า (Biotech rabbit, เยอรมนี) และใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *rbcL* (5' ATGTCACCACAAACAGAAAC 3')¹³ กับ 5'CTTCACAAGCAGCAGCTAGTTC 3')¹⁴ ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1 ไมโครโมลาร์ ให้มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *rbcL* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาทีจำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 50 วินาที จำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นนำมาตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1%

การวิเคราะห์ผล

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณขึ้นส่วนยีน *rbcL* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ทำให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์โดยการตัดและสกัดแถบดีเอ็นเอออกจากเจล ตรวจลำดับดีเอ็นเอโดยผู้ให้บริการ (Bionics, เกาหลีใต้) จากนั้นทำการแก้ไขข้อมูลลำดับดีเอ็นเอให้ถูกต้องและนำไปฝากไว้บนฐานข้อมูล GenBank ผ่านทาง DDBJ (DNA Data Bank of Japan) ลำดับดีเอ็นเอของกล้วยไม้ทั้ง 30 ชนิด ได้ถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อหารูปแบบสลับ (SNP haplotype) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วย โมเดล Jukes-Cantor Gamma ในการจัดกลุ่มแบบ Maximum-Likelihood และสุ่มข้อมูลซ้ำแบบ Bootstrap 1,000 ครั้งโดยใช้โปรแกรม MEGA 7.0¹⁵

ผลการวิจัย

จากการเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณในกล้วยไม้ไทยได้ทั้ง 30 ชนิด และเมื่อทำการ

ตรวจสอบขนาดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 คู่เบส (Figure 1) เมื่อนำไปวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ (260/280) พบว่าดีเอ็นเอของกล้วยไม้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.8-2.4 ไมโครกรัม และมีความบริสุทธิ์ที่ 1.7-2.1 เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* กับลำดับดีเอ็นเอบนฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI พบว่าลำดับดีเอ็นเอที่ได้นี้มีลำดับดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ 9 ชนิดยังไม่ปรากฏบนฐานข้อมูล GenBank ส่วนในลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ของกล้วยไม้ที่เหลือทั้ง 21 ชนิดที่มีในฐานข้อมูลนั้นมีความเหมือนไม่น้อยกว่าร้อยละ 94 จึงได้ทำการฝากเก็บลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* จากกล้วยไม้ทั้ง 30 ชนิด และได้หมายเลขเฉพาะ (Accession number) แสดงใน (Table 1) นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์หารูปแบบสลับ (SNP haplotype) ซึ่งพบตำแหน่งที่เกิดสลับขึ้นจำนวน 92 ตำแหน่ง ดังแสดงใน (Figure 2)

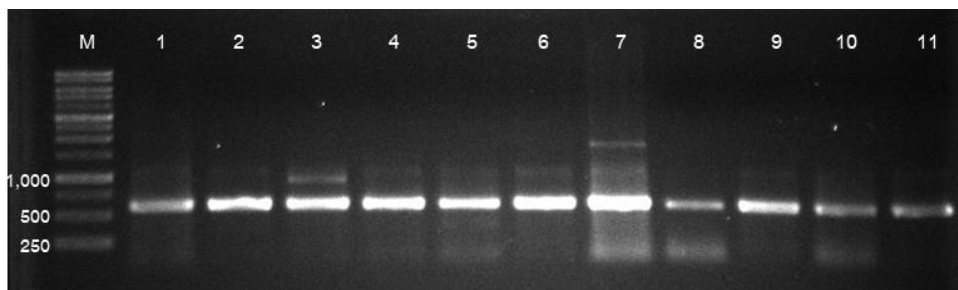


Figure 1. Some of 600 base pairs gel electrophoresis of *rbcL* gene from *A. falcata* (1), *B. macranthum* (2), *B. lasiochilum* (3), *C. aloifolium* (4), *D. lindleyi* (5), *D. friedericksianum* (6), *D. devonianum* (7), *D. ellipsophyllum* (8), *G. speciosum* (9), *R. gigantea* (10) and *V. aphylla* (11). M: 1 kb ladder.

Table 1. Accession number of orchid species in the present experiment and matching with the GenBank database.

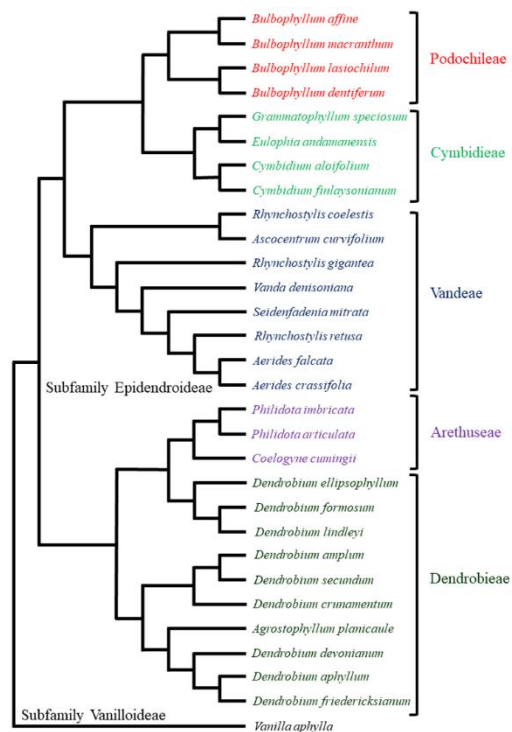
Table 1.Orchid species	Accession number	Database matching (%)	Accession number
<i>Aerides falcata</i> Lindl. & Paxton	LC670752	Not available in GenBank	-
<i>Ascocentrum curvifolium</i> Lindl.	LC670742	<i>Ascocentrum curvifolium</i> (99.62)	JX876893
<i>Bulbophyllum macranthum</i> Lindl.	LC670743	<i>Bulbophyllum macranthum</i> (100)	KT884993
<i>Bulbophyllum dentiferum</i> Ridl.	LC670744	Not available in GenBank	-
<i>Bulbophyllum lasiochilum</i> E.C.Parish & Rchb.f.	LC670738	Not available in GenBank	-
<i>Bulbophyllum affine</i> Wall. ex Lindl.	LC670741	<i>Bulbophyllum affine</i> (99.84)	KJ462098
<i>Coelogyne cumingii</i> Lindl.	LC670726	<i>Coelogyne cumingii</i> (99.46)	MN400414
<i>Cymbidium aloifolium</i> (L.) Sw.	LC670745	<i>Cymbidium aloifolium</i> (97.30)	MN641752
<i>Cymbidium finlaysonianum</i> Lindl.	LC670754	Not available in GenBank	-
<i>Dendrobium lindleyi</i> Steud.	LC670737	<i>Dendrobium lindleyi</i> (99.46)	HM055117
<i>Dendrobium amplum</i> Lindl.	LC670733	<i>Dendrobium amplum</i> (99.82)	JN005429
<i>Dendrobium friedericksianum</i> Rchb.f.	LC670756	Not available in GenBank	-
<i>Dendrobium devonianum</i> Paxton	LC670730	<i>Dendrobium devonianum</i> (99.61)	LC317045
<i>Dendrobium formosum</i> Roxb. ex Lindl.	LC670731	<i>Dendrobium formosum</i> (99.82)	KP762095
<i>Dendrobium secundum</i> (Blume) Lindl. ex Wall.	LC670740	Not available in GenBank	-
<i>Dendrobium ellipsophyllum</i> Tang & F.T.Wang	LC670746	<i>Dendrobium ellipsophyllum</i> (100)	KP762100
<i>Grammatophyllum speciosum</i> Blume	LC670724	<i>Grammatophyllum speciosum</i>	AF074176
<i>Pholidota imbricata</i> Lindl.	LC670736	(99.10)	MN398392
<i>Pholidota articulata</i> Lindl.	LC670747	<i>Pholidota imbricata</i> (99.46)	NC050859
<i>Rhynchostylis gigantea</i> Ridl.	LC670749	<i>Pholidota articulata</i> (100)	JX134498
<i>Rhynchostylis coelestis</i> A.H.Kent	LC670725	<i>Rhynchostylis gigantea</i> (96.98)	JX134500
<i>Rhynchostylis retusa</i> Blume	LC670748	<i>Rhynchostylis coelestis</i> (95.69)	MT919284
<i>Vanda denisoniana</i> Benson & Rchb.f.	LC670727	<i>Rhynchostylis retusa</i> (97.50)	JQ180386
<i>Dendrobium crumenatum</i> Swartz	LC670732	<i>Vanda denisoniana</i> (94.30)	JF713166
<i>Agrostophyllum planicaule</i> Rchb.f.	LC670734	<i>Dendrobium crumenatum</i> (99.64)	-
<i>Eulophia andamanensis</i> Rchb.f.	LC670751	Not available in GenBank	-
<i>Vanilla aphylla</i> Blume	LC670750	Not available in GenBank	AF074238
<i>Dendrobium aphyllum</i> C.E.C. Fisch.	LC670739	<i>Vanilla aphylla</i> (100)	LC192953
<i>Aerides crassifolia</i> C.S.P.Parish ex Burb.	LC670753	<i>Dendrobium aphyllum</i> (99.68)	-
<i>Seidenfadenia mitrata</i> Rchb.f.	LC670755	Not available in GenBank	-
		Not available in GenBank	

Orchid species	SNP haplotype
<i>Aerides falcata</i>	ATCTGTTCTAGTATTTCACCGGCAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Aerides crassifolia</i>	ATCTGTTCTAGTATTTCACCGGCAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Vanda curvifolia</i>	ATCTGGGCTGTTGATTTTACCGGCGGAAGGCGATGATGATCCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Bulbophyllum macranthum</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Bulbophyllum dentiferum</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Bulbophyllum lasiochilum</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Bulbophyllum affine</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Coelogyne cumingii</i>	AGGCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Cymbidium alofolium</i>	ATCTGTTCTGGGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Cymbidium finlaysonianum</i>	ATCTGTTCTGGGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Dendrobium lindleyi</i>	AGCCATTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Dendrobium amplum</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Dendrobium frideiricksianum</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Dendrobium devonianum</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Dendrobium secundum</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Dendrobium ellipsophyllum</i>	AGCGGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Grammatophyllum speciosum</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Pholidota imbricata</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Pholidota articulata</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Rhynchostylis gigantea</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Rhynchostylis coelestis</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Rhynchostylis retusa</i>	ATCTGTTCTAGTATTTCACCGGCAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Vanda denisoniana</i>	ATCTGTTCTAGTATTTCACCGGCAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Dendrobium crumenatum</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Agrostophyllum planicaule</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Eulophia andamanensis</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Vanilla aphylla</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Dendrobium aphyllum</i>	ATCCGTTCTGTTGATTTTACCGGCGGAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT
<i>Seidenfadenia mitrata</i>	ATCTGTTCTAGTATTTCACCGGCAATGCCGCTCTGATCATCCGGCCACGTCACATTAATAGTGTGTCCAAAAAATAAGGGATTACT

Figure 2. SNP haplotype of 30 orchid species

อภิปรายผล

ผลจากการสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Maximum Likelihood (Figure 3)


Figure 3. Cladogram of evolutionary relationships from *rbcL* gene with Maximum-Likelihood methods.



พบว่ากล้วยไม้ที่นำมาใช้ในการศึกษาค้นคว้าส่วนใหญ่เป็นกล้วยไม้ที่อยู่ในวงศ์ย่อย (Subfamily) Epidendroideae ซึ่งเป็นวงศ์ย่อยที่มีจำนวนสมาชิกกล้วยไม้มากที่สุดถึงร้อยละ 76 สามารถพบกล้วยไม้ในวงศ์ย่อยนี้ได้ทั่วโลก โดยเฉพาะในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้¹⁶ ซึ่งมีลักษณะเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย มีลำต้นแบบกก (Reed-stem) และมีใบแบบสลับหว่าง (Distichous) หรือเป็นเกลียวรอบลำต้น (Spiraling)¹⁷ มีเพียงแค่กล้วยไม้เถาภูเขาเพียงชนิดเดียวที่อยู่ในวงศ์ย่อย Vanilloideae กล้วยไม้ที่เหลือทั้ง 29 ชนิดที่ถูกจัดจำแนกอยู่ในวงศ์ย่อย Epidendroideae ยังสามารถจัดออกเป็นกลุ่มได้อีก 5 เผ่า (Tribe) ซึ่งลำดับอนุกรมวิธานที่ต่อจากวงศ์ย่อยโดย 5 เผ่าที่จัดจำแนกได้คือ (1) เผ่า Podochileae ได้แก่ กล้วยไม้สกุลสิงโต (*Bulbophyllum*) เป็นกล้วยไม้ที่ลำลูกกล้วยมีหนึ่งปล้อง ใบมีจำนวน 1 ใบ (หายากที่มี 2 ใบ) ช่อดอกออกตามข้อด้านล่างหรือออกจากเหง้า กลีบปากติดกับส่วนปลายคางของเส้าเกสรที่ยาว ลักษณะคล้ายบานพับ ทำให้กลีบปากสามารถเคลื่อนไหวได้^{18, 19} (2) เผ่า Cymbidieae ได้แก่ กล้วยไม้สกุลเข็มปี่เตียม (*Cymbidium*) สกุลเพชรหึง (*Grammatophyllum*) สกุล *Eulophia* เป็นกล้วยไม้ประเภทแตกกอ (Sympodial) ลำลูกกล้วยมี 1 ปล้องหรือหลายปล้อง ใบมีได้ตั้งแต่จำนวนน้อยไปจนถึงจำนวนมากช่อดอกออกจากรากฐานของลำลูกกล้วย กลุ่มนี้มีจำนวน 2 กลุ่ม มีลักษณะแข็ง เป็นร่อน และไม่มีก้าน (caudicles) สกุลเข็มปี่เตียม กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีขนาดและลักษณะคล้ายกัน ด้านข้างของกลีบปาก ตั้งขนานไปกับส่วนของเส้าเกสร ปากด้านหน้าโค้งลง มีฐานเส้าเกสร (Column-foot) ส่วนสกุล

เพชรหึงจะไม่มีฐานเส้าเกสร¹⁹ (3) เผ่า Vandaeae ได้แก่ สกุลช้าง (*Rhynchostylis*) สกุลกุหลาบ (*Aerides*) สกุลเข็ม (*Ascozentrum*) สกุลแวนด้า (*Vanda*) เป็นกล้วยไม้ประเภทไม่แตกกอ (Monopodial) มีการเจริญเติบโตขึ้นไปทางส่วนยอดใบเรียงตัวแบบซ้อนทับกัน ช่อดอกออกตามข้อ กลีบดอกคู่ล่างมักเชื่อมติดกันเป็นคาง กลุ่มนี้มีจำนวน 2 กลุ่ม มีร่อน¹⁹ (4) เผ่า Arethuseae ได้แก่ สกุลเอื้องลำต่อ (*Pholidota*) สกุลเอื้องใบหมาก (*Coelogyne*) เป็นกล้วยไม้ประเภทแตกกอ (Sympodial) ช่อดอกออกปลายยอด กลุ่มนี้มีจำนวน 4 หรือ 8 กลุ่ม มักจะเชื่อมติดกับก้าน หากไม่มีก้านกลุ่มเรณูมักจะมีลักษณะเป็นรูปกระบอง ในสกุลเอื้องใบหมาก ดอกจะมีขนาดกว้าง 0.6-13 เซนติเมตรกลีบปากจะไม่เปลี่ยนรูปไปเป็นถุง (Saccate) ไม่มีฐานเส้าเกสร กลุ่มนี้มีจำนวน 4 กลุ่ม มีลักษณะแข็งและไม่มีก้านสกุลเอื้องลำต่อ ดอกมักจะมีขนาดเล็กกว่า 2 เซนติเมตร กลีบปากมักจะเปลี่ยนรูปไปเป็นถุง (น้อยที่ไม่เปลี่ยน) กลุ่มเรณูมีจำนวน 4 กลุ่ม แบ่งตามขนาดเป็น 2 คู่ มีไข ก้านกลุ่มเรณูไม่ชัดเจน²⁰ และ (5) เผ่า Dendrobieae ได้แก่ สกุลหวาย (*Dendrobium*) สกุล *Agrostophyllum* เป็นกล้วยไม้ประเภทแตกกอ (Sympodial) ช่อดอกออกตามข้อ ใบพับตามแนวยาวคือประจบเข้าหาตามแนวเส้นกลางใบ (Duplicate) กลุ่มนี้มีจำนวน 4 กลุ่ม อับเรณูประจบหลัง (Incumbent) มีลักษณะแข็งและไม่มีก้าน (Caudicles) ลำลูกกล้วยจะมีหลายปล้อง ใบมีจำนวนได้ตั้งแต่ 1 ใบไปจนถึงจำนวนมาก ใบเรียงเป็นสองแถว ช่อดอกออกตามข้อบริเวณใกล้ยอด กลีบปากไม่มีเดือย และมักจะไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ กลุ่มเรณูแข็งและไม่มีก้าน^{19, 21}



ลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ที่ใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ มีความยาว 600 คู่เบส เป็นบริเวณส่วนแปลรหัสส่วนหน้า (5' coding region) ของยีน โดยในบริเวณส่วนหน้าของยีน *rbcL* นี้มีความแปรผันของลำดับดีเอ็นเอค่อนข้างสูง²² แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจึงสามารถจัดจำแนกกล้วยได้ 5 เผ่า และผลจากการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอที่หาออกมาได้กับฐานข้อมูล GenBank นั้น ข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบตรงกับลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ในฐานข้อมูล มากกว่าร้อยละ 94 ยกเว้นเอื้องปีกไก่ใหญ่ (*A. planicaule*) สิงโตนกกลีง (*B. lasiochilum*) กระเร่กระร่อนปากเปิด (*C. finlaysonianum*) และเหืองจันทบูร (*D. friedericksianum*) ที่ยังไม่เคยมีรายงานลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ในฐานข้อมูลมาก่อนจึงถือได้ว่าเป็นการรายงานลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* เป็นครั้งแรก สำหรับในกล้วยไม้ กุหลาบกระเปาะเปิด (*A. falcata*) สิงโตฟันจักร (*B. dentiferum*) เอื้องแปรงสีฟัน (*D. secundum*) หมูกลิ้ง (*E. andamanensis*) และเอื้องกุหลาบแดง (*A. crassifolia*) ถึงแม้จะมีการรายงานลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ในฐานข้อมูล แต่ลำดับดีเอ็นเอที่รายงานเป็นคนละบริเวณกับลำดับดีเอ็นเอที่ทำการศึกษานี้ในครั้งนี้ นอกจากนี้ผลจากการเปรียบเทียบหารูปแบบสนิป แสดงให้เห็นถึงรูปแบบที่เกิดขึ้นซึ่งเกิดความแตกต่างกันในลำดับดีเอ็นเอถึง 92 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 15.33 ของบริเวณยีนดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์นี้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากการวิจัยนี้มีความถูกต้องในการระบุชนิดของกล้วยไม้ และนับได้ว่ายีน *rbcL* เพียงยีนเดียวก็มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้ในการจัดกลุ่ม

ของกล้วยไม้วงศ์ย่อย Epidendroideae ถึงแม้ว่าในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้แนะนำให้ใช้ยีนหลายยีนเชื่อมต่อกันเพื่อให้มีความสามารถในการจัดจำแนกได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม Camerone *et. al.* (1999)²³ ได้ใช้ยีน *rbcL* เพียงยีนเดียวที่มีความยาวประมาณ 1,200 คู่เบส ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดจำแนกกล้วยไม้ ซึ่งพบว่าผลที่ได้มีความแตกต่างกับการใช้ลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ในงานวิจัยนี้ใน 2 ตำแหน่ง ซึ่งได้แก่กล้วยไม้ในสกุลสิงโต ที่โดยการจัดจำแนกทั้งทางสัณฐานวิทยาหรือการใช้ลำดับดีเอ็นเอของยีนหลายยีนเชื่อมต่อกันนั้น ได้จัดกล้วยไม้ในกลุ่มสิงโตให้มีความใกล้ชิดกับกล้วยไม้สกุลหวาย แต่เมื่อใช้ลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ที่มีความยาว 600 คู่เบส กลับพบว่ากล้วยไม้ในกลุ่มสิงโตมีความใกล้ชิดกับกล้วยไม้ในเผ่า Cymbidieae มากกว่า อีกประการหนึ่งคือความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ในสกุลเอื้องลำต่อ ซึ่งมีความแตกต่างจากในรายงานก่อนหน้านี้พบว่ากล้วยไม้สกุลนี้ได้ถูกจัดแยกออกไปเป็นเผ่า Arethuseae ซึ่งอยู่ห่างกับกล้วยไม้สกุลหวาย²⁴ แต่จากการใช้ลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ในงานวิจัยนี้ ที่ความยาว 600 คู่เบส พบว่ากลุ่มของกล้วยไม้สกุลเอื้องลำต่อได้ถูกจัดเข้าอยู่รวมกันกับกล้วยไม้สกุลหวาย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่ลำดับดีเอ็นเอในส่วนต้นของถึงกลายยีนนี้มีความแตกต่างกันน้อยและมีความแตกต่างกันมากขึ้นในส่วนท้ายของยีน ซึ่งความยาวที่ 600 คู่เบสนี้จึงไม่เพียงพอที่จะใช้ในการจัดตำแหน่งของเผ่าในกล้วยไม้ได้อย่างถูกต้อง แต่อย่างไรก็ดี ข้อดีของการใช้ลำดับดีเอ็นเอที่สั้น คือสามารถลดค่าใช้จ่ายในการหาลำดับดีเอ็นเอ



โดยที่ทำการหาลำดับดีเอ็นเอเพียงปฏิกิริยาเดียว (Reaction) แต่หากใช้ลำดับดีเอ็นเอที่มีความยาวตั้งแต่ 900 ขึ้นไป มีความจำเป็นที่จะต้องใช้ 2 ปฏิกิริยาเพื่อความถูกต้องแม่นยำ ส่งผลให้ค่าใช้จ่ายสูงขึ้น นอกจากนี้กล้วยไม้ในกลุ่มเดียวกันมีข้อมูลทางพันธุกรรมร่วมกันที่แสดงความใกล้ชิดเพิ่มขึ้นและสอดคล้องกับลักษณะปรากฏ ได้แก่ โครงสร้างดอก ลักษณะใบ และปัจจัยจากสภาพแวดล้อมแหล่งที่พบ ส่งผลให้เกิดการวิวัฒนาการแยกจากกันของแต่ละกลุ่มซึ่งวิวัฒนาการที่แยกห่างออกจากกันทำให้เกิดความแตกต่างกันของพันธุกรรม^{25, 26} เนื่องจากสภาพแวดล้อมเป็นปัจจัยหลักที่ควบคุมให้เกิดการวิวัฒนาการในสิ่งมีชีวิตเพื่อความอยู่รอด ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงข้อมูลพันธุกรรมก่อนแล้วจึงส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่ปรากฏ ซึ่งกล้วยไม้ในระดับสกุลหรือชนิดที่มีความใกล้ชิดกันมากนั้นการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอจึงมีความเหมาะสม เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงในระดับดีเอ็นเอให้ข้อมูลมากเพียงพอสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยที่ลำดับดีเอ็นเอที่ถูกเลือกมาใช้นั้นจำเป็นต้องมีอัตราการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอที่สูง กล่าวคือ ลำดับดีเอ็นเอที่มีอัตราการผันแปรที่สูงย่อมมีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ดี^{27, 28}

สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้ยีน *rbcL* ที่มีลำดับดีเอ็นเอขนาดสั้น (600 คู่เบส) ในบริเวณส่วนต้นของยีน ซึ่งมีความเหมือนกันกับในฐานข้อมูล อีกทั้งยังได้มีการนำลำดับดีเอ็นเอของ

ยีน *rbcL* ที่ยังไม่เคยมีรายงานในฐานข้อมูลเข้าไปฝากไว้ที่ฐานข้อมูล GenBank และสามารถใช้ในการจำแนกตัวอย่างกล้วยไม้จากแหล่งอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิด ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี ทั้ง 30 ชนิด และยังสามารถใช้ในการจัดกลุ่มกล้วยไม้ได้อย่างถูกต้องในระดับวงศ์ย่อยและเผ่า ถึงแม้ว่าการใช้ลำดับดีเอ็นเอที่มีความยาวจะให้ผลที่แม่นยำกว่าแต่ก็มีค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้นตามมาด้วยเช่นกัน ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้ดีเอ็นเอสั้นจึงเพียงพอสำหรับการจัดจำแนกกล้วยไม้ไทย ซึ่งผลการวิจัยนี้ยังสามารถนำไปใช้ในการวางแผนการอนุรักษ์ การระบุชนิดและปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรีที่ให้เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. Thammasiri K. Thai Orchid Genetic Resources and Their Improvement. Horticulturae 2016;2:9.
2. Chamchumroon V, Suphunte N, Tetsana N, Poopath M, Tanikkool S. Threatened Plants in Thailand. Bangkok: Omega Printing; 2017.
3. Hebert PDN, Gregory TR. The promise of DNA barcoding for taxonomy. Syst Biol 2005;54:852-9.



4. Kress WJ, Erickson DL. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. PLOS 2007;2:e508.
5. Ratnasingham S, Hebert PDN. BOLD: The Barcode of Life Data System. Mol Eco Notes 2007;7:355-64.
6. CBOL Plant Working Group. A DNA Barcode for Land Plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2009;106:12794-7.
7. Soltis DE, Soltis PS. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis, pp.1-42, In Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ. (Eds.), Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1998.
8. Bremer B, Manen JF. Phylogeny and classification of the subfamily Rubioideae (Rubiaceae). Plant Syst Evol 2000;225:43-72.
9. Ho VT, Tran TKP, Vu TTT, Widiarsih S. Comparison of *matK* and *rbcL* DNA barcodes for genetic classification of jewel orchid accessions in Vietnam. J Genet Eng Biotechnol 2021;19:93.
10. Wikström N, Kenrick P. Evolution of Lycopodiaceae (Lycopsidea): Estimating Divergence Times from *rbcL* Gene Sequences by Use of Nonparametric Rate Smoothing. Mol Phylogenet Evol 2001;19:177-86.
11. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bulletin 1978;19:11-5.
12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ndEd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
13. Fay MF, Swensen SM, Chase MW. Taxonomic affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). Kew Bulletin 1997;52:111-20.
14. Reeves G, Chase MW, Goldblatt P, Rudall P, Fay MF, Cox AV, Lejeune B, Souza-Chies T. Molecular Systematics of Iridaceae: Evidence from Four Plastid DNA Regions. Am J Bot 2001;88:2074-87.
15. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol 2016;33:1870-4.
16. Govaerts R, Dransfield J, Zona S, Hodel DR, Henderson A. World Checklist of Orchidaceae. Facilitated by the Royal Botanic Gardens. [internet]. 2014 [cited 2017 June 25] Available from: <http://wcsp.science.kew.org>.
17. Dressler RL. The orchids: natural history and classification. Massachusetts: Harvard University Press; 1990.



18. Schuiteman A, Vermeulen JJ, de Vogel F. Flora Malesiana: Orchids of New Guinea, Volume 6: Genus *Bulbophyllum*. Leiden: The National Herbarium of the Netherlands; 2010.
19. Pedersen HE, Kurzeil H, Suddee S, de Vogel F, Cribb PJ, Chantanaorrapint S, Watthana S, Gale SW, Seelanan T, Suwanphakdee C. Flora of Thailand, Volume 12, Part 1, Orchidaceae (Cypripedioideae, Orchidoideae, Vanilloideae). Bangkok: The Forest Herbarium, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation; 2011.
20. Pedersen HE, Kurzeil H, Suddee S, de Vogel F, Cribb PJ, Chantanaorrapint S, Watthana S, Gale SW, Seelanan T, Suwanphakdee C. Flora of Thailand, Volume 12, Part 2: Orchidaceae 2 (Epidendroideae P.P.: Neottieae, Tropidieae, Nervilieae, Gastrodieae, Thaieae, Calypsoeae, Arethuseae, Collabieae, Cymbidieae). Bangkok: The Forest Herbarium, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation; 2014.
21. Schuiteman A, de Vogel F. Flora Malesiana: Orchids of New Guinea, Volume 2: Dendrobium and Allied Genera. Leiden: The National Herbarium of the Netherlands (NHN); 2002.
22. El-Sherif N, and Ibrahim M. Implications of *rbcL* and *rpoC1* DNA Barcoding in Phylogenetic Relationships of some Egyptian *Medicago sativa* L. Cultivars. Egypt J Bot 2020;60:451-60.
23. Cameron K, Chase M, Whitten W, Kores P, Jarrell D, Albert V, Yukawa T, Goldman H. A Phylogenetic Analysis of the Orchidaceae: Evidence from *rbcL* Nucleotide Sequences. Am J Bot 1999;86:208-24.
24. Chase MW, Cameron KM, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Salazar GA, Berg C, Schuiteman A. An updated classification of Orchidaceae. Bot J Linn Soc 2015;177:151-74.
25. Carlsward BS, Whitten W, Williams NH, Bytebier B. Molecular phylogenetics of Vandaeae (Orchidaceae) and the evolution of leaflessness. Am J Bot 2006;5:770-86.
26. Stpiczynska M, Davies KL, Kaminska M. Comparative anatomy of the nectary spur in selected species of Aeridinae (Orchidaceae). Ann Bot 2011;107:327-45.
27. Fay MF, Chase MW. Orchid biology: From Linnaeus via Darwin to the 21st century. Ann Bot 2009;104:359-64.
28. Simson MG. Plant Systematics, 2nd Ed. Boston: Elsevier, Academic Press; 2012.