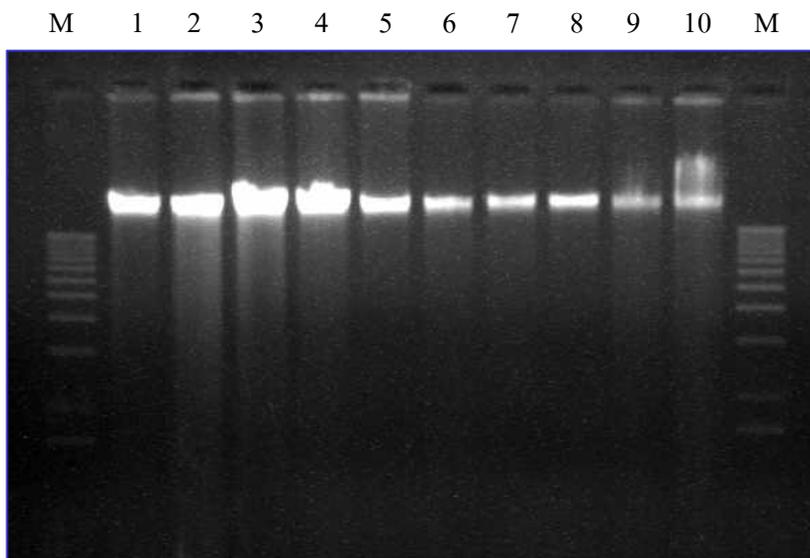


## ผลและวิจารณ์

### 1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ โดยใช้เทคนิค เอเอฟแอลพี

#### 1.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอ

พบว่า การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (1990) และ Changtragoon *et al.* (1996) สามารถสกัดดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพ การใช้ใบอ่อนนำมาสกัดดีเอ็นเอ จะทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอจำนวนมาก และมีการปนเปื้อนของสิ่งไม่พึงประสงค์ปริมาณน้อยซึ่งสังเกตได้หลังจากขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล ตัวอย่างที่ใช้ใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอจะได้ดีเอ็นเอที่ใสไม่มีสี ในขณะที่ตัวอย่างที่ใช้ใบแก่มาสกัดดีเอ็นเอ พบว่าบางหลอดมีการปนเปื้อนของสารสีฟ้า ซึ่งคาดว่าจะเป็นการปนเปื้อนของสารพวกเบ็ง โปรตีน และสารพวกฟีนอลิกคอมพาวด์อื่น ๆ จากผลการทดลองที่พบว่าใบอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารี สามารถนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอได้ดี เมื่อพิจารณาแล้วพบว่าใบยอดซึ่งเป็นใบอ่อนน่าจะมิกิจกรรมหลักเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต ทำให้มีปริมาณดีเอ็นเอมากและมีสิ่งปนเปื้อนน้อย ในขณะที่ใบแก่จะมีการสะสมของสารดังกล่าวอยู่ในปริมาณมาก นอกจากนี้ยังพบว่าใบของกล้วยไม้รองเท้านารีมีส่วนที่เป็นของเหลวอยู่ปริมาณมาก เมื่อนำมาบดให้ละเอียดร่วมกับไนโตรเจนเหลวแล้วนำ 2x CTAB buffer มาใส่รวมกัน มักจะเกิดปัญหาการเข้าผสมกันยาก เนื่องจากใบกล้วยไม้รองเท้านารีที่บดแล้วจะเกาะรวมตัวกันเป็นก้อนเหนียว ทำให้ 2x CTAB buffer ไม่สามารถทำการย่อยเซลล์และกำจัดสารพวกโปรตีนได้อย่างเต็มที่ อาจเป็นผลทำให้การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB ไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร จากการทดลองแก้ปัญหานี้พบว่า การบดใบกล้วยไม้รองเท้านารีพร้อมกันกับ 2x CTAB buffer โดยใช้ใบกล้วยไม้รองเท้านารีประมาณ 0.4 กรัม มาบดในโถรงบดยาที่เติม 2X CTAB buffer ปริมาณ 1,500 ไมโครลิตร เมื่อละเอียดดีแล้วถ่ายของเหลวที่ได้ลงในหลอดทดลองขนาด 1,500 ไมโครลิตร จากนั้นดำเนินการสกัดดีเอ็นเอต่อตามวิธี CTAB โดยปกติ เมื่อนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพและเช็ควัสดุโดยวิธีทำอิลีกโทรโฟรีซิสแล้ว แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ที่สกัดได้ มีปริมาณมากและดีเอ็นเอมีคุณภาพดี (ภาพที่ 2)



**ภาพที่ 2** แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ร่องเท่านั้นริเหลืองกระบี่ที่สกัดได้ เครื่องหมาย M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบวัดปริมาณดีเอ็นเอ ตัวเลข 1-10 เป็นบางตัวอย่างของกล้วยไม้ร่องเท่านั้นริเหลืองกระบี่ที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ

## 1.2 ผลการคัดเลือกคู่ไพโรมอร์

การคัดเลือกคู่ไพโรมอร์ที่เหมาะสม สำหรับการศึกษความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ร่องเท่านั้นริเหลืองกระบี่ ได้ทำการคัดเลือกคู่ไพโรมอร์ทั้งสิ้น 64 คู่ โดยสุ่มตัวอย่างกล้วยไม้ร่องเท่านั้นริเหลืองกระบี่จากทั้ง 6 แหล่งดังที่กล่าวมาแล้วจำนวน 10 ตัวอย่าง (ภาพที่ 3) พบว่ามีคู่ไพโรมอร์ที่เหมาะสมต่อกล้วยไม้ร่องเท่านั้นริเหลืองกระบี่ทั้งสิ้นจำนวน 13 คู่ ไพโรมอร์ ได้แก่ E-ACA/M-CAA, E-AGC/M-CAA, E-ACC/M-CAC, E-AAG/M-CAG, E-ACA/M-CAG, E-AGC/M-CAG, E-AGC/M-CAT, E-AAC/M-CTC, E-ACA/M-CTC, E-ACT/M-CTC, E-AGC/M-CTC, E-ACA/M-CTT และ E-ACG/M-CTT ตามลำดับ (ตารางที่ 4) โดยสามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก มีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน (polymorphism) ในสัดส่วนที่สูง และทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัด (ภาพที่ 4-9)

จากคู่ไพโรมอร์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมดนี้ เมื่อนำมาทดสอบกับตัวอย่างที่ใช้ศึกษาทั้งหมดแล้ว พบว่าสามารถคัดเลือกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) ได้ทั้งสิ้น 126 ตำแหน่ง (loci) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.63 ตำแหน่งต่อหนึ่งคู่ไพโรมอร์ เนื่องจากการทำ polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้เครื่อง Gel-Scan 3000 ทำให้การปฏิบัติงานมีความสะดวก

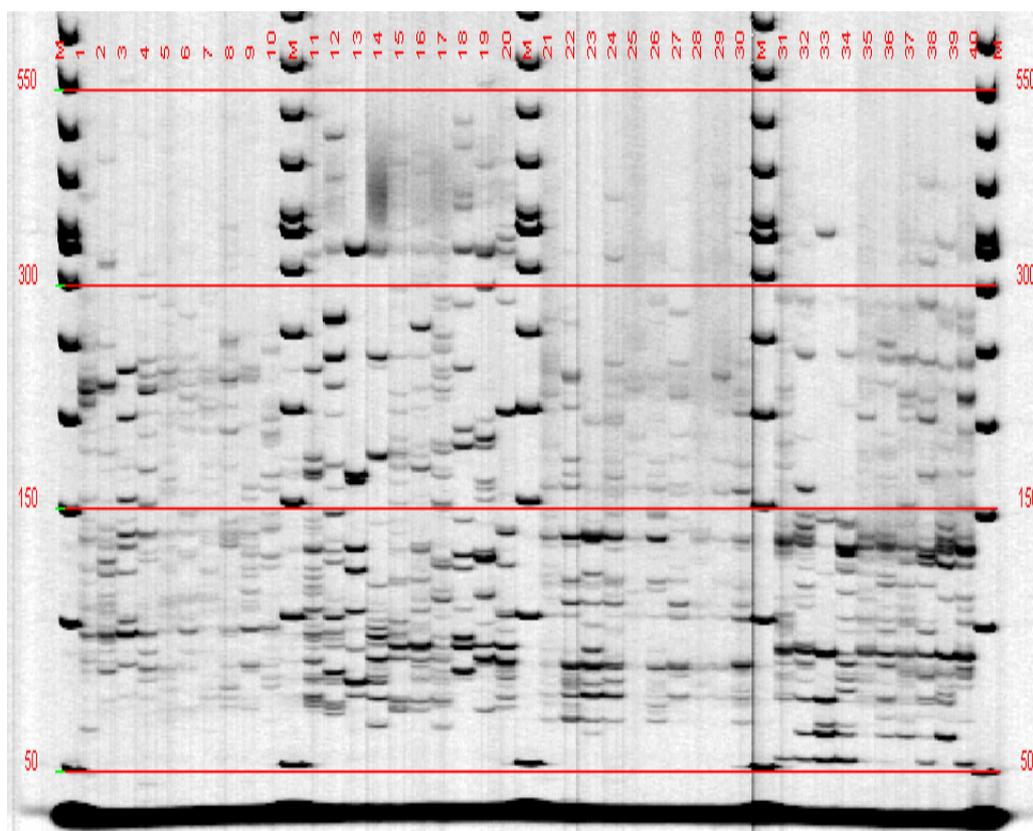
และรวดเร็ว ปลายพิมพ์เอเอฟแอลพีที่ได้มีปริมาณมาก และคู่ไพรเมอร์ต่างๆสามารถทำให้เกิดลายพิมพ์ได้หลายสิบตำแหน่ง แต่บางตำแหน่งมีขนาดใกล้เคียงกันมาก นอกจากนี้แต่ละตำแหน่งยังมีความเข้มของลายพิมพ์หลายระดับ โดยบางตำแหน่งมีระดับความเข้มต่ำมาก ซึ่งอาจจะทำให้การเก็บข้อมูลจากลายพิมพ์เอเอฟแอลพีเกิดความผิดพลาดได้ จึงได้คัดเลือกเฉพาะบางตำแหน่งซึ่งพิจารณาแล้วเห็นว่าจะทำให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องที่สุด

สาเหตุที่เทคนิคเอเอฟแอลพีทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอปริมาณมาก มีสาเหตุมาจากตำแหน่งการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดคือ *EcoRI* ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส และ *MseI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส จากความเหมาะสมของตำแหน่งการตัดดีเอ็นเอของคู่เอนไซม์ทั้งสองซึ่งจะกระจายได้ทั่วทั้งจีโนม (genome) และมีจำนวนจุดตัดมากมาย ทำให้ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับการวิเคราะห์ผลจำนวนมาก

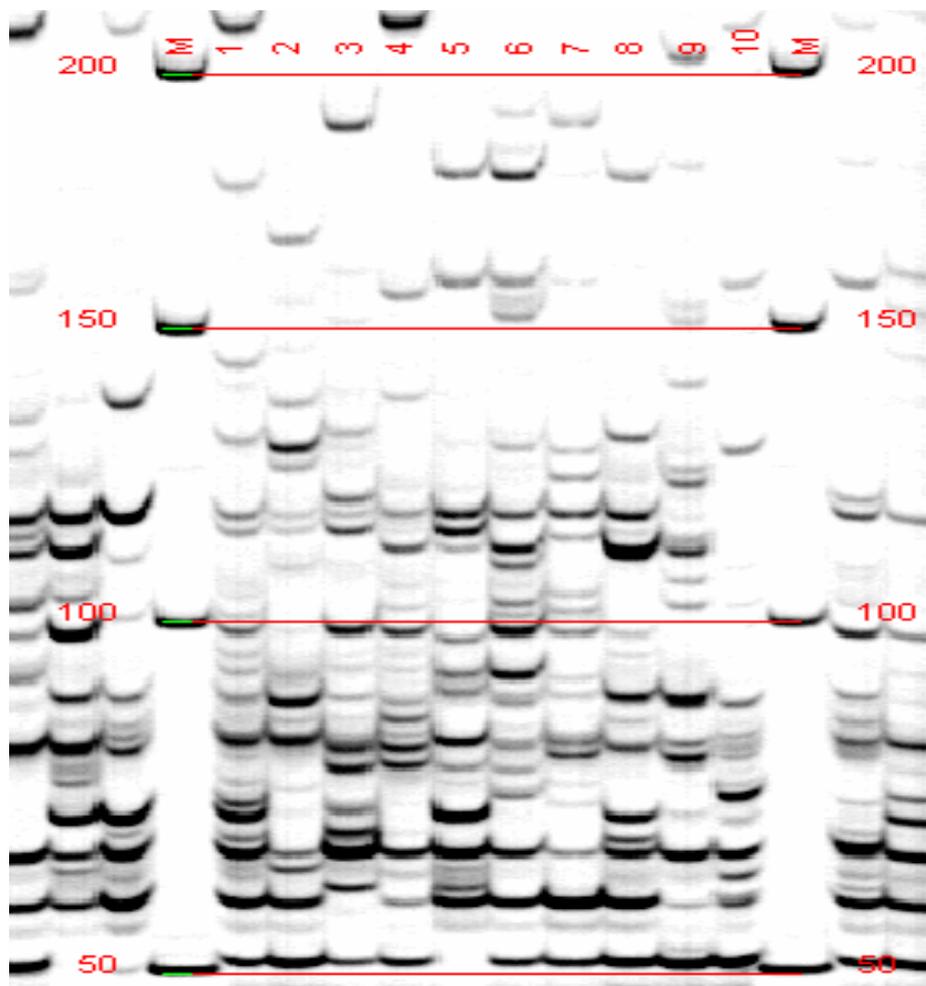
**ตารางที่ 4** คู่ไพรเมอร์จำนวน 13 คู่ ที่คัดเลือกได้จากจำนวนคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่

คู่ไพรเมอร์ E/M	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC						*		
E-AAG			*					
E-ACA	*		*			*		*
E-ACC		*						
E-ACG								*
E-ACT						*		
E-AGC	*		*	*		*		
E-AGG								

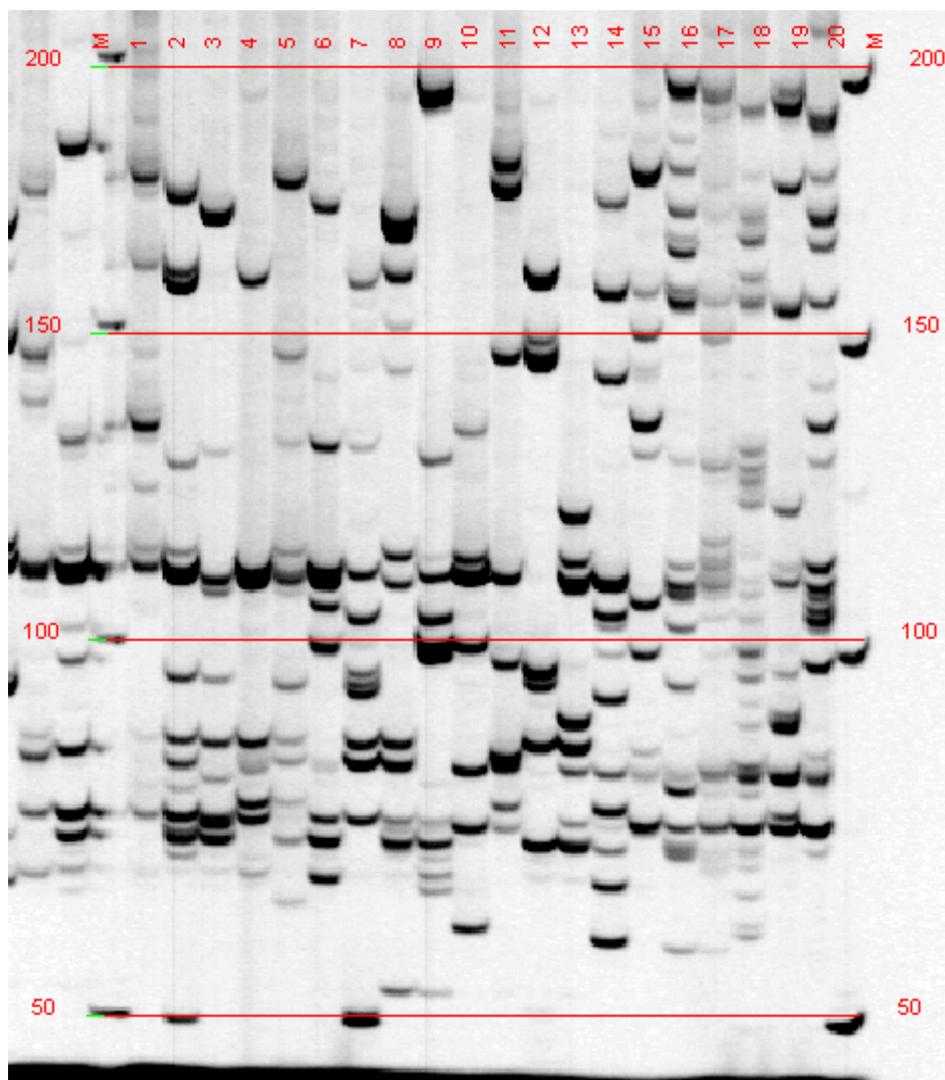
หมายเหตุ เครื่องหมาย (\*) หมายถึงคู่ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้



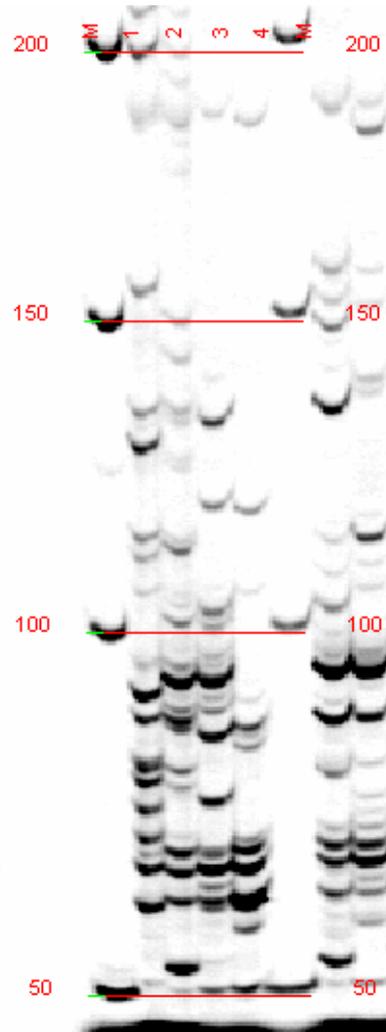
**ภาพที่ 3** ตัวอย่างการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม 4 คู่ จากทั้งหมด 64 คู่ เครื่องหมาย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่งต่างๆ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ใช้ได้จากการสุ่มมาจำนวน 10 ตัวอย่าง ในภาพแสดงการทดสอบ คู่ไพรเมอร์ 4 คู่ คือ ตั้งแต่หมายเลข 1 ถึง 10 หมายเลข 11 ถึง 20 หมายเลข 21 ถึง 30 และหมายเลข 31 ถึง 40 ตามลำดับ



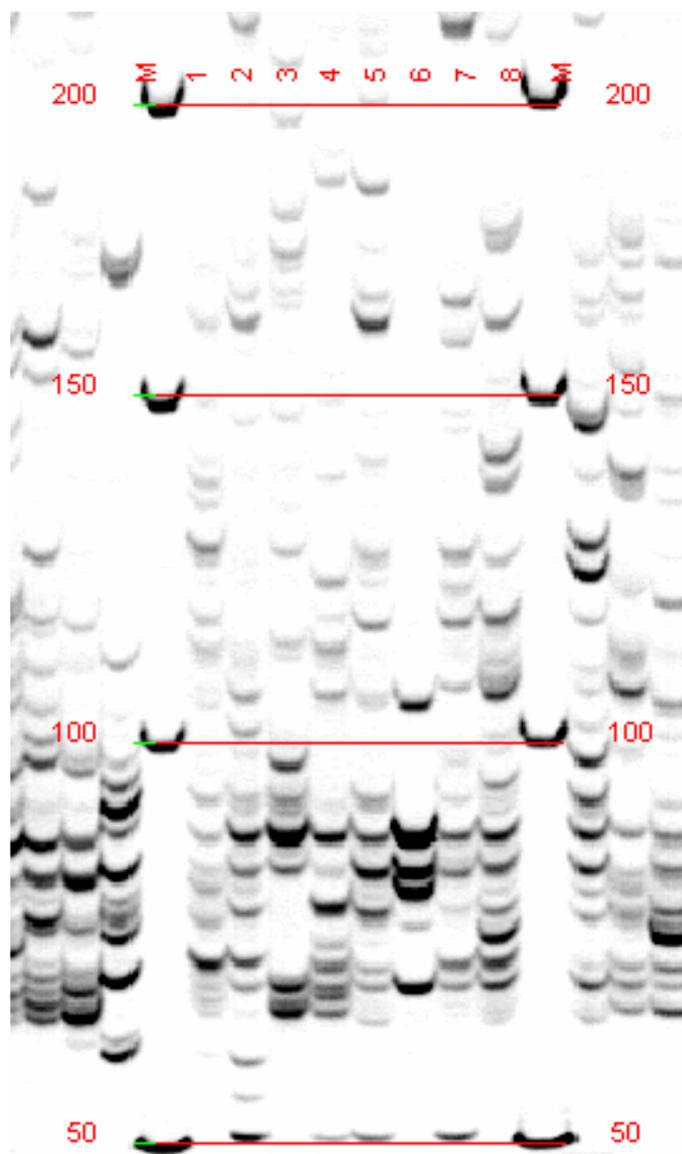
**ภาพที่ 4** แสดงภาพลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ที่ได้จากการทำ อิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เครื่อง Gel-Scan 3000 ในภาพเป็นตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพี จากการใส่คู่มือที่ E-AGC / M-CTC จากแหล่ง อ.ปะเหลียน จ.ตรัง



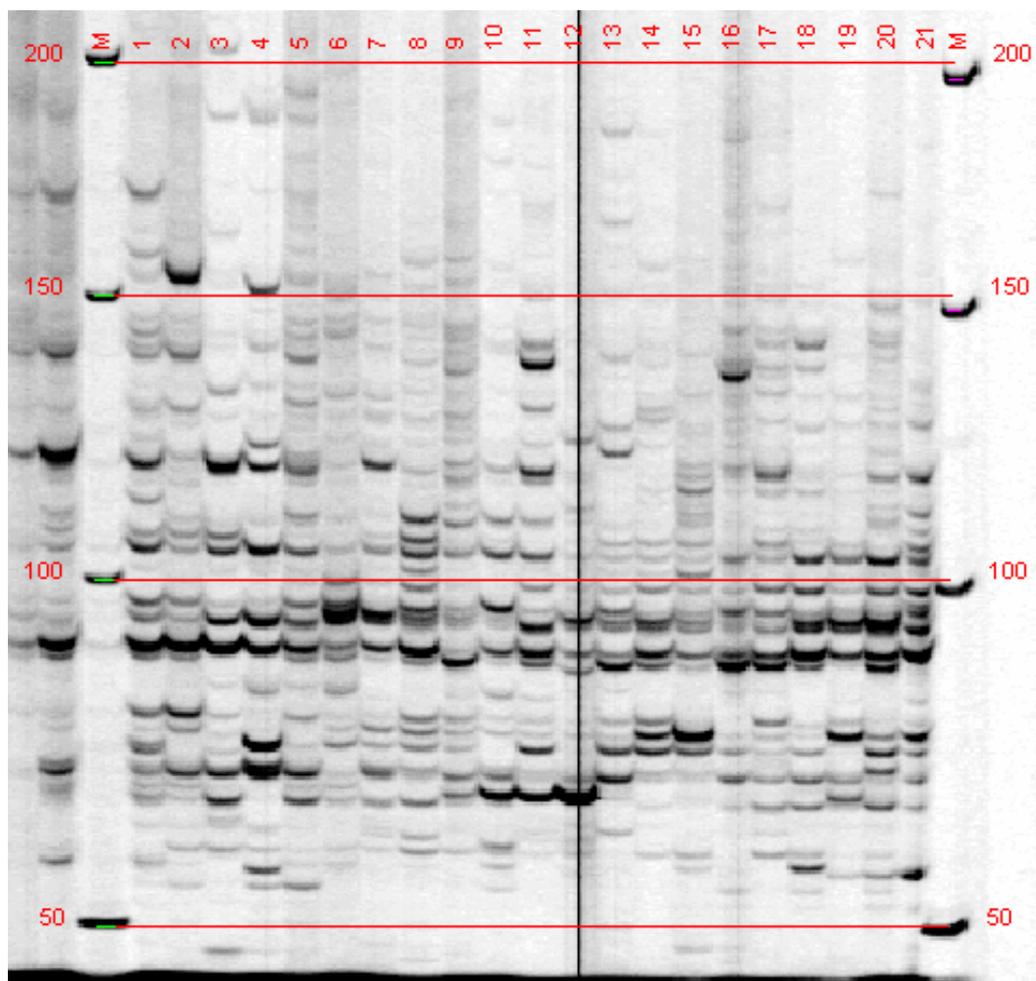
**ภาพที่ 5** แสดงภาพลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ที่ได้จากการทำ อิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เครื่อง Gel-Scan 3000 ในภาพเป็นตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพี จากการใส่คู่มือ E-ACC / M-CAC จากแหล่ง อ.ปลายพระยา จ.กระบี่



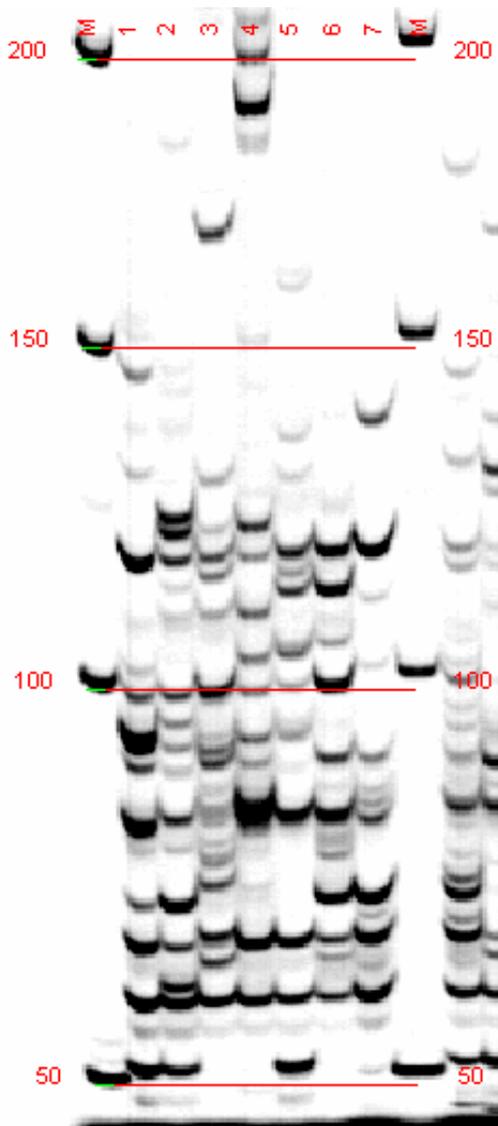
**ภาพที่ 6** แสดงภาพลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ที่ได้จากการทำ อิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เครื่อง Gel-Scan 3000 ในภาพเป็นตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพี จากการใช้คู่ไพรเมอร์ที่ E-AGC / M-CAA จากแหล่งเกษณัก อ.เมือง จ.กระบี่



**ภาพที่ 7** แสดงภาพลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ที่ได้จากการทำ อิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้เครื่อง Gel-Scan 3000 ในภาพเป็นตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพี จากการใส่คู่ไพรเมอร์ที่ E-AAC / M-CTC จากแหล่งเกาะน้อย อ.อ่าวลึก จ.กระบี่



**ภาพที่ 8** แสดงภาพลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ที่ได้จากการทำ อิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เครื่อง Gel-Scan 3000 ในภาพเป็นตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพี จากการใส่คู่มือ E-AGC / M-CAG จากแหล่งบ้านคลองเตย อ.ทับปุด จ.พังงา



**ภาพที่ 9** แสดงภาพลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ที่ได้จากการทำ อิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เครื่อง Gel-Scan 3000 ในภาพเป็นตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพี จากการใส่คู่มือเมอร์ที่ E-AGC / M-CAG จากแหล่ง อ.เขาพนม จ.กระบี่

1.3 ผลการวิเคราะห์ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) และค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (genetic differentiation among populations) ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่

เมื่อนำตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง มาวิเคราะห์ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีโดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 13 คู่ ทำให้ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวนมาก สามารถคัดเลือกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) ได้ทั้งสิ้น 126 ตำแหน่ง (loci) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TFPGA พบว่ากล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง มีค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism (95% criterion) อยู่ในช่วง 62.70 ถึง 91.27% แหล่งของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism สูงที่สุดคือแหล่งอำเภอปลายพระยา จังหวัดกระบี่ มีค่าสูงถึง 91.27% แหล่งที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism สูงเป็นอันดับที่ 2 คือแหล่งเกาะน้อย อำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่ มีค่าเท่ากับ 83.33% แหล่งที่มีสูงรองลงมาคือแหล่งบ้านคลองเตย อำเภอทับปุด จังหวัดพังงา และแหล่งอำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง มีค่าเท่ากันคือ 82.54% แหล่งที่มีค่าต่ำรองลงมาคือแหล่งอำเภอเขาพนม จังหวัดกระบี่ มีค่า 77.78% แหล่งที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism ต่ำที่สุดคือแหล่งเกาะนัง อำเภอเมือง จังหวัดกระบี่ซึ่งมีค่าเท่ากับ 62.69% โดยค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ polymorphism เท่ากับ 80.03% (ตารางที่ 5) ซึ่งถือเป็นค่าค่อนข้างสูง แต่เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism ของแหล่งเกาะนัง อำเภอเมือง จังหวัดกระบี่ ซึ่งต่ำกว่าค่าเฉลี่ยค่อนข้างมาก อาจมีสาเหตุมาจากจำนวนตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีที่รวบรวมมาได้มีจำนวนน้อยเกินไป คือมีเพียง 4 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นแหล่งที่มีตัวอย่างจำนวนน้อยที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ ที่เป็นเช่นนี้อาจมีสาเหตุมาจากจำนวนตัวอย่างที่น้อยเกินไปส่งผลต่อโอกาสในการตรวจพบความแตกต่างของซันติเอ็นเอหรือโอกาสที่จะพบการเกิดหรือไม่เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง เนื่องจากข้อมูลแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างที่ได้มาจากเทคนิคเอเอฟแอลพีนั้นเกิดขึ้นจากผลของการตัดซันติเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นจึงเป็นผลมาจากการเกิดการกลายพันธุ์ของลำดับเบสแล้วเกิดการหายไปของตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรืออาจจะเกิดจากการขาดหายไปหรือเพิ่มเข้ามาของซันติเอ็นเอทำให้ซันติเอ็นเอที่ตัดโดยเอนไซม์ตรงตำแหน่งเดียวกันมีขนาดที่แตกต่างกันได้ และปริมาณความผันแปรของตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ดังกล่าวมีอยู่มากมายแม้ว่าจะจะเป็นสิ่งมีชีวิตที่คล้ายคลึงกันหรือเป็นชนิดเดียวกันก็ตาม ดังนั้นหากทำการศึกษากับจำนวนตัวอย่างที่ยังมากขึ้นเท่าใดก็จะยิ่งเพิ่มโอกาสในการพบความผันแปรของตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์มากขึ้นเท่านั้น

ทำให้แหล่งที่มีตัวอย่างจำนวนน้อยอาจตรวจพบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดของเอนไซม์ตำแหน่งต่างๆ ได้น้อยกว่าความเป็นจริง

ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (He) อยู่ในช่วง 0.2634 ถึง 0.3341 ที่ค่าเฉลี่ย 0.3013 โดยมีค่าความหลากหลายรวมทุกแหล่งเท่ากับ 0.3384 แหล่งของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ที่มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุดคือแหล่งเกาะน้อย อำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่ มีค่าเท่ากับ 0.3341 แหล่งที่มีค่าสูงเป็นอันดับที่สองคือแหล่งอำเภอบลายพระยา จังหวัดกระบี่ มีค่า 0.3155 แหล่งที่มีค่าสูงรองลงมาคือแหล่งบ้านคลองเตย อำเภอทับปุด จังหวัดพังงา มีค่า 0.3128 รองลงมาคือแหล่งอำเภอเขาพนม จังหวัดกระบี่ มีค่า 0.2949 รองลงมาอีกคือแหล่งอำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง มีค่า 0.2873 และแหล่งเกาะนักษ์ อำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่ มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยที่สุดคือมีค่าเท่ากับ 0.2634

ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ( $F_{st}$ ) ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ในทุกแหล่งที่ทำการศึกษา มีค่าเท่ากับ 0.0821 (ตารางที่ 6) แสดงถึงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่งอยู่ประมาณ 8% ซึ่งอยู่ในระดับที่ไม่สูงนัก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่มีการกระจายพันธุ์แบบเฉพาะถิ่นอยู่ทางภาคใต้บริเวณจังหวัดตรัง กระบี่ พังงา และบริเวณอื่นๆที่มีความใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตามความแตกต่างระหว่างประชากรทั้ง 6 แหล่งของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่นี้ พบว่ามีค่าสูงกว่าค่าความแตกต่างที่ได้จากการศึกษาของ Sharma *et al.* (2003) โดยได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ดิน *Pterostylis aff. picta* ซึ่งเป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นใกล้สูญพันธุ์ของประเทศออสเตรเลีย จากการศึกษา allozymic polymorphism พบว่าค่า  $G_{st}$  ของ กล้วยไม้ดิน *Pterostylis aff. picta* ทั้ง 9 ประชากร มีค่าเพียง 0.05 ทั้งนี้อาจเพราะว่า allozyme มีจำนวนตำแหน่ง และ allele ที่จำกัด และอาจเป็นเพราะพื้นฐานทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ชนิดนี้เองด้วย เนื่องจากเป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นที่ใกล้สูญพันธุ์

**ตารางที่ 5** แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphic loci ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แห่ง

ลำดับ	ชื่อแหล่ง	จำนวนตัวอย่าง	Polymorphic loci (%)	
			99% criterion	95% criterion
1	อ.เขาพนม จ.กระบี่	7	77.7778	77.7778
2	อ.ปะเหลียน จ.ตรัง	10	82.5397	82.5397
3	อ.ปลายพระยา จ.กระบี่	20	94.4444	91.2698
4	เกาะนัง อ.เมือง จ.กระบี่	4	62.6984	62.6984
5	เกาะน้อย อ.อ่าวลึก จ.กระบี่	8	83.3333	83.3333
6	บ.คลองเตย อ.ทับปุด จ.พังงา	21	86.5079	82.5397
	Average		81.2169	80.0265

**ตารางที่ 6** แสดงค่า gene diversity ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แห่ง

ลำดับ	ชื่อแหล่ง	จำนวนตัวอย่าง	Expected heterozygosity	<i>Fst</i>
1	อ.เขาพนม จ.กระบี่	7	0.2949	
2	อ.ปะเหลียน จ.ตรัง	10	0.2873	
3	อ.ปลายพระยา จ.กระบี่	20	0.3155	
4	เกาะนัง อ.เมือง จ.กระบี่	4	0.2634	
5	เกาะน้อย อ.อ่าวลึก จ.กระบี่	8	0.3341	
6	บ.คลองเตย อ.ทับปุด จ.พังงา	21	0.3128	
	Average	11.67	0.3013	0.0821
	Total	70	0.3384	

#### 1.4 ผลการวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic distances) ระหว่างแหล่งของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ จากการวิเคราะห์ค่า genetic distances (ตารางที่ 7) ด้วยเทคนิค Unweighed Pair Group Method of Arithmetic Average (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม TFGA (Miller, 1997) พบว่าสามารถจัดกลุ่มของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แห่งตามลำดับความสัมพันธ์กันได้ดังนี้

(ตารางที่ 8) แหล่งอำเภอละเลียง จังหวัดตรัง มีความสัมพันธ์กับอำเภอบลายพระยา จังหวัดกระบี่ มากที่สุด โดยมีค่า genetic distance รวมเท่ากับ 0.0406 ลำดับถัดมาคือแหล่งบ้านคลองเตย อำเภอทับปุด จังหวัดพังงา ซึ่งมีความสัมพันธ์ห่างออกมา โดยมีค่า genetic distance รวมกับ 2 แหล่งแรกเท่ากับ 0.0482 ลำดับต่อมาคือแหล่งอำเภอเขาพนมจังหวัดกระบี่ มีค่า genetic distance รวมกับทั้ง 3 แหล่งแรกเท่ากับ 0.0579 ลำดับต่อมาคือแหล่งเกาะน้อย อำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่ มีค่า genetic distance รวมกับทั้ง 4 แหล่งที่ผ่านมาเท่ากับ 0.0689 และลำดับสุดท้ายซึ่งเป็นแหล่งที่มีความสัมพันธ์กับแหล่งอื่นๆ น้อยที่สุดคือแหล่งเกาะน้ก อำเภอเมือง จังหวัดกระบี่ มีค่า genetic distance รวมทั้งหมดเท่ากับ 0.1015 (ภาพที่ 10) เนื่องจากที่ตั้งหรือขอบเขตของพื้นที่ซึ่งระบุถึงแหล่งเก็บตัวอย่างอาจไม่สอดคล้องกับระยะห่างระหว่างพื้นที่ที่แท้จริง การพิจารณาถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งต่างๆ จึงควรอ้างอิงจากแผนที่ประกอบด้วย (ภาพที่ 1)

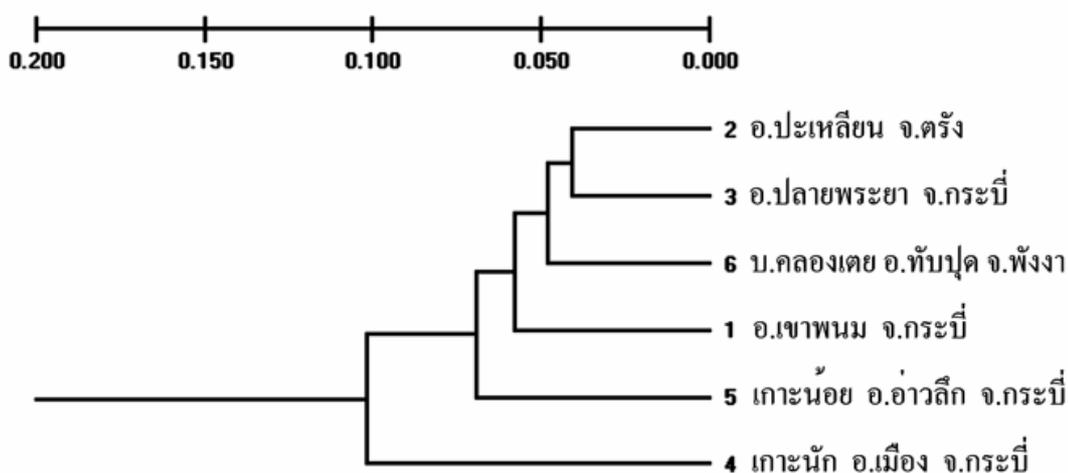
**ตารางที่ 7** แสดงค่า genetic distances และ identities (NEI'S (1972/1978) DISTANCE) ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง

I \ D	1	2	3	4	5	6
1	-	0.0373	0.0259	0.0736	0.0549	0.0452
2	0.9634	-	0.0249	0.0760	0.0428	0.0346
3	0.9744	0.9754	-	0.0786	0.0371	0.0353
4	0.9291	0.9268	0.9244	-	0.0529	0.0660
5	0.9466	0.9581	0.9635	0.9484	-	0.0434
6	0.9558	0.9660	0.9653	0.9361	0.9575	-

**ตารางที่ 8** แสดงค่า genetic distances ของการจัดกลุ่มกล้วยไม้รองเท้านารีแหล่งต่างๆ เรียงตามระดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ที่ได้จากการคำนวณ วิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม TFPGA

ระดับการจัดกลุ่ม	ค่า distance ของแต่ละกลุ่ม	แหล่งต่างๆที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม
1	0.0406	2-3
2	0.0482	2-3-6
3	0.0579	1-2-3-6
4	0.0689	1-2-3-5-6
5	0.1015	1-2-3-4-5-6

**หมายเหตุ** ระดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจะถูกเรียงลำดับจากแหล่งที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกันมากที่สุดเป็นกลุ่มเดียวกันก่อน โดยเริ่มต้นที่ 2 แหล่ง และแหล่งที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเป็นลำดับถัดมาจะถูกนำมารวมแล้วคิดเป็นกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมห่างออกไปตามลำดับ กลุ่มตัวเลขทางด้านขวาสุดเป็นลำดับของแหล่งต่างๆซึ่งอ้างอิงจากตารางที่ 1

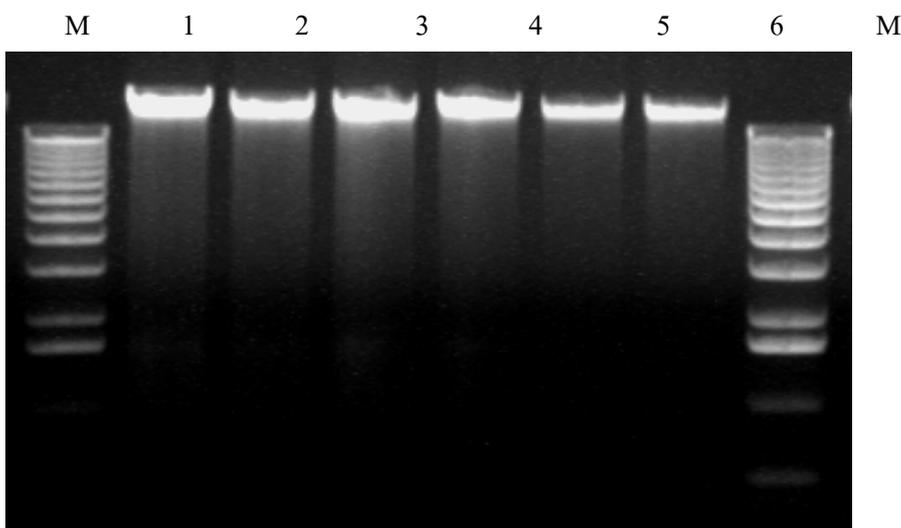


**ภาพที่ 10** แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง ตัวเลขที่อยู่ด้านหน้าชื่อแหล่งหมายถึงเลขลำดับของแหล่งซึ่งอ้างอิงจากตารางที่ 1

## 2. ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธีเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

### 2.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆ

การสกัดดีเอ็นเอได้ใช้วิธี CTAB ดัดแปลงมา Doyle and Doyle (1990) และ Changtragoon *et al.* (1996) ซึ่งเป็นวิธีเดียวกับการสกัดดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ดังที่ได้กล่าวไปแล้ว ผลการสกัดดีเอ็นเอพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆ จำนวน 17 ชนิด มีคุณภาพดี มีปริมาณมาก และไม่พบการปนเปื้อนของสิ่งไม่พึงประสงค์อันได้แก่ สารพวกคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนต่างๆ (ภาพที่ 11)

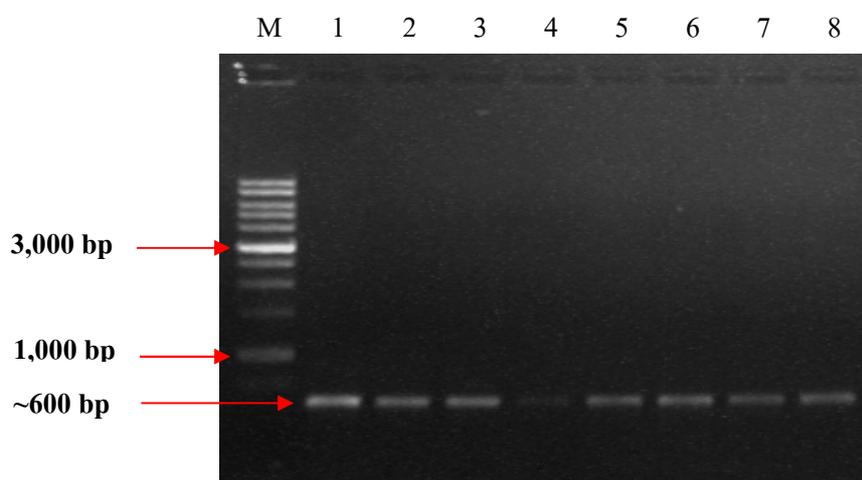


**ภาพที่ 11** แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิดที่สกัดได้ เครื่องหมาย M คือแถบ ดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบวัดปริมาณดีเอ็นเอ ตัวเลข 1-6 เป็นตัวอย่าง บางชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ

### 2.2 ผลการออกแบบไพรเมอร์และการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่งไอทีเอส โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

ผลการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอส ของกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบได้แก่ forward primer (GCG GAA GGA TCA TTG TTG AG) และ reverse primer (GAT GGG CCT CCA ATG GGG T) พบว่าสามารถเพิ่ม

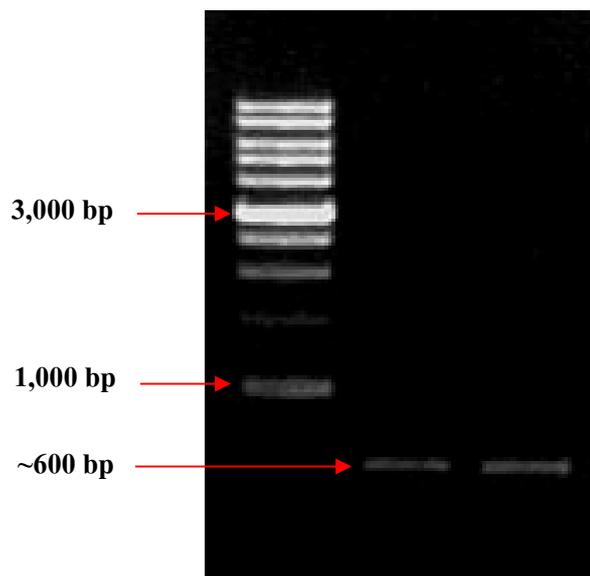
ปริมาณซันดีเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอส ได้ในกล้วยไม้ร่องเท่านั้นทุกชนิด ซันดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส ซึ่งตรงกับขนาดของซันดีเอ็นเอเป้าหมาย (ภาพที่ 12)



**ภาพที่ 12** แสดงการตรวจวิเคราะห์ซันดีเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้น เครื่องหมาย M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบวัดขนาดของซันดีเอ็นเอ ตัวเลข 1-8 เป็นการตรวจการเพิ่มปริมาณซันดีเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอสของตัวอย่างกล้วยไม้ร่องที่นำาริชนิดต่างๆ ซึ่งมีขนาดประมาณ 600 คู่เบส

2.3 ผลการโคลนซันดีเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอส และการทำโคลนพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบซันดีเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสมในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

นำซันดีเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอส ที่เพิ่มปริมาณโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบ มาต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector ทำให้ได้พลาสมิดสายผสม pGEM-T Easy / ITS sequence จากนั้นนำไปย้ายเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน เลือกอาเฉพาะโคโลนีของแบคทีเรียเจ้าบ้านที่ได้รับพลาสมิดสายผสม โดยการคัดเอาเฉพาะโคโลนีเดี่ยวสีขาวจากโคโลนีสีฟ้าและสีขาวทั้งหมดที่เพาะเลี้ยงได้ เมื่อนำโคโลนีเดี่ยวสีขาวที่คัดเลือกมาทำโคลนพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบซันดีเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอส พบซันดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส ซึ่งตรงกันกับขนาดของซันดีเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอสที่ทำการโคลน (ภาพที่ 13)



**ภาพที่ 13** แสดงการตรวจวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอส ที่ได้จากการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้น เปรียบเทียบกับการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอตำแหน่งไอทีเอส โดยตรงจากจีโนมมิกดีเอ็นเอ เครื่องหมาย M คือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบวัดขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ

2.4 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆ

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม ClustalW ClustalW (version 1.82) (Chenna *et al.*, 2003) พบว่าขนาดนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้รองเท้านารีที่มีการกระจายพันธุ์อยู่ในประเทศไทยแต่ละชนิดมีขนาดใกล้เคียงกัน คือมีขนาดตั้งแต่ 594 ถึง 611 คู่เบส ชนิดที่มีจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยที่สุดคือกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paph. niveum*) มีขนาดเพียง 594 คู่เบส ส่วนชนิดที่มีจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุดคือกล้วยไม้รองเท้านารีฝายหอย (*Paph. bellatulum*) (ภาพที่ 14)

<i>Paph. gratrixianum</i>	ATCACATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCCATGGGC	60
<i>Paph. villosum</i>	ATCACATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCCATGGGC	60
<i>Paph. x Ang Thong</i>	ATCACATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCCATGGGC	60
<i>Paph. sp.</i>	ATCACATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCTCATGGGC	60
<i>Paph. charlesworthii</i>	ATCACATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCCATGGGC	60
<i>Paph. exul</i>	ATCACATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCTCATGGGC	60
<i>Paph. sukhakulii</i>	ATCACATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCTCATGGGC	60
<i>Paph. appletonianum</i>	ATCACATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCTGTTTACTTTGGTCACCCATGGGC	60
<i>Paph. callosum</i>	ATCACATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCGGTTTACTTTGGTCACCTCATGGGC	60
<i>Paph. hirsutissimum</i>	ATCACATAATAATTGATCGAGTTACTCTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCCATGGGC	60
<i>Paph. parishii</i>	ATCACATAATAATTGATCGAGTTAATCTAGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCCATGGGC	60
<i>Paph. concolor A</i>	ATCGCATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCCACGGGC	60
<i>Paph. concolor P</i>	ATCGCATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCCACGGGC	60
<i>Paph. concolor K</i>	ATCGCATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCGCCACGGGC	60
<i>Paph. bellatulum</i>	ATCGCATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCCATGGGC	60
<i>Paph. godefroyae</i>	ATTGCATAATAATTGATCGAGTTAATCTGAAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCAATGGGC	60
<i>Paph. niveum</i>	ATCGCATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCCATGGGC	60
	** ***** ** ***** * * **	
<i>Paph. gratrixianum</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. villosum</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. x Ang Thong</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. sp.</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. charlesworthii</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. exul</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. sukhakulii</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. appletonianum</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. callosum</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. hirsutissimum</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. parishii</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. concolor A</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. concolor P</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. concolor K</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. bellatulum</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. godefroyae</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
<i>Paph. niveum</i>	ATTTGCTATTGCAGTGACCGAGATTTGCCATCGAGCCTCCTTTGGGAGCTTCTTGCTGGC	120
	** *** ** ***** ***** **	
<i>Paph. gratrixianum</i>	GA--TCTAAACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGGCGA	178
<i>Paph. villosum</i>	GA--TCTAAACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGGCGA	178
<i>Paph. x Ang Thong</i>	GA--TCTAAACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGGCGA	178
<i>Paph. sp.</i>	GA--TCTAAACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGGTGA	178
<i>Paph. charlesworthii</i>	GA--TCTAAACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGGTGA	178
<i>Paph. exul</i>	GA--TCTAAACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGGTGA	178
<i>Paph. sukhakulii</i>	GA--TCTAAACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGGTGA	178
<i>Paph. appletonianum</i>	GAGATCTAAACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGGTGA	180
<i>Paph. callosum</i>	GA--TCTAAACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGGTGA	178
<i>Paph. hirsutissimum</i>	GA--TCTAAACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGGTGA	178
<i>Paph. parishii</i>	GA--TCTAAATCGTTGCCCGACGACGCTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGG--A	176
<i>Paph. concolor A</i>	GA--TCTATACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGGTGA	178
<i>Paph. concolor P</i>	GA--TCTATACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGGTGA	178
<i>Paph. concolor K</i>	GA--TCTATACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGGTGA	178
<i>Paph. bellatulum</i>	GA--TCTATACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGGTGA	178
<i>Paph. godefroyae</i>	GA--TTAAACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACA--ATTGGTGA	176
<i>Paph. niveum</i>	GA--TCTATACCCCTAGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAAGTCATATGACACATAAATGGTGA	178
	* * * * * ***** ** ***** * * * * *	

**ภาพที่ 14** แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอสของกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆ



<i>Paph. callosum</i>	GCCAAGGGCACGCTGCCTGGGCATTGCGAGTCATATCTCTCCCTTAACGAGGCTGTCCA	412
<i>Paph. hirsutissimum</i>	GCCAAGGGCACGCTGCCTGGGCATTGCGAGTCATATCTCTCCCTTAATGAGGCTGTCCA	412
<i>Paph. parishii</i>	GCCAAGGGCACGCTGCCTGGGCATTGCGAGTCATATCTCTCCCTTAATGAGGCTGTCCA	410
<i>Paph. concolor A</i>	GCCAAGGGCACGCTGCCTGGGCATTGCGAGTCATATCTCTCCCTTAATGAGGCTGTCCA	417
<i>Paph. concolor P</i>	GCCAAGGGCACGCTGCCTGGGCATTGCGAGTCATATCTCTCCCTTAATGAGGCTGTCCA	417
<i>Paph. concolor K</i>	GCCAAGGGCACGCTGCCTGGGCATTGCGAGTCATATCTCTCCCTTAATGAGGCTGTCCA	413
<i>Paph. bellatulum</i>	GCCAAGGGCATGCTGCCTGGGCATTGCGAGTCATATCTCTCCCTTAATGAGGCTGTCCA	418
<i>Paph. godefroyae</i>	GCCAAGGGCACGCTGCCTGGGCATTGCGAGTCATATCTCTCCCTTAATGAGGCTGTCCA	412
<i>Paph. niveum</i>	GCCAAGGGCACGCTGCCTGGGCATTGCGAGTCATATCTCTCCCTTAATGAGGCTGTCCA	414
	***** * * * * *	
<i>Paph. gratrixianum</i>	CACATACTGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	472
<i>Paph. villosum</i>	CACATACTGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	472
<i>Paph. x Ang Thong</i>	CACATACTGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	472
<i>Paph. sp.</i>	CACATACTGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	472
<i>Paph. charlesworthii</i>	TACATACAGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	472
<i>Paph. exul</i>	TACATACTGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	472
<i>Paph. sukhakulii</i>	TACATACTGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	472
<i>Paph. appletonianum</i>	TACATACTGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	474
<i>Paph. callosum</i>	TACATACTGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	472
<i>Paph. hirsutissimum</i>	TACATATGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	472
<i>Paph. parishii</i>	TACATACTGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	470
<i>Paph. concolor A</i>	TACATACTGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	477
<i>Paph. concolor P</i>	TACATACTGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	477
<i>Paph. concolor K</i>	TACATACTGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	473
<i>Paph. bellatulum</i>	TACATACTGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	478
<i>Paph. godefroyae</i>	TACATACTGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	472
<i>Paph. niveum</i>	TACGTAAGTTTCAGCCGGTGC GGATGTGAGTTTGGCCCTTGTTTCATTGGTACGGGGGGT	474
	***** * * * * *	
<i>Paph. gratrixianum</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	532
<i>Paph. villosum</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	532
<i>Paph. x Ang Thong</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	532
<i>Paph. sp.</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	532
<i>Paph. charlesworthii</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	532
<i>Paph. exul</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	532
<i>Paph. sukhakulii</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	532
<i>Paph. appletonianum</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	534
<i>Paph. callosum</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	532
<i>Paph. hirsutissimum</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	532
<i>Paph. parishii</i>	CTAAAAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	530
<i>Paph. concolor A</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	537
<i>Paph. concolor P</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	537
<i>Paph. concolor K</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	533
<i>Paph. bellatulum</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	538
<i>Paph. godefroyae</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	532
<i>Paph. niveum</i>	CTAAGAGCTGCGTGGGCTTTTGTGGTCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACATATGCT	534
	**** * * * * *	
<i>Paph. gratrixianum</i>	ACAACAAAATGTTGTGCGAATGCCCGGGTTGTCGTATTAGATGGGCC-AGCATAATCT	591
<i>Paph. villosum</i>	ACAACAAAATGTTGTGCGAATGCCCGGGTTGTCGTATTAGATGGGCC-AGCATAATCT	591
<i>Paph. x Ang Thong</i>	ACAACAAAATGTTGTGCGAATGCCCGGGTTGTCGTATTAGATGGGCC-AGCATAATCT	591
<i>Paph. sp.</i>	ACAACAAAATGTTGTGCGAATGCCCGGGTTGTCGTATTAGATGGGCC-AGCATAATCT	591
<i>Paph. charlesworthii</i>	ACAACAAAATGTTGTGCGAATGCCCGGGTTGTCGTATTAGATGGGCC-AGCATAATCT	591
<i>Paph. exul</i>	ACAACAAAATGTTGTGCGAATGCCCGGGTTGTCGTATTAGATGGGCC-AGCATAATCT	592
<i>Paph. sukhakulii</i>	ACAACAAAATGTTGTGCGAATGCCCGGGTTGTCGTATTAGATGGGCC-AGCATAATCT	592
<i>Paph. appletonianum</i>	ACAACAAAATGTTGTGCGAATGCCCGGGTTGTCGTATTAGATGGGCC-AGCATAATCT	593
<i>Paph. callosum</i>	ACAACAAAATGTTGTGCGAATGCCCGGGTTGTCGTATTAGATGGGCC-AGCATAATCT	586
<i>Paph. hirsutissimum</i>	ACAACAAAATGTTGTGCGAATGCCCGGGTTGTCGTATTAGATGGGCC-AGCATAATCT	591
<i>Paph. parishii</i>	ACAACAAAATGTTGTGCGAATGCCCGGGTTGTCGTATTAGATGGGCC-AGCATAATCT	589
<i>Paph. concolor A</i>	ACAACAAAATGTTGTGCGAATGCCCGGGTTGTCGTATTAGATGGGCC-AGCATAATCT	596
<i>Paph. concolor P</i>	ACAACAAAATGTTGTGCGAATGCCCGGGTTGTCGTATTAGATGGGCC-AGCATAATCT	596

## ภาพที่ 14 (ต่อ)



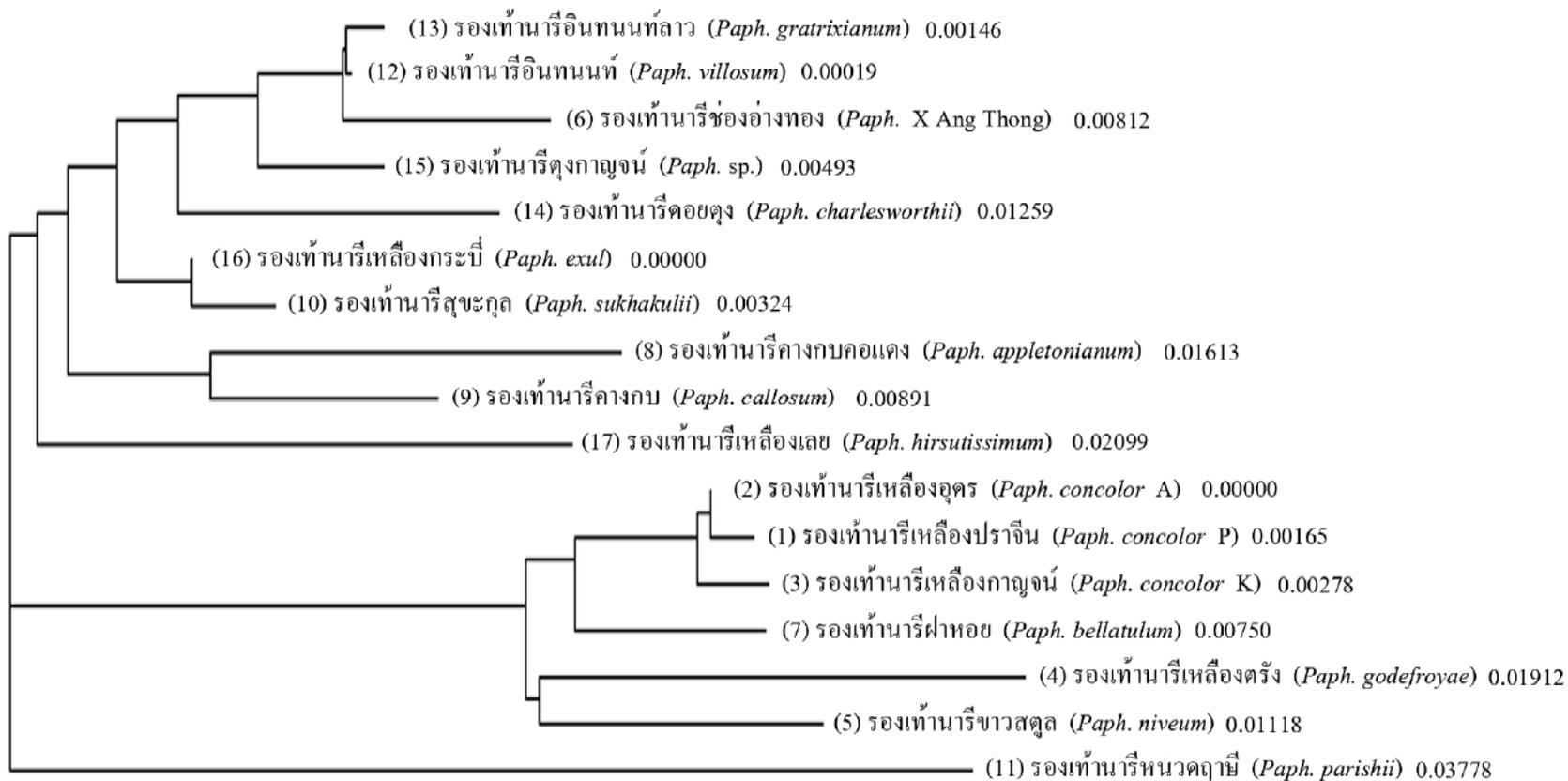
**ตารางที่ 9** เปรียบเทียบขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ (bp) ของชิ้นดีเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอส (ITS, Internal Transcribed Spacer) ในกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆ จำนวน 15 ชนิด ที่ใช้ในการการศึกษา

ลำดับ	ชนิดรองเท้านารี	ขนาด (bp)
*1	<i>Paph. sp.</i> (TungKarn)	605
**2	<i>Paph. x Ang Thong</i>	605
3	<i>Paph. appletonianum</i>	607
4	<i>Paph. bellatulum</i>	611
5	<i>Paph. charlesworthii</i>	605
6	<i>Paph. callosum</i>	599
7	<i>Paph. concolor</i> (A, Audornthane)	610
8	<i>Paph. concolor</i> (K, Karnjanaburi)	606
9	<i>Paph. concolor</i> (P, Prachinburi)	610
10	<i>Paph. exul</i>	606
11	<i>Paph. gratixianum</i>	605
12	<i>Paph. godefroyae</i>	605
13	<i>Paph. niveum</i>	594
14	<i>Paph. parishii</i>	603
15	<i>Paph. sukhakulii</i>	605
16	<i>Paph. villosum</i>	605
17	<i>Paph. hirsutissimum</i>	605

**หมายเหตุ** เครื่องหมาย (\*) หมายถึงกล้วยไม้รองเท้านารีคอตงกาญจน์ ซึ่งเป็นชนิดใหม่ที่ยังไม่ได้  
รับการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ โดยศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับชนิดอื่นๆ

เครื่องหมาย (\*\*) หมายถึงกล้วยไม้รองเท้านารีช่องอ่างทอง ที่ต้องการยืนยันความ  
ใกล้ชิดทางพันธุกรรมภายในหมู่ *Brachypetalum*

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆที่พบในประเทศไทยซึ่งวิเคราะห์ออกมาเป็น phylogenetic tree จากการคำนวณโดยวิธี Neighbour Joining method (Saitou and Nei, 1987) โดยใช้โปรแกรม ClustalW (ภาพที่ 15) พบว่ากล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆมีการแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paph. exul*) แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับกล้วยไม้รองเท้านารีสุขะกุล (*Paph. sukhakulii*) โดยที่กล้วยไม้รองเท้านารีคางคอบแดง (*Paph. appletonianum*) แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับกล้วยไม้รองเท้านารีคางคอบ (*Paph. callosum*) และกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ (*Paph. villosum*) แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ลาว (*Paph. gratixianum*) กล้วยไม้รองเท้านารีช่องอ่างทอง (*Paph. x Ang Thong*) กล้วยไม้รองเท้านารีตุงกาญจน์ (*Paph. sp.*) และกล้วยไม้รองเท้านารีคอยตุง (*Paph. charlesworthii*) ตามลำดับ ในขณะที่กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองเลย (*Paph. hirsutissimum*) แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่แยกห่างจากชนิดอื่นในกลุ่มนี้มากที่สุดตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่ 2 เรียงลำดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากมากไปน้อยคือกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดร (*Paph. concolor*) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paph. concolor*) มากที่สุด โดยมีกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (*Paph. concolor*) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเป็นอันดับรองลงมา ชนิดที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเป็นอันดับต่อมาก็คือกล้วยไม้รองเท้านารีฝายหอย (*Paph. bellatulum*) และต่อมาก็คือกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองตรัง (*Paph. godefroyae*) กับกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paph. niveum*) ตามลำดับ กลุ่มที่ 3 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมห่างออกมาเป็นอันดับสุดท้าย มีเพียงชนิดเดียวคือกล้วยไม้รองเท้านารีเมืองกาญจน์ หรือกล้วยไม้รองเท้านารีหนวดฤๅษี (*Paph. parishii*)



**ภาพที่ 15** Phylogenetic tree แสดงค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม จากความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งไอทีเอส ของกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆ จำนวน 15 ชนิด ตัวเลขในวงเล็บหมายถึงลำดับภาพกล้วยไม้รองเท้านารี (ภาพผนวกที่ 1-17) ตามด้วยชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ และค่า genetic distances ซึ่งคำนวณตามวิธี Neighbour Joining Method (Saitou และ Nei, 1987) ตามลำดับ

จากผลการทดลองสามารถนำมาเปรียบเทียบกับการจัดหมวดหมู่โดยใช้ลักษณะทาง  
 สัณฐานวิทยาของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* ซึ่งถูกแบ่งไว้ 2 สกุลย่อยคือ  
*Brachypetalum* และ *Paphiopedilum* และแต่ละสกุลย่อยดังกล่าวยังได้แบ่งออกเป็นหมู่ต่างๆอีกคือ  
 สกุลย่อย *Brachypetalum* ประกอบไปด้วยหมู่ *Brachypetalum* และหมู่ *Parvisepalum* ในสกุลย่อยนี้  
 ประเทศไทยพบเฉพาะหมู่ *Brachypetalum* เท่านั้น อีกสกุลย่อยหนึ่งคือสกุลย่อย *Paphiopedilum*  
 ประกอบไปด้วยหมู่ *Coryopedilum* หมู่ *Cochlopetalum* หมู่ *Pardalopetalum* หมู่ *Paphiopedilum*  
 และหมู่ *Barbata* ซึ่ง 2 หมู่แรกไม่พบในประเทศไทย และหมู่ *Pardalopetalum* พบในประเทศไทย  
 เพียงชนิดเดียวคือกล้วยไม้รองเท้านารีเมืองกาญจน์หรือกล้วยไม้รองเท้านารีหนวดฤาษี  
 (*Paph. parishii*)

เมื่อพิจารณาในสกุลย่อย *Brachypetalum* จากผลการศึกษาพบว่ากล้วยไม้รองเท้านารีเหลือง  
 ปรานจีน กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดร และกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกาญจน์มีความสัมพันธ์ทาง  
 พันธุกรรมกันมากที่สุดตามลำดับ โดยกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 3 แห่งนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์เหมือนกัน  
 ว่า *Paphiopedilum concolor* สอดคล้องกันกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความแตกต่างกันเพียง  
 เล็กน้อย ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากกล้วยไม้รองเท้านารีทั้งสามแห่งดังกล่าวมีการกระจายตัวในสภาพ  
 พื้นที่แยกห่างจากกัน และอาจมีการปรับตัวตามกระบวนการวิวัฒนาการให้มีความเหมาะสมกับ  
 สภาพพื้นที่ เช่นกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกาญจน์มีเอกลักษณ์เฉพาะที่แยกย่อยไปอีกคือกลีบดอก  
 มักมีการเรียงตัวของจุดประสีม่วงแดงในรูปแบบตรงกลางตามทางยาวของกลีบดอก จึงถูกตั้งชื่อใน  
 ระดับ variety ว่า *Paphiopedilum concolor* var. *straitianum* (อุไร, 2545) ส่วนกล้วยไม้รองเท้านารีที่  
 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเป็นลำดับต่อมาคือรองเท้านารีฝ้าย (*Paph. bellatulum*) นอกจากนี้  
 พบว่ากล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paph. niveum*) แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิด  
 กับกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองตรง (*Paph. godefroyae*) ในขณะที่กล้วยไม้รองเท้านารีช่องอ่างทอง  
 (*Paph. x Ang Thong*) ซึ่งการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาได้ถูกจัดอยู่ในสกุลย่อย *Brachypetalum* ด้วย  
 ได้แสดงถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ห่างออกไปจากกลุ่ม โดยแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม  
 ใกล้ชิดกับกลุ่มของสกุลย่อย *Paphiopedilum*

เมื่อพิจารณาอีกสกุลย่อยหนึ่งคือสกุลย่อย *Paphiopedilum* ซึ่งประเทศไทยพบอยู่ทั้งสิ้น 3 หมู่  
 คือ หมู่ *Pardalopetalum* หมู่ *Paphiopedilum* และหมู่ *Barbata* ซึ่งหมู่ *Pardalopetalum* ในประเทศ  
 ไทยพบเพียงชนิดเดียวคือกล้วยไม้รองเท้านารีเมืองกาญจน์หรือกล้วยไม้รองเท้านารีหนวดฤาษี  
 (*Paph. parishii*) สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ที่กล้วยไม้รองเท้านารีเมืองกาญจน์มีความสัมพันธ์ทาง

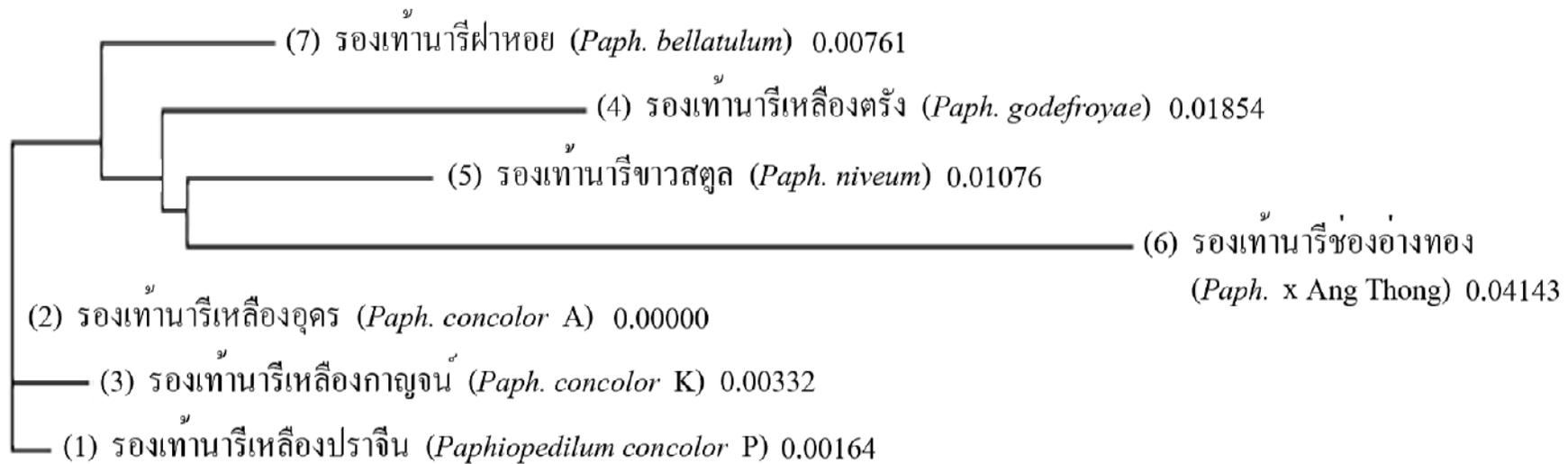
พันธุกรรมแยกห่างออกจากชนิดอื่นๆ บ่งบอกถึงมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดอื่นๆ ในระดับต่ำสุด จากการพิจารณาหมู่ *Paphiopedilum* พบว่ากล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ (*Paph. villosum*) กับกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ลาว (*Paph. gratrixianum*) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกัน โดยมีรองเท้านารีตุงกาญจน์ (*Paph. sp.*) และกล้วยไม้รองเท้านารีคอยตุง (*Paph. charlesworthii*) แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมต่อมาตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นและดอกของกล้วยไม้รองเท้านารีตุงกาญจน์ (*Paph. sp.*) ที่มีความคล้ายคลึงกับกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ (*Paph. villosum*) กล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ลาว (*Paph. gratrixianum*) และกล้วยไม้รองเท้านารีคอยตุง (*Paph. charlesworthii*) ในระดับหนึ่ง ส่วนกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองเลย (*Paph. hirsutissimum*) พบว่ามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมห่างออกไปจากหมู่ โดยแสดงความสัมพันธ์กับกล้วยไม้รองเท้านารีคางกบ (*Paph. callosum*) และกล้วยไม้รองเท้านารีคางกบคอแดง (*Paph. appletonianum*) ซึ่งเป็นสมาชิกของหมู่ *Barbata* ในขณะเดียวกันกล้วยไม้รองเท้านารีสุชะกุล (*Paph. sukhakulii*) ก็ได้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paph. exul*) ซึ่งจัดอยู่ในหมู่ *Paphiopedilum* ด้วยเช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมของหมู่ *Barbata* และหมู่ *Paphiopedilum* ในสกุลย่อย *Paphiopedilum* นี้

กล้วยไม้รองเท้านารีตุงกาญจน์ (*Paph. sp.*) ซึ่งเป็นชื่อเรียกท้องถิ่นที่รู้จักกันทั่วไปในกลุ่มผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้รองเท้านารีในประเทศไทย มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เป็นเอกลักษณ์ และในปัจจุบันยังไม่ได้รับการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ เมื่อพิจารณาแล้วพบว่า มีลักษณะสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับกล้วยไม้รองเท้านารีในสกุลย่อย *Paphiopedilum* หมู่ *Paphiopedilum* โดยกล้วยไม้รองเท้านารีของประเทศไทยที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่กล้วยไม้รองเท้านารีคอยตุง (*Paph. charlesworthii*) กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paph. exul*) กล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ (*Paph. villosum*) กล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ลาว (*Paph. gratrixianum*) และกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองเลย (*Paph. hirsutissimum*) จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree ดังที่กล่าวมาแล้ว โดยเลือกพิจารณาเฉพาะรองเท้านารีสกุลย่อย *Paphiopedilum* หมู่ *Paphiopedilum* เท่านั้นพบว่ากล้วยไม้รองเท้านารีตุงกาญจน์ (*Paph. sp.*) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ (*Paph. villosum*) และกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ลาว (*Paph. gratrixianum*) มากที่สุด โดยกล้วยไม้รองเท้านารีคอยตุง (*Paph. charlesworthii*) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเป็นลำดับรองลงมา การที่เลือกพิจารณาเฉพาะกล้วยไม้รองเท้านารีในสกุลย่อย *Paphiopedilum* หมู่ *Paphiopedilum* เท่านั้น มีเหตุผลคือถึงแม้ว่ากล้วยไม้รองเท้านารีช่องอ่างทอง (*Paph. x Ang Thong*)

ที่ผลการวิเคราะห์บ่งชี้ว่ามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ (*Paph. villosum*) และกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ลาว (*Paph. gratrixianum*) มากก็ตาม แต่จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เป็นเอกลักษณ์ชัดเจนของกล้วยไม้รองเท้านารีในสกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* และลักษณะการกระจายตัวที่พบเฉพาะบริเวณหมู่เกาะอ่างทองทางภาคใต้ของประเทศไทยเท่านั้น เมื่อพิจารณาแล้วไม่สามารถหาเหตุผลมาอธิบายผลการวิเคราะห์ให้มีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เป็นเอกลักษณ์อย่างมากได้ ผลของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่วิเคราะห์ได้นี้จะมีสาเหตุมาจากเหตุผลอื่น ๆ ที่มีความเป็นไปได้เช่นรูปแบบของการเกิดการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอที่ตรงตำแหน่งไอทีเอส ที่เป็นได้ทั้งกรณีการเกิดการแทนที่เบสที่ผิดตำแหน่งหรือการขาดหายหรือแทรกเข้ามาของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ แล้วทำให้เกิดระดับความแตกต่างของดีเอ็นเอที่ตรงตำแหน่งไอทีเอสที่มากภายในกลุ่มสกุลย่อยเดียวกัน แล้วอาจส่งผลให้ระดับความแตกต่างไปใกล้เคียงกับระดับความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ (*Paph. villosum*) และกล้วยไม้รองเท้านารีอินทนนท์ลาว (*Paph. gratrixianum*)

การหาคำตอบเกี่ยวกับที่มาของกล้วยไม้รองเท้านารีช่องอ่างทองซึ่งเป็นรองเท้านารีที่พบได้ที่บริเวณหมู่เกาะอ่างทอง ทางภาคใต้ของประเทศไทย มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เป็นเอกลักษณ์ชัดเจนของสกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆ ในประเทศไทย พบว่ากล้วยไม้รองเท้านารีช่องอ่างทอง (*Paph. x Ang Thong*) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับกล้วยไม้รองเท้านารีในกลุ่มสกุลย่อย *Paphiopedilum* หมู่ *Paphiopedilum* เมื่อพิจารณาแล้วพบว่ากล้วยไม้รองเท้านารีช่องอ่างทองมีระดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ห่างไกลจากกลุ่มสกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* มากเกินไป เวลานำไปวิเคราะห์ร่วมกับรองเท้านารีกลุ่มอื่นๆ ระดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ห่างไกลกันมากภายในกลุ่มเดียวกันนี้ อาจส่งผลให้มีความใกล้ชิดสอดคล้องกับกลุ่มอื่นได้ จึงได้ทำการวิเคราะห์อีกครั้งโดยวิเคราะห์เฉพาะในส่วนของกล้วยไม้รองเท้านารีในกลุ่มสกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ผลการวิเคราะห์พบว่า กล้วยไม้รองเท้านารีช่องอ่างทอง (*Paph. x Ang Thong*) จัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paph. niveum*) และกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองตรัง (*Paph. godefroyae*) มากที่สุดตามลำดับ กล้วยไม้รองเท้านารีฝ้าย (*Paph. bellatulum*) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเป็นลำดับต่อมาตามด้วยกลุ่มของ *Paph. concolor* ซึ่งประกอบด้วยกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองอุดร และกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ โดยทั้ง 3 แหล่งนี้แสดงความสัมพันธ์กันภายในกลุ่มอย่างชัดเจน (ภาพที่ 16) นอกจากนั้น ผลการวิเคราะห์นี้สามารถนำไป

สนับสนุนสมมุติฐานของ Fowlie, (1975) ได้ ซึ่งจากสมมุติฐานได้อธิบายไว้ 2 ประเด็นคือประเด็นแรกกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองตรัง (*Paph. godefroyae*) มีวิวัฒนาการมายาวนานเป็นเอกเทศ โดยมีการกระจายตัวซ้อนเหลื่อมกันกับรองเท้านารีขาวสตูล (*Paph. niveum*) ทำให้เกิดการผสมข้ามได้ ประชากรลูกผสมทางธรรมชาติขึ้น และวิวัฒนาการต่อมาเป็นรองเท้านารีช่องอ่างทอง (*Paph. x Ang Thong*) ส่วนอีกประเด็นหนึ่งคิดว่ากล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองตรัง (*Paph. godefroyae*) มีวิวัฒนาการมาจากลูกผสมทางธรรมชาติระหว่างการผสมร่วมกันของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paph. concolor*) กล้วยไม้รองเท้านารีฟาคอย (*Paph. bellatulum*) และกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paph. niveum*) ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงผลสอดคล้องกับสมมุติฐานทั้ง 2 ประเด็น เนื่องจากผลการวิเคราะห์มีความชัดเจนว่ากล้วยไม้รองเท้านารีช่องอ่างทอง (*Paph. x Ang Thong*) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paph. niveum*) และรองเท้านารีเหลืองตรัง (*Paph. godefroyae*) ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามแนวทางของสมมุติฐานแรก ในขณะที่กล้วยไม้รองเท้านารีฟาคอย (*Paph. bellatulum*) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันกับกลุ่มของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองอุดร และรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (*Paph. concolor*) ซึ่งสอดคล้องกับการกระจายตัวร่วมกันอย่างกว้างขวางบริเวณพื้นที่เหนือภาคใต้ของประเทศไทยของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้งสองชนิดนี้ โดยกล้วยไม้รองเท้านารีฟาคอย (*Paph. bellatulum*) ยังแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองตรัง (*Paph. godefroyae*) และกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูล (*Paph. niveum*) ตามลำดับ จากการจัดกลุ่มตามระดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มสกุลย่อย *Brachypetalum* นี้ เป็นการยากที่จะสรุปให้ชัดเจนได้ว่าชนิดใดเป็นบรรพบุรุษของชนิดใด เนื่องจากว่ากระบวนการวิวัฒนาการนั้นส่วนหนึ่งเกิดขึ้นมาจากแรงผลักดันของสภาพแวดล้อมทางกายภาพและชีวภาพในยุคสมัยต่างๆ ซึ่งเป็นช่วงระยะเวลาที่ยาวนานมาก และผลของแรงผลักดันจากสภาพแวดล้อมทางกายภาพและชีวภาพในยุคสมัยต่างๆ ดังกล่าว อาจจะเอื้ออำนวยให้เกิดการผสมข้ามชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีในกลุ่มนี้ได้หลายกรณีแตกต่างกันไปตามแต่ละยุคสมัย ดังนั้นหากต้องการความชัดเจนในข้อสรุปมากยิ่งขึ้น ควรจะศึกษาที่ยีนหรือบริเวณของจีโนมิกดีเอ็นเอตำแหน่งอื่นๆ ซึ่งครอบคลุมทั้งคลอโรพลาสต์ ไมโทคอนเดรีย และนิวเคลียส รวมทั้งพิจารณาร่วมกับข้อมูลโบราณคดีทางภูมิศาสตร์ที่อ้างอิงถึงทั้งทางกายภาพและชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับวิวัฒนาการของกล้วยไม้รองเท้านารีมาประกอบการพิจารณาด้วย อย่างไรก็ตามผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ได้แสดงให้เห็นถึงการมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกันของกล้วยไม้รองเท้านารีภายในกลุ่มสกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* นี้ ซึ่งเมื่อพิจารณาแล้วพบว่ามีความสอดคล้องกันกับสมมุติฐานที่สองด้วย



**ภาพที่ 16** Phylogenetic tree แสดงค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม จากความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งไอทีเอส ของกล้วยไม้ ร่องเท้านารีในหมู่ Brachypetalum ซึ่งประกอบด้วย *Paph. bellatulum*, *Paph. concolor*, *Paph. godefroyae*, *Paph. niveum* และ *Paph. x Ang Thong* ตัวเลขในวงเล็บหมายถึงลำดับภาพกล้วยไม้ร่องเท้านารี (ภาพผนวกที่ 1-7) ตามด้วยชื่อสามัญ ชื่อวิทยาศาสตร์ และค่า genetic distances ซึ่งคำนวณตามวิธี Neighbour Joining Method (Saitou และ Nei, 1987) ตามลำดับ