

การตรวจสอบสถานะทางอนุกรมวิธานของเทียนสิรินธร (*IMPATIENS*
SIRINDHORNIAE TRIBOUN & SUKSATHAN) ในประเทศไทย
TAXONOMIC STATUS INVESTIGATING OF *IMPATIENS*
SIRINDHORNIAE TRIBOUN & SUKSATHAN IN THAILAND

ไชนียะ สมะลา¹ กิตติมา คงทน¹ เยาวลักษณ์ สุวรรณคง² และสหาณัฐ เพชรศรี^{3*}
Saineeya Samala¹, Kittima Kongton¹, Yaowalak Suwannakong² and Sahanat Petchsri^{3*}

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบสถานภาพทางด้านอนุกรมวิธานของเทียนสิรินธร (*Impatiens sirindhorniae* Triboun & Suksathan) จาก 2 ประชากร คือ 1) ตัวอย่างพืชจากเขาหินปูน อำเภอปลายพระยา จังหวัดกระบี่ ซึ่งเป็นสถานที่ค้นพบตัวอย่างพืชต้นแบบ (type locality) และ 2) ตัวอย่างพืชจากเขื่อนรัชชประภา จังหวัดสุราษฎร์ธานี ด้วยข้อมูลฐานวิธานวิทยาและชีวโมเลกุล จากการศึกษาฐานวิธานวิทยาพบว่าตัวอย่างพืชจากทั้ง 2 ประชากรมีลักษณะต่างกันหลายประการ เช่น รูปร่างใบ ปลายใบ ฐานใบ ขอบใบ สีดอกและสีลำต้น โดยตัวอย่างจาก จ.สุราษฎร์ธานี มีความแปรผันของลักษณะสูงกว่าตัวอย่างจาก จังหวัดกระบี่ ส่วนลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ เช่น รูปร่างเกสร รังไข่ เรณู ฝัก และเมล็ด ของตัวอย่างพืชทั้ง 2 ประชากรมีความคล้ายคลึงกันมาก ในขณะที่ผลการศึกษาทางชีววิทยาโมเลกุลโดยวิธีเครื่องหมายโมเลกุลพบว่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน matK และ rbcL

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84100

¹Faculty of Science and Technology, Sutatthani Rajabhat University, Muang District, Sutatthani Province 84100

²สำนักบริหารพื้นที่อนุรักษ์ที่ 4 (สุราษฎร์ธานี) อำเภอเมือง จังหวัดสุราษฎร์ธานี 84000

²The Office of Protected Area Management 4 (Suratthani), Muang District, Sutatthani Province 84000

³คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

³Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen District, Nakhon Pathom Province 73140

*corresponding author e-mail: faassnps@ku.ac.th

Received: 24 July 2024; Revised: 4 November 2024; Accepted: 7 November 2024

DOI: <https://doi.org/10.14456/lsej.2024.31>

ของต้นเทียนสิรินธร ของทั้ง 2 ประชากรจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalX มีค่าค่อนข้างสูง โดยบริเวณ ยีน matK มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดอยู่ที่ 0.00–0.40 ซึ่งต่ำกว่าความผันแปรระหว่าง ชนิดของเทียนชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในช่วง 0.46–0.53 ส่วนยีน rbcL พบความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ ภายในชนิดอยู่ที่ 0.00 และระหว่างชนิดที่ 0.72–0.78 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแม้ว่าตัวอย่างพืชจากทั้ง 2 ประชากรจะมีสัณฐานวิทยาแตกต่างกันในหลายลักษณะหากแต่ยังไม่มากพอที่จะแยกเป็นคณะหน่วย ทางอนุกรมวิธาน (taxa) สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน matK และยีน rbcL ระหว่าง 2 ประชากรที่พบมีค่าต่ำกว่ามากเมื่อเทียบกับเทียนชนิดอื่นในสกุลเดียวกัน

คำสำคัญ: การจำแนก เครื่องหมายโมเลกุล เทียนสิรินธร ยีน matK ยีน rbcL

Abstract

This study aimed to investigate the taxonomic status of *Impatiens sirindhorniae* Triboun & Suksathan from two populations including: plants from limestone hills, Plai Phraya District, Krabi Province, which is type locality, and plants from Ratchaprapha Dam, Suratthani Province by morphological and biomolecular data. From the morphological study, it was found that plants from both populations had many different characteristics such as leaf shape, leaf tip, leaf base, leaf edge, flower color, and stem color. Plant specimens from Suratthani Province was higher variation in characteristics than plant specimens from Krabi Province. Whereas reproductive parts, such as the shape of pistil and stamen, ovary, pollen, pods, and seeds of those specimens from the two populations were very similar. The results of the molecular biology study using molecular markers found that the similarity of the nucleotide sequences using the ClustalX program of the matK gene and the rbcL gene of *I. sirindhorniae* of both populations was quite high. The matK gene region having the within-species nucleotide sequence variation is 0.00–0.40, which is lower than the inter-species variation of other *Impatiens* species in the range of 0.46–0.53. For the rbcL gene, the nucleotide sequence variation was 0.00 within species and 0.72–0.78 between species. Therefore, it can be concluded that although the plant from the two populations has different morphology in many characteristics, they are not enough to classify them into different taxonomic units (taxa). This is consistent with the

results of the analysis of the nucleotide sequence variation of the matK and rbcL genes. The variation between the 2 populations was lower than other *Impatiens* species.

Keywords: classification, DNA marker, *Impatiens sirindhorniae*, matK Gene, rbcL Gene

บทนำ

ประเทศไทยนั้นนับว่าเป็นพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงติดอันดับ 1 ใน 20 ประเทศทั่วโลก มีความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรพรรณไม้ เนื่องจากมีเขตการกระจายพันธุ์ของพืช (Floristic Region) พาดผ่านถึง 3 เขต (van Welzen et al., 2011) ประกอบกับสภาพภูมิประเทศที่หลากหลายส่งผลให้เกิดความหลากหลายของพันธุ์พืชและพันธุ์สัตว์เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะระบบนิเวศบนภูเขาหินปูนที่กระจายอยู่ทั่วประเทศนั้นล้วนแล้วแต่มีปัจจัยด้านกายภาพที่มีความเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวสูงส่งผลให้พรรณไม้ในบริเวณนี้จำเป็นต้องปรับตัวเพื่อความอยู่รอดจนมีพืชลักษณะแตกต่างจากพรรณไม้ในบริเวณอื่น ๆ อย่างชัดเจน (Poopath, 2014; Shewchenko et al., 2018) เกิดเป็นพืชเฉพาะถิ่นหรือพืชถิ่นเดียว (endemic species) ซึ่งพืชถิ่นเดียวเหล่านี้มักมีการกระจายพันธุ์แคบ ๆ พบเฉพาะในพื้นที่ขนาดเล็กบนเขาหินปูน อีกทั้งมีจำนวนประชากรจำกัด นับว่าเป็นสิ่งมีชีวิตที่หายากและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์เป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความเปราะบางด้านนิเวศวิทยา และไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพดินฟ้าอากาศ โดยมีประมาณการว่าประเทศไทยมีพืชถิ่นเดียว จำนวน 800 ชนิด (Santisuk et al., 2006; Chamchamroon, 2012) โดยในจำนวนนี้มีถึงร้อยละ 22.5 หรือ 180 ชนิดที่พบเฉพาะบนระบบนิเวศเขาหินปูนเท่านั้น

เทียนสิรินธรหรือชมพูสิริน (*Impatiens sirindhorniae* Triboun & Suksathan) เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์เทียน (Balsaminaceae) ได้รับการกำหนดให้เป็นพืชถิ่นเดียว (endemic plant) ของประเทศไทยซึ่งเจริญบริเวณหน้าผาเขาหินปูน (lime stone cliff) ที่ความสูงประมาณ 200 เมตรจากระดับน้ำทะเล ในเขตอำเภอปลายพระยา จังหวัดกระบี่ และ ในอ่างเก็บน้ำเขื่อนรัชชประภา จังหวัดสุราษฎร์ธานีเท่านั้น โดยคำระบุชนิด “sirindhorniae” นั้นตั้งขึ้นเพื่อเทิดพระเกียรติ “สมเด็จพระกนิษฐาธิราชเจ้า กรมสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี” การรายงานการค้นพบพืชชนิดใหม่ของโลก (new species) ชนิดนี้ ได้ตีพิมพ์ในวารสาร The Gardens' Bulletin Singapore เมื่อปี ค.ศ. 2009 โดยนักพฤกษศาสตร์ชาวไทย คือ ดร. ปิยะเกษตร สุขสถาน และ ดร.ปราโมทย์ ไตรบุญ

จากข้อมูลเบื้องต้นพบว่าตัวอย่างพืชจากทั้ง 2 พื้นที่นี้มีความแตกต่างกันทางลักษณะสัณฐานวิทยาหลายประการอย่างเห็นได้ชัด โดยตัวอย่างของเทียนสิรินธรที่พบตามเขาหินปูนในอ่างเก็บน้ำของเขื่อนรัชชประภามีลักษณะสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากคำบรรยายลักษณะ (description) ของตัวอย่าง

ต้นแบบ (type specimen) ที่รายงานไว้ในการศึกษาพืชชนิดนี้ครั้งแรกหลายลักษณะ (Suksathan & Triboun, 2009) ทำให้เกิดความคลุมเครือของสถานะทางอนุกรมวิธานว่าสมควรจำแนกพืชจากทั้ง 2 ประชากรนี้เป็นคนละหน่วยทางอนุกรมวิธาน (taxa) หรือไม่ หากแยก สมควรแยกเป็นระดับใด เนื่องจากมีพืชในสกุลเทียนหลายชนิดที่มีการจำแนกหน่วยทางอนุกรมวิธานในระดับต่ำกว่าชนิด (Suksathan & Triboun, 2009) โดยในปี ค.ศ. 2012 มีรายงานว่าผลการศึกษารรณไม้ในวงศ์เทียน (Balsaminaceae) บริเวณเทือกเขาหินปูนในพื้นที่ธรรมชาติทั่วประเทศไทย พบพืชจำนวน 60 ชนิด และทุกชนิดจัดอยู่ในสกุลเทียน (*Impatiens* L.) เพียงสกุลเดียวเท่านั้น ซึ่งในจำนวนนี้เป็นพืชชนิดใหม่ของโลกมากถึง 10 ชนิดด้วยกัน (Triboun et al., 2012) และต่อมาได้มีการตีพิมพ์หนังสือเกี่ยวกับพืชสกุลเทียนในประเทศไทยและรายงานพืชชนิดใหม่ของโลกเพิ่มอีก 20 ชนิด นอกจากนี้ยังมีถึง 43 ชนิดที่มีการจำแนกหน่วยทางอนุกรมวิธานในระดับต่ำกว่าชนิด (Suksathan & Ruchisabsakun, 2020) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้สูงที่ตัวอย่างพืชจากเขื่อนรัชชประภาอาจเป็นคนละหน่วยทางอนุกรมวิธาน (taxa) กับตัวอย่างพืชที่เจริญบริเวณที่ค้นพบตัวอย่างต้นแบบ (type locality)

ทั้งนี้เนื่องจากการใช้เพียงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์เพียงอย่างเดียวในการจำแนกและวิเคราะห์ชนิดพรรณไม้ อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการจำแนกได้ โดยเฉพาะพืชที่มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก (Khan et al., 2011) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้นำเทคนิคด้านเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เข้ามาใช้ในการพิจารณาด้วย ซึ่งเทคนิคนี้ได้รับความนิยมอย่างมากในการนำมาใช้จัดจำแนกสิ่งมีชีวิต โดยพัฒนาจากการเลือกใช้ดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันระหว่างชนิดสูงซึ่งสามารถแยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดออกจากกันได้ (Thanananta et al., 2014; Habert et al., 2003) อย่างไรก็ตาม การระบุชนิดให้ถูกต้องและแม่นยำควรใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมากกว่า 1 ตำแหน่ง (Fazekas, 2008) ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งสนใจศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมของพลาสติดบริเวณยีน *rbcl* และยีน *matK* ในเทียนสิรินธรทั้ง 2 ประชากร ซึ่งยีนดังกล่าวได้รับการระบุว่าเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสากลสำหรับระบุหน่วยทางอนุกรมวิธานระดับต่าง ๆ ในกลุ่มพืชดอกที่มีประสิทธิภาพสามารถแยกได้ถึงระดับสกุลและวงศ์อีกด้วย (Kress et al., 2005; Gao et al., 2011; Hollingsworth et al., 2011; Jinbo & Kato, 2011; Wattoo et al., 2016)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1.1 สํารวจจํานวนประชากร ลักษณะทางนิเวศวิทยา และเก็บตัวอย่างเหียนสิรินธรใน 2 พื้นที่ของอ่างเก็บน้ำเขื่อนรัชชประภา จ.สุราษฎร์ธานี ได้แก่ 1. บริเวณเทือกเขาทะเลาะ ($9^{\circ}00'54.4''\text{N}$ $98^{\circ}44'29.0''\text{E}$) และ 2. บริเวณเทือกเขาสามเกลอ ($8^{\circ}59'33.0''\text{N}$ $98^{\circ}42'26.9''\text{E}$) และเก็บตัวอย่างเหียนสิรินธรในบริเวณเขาหินปูน อ.ปลายพระยา จ.กระบี่ จากนั้นนำมาจัดทําเป็นตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง (voucher specimen) เก็บรักษาไว้ ณ ห้องปฏิบัติการทางพฤกษศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมชีวภาพ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จากนั้นนำตัวอย่างพรรณไม้ที่วิเคราะห์ชื่อแล้วไปเปรียบเทียบกับตัวอย่างพืชต้นแบบที่เก็บรักษาในพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ (BK) สํานักงานคํมครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ เพื่อยืนยันความถูกต้อง

1.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพของใบและดอกเหียนสิรินธรจากตัวอย่างพรรณไม้ที่พบจากเขื่อนรัชชประภา จ.สุราษฎร์ธานี จํานวน 35 หมายเลข เปรียบเทียบกับใบและดอกของตัวอย่างพรรณไม้ที่เก็บตัวอย่างจากพื้นที่ จ.กระบี่ จํานวน 8 หมายเลข และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองโดยใช้วิธี One-Way ANOVA

1.3 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเรณูเหียนสิรินธรจากทั้ง 2 พื้นที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) โดยตรึงเรณูด้วยสารละลาย FAA เป็นเวลา 1–2 ชั่วโมง ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2–3 ครั้ง ตึงน้ำออกจากเรณูโดยใช้แอลกอฮอล์ความเข้มข้นเป็นลำดับ (ร้อยละ 50–100) ตัวอย่างละ 15–30 นาที และทำเรณูให้แห้งโดยใช้วิธีทำให้แห้ง จุดวิกฤต (critical point drying : CPD) จากนั้นนำเรณูติดบนแท่น โดยใช้เทปกาว 2 หน้าเป็นตัวยึด แล้วเคลือบทองด้วยเครื่อง sputter coater และศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

1.4 ศึกษาสารแอนโธไซยานินในดอกเหียนสิรินธร โดยนำดอกเหียนสิรินธรที่มีสีแตกต่างกันจากแต่ละพื้นที่ศึกษาแช่ในเอทานอล ในอัตราส่วนดอกเหียนสิรินธต่อเอทานอล 1:6 ทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปกรองด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ นำสารที่สกัดได้มาวิเคราะห์ปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมดด้วยวิธีการ pH differential โดยเจือจางสารสกัดด้วยบัฟเฟอร์ pH 1.0 (0.025 M Potassium chloride) และบัฟเฟอร์ pH 4.5 (0.4 M Sodium acetate) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 และ 700 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer โดยใช้ตัวทําลายผลผสมบัฟเฟอร์เป็น Blank และคํานวณปริมาณแอนโธไซยานินทั้งหมดของสารสกัดจากสมการดังต่อไปนี้

ปริมาณแอนโธไซยานิน (มิลลิกรัม/ลิตร) = $(A \times MW \times DF \times 103) / (\epsilon \times 1)$

โดยที่ A = (A520 nm - A700 nm) pH 1.0 - (A520 nm - A700 nm) pH 4.5

MW = 499.2 g/mol (น้ำหนักโมเลกุลของ Cyanidin-3-glucoside)

ϵ = 26,900 L/mol/cm (โมลาร์แอฟฟอกติวิตี)

DF = Dilution factor ของสารละลายตัวอย่าง

103 = Factor for conversion from g to mg

2. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

2.1 สุ่มเก็บตัวอย่างใบของเทียนสีรินธที่มีลักษณะต่างกันของทั้ง 2 ประชากร ประชากรละ 3 ซ้ำ จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ GeneJET™ Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, USA) ตามวิธีการที่ระบุและตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วย 1% Agarose gel electrophoresis และวัดคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop™ 2000/c Spectrophotometers ของบริษัท Thermo Scientific (USA)

2.2 นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน matK และยีน rbcL ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) โดยมีปริมาตรรวมทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x Phusion buffer, 10 mM dNTP, 0.5 μ M Forward และ Reverse Primer, 0.5 unit Phusion Taq และดีเอ็นเอต้นแบบ (Template) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน matK 472F (5'-CCCRTYCATCTGGA AATCTTGGTTC-3') และ 1248R (5'-GCTRTRATAATGAGAAAGATTT CTGC-3') และคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน rbcL คือ 1F (5'-ATGTCACCACAAACAGAAAC-3') และ 724R (5'-TCGCATGTACCTGCAGTAGC-3') โปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้ Pre-denaturation ที่ 98°C (3 นาที) 1 รอบ Denaturation ที่ 98°C (10 วินาที) Annealing 55°C (20 วินาที) และ Extension ที่ 72°C (30 วินาที) เป็นจำนวน 35 รอบ และ Final extension ที่ 72°C (30 วินาที) 1 รอบ และตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณที่ได้ด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด (100 bp ladder) จากนั้นส่งผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสไปทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Ward Medic, Singapore)

2.3 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องโดยวิเคราะห์จาก Chromatogram และเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเทียนชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov) และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน matK และ

rbcl ในเทียนสิรินธรแต่ละตัวอย่างกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นโดยใช้โปรแกรม ClustalX และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม MEGA 5.0

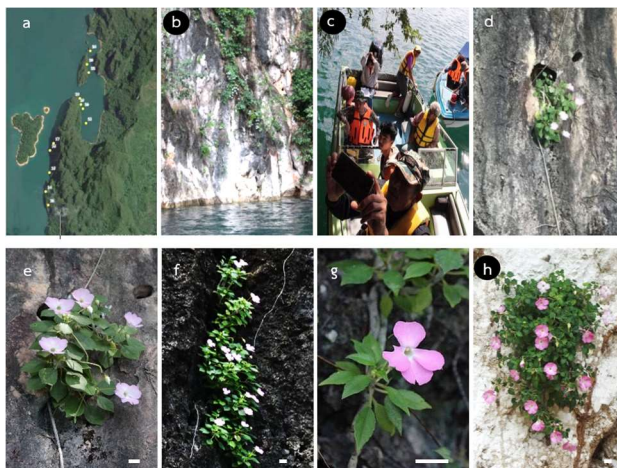


Figure 1 *Impatiens sirindhorniae* in natural habitat in the study area of Ratchaprapa Dam, Surat Thani Province (a–g) and Krabi Province (h), a. the white dots are the areas where the samples were taken. Scale = 5 cm.

ผลการวิจัย

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1.1 จากผลสำรวจในรอบ 1 ปี พบว่าจำนวนประชากรเทียนสิรินธรปรากฏมากในช่วงเดือนตุลาคม ถึง มกราคม และพบน้อยลงหรือไม่พบเลยในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ถึง กรกฎาคม โดยเทียนสิรินธรมีฤดูกาลออกดอกสะพรั่งในช่วงเดือนสิงหาคม ถึง ตุลาคม และออกดอกบ้างเป็นระยะในช่วงนอกฤดูออกดอก ส่วนถิ่นอาศัยของเทียนสิรินธรนั้นมักขึ้นปรากฏอยู่บนหน้าผาในเทือกเขาหินปูนที่มีความชันสูงเป็นแนวตั้งฉาก (ประมาณ 90 องศา) ตั้งแต่ความสูงจากระดับน้ำทะเล 15 เมตร ถึง 130 เมตร (อาจถึง 150 เมตรในบางพื้นที่) โดยเทียนสิรินธรมักเจริญอยู่ในบริเวณเปิดโล่งมีแสงแดดจัดตามรอยแยกแตกของหินผาซึ่งมีความหนาของชั้นดินน้อยมากหรือไม่มีดินหรืออินทรีย์วัตถุเลย ดังภาพที่ 1 (Figure 1)

1.2 จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพของลำต้นและใบเทียนสิรินธรจากทั้ง 2 พื้นที่ รวมทั้งสิ้น 44 หมายเลข พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างเทียนสิรินธรจากเขื่อนรัชชประภา จ.สุราษฎร์ธานี มีความแปรผันสูง ในขณะที่ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ของตัวอย่างเทียนสิรินธรจาก จ.กระบี่ ค่อนข้างคงที่ โดยตัวอย่างจาก จ.สุราษฎร์ธานี มีลำต้นสีฟางซีด (stramineous) ส่วนเทียนสิรินธรจาก จ.กระบี่ มีลำต้นสีเขียวเข้ม (dark green) ส่วนลักษณะรูปร่างใบ พบว่าตัวอย่างจาก จ.สุราษฎร์ธานี มีรูปร่างใบ 3 แบบ ได้แก่ รูปไข่ รูปรี และรูปกลม ดังภาพที่ 2a-c (Figure 2a-c) ส่วนเทียนสิรินธรจาก จ.กระบี่ มีใบรูปกึ่งหัวใจ ดังภาพที่ 2d (Figure 2d) ส่งผลให้รูปร่างของปลายใบและฐานใบของเทียนสิรินธรจาก จ.สุราษฎร์ธานี มีความหลากหลายกว่าเทียนสิรินธรจาก จ.กระบี่ เช่นเดียวกับลักษณะขอบใบที่พบว่าเทียนสิรินธรจาก จ.สุราษฎร์ธานี มีลักษณะขอบใบ 2 แบบ คือ เกือบเรียบ และซี่หยักถี่ ดังภาพที่ 2a-c (Figure 2a-c) ส่วนขอบใบเทียนสิรินธรจาก จ.กระบี่ มีซี่หยักห่างกว่า (Figure 2d)

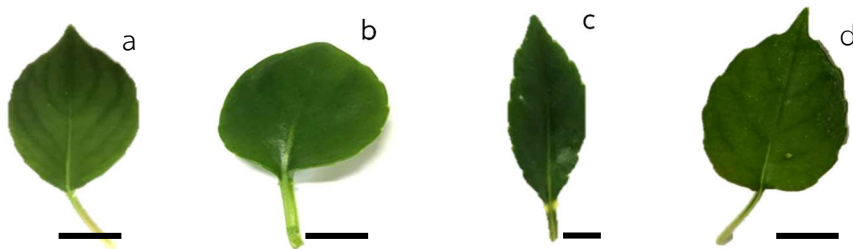


Figure 2 Leaves shape and flower color shade of *Impatiens sirindhorniae*;

a. ovate, b. orbicular, c. elliptic and d. subcordate. Scale = 2 cm.

นอกจากนี้ใบของเทียนสิรินธรจาก จ.สุราษฎร์ธานี (ยกเว้นใบรูปกลม) มีความยาวมากกว่าใบเทียนสิรินธรจาก จ.กระบี่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99% ส่วนความกว้างพบว่าใบรูปไข่และใบรูปกลมจาก จ.สุราษฎร์ธานี มีความกว้างมากกว่าใบรูปหัวใจจาก จ.กระบี่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99% และยังพบอีกว่าใบของเทียนสิรินธรจาก จ.สุราษฎร์ธานี ทั้ง 3 รูปร่างมีความหนาแน่นมากกว่าใบเทียนสิรินธรจาก จ.กระบี่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99% ดังตารางที่ 1 (Table 1)

Table 1 Width, length, and thickness of all 4 types of *Impatiens sirindhorniae* leaves.

Leaves shape	Width (cm)	Length (cm)	Thickness (cm)	Source
Ovate	4.38±0.08 ^a	6.45±0.03 ^a	0.24±0.01 ^a	Surat Thani Province
Elliptic	3.51±0.06 ^b	6.74±0.13 ^a	0.23±0.01 ^a	Surat Thani Province
Orbicular	4.36±0.05 ^a	3.90±0.08 ^b	0.19±0.00 ^b	Surat Thani Province
Cordate	2.81±0.06 ^c	4.19±0.08 ^b	0.08±0.00 ^c	Krabi Province
F-test	**	**	**	
C.V. (%)	18.29	26.40	39.89	

Remark Means ± standard deviation followed by different letters in the same column denote significant differences at $P \leq 0.01$ as determined by LSD ** = significant.

1.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกพบว่าดอกเทียนสิรินธรมีสีกลีบดอกแตกต่างกัน 4 สี คือ สีชมพูเข้ม สีชมพูอ่อน สีขาวอมชมพู และ สีขาว ดังภาพที่ 1e-g (Figure 1e-g) โดยเป็นที่น่าสังเกตว่าเทียนสิรินธรจาก จ.กระบี่ มีเฉพาะดอกสีชมพูอ่อน ดังภาพที่ 1h (Figure 1h) ตรงตามคำบรรยายในรายงานการค้นพบพืชชนิดใหม่ (Suksathan & Triboun, 2009) และพบว่าดอกสีชมพูเข้มและดอกสีชมพูอ่อนมีขนาดใหญ่กว่าดอกสีขาวและสีขาวอมชมพูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างของขนาดดอกในเทียนสิรินธรทั้ง 2 ประชากร ส่วนความยาวของก้านดอกพบว่าดอกสีขาวมีความยาวของก้านดอกมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (56.86 ± 4.32 มิลลิเมตร) รองลงมาคือดอกสีชมพูอ่อน สีชมพูเข้ม และ สีขาวอมชมพู ตามลำดับ ดังตารางที่ 2 (Table 2)

Table 2 Size of *Impatiens sirindhorniae* flower and Anthocyanin content.

Floral color	Petal width (mm)	Petal length (mm)	Floral stalk (mm)	Anthocyanin content (Mg / dry weight)	Source
Dark purple	37.42 ± 0.98^a	44.34 ± 0.89^a	32.23 ± 1.02^c	11.68 ± 0.66^a	Surat Thani Province
Light purple	37.81 ± 1.03^a	43.21 ± 1.06^a	39.18 ± 1.05^b	5.62 ± 0.14^b	Surat Thani Province
				4.67 ± 0.00^b	Krabi Province
Purplish white	29.44 ± 0.28^b	31.39 ± 0.37^b	30.99 ± 1.46^c	1.50 ± 0.34^c	Surat Thani Province
White	32.46 ± 0.70^b	32.46 ± 1.06^b	56.86 ± 4.32^a	0.33 ± 0.09^d	Surat Thani Province
F-test	*	*	*		
C.V. (%)	13.32	16.86	25.13		

Remark Means $\pm$ standard deviation followed by different letters in the same column denote significant differences at $P \leq 0.05$ as determined by LSD * = significant.

1.4 การวิจัยในครั้งนี้ยังได้ศึกษาเพิ่มเติมในลักษณะอื่น ๆ โดยเฉพาะลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ เนื่องจากเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดของพืช อาทิ รูปร่างของเกสรเพศเมีย เกสรเพศผู้ รังไข่ เรณู ฝัก และเมล็ด โดยพบว่าเทียนสิรินธรจากทั้ง 2 พื้นที่มีลักษณะเหล่านี้คล้ายคลึงกัน ดังภาพที่ 3 (Figure 3)

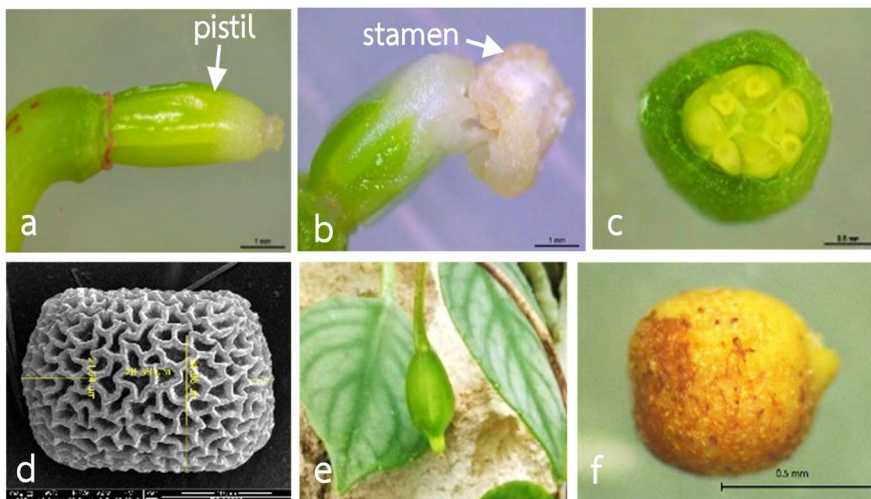


Figure 3 Some characteristics of the reproductive parts of *Impatiens sirindhorniae*, a. pistil, b. stamen, c. x-section of ovary, d. pollen, e. fruit, and f. seed. Scale a. & b. = 1 mm, c. & f. = 0.5 mm.

2. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ GeneJET Genomic DNA Purification Kit พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ A260/280 อยู่ในช่วง 1.40-1.80 และจากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากคูไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน matK และยีน rbcL พบว่ามีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 800 คู่เบส และ 750 คู่เบส ตามลำดับ

2.2 จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sequencing พบว่าผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีโครมาโทแกรม (Chromatogram) ที่มีคุณภาพดี และไม่มีสัญญาณรบกวน ส่วนผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน matK และยีน rbcL ของเทียนสรีนธจากทั้ง 2 ประชากรด้วยโปรแกรม ClustalX พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวมีความเหมือนกันค่อนข้างสูงแต่มีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่บ้างเล็กน้อยด้วย

2.3 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน matK และยีน rbcL ในเทียนสรีนธของทั้ง 2 พื้นที่กับเทียนชนิดอื่น ๆ โดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 5.0 พบว่าเทียนสรีนธมีความสัมพันธ์กับเทียนชนิด *Impatiens inaperta* H.Perrier มากกว่าเทียนชนิดอื่น ๆ ถึงร้อยละ 82 ดังภาพที่ 4 (Figure 4)

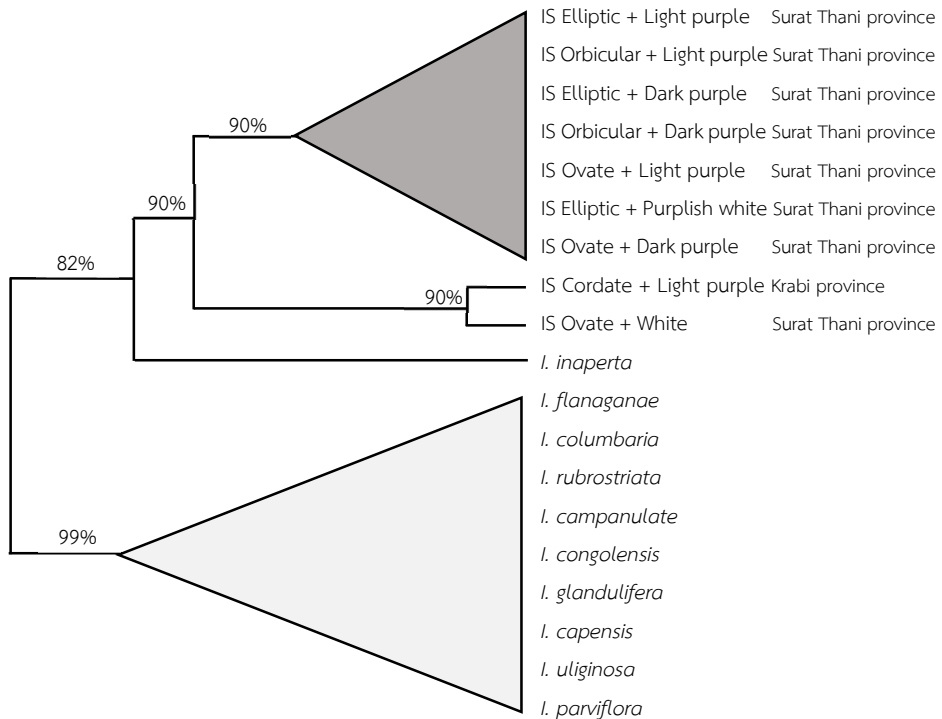


Figure 4 Phylogenetic tree derived from analyses of matK sequence data from 9 samples of *Impatiens sirindhorniae*, and 10 outgroup representatives.

2.4 การวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม (Pairwise alignment) พบว่าบริเวณยีน matK มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดอยู่ที่ 0.00–0.40 โดยเทียบสรีนธจาก จ.กระบี่ มีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก จ.สุราษฎร์ธานี อยู่ที่ 0.40 ซึ่งต่ำกว่าความผันแปรระหว่างชนิดของเทียบชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในช่วง 0.46–0.53 ในขณะที่ยีน rbcL มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดอยู่ที่ 0.00 และระหว่างชนิดที่ 0.72–0.78 ดังตารางที่ 3 (Tabel 3)

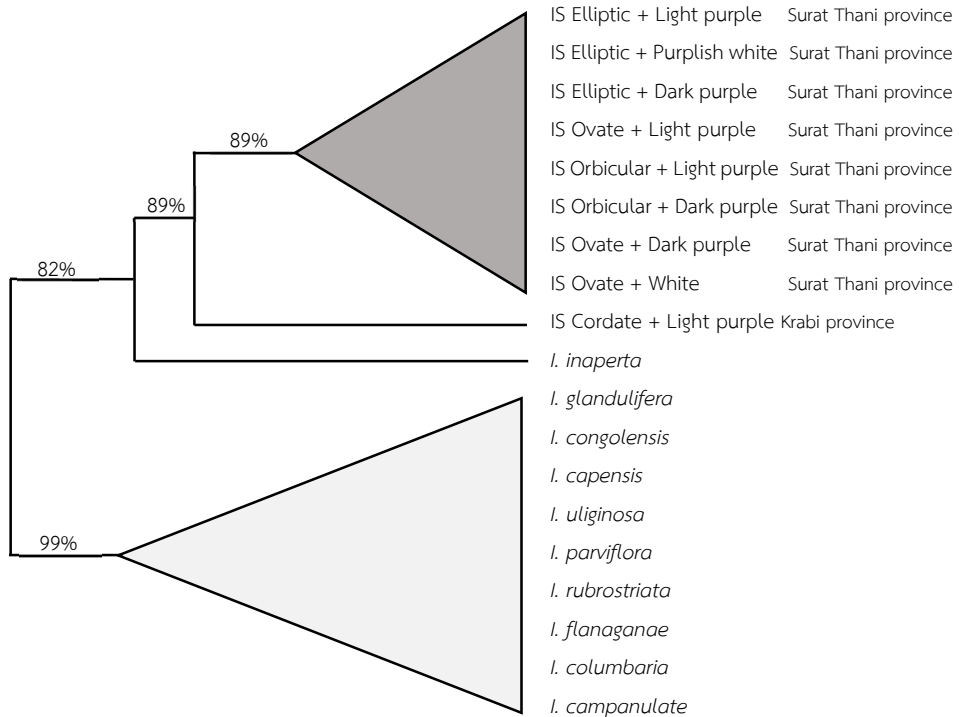


Figure 5 Phylogenetic tree derived from analyses of *rbcl* sequence data from 9 samples of *Impatiens sirindhorniae*, and 10 outgroup representatives.

อภิปรายผล

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบและดอกเทียนสิรินธรจากพื้นที่เขื่อนรัชชประภา จ.สุราษฎร์ธานี และพื้นที่ อ.ปลายพระยา จ.กระบี่ พบว่ามีความแตกต่างทั้งสีลำต้น ขนาด รูปร่างและสีใบ และขนาดดอก โดยตัวอย่างพรรณไม้จากพื้นที่เขื่อนรัชชประภามีความแปรผันในลักษณะสัณฐานสูงกว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างพรรณไม้จากพื้นที่ จ.กระบี่ จึงเป็นที่เข้าใจได้หากจะมีผู้ที่สับสนและเห็นแย้งว่าไม่ควรจำแนกเป็นชนิดเดียวกัน แต่ทั้งนี้ลักษณะเหล่านี้สามารถแปรผันตามคุณภาพของปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมของสภาพพื้นที่ที่พืชเจริญอยู่ได้ (Iroka et al., 2015) ซึ่งพบว่าเทียนสิรินธรจากพื้นที่เขื่อนรัชชประภาขึ้นอยู่ตามรอยแตกของหินปูนบริเวณหน้าผาที่เปิดโล่ง มีอินทรีย์วัตถุหรือหน้าดินน้อยมาก ในขณะที่เทียนสิรินธรจากพื้นที่ จ.กระบี่ เจริญในบริเวณที่มีอินทรีย์วัตถุและรุ่มเงามากกว่า ทำให้พรรณไม้มีสีใบและลำต้นเขียวเข้มกว่าเทียนสิรินธรจากพื้นที่ จ.สุราษฎร์ธานี ซึ่งกล่าวได้ว่าสภาพแวดล้อมที่แตกต่างของ จ.กระบี่ และ จ.สุราษฎร์ธานี อาจส่งผลให้ปริมาณคลอโรฟิลล์ในส่วนต่าง ๆ ของพืช

แตกต่างกัน (Chanapug et al., 2011) สอดคล้องกับงานวิจัยในพืชเกษตรที่ระบุว่าอัตราการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ a และ b ในใบที่โตเต็มที่แล้วจะสูงมากขึ้นเมื่อพืชในรับแสงมากและเป็นระยะเวลานาน (Fahad et al., 2017) ส่วนการที่เทียนสรีนธจากพื้นที่ จ.สุราษฎร์ธานี มีขนาดและความหนาของใบมากกว่าเทียนสรีนธจากพื้นที่ จ.กระบี่ ก็น่าจะเนื่องมาจากการปรับตัวเพื่อเพิ่มพื้นที่ในการกักเก็บน้ำเนื่องจากเทียนสรีนธเป็นพืชชอบน้ำที่ขึ้นบนเขาหินปูนซึ่งเป็นสภาพถิ่นอาศัยที่ต้องเผชิญกับความแห้งแล้งอยู่บ่อยครั้งเพราะพื้นที่ไม่สามารถกักเก็บน้ำไว้ได้นาน การเก็บน้ำในลักษณะดังกล่าวทำให้พืชสามารถมีชีวิตรอดในสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งได้ นอกจากนี้รูปร่างของใบพืชแต่ละชนิดที่ต่างกัน อาจเป็นผลจากการตอบสนองต่อระบบนิเวศของพื้นที่นั้น ๆ เพื่อให้พืชสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (Lim et al., 2001)

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าลักษณะสัณฐานวิทยาหลายประการจะแปรผันไปตามสภาพแวดล้อม แต่พบว่าลักษณะรูปร่างของเกสร เรณู และ เมล็ด ของเทียนสรีนธจากทั้ง 2 พื้นที่มีความคล้ายคลึงกัน แสดงว่าลักษณะเหล่านี้ไม่ได้แปรผันไปตามคุณภาพของถิ่นอาศัย ดังนั้นจากผลการศึกษาทางด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาจึงไม่สนับสนุนการจำแนกเทียนสรีนธของทั้ง 2 พื้นที่แยกออกจากกัน ทั้งในระดับชนิดและระดับที่ต่ำกว่าชนิด (intraspecific unit)

เมื่อพิจารณาถึงผลการศึกษาด้านชีวโมเลกุลพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน matK และยีน rbcL ของเทียนสรีนธของทั้ง 2 ประชากรนั้นมีความเหมือนกันค่อนข้างสูง โดยความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดอยู่ที่ 0.00–0.40 ซึ่งต่ำกว่าความผันแปรระหว่างชนิดเมื่อเทียบกับเทียนชนิดอื่น ๆ (Table 3 and 4) ทำให้เห็นว่าเป็นการใช้เทคนิควิธีนี้ในการจำแนกเทียนสรีนธทั้ง 2 ประชากรจากกันไม่ได้ เช่นเดียวกับ Cafa et al. (2020) ที่ศึกษาสถานะทางอนุกรมวิธานของเทียนหิมาลัย (*Impatiens glandulifera*) ซึ่งเป็นพืชรุกรานในพื้นที่ศึกษาด้วยเทคนิคเดียวกันนี้และพบว่าไม่สามารถจำแนกเทียนหิมาลัย 2 ประชากรที่มีความแตกต่างกันได้ ดังนั้นการใช้เทคนิคนี้เพื่อจำแนกชนิดของพืชสกุลเทียนอาจต้องศึกษาเพิ่มเติมในบริเวณอื่นของยีน เช่น การศึกษาสถานะทางอนุกรมวิธานของพืชสกุลเทียน 6 ชนิดจากประเทศจีนด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมของยีนในคลอโรพลาสต์เทียบกับ 6 ชนิดเดิมที่เคยมีรายงานไว้แล้ว พบว่าสามารถจำแนกได้เป็นอย่างดี (Lou et al., 2021)

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาในแต่ละยีนพบว่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน matK (0.00–0.40) สูงกว่ายีน rbcL (0.00) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในพืชหลายกลุ่ม เช่น กล้วยไม้สกุลก้านก่อ (*Eria Schltr.*) กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (*Coelogyne Lindl.*) กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum Pfitzer*) และ พืชสกุลมะเขือ (*Solanum L.*) ที่พบว่ายีน rbcL มีประสิทธิภาพในการจำแนกชนิดต่ำกว่ายีน matK (Thanananta et al., 2016; Prommanee, 2017; Jiemjuejun et al., 2018; Meesangium et al., 2018; and Siritheptawee et al., 2018)

Table 3 Nucleotide genetic divergence values among sequences of the matK gene of *Impatiens* spp. included in the phylogenetic analyses with the MEGA 5.0 program.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.
1. IS Elliptic + Light purple	0.00																		
2. IS Orbicular + Light purple	0.00	0.00																	
3. IS Elliptic + Purplish white	0.00	0.00	0.00																
4. IS Ovate + Dark purple	0.00	0.00	0.00	0.00															
5. IS Cordate + Light purple	0.40	0.40	0.40	0.40	0.00														
6. IS Ovate + White	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.00													
7. IS Elliptic + Dark purple	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	0.36	0.00												
8. IS Orbicular + Dark purple	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	0.36	0.00	0.00											
9. IS Ovate + Light purple	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	0.36	0.00	0.00	0.00										
10. <i>I. uliginosa</i>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.48	0.50	0.50	0.50	0.50	0.00									
11. <i>I. rubrostriata</i>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.52	0.49	0.50	0.50	0.50	0.37	0.00								
12. <i>I. parviflora</i>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.49	0.50	0.50	0.50	0.50	0.13	0.38	0.00							
13. <i>I. inaperta</i>	0.45	0.45	0.45	0.45	0.51	0.50	0.45	0.45	0.45	0.54	0.50	0.52	0.00						
14. <i>I. glandulifera</i>	0.50	0.50	0.50	0.50	0.51	0.49	0.50	0.50	0.50	0.42	0.46	0.28	0.51	0.00					
15. <i>I. flanaganae</i>	0.47	0.47	0.47	0.47	0.48	0.48	0.47	0.47	0.47	0.38	0.30	0.33	0.50	0.37	0.00				
16. <i>I. congolensis</i>	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.52	0.49	0.49	0.49	0.38	0.41	0.40	0.48	0.43	0.41	0.00			
17. <i>I. columbaria</i>	0.48	0.48	0.48	0.48	0.47	0.48	0.48	0.48	0.48	0.36	0.28	0.39	0.51	0.43	0.17	0.39	0.00		
18. <i>I. capensis</i>	0.51	0.51	0.51	0.51	0.53	0.50	0.51	0.51	0.51	0.34	0.39	0.37	0.50	0.41	0.37	0.39	0.35	0.00	
19. <i>I. campanulate</i>	0.46	0.46	0.46	0.46	0.48	0.49	0.46	0.46	0.46	0.39	0.29	0.39	0.51	0.43	0.13	0.41	0.14	0.36	0.00

Table 4 Nucleotide genetic divergence values among sequences of the *rbCL* gene of *Impatiens* spp. included in the phylogenetic analyses with the MEGA 5.0 program.

	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.
1. IS Elliptic + Light purple	0.00																		
2. IS Orbicular + Light purple	0.00	0.00																	
3. IS Elliptic + Purplish white	0.00	0.00	0.00																
4. IS Ovate + Dark purple	0.00	0.00	0.00	0.00															
5. IS Cordate + Light purple	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00														
6. IS Ovate + White	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00													
7. IS Elliptic + Dark purple	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00												
8. IS Orbicular + Dark purple	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00											
9. IS Ovate + Light purple	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00										
10. <i>I. uliginosa</i>	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.00									
11. <i>I. rubrostriata</i>	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.53	0.00								
12. <i>I. parviflora</i>	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.77	0.18	0.53	0.00							
13. <i>I. inaperta</i>	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.69	0.74	0.00						
14. <i>I. glandulifera</i>	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.61	0.63	0.43	0.72	0.00					
15. <i>I. flanaganæ</i>	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.53	0.44	0.43	0.70	0.53	0.00				
16. <i>I. congolensis</i>	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.58	0.58	0.6	0.71	0.62	0.60	0.00			
17. <i>I. columbaria</i>	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.76	0.52	0.43	0.53	0.70	0.61	0.20	0.58	0.00		
18. <i>I. capensis</i>	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74	0.51	0.54	0.54	0.72	0.62	0.52	0.57	0.50	0.00	
19. <i>I. campanulate</i>	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.51	0.45	0.52	0.71	0.60	0.19	0.60	0.20	0.50	0.00

สรุปผลการวิจัย

แม้ว่าลักษณะใบและดอกของเทียนสิรินธรจากเขื่อนรัชชประภา จ.สุราษฎร์ธานี จะมีลักษณะที่แตกต่างจากเทียนสิรินธรที่พบในพื้นที่ อ.ปลายพระยา จ.กระบี่ แต่ผลการศึกษาด้านเรณูวิทยาและสัณฐานวิทยาของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับสืบพันธุ์นั้นพบว่ามีความคล้ายคลึงกันสูง ส่งผลให้ข้อมูลที่ค้นพบยังไม่สนับสนุนการจัดจำแนกเทียนสิรินธร 2 ประชากรนี้ให้เป็นคนละหน่วยทางอนุกรมวิธาน (taxa) กัน สอดคล้องกับผลการศึกษาด้านชีววิทยาโมเลกุลด้วยเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบยีน matK และ rbcL ที่พบว่ามีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดน้อยมากคือ มีเพียง 0.00–0.40 ซึ่งต่ำกว่าความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดของเทียนชนิดอื่น ๆ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงสรุปว่ายังคงเห็นควรให้จัดเทียนสิรินธร (*Impatiens sirindhorniae*) จากทั้ง 2 ประชากร คือ จากพื้นที่เขื่อนรัชชประภา จ.สุราษฎร์ธานี และ อ.ปลายพระยา จ.กระบี่ เป็นชนิดเดียวกัน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย (เขื่อนรัชชประภา) ที่สนับสนุนงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณผู้อำนวยการเขื่อนรัชชประภา และผู้บริหารทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้ในทุกมิติ ขอขอบคุณ ดร.ครรชิต งามแสนโรจน์ และนายกิจจา ศรีทองกุล ที่ให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษางานวิจัย ขอขอบคุณ ดร.ปิยรัชฎ์ ปริญาพงษ์ เจริญทรัพย์ ที่ประสานการดำเนินงาน อพ.สธ. และให้ความกรุณาเป็นที่ปรึกษา ขอขอบคุณ นายวิโรจน์ โรจนจินดา ว่าที่ร้อยตรี สุทธิรักษ์ หนองแก้ว ดร.สุริรัตน์ เย็นซ้อน นายพนรัตน์ สุลีทัศน์ นายสุเทพ เทพสุริวงศ์ นายปราโมทย์ บัวแก้ว นายวิชัย เพ็งจันทร์ และนายอำนาจ เดิมแก้ว ที่ให้ความร่วมมืออย่างดียิ่งทั้งการอำนวยความสะดวกพื้นที่และด้านอื่น ๆ ในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Cafa G, Baroncelli R, Ellison CA, Kurose D. *Impatiens glandulifera* (Himalayan balsam) chloroplast genome sequence as a promising target for populations studies. Peer Journal 8:e8739 DOI 10.7717/peerj.8739.
- Chamchamroon V. Flora of Thailand and assessment of plant status in Thailand. Bangkok: Thailand forest ecological research network (T-FERN), 2012.
- Chanapug W, Kaveeta L, Malee Nanakorn M, Rungsarid Kaveeta R. Physiological Characteristics Related to Productivity of Elite Soybean Lines. Bangkok: Kasetsart University, 2011.

- Fahad S, Bajwa AA, Nazir U, Anjum SA, Farooq A, Zohaib A, Huang J. Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in Plant Science* 2017;8:1147.
- Fazekas AJ, Burgess KS, Kesanakurti PR, Graham SW. Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS One* 2008;3(7):e2802.
- Gao T, Sun Z, Yao H, Song J, Zhu Y, Ma X, Chen, S. Identification of Fabaceae plants using the DNA barcode matK. *Planta Medica* 2011;77:92-94.
- Habert PD, Cywinska A, Ball SL, Ward JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society's Flagship Biological Research Journal* 2003;270:313-321.
- Hollingsworth PM, Graham SW, Little DP. Choosing and using a plant DNA barcode. *Plos One* 2011; 6: e19254.
- Iroka CF, Okeke CU, Izundu AI, Okereke NC, Nyanayo BL, Ekwealor KU. Taxonomic Significance of Morphological Characters in the Species of *Stachytarpheta* Found in Awka, Nigeria. *International Journal of Plant & Soil Science* 2015;8(3):1-6.
- Jiemjuejun J, Thanananta T, Thanananta N. Assessment of Genetic Relationship and Identification of Orchids in the Genus *Eria* Using Nucleotide Sequences of matK and rbcL Genes. *Thai Science and Technology Journal* 26(1):91-102.
- Jinbo U, Kato T, Ito M. Current progress in DNA barcoding and future implications for entomology. *Entomological Science* 2011;14(2):107-124.
- Khan S, Mirza KJ, Abidin MZ. DNA fingerprinting for the authentication of *Ruta graveolens*. *The African Journal of Biotechnology* 2011;10:8709-8715.
- Kress WJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzan DH. Use of DNA barcode to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 2005;105:2923-2928.
- Lim M, Sdoodee S, Onthong J, Chanawirawan S. Patterns of annual growth and development of Longkong in the Southern Region of Thailand. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 2001;23:467-468.
- Lou C, Huang W, Sun H, Yer H, Li X, Li Y, Yan B, et al. Comparative chloroplast genome analysis of *Impatiens* species (Balsaminaceae) in the karst area of China: insights into genome evolution and phylogenomic implications. *BMC Genomics* 2021;22:571.
- Meesangium T, Thanananta T, Thanananta N. Assessment of genetic relationship and identification of Mottled leaf *Paphiopedilum* Base on Nucleotide Sequences of matK and rbcL Genes. *Thai Science and Technology Journal* 2018;103-112.
- Poopath M, Flora of Tham Pra Thun Non-Hunting Area, Uthaitхани Province. Bangkok: The Agricultural Co-Operative Federation of Thailand Ltd., 2014.
- Poopath M, Tetsana N. Limestone Flora Phu Khieo Nam Nao. Bangkok: Omega Printing Co., Ltd; 2018.

- Prommanee W. DNA Barcoding of plants in the genus *Solanum* L. in Thailand. Nakhon Pathom: Silpakorn University; 2017.
- Santisuk, T, Chayamarit K, Pooma R, Suddee S. Thailand Red Data: Plants. Bangkok: Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning (ONEP); 2006.
- Shewchenko O, Asanok L, Marod D. Forest structure and species composition of limestone forest after mining, Phrae province. *Thai Journal of Forestry* 2018;37(1):73-83.
- Siritheptawee P, Thanananta T, Thanananta N. Genetic Relationship Assessment and Identification of strap-leaf *Paphiopedilum* base on Nucleotide Sequences of *rbcl* and *matK* Gene. *Thai Science and Technology Journal* 2018;26(1):113-120.
- Suksathan P, Ruchisabsakun S. *Impatiens* of Thailand. Borneo: Natural History Publications; 2020.
- Suksathan P, Triboun P. Ten new species of *Impatiens* (Balsaminaceae) from Thailand. *Gardens' Bulletin Singapore* 2009;61(1):159-184.
- Thanananta N, Hongtongdee P, Thanananta T. Genetic Relationship Assessment and Identification of *Coelogyne* Using Nucleotide Sequences of *matK* and *rbcl* Gene. *Thai Journal of Science and Technology* 2016;5(2):169-180.
- Thanananta N, Tansa-nga W, Thanananta T. Identification and Genetic Relationship Analysis of *Aerides* Varieties Using High Annealing Temperature - Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Techniques. *Thai Journal of Science and Technology* 2014;2(5):664-673.
- Triboun P, Sonsupab B, Phontri P, Somprasong W, Prachasaisoradej V, Penjit P, Chartisathian J. Studies on limestone flora of the family Gesneriaceae and Balsaminaceae. Bangkok: Plant Varieties Protection Office, Department of Agriculture; 2012.
- van Welzen PC, Madern A, Raes N, Parnell JAN, Simpson D A, Byrne C, Curtis T, Teerawatananon A. The current and future status of floristic provinces in Thailand. In: *Land Use, Climate Change and Biodiversity Modeling: Perspectives and Applications*. IGI Global; 2011.
- Wattoo JI, Saleem MZ, Shahzad MS, Arif A, Hameed A, Saleem MA DNA Barcoding: Amplification and sequence analysis of *rbcl* and *matK* genome regions in three divergent plant species. *Advancements in Life Sciences* 2016;4(1):3-7.