ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น ในประเทศไทย

สุณิษา ล่วงลือ

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น ในประเทศไทย

สุณิษา ล่วงลือ

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2562
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น ในประเทศไทย"

ของ สุณิษา ล่วงลือ

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร.นฤมล ธนานันต์)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัทธมน แสงอินทร์)

อนุมัติ

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มุณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นในประเทศไทย

ผู้วิจัย สุณิษา ล่วงลือ

ประธานที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มลิวรรณ นาคขุนทด

กรรมการที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล

ประเภทสารนิพนธ์ วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2562

คำสำคัญ ดีเอ็นเอบาร์โค้ด, คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ, กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น

บทคัดย่อ

กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นจัดอยู่ในวงศ์กล้วยไม้ วงศ์ย่อย Epidendroideae ซึ่งประกอบด้วย 3 สกุล คือ สกุลเอื้องน้ำต้น (*Calanthe*) สกุลเอื้องพร้าว (*Phaius*) และสกุลเอื้องกลีบเกลียว (*Cephalanteropsis*) ซึ่งมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน ทำให้ยากต่อการจำแนกชนิดหรือสกุล ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเป็นเทคนิคที่ถูกต้องและสามารถใช้ในการระบุชนิดได้ง่าย โดยทำการศึกษาของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ในคลอโรพลาสต์ ในสกุลเอื้องน้ำต้น 12 ชนิด สกุลเอื้องพร้าว 4 ชนิด และสกุลเอื้องกลีบเกลียว 2 ชนิด จากผลการทดลองพบว่า ยีน *matK* และยีน *rbcL* สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ได้เพียง 71.11 เปอร์เซ็นต์ และ 84.44 เปอร์เซ็นต์ โดยยีน *matK* ยีน *rbcL* บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 88.89 เปอร์เซ็นต์ 73.33 เปอร์เซ็นต์ 37.5 เปอร์เซ็นต์ และ 52.63 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคลอโรพลาสดีเอ็นเอ 3 บริเวณมีความแตกต่างภายในชนิดต่ำแต่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิดสูง ยกเว้นยีน *rbcL* ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำทั้งภายในชนิดและระหว่างชนิดจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้ MEGA5.2 ด้วยวิธี UPGMA จากค่า bootstrap support ที่สูง ยีน *matK* สามารถแบ่งกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นออกเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับสัณฐานวิทยาของดอก ดังนั้นยีน *matK* มีประสิทธิภาพเพียงพอสำหรับบาร์โค้ดในกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น

Title DNA BARCODING FOR CALANTHE ORCHIDS IDENTIFICATION IN THAILAND

Author SUNISA LUANGLUE

Advisor Assistant Professor Maliwan Nakkuntod

Co-Advisor Associate Professor Surin Peyachoknagul

Academic Paper Thesis M.S. in Biotechnology, Naresuan University, 2019

Keywords DNA barcode, Chloroplast DNA, Calanthe group

ABSTRACT

Calanthe group is an orchid in subfamily Epidendroideae, consisting of *Calanthe*, *Phaius*, and *Cephalanteropsis* which are shared many morphological characteristics. Therefore, it is difficult to classify in species/genus levels using only morphology. DNA barcoding is accurate and rapid technique for species identification. In this study, 12 species in *Calanthe*, 4 species in *Phaius* and 2 species in *Cephalantheropsis* were evaluated based on 4 regions of chloroplast DNA. From the result, the rates of PCR amplification success for *matK* and *rbcL* genes were 100% but for intergenic spacers between *psbA-trnH* and *trnL-trnF* were 71.11% and 84.44%, respectively. The success rates of DNA sequencing for regions of *matK*, *rbcL*, *psbA-trnH* and *trnL-trnF* were 88.89, 73.33, 37.5 and 52.63%, respectively. Three regions of Chloroplast DNA were low polymorphism in intraspecific but high in interspecific which *rbcL* gene showed lowest polymorphism. However, the region combination were higher intraspesifiic and interspecific polymorphism. Genetic relationship analyzed by MEGA5.2 using UPGMA method presented that there are 5 groups of Calanthe orchids with high bootstrap support and related with flower morphology based on *matK*. Therefore *matK* gene should be recommend for DNA barcoding in Calanthe group.

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงในความกรุณาของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลาอันมีค่ามาเป็นที่ปรึกษา พร้อมคำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการวิทยานิพนธ์ อันประกอบไปด้วย รองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัทธมน แสงอินทร์ กรรมการ และรองศาสตราจารย์ ดร.นฤมล ธนานันต์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์และทรงคุณค่า

ขอขอบพระคุณ นายทัศนัย ปัญจันทร์สิงห์ นางสาวสุรภา นัทพรนิชกุล นายวรวิช สุขตระกูล นายศัตวุฒิ ชุมภูอินทร์ นายธีระพงษ์ จั่นงาม และนางสาวดารินทร์ ศรีอริยานนท์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างกล้วยไม้และข้อมูลดีเอ็นเอกลุ่มเอื้องน้ำต้นสำหรับการทำการวิจัยครั้งนี้

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ของผู้วิจัยที่ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้านอย่างดีที่สุดเสมอมา

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแด่ผู้มีพระคุณทุกๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการระบุชนิดและการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น เพื่อประโยชน์ทางเศรษฐกิจต่อไป

สุณิษา ล่วงลือ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

ประกาศคุณูปการ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความเป็นมาของปัญหา 1

จุดมุ่งหมายของการศึกษา 2

ขอบเขตของงานวิจัย 2

นิยามศัพท์เฉพาะ 2

สมมติฐานงานวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

กล้วยไม้ (Orchid) 4

การจำแนกกล้วยไม้ 5

กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น (Calanthe group) 7

1. กล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้น (*Calanthe* R.Br.) 7

2. กล้วยไม้สกุลเอื้องพร้าว (*Phaius* Lour.) 16

3. กล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียว (*Cephalantheropsis* Guillaumin) 18

คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA) 20
1. ยีน *matK* (maturase K) 20
2. ยีน *rbcL* (riburose 1,5-bisphosphate carboxylase) 21
3. บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* (*psbA-trnH* intergenic spacer) 21
4. บริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* (*trnL-trnF* intergenic spacer) 22
ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) 23
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 25
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 28
ตัวอย่างกล้วยไม้ที่ใช้ในการศึกษา 28
การสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยวิธีดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987) 30
การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR) 32
การทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ 34
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 35
การวิเคราะห์ข้อมูล 36
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 37
ผลการศึกษา 37
1. การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพ 37
2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์ 37
2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน matK 37
2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน rbcL 38
2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน psbA-trnH 41

2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน trnL-trnF 41
3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการระบุชนิด.....44
3.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริเวณยีน matK.....44
3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริเวณยีน rbcL 44
3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริเวณระหว่างยีน psbA-trnH.....45
3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริเวณระหว่างยีน trnL-trnF 51
4. การวิเคราะห์หาความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดและระหว่างชนิดด้วยวิธี pairwise distance 51
5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งเฉพาะ 54
5.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน matK.....54
5.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน rbcL 55
5.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน psbA-trnH 59
5.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน trnL-trnF.....59
5.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน matK ร่วมกับยีน rbcL 61
อภิปรายผล 64
1. การสกัดดีเอ็นเอ.....64
2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 65

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....68
5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น.....69
6. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น โดยใช้ลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ร่วมกับยีน *rbcL*.....72
บทที่ 5 บทสรุป.....73
สรุปผลการวิจัย.....73
1.1 การสกัดดีเอ็นเอ.....73
1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....73
1.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งของบริเวณในคลอโรพลาสต์.....73
1.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ.....73
ข้อเสนอแนะ.....74
บรรณานุกรม.....75
ภาคผนวก.....83
ประวัติผู้วิจัย.....115

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ตัวอย่างกล้วยไม้ที่ใช้ในการศึกษา 28

ตาราง 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา.....32

ตาราง 3 ความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 33

ตาราง 4 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน matK และ rbcL 33

ตาราง 5 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของบริเวณระหว่างยีน psbA-trnH และ trnL-trnF.....34

ตาราง 6 ความเข้มข้นและปริมาตรของผลผลิตพีซีอาร์และไพรเมอร์สำหรับส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์.....36

ตาราง 7 ผลการศึกษาเปรียบเทียบ 4 บริเวณ 45

ตาราง 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะบริเวณยีน matK.....46

ตาราง 9 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์จำเพาะบริเวณยีน rbcL 50

ตาราง 10 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์จำเพาะบริเวณระหว่างยีน psbA-trnH.....52

ตาราง 11 ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะบริเวณระหว่างยีน trnL-trnF 53

ตาราง 12 ค่า pairwise distance ด้วยโปรแกรม MEGA5.2 54

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพ 1 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Calanthe cardioglossa Schltr. 9
ภาพ 2 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Calanthe clavata Lindl. 9
ภาพ 3 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Calanthe densiflora Lindl. 10
ภาพ 4 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Calanthe herbacea Lindl. 11
ภาพ 5 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Calanthe lyroglossa Rchb.f. 11
ภาพ 6 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Calanthe masuca (D. Don) Lindl. 12
ภาพ 7 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Calanthe pulchra (Blume) Lindl. 13
ภาพ 8 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Calanthe rosea (Lindl.) Benth. 14
ภาพ 9 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Calanthe rubens Ridl. 15
ภาพ 10 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Calanthe succedanea Gagnep. 15
ภาพ 11 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Calanthe triplicata (Willemet) Ames 16
ภาพ 12 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Calanthe vestita Wall. Ex Lindl. 16
ภาพ 13 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Phaius flavus Lindl. 17
ภาพ 14 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Phaius mishmensis Blume. 18
ภาพ 15 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Phaius indochinensis Seidenf. & Ormerod 18
ภาพ 16 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Cephalantheropsis longipes (Hook.f.) Ormerod 19
ภาพ 17 ลักษณะดอกกล้วยไม้ Cephalantheropsis obcordata (Lindl.) Ormerod 20
ภาพ 18 ยีน matK ที่แทรกอยู่ระหว่าง trnK 5’ exon และ trnK 3’ exon 21
ภาพ 19 ยีน rbcL อยู่ระหว่างยีน atpB และ accD 21

ภาพ 20 บริเวณระหว่างยีน psbA และ trnH 22

ภาพ 21 บริเวณ trnL-trnF intergenic spacer (trnL-trnF IGS) ที่อยู่ระหว่างยีน trnL และ trnF 22

ภาพ 22 ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่สกัดจากใบกล้วยไม้ด้วยวิธี Doyle and Doyle (1987) โดยM คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA Ladder (Thermo Science, United State), 1 = C. cardioglossa MR3, 2 = C. densiflora PH1, 3 = C. rubens MR3, 4 = C. masuca MR1, 5 = C. herbacea PH1, 6 = P. indochinensis RK1, 7 = P. flavas RK2, 8 = P. flavas RK3, 9 = P. mishmensis RK4, 10 = P. mishmensis RK5, 11 = P. mishmensis RK7, 12 = Ce. obcordata RK1, 13 = Ce. longipes RK1, 14 = Ce. longipes PH1 และ 15 = Ce. longipes PH2 38

ภาพ 23 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณยีน matK โดย M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (GenedireX, Taiwan), M2 คือ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, United State), 1 = C. cardioglossa MR7, 2 = C. cardioglossa RK2, 3 = C. lyroglossa RK1, 4 = C. masuca RK1, 5 = P. indochinensis RK1, 6 = P. tankervilleae var. alba CM1, 7 = P. mishmemsis RK4, 8 = P. mishmemsis RK5, 9 = Ce. longipes RK1, 10 = Ce. obcordata RK1, 11= C. cardioglossa MR3, 12 = C. masuca MR1, 13 = C. pulchra MR1, 14 = C. rosea MR3, 15 = C. rosea MR4, 16 = C. rosea MR7, 17 = C. rubens MR3, 18 = C. succedanea MR1, 19 = C. triplicata MR1, 20 = C. vestita MR3, 21 = C. vestita MR4, 22 = P. tankervilleae MR1, 23 = Ce. longipes PH1, 24 = Ce. longipes PH2, 25 = C. densiflora PH1, 26 = C. herbacea PH1, 27 = C. clavata PR1, 28 = C. clavata PR2, 29 = C. rubens RK1, 30 = C. triplicata RK1, 31 = P. flavus RK2, 32 = P. flavus RK3, 33 = P. tankervilleae RK1, 34 = P. tankervilleae var. alba RK2, 35 = P. tankervilleae var. alba RK3, 36 = C. lyroglossa RK2, 37 = C. lyroglossa RK3, 38 = C. densiflora RK1, 39 = C. rubens var. alba RK1, 40 = C. masuca RK4, 41 = C. rubens PR4, 42 = C. triplicata PR2, 43 = C. triplicata NN1, 44 = P. mishmensis RK7 และ 45 = P. tankervilleae PR1 39

ภาพ 24 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณยีน rbcL โดย M คือ ดีเอ็นเอ มาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (Sibenzyme), 1 = C. triplicata RK1, 2 = C.

triplicata MR1, 3 = C. triplicata PR2, 4 = P. tankervilleae var. alba RK2, 5 = P. tankervilleae var. alba RK3, 6 = P. tankervilleae PR1, 7 = Ce. longipes PH1, 8 = Ce. longipes PH2, 9 = C. cardioglossa MR3, 10 = C. cardioglossa MR7, 11 = C. succedanea MR1, 12 = C. rosea MR3, 13 = C. rosea MR4, 14 = C. rosea MR7, 15 = C. vestita MR3, 16 = C. vestita MR4, 17 = C. rubens MR3, 18 = C. masuca MR1, 19 = C. pulchra MR1, 20 = C. masuca RK1, 21 = C. masuca RK4, 22 = C. rubens var. alba RK1, 23 = C. rubens RK1, 24 = C. lyroglossa RK1, 25 = C. lyroglossa RK2, 26 = C. lyroglossa RK3, 27 = P. mishmensis RK4, 28 = P. mishmensis RK5, 29 = P. mishmensis RK7, 30 = P. tankervilleae RK1, 31 = C. cardioglossa RK2, 32 = C. densiflora RK1, 33 = C. densiflora PH1, 34 = C. herbacea PH1, 35 = C. rubens PR4, 36 = C. triplicata NN1, 37 = C. clavata PR1, 38 = C. clavata PR2, 39 = Ce. longipes RK1, 40 = Ce. obcordata RK1, 41 = P. indochinensis RK1, 42 = P. flavus RK2, 43 = P. flavus RK3, 44 = P. tankervilleae MR1 และ 45 = P. tankervilleae var. alba CM1 40

ภาพ 25 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณระหว่างยีน psbA-trnH โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, United states), 1 = C. rubens PR4, 2 = P. tankervilleae var. alba RK2, 3 = C. triplicata PR2, 4 = Ce. obcordata RK1, 5 = C. clavata PR1, 6 = P. tankervilleae var. alba CM1, 7 = C. masuca MR1, 8 = C. cardioglossa MR3, 9 = C. triplicata RK1, 10 = C. lyroglossa RK3, 11 = P. tankervilleae var. alba RK3, 12 = Ce. longipes RK1, 13 = P. flavus RK2, 14 = C. cardioglossa MR7, 15 = C. cardioglossa RK2, 16 = C. masuca RK1, 17 = C. lyroglossa RK2, 18 = C. vestita MR3, 19 = C. vestita MR4, 20 = P. flavus RK3, 21 = C. rubens RK1, 22 = C. rubens MR3, 23 = C. rubens var. alba RK1, 24 = P. indochinensis RK1, 25 = C. lyroglossa RK1, 26 = P. tankervilleae MR1, 27 = P. tankervilleae RK1, 28 = P. tankervilleae PR1, 29 = C. pulchra MR1, 30 = Ce. longipes PH1, 31 = Ce. longipes PH2, 32 = C. triplicata NN1, 33 = C. rosea MR3, 34 = C. rosea MR4, 35 = C. masuca RK4, 36 = C. clavata PR2, 37 = P. mishmensis RK4, 38 = P. mishmensis RK5, 39 = P. mishmensis RK7, 40 = C. triplicata MR1, 41 = C. succedanea MR1, 42 = C. densiflora RK1, 43 = C. densiflora PH1, 44 = C. rosea MR7 และ 45 = C. herbacea PH1 42

ภาพ 26 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณระหว่างยีน trnL-trnF โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA Ladder (Sibenzyme), 1 = C. triplicata MR1, 2 = C. triplicata RK1, 3 = C. cardioglossa MR3, 4 = C. cardioglossa MR7, 5 = C. masuca MR1, 6 = C. masuca RK1, 7 = P. tankervilleae var. alba CM1, 8 = Ce. longipes RK1, 9 = Ce. longipes PH2, 10 = P. flavus RK2, 11 = P. tankervilleae MR1, 12 = C. triplicata NN1, 13 = Ce. obcordata RK1, 14 = C. clavata PR1, 15 = P. tankervilleae RK1, 16 = C. triplicata PR2, 17 = C. clavata PR2, 18 = C. cardioglossa RK2, 19 = C. rosea MR4, 20 = Ce. longipes PH1, 21 = P. flavus RK3, 22 = P. mishmensis RK7, 23 = P. tankervilleae RK2, 24 = C. densiflora PH1, 25 = C. lyroglossa RK1, 26 = P. tankervilleae var. alba RK3, 27 = P. indochinensis RK1, 28 = C. lyroglossa RK2, 29 = C. succedanea MR1, 30 = P. mishmensis RK4, 31 = C. herbacea PH1, 32 = C. masuca RK4, 35 = C. vestita MR3, 36 = C. vestita MR4, 37 = C. rosea MR3, 38 = C. rosea MR7, 39 = P. tankervilleae PR1, 40 = C. rubens RK1, 41 = C. rubens var. alba RK1, 42 = C. rubens MR3, 43 = C. rubens PR4, 44 = C. densiflora RK1 และ 45 = C. lyroglossa RK3.....43

ภาพ 27 Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน matK โดยใช้วิธี UPGMA.....56

ภาพ 28 Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน rbcL โดยใช้วิธี UPGMA.....58

ภาพ 29 Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน psbA-trnH โดยใช้วิธี UPGMA.....60

ภาพ 30 Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน trnL-trnF โดยใช้วิธี UPGMA.....62

ภาพ 31 Phylogenetic tree ที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ matK ร่วมกับ rbcL โดยใช้วิธี UPGMA.....63

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นจัดอยู่ในวงศ์ย่อย Epidendroideae ประกอบด้วย 3 สกุล ได้แก่ สกุลเอื้องน้ำต้น (*Calanthe*) พบ 260 ชนิด ในประเทศไทยมีรายงานพบ 23 ชนิด สกุลเอื้องพร้าว (*Phaius*) พบ 40 ชนิด ในประเทศไทยมีรายงานพบ 7 ชนิด และสกุลเอื้องกลีบเกลียว (*Cephalantheropsis*) พบ 5 ชนิด ในประเทศไทยมีรายงานพบ 2 ชนิด โดยกล้วยไม้กลุ่มนี้เป็นกลุ่มของกล้วยไม้ดิน และกล้วยไม้อิงอาศัย ที่มีการเจริญเติบโตทางยอดหรือทางด้านข้าง ซึ่งมีลักษณะที่สำคัญคือ มีใบแบบพับจีบ ดอกมีลักษณะเป็นช่อดอกแบบกระจะ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีลักษณะคล้ายกัน ปลายกลีบปากแยกออกเป็นแฉก มีเรณู 8 อัน แยกออกเป็น 2 กลุ่ม มีการกระจายพันธุ์หลักส่วนใหญ่อยู่ในเอเชีย โดยในประเทศจีนมีการรายงานของกล้วยไม้กลุ่มนี้ จึงมีการศึกษาความสัมพันธุ์ทางพันธุกรรม โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนิวเคลียสและคลอโรพลาสต์ สามารถแบ่งกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นออกเป็น 6 กลุ่ม โดยสกุลเอื้องน้ำต้นแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย *Calanthe*, *Styloglossa* และ *Preptanthe* สกุลเอื้องพร้าว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ประกอบด้วย *Phaius* และ *Paraphaius* ส่วนสกุลเอื้องกลีบเกลียวมี 1 กลุ่ม คือ *Cephalantheropsis* การจำแนกด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งเฉพาะกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ ราก ลำต้น และใบ พบว่า มีบางลักษณะของสัณฐานวิทยาที่ปรากฏร่วมกัน และบางลักษณะที่คล้ายกันมาก ดังนั้นเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าทั้งสามสกุลมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมาก (Zhai et al., 2014) อาจส่งผลให้การจำแนกหรือระบุชนิดโดยใช้สัณฐานวิทยาอย่างเดียวทำได้ยาก ต้องอาศัยความชำนาญและประสบการณ์ด้านการจำแนก ดังนั้นการใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมที่จำเพาะของกล้วยไม้มาช่วยในการจำแนกจะทำให้ได้ผลที่ถูกต้องยิ่งขึ้น

ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลจำนวนมากมาช่วยในการจัดจำแนก เช่น การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นนเพียงเส้นเดียวมาจับกับดีเอ็นเอแบบสุ่ม ทำให้เกิดผลผลิตจำนวนมาก เรียกว่า ramdom amplified polymorphic DNA หรือ RAPD เหมาะสำหรับพืชที่ยังไม่มีการศึกษา แต่มีข้อเสียคือ เมื่อทำซ้ำให้ผลไม่คงเดิม จึงมีการนำเทคนิคอื่นมาใช้มากขึ้น โดยมีการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งเฉพาะมาเป็นมาตรฐานในการระบุสิ่งมีชีวิตใน

ระดับชนิด เรียกว่า ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) ซึ่งเป็นเทคนิคที่เร็วและถูกต้อง ดังนั้นจึงมีผู้นำมาใช้ระบุชนิดในสิ่งมีชีวิต ทั้งในสัตว์ ฟังไจ แบคทีเรีย และพืช สำหรับดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานที่ใช้ในพืช มีการนำดีเอ็นเอทั้งจากนิวเคลียสและคลอโรพลาสต์มาวิเคราะห์เพื่อหาดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสม โดย Consortium for the Barcode of Life plant working group (2009) เสนอการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *rbcL* กับ *matK* ร่วมกัน (Hollingsworth et al., 2009) เนื่องจากวงศ์กล้วยไม้เป็นวงศ์ที่มีความหลากหลายสูง มีสมาชิกจำนวนมากและมีการกระจายพันธุ์ทั่วโลก ทำให้เมื่อศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดแล้วพบว่าแต่ละสกุลก็มีความแตกต่างกัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ 4 บริเวณ คือ *rbcL*, *matK*, *psbA-trnH* และ *trnL-trnF* เพื่อตรวจสอบหาดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่จำเพาะของแต่ละสกุลหรือแต่ละชนิดในกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นที่พบในประเทศไทย

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อตรวจสอบหาดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่จำเพาะในระดับสกุลหรือระดับชนิดของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น

2. เพื่อประเมินลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณในคลอโรพลาสต์ที่เหมาะสม สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดในกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น

ขอบเขตของงานวิจัย

กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นในประเทศไทย ประกอบด้วย 3 สกุล คือ สกุลเอื้องน้ำต้นหรือ *Calanthe* สกุลเอื้องพร้าวหรือ *Phaius* และสกุลเอื้องกลีบเกลียวหรือ *Cephalantheropsis* โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ ในบริเวณยีน *rbcL* และ *matK* บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และ *trnL-trnF*

นิยามศัพท์เฉพาะ

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด คือลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดสั้นที่มีความจำเพาะกับพืชในระดับสกุลและชนิด

สมมติฐานงานวิจัย

ลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์มีประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดออกจากกัน และมีประสิทธิภาพในการเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อระบุชนิดกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายกันได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กล้วยไม้ (Orchid)

กล้วยไม้ เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledonous plant) จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae มีอายุหลายปี ไม่มีเนื้อไม้ (perennial herb) กล้วยไม้เป็นพืชที่มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดในกลุ่มไม้ดอก สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย ซึ่งมีอยู่ในธรรมชาติมากกว่า 25,000 ชนิด ทั้งในบริเวณที่มีน้ำแข็งปกคลุม เขตหนาว และเขตอบอุ่น โดยทวีปเอเชีย อเมริกาใต้ และแอฟริกา ซึ่งอยู่ในเขตร้อนเป็นบริเวณที่มีกล้วยไม้ในธรรมชาติจำนวนมากและมีความหลากหลายสูง นอกจากนี้ยังมีการดำรงชีวิตที่หลากหลาย เช่น กล้วยไม้อิงอาศัยพบจำนวนมากในเขตร้อนและเขตอบอุ่นของโลก และยังมีสัณฐานวิทยาที่เฉพาะและหลากหลาย ซึ่งแตกต่างจากพืชชนิดอื่น ดังนี้

ราก ส่วนใหญ่รากของกล้วยไม้เป็นรากอากาศ ไม่มีรากฝอย บริเวณปลายรากมีสีเขียวช่วยในการสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างอาหาร มีลักษณะอวบน้ำและมีเนื้อเยื่อคล้ายฟองน้ำหุ้มเพื่อดูดซับแร่ธาตุและน้ำและรักษาความชื้น เรียกว่า เวลาเมน (velamen) เกิดจากเนื้อเยื่อของเซลล์ที่ตาย พบได้ทั้งในกล้วยไม้ดินและกล้วยไม้อิงอาศัย ในกล้วยไม้ดินบางชนิดยังมีรากทำหน้าที่สะสมอาหาร (tuberous root) (Kurzweil, 2011; ระพี สาคริก, 2530; เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล, 2552; อบฉันท์ ไทยทอง, 2544)

ลำต้น กล้วยไม้บางชนิดมีการปรับตัวของลำต้นให้สามารถทนกับสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งได้ โดยมีลักษณะลำต้นป่องพองคล้ายผลกล้วย เรียกว่า ลำลูกกล้วย หรือ หัวเทียม (pseudobulb) บริเวณลำลูกกล้วยจะมีข้อปล้อง ตา สามารถแตกเป็นหน่อใหม่ได้ ซึ่งลำลูกกล้วยอาจมีใบเดียวหรือหลายใบที่เจริญออกมาจากแต่ละข้อของลำต้น บางชนิดมีแผ่นใบในการเก็บน้ำและอาหาร หรืออาจมีสีเขียว ดังนั้นอาจมีลำลูกกล้วยสั้น เนื่องจากมีแผ่นใบช่วยในการสังเคราะห์แสง ในกล้วยไม้ดินจะมีลำต้นสะสมอาหารและน้ำ (tuber) หรือบางชนิดลำต้นมีขนาดเล็กมีใบปกคลุมจึงไม่เห็นส่วนของลำต้น (Kurzweil, 2011; ระพี สาคริก, 2530; เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล, 2552; อบฉันท์ ไทยทอง, 2544)

ใบ กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จะมีเส้นกลางใบหรือเส้นย่อยยาวขนานไปตามความยาวของใบ ใบของกล้วยไม้จะมีสีเขียว ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสงสร้างอาหารของพืช บางชนิดสามารถเจริญได้ในพื้นที่แห้งแล้ง เนื่องจากใบมีขนาดเล็กมากเพื่อลดการสูญเสียน้ำที่เกิดจากการ

ระเหยจากปากใบ หรืออาจมี กาบใบ ลำต้น หรือราก ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสง (Kurzweil, 2011; ระพี สาคริก, 2530; เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล, 2552; อบฉันท์ ไทยทอง, 2544)

ดอก กล้วยไม้เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ประกอบด้วย กลีบเลี้ยง (sepal) 3 กลีบอยู่รอบนอกสุดของดอก โดยส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายกัน อาจแยกเป็นแต่ละกลีบหรือเชื่อมติดกันคล้ายหลอดสั้นๆ ถัดจากวงกลีบเลี้ยง เป็นกลีบดอก (petal) 3 กลีบ ซึ่งมีกลีบด้านข้าง 2 กลีบที่มีลักษณะเหมือนกันและอีก 1 กลีบจะอยู่ด้านล่างมีลักษณะแตกต่างจากกลีบที่อยู่ด้านข้าง เรียกว่า กลีบปาก (lip) ส่วนที่อยู่ตรงกลางของดอกคือ เส้าเกสร (staminal column) มีลักษณะเป็นแท่งด้านบนจะมีฝาขนาดเล็ก (anther cap) ครอบกลุ่มเรณู ถัดลงมาจะมีแอ่งที่มีน้ำเหนียวๆ ซึ่งเป็นส่วนของเกสรเพศเมีย ถัดจากแอ่งเหนียวจะเป็นส่วนของรังไข่ ซึ่งจะอยู่ต่ำกว่าเส้าเกสร โดยจะมีลักษณะโป่งพองเล็กน้อย (Kurzweil, 2011; ระพี สาคริก, 2530; เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล, 2552; อบฉันท์ ไทยทอง, 2544)

ผลหรือฝัก นอกจากจะมีราก ลำต้น ใบ ดอก ที่หลากหลายแล้ว ผลหรือฝักก็เป็นส่วนประกอบหนึ่งที่มีความหลากหลายเช่นกัน ผลจะมีลักษณะสีเขียว เมื่อแก่เต็มที่จะแตกตามแนวของผล ภายในประกอบด้วยเมล็ดที่มีขนาดเล็กมาก ซึ่งเมล็ดจะไม่มีอาหารสะสมอยู่ภายในและ ไม่มีใบเลี้ยง (Kurzweil, 2011; ระพี สาคริก, 2530; เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล, 2552; อบฉันท์ ไทยทอง, 2544)

การจำแนกกล้วยไม้

เนื่องจากกล้วยไม้มีสมาชิกจำนวนมากประกอบกับลักษณะที่หลากหลายซึ่งเกิดจากการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัย จึงมีเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกกล้วยไม้ที่หลากหลาย ดังนี้

1. การจำแนกกล้วยไม้ตามที่อยู่อาศัย จากลักษณะของบริเวณที่มีการเจริญเติบโตในธรรมชาติสามารถจำแนกได้ ดังนี้

กล้วยไม้อิงอาศัย (epiphytic orchid) สามารถพบเห็นได้ทั่วไป โดยมักจะมีรากเกาะยึดกับเปลือกไม้ บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้บนหินหรือหน้าผาอาจเรียกว่า พวกอิงอาศัยบนหิน (lithophytic orchid)

กล้วยไม้ดิน (terrestrial orchid) หมายถึงกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตบนดินหรือบริเวณซอกหินที่มีการสลายตัวของซากพืชแทรกอยู่ อาจมีส่วนของลำต้นหรือรากอยู่ในระดับดินหรือใต้ดิน กล้วยไม้กลุ่มนี้จะมีการเจริญของใบ ดอก และฝักตามฤดูกาล

กล้วยไม้กินซาก (saprophytic orchid) เป็นกล้วยไม้ที่ไม่มีการสร้างใบหรือต้นที่มีสีเขียว จึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างอาหารได้ มีการเจริญเติบโตตามพื้นดิน จึงได้อาหารจากการย่อยสลายซากพืช (เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล, 2552; อบฉันท์ ไทยทอง, 2544)

2. การจำแนกกล้วยไม้ตามลักษณะการเจริญเติบโต สามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตทางปลายยอด (monopodial vegetative) โดยกล้วยไม้กลุ่มนี้จะมีลักษณะยอดที่เจริญเติบโตไปเรื่อย ๆ ซึ่งจะมีลำต้นชัดเจนและลำต้นยาว จะเจริญทางปลายยอดอย่างเดียว หน่อใหม่จะเกิดจากโคนต้นเดิมหรือข้อใกล้โคนต้นเดิม สามารถออกดอกได้หลายช่อในต้นเดียวกัน

กลุ่มที่มีการเจริญเติบโตทางด้านข้างของลำต้น (sympodial vegetative) เป็นกลุ่มที่มีหน่อเกิดจากบริเวณฐานโคนต้นหรือเหง้าได้อย่างเดียว และมีส่วนของไหลที่ทอดเลื้อย จึงมักจะขึ้นเป็นกระจุก กลุ่มนี้มักจะมีลำต้นแบบลำลูกกล้วย (เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล, 2552; อบฉันท์ ไทยทอง, 2544)

3. การจำแนกกล้วยไม้ตามหลักพฤกษศาสตร์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 5 วงศ์ย่อย (Pridgeon et al., 1999) ดังนี้

วงศ์ย่อย Apostasioideae เป็นกลุ่มของกล้วยไม้ดิน มีตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ มีส่วนของเหง้าที่อาจมีเกล็ด มีระบบรากแบบรากอากาศ ส่วนที่อยู่เหนือพื้นดินจะมีการเจริญเติบโตตามฤดูกาล มีลำต้นแบบตั้งตรงและทอดนอน แตกหรือไม่แตกแขนง ใบจะเรียงเวียนรอบลำต้น ใบมีลักษณะหลากหลายแล้วแต่ชนิด ช่อดอกจะออกที่บริเวณยอด มีลักษณะแบบกระจะ มักตั้งตรง ซึ่งช่อดอกอาจมีการแตกแขนงในบางชนิด ดอกจะออกเรียงเวียนรอบแกนช่อดอก โดยดอกประกอบด้วยกลีบดอก 3 กลีบที่ไม่เชื่อมกัน กลีบดอก 2 กลีบมีลักษณะอวบน้ำ และมีกลีบปากคล้ายกับกลีบดอกและกลีบเลี้ยง

วงศ์ย่อย Vanilloideae เป็นกล้วยไม้ดินที่มีการเจริญเติบโตทางยอดและทางตาข้าง มีอายุหลายปี มีลักษณะเป็นพืชล้มลุกหรือไม้เลื้อย รากฝอยจะมีลักษณะยาวเพื่อเกาะยึด และอวบน้ำเพื่อสะสมอาหาร ลำต้นจะมีข้อ ปล้อง ยืดยาวและเลื้อย ใบมีลักษณะอวบน้ำ ช่อดอกเป็นแบบช่อกระจะออกจากบริเวณปลายยอด หรือด้านข้าง ดอกจะมีขนาดใหญ่ มีสีสันสวยงาม และมีลักษณะเด่น คือ มีกลิ่นหอม กลีบเลี้ยงและกลีบดอกแยกเป็นอิสระจากกัน

วงศ์ย่อย Cypripedioideae กล้วยไม้กลุ่มนี้ประกอบด้วยกล้วยไม้ดินที่เจริญบนหินและกล้วยไม้อิงอาศัย มีระบบรากฝอย เหง้ามีขนาดสั้นหรือยาวไม่แตกแขนงลำต้นมีตั้งแต่สั้นจนถึงยาว

ต้นจะตั้งตรง ใบจะมีสีเหลืองจนเขียว มีลายจุดเข้มด้านบนของใบ ดอกมีตั้งแต่ 1 ดอกจนถึงหลายดอก ดอกมีขนาดใหญ่ มีเพียงสีเดียวหรือ 2 สีในดอกเดียวกัน กลีบเลี้ยงด้านบนจะตั้งตรง กลีบเลี้ยงด้านข้าง มักจะเชื่อมกันเป็นกลีบรวม ปลายเรียบหรืออาจแยกเป็น 2 แฉก กลีบดอกเป็นอิสระออกจากกัน

วงศ์ย่อย Orchidoideae ส่วนใหญ่เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย มีทั้งแบบอาศัยอยู่เดี่ยวๆ หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม มีรากหรือลำต้นอวบ สะสมอาหาร บางชนิดมีเหง้าที่อวบน้ำและยืดยาว บางชนิดใบลดรูปไปเป็นกาบใบ ใบจะเรียงเวียน มีตั้งแต่ 1 จนถึงหลายใบอยู่บริเวณที่โคนหรือลำต้นไปจนถึงยอด มักจะออกใบตลอดทั้งปี ใบที่อยู่ปลายยอดจะเปลี่ยนเป็นใบประดับรองรับช่อดอก ซึ่งอาจมี สีเขียว ช่อดอกจะออกปลายยอด มีลักษณะช่อดอกแบบช่อกระจะ ประกอบด้วย 1 ดอกจนถึงหลายดอก หลายชนิดพบการบิดของก้านดอก กลีบเลี้ยงอาจเป็นอิสระหรือเชื่อมติดกันคลุมเส้าเกสร กลีบดอกส่วนใหญ่จะเป็นอิสระ ปลายกลีบแยกเป็น 2 แฉก กลีบปากมีขอบเรียบ ปลายแฉกอาจแยก 3-5 แฉก

วงศ์ย่อย Epidendroideae เป็นกลุ่มที่มีการเจริญเติบโตที่หลากหลาย ทั้งกล้วยไม้ดิน กล้วยไม้ที่ขึ้นบนหิน และกล้วยไม้อิงอาศัย พบการเจริญเติบโตทั้งแบบปลายยอดและด้านข้าง รากมักเป็นเส้นเดียว หรือแตกแขนง มีลักษณะอ้วนป้อม และมีชั้นของเวลาเมนที่หนา บางชนิดมีกาบหุ้มรอบลำต้น ไม่มีเนื้อไม้ อาจอยู่เดี่ยวหรืออยู่เป็นกลุ่ม ใบเป็นแบบใบเดี่ยวไม่หลุดร่วง มีลักษณะหนา ผิวใบมันและเหนียว ช่อดอกเป็นแบบช่อกระจะ ออกทางด้านข้าง บางชนิดออกที่ปลายยอด มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกแยกเป็นอิสระจากกัน กลีบปากมีแฉก เส้าเกสรจะมีกลุ่มเรณู 2-6 กลุ่ม

กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น (Calanthe group)

กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น จัดอยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae) วงศ์ย่อย Epidendroideae ซึ่งเป็นกลุ่มของกล้วยไม้ดินและกล้วยไม้อิงอาศัย ประกอบด้วย 3 สกุล คือ สกุลเอื้องน้ำต้น (*Calanthe* R.Br.) สกุลเอื้องพร้าว (*Phaius* Lour.) และสกุลเอื้องกลีบเกลียว (*Cephalantheropsis* Guillaumin) มีรายงานการพบกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นในประเทศไทย สกุลเอื้องน้ำต้น 21 ชนิด สกุลเอื้องพร้าว 5 ชนิด และสกุลเอื้องกลีบเกลียว 1 ชนิด (Kurzweil, 2011) ซึ่งต่อมาในปี 2014 มีการเผยแพร่กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นที่พบในประเทศไทยในหนังสือ Flora of Thailand (Pedersen et al., 2014) ดังนี้

1. กล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้น (*Calanthe* R.Br.)

Calanthe มีความหมายว่า กล้วยไม้ที่มีดอกสวยงาม โดยมาจากภาษากรีก 2 คำ คือ “kalos” แปลว่าสวยงามและ “anthos” แปลว่าดอก กล้วยไม้สกุลนี้มักเจริญเติบโตในป่าผลัดใบหรือ

ป่าดิบเขา ส่วนใหญ่เป็นกล้วยไม้ดิน กล้วยไม้ที่ขึ้นบนหิน บางชนิดเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย ลำต้นมีลักษณะอวบน้ำเป็นแบบ ลำลูกกล้วย (pseudobulb) บางชนิดจะมีลำต้นสั้นและมีใบคลุม ใบมีขนาดยาว สีเขียว และมีรอยพับจีบ มีการเจริญของช่อดอกทางด้านข้างหรือจากซอกใบ ช่อดอกยาว 12-80 เซนติเมตร ไม่มีการแตกแขนง ดอกมีขนาดกลางไปจนถึงดอกขนาดใหญ่ โดยส่วนใหญ่กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีสีขาว สีชมพู หรือสีเหลือง เมื่อดอกมีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน กลีบเลี้ยงแยกจากกันและมักมีขนปกคลุม กลีบดอกมีลักษณะคล้ายกัน ปลายกลีบปากแยกออกเป็น 2-3 แฉก เส้าเกสรสั้นเชื่อมกับโคนกลีบดอก ทำให้ดูคล้ายเส้า กลุ่มเรณูมี 8 กลุ่ม แยกเป็นชุดละ 4 อัน

กล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้นเป็นสกุลที่มีขนาดใหญ่ มีสมาชิกทั้งหมด 207 ชนิด ส่วนใหญ่พบในเอเชีย ออสเตรเลียเหนือ หมู่เกาะแปซิฟิก ไอซ์แลนด์ แอฟริกา และอเมริกากลาง ในประเทศไทยพบทั้งหมด 23 ชนิด (Pedersen et al., 2014)

1.1 *Calanthe cardioglossa* Schltr. (เอื้องน้ำต้น)

กล้วยไม้ชนิดนี้มีลำต้นที่สูง 30-68 เซนติเมตร มีลำลูกกล้วยสีเขียวอมเทา มักเรียกว่า หัว มีลักษณะรูปรีซึ่งคล้ายกับลักษณะของน้ำเต้า มีร่องตื้นตามยาวบริเวณผิว โดยสูงประมาณ 3 -7 เซนติเมตร กว้างประมาณ 2-3.5 เซนติเมตร ใบมีลักษณะรีแกมรูปใบหอก ยาวประมาณ 20-30 เซนติเมตร กว้าง 3.5-5 เซนติเมตร บริเวณปลายใบแหลมมน ตรงงโคนใบสอบ ช่อดอกมีลักษะตรงหรือโค้ง ยาวประมาณ 20-50 เซนติเมตร ดอกในช่อเรียงแบบโปร่ง ดอกมีขนาด 1.5-2 เซนติเมตร ผิวด้านนอกของกลีบเลี้ยงมีขน มีลายจุดประบนกลีบแตกต่างกัน ดอกมีสีที่หลากหลาย เช่น ชมพู ส้ม หรือเหลืองอมส้ม (ภาพ 1) กล้วยไม้ชนิดนี้มักออกดอกในเดือนธันวาคมถึงเดือนมกราคม มักเจริญเติบโตในป่าดิบเขาและป่าผลัดใบ กล้วยไม้ชนิดนี้มีการกระจายพันธุ์ทั้งใน ประเทศไทย ลาว เวียดนาม และกัมพูชา โดยในประเทศไทยสามารถพบได้ในหลายภูมิภาค ได้แก่

ภาคเหนือ พบในจังหวัดแม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ น่าน อุตรดิตถ์ เพชรบูรณ์ และพิษณุโลก

ภาคตะวันออกฉียงเหนือ พบในจังหวัดเลย ของแก่น ชัยภูมิ และอุบลราชธาณี

ภาคตะวันตก พบในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ภาคตะวันออก พบในจังหวัดปราจีนบุรี และนครนายก

ภาคใต้พบในจังหวัดระนอง สุราษฎร์ธานี และพังงา (Pedersen et al., 2014; อบฉันท์ ไทยทอง, 2544)

ภาพ 1 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Calanthe cardioglossa* Schltr.

(ที่มา: https://www.123rf.com/photo_31651282_pink-ground-orchid-calanthe-cardioglossa-native-specie-terrestrial-orchid-in-the-southeast-asian-are.html)

1.2 *Calanthe clavata* Lindl. (เอื้องพุ่มคฑา)

กล้วยไม้ดิน สูงประมาณ 60 - 100 เซนติเมตร ใบ พับจีบ รูปรีแกม ขอบขนาน กว้าง 8-12 เซนติเมตร ยาว 60-100 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อตั้ง บานเต็มที่กว้าง 1.5 เซนติเมตร ออกจากโคนต้น ยาวประมาณ 40-50 เซนติเมตร มี 30-40 ดอก สีเหลือง กลีบปากมีหูกลีบชัดเจน บริเวณโคนกลีบปากเป็นเดือยรูปกระบอง ออกดอกเดือนตุลาคมมักเจริญเติบโตในป่าดิบเขาและป่าผลัดใบ กระจายพันธุ์ในหลายประเทศ ทั้งในอินเดีย บังกลาเทศ เมียนมาร์ เวียดนาม จีน ไต้หวัน และไทย ในประเทศไทยมีการกระจายพันธุ์เพียง 3 จังหวัด คือ เชียงใหม่ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี (ภาพ 2) (Pedersen et al., 2014)

ภาพ 2 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Calanthe clavata Lindl.*

(ที่มา: http://siamensis.org/webboard/topic/34817)

1.3 *Calanthe densiflora* Lindl.

กล้วยไม้ดิน สูงประมาณ 40 – 60 เซนติเมตร ใบพับจีบ 4 – 5 ใบ กว้าง 8 - 12 เซนติเมตร ยาว 60-100 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อตั้ง ออกจากโคนต้น ยาวประมาณ 40-50 เซนติเมตร มี 30-40 ดอก สีเหลือง มีการเจริญเติบโตในป่าเบญจพรรณ รายงานพบกล้วยไม้ชนิดนี้ในหลายประเทศ ได้แก่ เนปาล ภูฏาน อินเดีย บังกลาเทศ เมียนมาร์ เวียดนาม จีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น และไทย ในประเทศไทยพบในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ พิษณุโลก เพชรบูรณ์ และเลย (ภาพ 3) (Pedersen et al., 2014)

ภาพ 3 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Calanthe densiflora* Lindl.

(ที่มา: https://www.flickr.com/photos/afriorchids/4601411301)

1.4 *Calanthe herbacea* Lindl.

กล้วยไม้ดิน สูงประมาณ 100 เซนติเมตร ใบพับจีบ 4-6 ใบ ขอบขนาน กว้าง 8 - 12 เซนติเมตร ยาว 60-100 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อตั้ง บานเต็มที่กว้าง 1.5 เซนติเมตร ออกจากโคนต้น ยาวประมาณ 40-50 เซนติเมตร มี 30-40 ดอก กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีสีเขียว กลีบปากมีสีขาว พบการเจริญเติบโตในป่าดิบเขา มีการกระจายพันธุ์ในหลายประเทศ ได้แก่ อินเดีย เมียนมา เวียดนาม จีน และประเทศไทย ซึ่งในประเทศไทยพบในภาคเหนือเท่านั้น ได้แก่ เชียงใหม่ และน่าน (ภาพ 4) (Pedersen et al., 2014)

ภาพ 4 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Calanthe herbacea* Lindl.

(ที่มา: http://www.albiflora.be/plantdetail.php?id=76)

1.5 *Calanthe lyroglossa* Rchb.f. (กล้วยไม้ดง)

กล้วยไม้ชนิดนี้มีส่วนของลำต้นที่สั้น บริเวณโคนถูกหุ้มด้วยกาบใบ ใบมีลักษณะขอบขนานแกมรูปรี ยาวประมาณ 30-60 เซนติเมตร กว้างประมาณ 5-8 เซนติเมตร บริเวณโคนใบเรียว แผ่นใบมีลักษณะอ่อนและบาง ช่อดอกจะมีความสูงกว่าใบหรือใกล้เคียง ก้านช่อจะมีลักษณะอวบน้ำและตรง ดอกมักเกิดค่อนไปทางบริเวณปลายช่อดอก ทำให้ช่อดอกมีลักษณะคล้ายพุ่ม ประกอบด้วยใบประดับแทรกอยู่ในช่อดอก ดอกในช่อดอกจะทยอยบานจากบริเวณโคนช่อดอกไปยังปลายช่อดอก โดยดอกในช่อมีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ซึ่งกลีบจะกางเล็กน้อย กล้วยไม้ชนิดนี้จะออกดอกประมาณเดือนพฤศจิกายนไปจนถึงเดือนกุมภาพันธ์ มักเจริญเติบโตในป่าดิบเขา มีการกระจายพันธุ์ในหลายประเทศ เช่น อินเดีย เมียนมา กัมพูชา ลาว เวียดนาม จีน และเกาะบอร์เนียว ประเทศไทยเป็นอีกประเทศที่มีรายงานพบกล้วยไม้ชนิดนี้ด้วย มีการกระจายพันธุ์ในหลายจังหวัด ได้แก่ เลย ชัยภูมิ นครราชสีมา นครนายก จันทบุรี ระนอง สุราษฎ์ธานี พังงา นครศรีธรรมราช และปัตตานี (ภาพ 5) (Pedersen et al., 2014; อบฉันท์ ไทยทอง, 2544)

ภาพ 5 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Calanthe lyroglossa* Rchb.f.

(ที่มา: http://www.albiflora.be/plantdetail.php?id=76)

1.6 *Calanthe masuca* (D. Don) Lindl. (อั้วดอกม่วง)

ต้นสั้น มีโคนกาบใบหุ้ม ใบเป็นรูปรีหรือรูปใบหอกกลับ แผ่นใบบางและอ่อน มีขนนุ่มทั้งสองด้าน ปลายใบมีลักษณะแหลม โคนสอบเรียวเป็นก้าน ช่อดอกตั้งตรงสูงใกล้เคียงกับใบ ก้านช่อมีลักษณะอวบน้ำ ดอกเกิดไปทางปลายช่อและแน่น กลีบทุกกลีบกางเกือบอยู่ในระดับเดียวกัน ปัจจุบันพบได้น้อยมาก ออกดอกในเดือนกรกฎาคม เจริญเติบโตในป่าดิบเขาและป่าดงดิบ พบกล้วยไม้ชนิดนี้ในหลายประเทศ ได้แก่ ไทย อินเดีย ศรีลังกา เนปาล ภูฏาน เมียนมา เวียดนาม จีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น มาเลเซีย นอกจากนี้ยังพบตามหมู่เกาะอีกด้วย ได้แก่ เกาะสุมาตรา เกาะชวา หมู่เกาะซุนดาน้อย เกาะบอร์เนียว และเกาะซูลาเวซี ซึ่งในประเทศไทยพบในหลายจังหวัดได้แก่ เชียงใหม่ น่าน พิษณุโลก เพชรบูรณ์ เลย ชัยภูมิ ปัตตานี ยะลา นราธิวาส (ภาพ 6) **(Pedersen et al., 2014)**

ภาพ 6 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Calanthe masuca* (D. Don) Lindl.
(ที่มา: https://www.flickr.com/photos/131528844@N08/29755791877)

1.7 *Calanthe pulchra* (Blume) Lindl.

เป็นกล้วยไม้ดิน สูงประมาณ 40 – 60 เซนติเมตร ใบพับจีบ 2 – 6 ใบ กว้าง 8 - 12 เซนติเมตร ยาว 60-100 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อตั้ง ออกจากโคนต้น ยาวประมาณ 40-50 เซนติเมตร มี 30-40 ดอก ดอกสีเหลือง กลีบปากมีสีเหลืองไปจนถึงสีดำ มักเจริญเติบโตในป่าดงดิบเขาพบกล้วยไม้ชนิดนี้ในหลายประเทศได้แก่ ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย สิงคโปร์ เกาะสุมาตรา เกาะชวา และเกาะบอร์เนียว รวมถึงประเทศไทยด้วย ซึ่งในประเทศไทยมีการกระจายพันธุ์ในภาคใต้เท่านั้น ได้แก่ นครศรีธรรมราช สงขลา และยะลา (ภาพ 7) (Pedersen et al., 2014)

ภาพ 7 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Calanthe pulchra* (Blume) Lindl.

(ที่มา: http://www.dnp.go.th/botany/mindexdictdetail.aspx?runno=5262)

1.8 *Calanthe rosea* (Lindl.) Benth. (เอื้องข้าวเหนียวลิง)

มีลำลูกกล้วยสีเขียวอมเทา มักเรียกว่า หัว มีลักษณะรูปรีซึ่งคล้ายกับลักษณะของน้ำเต้า มีร่องตื้นตามยาวบริเวณผิว โดยสูงประมาณ 6 -10 เซนติเมตร กว้างประมาณ 2-3 เซนติเมตร ใบมีลักษณะขอบขนานแกมรี ยาวประมาณ 20-40 เซนติเมตร กว้าง 5-6 เซนติเมตร แผ่นใบมีลักษณะอ่อนและบาง บริเวณโคนก้านจะเรียว มักทิ้งใบก่อนออกดอก ช่อดอกยาวประมาณ 20-50 เซนติเมตร ก้านช่อมีลักษณะผอมและมีขนปกคลุม ดอกในช่อเรียงแบบโปร่ง ดอกมักออกที่ปลายช่อดอก ดอกมีขนาด 4-2.5 เซนติเมตร โดยดอกจะทยอยบาน กล้วยไม้ชนิดนี้มักออกดอกในเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคม มักเจริญเติบโตในป่าดิบแล้งและป่าผลัดใบ พบกล้วยไม้ชนิดนี้ในเมียนมา และประเทศไทย ซึ่งในประเทศไทยมีการกระจายพันธุ์ในหลายจังหวัด

ภาคเหนือ พบในจังหวัดน่าน ลำปาง เพชรบูรณ์ และตาก

ภาคกลาง พบในจังหวัดอุทัยธานี

ภาคจะวันตก พบในจังหวัดกาญจนบุรี และเพชรบุรี

ภาคตะวันออก พบในจังหวัดปราจีนบุรี (ภาพ 8) (Pedersen et al., 2014; อบฉันท์ ไทยทอง, 2544)

1.9 *Calanthe rubens* Ridl. (อั้วพวงมณี)

มีลำลูกกล้วยสีเขียวอมเทา มักเรียกว่า หัว มีลักษณะรูปรีซึ่งคล้ายกับลักษณะของน้ำเต้า มีร่องตื้นตามยาวบริเวณผิว โดยสูงประมาณ 5 -6 เซนติเมตร กว้างประมาณ 2-3 เซนติเมตร ใบ ยาวประมาณ 25-40 เซนติเมตร กว้าง 8-10 เซนติเมตร มักทิ้งใบก่อนออกดอก ช่อดอกยาวประมาณ 50 เซนติเมตร โดยดอกจะทยอยบาน กล้วยไม้ชนิดนี้มักออกดอกในเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์

ภาพ 8 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Calanthe rosea* (Lindl.) Benth.

(ที่มา: https://medium.com/@Potsandpetals/pots-and-petals-calanthe-rosea-346446bf64cb)

มักเจริญเติบโตในป่าดิบเขา พบกล้วยไม้ชนิดนี้ในหลายประทศ ได้แก่ กัมพูชา เวียดนาม ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย และประเทศไทย โดยในประเทศไทยพบกระจายพันธุ์ในหลายจังหวัด ดังนี้

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบในจังหวัดนครราชสีมา ศรีษะเกษ

ภาคกลาง พบในจังหวัดสระบุรี

ภาคตะวันออก พบในจังหวัดปราจีนบุรี ระยอง ชลบุรี

ภาคใต้ พบในจังหวัดสุราษฎ์ธานี พังงา กระบี่ นครศรีธรรมราช ตรัง และสตูล (ภาพ 9) (Pedersen et al., 2014; อบฉันท์ ไทยทอง, 2544)

1.10 *Calanthe succedanea* Gagnep.

เป็นกล้วยไม้ดิน สูงประมาณ 30 – 47 เซนติเมตร ใบพับจีบ 4 ใบ กว้าง 8 - 12 เซนติเมตร ยาว 60-100 เซนติเมตร ดอกออกเป็นช่อตั้ง ออกจากโคนต้น ยาวประมาณ 40-50 เซนติเมตร มี 30-40 ดอก ดอกสีชมพู กลีบปากมีสีเข้ม ดอกคล้ายกับ *C. cardioglossa* แต่จะมีขนาดที่ใหญ่กว่า เจริญเติบโตในป่าดิบแล้ง ในประเทศไทยกล้วยไม้ชนิดนี้มีการกระจายพันธุ์ในหลายจังหวัด ได้แก่ แม่ฮ่องสอน เชียงใหม่ พิษณุโลก เพชรบูรณ์ เลย ชัยภูมิ และจันทบุรี นอกจากนี้ยังมีรายงานพบในประเทศอื่นๆ ด้วย ได้แก่ กัมพูชา ลาว และเวียดนาม (ภาพ 10) (Pedersen et al., 2014)

ภาพ 9 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Calanthe rubens* Ridl.

(ที่มา: https://www.orchidroots.com/detail/30391/species/?tab=sum)

ภาพ 10 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Calanthe succedanea* Gagnep.

(ที่มา: https://khaoyaim.exblog.jp/14858070/)

1.11 *Calanthe triplicata* (Willemet) Ames (อั้วดอกขาว)

ต้นสั้น มีโคนกาบใบหุ้ม ใบรูปขอบขนานแกมรี ช่อดอกลักษณะตั้งตรง ดอกเรียงตัวกันเป็นพุ่มทางปลายช่อ ปัจจุบันสามารถพบได้น้อยลง ช่วงเวลาที่ออกดอกได้แก่เดือนพฤษภาคมไปจนถึงเดือนมิถุนายนเจริญเติบโตในป่าดิบเขา ในประเทศไทยพบกล้วยไม้ชนิดนี้ในหลายจังหวัด ดังนี้

ภาคเหนือ พบในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง เพชรบูรณ์ และตาก

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบในจังหวัดเลย ชัยภูมิ และนครราชสีมา

ภาคตะวันออก พบในจังหวัดนครนายก ปราจีนบุรี ชลบุรี จันทบุรี และตราด

ภาคตะวันตก พบในจังหวัดกาญจนบุรี และเพชรบุรี (ภาพ 11) (Pedersen et al., 2014)

ภาพ 11 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Calanthe triplicata* (Willemet) Ames

(ที่มา: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/448382?lg=en)

1.12 *Calanthe vestita* Wall. Ex Lindl. (อั้วนวลจันทร์)

หัวรูปรี ขอบเป็นสันมน สีเขียวอมเทา จะทิ้งใบก่อนออกดอก ปลายมักจะโค้ง ดอกในช่อค่อนข้างดก กล้วยไม้ชนิดนี้จะออกดอกในเดือนพฤศจิกายนไปจนถึงเดือนมกราคม เจริญเติบโตในป่าเขาหินปูน พบกล้วยไม้ชนิดนี้กระจายพันธุ์ในหลายประเทศ ได้แก่ ไทย เมียนมาร์ ลาว เวียดนาม ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย เกาะสุมาตรา เกาะชวา เกาะบอร์เนียว เกาะซูลาเวซี เกาะซุนดาน้อย และเกาะนิวกินี ซึ่งในประเทศไทยพบในจังหวัดตาก ระนอง สุราษฎร์ธานี และพังงา (ภาพ 12) (Pedersen et al., 2014)

ภาพ 12 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Calanthe vestita* Wall. Ex Lindl.

(ที่มา: https://alchetron.com/Calanthe-vestita)

2. กล้วยไม้สกุลเอื้องพร้าว (*Phaius* Lour.)

มีการเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่คล้ายกับสกุลเอื้องน้ำต้น เป็นกล้วยไม้ดิน ลำต้นเป็นแบบลำลูกกล้วยช่อดอกยาว 40-200 เซนติเมตร ดอกมีขนาดใหญ่ ชนิดที่พบในประเทศไทย ส่วนใหญ่ดอกมีสีเหลือง สีชมพู หรือสีขาว กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีลักษณะคล้ายกัน แต่ละกลีบไม่เชื่อมติดกัน

ปลายกลีบปากแยกเป็น 3 แฉกหรือมากกว่านั้น กลีบเลี้ยงและกลีบดอกไม่เชื่อมติดกับเส้าเกสร หรืออาจรวมเฉพาะที่ฐานของดอก เส้าเกสรมีลักษณะยาว โดยส่วนใหญ่มีขน เรณูมี 8 อัน แยกเป็น 2 กลุ่ม ทั่วโลกพบกล้วยไม้สกุลนี้ 40 ชนิด มีการกระจายพันธุ์ในเอเชีย แอฟริกา ออสเตรเลียเหนือ และไอซ์แลนด์ ในประเทศไทยพบ 6 ชนิด (Pedersen et al., 2014)

2.1 *Phaius flavus* Lindl.

เอื้องคำผา หรือเอื้องพร้าวดอกเหลือง หัวคล้ายกรวยคว่ำ แต่ละต้นมี 5-8 ใบ โคนใบเป็นกาบซ้อนกันคล้ายต้น เป็นลำกลม แผ่นใบเป็นรูปรีแกมใบหอกกลับ มีแนวพับจีบตามยาวของใบ ช่อดอกจะเกิดจากโคนต้นเป็นช่อตรง กลีบดอกอวบน้ำ เป็นกล้วยไม้ขนาดใหญ่ แต่พบค่อนข้างน้อย โดยจะออกดอกในเดือนเมษายนไปจนถึงเดือนมิถุนายน เป็นกล้วยไม้ดินเจริญเติบโตในป่าดิบเขา กล้วยไม้ชนิดนี้มีการกระจายพันธุ์ในหลายประเทศ เช่น อินเดีย เนปาล จีน ญี่ปุ่น มาเลเซีย นิวกินี และประเทศไทย ซึ่งประเทศไทยพบในหลายจังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ น่าน ตาก พิษณุโลก เพชรบูรณ์ เลย และกาญจนบุรี (ภาพ 13) (Pedersen et al., 2014)

ภาพ 13 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Phaius flavus* Lindl.

(ที่มา: https://www.earth.com/earthpedia/plant/th/phaius-flavus/)

2.2 *Phaius mishmensis* Blume.

หรือกล้วยไม้ดง เป็นกล้วยไม้ดินเจริญเติบโตในป่าดิบเขา ลำต้นสูง เป็นแท่งกลม ใบรูปหอก แผ่นใบพับจีบ ดอกออกเป็นช่อที่ลำต้น มี 5-7 ดอก กลีบเลี้ยงและกลีบดอกสีแดงอมชมพูหรือสีแดงเข้ม กลีบปากโคนเป็นเดือยรูปทรงกระบอกปลายแผ่ ขอบหยักเป็นคลื่น กลางกลีบมีขนเป็นกลุ่มตามยาว ออกดอกช่วงเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม (องค์การสวนพฤกษศาสตร์ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2551) มีรายงานพบในหลายประเทศ ได้แก่ อินเดีย ภูฏาน

เมียนมาร์ ลาว เวียดนาม จีนไต้หวัน ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และไทย ในประเทศไทยพบในจังหวัดน่าน ลำปาง พิษณุโลก เลย และราชบุรี(ภาพ 14) (Pedersen et al., 2014)

ภาพ 14 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Phaius mishmensis* Blume.
(ที่มา: http://www.orchidspecies.com/phaiusmishmensis.htm)

2.3 *Phaius indochinensis* Seidenf. & Ormerod

หรือเอื้องพร้าวดง เป็นกล้วยไม้ดินเจริญเติบโตในป่าดิบเขา พบกระจายพันธุ์ในประเทศเวียดนาม และประเทศไทย ซึ่งในประเทศไทยพบในหลายจังหวัด ได้แก่ เพชรบูรณ์ เลย ชัยภูมิ จันทบุรี ชุมพร พังงา และปัตตานี (ภาพ 15) (Pedersen et al., 2014)

ภาพ 15 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Phaius indochinensis* Seidenf. & Ormerod
(ที่มา: http://www.rspg.or.th/plants_data/rare_plants/scien_name_p19.htm)

3. กล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียว (*Cephalantheropsis* Guillaumin)

เป็นกล้วยไม้ดิน ดอกมีขนาดกลาง ในประเทศไทยดอกสกุลนี้มีสีเหลืองหรือสีส้ม กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีลักษณะคล้ายกัน เดือยดอกสั้น กลีบปากเจริญโอบหุ้มเส้าเกสร บริเวณปลายกลีบปาก

จะแผ่ออกคล้ายปากแตร กลุ่มเรณูมี 8 อัน แยกออกเป็น 2 กลุ่ม กล้วยไม้สกุลนี้พบทั่วโลกทั้งหมด 5 ชนิด ซึ่งพบใน อินเดีย จีน ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ และญี่ปุ่น ปัจจุบันกล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียวในธรรมชาติสามารถพบเห็นน้อยลง ในประเทศไทยพบ 2 ชนิด คือ (Pedersen et al., 2014)

3.1 *Cephalantheropsis longipes* (Hook.f.) Ormerod

เป็นกล้วยไม้ดิน เจริญเติบโตในป่าดิบเขาลำต้นสูง ช่อดอกยาว แผ่นใบพับจีบ มี 5 – 8 ใบ กลีบและกลีบดอก มีสีเหลืองไปจนถึงสีส้ม ดอกมีขนาดใหญ่ถึง 15 มิลลิเมตร มีการกระจายพันธุ์ในหลายประเทศ ได้แก่ อินเดีย เมียนมา จีน เวียดนาม มาเลเซีย เกาะสุมาตรา ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ และไทย (Pedersen et al., 2014)

ภาพ 16 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Cephalantheropsis longipes* (Hook.f.) Ormerod
(ที่มา: http://www.dnp.go.th/botany/mindexdictdetail.aspx?runno=12229)

3.2 *Cephalantheropsis obcordata* (Lindl.) Ormerod (เอื้องกลีบเกลียว)

เป็นกล้วยไม้ดิน อาศัยอยู่ในป่าดิบแล้ง ต้นสูง ลำต้นยาว 3-5 เซนติเมตร ช่อดอกยาว ใบพับจีบ มี 5 – 9 ใบ มีดอกอยู่จำนวนมาก มีดอกสีเหลืองไปจนถึงสีส้ม กลีบปากมีสีขาว มีรายงานพบกล้วยไม้ชนิดนี้ในหลายประเทศ คือ อินเดีย บังกลาเทศ เมียนมา ลาว เวียดนาม จีน ไต้หวัน ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย และไทย ซึ่งในประเทศไทยมีการกระจายพันธุ์ในจังหวัดเลย กาญจนบุรี นครนายก นครราชสีมา สระบุรี ปราจีนบุรี จันทบุรี ระนอง สุราษฎ์ธานี และตรัง (ภาพ 17) (Pedersen et al., 2014)

ภาพ 17 ลักษณะดอกกล้วยไม้ *Cephalantheropsis obcordata* (Lindl.) Ormerod

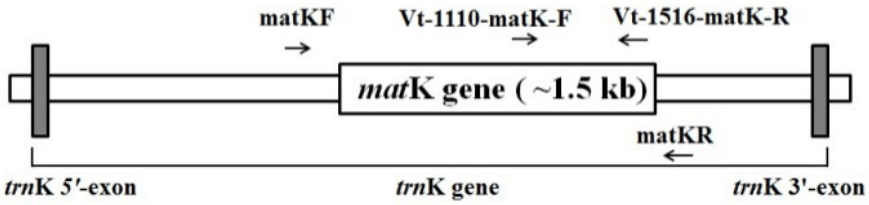
(ที่มา: https://www.flickriver.com/photos/mingiweng/31276715487/)

คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA)

คลอโรพลาสต์เป็นออร์แกเนลที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างอาหารของพืช ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของงพืช มักศึกษาดีเอ็นเอที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ ซึ่งดีเอ็นเอจะอยู่ในส่วนของ สโตรมา (stroma) ที่มีลักษณะเป็นของเหลว ดีเอ็นเอของคลอโรพลาสมีลักษณะเป็นวงกลม ประกอบด้วยพอลินิวคลีโอไทด์ 2 เส้น เข้าคู่กัน ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของพืชมีขนาดประมาณ 120-160 กิโลเบส ประกอบด้วยยีนจำนวน 120-140 ยีน (คำรพ รัตนสุต, 2561) โดยบริเวณที่มีการนำมาใช้ในการศึกษามีหลายยีน เช่น

1. ยีน *matK* (maturase K)

ยีน *matK* เป็นยีนหนึ่งที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ โดยแทรกอยู่ในอินทรอนของยีน *trnK* (ภาพ 18) ยีนนี้มีหน้าที่สร้างเอนไซม์ maturase K ซึ่งใช้ในกระบวนการตัดแต่ง (splicing) ของอินทรอนกลุ่มที่ 2 มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (Barthet, 2006) ยีนนี้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ง่าย และมีวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์สูงนำมาใช้ในการจำแนกพืชหลายชนิด โดยเฉพาะกล้วยไม้ ซึ่งจัดว่าเป็นพืชดอกที่มีความหลายหลายและจำนวนชนิดมากที่สุด เช่น สกุลหวาย (*Dendrobium*) กลุ่มเอื้องสายที่มีลูกผสมจำนวนมากเพื่อใช้ในทางเศรษฐกิจ (Thanananta et al., 2016) สกุลเอื้องเทียน (*Coelogyne*) เป็นสกุลที่พบจำนวนไม่มากในธรรมชาติ (Thanananta et al., 2016) สกุลแวนด้า (*Vanda*) ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่สำคัญทางเศรษฐกิจ (Tanee et al., 2012)

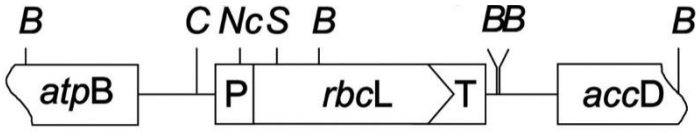


ภาพ 18 ยีน *matK* ที่แทรกอยู่ระหว่าง *trnK* 5' exon และ *trnK* 3' exon

(ที่มา: https://www.google.com/url?sa=i&source=images&cd=&ved=2ahUKEwi5rs-w5PbmAhWt8HMBHYLMA78QjRx6BAgBEAQ&url)

2. ยีน *rbcL* (riburose 1,5-bisphosphate carboxylase)

ยีน *rbcL* เป็นยีนขนาดใหญ่ประกอบด้วย 1 เอกซอน ไม่มีอินทรอน (ภาพ 19) ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ riburose 1,5-bisphosohate carboxylase/oxygenase large subunit หรือ RubisCO ในวัฏจักรคาลวิน (Calvin's cycle) กระบวนการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ เอนไซม์ RubisCO จะเร่งปฏิกิริยาให้ RuBP รวมกับ CO_2 ได้เป็น PGA โดยยีนนี้มีขนาดประมาณ 1,400 คู่เบส มีการนำยีนนี้มาช่วยจำแนกในกล้วยไม้หลายชนิด ได้แก่ สกุลเอื้องเทียน (*Coelogyne*) ซึ่งใช้เวลาในการออกดอกนานและมีดอกจำนวนน้อยทำให้เกิดข้อผิดพลาดในการจำแนกได้ง่าย (Thanananta et al., 2016)



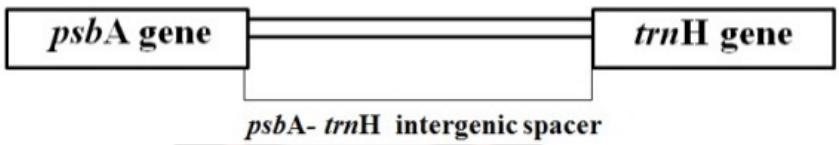
ภาพ 19 ยีน *rbcL* อยู่ระหว่างยีน *atpB* และ *accD*

(ที่มา: https://www.google.com/url?sa=i&source=images&cd=&ved=2ahUKEwjpyqal7fbmAhXljOYKHVYNDJwQjRx6BAgBEAQ&url)

3. บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* (*psbA-trnH* intergenic spacer)

*psb*A-*trn*H intergenic spacer อยู่ระหว่างยีน *psbA* ที่ควบคุมการสร้างสายพอลิเพปไทด์เพื่อใช้ใน photosystem ll กับยีน *trnH* ซึ่งควบคุมการสร้าง ของกรดอะมิโนฮิสติดีน (histidine, H)

(ภาพ 20) ซึ่งบริเวณนี้มีความแปรผันของนิวคลีโอไทด์สูง กล้วยไม้ที่นำบริเวณนี้มาใช้ในการจำแนก เช่น กล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบลาย เป็นกล้วยไม้ที่ผลิตดอกเพื่อส่งออกเป็นจำนวนมาก เนื่องจากดอกมีความหลากหลายสูง แต่ลักษณะอื่นๆ ใกล้เคียงกันมาก (Meesangiem et al., 2017) สกุลหวาย (*Dendrobium*) หมู่แคลิสตา (Maneenet et al., 2018)

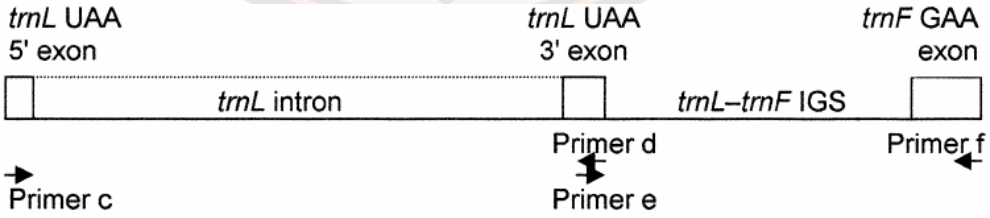


ภาพ 20 บริเวณระหว่างยีน *psbA* และ *trnH*

(ที่มา: https://www.google.com/url?sa=i&source=images&cd=&ved=2ahUKEwi5rs-w5PbmAhWt8HMBHYLMA78QjRx6BAgBEAQ&url)

4. บริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* (*trnL-trnF* intergenic spacer)

trnL-trnF intergenic spacer เป็นบริเวณในคลอโรพลาสต์อยู่ระหว่างยีน *trnL* ที่สร้าง tRNA ของกรดอะมิโนลิวซีน (leucine, L) และยีน *trnF* ควมคุมการสร้าง tRNA ของกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) โดยบริเวณระหว่างยีนทั้งสองนี้มีอัตราการแทนที่ของเบสสูง และมักพบตำแหน่งการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงนำมาใช้แก้ปัญหาในการจำแนกพืชหลายชนิดที่มีสัณฐานวิทยาไม่ชัดเจน (กานดา พรหมณี, 2560; ปิยภรณ์ วงษ์อักษร, 2558)



ภาพ 21 บริเวณ *trnL-trnF* intergenic spacer (*trnL-trnF* IGS) ที่อยู่ระหว่างยีน *trnL* และ *trnF*

(ที่มา: https://www.google.com/url?sa=i&source=images&cd=&ved=2ahUKEwirheLO6_bmAhU6ILcAHTqSAIUQjRx6BAgBEAQ&url=https%3A%2F%2F)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode)

ในทางชีววิทยา ดีเอ็นเอบาร์โค้ด คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดสั้นที่ใช้เป็นมาตรฐาน ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่มีลักษณะเฉพาะในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต นิยมใช้ในการระบุสิ่งมีชีวิตที่ไม่ทราบชนิด โดยระบุจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิงในฐานข้อมูล ในการระบุชนิดดีเอ็นเอบาร์โค้ดทำได้รวดเร็วและถูกต้อง (Xiang et al., 2011) โดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดมีลักษณะดังนี้

1. ลำดับนิวคลีโอไทด์มีขนาด 500-800 คู่เบส เพื่อให้ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

2. มีลักษณะจำเพาะในการจำแนกระดับชนิด

3. มีบริเวณอนุรักษณ์ (conserved site) สำหรับการจับของไพรเมอร์

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเผยแพร่ครั้งแรก โดย Hebert et al. (Hebert et al., 2003) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 600 เบสของยีน cytochrome c oxidase subunit 1 หรือ *COI* ในไมโทคอนเดรีย สามารถใช้ในการระบุชนิดได้ ดังนั้น *COI* จึงเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานในการระบุชนิดในสัตว์หลายกลุ่ม แต่ในสัตว์บางกลุ่ม *COI* ไม่มีประสิทธิภาพ เช่น สัตว์ปีก สัตว์เลื้อยคลาน (Kress et al., 2015) สำหรับพืช *COI* ไม่สามารถใช้ในการระบุชนิดได้ เนื่องจากมีอัตราการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ *COI* ในสัตว์ (A.J. Fazekas et al., 2009) จึงมีการทดสอบลำดับนิวคลีโอไทด์หลายบริเวณเพื่อหาบริเวณมาตรฐานใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ด บริเวณที่นิยมนำมาทดสอบคือ คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ เช่น *rbcL*, *matK* และ *psbA-trnH* (Hollingsworth et al., 2009; Kim et al., 2014; Parveen et al., 2012; Xiang et al., 2011) และบริเวณดีเอ็นเอในนิวเคลียส คือ internal transcribed spacer หรือ ITS (Chase et al., 2005; Chen et al., 2010; Kress et al., 2005)

ดีเอ็นเอบาร์โค้ดถูกนำมาใช้ในพืชหลายชนิด เพื่อหาดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสมสำหรับพืช Consortium for the Barcode of Life plant working group แนะนำการระบุชนิดของพืชโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์สองบริเวณจากคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอร่วมกัน คือ *rbcL* กับ *matK* (Hollingsworth et al., 2009) กล้วยไม้เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีการวิเคราะห์หาบริเวณที่เหมาะสม เช่น กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) เป็นสกุลที่มีขนาดใหญ่ประกอบด้วย 1,200-1,500 ชนิด มีการกระจายพันธุ์ในแถบเอเชียเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน ตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ กล้วยไม้สกุลหวายหลายชนิดเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ เนื่องจากมีการนำกล้วยไม้หลายชนิดไปใช้ประโยชน์ทางด้านการแพทย์และทางเศรษฐกิจ รวมไปถึงการบุกรุกพื้นที่ส่งผลให้พื้นที่ป่าที่อยู่

อาศัยลดลง กล้วยไม้สกุลหวายมีลักษณะต้นที่คล้ายกัน ประกอบกับมีจำนวนชนิดค่อนข้างมาก ส่งผลให้มีลักษณะสัณฐานวิทยาที่หลากหลาย บางลักษณะปรากฏในหลายชนิด ดังนั้นสัณฐานวิทยาจึงใช้ในการจำแนกและระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายได้ไม่ดี ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์บาร์โค้ด 11 บริเวณจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS, *matK*, *rbcL* และ *trnH-psbA* เพื่อหาดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรฐานสำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 11 บริเวณ พบว่ามีประสิทธิภาพในการแยกชนิดกล้วยไม้สกุลหวายต่ำ (31.93 %) *matK+rbcL* เป็นบาร์โค้ดที่ CBOL เสนอให้เป็นบาร์โค้ดหลักสำหรับพืชมีประสิทธิภาพต่ำ (24 %) ในกลุ่มบาร์โค้ดที่ใช้มากกว่าหนึ่งบริเวณ ITS+*matK* สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลนี้ได้มากที่สุด (76.92 %) (Xu et al., 2015) นอกจากนี้กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum*) เป็นกล้วยไม้อีกสกุลหนึ่งที่นำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ซึ่งการระบุชนิดขณะที่ไม่มีดอกทำได้ยาก ดังนั้นการระบุชนิดโดยใช้สัณฐานวิทยาต้องใช้เวลานานและจำเป็นต้องมีทักษะในการจำแนก จึงใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเข้ามาช่วยในการระบุชนิดให้ถูกต้อง โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 8 บริเวณ ประกอบด้วย ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ 7 บริเวณ (*accD, matK, rbcL, rpoC2, ycf1, atpF-atpH, atpI-atpH*) และดีเอ็นเอในนิวเคลียส (ITS) ซึ่ง nrITS มีประสิทธิภาพในการระบุชนิดสูงที่สุด (52.27 %) จาก 8 บริเวณ โดยบาร์โค้ดหลักมีประสิทธิภาพในการระบุชนิดต่ำมาก (18.86 %) (Guo et al., 2016) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพื่อหาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในกล้วยไม้สกุลอื่นๆ อีกด้วย เช่น *Holcoglossum* (Xiang et al., 2011) *Vanda* (Tanee et al., 2012)

ปัจจุบันมีการนำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ เช่น นิเวศวิทยา ในบางกรณียังมีสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ทราบชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะคล้ายกับสิ่งมีชีวิตอื่น แต่ยังมีบางลักษณะที่แตกต่างที่อยู่ในถิ่นอาศัยที่มีความหลากหลายสูงมาก โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่ระยะตัวอ่อนมีลักษณะคล้ายกัน จะจำแนกโดยใช้สัณฐานวิทยาได้ก็ต่อเมื่อเจริญเป็นตัวเต็มวัย จึงมีการนำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาช่วยในการระบุชนิด จากดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้สามารถนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (phylogeny) ทางวิวัฒนาการของสมาชิก การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการมาตรฐานจะช่วยในการแยกความสัมพันธ์ของสมาชิกในแต่ละกลุ่ม ช่วยสร้างความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่หายไปภายในกลุ่มเป้าหมาย สำหรับพืชอาจจะต้องใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 1 บริเวณ มาช่วยในการแก้ปัญหานี้ ในการอนุรักษ์ (conservation) มีการนำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาใช้ในการระบุและตรวจสอบสิ่งมีชีวิตที่เสี่ยงต่อการสูญพันธ์ เช่น การนำดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาตรวจสอบพืชสมุนไพรจากธรรมชาติ หรือการตรวจสอบชนิดในผลิตภัณฑ์ที่มีอยู่ในท้องตลาด (Kress et al., 2015)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษากล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ในนิวเคลียร์ดีเอ็นเอและคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ คือ *trnL-trnF* IGS, *atpI-atpH* และ *matK* จำนวน 50 ชนิดประกอบด้วย *Calanthe* 41 ชนิด *Phaius* 6 ชนิด และ *Cephalantheropsis* 3 ชนิด สามารถแบ่งกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นออกเป็น 6 กลุ่ม คือ *Calanthe, Paraphaius, Styloglossum, Cephalantheropsis, Phaius* และ *Preptanthe* โดย *Calanthe* แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กล้วยไม้สกุลนี้ส่วนใหญ่อยู่ใน *Calanthe* รองลงมาคือ *Styloglossum* มีบางชนิดแยกออกมาอยู่ใน *Preptanthe* ส่วน *Phaius* แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ *Paraphaius* และ *Phaius* ซึ่งมีความใกล้ชิดกับกลุ่มของ *Calanthe* ส่วน *Cephalantheropsis* มี 1 กลุ่ม (Zhai et al., 2014)

Batista et al. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกล้วยไม้สกุล *Habenaria* 180 ชนิด โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ คือ *matK* ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอในนิวเคลียส คือ ITS สามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลนี้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กล้วยไม้เขตร้อนในทวีปอเมริกา (neotropical) และกล้วยไม้จากทวีปแอฟริกา ทวีปยุโรป และทวีปเอเชีย (Bartista et al., 2013)

Hosseini et al. ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) ในประเทศมาเลเซีย โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียส คือ ITS มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ประกอบด้วย *trnL-trnF, matK* และ *rbcL* พบว่า section *Desmosanthes* มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ section *Cirrhopetalum* (Hosseini et al., 2016)

Parveen et al. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5 บริเวณจากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์เป็นส่วนของยีน 4 บริเวณ คือ *rpoB, rpoC1, rbcL* และ *matK* และบริเวณระหว่างยีนในนิวเคลียส คือ ITS มาใช้ในการระบุชนิดของ *Paphiopedilum* ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ 8 ชนิดและลูกผสมในธรรมชาติ 3 ชนิด จากผลการศึกษา *rpoB, rpoC1, rbcL* และ nrITS สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง เมื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละบริเวณ *rpoB* และ *rbcL* สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้มากที่สุด 97.61 % เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ พบว่า *matK* มีความแตกต่างภายในชนิดเฉลี่ยเท่ากับ 0.07% ความแตกต่างระหว่างชนิดเฉลี่ย 0.9 % ซึ่งยีน *matK* มีความสามารถในการจำแนกชนิดกล้วยไม้ทั้ง 11 ชนิดได้ (Parveen et al., 2012)

กล้วยไม้สกุล *Holcoglossum* มีประมาณ 12 ชนิด มีเขตการกระจายพันธุ์ใน มาเลเซีย ไทย พม่า เวียดนาม และจีน จากรายงานการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์และดีเอ็นเอในนิวเคลียส สามารถแบ่งกล้วยไม้กลุ่มนี้ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นกล้วยไม้ที่กระจายพันธุ์ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประกอบด้วย 4 ชนิด กลุ่มที่ 2 กระจายพันธุ์บนภูเขา Hengduan ในประเทศจีน ประกอบด้วย 5 ชนิด และกลุ่มที่ 3 เป็นกล้วยไม้ที่กระจายพันธุ์อยู่ระหว่างกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 3 ชนิด (Fan et al., 2009) ซึ่งการระบุชนิดภายในกลุ่มโดยใช้สัณฐานวิทยาหรือข้อมูลในระดับโมเลกุลยังไม่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 6 บริเวณ ประกอบด้วยดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ คือ *rbcL, matK, atpF-atpH* intergenic spacer, *psbK-psbI* intergenic spacer และ *trnH-psbA* intergenic spacer และลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในนิวเคลียส คือ ITS มาวิเคราะห์หาดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ จากผลการวิจัย *rbcL* สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ในทุกตัวอย่าง มีความแตกต่างระหว่างชนิดตั้งแต่ 0.0019 (*rbcL*) – 0.0135 (nrITS) ซึ่งเมื่อพิจารณาดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสมจาก 6 บริเวณ พบว่า *matK* เป็นบริเวณที่เหมาะสมที่สุดสำหรับดีเอ็นเอบาร์โค้ดสกุล *Holcoglossum* (Xiang et al., 2011)

กล้วยไม้เป็นวงศ์ของพืชดอกที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งมีสมาชิกมากถึง 25,000 ชนิด พบกระจายอยู่ทั่วโลกโดยเฉพาะบริเวณเขตร้อน บางชนิดมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น *Phalaenopsis* Blue บางชนิดนำมาใช้เป็นอาหาร เช่น *Vanilla* Mill. นอกจากนี้บางชนิดยังมีสารสำคัญใช้เป็นยา เช่น *Bulbophyllum* Thouars ซึ่งส่งผลให้กล้วยไม้บางชนิดมีจำนวนหรือประชากรที่น้อยลง ทำให้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ได้ง่าย การระบุชนิดในกล้วยไม้กลุ่มนี้โดยใช้สัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวนั้นทำได้ยาก ต้องอาศัยความชำนาญและประสบการณ์สูง ดังนั้นจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ 5 บริเวณ ประกอบด้วย *rbcL, matK, atpF-atpH* intergenic spacer, *psbK-psbI* intergenic spacer และ *trnH-psbA* intergenic spacer มาวิเคราะห์เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้ 89 ชนิดในประเทศสาธารณรัฐเกาหลีใต้ จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าบริเวณระหว่างยีน *psbK-psbI* intergenic spacer มีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างชนิดสูงที่สุด (0.1192) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างชนิดสูงรองลงมา (0.0803) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบบริเวณระหว่างยีนและบริเวณที่เป็นยีน *rbcL* มีความแตกต่างระหว่างชนิดต่ำที่สุด (0.0248) และเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างภายในชนิด พบว่า *rbcL* มีความแตกต่างภายในชนิดต่ำที่สุด 0.0009 และ *psbK-psbI* intergenic spacer มีความแตกต่างภายในชนิดมากที่สุดเท่ากับ 0.0072 ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnH-psbA* มี

ความสามารถในการแยกชนิดสูงที่สุด เท่ากับ 83.5 % ในขณะที่บริเวณยีน *rbcL* ความสามารถในการแยกชนิดน้อยที่สุด เท่ากับ 60.5 % เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละบริเวณมาวิเคราะห์ร่วมกันตั้งแต่ 2 ถึง 5 บริเวณ พบว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 6 แบบสามารถแยกชนิดของกล้วยไม้ได้สูงถึง 98.8 % ได้แก่ การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน 3 บริเวณ และการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนและบริเวณระหว่างยีน 4-5 บริเวณร่วมกัน จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการสามารถแบ่งกล้วยไม้ 89 ชนิด ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ Vanilloideae, Cypripedioideae, Orchidoideae และ Epidendroideae ดังนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 5 บริเวณร่วมกันเป็นดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่เหมาะสมในกล้วยไม้ของประเทศสาธารณรัฐเกาหลี (Kim et al., 2014)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่างกล้วยไม้ที่ใช้ในการศึกษา

เก็บตัวอย่างใบกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น 3 สกุล 18 ชนิด 45 ตัวอย่าง จาก 6 สถานที่ ได้แก่ สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิต์ จังหวัดเชียงใหม่ (MR) สวนกล้วยไม้คุณชายจาง จังหวัดเชียงใหม่ (CM) สวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้าพิษณุโลกในพระราชดำริ จังหวัดพิษณุโลก (RK) อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า จังหวัดพิษณุโลก (PH) อ. ภูเรือ จังหวัดเลย (PR) และ อ. น้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ (NN) โดยตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย สกุลเอื้องน้ำต้น (*Calanthe*) จำนวน 12 ชนิด 29 ตัวอย่าง สกุลเอื้องกลีบเกลียว (*Cephalantheropsis*) 2 ชนิด 4 ตัวอย่าง และสกุลเอื้องพร้าว (*Phaius*) 4 ชนิด 12 ตัวอย่าง ดังตาราง 1

ตาราง 1 ตัวอย่างกล้วยไม้ที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	อักษรย่อ
1	*Calanthe cardioglossa* Schltr.	CCA_MR3
2	*C. cardioglossa* Schltr.	CCA_MR7
3	*C. cardioglossa* Schltr.	CCA_RK2
4	*C. clavata* Lindl.	CCL_PR1
5	*C. clavata* Lindl.	CCL_PR2
6	*C. densiflora* Lindl.	CDE_RK1
7	*C. densiflora* Lindl.	CDE_PH1
8	*C. herbacea* Lindl.	CHE_PH1
9	*C. lyroglossa* Rchb.f.	CLY_RK1

ตาราง 1 ตัวอย่างกล้วยไม้ที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	อักษรย่อ
10	*C. lyroglossa* Rchb.f.	CLY_RK2
11	*C. lyroglossa* Rchb.f.	CLY_RK3
12	*C. masuca* Lindl.	CMA_MR1
13	*C. masuca* Lindl.	CMA_RK1
14	*C. masuca* Lindl.	CMA_RK4
15	*C. pulchra* Lindl.	CPU_MR1
16	*C. rosea* Benth.	CRO_MR3
17	*C. rosea* Benth.	CRO_MR4
18	*C. rosea* Benth.	CRO_MR7
19	*C. rubens* Ridl.	CRU_RK1
20	*C. rubens* Ridl.	CRU_MR3
21	*C. rubens* Ridl.	CRU_PR4
22	*C. rubens* var. *alba* Ridl.	CRUA_RK1
23	*C. succedanea* Gagnep.	CSU_MR1
24	*C. triplicata* Ames.	CTR_MR1
25	*C. triplicata* Ames.	CTR_RK1
26	*C. triplicata* Ames.	CTR_PR2
27	*C. triplicata* Ames.	CTR_NN1
28	*C. vestita* Lindl.	CVE_MR3
29	*C. vestita* Lindl.	CVE_MR4

ตาราง 1 ตัวอย่างกล้วยไม้ที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อวิทยาศาสตร์	อักษรย่อ
30	*Cephalantheropsis longipes* Ormerod	CEPL_RK1
31	*Ce. longipes* Ormerod	CEPL_PH1
32	*Ce. longipes* Ormerod	CEPL_PH2
33	*Ce. obcordata* Ormerod	CEPO_RK1
34	*Phaius flavus* Lindl.	PFL_RK2
35	*P. flavus* Lindl.	PFL_RK3
36	*P. indochinensis* Seidenf. & Ormerod	PIN_RK1
37	*P. mishmensis* Rchb.	PMI_RK4
38	*P. mishmensis* Rchb.	PMI_RK5
39	*P. mishmensis* Rchb.	PMI_RK7
40	*P. tankervilleae* Blume	PTA_MR1
41	*P. tankervilleae* Blume	PTA_RK1
42	*P. tankervilleae* Blume	PTA_PR1
43	*P. tankervilleae* var. *alba* Blume	PTAA_RK2
44	*P. tankervilleae* var. *alba* Blume	PTAA_RK3
45	*P. tankervilleae* var. *alba* Blume	PTAA_CM1

การสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยวิธีดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987)

นำตัวอย่างใบสดกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นมาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (Doyle and Doyle, 1987) มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งใบกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นประมาณ 0.5 กรัม มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว แล้วถ่ายใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เติม 1X CTAB buffer 600 ไมโครลิตร และ β-mercaptoethanol 10 ไมโครลิตร (ก่อนใช้อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส)

2. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ผสมโดยกลับหลอดไปมาทุกๆ 10 นาที

3. เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

5. ดูดสารละลายส่วนบนใสในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

6. เติม RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

7. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

8. เติม Phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ

9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที

10. ดูดสารละลายส่วนบนใสในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

11. เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ

12. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที

13. ดูดสารละลายส่วนบนใสในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

14. เติม 3M Sodium acetate ปริมาตร 1/10 เท่า และเติม Absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารที่มีในหลอด

15. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 45 นาที

16. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

17. ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

18. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

19. ปล่อยให้ตะกอนแห้งในอากาศที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที

20. ละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl และ 1 mM EDTA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

21. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

หลังจากนั้นตรวจสอบคุณภาพและปริมาณด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ในอะกาโรสเจล 0.8% และเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่สกัดได้กับ 1 Kb DNA Ladder (Thermo scientific, United

State) ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาทีหรือจนกว่าสี bromophenol blue เคลื่อนที่ประมาณ 2 ใน 3 ของเจล แล้วถ่ายภาพเพื่อบันทึกผล วัดปริมาณดีเอ็นเอ ตรวจสอบการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วบันทึกผล

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)

นำดีเอ็นเอของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด 4 บริเวณ ได้แก่ บริเวณยีน *matK* และ *rbcL*และบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และ *trnL-F* ในคลอโรพลาสต์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตาราง 2 โดยใช้ความเข้มข้นของสารในปฏิกิริยาดังตาราง 3 โดยมีอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมของยีน *matK* และ *rbcL* ดังตาราง 4 และบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และ *trnL-trnF* ดังตาราง 5

ตาราง 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	อ้างอิง
matKKUf	5’-ATATCCGCTACTCCTTCAGGAG-3’	(Srikulnath et al.,
matKKUr	5’-CGAGCCAAAGTTCTAGCACACG-3’	2015)
rbcL 1F	5’-ATGTCACCACAAACAGAAACTAAAGC-3’	(Fay et al., 1997)
rbcL 724R	5’-CATGTACCTGCAGTAGC-3’	
psbA	5’-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3’	(Sang et al., 1997)
trnH	5’-CGCGCATGGTGGATTCACAAATC-3’	
trnLF-c	5’-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3’	(Taberlet et al.,
trnLF-f	5’-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3’	1991)

ตาราง 3 ความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารเคมี	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ความเข้มข้นสุดท้าย
PCR buffer	10X	1X
$MgCl_2$	50 mM	0-1.5 mM
dNTPs	10 mM	0.2-1 mM
Forward primer	10 µM	0.2 µM
Reverse primer	10 µM	0.2 µM
Taq DNA polymerase (RBC, Taiwan)	5U/µl	1-1.5 U
Distilled water	-	Up to 50 µl
DNA template	-	50-100 ng

ตาราง 4 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน *matK* และ *rbcL*

ขั้นตอน	*matK*		*rbcL*	
1. Initial denaturation	94 °C 3 นาที		94 °C 5 นาที	
2. Denaturation	94 °C 30 วินาที	35	94 °C 30 วินาที	35
Annealing	50-60 °C 30 วินาที		56 °C 30 วินาที	
Extension	72 °C 1 นาที		72 °C 1 นาที	
3. Final extension	72 °C 10 นาที		72 °C 10 นาที	

ตาราง 5 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ของบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และ *trnL-trnF*

ขั้นตอน	*psbA-trnH*		*trnL-trnF*	
1. Initial denaturation	94 °C 5 นาที		94 °C 5 นาที	
2. Denaturation	94 °C 30 วินาที	30	94 °C 30 วินาที	30
Annealing	49 °C 1 นาที		50 °C 1 นาที	
Extension	72 °C 2 นาที		72 °C 2 นาที	
3. Final extension	72 °C 5 นาที		72 °C 5 นาที	

หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล 1% และเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่สกัดได้กับ 1 Kb DNA Ladder (Thermo scientific, United State) และ 100 bp DNA Ladder (Sibenzyme, United State) ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที แล้วถ่ายภาพเพื่อบันทึกผล

การทำผลผลิตพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

โดยผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏบนดีเอ็นเอเพียง 1 แบนสามารถนำผลผลิตนั้นมาทำให้บริสุทธิ์ได้เลย ถ้าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ปรากฏแถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ ทำการตัดแถบดีเอ็นเอออกจากเจลแล้วนำผลผลิตพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด PCR Clean-Up & Gel Extraction kit (PureDirex) มีขั้นตอนดังนี้

<u>ขั้นตอนที่ 1 Sample preparation</u>

1. เติม Buffer B 5 เท่าของปริมาตรผลผลิตพีซีอาร์ กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน

<u>ขั้นตอนที่ 2 Binding</u>

1. นำ PG column ใส่ลงใน Collection tube ย้ายสารจากขั้นตอนที่ 1 ใส่ลงใน PG column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. เทสารใน Collection tube ทิ้ง แล้วนำ PG column กลับมาใส่ใน Collection tube

ขั้นตอนที่ 3 Wash

1. เติม Buffer W1 400 ไมโครลิตรใส่ลงใน PG column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
2. เทสารใน Collection tube ทิ้ง แล้วนำ PG column กลับมาใส่ใน Collection tube
3. เติม Buffer W2 600 ไมโครลิตรใส่ลงใน PG column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
4. เทสารใน Collection tube ทิ้ง แล้วนำ PG column กลับมาใส่ใน Collection tube
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยก Buffer W2 ทั้งหมดออกจาก PG column

ขั้นตอนที่ 4 Elution

1. ย้าย PG column ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. เติม Buffer E หรือน้ำ 30 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ PG column ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

หมายเหตุ ในกรณีที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณมีมากกว่า 1 แถบ จะแยกชิ้นส่วนออกจากกันโดยการตัดเจล ย้ายเจล 300 มิลลิกรัมใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Buffer B 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายทั้งหมด โดยกลับหลอดไปมาทุก 3 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำตามขั้นตอนที่ 2 ถึง ขั้นตอนที่ 4

หลังจากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล 1% และเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่สกัดได้กับ 1 Kb DNA Ladder (Thermo scientific, United State) ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาทีหรือจนกว่าสี bromophenol blue เคลื่อนที่ประมาณ 2 ใน 3 ของเจล แล้วถ่ายภาพเพื่อบันทึกผล

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์แล้วเตรียมตัวอย่างสำหรับหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ โดยใช้ไพรเมอร์ ดังตาราง 2 ซึ่งมีความเข้มข้นและปริมาตร ดังตาราง 6

ตาราง 6 ความเข้มข้นและปริมาตรของผลผลิตพีซีอาร์และไพรเมอร์สำหรับส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์	ความเข้มข้นของตัวอย่าง	ปริมาตรของตัวอย่าง	ปริมาตรของไพรเมอร์ (ความเข้มข้น)
Purified PCR product (over 500 bp)	Over 25 ng/ul	10 ul	5 ul (5 pmol/ul)
Purified PCR product (over 1000 bp)	30~60 ng/ul	10 ul	5 ul (5 pmol/ul)

การวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information โดยใช้ Nucleotide blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) แล้วทำการจัดเรียง (Alignment) โดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6.002 (Nicholas et al., 1997) และ ClustalX (Thompson et al., 1997) ทำการตรวจสอบนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Chromas (Technelysium Pty. Ltd., Helensvale, Queensland, Australia) วิเคราะห์ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ภายในชนิดเดียวกันและระหว่างชนิดด้วย pairwise distance แล้วทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม MEGA5.2 (Tamura et al., 2011) โดยใช้ Tamura-3-parameter model สร้าง phylogenetic tree โดยใช้กล้วยไม้ชนิดอื่นเป็น outgroups ได้แก่ *Dendrobium pulchellum* (AB519778.1), *Vanda pumila* (KC244661.1, MN523481.1), *Holcoglossum linearifolium* (JN106351.1), *Paraholcoglossum auriculatum* (HQ452928.1), *Cypripedium calceolus* (AY557208.1, HM640550.1), *Paphiopedilum glaucophyllum* (AY557205.1, KX755548.1), *Spiranthes vernalis* (MG755180.1, KJ773926.1), *Anoectochilus lanceolatus* (MK451808.1, MK451850.1), *Rhomboda moulmeinesis* (MK451810.1), *Corallorhiza wisteriana* (EU391361.1), *Bulbophyllum odoratissimum* (EU887945.1), *Dendrobium hainanense* (EU887943.1), *Aerides odorata* (KC985414.1) และ *Vanda curvifolia* (KC985418.1)

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการศึกษา

1. การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพ

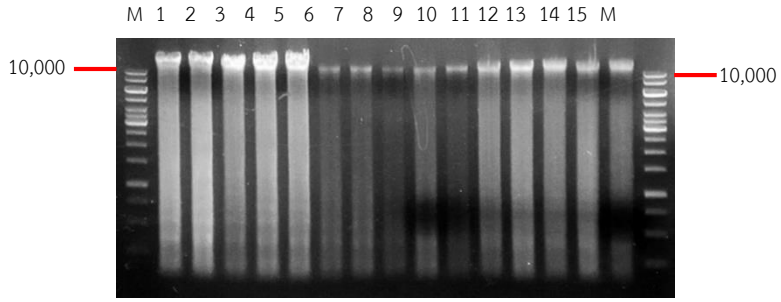
เมื่อนำใบกล้วยไม้ที่เก็บมาจากสถานที่ต่าง ๆ ทั้งหมด 18 ชนิด 45 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB method ที่ดัดแปลงมาจากการสกัดใบพืชของ Doyle and Doyle (1987) ในบางตัวอย่างจะได้สารละลายดีเอ็นเอใสไม่มีสี และมีบางตัวอย่างที่สารละลายดีเอ็นเอมีสีเหลืองอ่อน จากนั้นนำดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่มีความเข้มข้น 0.8% พบว่าในทุกตัวอย่างปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 10 กิโลเบส นอกจากนี้ยังพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จะมีรอย smear เกิดขึ้น (ภาพ 22) จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่าความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอสูงสุดอยู่ที่ประมาณ 1,044 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (*C. herbacea* PH1) และความเข้มข้นต่ำสุดอยู่ที่ประมาณ 4.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (*C. rosea* MR3) และค่าอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 1.5-2.0 (ภาคผนวก ก)

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 4 บริเวณ ได้แก่ ยีน *matK* ยีน *rbcL* บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ตรวจสอบผลผลิตที่เกิดขึ้นด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้น 1% จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป PCR Clean-Up & Gel Extraction Kit แล้วทำการตรวจสอบด้วยวิธีวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้น 1%

2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *matK*

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สกัดมาทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณยีน *matK* โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ และใช้อุณหภูมิ annealing 50-60 องศาเซลเซียส พบว่าจากตัวอย่างดีเอ็นเอ

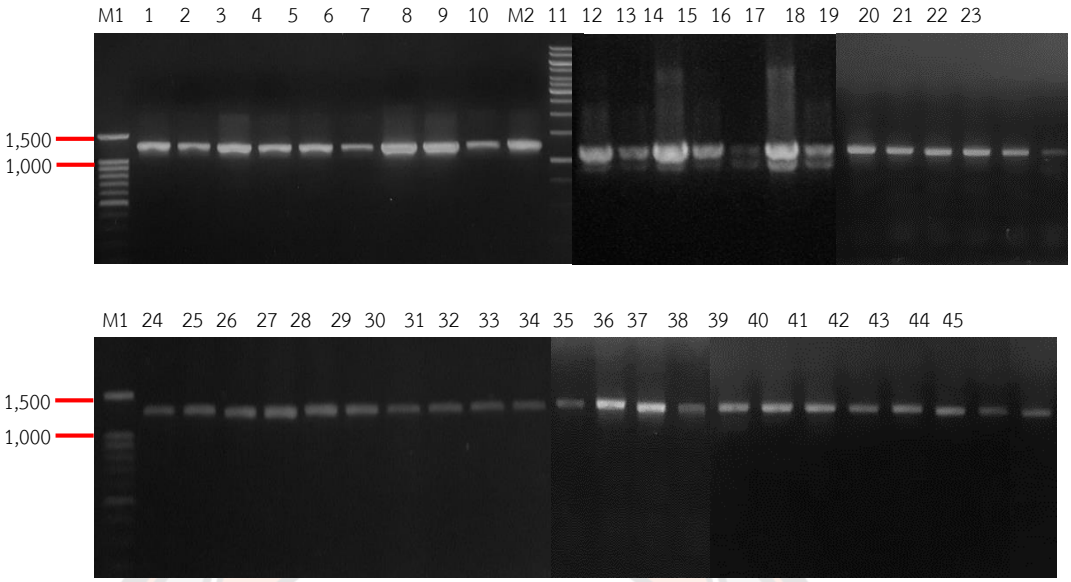


ภาพ 22 ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่สกัดจากใบกล้วยไม้ด้วยวิธี Doyle and Doyle (1987) โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA Ladder (Thermo Science, United State), 1 = *C. cardioglossa* MR3, 2 = *C. densiflora* PH1, 3 = *C. rubens* MR3, 4 = *C. masuca* MR1, 5 = *C. herbacea* PH1, 6 = *P. indochinensis* RK1, 7 = *P. flavas* RK2, 8 = *P. flavas* RK3, 9 = *P. mishmensis* RK4, 10 = *P. mishmensis* RK5, 11 = *P. mishmensis* RK7, 12 = *Ce. obcordata* RK1, 13 = *Ce. longipes* RK1, 14 = *Ce. longipes* PH1 และ 15 = *Ce. longipes* PH2

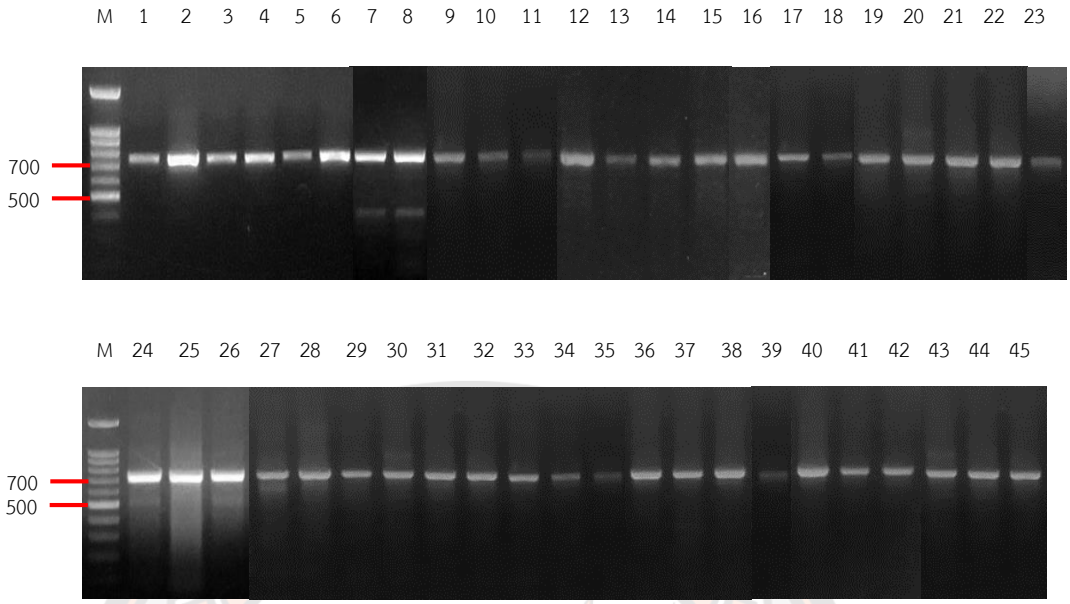
18 ชนิด 45 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการได้ทุกตัวอย่าง โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดอยู่ที่ประมาณ 1,400 คู่เบสในทุกตัวอย่าง แต่บางตัวอย่างปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (non specific band) เกิดขึ้น (ภาพ 23) แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ พบว่าหลังจากทำให้ผลผลิตที่ได้บริสุทธิ์พบแถบผลผลิตเพียงแถบเดียว

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcL*

เมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ บริเวณยีน *rbcL* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนได้ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีความยาวประมาณ 700 คู่เบส บางตัวอย่างปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ จึงทำการเพิ่มอุณหภูมิ annealing จาก 52 องศาเซลเซียส เป็น 56 องศาเซลเซียส ช่วยลดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ ในบางตัวอย่างเหลือแค่รอย smear เล็กน้อย (ภาพ 24) หลังจากที่นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาทำให้บริสุทธิ์ รอย smear ที่เกิดขึ้นก็จะหายไปและแถบดีเอ็นเอจะคมชัดขึ้น แต่ความเข้มของแถบหรือปริมาณดีเอ็นเอจะลดลง เนื่องจากดีเอ็นเอบางส่วนติดอยู่บนแผ่นแมมเบรมที่ใช้ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์



ภาพ 23 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณยีน *matK* โดย M1 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (GenedireX, Taiwan), M2 คือ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, United State), 1 = *C. cardioglossa* MR7, 2 = *C. cardioglossa* RK2, 3 = *C. lyroglossa* RK1, 4 = *C. masuca* RK1, 5 = *P. indochinensis* RK1, 6 = *P. tankervilleae* var. *alba* CM1, 7 = *P. mishmemsis* RK4, 8 = *P. mishmemsis* RK5, 9 = *Ce. longipes* RK1, 10 = *Ce. obcordata* RK1, 11= *C. cardioglossa* MR3, 12 = *C. masuca* MR1, 13 = *C. pulchra* MR1, 14 = *C. rosea* MR3, 15 = *C. rosea* MR4, 16 = *C. rosea* MR7, 17 = *C. rubens* MR3, 18 = *C. succedanea* MR1, 19 = *C. triplicata* MR1, 20 = *C. vestita* MR3, 21 = *C. vestita* MR4, 22 = *P. tankervilleae* MR1, 23 = *Ce. longipes* PH1, 24 = *Ce. longipes* PH2, 25 = *C. densiflora* PH1, 26 = *C. herbacea* PH1, 27 = *C. clavata* PR1, 28 = *C. clavata* PR2, 29 = *C. rubens* RK1, 30 = *C. triplicata* RK1, 31 = *P. flavus* RK2, 32 = *P. flavus* RK3, 33 = *P. tankervilleae* RK1, 34 = *P. tankervilleae* var. *alba* RK2, 35 = *P. tankervilleae* var. *alba* RK3, 36 = *C. lyroglossa* RK2, 37 = *C. lyroglossa* RK3, 38 = *C. densiflora* RK1, 39 = *C. rubens* var. *alba* RK1, 40 = *C. masuca* RK4, 41 = *C. rubens* PR4, 42 = *C. triplicata* PR2, 43 = *C. triplicata* NN1, 44 = *P. mishmensis* RK7 และ 45 = *P. tankervilleae* PR1



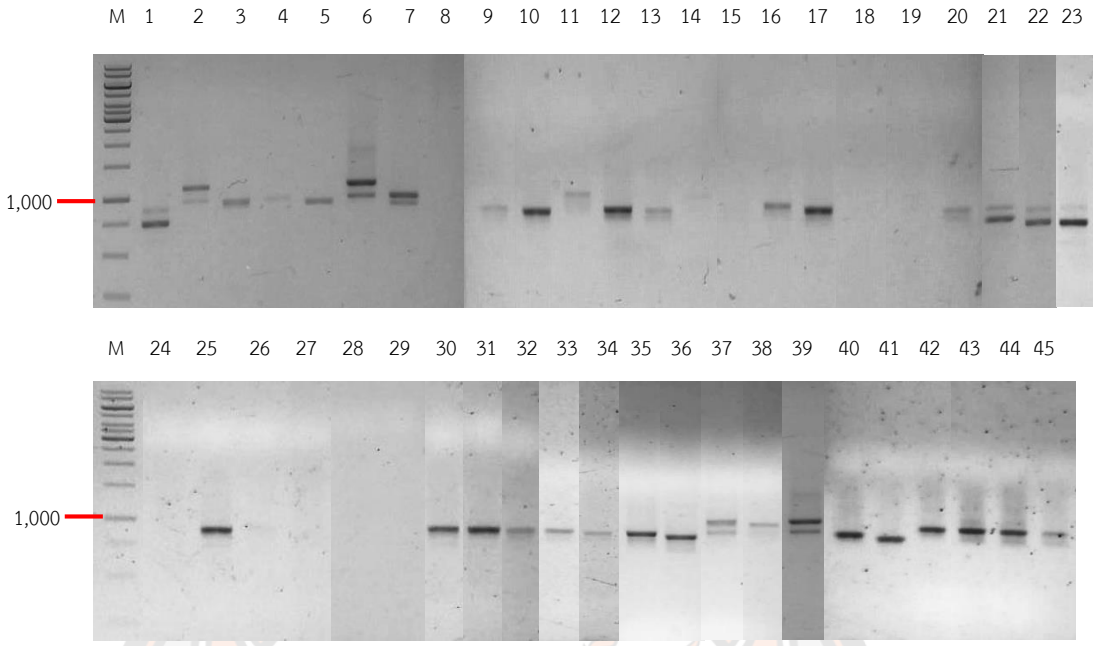
ภาพ 24 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณยีน *rbcL* โดย M คือ ดีเอ็นเอ มาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (Sibenzyme), 1 = *C. triplicata* RK1, 2 = *C. triplicata* MR1, 3 = *C. triplicata* PR2, 4 = *P. tankervilleae* var. *alba* RK2, 5 = P. tankervilleae var. alba RK3, 6 = P. tankervilleae PR1, 7 = Ce. longipes PH1, 8 = *Ce. longipes* PH2, 9 = *C. cardioglossa* MR3, 10 = *C. cardioglossa* MR7, 11 = *C. succedanea* MR1, 12 = *C. rosea* MR3, 13 = *C. rosea* MR4, 14 = *C. rosea* MR7, 15 = *C. vestita* MR3, 16 = *C. vestita* MR4, 17 = *C. rubens* MR3, 18 = *C. masuca* MR1, 19 = *C. pulchra* MR1, 20 = *C. masuca* RK1, 21 = *C. masuca* RK4, 22 = *C. rubens* var. *alba* RK1, 23 = *C. rubens* RK1, 24 = C. *lyroglossa* RK1, 25 = *C. lyroglossa* RK2, 26 = *C. lyroglossa* RK3, 27 = *P. mishmensis* RK4, 28 = *P. mishmensis* RK5, 29 = *P. mishmensis* RK7, 30 = *P. tankervilleae* RK1, 31 = *C. cardioglossa* RK2, 32 = *C. densiflora* RK1, 33 = *C. densiflora* PH1, 34 = *C. herbacea* PH1, 35 = *C. rubens* PR4, 36 = *C. triplicata* NN1, 37 = *C. clavata* PR1, 38 = *C. clavata* PR2, 39 = *Ce. longipes* RK1, 40 = *Ce. obcordata* RK1, 41 = *P. indochinensis* RK1, 42 = *P. flavus* RK2, 43 = *P. flavus* RK3, 44 = *P. tankervilleae* MR1 และ 45 = *P. tankervilleae* var. *alba* CM1

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH*

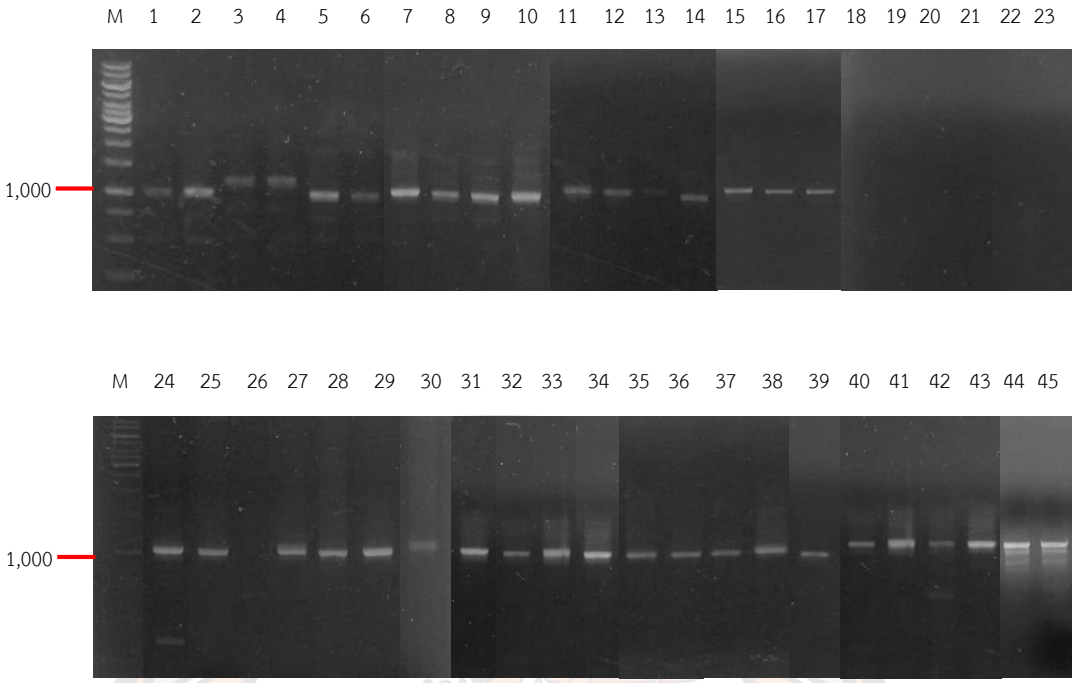
นำสารละลายดีเอ็นเอของกล้วยไม้ในกลุ่มเอื้องน้ำต้นที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ฟอร์เวิร์ดไพรเมอร์จะจับบริเวณยีน *psbA* และรีเวิร์สไพรเมอร์จับที่ยีน *trnH* จากการทดลองพบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณบางตัวอย่างปรากฏเพียงแถบเดียว นอกจากนี้บางตัวอย่างเพิ่มปริมาณได้น้อย แต่ในบางตัวอย่างพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากไพรเมอร์นี้มีขนาดประมาณ 700-1000 คู่เบส โดยพบว่า กล้วยไม้ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส เป็นกล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้นและสกุลเอื้องกลีบเกลียว ส่วนกล้วยไม้ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1000 คู่เบส เป็นกล้วยไม้ในสกุลเอื้องพร้าว และยังพบว่ามีกล้วยไม้จำนวน 5 ชนิดที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ได้แก่ *C. cardioglossa*, *C. pulchra*, *C. vestita*, *P. indochinensis* และ *P. tankervilleae* (ภาคผนวก ก) เนื่องจากบางตัวอย่างมีผลผลิตพีซีอาร์เป็นแถบจาง จึงต้องใช้ภาพ invert เพื่อให้เห็นผลผลิต (ภาพ 25) หลังจากนั้นนำผลผลิตที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยจากการตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟริซีสพบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 700-1000 คู่เบส ในบางตัวอย่างเพิ่มปริมาณได้น้อยจึงทำให้แถบผลผลิตมีลักษณะเป็นแถบจาง

2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF*

จากการนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ บริเวณ *trnL-trnF* และใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 50-55 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสม จากนั้นตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรส 1% พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการได้ มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส และ 1,200 คู่เบส และพบว่ามีบางตัวอย่างไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จึงเจือจาง แต่ยังไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 38 ตัวอย่าง จาก 45 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ปรากฏแถบของดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ จำนวน 12 ตัวอย่าง และปรากฏเพียง 1 แถบ จำนวน 26 ตัวอย่าง (ภาพ 26) ในตัวอย่างที่ปรากฏแถบของดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ จะตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไป ซึ่งหลังจากทำให้ผลผลิตพีซีอาร์บริสุทธิ์แล้วพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จางมาก



ภาพ 25 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific, United states), 1 = *C. rubens* PR4, 2 = *P. tankervilleae* var. *alba* RK2, 3 = *C. triplicata* PR2, 4 = *Ce. obcordata* RK1, 5 = *C. clavata* PR1, 6 = P. *tankervilleae* var. *alba* CM1, 7 = *C. masuca* MR1, 8 = *C. cardioglossa* MR3, 9 = *C. triplicata* RK1, 10 = *C. lyroglossa* RK3, 11 = *P. tankervilleae* var. *alba* RK3, 12 = *Ce. longipes* RK1, 13 = *P. flavus* RK2, 14 = C. cardioglossa MR7, 15 = C. cardioglossa RK2, 16 = C. masuca RK1, 17 = *C. lyroglossa* RK2, 18 = *C. vestita* MR3, 19 = *C. vestita* MR4, 20 = *P. flavus* RK3, 21 = *C. rubens* RK1, 22 = *C. rubens* MR3, 23 = *C. rubens* var. *alba* RK1, 24 = *P. indochinensis* RK1, 25 = C. lyroglossa RK1, 26 = P. tankervilleae MR1, 27 = *P. tankervilleae* RK1, 28 = *P. tankervilleae* PR1, 29 = *C. pulchra* MR1, 30 = *Ce. longipes* PH1, 31 = *Ce. longipes* PH2, 32 = *C. triplicata* NN1, 33 = *C. rosea* MR3, 34 = *C. rosea* MR4, 35 = *C. masuca* RK4, 36 = *C. clavata* PR2, 37 = *P. mishmensis* RK4, 38 = *P. mishmensis* RK5, 39 = *P. mishmensis* RK7, 40 = *C. triplicata* MR1, 41 = *C. succedanea* MR1, 42 = *C. densiflora* RK1, 43 = *C. densiflora* PH1, 44 = *C. rosea* MR7 และ 45 = *C. herbacea* PH1



ภาพ 26 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb DNA Ladder (Sibenzyme), 1 = *C. triplicata* MR1, 2 = *C. triplicata* RK1, 3 = *C. cardioglossa* MR3, 4 = *C. cardioglossa* MR7, 5 = *C. masuca* MR1, 6 = *C. masuca* RK1, 7 = *P. tankervilleae* var. *alba* CM1, 8 = *Ce. longipes* RK1, 9 = *Ce. longipes* PH2, 10 = *P. flavus* RK2, 11 = *P. tankervilleae* MR1, 12 = *C. triplicata* NN1, 13 = *Ce. obcordata* RK1, 14 = *C. clavata* PR1, 15 = *P. tankervilleae* RK1, 16 = *C. triplicata* PR2, 17 = *C. clavata* PR2, 18 = *C. cardioglossa* RK2, 19 = *C. rosea* MR4, 20 = *Ce. longipes* PH1, 21 = *P. flavus* RK3, 22 = *P. mishmensis* RK7, 23 = *P. tankervilleae* RK2, 24 = *C. densiflora* PH1, 25 = *C. lyroglossa* RK1, 26 = *P. tankervilleae* var. *alba* RK3, 27 = *P. indochinensis* RK1, 28 = *C. lyroglossa* RK2, 29 = *C. succedanea* MR1, 30 = *P. mishmensis* RK4, 31 = *C. herbacea* PH1, 32 = *C. masuca* RK4, 35 = *C. vestita* MR3, 36 = *C. vestita* MR4, 37 = *C. rosea* MR3, 38 = *C. rosea* MR7, 39 = *P. tankervilleae* PR1, 40 = *C. rubens* RK1, 41 = *C. rubens* var. *alba* RK1, 42 = *C. rubens* MR3, 43 = *C. rubens* PR4, 44 = *C. densiflora* RK1 และ 45 = *C. lyroglossa* RK3

3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการระบุชนิด

3.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริเวณยีน *matK*

ตัวอย่างผลผลิตพีซีอาร์บริเวณยีน *matK* ของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น 18 ชนิด จำนวนทั้งหมด 45 ตัวอย่าง มีเพียง 17 ชนิด 40 ตัวอย่าง ที่สามารถนำมาจัดเรียงเพื่อวิเคราะห์ได้ โดยลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ที่นำมาจัดเรียงมีความยาว 667-679 คู่เบส จากฐานข้อมูล NCBI ยีน *matK* ของ *C. sieboldii* (KF673815.1) มีความยาวประมาณ 1,500 คู่เบส เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ศึกษา พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นอยู่บริเวณตำแหน่งที่ 142 ถึง 820 โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ conserved sites 91.50% (625 ตำแหน่ง) variable sites 8.49% (58 ตำแหน่ง) แบ่งเป็น parsimony infomative sites 7.17% (49 ตำแหน่ง) และ singleton sites 1.31% (9 ตำแหน่ง) (ตาราง 7) โดยพบการแทนที่เบสแบบ transition 28 ตำแหน่ง transversion 22 ตำแหน่ง นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับเบสตั้งแต่ 1 ตำแหน่งถึง 27 ตำแหน่ง โดยแต่ละตัวอย่างภายในชนิดเดียวกันมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นกล้วยไม้ 5 ชนิด ได้แก่ *C. rosea*, *C. ruben*, *C. vestita*, *C. triplicata* และ *P. tankervilleae* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันภายในชนิดเดียวกัน (ภาคผนวก ค) กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นบางชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะ ได้แก่ *C. clavata* (ตำแหน่งที่ 193, 214 และ 640) *C. masuca* (ตำแหน่งที่ 556 และ 797) *C. pulchra* (ตำแหน่งที่ 574) *P. flavus* (ตำแหน่งที่ 243, 286 และ 816) และ *P. tankervilleae* (ตำแหน่งที่ 244, 342 และ 719) ในขณะที่กล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียวลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะในระดับสกุล (*Ce. longipes* PH1, *Ce. longipes* PH2, *Ce. longipes* RK1 และ *Ce. obcordata* RK1) คือ ตำแหน่งที่ 152, 210, 231, 320, 337, 443, 452, 655 และ 788 (ตาราง 8)

3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริเวณยีน *rbcL*

ผลผลิตพีซีอาร์บริเวณยีน *rbcL* ของตัวอย่างกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น 18 ชนิด 45 ตัวอย่างมีเพียง 15 ชนิด 33 ตัวอย่าง ที่สามารถนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้ในการวิเคราะห์ได้ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 543 คู่เบส ซึ่งยีน *rbcL* มีความยาวประมาณ 1,400 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbc*L ของตัวอย่างกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นกับ *Oreorchis patents* (EU391355.1) ในฐานข้อมูล NCBI พบว่านิวคลีโอไทด์ที่ได้เริ่มต้นที่ตำแหน่ง 122 ถึง 664 สามารถแปลรหัสได้ 180 กรดอะมิโน โดยกรดอะมิโนตัวแรกของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นเป็นกรดอะมิโนตัวที่

ตาราง 7 ผลการศึกษาเปรียบเทียบ 4 บริเวณ

	matK	*rbcL*	*psbA-trnH*	*trnL-trnF*
PCR success (%)	100	100	71.11	84.44
Sequencing success (%)	88.89	73.33	37.5	52.63
Length of aligned sequence (bp)	667-679	543	492-511	448-497
Conserved sites	625	526	476	458
Insertion/deletion (bp)	5 (1-27)	0	3 (1-33)	24 (1-48)
Variable sites	58	17	43	90
Parsimony informative sites (%)	49 (7.17)	7 (1.29)	38 (7.23)	28 (4.94)
Singleton sites	9	10	5	62

42 และตัวสุดท้ายเป็นกรดอะมิโนตัวที่ 221 ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ conserved sites 96.89% (526 ตำแหน่ง) variable sites 3.13% (17 ตำแหน่ง) parsimony infomative sites 1.29% (7 ตำแหน่ง) และ singleton sites 1.84% (10 ตำแหน่ง) (ตาราง 7) โดยพบการแทนที่เบสแบบ transition 13 ตำแหน่ง transversion 5 ตำแหน่ง และจากลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่พบการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับเบส กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นบางชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะ ได้แก่ *C. pulchra* (ตำแหน่งที่ 240 และ 489) และ *C. triplicata* (ตำแหน่งที่ 624) (ตาราง 9)

3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH*

ผลผลิตพีซีอาร์บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ของตัวอย่างกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น 13 ชนิด 32 ตัวอย่าง มีเพียง 8 ชนิด 12 ตัวอย่าง ที่สามารถนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้ในการวิเคราะห์ได้ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 492-511 คู่เบส โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ conserved sites 90.67% (476 ตำแหน่ง) variable sites 5.17% (31 ตำแหน่ง) parsimony infomative sites 7.23% (38 ตำแหน่ง) และ singleton sites 0.95% (5 ตำแหน่ง) โดยพบการแทนที่เบสแบบ transition 2 ตำแหน่ง transversion 24 ตำแหน่ง (ตาราง 7) จากลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของ

ตาราง 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะบริเวณยีน *matK*

ตัวอย่าง	152	193	210	214	231	243	244	286	320	337	342
1. CCA_MR3	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
2. CCA_MR7	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
3. CCA_RK2	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
4. CCL_PR1	T	T	C	G	C	C	G	G	C	T	G
5. CCL_PR2	T	T	C	G	C	C	G	G	C	T	G
6. CDE_PH1	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
7. CDE_RK1	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
8. CLY_RK2	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
9. CLY_RK3	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
10. CMA_MR1	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
11. CPU_MR1	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
12. CRO_MR3	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
13. CRO_MR4	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
14. CRO_MR7	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
15. CRU_MR3	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
16. CRU_PR4	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
17. CRU_RK1	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
18. CRUA_RK1	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
19. CSU_MR1	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
20. CTR_MR1	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G

ตาราง 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะบริเวณยีน *matK* (ต่อ)

ตัวอย่าง	152	193	210	214	231	243	244	286	320	337	342
21. CTR_NN1	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
22. CTR_PR2	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
23. CVE_MR3	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
24. CVE_MR4	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
25. CELO_PH1	C	-	T	A	A	C	G	G	A	C	G
26. CELO_PH2	C	-	T	A	A	C	G	G	A	C	G
27. CELO_RK1	C	-	T	A	A	C	G	G	A	C	G
28. CEOB_RK1	C	-	T	A	A	C	G	G	A	C	G
29. PFL_RK2	T	-	C	A	C	T	G	A	C	T	G
30. PFL_RK3	T	-	C	A	C	T	G	A	C	T	G
31. PIN_RK1	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
32. PMI_RK4	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
33. PMI_RK5	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
34. PMI_RK7	T	-	C	A	C	C	G	G	C	T	G
35. PTA_MR1	T	-	C	A	C	C	A	G	C	T	C
36. PTA_PR1	T	-	C	A	C	C	A	G	C	T	C
37. PTA_RK1	T	-	C	A	C	C	A	G	C	T	C
38. PTAA_CM1	T	-	C	A	C	C	A	G	C	T	C
39. PTAA_RK2	T	-	C	A	C	C	A	G	C	T	C
40. PTAA_RK3	T	-	C	A	C	C	A	G	C	T	C

ตาราง 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะบริเวณยีน *matK* (ต่อ)

ตัวอย่าง	443	452	556	574	640	655	719	788	797	816
1. CCA_MR3	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
2. CCA_MR7	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
3. CCA_RK2	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
4. CCL_PR1	C	G	T	G	T	G	C	G	G	G
5. CCL_PR2	C	G	T	G	T	G	C	G	G	G
6. CDE_PH1	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
7. CDE_RK1	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
8. CLY_RK2	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
9. CLY_RK3	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
10. CMA_MR1	C	G	C	G	C	G	C	G	A	G
11. CPU_MR1	C	G	T	A	C	G	C	G	G	G
12. CRO_MR3	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
13. CRO_MR4	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
14. CRO_MR7	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
15. CRU_MR3	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
16. CRU_PR4	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
17. CRU_RK1	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
18. CRUA_RK1	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
19. CSU_MR1	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
20. CTR_MR1	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G

ตาราง 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะบริเวณยีน *matK* (ต่อ)

ตัวอย่าง	443	452	556	574	640	655	719	788	797	816
21. CTR_NN1	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
22. CTR_PR2	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
23. CVE_MR3	C	T	T	G	C	G	C	G	G	G
24. CVE_MR4	C	T	T	G	C	G	C	G	G	G
25. CELO_PH1	T	G	T	G	C	T	C	A	G	G
26. CELO_PH2	T	G	T	G	C	T	C	A	G	G
27. CELO_RK1	T	G	T	G	C	T	C	A	G	G
28. CEOB_RK1	T	G	T	G	C	T	C	A	G	G
29. PFL_RK2	C	G	T	G	-	G	C	G	G	A
30. PFL_RK3	C	G	T	G	-	G	C	G	G	A
31. PIN_RK1	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
32. PMI_RK4	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
33. PMI_RK5	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
34. PMI_RK7	C	G	T	G	C	G	C	G	G	G
35. PTA_MR1	C	G	T	G	C	G	A	G	G	G
36. PTA_PR1	C	G	T	G	C	G	A	G	G	G
37. PTA_RK1	C	G	T	G	C	G	A	G	G	G
38. PTAA_CM1	C	G	T	G	C	G	A	G	G	G
39. PTAA_RK2	C	G	T	G	C	G	A	G	G	G
40. PTAA_RK3	C	G	T	G	C	G	A	G	G	G

ตาราง 9 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์จำเพาะบริเวณยีน *rbcL*

ตัวอย่าง	240	489	624
1. CCA_MR3	A	A	G
2. CCA_RK2	A	A	G
3. CCL_PR1	A	A	G
4. CCL_PR2	A	A	G
5. CDE PH1	A	A	C
6. CDE RK1	A	A	G
7. CHE_PH1	A	A	G
8.CPU_MR1	G	G	G
9. CRU_MR3	A	A	G
10. CRU_PR4	A	A	G
11. CRU_RK1	A	A	G
12. CRUA_RK1	A	A	G
13. CSU_MR1	A	A	G
14. CTR_MR1	A	A	A
15. CTR_NN1	A	A	A
16. CTR_PR2	A	A	A
17. CTR RK1	A	A	A
18. CVE_MR3	A	A	G
19. CVE_MR4	A	A	G
20. CELO_PH1	A	A	G
21. CELO_PH2	A	A	G
22. CELO_RK1	A	A	G
23. CEOB_RK1	A	A	G
24. PFL_RK2	A	A	G
25. PFL_RK3	A	A	G
26. PIN_RK1	A	A	G

ตัวอย่าง	240	489	624
27. PMI_RK5	A	A	G
28. PMI_RK7	A	A	G
29. PTA_MR1	A	A	G
30. PTA_RK1	A	A	G
31. PTAA_CM1	A	A	G
32. PTAA_RK2	A	A	G
33. PTAA_RK3	A	A	G

นิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 1 ถึง 33 เบส กล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้นบางชนิดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะ ได้แก่ *C. masuca* (ตำแหน่งที่ 389 และ 475) และ *C. triplicata* (ตำแหน่งที่ 98, 137, 154, 156, 258, 392 และ 425) และมีบางตำแหน่งที่จำเพาะกับ *P. flavus* และ *P. tankervilleae* var. *alba* (ตำแหน่งที่ 169, 260, 274, 289, 380 และ 404) (ตาราง 10)

3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF*

ผลผลิตพีซีอาร์บริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ของตัวอย่างกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น 18 ชนิด 45 ตัวอย่าง มีเพียง 12 ชนิด 20 ตัวอย่าง ที่สามารถนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้ในการวิเคราะห์ได้ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 448-497 คู่เบส โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ conserved sites 80.77% (458 ตำแหน่ง) variable sites 19.65% (90 ตำแหน่ง) parsimomy infomative sites 4.94% (28 ตำแหน่ง) และ singleton sites 10.93% (62 ตำแหน่ง) (ตาราง 7) โดยพบการแทนที่เบสแบบ transition 32 ตำแหน่ง transversion 56 ตำแหน่ง จากลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ ตั้งแต่ 1 ถึง 48 เบส และมีนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่งที่จำเพาะกับกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้นบางชนิด คือ *C. clavata* (ตำแหน่งที่ 16) และสกุลเอื้องกลีบเกลียว (ตำแหน่งที่ 2, 180, 220 และ 314) (ตาราง 11)

4. การวิเคราะห์หาความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดและระหว่างชนิดด้วยวิธี pairwise distance

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 บริเวณมาวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธี pairwise distance โดยใช้โปรแกรม MEGA5.2 พบว่า ยีน *matK* มีความแตกต่างภายในชนิดน้อยกว่าเมื่อเทียบกับชนิดอื่น ยกเว้นบางชนิด คือ *C. rosea*, *C. rubens*, *C. rubens* var. *alba* และ *C. vestits* ที่มีความแตกต่างภายในชนิดสูงกว่าเมื่อเทียบกับชนิดอื่น ในขณะที่ยีน *rbcL* สกุลเอื้องน้ำต้นและสกุลเอื้องกลีบเกลียวมีความแตกต่างภายในชนิดน้อยกว่าเมื่อเทียบกับชนิดอื่น ซึ่งในสกุลเอื้องพร้าวไม่มีความแตกต่างภายในชนิดและสกุล ส่วนบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ไม่มีความแตกต่างภายในชนิดเดียวกัน และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* มีความแตกต่างภายในชนิดต่ำ ยกเว้น *P. tankervilleae PR*, *P. tankervilleae* RK, *P. tankervilleae* MR, *P. tankervilleae* var. *alba* MR ที่มีความแตกต่างภายในชนิดสูงกว่าเมื่อเทียบกับชนิดอื่น

ตาราง 10 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์จำเพาะบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH*

ตัวอย่าง	98	137	154	156	169	258	260	274	289	380	389
1. CCL_PR1	G	G	A	C	T	T	A	C	G	T	T
2. CMA RK1	G	G	A	C	T	T	A	C	G	T	A
3. CMA RK4	G	G	A	C	T	T	A	C	G	T	A
4. CDE_PH1	G	G	A	C	T	T	A	C	G	T	T
5. CLY RK1	G	G	A	C	T	T	A	C	G	T	T
6. CLY RK2	G	G	A	C	T	T	A	C	G	T	T
7. CLY RK3	G	G	A	C	T	T	A	C	G	T	T
8. CSU_MR1	G	G	A	C	T	T	A	C	G	T	T
9. CTR_MR1	C	C	T	A	T	G	A	C	G	T	T
10. CTR RK1	C	C	T	A	T	G	A	C	G	T	T
11. PFL RK2	G	G	A	C	A	T	T	A	C	A	T
12. PTAA_RK2	G	G	A	C	A	T	T	A	C	A	T

ตัวอย่าง	392	404	425	475
1. CCL_PR1	C	A	C	T
2. CMA RK1	C	A	C	G
3. CMA RK4	C	A	C	G
4. CDE_PH1	C	A	C	T
5. CLY RK1	C	A	C	T
6. CLY RK2	C	A	C	T
7. CLY RK3	C	A	C	T
8. CSU_MR1	C	A	C	T
9. CTR_MR1	A	A	A	T
10. CTR RK1	A	A	A	T
11. PFL RK2	C	C	C	T
12. PTAA_RK2	C	C	C	T

ตาราง 11 ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF*

ตัวอย่าง	2	16	180	220	314
1. CCL_PR1	G	A	G	C	T
2. CMA RK4	G	G	G	C	T
3. CMA MR1	G	G	G	C	T
4. CHE_PH1	G	G	G	C	T
5. CLY RK1	G	G	G	C	T
6. CLY RK2	G	G	G	C	T
7. CLY RK3	G	G	G	C	T
8. CPU_MR1	G	G	G	C	T
9. CSU_MR1	G	G	G	C	T
10. CTR_PR2	G	G	G	C	T
11. CTR RK1	G	G	G	C	T
12. CELO_RK1	A	G	A	T	G
13. CEOB_RK1	A	G	A	T	G
14. PFL RK2	G	G	G	C	T
15. PMI_RK5	G	G	G	C	T
16. PMI_RK7	G	G	G	C	T
17. PTA PR1	G	G	G	C	T
18. PTA_MR1	G	G	G	C	T
19. PTA_RK1	G	G	G	C	T
20. PTAA_CM1	G	G	C	C	T

ในการวิเคราะห์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกันในบางชนิดมีความแตกต่างภายในชนิดสูงขึ้น ในขณะที่การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชนิด พบว่า บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* มีความแตกต่างระหว่างชนิดสูงกว่ายีน *matK* และ *rbcL*ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกันทำให้ความแตกต่างระหว่างชนิดมีค่าสูงกว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงบริเวณเดียว (ตาราง 12)

ตาราง 12 ค่า pairwise distance ด้วยโปรแกรม MEGA5.2

Region	Intraspecific	Interspecific
matK	0.000-0.008	0.000-0.040
rbcL	0.000-0.0007	0.000-0.015
psbA-trnH	0.000	0.004-0.066
trnL-trnF	0.000-0.104	0.000-0.127
matK+rbcL	0.000-0.008	0.002-0.022
matK+psbA-trnH	0.000	0.007-0.033
matK+trnL-trnF	0.000-0.032	0.001-0.060
rbcL+ psbA-trnH	0.001	0.002-0.026
rbcL+ trnL-trnF	0.000-0.031	0.000-0.055
psbA-trnH+ trnL-trnF	0.000-0.001	0.004-0.041
matK+rbcL+psbA-trnH	-	0.009-0.023
matK+rbcL+ trnL-trnF	0.011-0.025	0.014-0.040
matK+psbA-trnH+ trnL-trnF	0.001	0.007-0.026
rbcL+psbA-trnH+ trnL-trnF	-	0.005-0.029
matK+rbcL+psbA-trnH+ trnL-trnF	-	0.010-0.020

หมายเหตุ – คือ หนึ่งชนิดมีเพียง 1 ตัวอย่าง

5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งเฉพาะ

5.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK*

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยการวิเคราะห์ UPGMA โดยใช้โปรแกรม MEGA5.2 แสดงให้เห็นว่าสามารถแบ่งกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นออกได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยกล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้น 4 ตัวอย่าง คือ *C. triplicata* MR1, *C. triplicata* NN1, *C. triplicata* PR2 และ *C. masuca* MR1 และกล้วยไม้ในสกุลเอื้องพร้าว 6 ตัวอย่าง คือ *P. flavus* RK2, *P. flavus* RK3, *P. indochinensis* RK1, *P. mishmensis* RK4, *P. mishmemsis* RK5 และ *P. mishmensis* RK7

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้ *P. tankervilleae* และ *P. tankervilleae* var. *alba* ประกอบด้วย *P. tankervilleae* PR1, *P. tankervilleae* MR1, *P. tankervilleae* RK1, *P. tankervilleae* var. *alba* CM1, *P. tankervilleae* var. *alba* RK2 และ *P. tankervilleae* var. *alba* RK3

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้น 5 ชนิด 13 ตัวอย่าง ดังนี้ *C. rosea* MR3, *C. rosea* MR4, *C. rosea* MR7, *C. ruben* MR3, *C. rubens* RK1, *C. ruben* PR4, *C. ruben* var. *alba* RK1, *C. cardioglossa* MR3, *C. cardioglossa* RK2, *C. cardioglossa* MR7, *C. succedanea* MR1, *C. vestita* MR3 และ *C. vestita* MR7

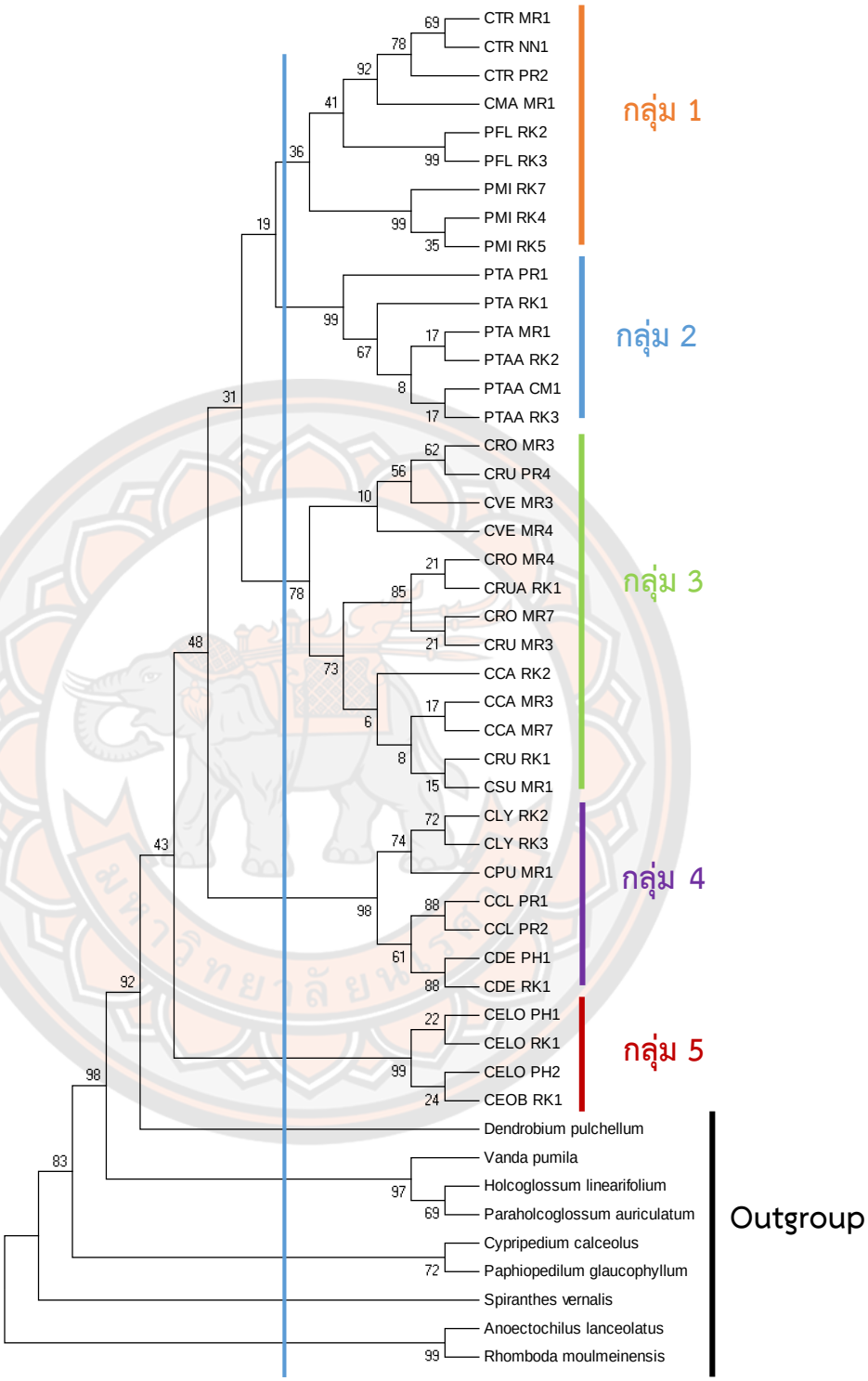
กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้น 4 ชนิด 7 ตัวอย่าง ดังนี้ *C. lyroglossa* RK2, *C. lyroglossa* RK3, *C. pulchra*, *C. clavata* PR1, *C. clavata* PR2, *C. densiflora* PH1 และ *C. densiflora* RK1

กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียว ประกอบด้วย *Ce. longipes* PH1, *Ce. longipes* PH2, *Ce. longipes* RK1, และ *Ce. Obcordata* RK1 (ภาพ 27)

ยีน *matK* ในกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรม (pairwise diatance) ตั้งแต่ 0.000 ถึง 0.040 โดยไม่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิด คือ *C. cardioglossa*, *C. clavata*, *C. densiflora*, *C. lyroglossa*, *P. flavus* และ *P. mishmensis* นอกจากนี้ยังพบว่ากล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียวไม่มีความแตกต่างภายในสกุล ซึ่งกล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียวทั้ง 4 ตัวอย่าง มีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากกล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้น 0.019 ในตัวอย่าง *C. densiflora* PH1 และ *C. densiflora* RK1 ถึง 0.040 ในตัวอย่าง *C. vestita* MR4 และสกุลเอื้องพร้าวตั้งแต่ 0.024 ในตัวอย่าง *P. indochinensis* RK1, *P. mishmensis* RK4, *P. mishmensis* RK5 และ *P. mishmensis* RK7 ถึง 0.035 ในตัวอย่าง *P. tankervilleae* MR1, *P. tankervilleae* RK1, *P. tankervilleae* var. *alba* RK2, *P. tankervilleae* var. *alba* RK3 และ *P. tankervilleae* var. *alba* CM1 ดังนั้นกล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียวจึงถูกแยกออกมาจากทั้งสองสกุลที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่น้อยกว่า (ภาคผนวก ช)

5.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbcL*

เมื่อนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่าในตัวอย่างชนิดเดียวกันจะมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยกว่าตัวอย่างที่อยู่คนละชนิดหรือสกุล จากการวิเคราะห์



ภาพ 27 Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* โดยใช้วิธี UPGMA

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์จะได้ phylogenetic tree ด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งได้ 6 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้ในสกุลเอื้องพร้าว คือ *P. flavus* RK2*, P. flavus* RK3*, P. indochinensis* RK1*, P. mishmensis* RK5*, P. mishmensis* RK7*, P. tankervilleae* MR1*, P. tankervilleae* RK1*, P. tankervilleae* var. *alba* CM1*, P. tankervilleae* var. *alba* RK2 *และ P. tankervilleae* var. *alba* RK3 และกล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้น 1 ตัวอย่าง *C. densiflora* RK1

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยกล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้น ดังนี้ *C. cardioglossa* MR3*, C. clavata* PR2*, C. succedanea* MR1*, C. vestita* MR4*, C. rubens* PR4*, C. rubens* MR3*, C. rubens* RK1 และ *C. rubens* var. *alba* RK1

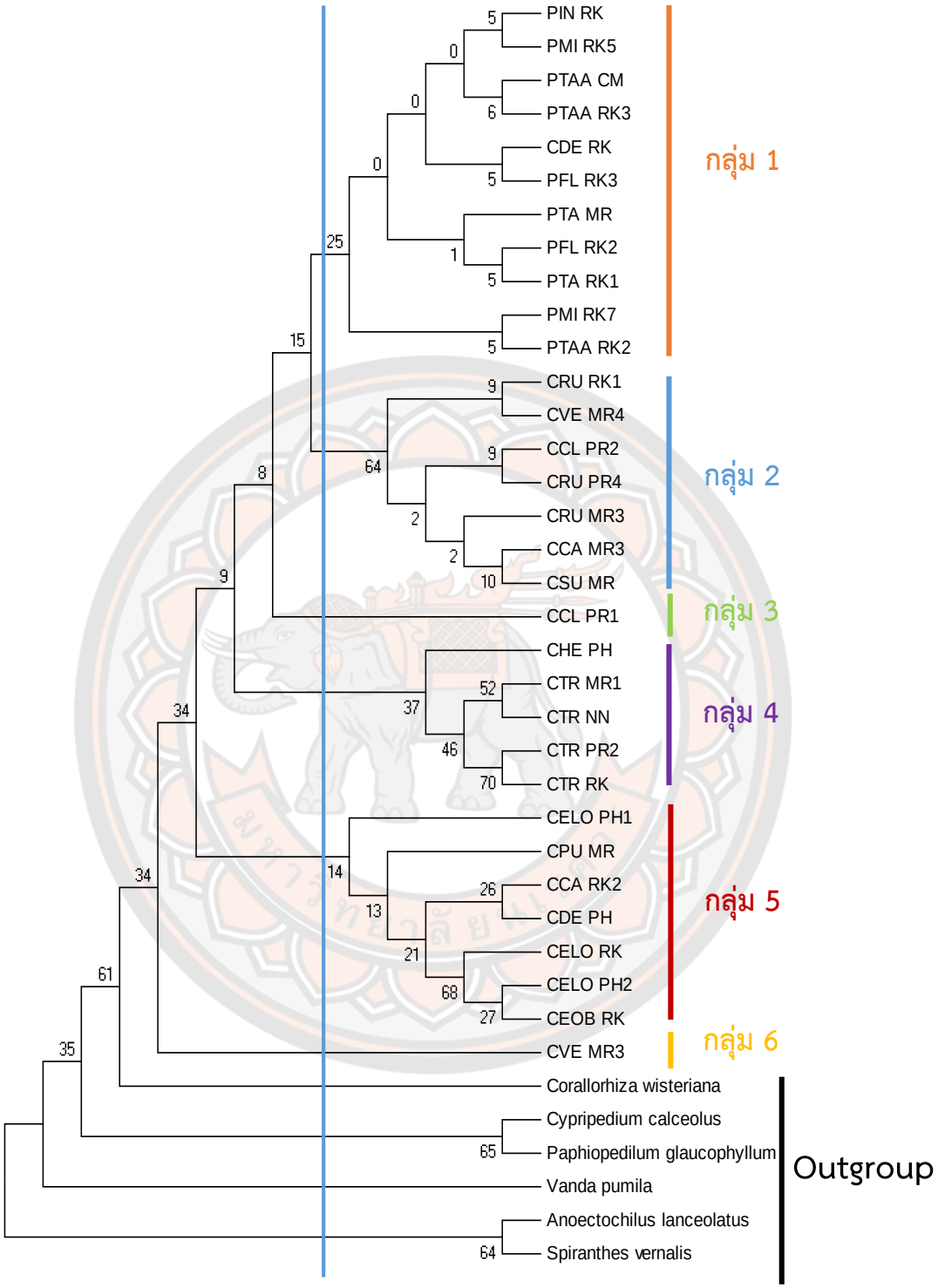
กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้น 1 ตัวอย่าง คือ *C. clavata* PR1

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้น ประกอบด้วย *C. herbacea* PH1, *C. triplicata* MR1, *C. triplicata* NN1, *C. triplicata* PR2 และ *C. triplicata* RK2

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยกล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้นและกล้วยไม้ในสกุลเอื้องกลีบเกลียว ดังนี้ *C. pulchra* MR1, *C. cardioglossa* RK2, *C. densiflora* PH1, *Ce. longipes* RK1, *Ce. longipes* PH1, *Ce. longipes* PH2 และ *Ce. obcordata* RK1

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยกล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้น 1 ตัวอย่าง คือ *C. vestita* MR3 (ภาพ 28)

กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *rbcL* อยู่ในช่วง 0.000 ถึง 0.015 ซึ่งบางตัวอย่างภายในสกุลเดียวกันและต่างสกุลกันไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม เช่น *C. cardiglossa* MR3 และ *C. clavata* PR2 ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับ *C. rubens* MR3, *C. rubens* PR4, *C. rubens* RK1, *C. rubens* var. *alba* RK1 และ *C. succedenea* MR1 และ ตัวอย่างกล้วยไม้ในสกุลเอื้องพร้าว โดย *C. vestita* MR3 มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงที่สุด คือ 0.013 เมื่อเปรียบเทียบกับ *C. pulchra* MR1, *C. triplicata* PR2 และ *C. triplicata* RK1 (ภาคผนวก ช)



ภาพ 28 Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbcL* โดยใช้วิธี UPGMA

5.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH*

จากแผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น 8 ชนิด 12 ตัวอย่าง สามารถแบ่งกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยกล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้น ดังนี้ *C. masuca* RK1, *C. masuca* RK4, *C. densiflora* PH1, *C. triplicata* MR1 และ *C. triplicata* RK1

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยกล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้น 2 ตัวอย่าง คือ *C. clavata* PR1 *และ C. succedanea* MR1

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยกล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้นและสกุลเอื้องพร้าว ดังนี้ *C. lyroglossa* RK1, *C. lyroglossa* RK2, *C. lyroglossa* RK3, *P. flavus* RK2 และ *P. tankervilleae* var. *alba* RK2 (ภาพ 29)

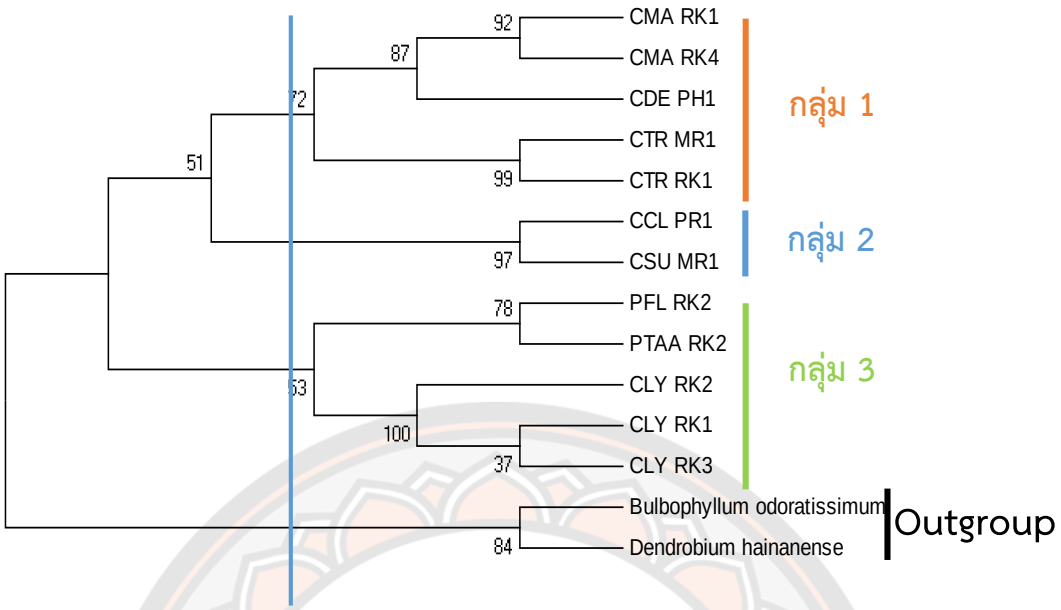
บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ของกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้นและเอื้องพร้าว อยู่ในช่วง 0.000 ถึง 0.066 โดยตัวอย่างที่เป็นชนิดเดียวกันไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม คือ *C. lyroglossa*, *C. masuca* และ *C. triplicata* ซึ่ง *C. triplicata* MR1 และ *C. triplicata* RK มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกล้วยไม้ในสกุลเอื้องพร้าว *P. flavus* RK2 (0.066) และ *P. tankervilleae* var. *alba* RK2 (0.063) สูงที่สุด (ภาคผนวก ช)

5.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF*

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 12 ชนิด 20 ตัวอย่าง มาสร้าง Phylogenetic tree โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม MEGA5.2 สามารถแบ่งได้เป็น 8 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้น ประกอบด้วย *C. lyroglossa* RK1, *C. lyroglossa* RK2, *C. lyroglossa* RK3, *C. succedanea* MR1, *C. pulchra* MR1 และ *C. clavata* PR1

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้น ดังนี้ *C. masuca* MR1, *C. masuca* RK4, *C. herbacea* PH1, *C. triplicata* RK1 *และ C. triplicata* PR2



ภาพ 29 Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* โดยใช้วิธี UPGMA

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยกล้วยไม้ในสกุลเอื้องกลีบเกลียว 1 ตัวอย่าง คือ *Ce. longipes* RK1

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้ในสกุลเอื้องพร้าว ประกอบด้วย *P. flavus* RK2, *P. tankervilleae* RK1, *P. mishmensis* RK4 และ *P. mishmensis* RK5

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วยกล้วยไม้สกุลเอื้องพร้าว 1 ชนิด คือ *P. tankervilleae* PR1

กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วยกล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียว 1 ชนิด คือ *Ce. obcordata* RK1

กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยกล้วยไม้สกุลเอื้องพร้าว 1 ชนิด คือ *P. tankervilleae* MR1

กลุ่มที่ 8 ประกอบด้วยกล้วยไม้สกุลเอื้องพร้าว 1 ชนิด คือ *P. tankervilleae* var. *alba* CM1 (ภาพ 30)

กล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้นมีความแตกต่างทางพันธุกรรมบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ภายในสกุลต่ำ โดย *C. lyroglossa* RK1, *C. lyroglossa* RK3, *C. pulchra* MR1 และ *C. succedanea* MR1 ไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม (0.000) นอกจากนี้ *C. lyroglossa* RK1, *C. lyroglossa* RK3, *C. pulchra* MR1 และ *C. succedanea* MR1 มีความแตกต่างทางพันธุกรรม

กับ *C. masuca* MR1 และ *C. herbacea* PH1 สูงที่สุด (0.017) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียว (*Ce. obcordata* RK1) มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้นและสกุลเอื้องกลีบเกลียวสูงที่สุด คือ 0.127 ระหว่าง *Ce. obcordata* RK1 กับ *P. tankervilleae* var. *alba* CM1 (ภาคผนวก ช)

5.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ร่วมกับยีน *rbcL*

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 14 ชนิด 31 ตัวอย่าง มาสร้าง Phylogenetic tree โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม MEGA5.2 สามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยกล้วยไม้ในสกุลเอื้องพร้าวและเอื้องกลีบเกลียว ดังนี้ *P. indochinensis* RK1, *P. mishmensis* RK5, *P. mishmensis* RK7, *P. flavus* RK2, *P. flavus* RK3, *C. triplicata* PR2, *C. triplicata* MR1 และ *C. triplicata* NN1

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้ในสกุลเอื้องพร้าว 1 ชนิด คือ *P. tankervilleae* ดังนี้ *P. tankervilleae* RK1, *P. tankervilleae* MR1, *P. tankervilleae* var. *alba* CM1, *P. tankervilleae* var. *alba* RK2 และ *P. tankervilleae* var. *alba* RK3

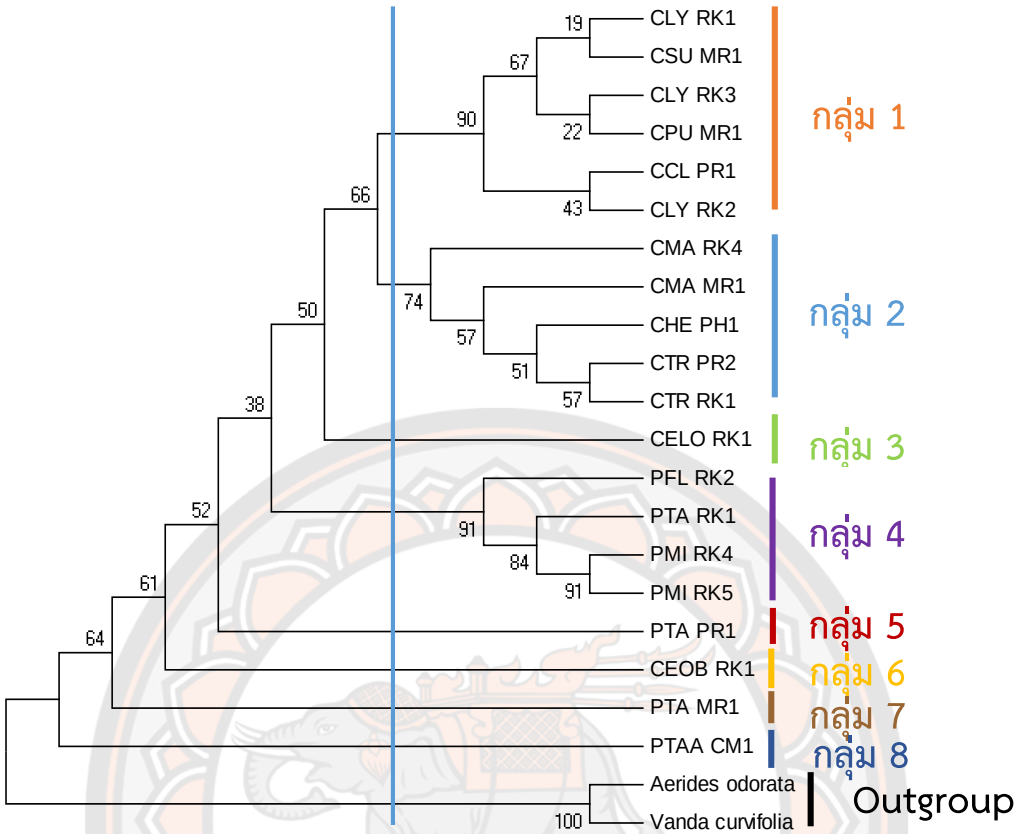
กลุ่มที่ 3, 4 และ 5 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้น ประกอบด้วย *C. vestita* MR3, *C. vestita* MR4, และ *C. rubens* PR4,

กลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้น ดังนี้ *C. rubens* MR3, *C. rubens* RK1, *C. rubens* var. *alba* RK1, *C. cardioglossa* RK2, *C. cardioglossa* MR3 และ *C. succedanea* MR1

กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วยกล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้น ดังนี้ *C. pulchra* MR1, *C. clavata* PR1, *C. clavata* PR2, C. *densiflora* PH1 และ *C. densiflora* RK1

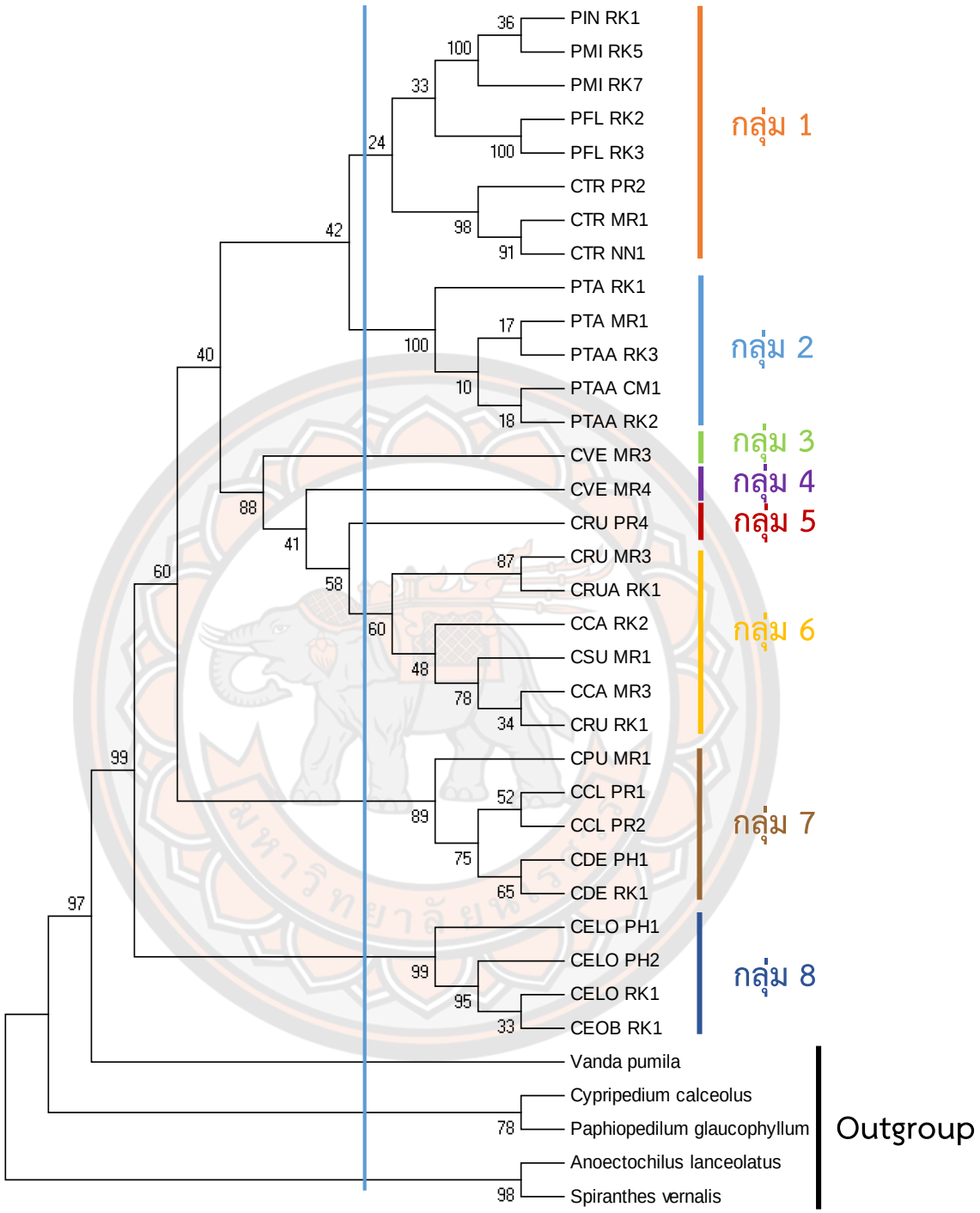
กลุ่มที่ 8 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้ในสกุลเอื้องกลีบเกลียว ประกอบด้วย *Ce. longipes* PH1, *Ce. longipes* PH2, *Ce. longipes* RK1 และ *Ce. obcordata* RK1 (ภาพ 31)

กล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียวมีความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน *matK* และยีน *rbcL* ภายในสกุลเพียง 0.000-0.003 เมื่อเปรียบเทียบกับอีก 2 สกุลพบว่า มีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้น มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.012 (ระหว่าง *Ce. longipes* PH2, *Ce. longipes* RK1 และ *Ce. obcordata* กับ *C. densiflora*



ภาพ 30 Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* โดยใช้วิธี UPGMA

PH1 และ *C. densiflora* RK1) ถึง 0.026 (ระหว่าง *Ce. longipes* PH1 กับ *C. vestita* MR3) และสกุลเอื้องพร้าวอยู่ในช่วง 0.015 (ระหว่าง *Ce. longipes* PH1, *Ce. longipes* PH2, *Ce. longipes* RK1 และ *Ce. obcordata* กับ *P. flavus* RK2, *P. flavus* RK3, *P. indochinensis* RK1, *P. mishmensis* RK5 และ *P. mishmensis* RK7) ถึง 0.022 (ระหว่าง *Ce. longipes* PH1 กับ *P. tankervilleae* MR1, *P. tankervilleae* RK1, *P. tankervilleae* var. *alba* RK2, *P. tankervilleae* var. *alba* RK3 และ *P. tankervilleae* var. *alba* CM1) (ภาคผนวก ช)



ภาพ 31 Phylogenetic tree ที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *matK* ร่วมกับ *rbcL* โดยใช้วิธี UPGMA

อภิปรายผล

1. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น 45 ตัวอย่าง ด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (Doyle and Doyle, 1987) สารละลายดีเอ็นเอมีลักษณะใสไม่มีสี แต่ในบางตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอมีสีเหลืองอ่อน ซึ่งอาจเกิดจากสารกลุ่มพอลิฟีนอลหรือสารที่เกิดจากกระบวนการออกซิเดชันของสารในกลุ่มพอลิฟีนอล ซึ่งถ้ามีการปนเปื้อนในสารของกลุ่มนี้จำนวนมากจะทำให้สารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีสีน้ำตาล (Katterman and Shattuck, 1983; Moreira and Oliveira, 2011) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ (Amani et al., 2011; Porebski et al., 1997) บางตัวอย่างมีการปนเปื้อนของสารในกลุ่มนี้ปริมาณน้อยจึงทำให้สารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีสีเหลืองอ่อน สามารถกำจัดสารในกลุ่มนี้โดยเติมสาร polyvinylpyrrolidone (PVP) หรือ bovine serum albumin (BSA) ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังมีการเติมสาร β-mercaptoethanol ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันใน CTAB buffer ดังนั้นการเพิ่มปริมาณ β-mercaptoethanol ทำให้สารละลายดีเอ็นเอมีปริมาณสารกลุ่มพอลิฟีนอลน้อยลง ทำการ ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบแถบดีเอ็นเอในทุกตัวอย่างและมีรอย smear ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ endonluclease ในตัวอย่างที่สารละลายดีเอ็นเอมีสีเหลือง อาจเกิดจากใบกล้วยไม้ที่ใช้สกัดไม่ใช่ใบสดและเป็นใบแก่ ซึ่งมีสารพอลิฟีนอลสูง ในวิธีการสกัดอาจใช้ใบสดที่เป็นใบอ่อน เนื่องจากเป็นส่วนของเนื้อเยื่อเจริญที่มีการแบ่งเซลล์ทำให้มีปริมาณดีเอ็นเอที่สูงและมีสารพอลิฟีนอลน้อย ส่งผลให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณและคุณภาพดีขึ้น นอกจากสารพอลิฟีนอลแล้วพืชมีสารอื่นที่ส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วย สารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) เช่น alkaloids, flavonoids, phenolic compounds, gummy polysaccharides, terpenes และ quinine ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ รวมไปถึงการโคลน (Sharma et al., 2002) บางกรณีสารละลายดีเอ็นเอมีลักษณะหนืดเนื่องจากการปนเปื้อนของพอลิแซ็คคาไรด์ (Amani et al., 2011) โดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบสดและใบแห้งของ *Terminalia arjuna* (Roxb.) พบว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มักมีสีเหลือง และหนืด ซึ่งเกิดจากการพอลิแซ็คคาไรด์จับตัวกับดีเอ็นเอและมีสารพอลิฟีนอลในปริมาณสูง เนื่องจากในขั้นตอนการตกตะกอนดีเอ็นเอสารเหล่านี้ตกตะกอนพร้อมกับดีเอ็นเอ สามารถกำจัดสารพอลิฟีนอลได้โดยการล้างตะกอนด้วย wash buffer ที่ประกอบด้วย PVP และ β-mercaptoethanol 3-4 ครั้ง และสำหรับสารพอลิแซ็คคาไรด์สามารถกำจัดได้โดยใช้ extraction

buffer ที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นสูง (Aljanabi et al., 1999; Deshmukh et al., 2007; Sharma et al., 2002) ในการสกัดดีเอ็นเอให้มีคุณภาพและปริมาณที่สูงควรใช้ใบสด แต่ในพืชบางชนิดมีลักษณะของถิ่นที่อยู่อาศัยที่จำเพาะที่อยู่ห่างไกล ซึ่งยากต่อการเดินทางเพื่อเก็บตัวอย่าง ดังนั้นบางครั้งจึงจำเป็นต้องสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบแห้ง การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ β-mercaptoethanol ในปริมาณที่สูงสามารถกำจัดพอลิฟีนอลออกจากใบแห้งได้ทำให้ดีเอ็นเอมีคุณภาพที่ดีขึ้น และใช้ extraction buffer ที่มีความเข้มข้นของ NaCl มากกว่า 0.5 M จะช่วยกำจัดพอลิฟีนอลในขั้นตอนการสกัดได้ (Moreira and Oliveira, 2011; Paterson et al., 1993; Sahu et al., 2012) ซึ่งบางชนิดอาจใช้ extraction buffer ที่มีความเข้มข้นของ NaCl สูงถึง 6 M (Aljanabi et al., 1999) ดังนั้นเพื่อเพิ่มคุณภาพดีเอ็นเอ อาจเพิ่มปริมาณของ NaCl และβ-mercaptoethanol ใน extraction buffer และเติม PVP ลงใน wash buffer เพื่อกำจัดพอลิแซ็คคาไรด์

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *matK* โดยใช้ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด matKKUf และไพรเมอร์รีเวิร์ส matKKUr สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้ง 45 ตัวอย่าง ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้มาจากการออกแบบเพื่อใช้ในการตรวจสอบกล้วยไม้สกุลหวาย (Srikulnath et al., 2015) ซึ่งกล้วยไม้สกุลหวายจัดอยู่ในวงศ์ย่อย Epidendroideae เช่นเดียวกับกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น จึงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ซึ่งยีน *matK* เป็นยีนที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ง่าย (Lahaye et al., 2008) ดังนั้นกล้วยไม้ในหลายสกุลสามารถใช้ universal primer ในการเพิ่มปริมาณได้ (Xiang et al., 2011; Xu et al., 2015)

ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด rbcL1F และไพรเมอร์รีเวิร์ส rbcL724R เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Medusagyne oppositifolia* (Fay et al., 1997) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcL* ของกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้นได้ในทุกตัวอย่าง โดยยีน *rbcL* เป็นยีนที่สร้างเอนไซม์รูบิสโก ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในวัฏจักรคาลวิน (Soltis and Soltis, 1998) ยีน *rbcL* เป็นยีนที่มีอัตราการแทนที่ของเบสที่ต่ำมาก ซึ่งในการศึกษากล้วยไม้สกุลหวายเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ด้วย universal primer สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในทุกตัวอย่าง มีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 1,297 คู่เบส ซึ่งไม่มีตำแหน่งที่เป็น parsimony informative site (Xu et al., 2015) นอกจากนี้กล้วยไม้สกุล *Holcoglossum* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcL* ได้ทุกตัวอย่าง โดยใช้ universal primer โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 1,288 คู่เบส พบ variable site 8 ตำแหน่งเป็น

parsimony informative site เพียง 3 ตำแหน่ง ส่งผลให้เป็นบริเวณที่มีความแตกต่างระหว่างชนิดต่ำที่สุด (Xiang et al., 2011) จะเห็นได้ว่ายีน *rbcL* ของกล้วยไม้ในแต่ละสกุลมีบริเวณอนุรักษ์สูงมาก สามารถใช้ universal primer ในการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ ดังนั้นจึงทำให้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากพืชชนิดอื่นสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้นได้ในทุกตัวอย่าง

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และ *trnL-trnF* ไม่สามารถเพิ่มผลผลิตได้ในบางตัวอย่าง อาจเนื่องมาจากสารละลายดีเอ็นเอที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีการปนเปื้อนพอลิแซ็คคาไรด์ ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ *Taq* polymerase (Fang et al., 1992) และในบางตัวอย่างสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้น้อย อาจเนื่องมาจากดีเอ็นเอที่สกัดได้มีเอนไซม์ endonuclease ที่ทำหน้าที่สลายพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ของสายดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอที่ได้เกิดการแตกหัก จึงเพิ่มผลผลิตได้จำนวนน้อย (Weishing et al., 1995) ซึ่งปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 1-10 นาโนกรัม เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่มากเกินไปอาจส่งผลให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ รวมถึงดีเอ็นเอต้องปราศจาก phenol, proteinase K และ EDTA ที่เป็นตัวยับยั้งในการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ สามารถทำให้ดีเอ็นเอมีคุณภาพดีขึ้นได้โดยการเจือจางดีเอ็นเอ (https://www.dnagdansk.com/media/Downloads/pcr-optimization-and-troubleshooting. pdf) นอกจากนี้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างยีน *psbA-trnH* และ *trnL-trnF* เป็น universal primer ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในพืชหลายชนิด (Edwards et al., 2008; Kocyan et al., 2008; Xiang et al., 2011) รวมไปถึงกล้วยไม้ในบางสกุล เช่น สกุล *Dendrobium* ที่สามารถใช้ universal primer ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ได้ในทุกตัวอย่าง (Xu et al., 2015) แต่ในพืชบางชนิดการใช้ universal primer ส่งผลให้เกิดปัญหาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Bolson et al., 2015; de Groot et al., 2011; Kelly et al., 2010; Roy et al., 2010; Sass et al., 2007; Theodoridis et al., 2012; Yan et al., 2011)

3. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ในเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ 4 บริเวณ คือ ยีน *matK* ยีน *rbcL* บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 37.5 (*psbA-trnH*) -88.89 (*matK*) เปอร์เซ็นต์ โดยยีน *matK* สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 40 ตัวอย่าง จาก 45 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นบริเวณที่ประสบความสำเร็จในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุด โดยยีน *matK* เป็นยีนที่ประสบความสำเร็จในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์สูงในพืชหลายชนิด เช่น กล้วยไม้สกุล

หวาย ยีน *matK* สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้สูงถึง 97.42 เปอร์เซ็นต์ (Xu et al., 2015) กล้วยไม้สกุล *Holcoglossum* 82.70 เปอร์เซ็นต์ (Xiang et al., 2011) นอกจากนี้พืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศบราซิล สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ได้สูงถึง 86 เปอร์เซ็นต์ (Bolson et al., 2015) จะเห็นได้ว่าบางตัวอย่างไม่สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ ในการศึกษาพืชบางชนิดการใช้ universal primer ส่งผลต่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Bolson et al., 2015; Du et al., 2011; Kelly et al., 2010; Roy et al., 2010; Sass et al., 2007; Theodoridis et al., 2012; Yan et al., 2011) ดังนั้นเพิ่มเพิ่มประสิทธิภาพของยีน *matK* อาจใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับพืชที่ศึกษาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Guo et al., 2016; Yu et al., 2011)

ยีน *rbcL* เป็นยีนที่มีบริเวณอนุรักษ์จำนวนมาก มีอัตราการแทนที่ของเบสต่ำ จึงทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกันในพืชหลายชนิด ซึ่งเมื่อศึกษาในกลุ่มของพืชหลายชนิดทำให้มีอัตราการประสบความสำเร็จในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สูงมาก เช่น การศึกษาพืชที่เจริญในป่าฝน ยีน *rbcL* ประสบความสำเร็จในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์สูงที่สุด (82.80 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้การศึกษาพืชเขตร้อนในประเทศอินเดีย พบว่าสามารถหาลำดับนิวคลโอไทด์ได้สูงถึง 90.8 เปอร์เซ็นต์ (Tripathi et al., 2013) ในพืชสกุล *Berberis* 97 เปอร์เซ็นต์ (Roy et al., 2010)

โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ในกล้วยไม้สกุลหวายสามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เพียง 49.68% เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์มีเบส T ซ้ำ 100 เบส (Xu et al., 2015) ซึ่งเป็นตำแหน่งของ microsatellite ทำให้ไม่สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ ซึ่งในการศึกษาบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ในพืชชนิดอื่น มีอัตราการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สูง แต่ยังมีบางชนิดหรือบางตัวอย่างที่ไม่สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ เช่น การศึกษาต้นไม้ที่เจริญเติบโตในอเมซอนที่สามารถหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เพียง 89.90 เปอร์เซ็นต์ (Gonzalez et al., 2009)

นอกจากนี้ยังพบว่า microsatellite มักเกิดบริเวณระหว่างยีน รวมไปถึงบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ด้วย จากการศึกษาบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ในเฟิร์นพบว่ามีการซ้ำของเบส 1 ชนิด ส่งผลให้ลดประสิทธิภาพในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (de Groot et al., 2011; Erkens et al., 2009) การใช้เอนไซม์ proofreading จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีตำแหน่งการเรียงของเบสซ้ำ (Devey et al., 2009; Aron J. Fazekas et al., 2008; Aron J. Fazekas et al., 2010)

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น 17 ชนิด 40 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. sieboldii* (KF673815.1) จากฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีการเพิ่มขึ้น 1 เบสจำนวน 1 ตำแหน่ง 3 เบส 1 ตำแหน่ง และพบการขาดหาย 3 เบส 1 ตำแหน่ง ซึ่งการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของเบสสามารถพบได้ในยีน *matK* ของกล้วยไม้หลายชนิด โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ *matK* ของ กล้วยไม้ *Corallorhiza* และ *Corallorhizinae* พบว่ามีการขาดหายไปของเบสบริเวณ 5’ ของ open leading frame โดยสกุล *Aplectrum* มีการขาดหายไป 299 เบส *Oreochis* และ *Corallorhiza* มีการขาดหายไป 84 เบส นอกจากนี้ยังพบว่า มีการเพิ่มขึ้นของเบส 3-7 เบสในบางสกุลอีกด้วย (Freudenstein and Senyo, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแทนที่ของเบสหลายตำแหน่ง ซึ่งส่งผลให้เป็นยีนที่มีตำแหน่งที่เป็น variable site และ parsimony site สูง บางรายงานกล่าวว่า *matK* เป็น pseudogene มีอัตราการวิวัฒนาการที่สูงนิยมใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้หลายชนิด เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลก้านก่อ 30 ชนิด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *matK* มีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของเบสตำแหน่งที่ 249-254 และมีการแทนที่ของเบสทั้งหมด 66 ตำแหน่ง สามารถใช้ในการจำแนกสกุลก้านก่อได้ 21 ชนิด (70 เปอร์เซ็นต์) (Jiemjuejun et al., 2561) นอกจากนี้ยังมีการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย 13 ชนิด พบว่า ยีน *matK* พบการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไป 1 เบส 3 ตำแหน่ง และการแทนที่ของเบส 30 ตำแหน่ง ซึ่งบางตำแหน่งมีเบสที่จำเพาะกับกล้วยไม้บางชนิด (Thanananta et al., 2016) นอกจากนี้ การศึกษากล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน พบว่า ยีน *matK* มีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของดีเอ็นเอจำนวน 22 ตำแหน่ง และพบการแทนที่ของเบสจำนวนมากกระจายอยู่ในลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ตำแหน่งที่ 101 ถึง 960 (Thanananta et al., 2016)

เมื่อนำข้อมูลของลำดับนำคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยบริษัท *Macrogen* ประเทศเกาหลีใต้ มาจัดเรียง (alignment) โดยโปรแกรม GeneDoc พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ได้ มีทั้งหมด 33 ตัวอย่าง ในแต่ละตัวอย่างอยู่ในช่วง 530-724 คู่เบส แต่เมื่อทำการการวิเคราะห์จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาว 543 เบส โดยพบการการกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 2 แบบประกอบด้วยการแทนที่แบบทราสซิชัน และการแทนที่แบบทรานเวอร์ชัน เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ที่สมบูรณ์ของ *Oreorchis patens* ที่ได้จากฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวแรกของกล้วยไม้ในกลุ่มเอื้องน้ำต้นเริ่มต้นที่ตำแหน่ง

122 กรดอะมิโนตัวแรกของลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับตัวที่ 42 และแปลรหัสได้ 180 กรดอะมิโน ซึ่งพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. vestits* MR3 ตัวที่ 583 เปลี่ยนจากเบส G เป็น A ทำให้กรดอะมิโนตัวที่ 195 เปลี่ยนจาก อะลานีน ที่ไม่มีขั้วและไม่มีประจุเป็นทรีโอนีนที่มีขั้วและไม่มีประจุ ตัวที่ 602 เปลี่ยนจากเบส G เป็น C ทำให้กรดอะมิโนตัวที่ 201 เปลี่ยนจาก อาร์จีนีนที่มีประจุบวกเป็นโพรลีนที่ไม่มีขั้วและไม่มีประจุ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. densiflora* PH1 ตัวที่ 624 เปลี่ยนจากเบส G เป็น C ทำให้กรดอะมิโนตัวที่ 208 เปลี่ยนจาก ไลซีนที่มีประจุบวก เป็นแอสพาราจีนที่มีขั้วแต่ไม่มีประจุ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. clavata* PR1 ตัวที่ 638 เปลี่ยนจากเบส T เป็น G ทำให้กรดอะมิโนตัวที่ 213 เปลี่ยนจาก วาลีน เป็นไกลซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนกลุ่มเดียวกันที่ไม่มีขั้วและไม่มีประจุ โดยการเปลี่ยนแปลงของเบสเป็นแบบ missense substitution ส่งผลให้กรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงแต่ไม่ส่งผลให้เกิด stop codon ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติต่างกันอาจจะไม่ได้อยู่ตำแหน่งที่อยู่ใน active site ของเอนไซม์ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนไม่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในกล้วยไม้หลายชนิด การศึกษาจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก่อ 30 ชนิด พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *rbcL* พบการแทนที่ของเบส 52 ตำแหน่ง สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลนี้ได้เพียง 10 ชนิด (Jiemjuejun et al., 2561) ซึ่งจากการศึกษากล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน 24 ชนิดพบว่า ยีน *rbcL* มีการแทนที่ของเบสเพียง 9 ตำแหน่ง (Thanananta et al., 2016)

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และ *trnL-trnF* พบว่าอัตราการเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายไปของดีเอ็นเอ และการแทนที่ของเบสที่สูงมาก เนื่องจากเป็นบริเวณระหว่างยีนซึ่งการกลายพันธุ์ดังกล่าวไม่ส่งผลต่อการทำงานของยีน โดยการศึกษาการจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *psbA-trnH* มีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของดีเอ็นเอตั้งแต่ 1-7 เบส โดยพบทั้งหมด 6 ตำแหน่ง (Thanananta et al., 2014)

5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น

กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นประกอบด้วย 3 สกุล ได้แก่ สกุลเอื้องน้ำต้น สกุลเอื้องกลีบเกลียว และสกุลเอื้องพร้าว ซึ่งมีลักษณะของลำต้น ใบ และดอกที่คล้ายคลึงกัน มีเขตการกระจายพันธุ์ส่วนใหญ่อยู่ในแถบเอเชีย โดยในประเทศไทยพบการกระจายพันธุ์ในหลายจังหวัด เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาทำให้ไม่สามารถจำแนกโดยใช้ลักษณะเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงทำการศึกษา

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ 4 บริเวณ ประกอบด้วย บริเวณที่เป็นยีน ได้แก่ *matK* และ *rbcL* และบริเวณระหว่างยีน ได้แก่ บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF*

ซึ่งจากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้บริเวณยีน *matK* สามารถแบ่งกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น 17 ชนิด 40 ตัวอย่าง ได้เป็น 5 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *C. masuca*, *C. triplicata* และ *P. flavus* และ *P. mishmensis* ใบประดับมีลักษณะรูปไข่ปลายใบแหลม กลีบดอกมีลักษณะยาวรี ปลายกลีบดอกและฐานกลีบดอกเรียว กลีบปากเชื่อมติดกับเส้าเกสร ปลายกลีบปากแยกออกเป็น 3 แฉก โคนกลีบปากมีส่วนของเดือยที่ยื่นออกมา กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *P. tankervilleae* และ *P. tankervilleae* var. *alba* สีด้านนอกและด้านในของกลีบเลี้ยงและกลีบดอกแตกต่างกัน โดยด้านนอกของกลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีสีขาว ด้านในของกลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีสีน้ำตาลแดง กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *C. cardioglossa*, *C. succedanea*, *C. rosea*, *C. rubens*, *C. rubens* var. *alba* และ *C. vestita* มีลักษณะลำลูกกล้วยที่เด่น ไม่มีใบห่อหุ้มลำลูกกล้วย ลำลูกกล้วยมีลักษณะเป็นรูปไข่หรือรูปรี ใบมีอายุสั้น ไม่มีใบในระยะออกดอก กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *C. lyroglossa*, *C. pulchra C. clavata* และ *C. densiflora* ใบประดับหลุดร่วงง่าย โดยในระหว่างออกดอกจะไม่ปรากฏใบประดับ ช่อดอกตั้ง ดอกมีขนาดเล็ก มีสีเหลืองหรือสีส้ม และกลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *Ce. longipes* และ *Ce. obcordata* กลีบปากไม้เชื่อมติดกับเส้าเกสร โคนกลีบปากไม่มีเดือยดอก (Kurzweil, 2011; Pedersen et al., 2014)

ในขณะที่การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbcL* สามารถแบ่งกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น 15 ชนิด 33 ตัวอย่าง ได้ออกเป็น 6 กลุ่ม ซึ่งแตกต่างจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ซึ่งยีน *rbcL* มีอัตราการแทนที่ของเบสต่ำกว่ายีน *matK* ทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่เป็นบริเวณอนุรักษ์ ซึ่งมีความแตกต่างในระดับสกุลหรือระดับชนิดต่ำมาก ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ Habenariinae จำนวน 10 สกุล โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *matK* และ *rbcL* ในคลอโรพลาสต์ พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *rbcL* มีขนาด 1,254 คู่เบสมีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยกว่ายีน *matK* โดยพบตำแหน่ง variable site เพียง 14 เปอร์เซ็นต์ เป็น parsimony informative site 8 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* มี variable site 34 เปอร์เซ็นต์ เป็น parsimony informative site 22 เปอร์เซ็นต์ (Jin et al., 2014)

ในขณะที่การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* สามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้นและสกุลเอื้องพร้าวออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *C. masuca*, *C. densiflora* และ *C. triplicata* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *C. clavata* และ *C. succedanea* และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *C. lyroglossa*, *P. flavus* และ *P. tankervilleae* var. *alba*

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* สามารถแบ่งกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นออกเป็น 8 กลุ่ม บางชนิดมีมากกว่า 1 ตัวอย่าง พบว่า *P. tankervilleae* RK1, *P. tankervilleae* PR1, *P. tankervilleae* MR1 และ *P. tankervilleae* var. *alba* CM1 แยกออกจากกัน รวมไปถึงกล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียว 2 ชนิด ที่แยกออกจากกัน แต่สามารถแยกกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้นออกจากกล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียวและเอื้องพร้าวได้

ซึ่งกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นพบการกระจายพันธุ์ในประเทศอื่นๆด้วย โดยในประเทศจีนได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (*matK*, *atpI-atpH* และ *trnL-trnF*) ร่วมกับนิวเคลียสดีเอ็นเอ (ITS) ของกล้วยไม้เอื้องน้ำต้นทั้งหมด 50 ชนิด ประกอบด้วยสกุลเอื้องน้ำต้น 41 ชนิด สกุลเอื้องกลีบเกลียว 3 ชนิด และสกุลเอื้องพร้าว 6 ชนิด สามารถแบ่งกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นออกเป็น 6 สกุลย่อย โดยกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้นแบ่งออกเป็น 3 สกุลย่อย คือ *Calanthe*, *Styloglossa* และ *Preptanthe* สกุลเอื้องพร้าวแบ่งออกเป็น 2 สกุลย่อย คือ *Paraphaius* และ *Phaius* และกล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบกลียว 1 สกุล ซึ่งการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นในประเทศไทยประกอบด้วยกล้วยไม้ทั้ง 6 สกุล คือ สกุลย่อย *Calanthe* ประกอบด้วย *C. triplicata* และ *C. herbacea* สกุลย่อย *Styloglossa* ประกอบด้วย *C. densiflora*, *C. clavata* และ *C. lyroglossa* สกุลย่อย *Preptanthe* ประกอบด้วย *C. cardioglossa* และ *C. rubens* สกุลย่อย *Paraphaius* ประกอบด้วย *P. flavus* สกุลย่อย *P. tankervilleae* และ *P. mishmensis* และสกุลย่อย *Cephalantheropsis* ประกอบด้วย *Ce. longipes* ซึ่งกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นในประเทศจีนบางชนิดไม่พบการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย ทำให้ในแต่ละสกุลย่อยมีตัวอย่างเพียง 1-3 ชนิด ซึ่งจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบริเวณคลอโรพลาสต์ 4 บริเวณของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นในประเทศไทย พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* สามารถแบ่งกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นได้คล้ายกับการแบ่งกลุ่มกล้วยไม้ในประเทศจีน โดย กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย สกุลย่อย *Calanthe Paraphaius* และ *Phaius* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย

Phaius กลุ่มที่ 3 เป็นสกุลย่อย *Preptanthe* กลุ่มที่ 4 เป็นสกุลย่อย *Styloglossa* และกลุ่มที่ 5 เป็นสกุลย่อย *Cephalantheropsis* (Zhai et al., 2014)

6. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ร่วมกับยีน *rbcL*

การหาลำดับในนิวคลีโอไทด์ในแต่ละบริเวณไม่ประสบความสำเร็จในบางตัวอย่าง ดังนั้นจึงเป็นข้อจำกัดในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ร่วมกัน โดยเฉพาะบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 12 ตัวอย่างในสกุลเอื้องน้ำต้นและสกุลเอื้องพร้าวเท่านั้น เมื่อนำมาวิเคราะห์ร่วมกับบริเวณอื่น ส่งผลให้ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์มีจำนวนน้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 3-4 บริเวณที่มีตัวอย่างในการวิเคราะห์เพียงบางชนิดเท่านั้น ดังนั้นเมื่อพิจารณาการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 2 บริเวณ การวิเคราะห์ยีน *matK* ร่วมกับยีน *rbcL* สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้นได้ได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นบริเวณที่แนะนำเป็นบริเวณมาตรฐานสำหรับดีเอ็นเอบาร์โค้ดในพืช (Hollingsworth et al., 2009) ซึ่งยีน *rbcL* เป็นบริเวณที่มีอัตราการแทนที่ต่ำกว่าบริเวณอื่น จึงมักใช้ยีน *rbcL* ร่วมกับบริเวณอื่นในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยยีน *matK* สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก่อได้ 21 ชนิด (70 เปอร์เซ็นต์) ส่วนยีน *rbcL* สามารถจำแนกได้เพียง 10 ชนิด (33.33 เปอร์เซ็นต์) เมื่อนำมาวิเคราะห์ร่วมกันสามารถจำแนกได้ 23 ชนิด (76.67 เปอร์เซ็นต์) (Jiemjuejun et al., 2561) นอกจากนี้ยีน *matK* สามารถแยกกล้วยไม้สกุลหวายได้ 10.48 เปอร์เซ็นต์ ยีน *rbcL* แยกได้ 5.56 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาวิเคราะห์ร่วมกับช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกเป็น 24 เปอร์เซ็นต์ (Xu et al., 2015) การจำแนกกล้วยไม้จำนวน 4 วงศ์ย่อย ได้แก่ Vanilloideae, Cypripedioideae, Orchidaceae และ Epidendroideae โดยใช้ยีน *matK* และยีน *rbcL* ร่วมกันช่วยเพิ่มปริสิทธิภาพในการจำแนกจาก 73.6 เปอร์เซ็นต์ (*matK*) และ 60.5 เปอร์เซ็นต์ (*rbcL*) เป็น 85.7 เปอร์เซ็นต์ (Kim et al., 2014)

บทที่ 5

บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

1.1 การสกัดดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอของใบกล้วยไม้ด้วยวิธีการสกัดที่ดัดแปลงมาจากวิธี CTAB ของ Doyle and Doyle (1987) นั้น สามารถสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นได้ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง และมีปริมาณดีเอ็นเอที่มากเพียงพอต่อการเพิ่มปริมาณและมีคุณภาพดี แต่มีบางตัวอย่างเกิดการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

1.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *matK* และ *rbcL* ได้ทุกตัวอย่างในขณะที่บริเวณระหว่างยีนสามารถเพิ่มปริมาณได้บางตัวอย่างซึ่งอาจเกิดจากความแปรผันทางพันธุกรรม ซึ่งอาจออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่จำเพาะต่อกล้วยไม้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

1.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งของบริเวณในคลอโรพลาสต์

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 บริเวณในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ยีน *matK* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในชนิดที่ต่ำและมีบางตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับกล้วยไม้บางชนิด ได้แก่ *C. clavata*, *C. vestits*, *C. masuca*, *C. pulchra*, *P. flavus* และ *P. tankervilleae* และบางตำแหน่งมีความจำเพาะกับกล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียว

1.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้ลำดับนิวคลโอไทด์ในบริเวณยีน *mat*K พบว่าสามาถแยกกลุ่มกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นได้ออกเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งสามารถแยกกล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียวออกจากสกุลเอื้องน้ำต้นและเอื้องพร้าวได้ ในขณะที่สกุลเอื้องน้ำต้นและเอื้องพร้าวไม่สามารถแยกออกจากกันได้ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbcL* มีบริเวณอนุรักษ์สูงมากยังไม่สามารถแยกทั้ง 3 สกุลได้อย่างชัดเจน และบริเวณระหว่างยีนสามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้เอื้องน้ำต้นได้บางชนิด

ข้อเสนอแนะ

1. บริเวณที่ศึกษาเป็นบริเวณในคลอโรพลาสต์ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcript spacer ซึ่งเป็นบริเวณที่พบในนิวเคลียสมาช่วยในการจัดจำแนกกล้วยไม้กลุ่มนี้ได้ดีขึ้น

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และ *trnL-trnF* ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในบางตัวอย่าง และเกิดแถบ non-specific ควรออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับกล้วยไม้ในกลุ่มนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในปฏิกิริยาพีซีอาร์

บรรณานุกรม

Aljanabi, S. M., Forget, L., & Dookun, A. (1999). An Improved and Rapid Protocol for the Isolation of Polysaccharide- and Polyphenol-Free Sugarcane DNA. *Plant Molecular Biology Reporter,* 17(3), 281-281. doi: 10.1023/A:1007692929505

Amani, A., Kazemi, R., Abbasi, A. R., & Salmanian, A. H. (2011). A simple and rapid leaf genomic DNA extraction method for polymerase chain reaction anaysis. *Journal of Biotechnology,* 9(1), 69-71.

Barthet, M. M. (2006). Expression and function of the chloroplast-encoded gene *matK*. Ph.D. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia, USA.

Bartista, J. A. N., Borges, K. S., Faria, M. W. F. D., Proite, K., Ramalho, A. J., Salazar, G. A., & Berg, C. V. D. (2013). Molecular phylogenetics of the species-rich genus *Habenaria* (Orchidaceae) in the New World based on nuclear and plastid DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution,* 67, 95-109.

Bolson, M., Smidt, E. d. C., Brotto, M. L., & Silva-Pereira, V. (2015). ITS and *trnH-psbA* as Efficient DNA Barcodes to Identify Threatened Commercial Woody Angiosperms from Southern Brazilian Atlantic Rainforests. *PLOS ONE,* 10(12), e0143049. doi: 10.1371/journal.pone.0143049

Chase, M. W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J. M., Kesanakurthi, R. P., Haider, N., & Savolainen, V. (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B Biological Sciences,* 360, 1889–1895.

Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y., & Leon, C. (2010). Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLOS ONE,* 5(1), e8613. doi: 10.1371/journal.pone.0008613

de Groot, G. A., During, H. J., Maas, J. W., Schneider, H., Vogel, J. C., & Erkens, R. H. J. (2011). Use of *rbcL* and *trnL-F* as a Two-Locus DNA Barcode for Identification of NW-European Ferns: An Ecological Perspective. *PLOS ONE,* 6(1), e16371. doi: 10.1371/journal.pone.0016371

Deshmukh, V. P., Thakare, P. V., Chaudhari, U. S., & Gawande, P. A. (2007). A simple method for isolation of genomic DNA from fresh and dry leaves of *Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight and Argot. *Electron Journal Biotechnology,* 10, 468-472.

Devey, D. S., Chase, M. W., & Clarkson, J. J. (2009). A Stuttering Start to Plant DNA Barcoding: Microsatellites Present a Previously Overlooked Problem in Non-Coding Plastid Regions. *Taxon,* 58(1), 7-15.

Doyle, J., & Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin,* 19, 11-15.

Du, Z.-Y., Qimike, A., Yang, C.-F., Chen, J.-M., & Wang, Q.-F. (2011). Testing four barcoding markers for species identification of Potamogetonaceae. *Journal of Systematics and Evolution,* 49(3), 246-251. doi: 10.1111/j.1759-6831.2011.00131.x

Edwards, D., Horn, A., Taylor, D., Savolainen, V., & Hawkins, J. A. (2008). DNA barcoding of a large genus, Aspalathus L. (Fabaceae). *Taxon,* 57(4), 1317-1314E. doi: 10.1002/tax.574021

Erkens, R. H. J., Maas, J. W., & Couvreur, T. L. P. (2009). From Africa via Europe to South America: migrational route of a species-rich genus of Neotropical lowland rain forest trees (Guatteria, Annonaceae). *Journal of Biogeography,* 36(12), 2338-2352. doi: 10.1111/j.1365-2699.2009.02162.x

Fan, J., Qin, H.-N., Li, D.-Z., & Jin, X.-H. (2009). Molecular phylogeny and biogeography of *Holcoglossum* (Orchidaceae: Aeridinae) based on nuclear ITS, and chloroplast *trnL-F* and *matK*. *Taxon,* 58(3), 849-861. doi: 10.1002/tax.583013

Fang, G., Hammar, S., & Grumet, R. (1992). A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *BioTechniques,* 13(1), 52-56.

Fay, M. F., Swensen, S. M., & Chase, M. W. (1997). Taxonomic Affinities of *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). *Kew Bulletin,* 52(1), 111-120. doi: 10.2307/4117844

Fazekas, A. J., Burgess, K. S., Kesanakurti, P. R., Graham, S. W., Newmaster, S. G., Husband, B. C., Percy, D. M., Hajibabaei, M., & Barrett, S. C. H. (2008). Multiple Multilocus DNA Barcodes from the Plastid Genome Discriminate Plant Species Equally Well. *PLOS ONE,* 3(7), e2802. doi: 10.1371/journal.pone.0002802

Fazekas, A. J., Kesanakurti, P. R., Burgess, K. S., Percy, D. M., Graham, S. W., Barrett, S. C., Newmaster, S. G., Hajibabaei, M., & Husband, B. C. (2009). Are plant species

inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markers? *Molecular ecology resources,* 9, 130-139.

Fazekas, A. J., Steeves, R., & Newmaster, S. G. (2010). Improving sequencing quality from PCR products containing long mononucleotide repeats. *BioTechniques,* 48(4), 277-285. doi: 10.2144/000113369

Freudenstein, J. V., & Senyo, D. M. (2008). Relationships and evolution of *matK* in a group of leafless orchids (Corallorhiza and Corallorhizinae; Orchidaceae: Epidendroideae). *American Journal of Botany,* 95(4), 498-505. doi: 10.3732/ajb.95.4.498

Gonzalez, M. A., Baraloto, C., Engel, J., Mori, S. A., Pétronelli, P., Riéra, B., Roger, A., Thébaud, C., & Chave, J. (2009). Identification of Amazonian Trees with DNA Barcodes. *PLOS ONE,* 4(10), e7483. doi: 10.1371/journal.pone.0007483

Guo, Y.-Y., Huang, L.-Q., Liu, Z.-J., & Wang, X.-Q. (2016). Promise and Challenge of DNA Barcoding in Venus Slipper (*Paphiopedilum*). *PLOS ONE,* 11(1), e0146880. doi: 10.1371/journal.pone.0146880

Hebert, P., Cywinska, A., Ball, S. L., & Waard, J. R. (2003). Biological identification through DNA barcodes. *Proceeding of the Royal Society of London, Series B: Biological Science,* 270, 313-321.

Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M. W., Cowan, R. S., Erickson, D. L., Fazekas, A. J., Graham, S. W., James, K. E., Kim, K.-J., Kress, W. J., Schneider, H., van AlphenStahl, J., Barrett, S. C. H., van den Berg, C., Bogarin, D., Burgess, K. S., Cameron, K. M., Carine, M., Chacón, J., Clark, A., Clarkson, J. J., Conrad, F., Devey, D. S., Ford, C. S., Hedderson, T. A. J., Hollingsworth, M. L., Husband, B. C., Kelly, L. J., Kesanakurti, P. R., Kim, J. S., Kim, Y.-D., Lahaye, R., Lee, H.-L., Long, D. G., Madriñán, S., Maurin, O., Meusnier, I., Newmaster, S. G., Park, C.-W., Percy, D. M., Petersen, G., Richardson, J. E., Salazar, G. A., Savolainen, V., Seberg, O., Wilkinson, M. J., Yi, D.-K., & Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* 106(31), 12794. doi: 10.1073/pnas.0905845106

Hosseini, S., Dadkhah, K., & Go, R. (2016). Molecular systematics of genus *Bulbophyllum* (Orchidaceae) in Peninsular Malaysia based on combined nuclear and plastid DNA sequences. *Biochemical Systematics and Ecology,* 65, 40-48.

Jiemjuejun, J., Thanananta, N., & Thanananta, T. (2561). Genetic relationship assessment and identification of orchids in the genus *Eria* using SCoT markers. *Thai Journal of Science and Technology,* 6(2), 152-160.

Jin, W.-T., Jin, X.-H., Schuiteman, A., Li, D.-Z., Xiang, X.-G., Huang, W.-C., Li, J.-W., & Huang, L.-Q. (2014). Molecular systematics of subtribe Orchidinae and Asian taxa of Habenariinae (Orchideae, Orchidaceae) based on plastid *matK*, *rbcL* and nuclear ITS. *Molecular Phylogenetics and Evolution,* 77, 41-53. doi: https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.04.004

Katterman, F. R. H., & Shattuck, V. I. (1983). An Effective Method of DNA Isolation from the Mature Leaves of *Gossypium* Species That Contain Large Amounts of Phenolic Terpenoids and Tannins. *Preparative Biochemistry,* 13(4), 347-359. doi: 10.1080/00327488308068177

Kelly, L. J., Ameka, G. K., & Chase, M. W. (2010). DNA barcoding of African Podostemaceae (river-weeds): A test of proposed barcode regions. *Taxon,* 59(1), 251-260. doi: 10.1002/tax.591023

Kim, H. M., Oh, S.-H., Bhandari, G. S., Kim, C.-S., & Park, C.-W. (2014). DNA barcoding of Orchidaceae in Korea. *Molecular ecology resources,* 14(3), 499-507. doi: 10.1111/1755-0998.12207

Kocyan, A., Vogel, E. F. d., Conti, E., & Gravendeel, B. (2008). Molecular phylogeny of *Aerides* (Orchidaceae) based on one nuclear and two plastid markers: A step forward in understanding the evolution of the Aeridinae. *Molecular Phylogenetics and Evolution,* 48(2), 422-443. doi: https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.02.017

Kress, W. J., García-Robledo, C., Uriarte, M., & Erickson, D. L. (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology & Evolution,* 30(1), 25-35.

Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 102(23), 8369. doi: 10.1073/pnas.0503123102

Kurzweil, H. (2011). A precursory study of the Calanthe group (Orchidaceae) in Thailand. *Adansonia,* 32(1), 57-107.

Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T. G., & Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 105(8), 2923-2928. doi: 10.1073/pnas.0709936105

Maneenet, T., Khumphai, P., Thanananta, N., & Thanananta, T. (2018). Assessment of genetic relationship and identification of *Dendrobium* section Callista using nucleotide sequence of *rpoC*1 and *matK* genes. *Thai Journal of Science and Technology,* 7(1), 81-88.

Meesangiem, T., Thanananta, T., & Thanananta, N. (2017). Genetic relationship assessment and identification of Mottled-leaf *Paphiopedilum* using nucleotide sequence of *rpoC*1 gene and *trnH-psbA* intergenic spacer region. *Thai Journal of Science and Technology,* 6(4), 347-357.

Moreira, P. A., & Oliveira, D. A. (2011). Leaf age affects the quality of DNA ectracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. *Genetics and Molecular research: GMR,* 10(1), 353-358.

Nicholas, K. B., Nicholas, H. B., & Deerfield II, D. W. (1997). GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNET news,* 4, 1-4.

Parveen, I., Singh, H. K., Raghuvanshi, S., Pradhan, U. C., & Babbar, S. B. (2012). DNA barcoding of endangered Indian *Paphiopedilum* species. *Molecular ecology resources,* 12(1), 82-90. doi: 10.1111/j.1755-0998.2011.03071.x

Paterson, A. H., Brubaker, C. L., & Wendel, J. F. (1993). A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Molecular Biology Reporter,* 11(2), 122-127. doi: 10.1007/BF02670470

Pedersen, H., Kurzweil, H., Suddee, S., Vogel, E. F., Cribb, P., Chantanaorrapimt, S., Watthana, S., Gale, S., Seelanan, T., & Suwanphakdee, C. (2014). Flora of Thailand. Volume 12, Part 12: Orchidaceae 12 (Epidendroideae P.P.: Neottieae, Tropideae, Nervilieae.

Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter,* 15(1), 8-15. doi: 10.1007/BF02772108

Pridgeon, A. M., Cribb, P. J., Chase, M. W., & Rasmussen, F. N. (1999). Genera Orchidacearum 1. Oxford University Press, Oxford.

Roy, S., Tyagi, A., Shukla, V., Kumar, A., Singh, U. M., Chaudhary, L. B., Datt, B., Bag, S. K., Singh, P. K., Nair, N. K., Husain, T., & Tuli, R. (2010). Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: A case study with indian *Berberis* species. *PLOS ONE,* 5(10), e13674. doi: 10.1371/journal.pone.0013674

Sahu, S. K., Thangaraj, M., & Kathiresan, K. (2012). DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *Molecular Biology*, 1-6.

Sang, T., Crawford, D. J., & Stuessy, T. F. (1997). Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of Paeonia (Paeoniaceae). *American Journal of Botany,* 84(8), 1120-1136. doi: 10.2307/2446155

Sass, C., Little, D. P., Stevenson, D. W., & Specht, C. D. (2007). DNA Barcoding in the Cycadales: Testing the Potential of Proposed Barcoding Markers for Species Identification of Cycads. *PLOS ONE,* 2(11), e1154. doi: 10.1371/journal.pone.0001154

Sharma, A. D., Gill, P. K., & Singh, P. (2002). DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Molecular Biology Reporter,* 20(4), 415-415. doi: 10.1007/BF02772129

Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (1998). Molecular Systematics of Plant ll: Choosing an approach and appropriate gene for phylogenetic analysis. Springer, Bostan.

Srikulnath, K., Sawasdichai, S., Jantapanon, T., Pongtongkam, P., & Peyachoknagul, S. (2015). Phylogenetic relationship of *Dendrobium* species in Thailand inferred from chloroplast *matK* gene and nuclear rDNA ITS region. *The Horticulture Journal,* 84(3), 243-252. doi: 10.2503/hortj.MI-028

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., & Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology,* 17(5), 1105-1109. doi: 10.1007/BF00037152

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution,* 28(10), 2731-2739. doi: 10.1093/molbev/msr121

Tanee, T., Chadmuk, P., Sudmoon, R., Chaveerach, A., & Noikotr, K. (2012). Genetic analysis for identification, genomic template stability in hybrids and barcodes of the *Vanda* species (Orchidaceae) of Thailand. *African Journal of Biotechnology,* 11(55), 11772-11781.

Thanananta, N., Hongtongdee, P., & Thanananta, T. (2016). Genetic relationship assessment and identification of *Coelogyne* using nucleotide sequences of *matK* and *rbcL* gene. *Thai Journal of Science and Technology,* 5(2), 169-180.

Thanananta, N., Tansa-nga, W., & Thanananta, T. (2014). Identification and genetic relationship analysis of *Aerides* using nucleotiide sequence specific sites. *Thai Journal of Science and Technology,* 22(5), 664-530.

Thanananta, N., Thomsopa, T., & Thanananta, T. (2015). Identification and genetic relationship analysis of *Dendrobium*, Ueang Sai Group, using DNA sequences of *matK* and *rpoC*1 genes. *Thai Journal of Science and Technology,* 23(1), 1-10.

Theodoridis, S., Stefanaki, A., Tezcan, M., Aki, C., Kokkini, S., & Vlachonasios, K. E. (2012). DNA barcoding in native plants of the Labiatae (Lamiaceae) family from Chios Island (Greece) and the adjacent Çeşme-Karaburun Peninsula (Turkey). *Molecular ecology resources,* 12(4), 620-633. doi: 10.1111/j.1755-0998.2012.03129.x

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acids research,* 25(24), 4876-4882. doi: 10.1093/nar/25.24.4876

Tripathi, A. M., Tyagi, A., Kumar, A., Singh, A., Singh, S., Chaudhary, L. B., & Roy, S. (2013). The Internal Transcribed Spacer (ITS) Region and *trnH-psbA* Are Suitable Candidate Loci for DNA Barcoding of Tropical Tree Species of India. *PLOS ONE,* 8(2), e57934. doi: 10.1371/journal.pone.0057934

Weishing, K., Nybom, H., Wolff, K., & Meyer, W. (1995). DNA fingerprinting in plants and fungi: DNA isolation and purification. CRC Press, United states, 44-59.

Xiang, X.-g., Hu, H., Wang, W., & Jin, X.-H. (2011). DNA barcoding of the recently evolved genus *Holcoglossum* (Orchidaceae: Aeridinae): a test of DNA barcode candidates. *Molecular ecology resources,* 11 (6), 1012-1021.

Xu, S., Li, D., Li, J., Xiang, X., Jin, W., Huang, W., Jin, X., & Huang, L. (2015). Evaluation of the DNA Barcodes in *Dendrobium* (Orchidaceae) from Mainland Asia. *PLOS ONE,* 10(1), e0115168. doi: 10.1371/journal.pone.0115168

Yan, H.-F., Hao, G., Hu, C.-M., & Ge, X.-J. (2011). DNA barcoding in closely related species: A case study of Primula L. sect. Proliferae Pax (Primulaceae) in China. *Journal of Systematics and Evolution,* 49(3), 225-236. doi: 10.1111/j.1759-6831.2011.00115.x

Yu, J., Xue, J.-H., & Zhou, S.-L. (2011). New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution,* 49(3), 176-181. doi: 10.1111/j.1759-6831.2011.00134.x

Zhai, J.-W., Zhang, G.-Q., Li, L., Wang, M., Chen, L.-J., Chung, S.-W., Rodríguez, F. J., Francisco-Ortega, J., Lan, S.-R., Xing, F.-W., & Liu, Z.-J. (2014). A new phylogenetic analysis sheds new light on the relationships in the Calanthe alliance (Orchidaceae) in China. *Molecular Phylogenetics and Evolution,* 77, 216-222. doi: https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.04.005

กานดา พรหมณี. (2560). การศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดของพืชสกุลมะเขือ (*Solanum* L.) ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.

คำรพ รัตนสุต. (2561). พันธุศาสตร์โมเลกุลพื้นฐานจำเป็น. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร. พิษณุโลก. 207 หน้า.

ปิยภรณ์ วงษ์อักษร. (2558). การประยุกต์ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุพืชในวงศ์เหงือกปลาหมอ (Acanthaceae) ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.

ระพี สาคริก. (2530). กล้วยไม้. สำนักพิพ์ช่อนนทรี. กรุงเทพ. 140 หน้า.

เศรษฐมันตร์ กาญจนกุล. (2552). กล้วยไม้ไทย. สำนักพิพ์เศรษฐศิลป์. กรุงเทพฯ. 208 หน้า.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (2551). กล้วยไม้ไทย 1. สำนักพิพ์ หจก. วนิดาการพิมพ์. เชียงใหม่. 310 หน้า.

อบฉันท์ ไทยทอง. (2544). กล้วยไม้เมืองไทย. บ้านและสวน. กรุงเทพฯ. 461 หน้า.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

ตาราง ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

ชื่อวิทยาศาสตร์	260	280	260/280	Concentration (ng/µl)
C. cardioglossa MR3	0.730	0.353	2.068	730
C. cardioglossa MR7	0.836	0.403	2.074	836
C. densiflora PH1	0.438	0.214	2.046	438
C. herbacea PH1	1.044	0.661	1.579	1,044
C. masuca MR1	0.911	0.480	1.898	911
C. pulchra MR1	0.559	0.283	1.975	559
C. rosea MR3	0.004	0.003	1.333	4
C. rosea MR4	0.319	0.187	1.705	319
C. rosea MR7	0.331	0.190	1.742	331
C. rubens MR3	0.662	0.368	1.799	662
C. succedanea MR1	0.456	0.382	1.194	456
C. triplicata MR1	0.540	0.319	1.693	540
C. vestita MR3	0.278	0.182	1.527	278
C. vestita MR4	0.392	0.231	1.697	392
Ce. longipes RK1	0.433	0.247	1.753	433
Ce. longipes PH1	0.440	0.257	1.712	440
Ce. longipes PH2	0.392	0.228	1.719	392
Ce. obcordata RK1	0.538	0.316	1.702	538
P. flavus RK2	0.174	0.100	1.740	174
P. flavus RK3	0.130	0.074	1.757	130
P. indochinensis RK1	0.111	0.078	1.423	111
P. mishmensis RK4	0.160	0.103	1.747	160

ชื่อวิทยาศาสตร์	260	280	260/280	Concentration (ng/µl)
P. mishmensis RK5	0.222	0.139	1.597	222
P. mishmensis RK7	0.186	0.128	1.453	186
P. tankervilleae MR1	0.252	0.118	2.135	252

ภาคผนวก ข การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตาราง การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณในคลอโรพลาสต์ในกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น (M คือ ยีน *matK*, R คือ ยีน *rbcL*, PT คือ บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และ LF คือ บริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF*)

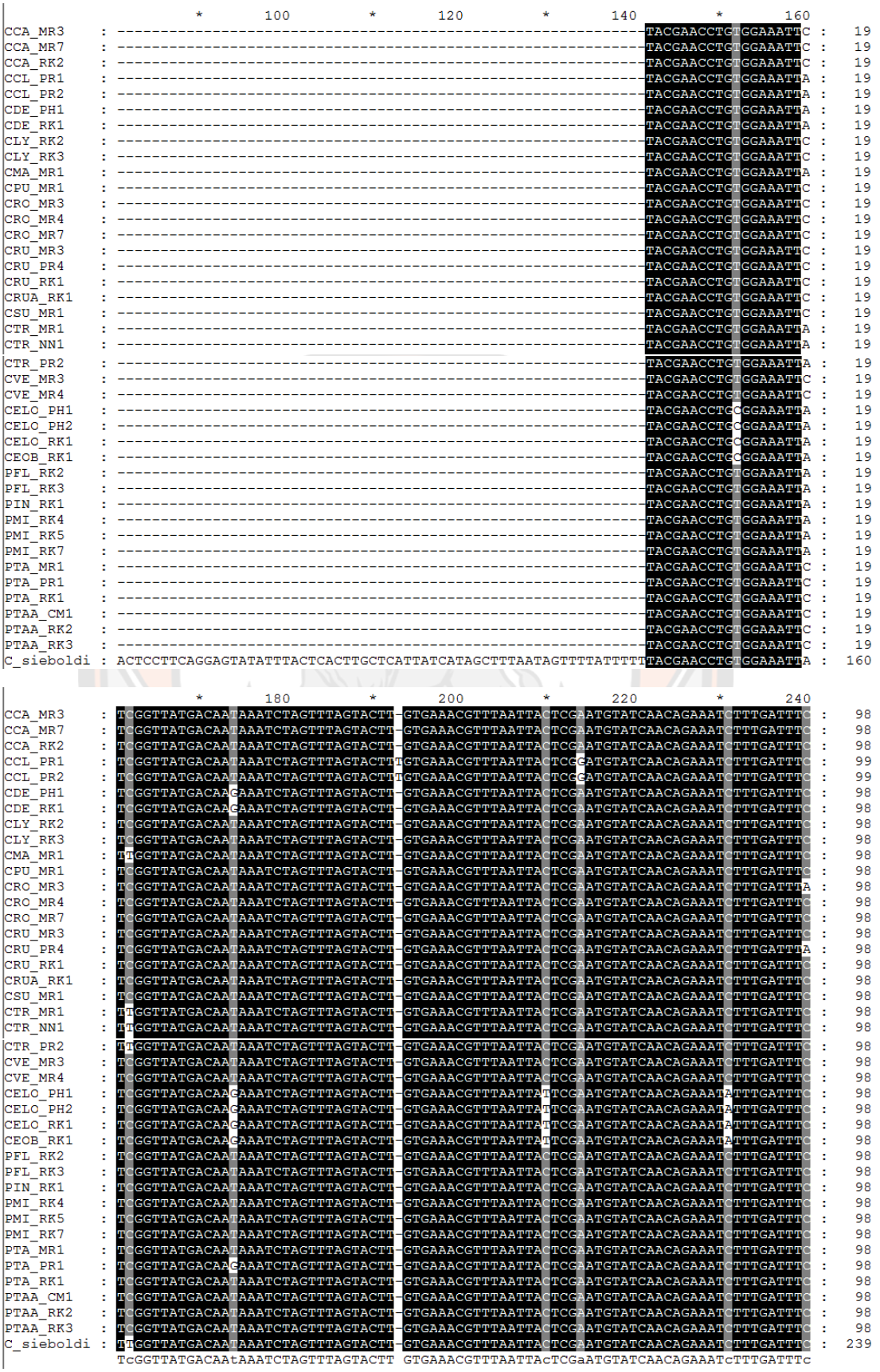
ชื่อวิทยาศาสตร์	Polymerase chain reaction				DNA sequencing			
	M	R	PT	LF	M	R	PT	LF
C. cardioglossa MR3	√	√		√	√	√		
C. cardioglossa MR7	√	√		√	√			
C. cardioglossa RK2	√	√			√	√		
C. clavata PR1	√	√	√	√	√	√	√	√
C. clavata PR2	√	√	√	√	√	√		
C. densiflora RK1	√	√	√	√	√	√		
C. densiflora PH1	√	√	√	√	√	√	√	
C. herbacea PH1	√	√	√	√		√		√
C. lyroglossa RK1	√	√	√	√			√	√
C. lyroglossa RK2	√	√	√	√	√		√	√
C. lyroglossa RK3	√	√	√	√	√		√	√
C. masuca MR1	√	√	√	√	√			√
C. masuca RK1	√	√	√	√			√	
C. masuca RK4	√	√	√	√			√	√
C. pulchra MR1	√	√		√	√	√		√
C. rosea MR3	√	√	√	√	√			
C. rosea MR4	√	√	√		√			
C. rosea MR7	√	√	√	√	√			
C. rubens RK1	√	√	√	√	√	√		
C. rubens MR3	√	√	√	√	√	√		

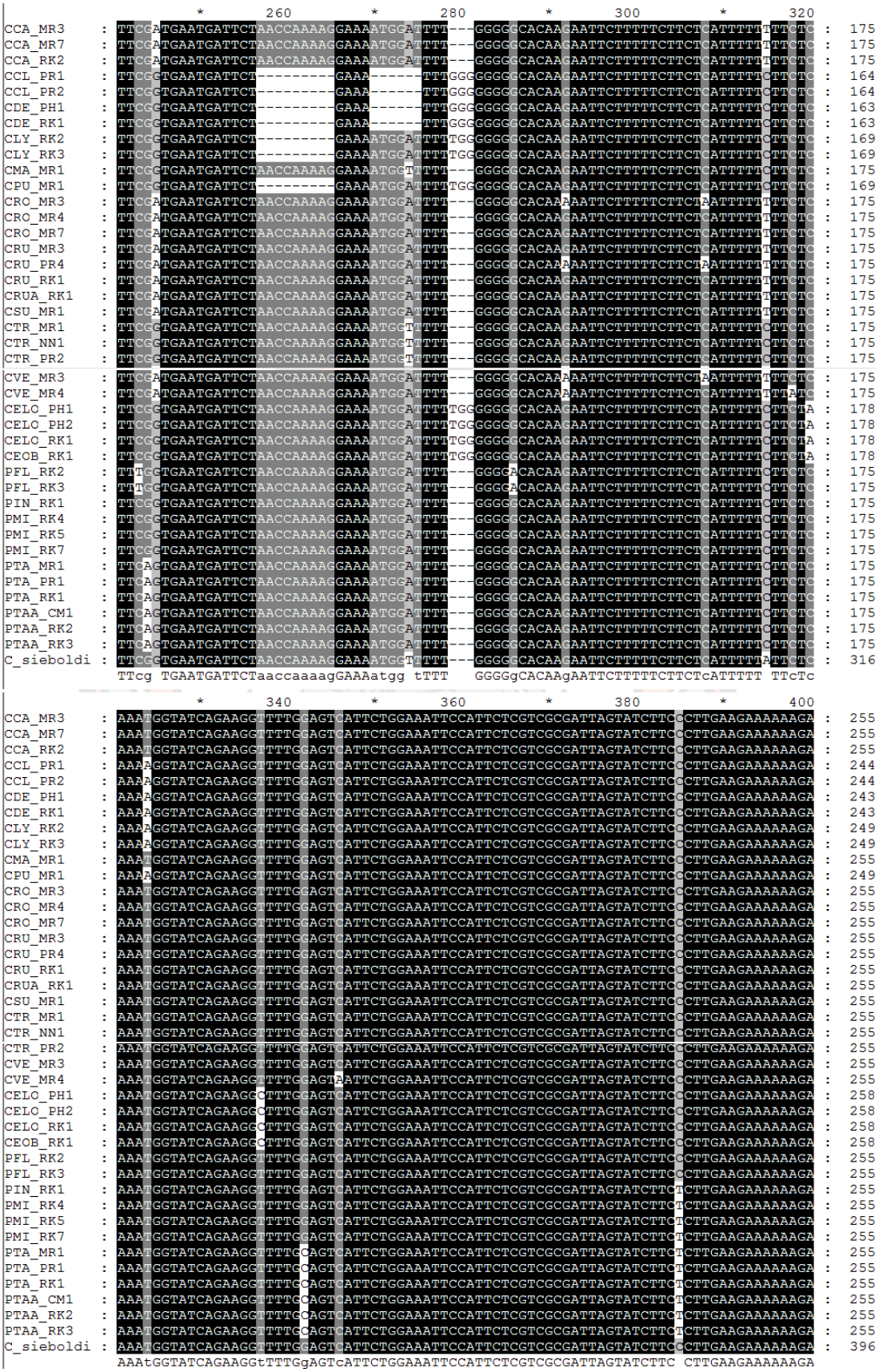
ชื่อวิทยาศาสตร์	Polymerase chain reaction				DNA sequencing			
	M	R	PT	LF	M	R	PT	LF
C. rubens PR4	√	√	√	√	√	√		
C. rubens alba RK1	√	√	√	√	√	√		
C. succedanea MR1	√	√	√	√	√	√	√	√
C. triplicata MR1	√	√	√	√	√	√	√	
C. triplicata RK1	√	√	√	√		√	√	√
C. triplicata PR2	√	√	√	√	√	√		√
C. triplicata NN1	√	√	√	√	√	√		
C. vestita MR3	√	√		√	√	√		
C. vestita MR4	√	√		√	√	√		
Ce. longipes RK1	√	√	√	√	√	√		√
Ce. longipes PH1	√	√	√		√	√		
Ce. longipes PH2	√	√	√	√	√	√		
Ce. obcordata RK1	√	√	√	√	√	√		√
P. flavus RK2	√	√	√	√	√	√	√	√
P. flavus RK3	√	√	√		√	√		
P. indochinensis RK1	√	√		√	√	√		
P. mishmensis RK4	√	√	√	√	√			√
P. mishmensis RK5	√	√	√	√	√	√		√
P. mishmensis RK7	√	√	√		√	√		
P. tankervilleae MR1	√	√		√	√	√		√
P. tankervilleae RK1	√	√		√	√	√		√
P. tankervilleae PR1	√	√		√	√			√
P. tankervilleae alba RK2	√	√	√		√	√	√	
P. tankervilleae alba RK3	√	√	√		√	√		

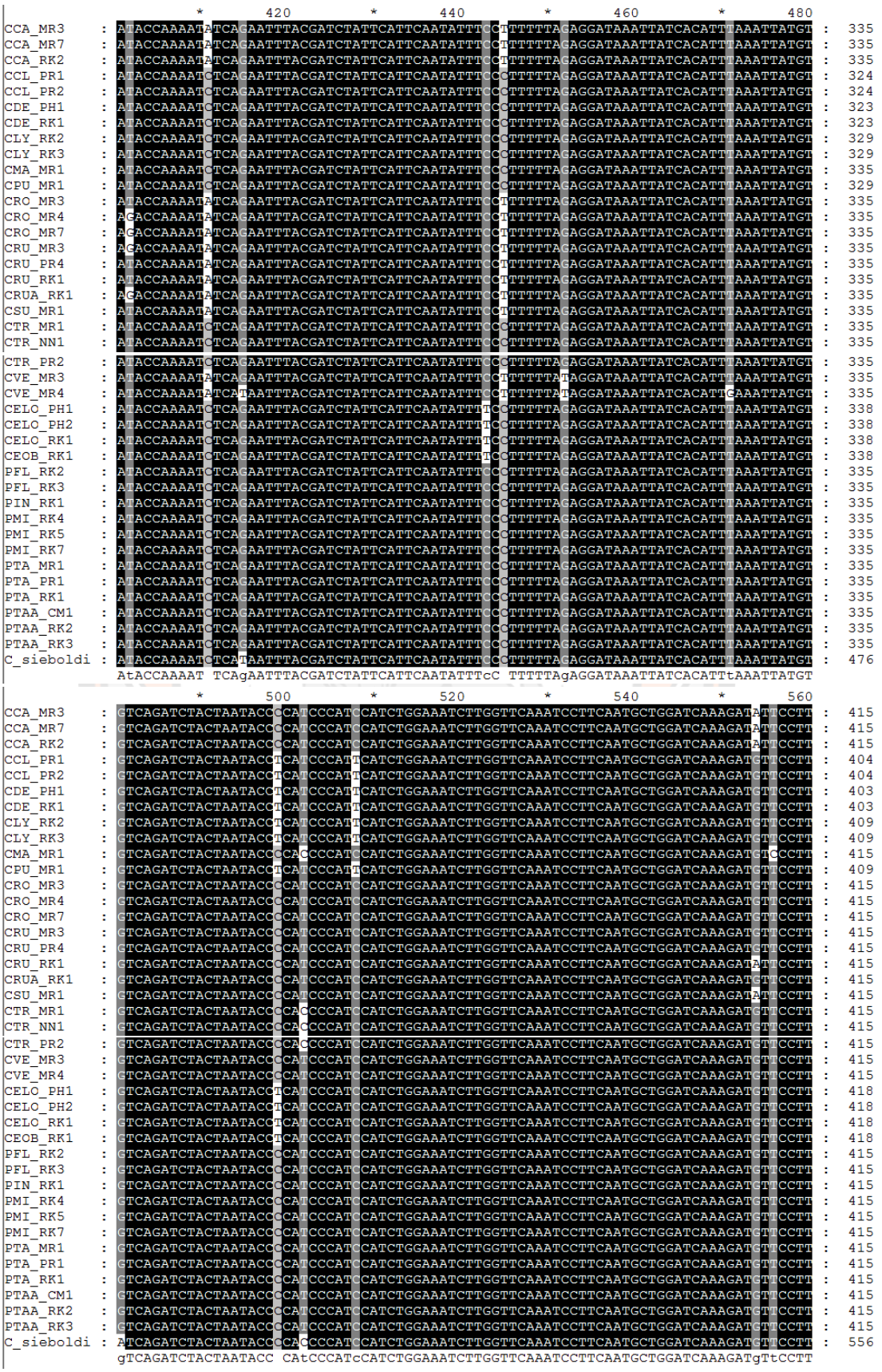
ชื่อวิทยาศาสตร์	Polymerase chain reaction				DNA sequencing			
	M	R	PT	LF	M	R	PT	LF
P. tankervilleae alba CM1	√	√	√	√	√	√		√

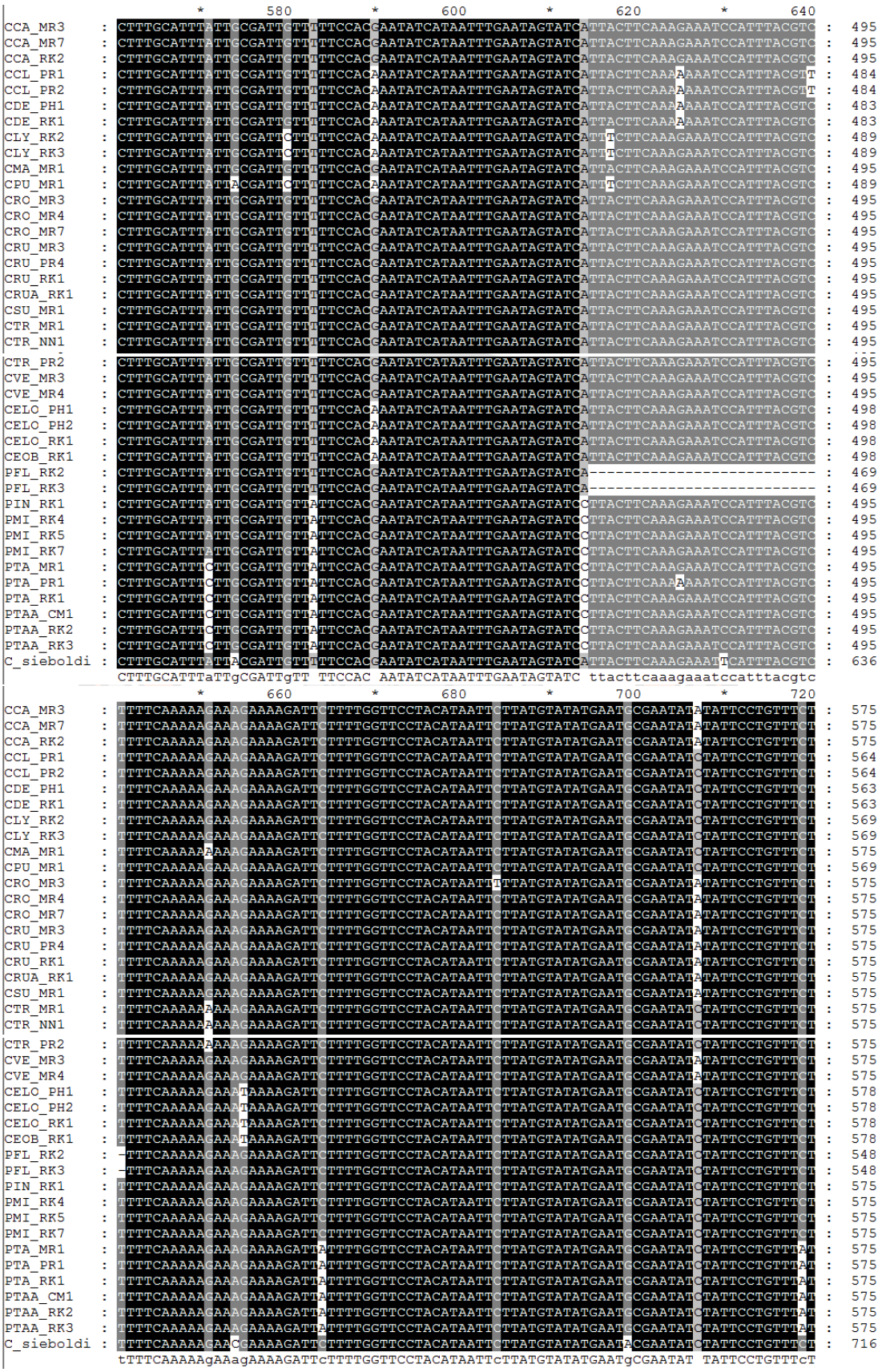
ภาคผนวก ค ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK*

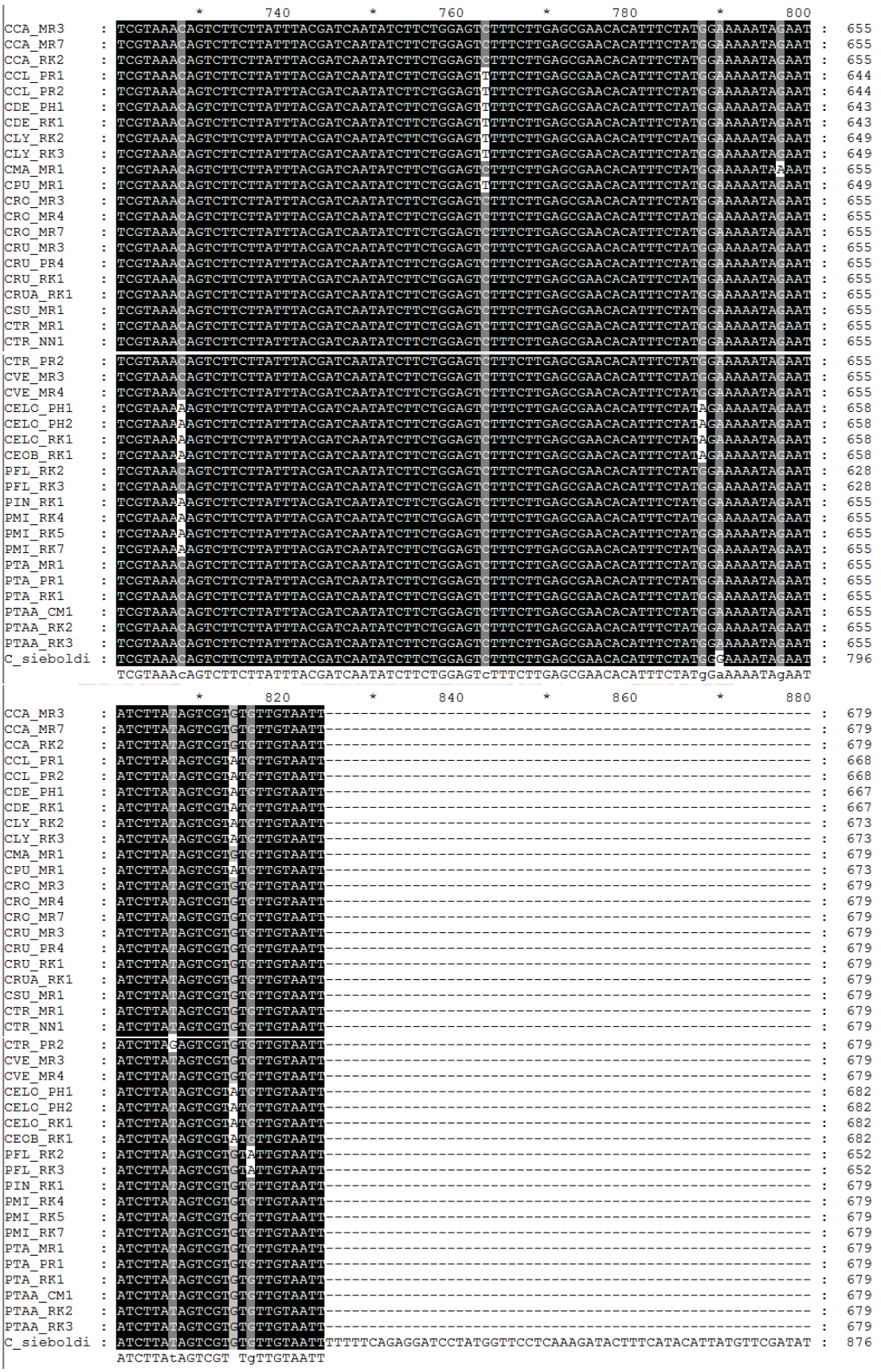
```
                    *        20         *        40         *        60         *        80
CCA_MR3     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CCA_MR7     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CCA_RK2     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CCL_PR1     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CCL_PR2     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CDE_PH1     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CDE_RK1     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CLY_RK2     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CLY_RK3     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CMA_MR1     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CPU_MR1     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CRO_MR3     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CRO_MR4     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CRO_MR7     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CRU_MR3     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CRU_PR4     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CRU_RK1     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CRUA_RK1    : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CSU_MR1     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CTR_MR1     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CTR_NN1     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CTR_PR2     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CVE_MR3     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CVE_MR4     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CELO_PH1    : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CELO_PH2    : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CELO_RK1    : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
CEOB_RK1    : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
PFL_RK2     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
PFL_RK3     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
PIN_RK1     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
PMI_RK4     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
PMI_RK5     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
PMI_RK7     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
PTA_MR1     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
PTA_PR1     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
PTA_RK1     : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
PTAA_CM1    : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
PTAA_RK2    : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
PTAA_RK3    : ---------------------------------------------------------------------------- :     -
C_sieboldi  : ATGTATTTAAATGGCAGAATTACAAGGATATTTAGATTGAAAAAAGATAGATTTCGGCAACAAAACTTCCTATATCCACT :    80
```


CCA_MR3 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CCA_MR7 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CCA_RK2 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CCL_PR1 : TACGAACCTGTGGAAATTA : 19
CCL_PR2 : TACGAACCTGTGGAAATTA : 19
CDE_PH1 : TACGAACCTGTGGAAATTA : 19
CDE_RK1 : TACGAACCTGTGGAAATTA : 19
CLY_RK2 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CLY_RK3 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CMA_MR1 : TACGAACCTGTGGAAATTA : 19
CPU_MR1 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CRO_MR3 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CRO_MR4 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CRO_MR7 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CRU_MR3 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CRU_PR4 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CRU_RK1 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CRUA_RK1 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CSU_MR1 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CTR_MR1 : TACGAACCTGTGGAAATTA : 19
CTR_NN1 : TACGAACCTGTGGAAATTA : 19
CTR_PR2 : TACGAACCTGTGGAAATTA : 19
CVE_MR3 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CVE_MR4 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
CELO_PH1 : TACGAACCTGCGGAAATTA : 19
CELO_PH2 : TACGAACCTGCGGAAATTA : 19
CELO_RK1 : TACGAACCTGCGGAAATTA : 19
CEOB_RK1 : TACGAACCTGCGGAAATTA : 19
PFL_RK2 : TACGAACCTGTGGAAATTA : 19
PFL_RK3 : TACGAACCTGTGGAAATTA : 19
PIN_RK1 : TACGAACCTGTGGAAATTA : 19
PMI_RK4 : TACGAACCTGTGGAAATTA : 19
PMI_RK5 : TACGAACCTGTGGAAATTA : 19
PMI_RK7 : TACGAACCTGTGGAAATTA : 19
PTA_MR1 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
PTA_PR1 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
PTA_RK1 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
PTAA_CM1 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
PTAA_RK2 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
PTAA_RK3 : TACGAACCTGTGGAAATTC : 19
C_sieboldi : ACTCCTTCAGGAGTATATTTACTCACTTGCTCATTATCATAGCTTTAATAGTTTTATTTTTTACGAACCTGTGGAAATTA : 160
100
120
140
160
CCA_MR3 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CCA_MR7 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CCA_RK2 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CCL_PR1 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTTTGTGAAACGTTTAATTACTCGGATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 99
CCL_PR2 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTTTGTGAAACGTTTAATTACTCGCATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 99
CDE_PH1 : TCGGTTATGACAAGAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CDE_RK1 : TCGGTTATGACAAGAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CLY_RK2 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CLY_RK3 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CMA_MR1 : TTGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CPU_MR1 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CRO_MR3 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTA : 98
CRO_MR4 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CRO_MR7 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CRU_MR3 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CRU_PR4 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTA : 98
CRU_RK1 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CRUA_RK1 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CSU_MR1 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CTR_MR1 : TTGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CTR_NN1 : TTGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CTR_PR2 : TTGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CVE_MR3 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CVE_MR4 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
CELO_PH1 : TCGGTTATGACAAGAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTATTCGAATGTATCAACAGAAATATTTGATTTC : 98
CELO_PH2 : TCGGTTATGACAAGAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTATTCGAATGTATCAACAGAAATATTTGATTTC : 98
CELO_RK1 : TCGGTTATGACAAGAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTATTCGAATGTATCAACAGAAATATTTGATTTC : 98
CEOB_RK1 : TCGGTTATGACAAGAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTATTCGAATGTATCAACAGAAATATTTGATTTC : 98
PFL_RK2 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
PFL_RK3 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
PIN_RK1 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
PMI_RK4 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
PMI_RK5 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
PMI_RK7 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
PTA_MR1 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
PTA_PR1 : TCGGTTATGACAAGAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
PTA_RK1 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
PTAA_CM1 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
PTAA_RK2 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
PTAA_RK3 : TCGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 98
C_sieboldi : TTGGTTATGACAATAAATCTAGTTTAGTACTT-GTGAAACGTTTAATTACTCGAATGTATCAACAGAAATCTTTGATTTC : 239
TcGGTTATGACAAtAAATCTAGTTTAGTACTT GTGAAACGTTTAATTAcTCGaATGTATCAACAGAAATcTTTGATTTc
180
200
220
240

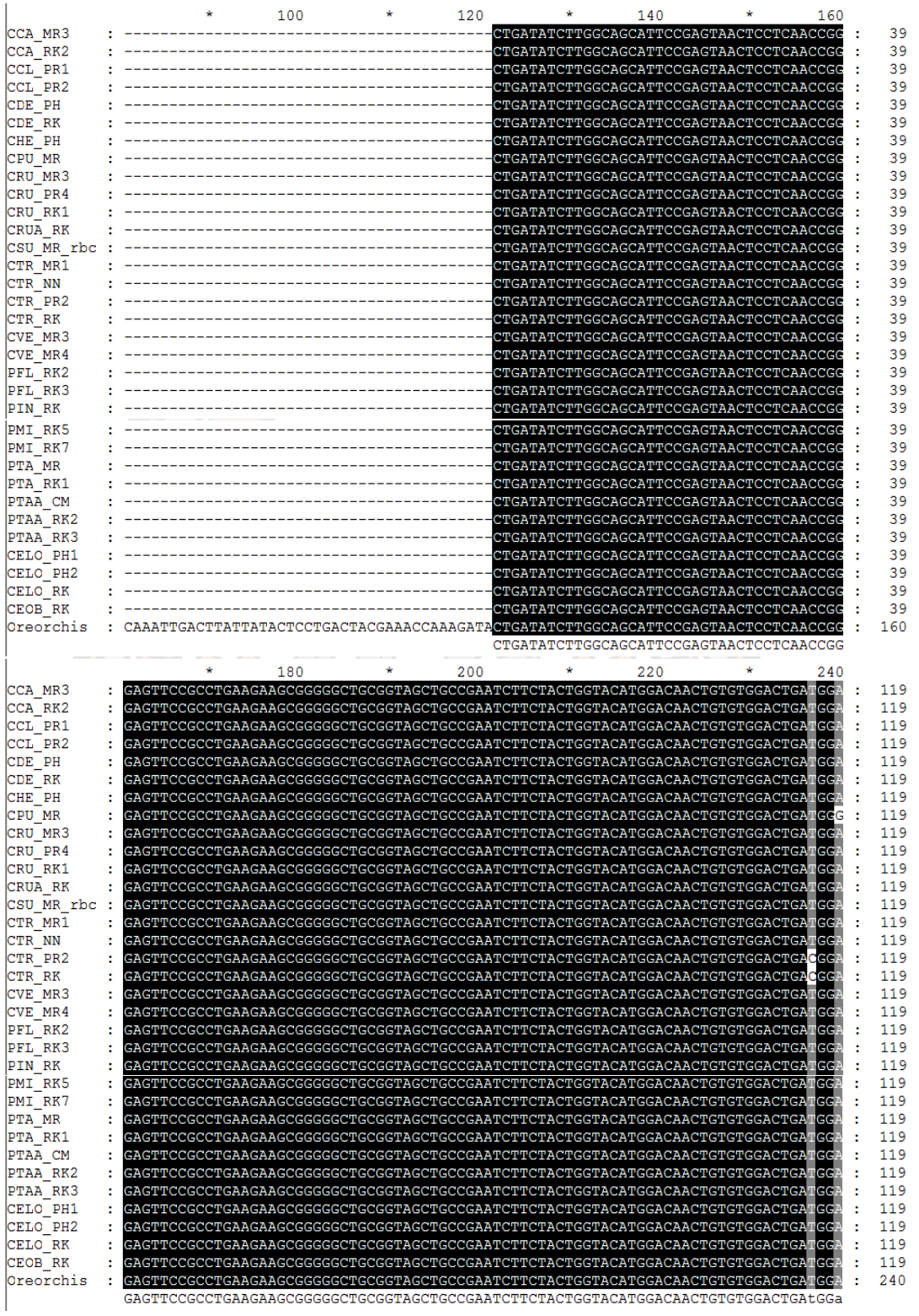

CCA_MR3 : TTCGATGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTTTTCTC : 175
CCA_MR7 : TTCGATGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTTTTCTC : 175
CCA_RK2 : TTCGATGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTTTTCTC : 175
CCL_PR1 : TTCGGTGAATGATTCT---------GAAA------TTTGGGGGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTCTTCTC : 164
CCL_PR2 : TTCGGTGAATGATTCT---------GAAA------TTTGGGGGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTCTTCTC : 164
CDE_PH1 : TTCGGTGAATGATTCT---------GAAA------TTTGGGGGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTCTTCTC : 163
CDE_RK1 : TTCGGTGAATGATTCT---------GAAA------TTTGGGGGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTCTTCTC : 163
CLY_RK2 : TTCGGTGAATGATTCT---------GAAAATGCATTTTTGGGGGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTCTTCTC : 169
CLY_RK3 : TTCGGTGAATGATTCT---------GAAAATGCATTTTTGGGGGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTCTTCTC : 169
CMA_MR1 : TTCGGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGGTTTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTCTTCTC : 175
CPU_MR1 : TTCGGTGAATGATTCT---------GAAAATGCATTTTTGGGGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTCTTCTC : 169
CRO_MR3 : TTCGATGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTTTTCTC : 175
CRO_MR4 : TTCGATGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTTTTCTC : 175
CRO_MR7 : TTCGATGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTTTTCTC : 175
CRU_MR3 : TTCGATGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTTTTCTC : 175
CRU_PR4 : TTCGATGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTTTTCTC : 175
CRU_RK1 : TTCGATGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTTTTCTC : 175
CRUA_RK1 : TTCGATGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTTTTCTC : 175
CSU_MR1 : TTCGATGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTTTTCTC : 175
CTR_MR1 : TTCGGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGGTTTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTC : 175
CTR_NN1 : TTCGGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGGTTTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTC : 175
CTR_PR2 : TTCGGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGGTTTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTC : 175
CVE_MR3 : TTCGATGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAAAATTCTTTTTCTTCTAATTTTTTTTCTC : 175
CVE_MR4 : TTCGATGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAAAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTTTTATC : 175
CELO_PH1 : TTCGGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTTTGGGGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTA : 178
CELO_PH2 : TTCGGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTTTGGGGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTA : 178
CELO_RK1 : TTCGGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTTTGGGGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTA : 178
CEOB_RK1 : TTCGGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTTTGGGGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTA : 178
PFL_RK2 : TTTGGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGACACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTC : 175
PFL_RK3 : TTTGGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGACACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTC : 175
PIN_RK1 : TTCGGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTC : 175
PMI_RK4 : TTCGGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTC : 175
PMI_RK5 : TTCGGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTC : 175
PMI_RK7 : TTCGGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTC : 175
PTA_MR1 : TTCAGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTC : 175
PTA_PR1 : TTCAGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTC : 175
PTA_RK1 : TTCAGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTC : 175
PTAA_CM1 : TTCAGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTC : 175
PTAA_RK2 : TTCAGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTC : 175
PTAA_RK3 : TTCAGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGCATTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTGTTCTC : 175
C_sieboldi : TTCGGTGAATGATTCTAACCAAAAGGAAAATGGTTTTT---GGGGGCACAAGAATTCTTTTTCTTCTCATTTTTATTCTC : 316
TTcg TGAATGATTCTaaccaaaagGAAAatgg tTTT GGGGgCACAAgAATTCTTTTTCTTCTcATTTTT TTcTc
CCA_MR3 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CCA_MR7 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CCA_RK2 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CCL_PR1 : AAAAGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 244
CCL_PR2 : AAAAGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 244
CDE_PH1 : AAAAGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 243
CDE_RK1 : AAAAGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 243
CLY_RK2 : AAAAGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 249
CLY_RK3 : AAAAGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 249
CMA_MR1 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CPU_MR1 : AAAAGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 249
CRO_MR3 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CRO_MR4 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CRO_MR7 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CRU_MR3 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CRU_PR4 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CRU_RK1 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CRUA_RK1 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CSU_MR1 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CTR_MR1 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CTR_NN1 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CTR_PR2 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CVE_MR3 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CVE_MR4 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTAATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
CELO_PH1 : AAATGGTATCAGAAGGCTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 258
CELO_PH2 : AAATGGTATCAGAAGGCTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 258
CELO_RK1 : AAATGGTATCAGAAGGCTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 258
CEOB_RK1 : AAATGGTATCAGAAGGCTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 258
PFL_RK2 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
PFL_RK3 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
PIN_RK1 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
PMI_RK4 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
PMI_RK5 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
PMI_RK7 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
PTA_MR1 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGCAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
PTA_PR1 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGCAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
PTA_RK1 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGCAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
PTAA_CM1 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGCAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
PTAA_RK2 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGCAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
PTAA_RK3 : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGCAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 255
C_sieboldi : AAATGGTATCAGAAGGTTTTGGAGTCATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTCGCTTGAAGAAAAAAGA : 396
AAAtGGTATCAGAAGGtTTTGgAGTcATTCTGGAAATTCCATTCTCGTCGCGATTAGTATCTTC CTTGAAGAAAAAAGA

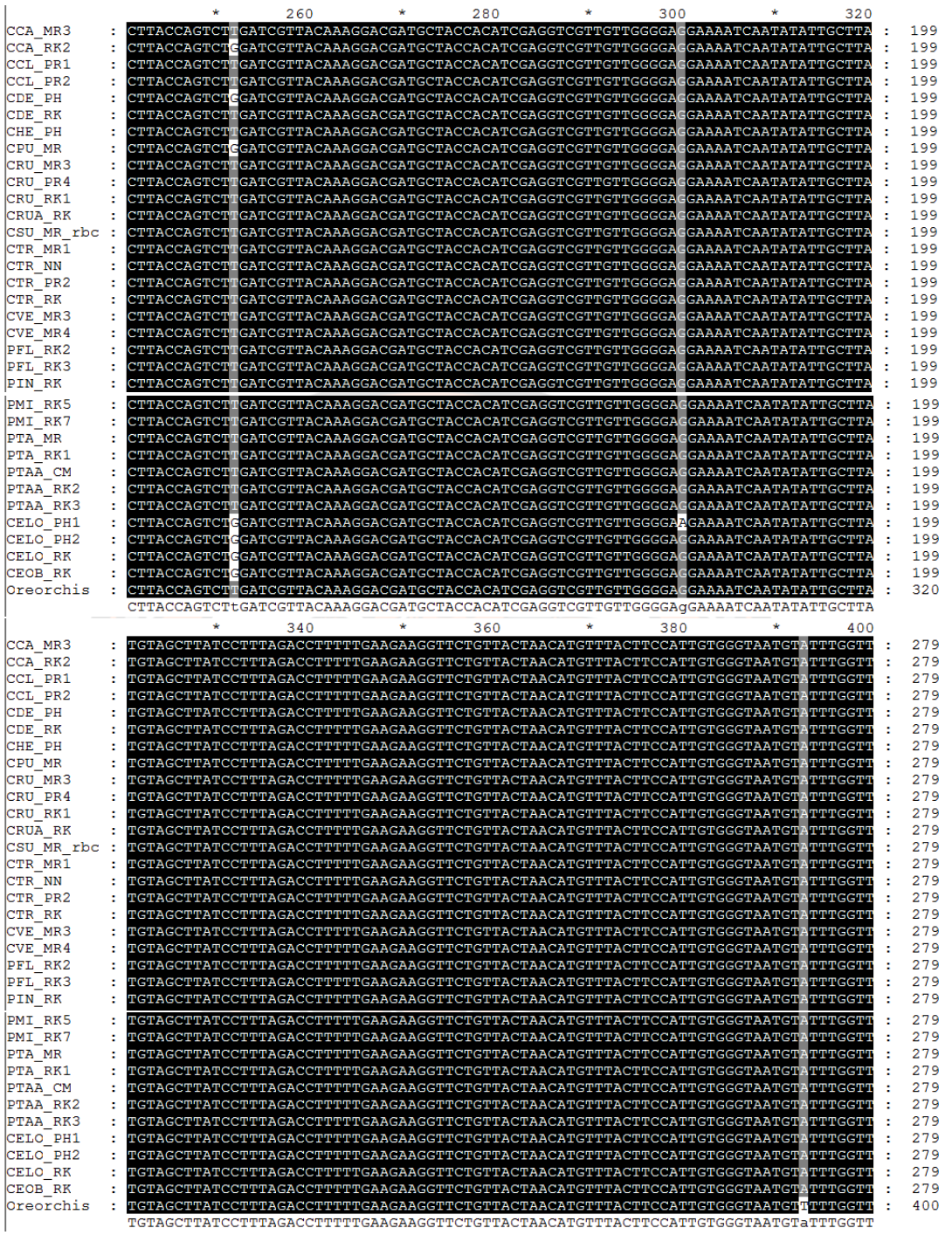

420
440
460
480
CCA_MR3 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CCA_MR7 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CCA_RK2 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CCL_PR1 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 324
CCL_PR2 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 324
CDE_PH1 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 323
CDE_RK1 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 323
CLY_RK2 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 329
CLY_RK3 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 329
CMA_MR1 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CPU_MR1 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 329
CRO_MR3 : ATACCAAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCTTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CRO_MR4 : AGACCAAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCTTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CRO_MR7 : AGACCAAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCTTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CRU_MR3 : AGACCAAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCTTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CRU_PR4 : ATACCAAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCTTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CRU_RK1 : ATACCAAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCTTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CRUA_RK1 : AGACCAAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCTTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CSU_MR1 : ATACCAAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCTTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CTR_MR1 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CTR_NN1 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CTR_PR2 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CVE_MR3 : ATACCAAAATATCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCTTTTTTATAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
CVE_MR4 : ATACCAAAATATCATAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCTTTTTTATAGGATAAATTATCACATTGAAATTATGT : 335
CELO_PH1 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTTCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 338
CELO_PH2 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTTCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 338
CELO_RK1 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTTCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 338
CEOB_RK1 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTTCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 338
PFL_RK2 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
PFL_RK3 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
PIN_RK1 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
PMI_RK4 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
PMI_RK5 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
PMI_RK7 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
PTA_MR1 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
PTA_PR1 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
PTA_RK1 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
PTAA_CM1 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
PTAA_RK2 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
PTAA_RK3 : ATACCAAAATGTCAGAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 335
C_sieboldi : ATACCAAAATGTCATAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTGCCTTTTTAGAGGATAAATTATCACATTTAAATTATGT : 476
ATACCAAAAT TCAgAATTTACGATCTATTCATTCAATATTTcC TTTTTAgAGGATAAATTATCACATTtAAATTATGT
500
520
540
560
CCA_MR3 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATATTCCTT : 415
CCA_MR7 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATATTCCTT : 415
CCA_RK2 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATATTCCTT : 415
CCL_PR1 : GTCAGATCTACTAATACGTCATCCCATTCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 404
CCL_PR2 : GTCAGATCTACTAATACGTCATCCCATTCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 404
CDE_PH1 : GTCAGATCTACTAATACGTCATCCCATTCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 403
CDE_RK1 : GTCAGATCTACTAATACGTCATCCCATTCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 403
CLY_RK2 : GTCAGATCTACTAATACGTCATCCCATTCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 409
CLY_RK3 : GTCAGATCTACTAATACGTCATCCCATTCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 409
CMA_MR1 : GTCAGATCTACTAATACGCACCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTCCCTT : 415
CPU_MR1 : GTCAGATCTACTAATACGTCATCCCATTCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 409
CRO_MR3 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
CRO_MR4 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
CRO_MR7 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
CRU_MR3 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
CRU_PR4 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
CRU_RK1 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATATTCCTT : 415
CRUA_RK1 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
CSU_MR1 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATATTCCTT : 415
CTR_MR1 : GTCAGATCTACTAATACGCACCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
CTR_NN1 : GTCAGATCTACTAATACGCACCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
CTR_PR2 : GTCAGATCTACTAATACGCACCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
CVE_MR3 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
CVE_MR4 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
CELO_PH1 : GTCAGATCTACTAATACGTCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 418
CELO_PH2 : GTCAGATCTACTAATACGTCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 418
CELO_RK1 : GTCAGATCTACTAATACGTCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 418
CEOB_RK1 : GTCAGATCTACTAATACGTCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 418
PFL_RK2 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
PFL_RK3 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
PIN_RK1 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
PMI_RK4 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
PMI_RK5 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
PMI_RK7 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
PTA_MR1 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
PTA_PR1 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
PTA_RK1 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
PTAA_CM1 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
PTAA_RK2 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
PTAA_RK3 : GTCAGATCTACTAATACGCATCCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 415
C_sieboldi : ATCAGATCTACTAATACGCACCCATCCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATGTTCCTT : 556
gTCAGATCTACTAATACC CAtCCCATcCATCTGGAAATCTTGGTTCAAATCCTTCAATGCTGGATCAAAGATgTtCCTT

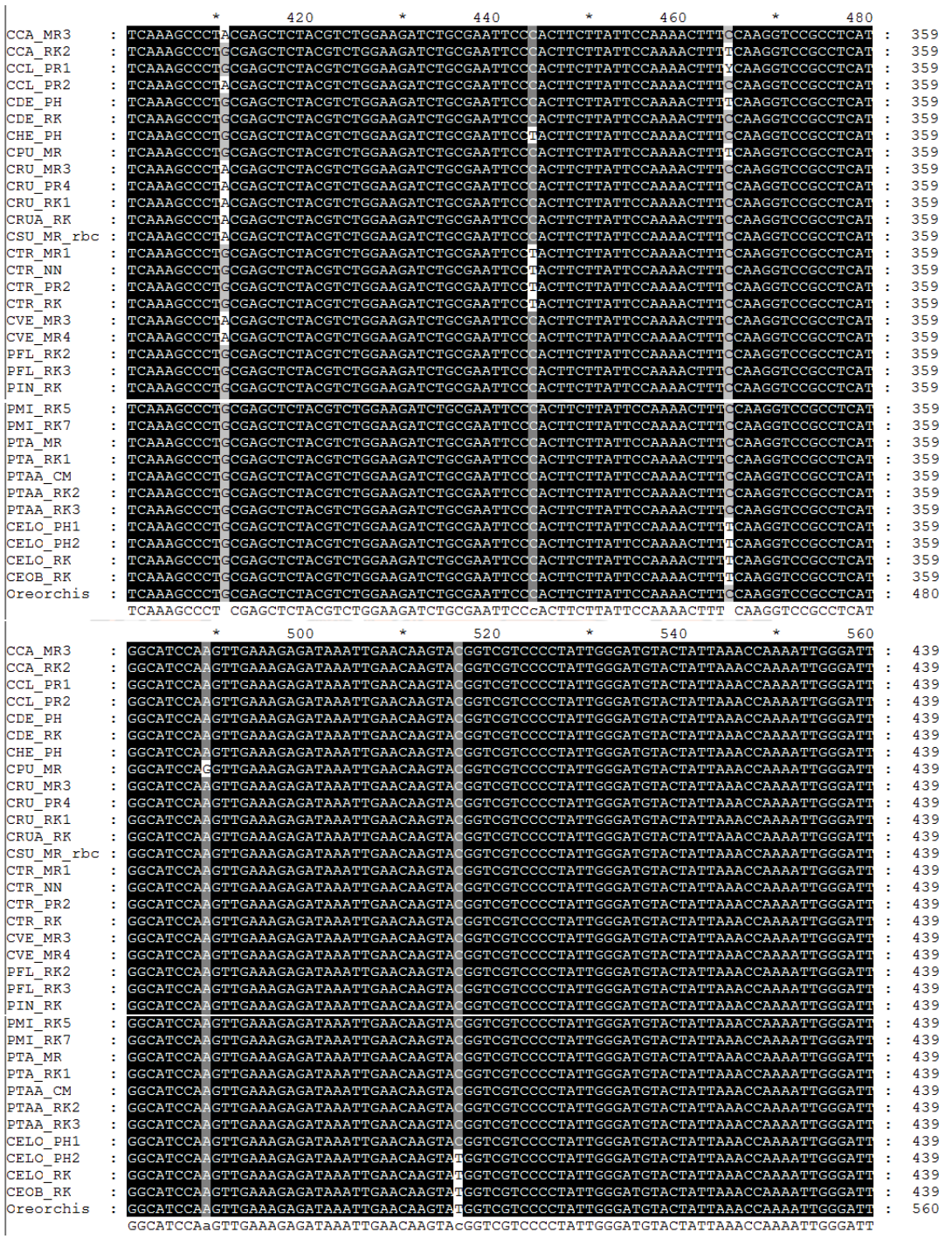

CCA_MR3
CCA_MR7
CCA_RK2
CCL_PR1
CCL_PR2
CDE_PH1
CDE_RK1
CLY_RK2
CLY_RK3
CMA_MR1
CPU_MR1
CRO_MR3
CRO_MR4
CRO_MR7
CRU_MR3
CRU_PR4
CRU_RK1
CRUA_RK1
CSU_MR1
CTR_MR1
CTR_NN1
CTR_PR2
CVE_MR3
CVE_MR4
CELO_PH1
CELO_PH2
CELO_RK1
CEOB_RK1
PFL_RK2
PFL_RK3
PIN_RK1
PMI_RK4
PMI_RK5
PMI_RK7
PTA_MR1
PTA_PR1
PTA_RK1
PTAA_CM1
PTAA_RK2
PTAA_RK3
C_sieboldi

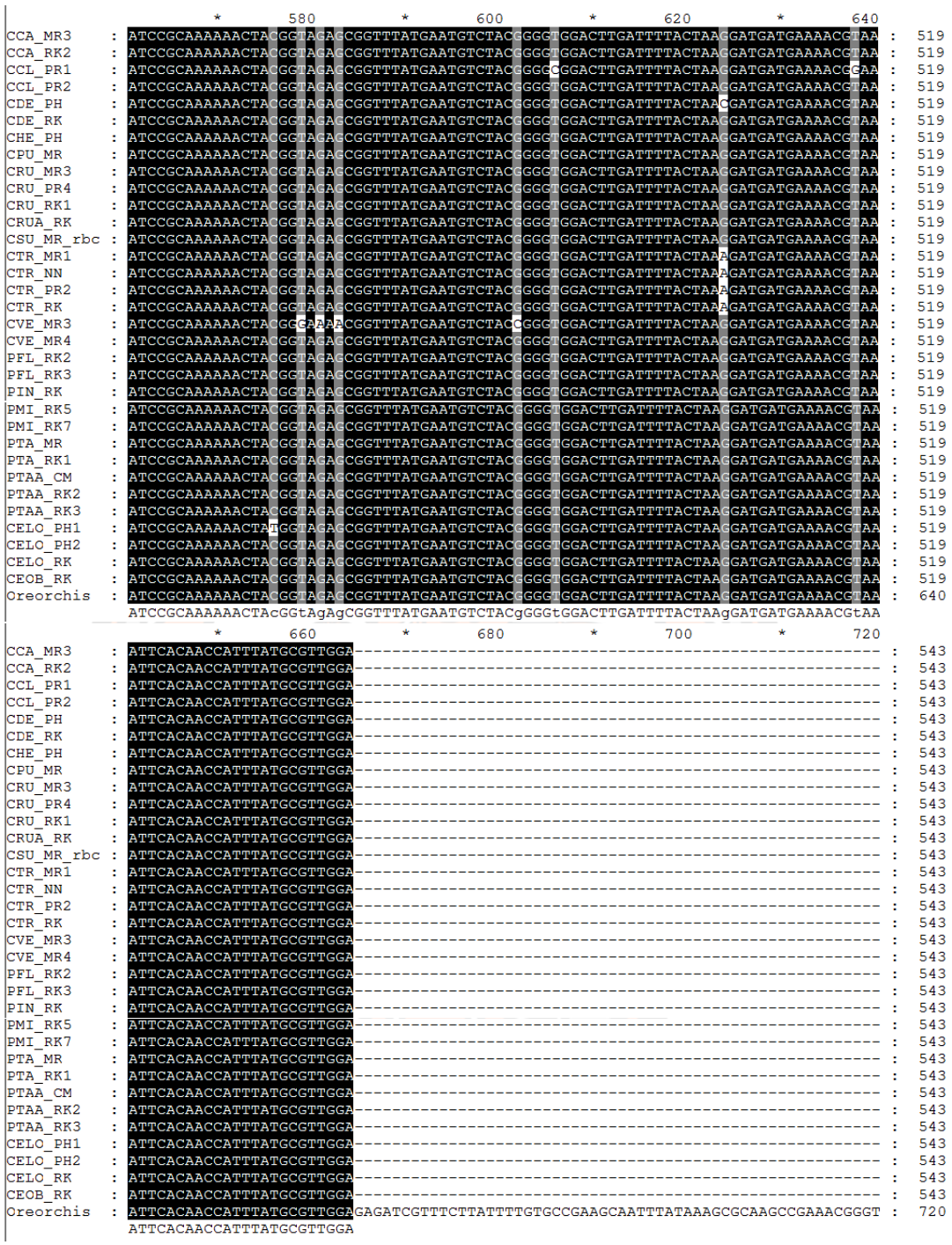

CCA_MR3 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CCA_MR7 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CCA_RK2 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CCL_PR1 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 644
CCL_PR2 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 644
CDE_PH1 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 643
CDE_RK1 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 643
CLY_RK2 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 649
CLY_RK3 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 649
CMA_MR1 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAAAAT : 655
CPU_MR1 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 649
CRO_MR3 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CRO_MR4 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CRO_MR7 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CRU_MR3 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CRU_PR4 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CRU_RK1 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CRUA_RK1 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CSU_MR1 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CTR_MR1 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CTR_NN1 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CTR_PR2 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CVE_MR3 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CVE_MR4 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
CELO_PH1 : TCGTAAAAAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 658
CELO_PH2 : TCGTAAAAAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATAGAAAAATAGAAT : 658
CELO_RK1 : TCGTAAAAAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATAGAAAAATAGAAT : 658
CEOB_RK1 : TCGTAAAAAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATAGAAAAATAGAAT : 658
PFL_RK2 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 628
PFL_RK3 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 628
PIN_RK1 : TCGTAAAAAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
PMI_RK4 : TCGTAAAAAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
PMI_RK5 : TCGTAAAAAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
PMI_RK7 : TCGTAAAAAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
PTA_MR1 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
PTA_PR1 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
PTA_RK1 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
PTAA_CM1 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
PTAA_RK2 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
PTAA_RK3 : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGGAAAAATAGAAT : 655
C_sieboldi : TCGTAAACAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTCTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATGCGAAAATAGAAT : 796
TCGTAAAcAGTCTTCTTATTTACGATCAATATCTTCTGGAGTcTTTCTTGAGCGAACACATTTCTATgGaAAAATAgAAT
CCA_MR3 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CCA_MR7 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CCA_RK2 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CCL_PR1 : ATCTTATAGTCGTATGTTGTAATT---------- : 668
CCL_PR2 : ATCTTATAGTCGTATGTTGTAATT---------- : 668
CDE_PH1 : ATCTTATAGTCGTATGTTGTAATT---------- : 667
CDE_RK1 : ATCTTATAGTCGTATGTTGTAATT---------- : 667
CLY_RK2 : ATCTTATAGTCGTATGTTGTAATT---------- : 673
CLY_RK3 : ATCTTATAGTCGTATGTTGTAATT---------- : 673
CMA_MR1 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CPU_MR1 : ATCTTATAGTCGTATGTTGTAATT---------- : 673
CRO_MR3 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CRO_MR4 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CRO_MR7 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CRU_MR3 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CRU_PR4 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CRU_RK1 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CRUA_RK1 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CSU_MR1 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CTR_MR1 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CTR_NN1 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CTR_PR2 : ATCTTACAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CVE_MR3 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CVE_MR4 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
CELO_PH1 : ATCTTATAGTCGTATGTTGTAATT---------- : 682
CELO_PH2 : ATCTTATAGTCGTATGTTGTAATT---------- : 682
CELO_RK1 : ATCTTATAGTCGTATGTTGTAATT---------- : 682
CEOB_RK1 : ATCTTATAGTCGTATGTTGTAATT---------- : 682
PFL_RK2 : ATCTTATAGTCGTGTATTGTAATT---------- : 652
PFL_RK3 : ATCTTATAGTCGTGTATTGTAATT---------- : 652
PIN_RK1 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
PMI_RK4 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
PMI_RK5 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
PMI_RK7 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
PTA_MR1 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
PTA_PR1 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
PTA_RK1 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
PTAA_CM1 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
PTAA_RK2 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
PTAA_RK3 : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATT---------- : 679
C_sieboldi : ATCTTATAGTCGTGTGTTGTAATTTTTTTCAGAGGATCCTATGGTTCCTCAAAGATACTTTCATACATTATGTTCGATAT : 876
ATCTTAtAGTCGT TgTTGTAATT

ภาคผนวก ง ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL*

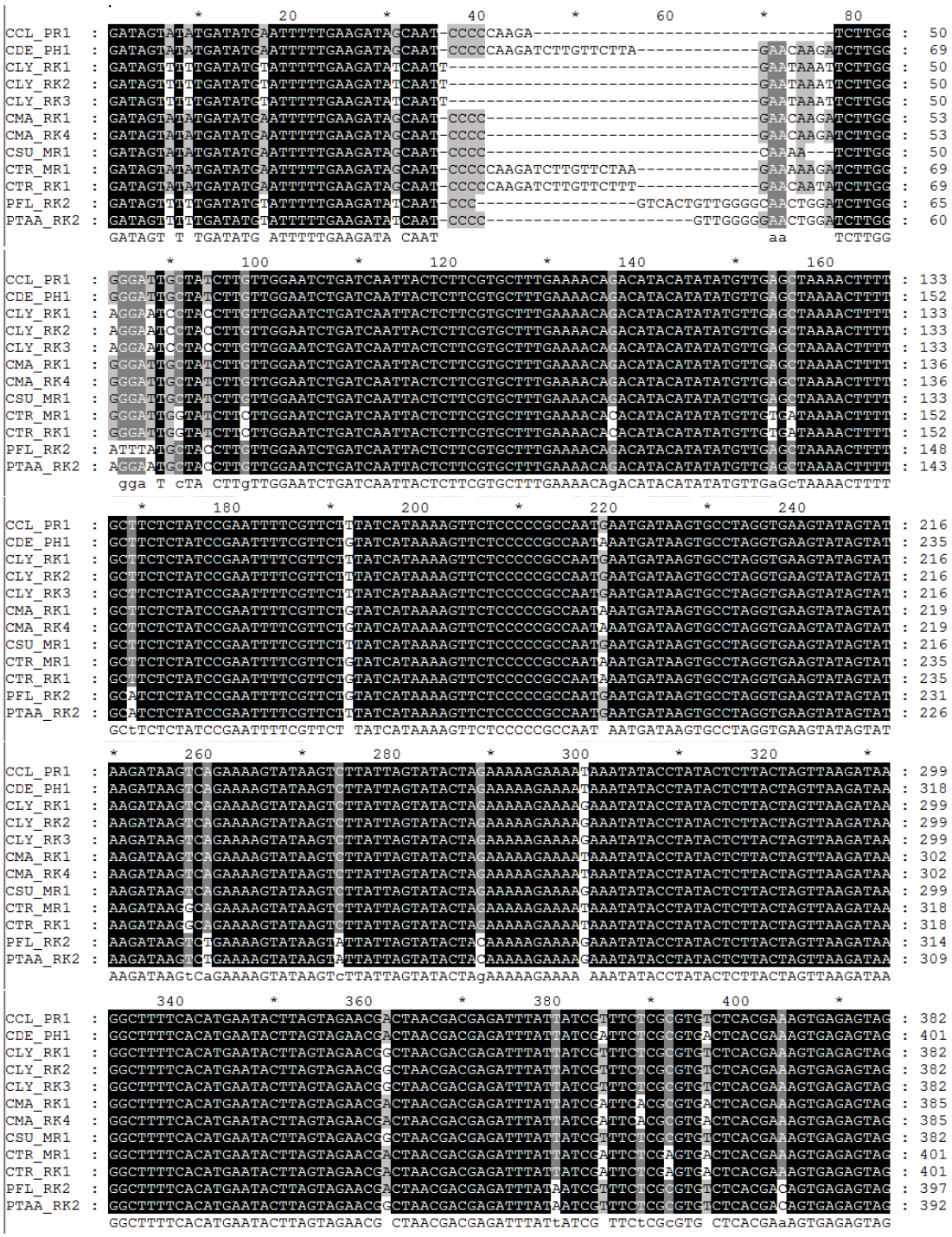


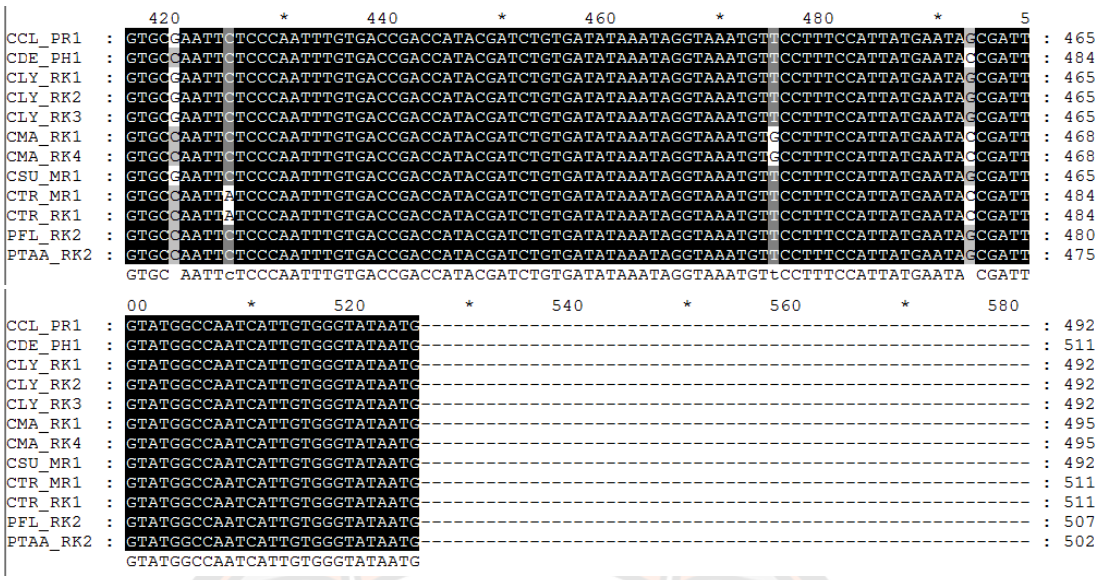

260
280
300
320
CCA_MR3 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CCA_RK2 : CTTACCAGTCTGGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CCL_PR1 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CCL_PR2 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CDE_PH : CTTACCAGTCTGGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CDE_RK : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CHE_PH : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CPU_MR : CTTACCAGTCTGGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CRU_MR3 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CRU_PR4 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CRU_RK1 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CRUA_RK : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CSU_MR_rbc : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CTR_MR1 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CTR_NN : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CTR_PR2 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CTR_RK : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CVE_MR3 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CVE_MR4 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
PFL_RK2 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
PFL_RK3 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
PIN_RK : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
PMI_RK5 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
PMI_RK7 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
PTA_MR : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
PTA_RK1 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
PTAA_CM : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
PTAA_RK2 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
PTAA_RK3 : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CELO_PH1 : CTTACCAGTCTGGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAAGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CELO_PH2 : CTTACCAGTCTGGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CELO_RK : CTTACCAGTCTGGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
CEOB_RK : CTTACCAGTCTGGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 199
Oreorchis : CTTACCAGTCTTGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAGGAAAATCAATATATTGCTTA : 320
CTTACCAGTCTtGATCGTTACAAAGGACGATGCTACCACATCGAGGTCGTTGTTGGGGAgGAAAATCAATATATTGCTTA
340
360
380
400
CCA_MR3 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CCA_RK2 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CCL_PR1 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CCL_PR2 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CDE_PH : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CDE_RK : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CHE_PH : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CPU_MR : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CRU_MR3 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CRU_PR4 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CRU_RK1 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CRUA_RK : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CSU_MR_rbc : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CTR_MR1 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CTR_NN : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CTR_PR2 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CTR_RK : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CVE_MR3 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CVE_MR4 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
PFL_RK2 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
PFL_RK3 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
PIN_RK : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
PMI_RK5 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
PMI_RK7 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
PTA_MR : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
PTA_RK1 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
PTAA_CM : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
PTAA_RK2 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
PTAA_RK3 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CELO_PH1 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CELO_PH2 : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CELO_RK : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
CEOB_RK : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 279
Oreorchis : TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTATTTGGTT : 400
TGTAGCTTATCCTTTAGACCTTTTTGAAGAAGGTTCTGTTACTAACATGTTTACTTCCATTGTGGGTAATGTaTTTGGTT


CCA_MR3 : TCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CCA_RK2 : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTTCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CCL_PR1 : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTYCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CCL_PR2 : TCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CDE_PH : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTTCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CDE_RK : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CHE_PH : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCTACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CPU_MR : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTTCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CRU_MR3 : TCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CRU_PR4 : TCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CRU_RK1 : TCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CRUA_RK : TCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CSU_MR_rbc : TCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CTR_MR1 : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCTACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CTR_NN : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCTACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CTR_PR2 : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCTACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CTR_RK : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCTACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CVE_MR3 : TCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CVE_MR4 : TCAAAGCCCTACGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
PFL_RK2 : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
PFL_RK3 : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
PIN_RK : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
PMI_RK5 : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
PMI_RK7 : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
PTA_MR : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
PTA_RK1 : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
PTAA_CM : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
PTAA_RK2 : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
PTAA_RK3 : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CELO_PH1 : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTTCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CELO_PH2 : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTTCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CELO_RK : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTTCAAGGTCCGCCTCAT : 359
CEOB_RK : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTTCAAGGTCCGCCTCAT : 359
Oreorchis : TCAAAGCCCTCCGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCCACTTCTTATTCCAAAACTTTCCAAGGTCCGCCTCAT : 480
TCAAAGCCCT CGAGCTCTACGTCTGGAAGATCTGCGAATTCCcACTTCTTATTCCAAAACTTT CAAGGTCCGCCTCAT
CCA_MR3 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CCA_RK2 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CCL_PR1 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CCL_PR2 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CDE_PH : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CDE_RK : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CHE_PH : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CPU_MR : GGCATCCAGGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CRU_MR3 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CRU_PR4 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CRU_RK1 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CRUA_RK : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CSU_MR_rbc : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CTR_MR1 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CTR_NN : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CTR_PR2 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CTR_RK : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CVE_MR3 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CVE_MR4 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
PFL_RK2 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
PFL_RK3 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
PIN_RK : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
PMI_RK5 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
PMI_RK7 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
PTA_MR : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
PTA_RK1 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
PTAA_CM : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
PTAA_RK2 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
PTAA_RK3 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CELO_PH1 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTACGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CELO_PH2 : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CELO_RK : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
CEOB_RK : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 439
Oreorchis : GGCATCCAAGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTATGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT : 560
GGCATCCAaGTTGAAAGAGATAAATTGAACAAGTAcGGTCGTCCCCTATTGGGATGTACTATTAAACCAAAATTGGGATT

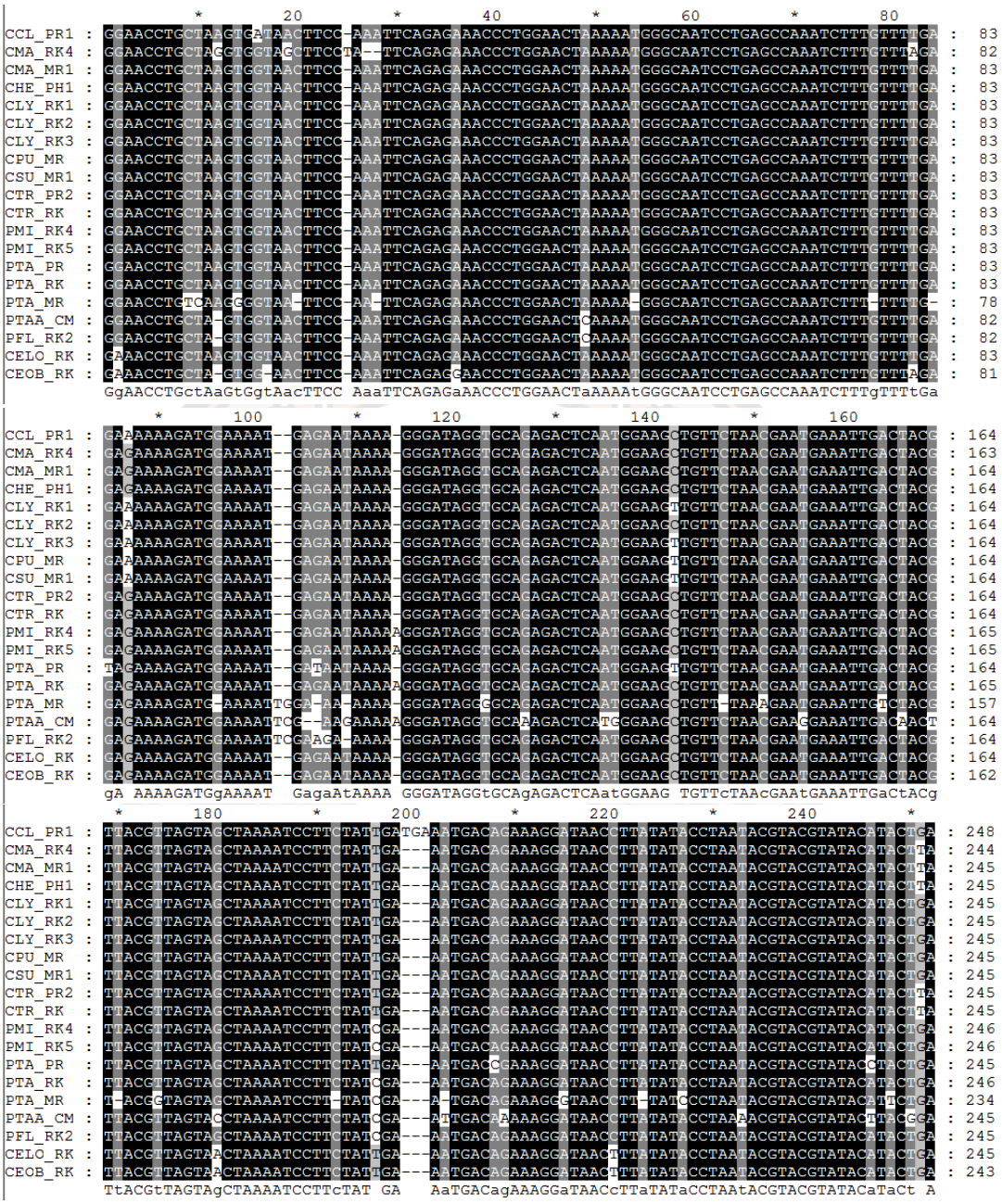

CCA_MR3 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CCA_RK2 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CCL_PR1 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGCGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGCAA : 519
CCL_PR2 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CDE_PH : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAACGATGATGAAAACGTAA : 519
CDE_RK : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CHE_PH : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CPU_MR : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CRU_MR3 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CRU_PR4 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CRU_RK1 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CRUA_RK : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CSU_MR_rbc : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CTR_MR1 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAAGATGATGAAAACGTAA : 519
CTR_NN : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAAGATGATGAAAACGTAA : 519
CTR_PR2 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAAGATGATGAAAACGTAA : 519
CTR_RK : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAAGATGATGAAAACGTAA : 519
CVE_MR3 : ATCCGCAAAAAACTACGGCAAAAAACGGTTTATGAATGTCTACCGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CVE_MR4 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
PFL_RK2 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
PFL_RK3 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
PIN_RK : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
PMI_RK5 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
PMI_RK7 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
PTA_MR : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
PTA_RK1 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
PTAA_CM : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
PTAA_RK2 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
PTAA_RK3 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CELO_PH1 : ATCCGCAAAAAACTATGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CELO_PH2 : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CELO_RK : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
CEOB_RK : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 519
Oreorchis : ATCCGCAAAAAACTACGGTAGAGCGGTTTATGAATGTCTACGGGGTGGACTTGATTTTACTAAGGATGATGAAAACGTAA : 640
ATCCGCAAAAAACTACGGtAgAgCGGTTTATGAATGTCTACgGGGtGGACTTGATTTTACTAAgGATGATGAAAACGtAA
CCA_MR3 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CCA_RK2 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CCL_PR1 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CCL_PR2 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CDE_PH : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CDE_RK : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CHE_PH : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CPU_MR : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CRU_MR3 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CRU_PR4 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CRU_RK1 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CRUA_RK : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CSU_MR_rbc : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CTR_MR1 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CTR_NN : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CTR_PR2 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CTR_RK : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CVE_MR3 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CVE_MR4 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
PFL_RK2 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
PFL_RK3 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
PIN_RK : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
PMI_RK5 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
PMI_RK7 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
PTA_MR : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
PTA_RK1 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
PTAA_CM : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
PTAA_RK2 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
PTAA_RK3 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CELO_PH1 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CELO_PH2 : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CELO_RK : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
CEOB_RK : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA---------- : 543
Oreorchis : ATTCACAACCATTTATGCGTTGGAGAGATCGTTTCTTATTTTGTGCCGAAGCAATTTATAAAGCGCAAGCCGAAACGGGT : 720
ATTCACAACCATTTATGCGTTGGA

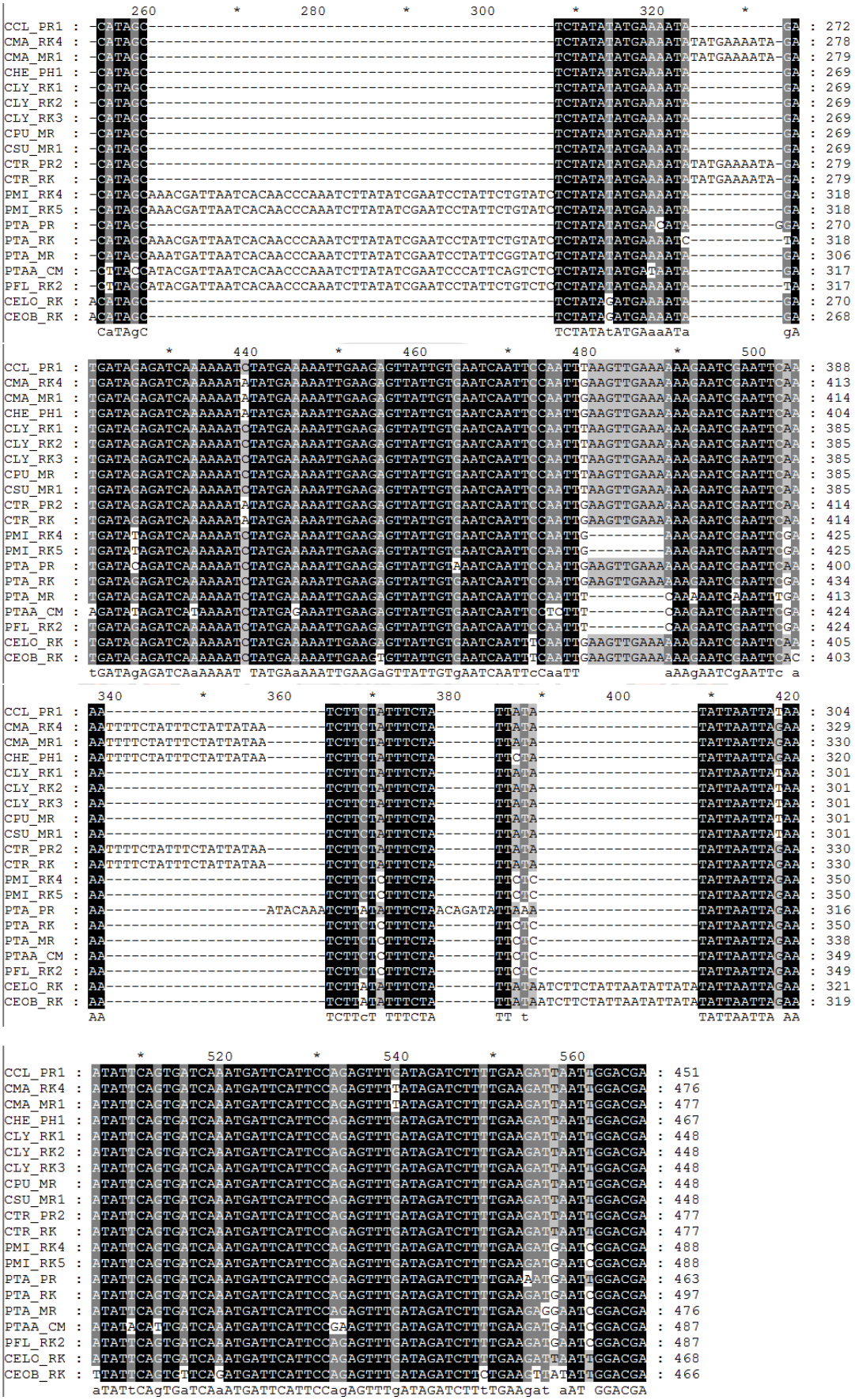
ภาคผนวก จ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH*




420 * 440 * 460 * 480 * 5
CCL_PR1 : GTGGGAATTCTCCCAATTTGTGACCGACCATACGATCTGTGATATAAATAGGTAAATGTTCCTTTCCATTATGAATAGCGATT : 465
CDE_PH1 : GTGGCAATTCTCCCAATTTGTGACCGACCATACGATCTGTGATATAAATAGGTAAATGTTCCTTTCCATTATGAATACCGATT : 484
CLY_RK1 : GTGGGAATTCTCCCAATTTGTGACCGACCATACGATCTGTGATATAAATAGGTAAATGTTCCTTTCCATTATGAATAGCGATT : 465
CLY_RK2 : GTGGGAATTCTCCCAATTTGTGACCGACCATACGATCTGTGATATAAATAGGTAAATGTTCCTTTCCATTATGAATAGCGATT : 465
CLY_RK3 : GTGGGAATTCTCCCAATTTGTGACCGACCATACGATCTGTGATATAAATAGGTAAATGTTCCTTTCCATTATGAATAGCGATT : 465
CMA_RK1 : GTGGCAATTCTCCCAATTTGTGACCGACCATACGATCTGTGATATAAATAGGTAAATGTGCCTTTCCATTATGAATACCGATT : 468
CMA_RK4 : GTGGCAATTCTCCCAATTTGTGACCGACCATACGATCTGTGATATAAATAGGTAAATGTGCCTTTCCATTATGAATACCGATT : 468
CSU_MR1 : GTGGGAATTCTCCCAATTTGTGACCGACCATACGATCTGTGATATAAATAGGTAAATGTTCCTTTCCATTATGAATAGCGATT : 465
CTR_MR1 : GTGGCAATTATCCCAATTTGTGACCGACCATACGATCTGTGATATAAATAGGTAAATGTTCCTTTCCATTATGAATACCGATT : 484
CTR_RK1 : GTGGCAATTATCCCAATTTGTGACCGACCATACGATCTGTGATATAAATAGGTAAATGTTCCTTTCCATTATGAATACCGATT : 484
PFL_RK2 : GTGGCAATTCTCCCAATTTGTGACCGACCATACGATCTGTGATATAAATAGGTAAATGTTCCTTTCCATTATGAATAGCGATT : 480
PTAA_RK2 : GTGGCAATTCTCCCAATTTGTGACCGACCATACGATCTGTGATATAAATAGGTAAATGTTCCTTTCCATTATGAATAGCGATT : 475
GTGC AATTcTCCCAATTTGTGACCGACCATACGATCTGTGATATAAATAGGTAAATGTtCCTTTCCATTATGAATA CGATT
00 * 520 * 540 * 560 * 580
CCL_PR1 : GTATGGCCAATCATTGTGGGTATAATG---------- : 492
CDE_PH1 : GTATGGCCAATCATTGTGGGTATAATG---------- : 511
CLY_RK1 : GTATGGCCAATCATTGTGGGTATAATG---------- : 492
CLY_RK2 : GTATGGCCAATCATTGTGGGTATAATG---------- : 492
CLY_RK3 : GTATGGCCAATCATTGTGGGTATAATG---------- : 492
CMA_RK1 : GTATGGCCAATCATTGTGGGTATAATG---------- : 495
CMA_RK4 : GTATGGCCAATCATTGTGGGTATAATG---------- : 495
CSU_MR1 : GTATGGCCAATCATTGTGGGTATAATG---------- : 492
CTR_MR1 : GTATGGCCAATCATTGTGGGTATAATG---------- : 511
CTR_RK1 : GTATGGCCAATCATTGTGGGTATAATG---------- : 511
PFL_RK2 : GTATGGCCAATCATTGTGGGTATAATG---------- : 507
PTAA_RK2 : GTATGGCCAATCATTGTGGGTATAATG---------- : 502
GTATGGCCAATCATTGTGGGTATAATG

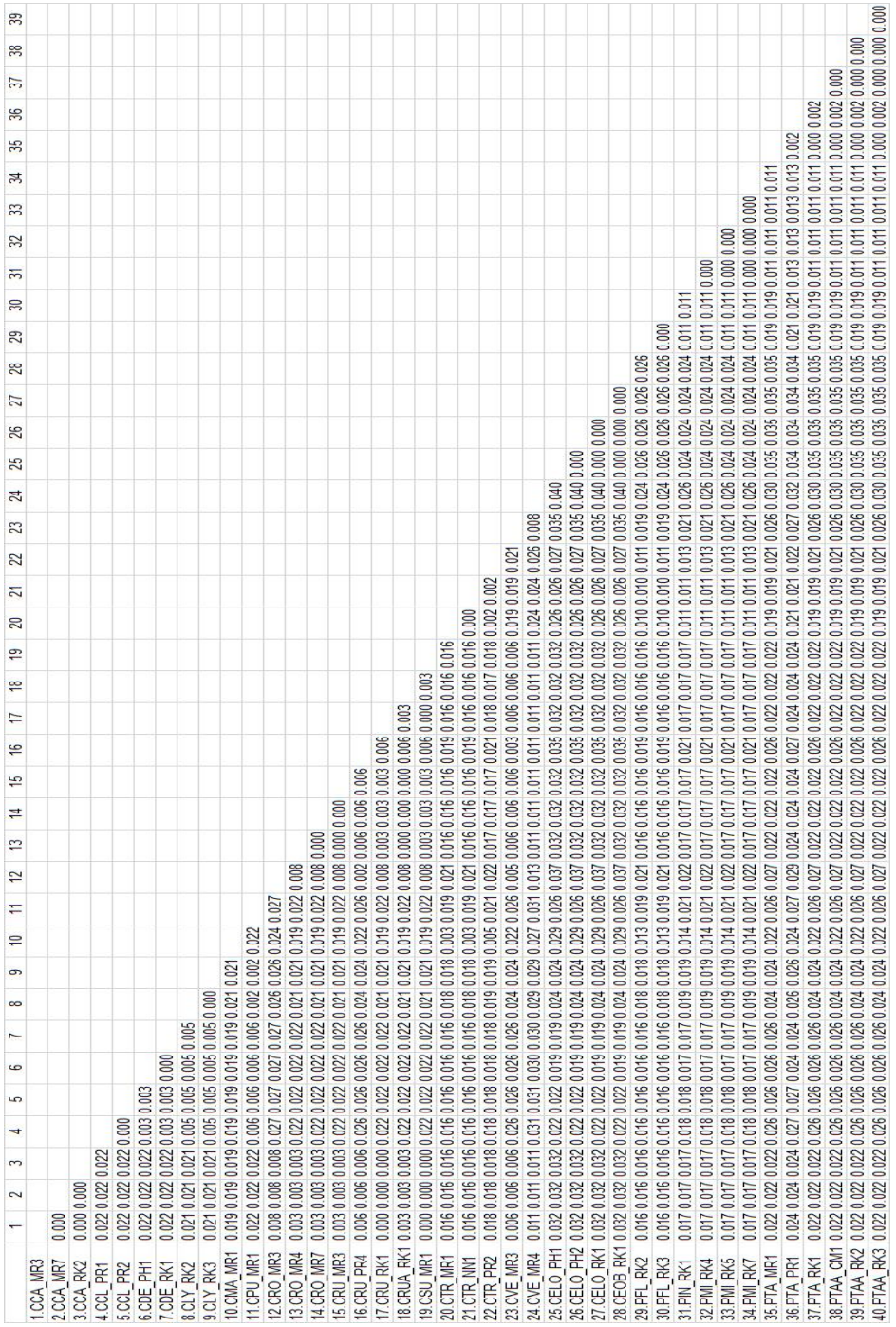
ภาคผนวก ฉ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF*





ภาคผนวก ช ความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นด้วยวิธี pairwise distance

ตาราง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ด้วยวิธี pairwise distance



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
1.CCA_MR3																																							
2.CCA_MR7	0.000																																						
3.CCA_RK2	0.000	0.000																																					
4.CCL_PR1	0.022	0.022	0.022																																				
5.CCL_PR2	0.022	0.022	0.022	0.000																																			
6.CDE_PH1	0.022	0.022	0.022	0.003	0.003																																		
7.CDE_RK1	0.022	0.022	0.022	0.003	0.003	0.000																																	
8.CLY_RK2	0.021	0.021	0.021	0.005	0.005	0.005	0.005																																
9.CLY_RK3	0.021	0.021	0.021	0.005	0.005	0.005	0.005	0.000																															
10.CMA_MR1	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.019	0.021	0.021																														
11.CPU_MR1	0.022	0.022	0.022	0.006	0.006	0.006	0.006	0.002	0.002	0.022																													
12.CRO_MR3	0.008	0.008	0.008	0.027	0.027	0.027	0.027	0.026	0.026	0.024	0.027																												
13.CRO_MR4	0.003	0.003	0.003	0.022	0.022	0.022	0.022	0.021	0.021	0.019	0.022	0.008																											
14.CRO_MR7	0.003	0.003	0.003	0.022	0.022	0.022	0.022	0.021	0.021	0.019	0.022	0.008	0.000																										
15.CRU_MR3	0.003	0.003	0.003	0.022	0.022	0.022	0.022	0.021	0.021	0.019	0.022	0.008	0.000	0.000																									
16.CRU_PR4	0.006	0.006	0.006	0.026	0.026	0.026	0.026	0.024	0.024	0.022	0.026	0.002	0.006	0.006	0.006																								
17.CRU_RK1	0.000	0.000	0.000	0.022	0.022	0.022	0.022	0.021	0.021	0.019	0.022	0.008	0.003	0.003	0.003	0.006																							
18.CRUA_RK1	0.003	0.003	0.003	0.022	0.022	0.022	0.022	0.021	0.021	0.019	0.022	0.008	0.000	0.000	0.000	0.006	0.003																						
19.CSU_MR1	0.000	0.000	0.000	0.022	0.022	0.022	0.022	0.021	0.021	0.019	0.022	0.008	0.003	0.003	0.003	0.006	0.000	0.003																					
20.CTR_MR1	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.018	0.018	0.003	0.019	0.021	0.016	0.016	0.016	0.019	0.016	0.016	0.016																				
21.CTR_NN1	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.018	0.018	0.003	0.019	0.021	0.016	0.016	0.016	0.019	0.016	0.016	0.016	0.000																			
22.CTR_PR2	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.019	0.019	0.005	0.021	0.022	0.017	0.017	0.017	0.021	0.018	0.017	0.018	0.002	0.002																		
23.CVE_MR3	0.006	0.006	0.006	0.026	0.026	0.026	0.026	0.024	0.024	0.022	0.026	0.005	0.006	0.006	0.006	0.003	0.006	0.006	0.006	0.019	0.019	0.021																	
24.CVE_MR4	0.011	0.011	0.011	0.031	0.031	0.030	0.030	0.029	0.029	0.027	0.031	0.013	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.024	0.024	0.026	0.008																
25.CELO_PH1	0.032	0.032	0.032	0.032	0.022	0.022	0.022	0.019	0.024	0.029	0.026	0.037	0.032	0.032	0.032	0.035	0.032	0.032	0.032	0.026	0.026	0.027	0.035	0.040															
26.CELO_PH2	0.032	0.032	0.032	0.032	0.022	0.022	0.022	0.019	0.024	0.029	0.026	0.037	0.032	0.032	0.032	0.035	0.032	0.032	0.032	0.026	0.026	0.027	0.035	0.040	0.000														
27.CELO_RK1	0.032	0.032	0.032	0.032	0.022	0.022	0.022	0.019	0.024	0.029	0.026	0.037	0.032	0.032	0.032	0.035	0.032	0.032	0.032	0.026	0.026	0.027	0.035	0.040	0.000	0.000													
28.CEOB_RK1	0.032	0.032	0.032	0.032	0.022	0.022	0.022	0.019	0.024	0.029	0.026	0.037	0.032	0.032	0.032	0.035	0.032	0.032	0.032	0.026	0.026	0.027	0.035	0.040	0.000	0.000	0.000												
29.PFL_RK2	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.018	0.018	0.013	0.019	0.021	0.016	0.016	0.016	0.019	0.016	0.016	0.016	0.010	0.010	0.011	0.019	0.024	0.026	0.026	0.026	0.026											
30.PFL_RK3	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.018	0.018	0.013	0.019	0.021	0.016	0.016	0.016	0.019	0.016	0.016	0.016	0.010	0.010	0.011	0.019	0.024	0.026	0.026	0.026	0.026	0.000										
31.PIN_RK1	0.017	0.017	0.017	0.018	0.018	0.017	0.017	0.019	0.019	0.014	0.021	0.022	0.017	0.017	0.017	0.021	0.017	0.017	0.017	0.011	0.011	0.013	0.021	0.026	0.024	0.024	0.024	0.024	0.011	0.011									
32.PMI_RK4	0.017	0.017	0.017	0.018	0.018	0.017	0.017	0.019	0.019	0.014	0.021	0.022	0.017	0.017	0.017	0.021	0.017	0.017	0.017	0.011	0.011	0.013	0.021	0.026	0.024	0.024	0.024	0.024	0.011	0.011	0.000								
33.PMI_RK5	0.017	0.017	0.017	0.018	0.018	0.017	0.017	0.019	0.019	0.014	0.021	0.022	0.017	0.017	0.017	0.021	0.017	0.017	0.017	0.011	0.011	0.013	0.021	0.026	0.024	0.024	0.024	0.024	0.011	0.011	0.000	0.000							
34.PMI_RK7	0.017	0.017	0.017	0.018	0.018	0.017	0.017	0.019	0.019	0.014	0.021	0.022	0.017	0.017	0.017	0.021	0.017	0.017	0.017	0.011	0.011	0.013	0.021	0.026	0.024	0.024	0.024	0.024	0.011	0.011	0.000	0.000	0.000						
35.PTA_MR1	0.022	0.022	0.022	0.026	0.026	0.026	0.026	0.024	0.024	0.022	0.026	0.027	0.022	0.022	0.022	0.026	0.022	0.022	0.022	0.022	0.019	0.019	0.021	0.026	0.030	0.035	0.035	0.035	0.019	0.019	0.011	0.011	0.011	0.011					
36.PTA_PR1	0.024	0.024	0.024	0.027	0.027	0.027	0.024	0.026	0.026	0.024	0.027	0.029	0.024	0.024	0.024	0.027	0.024	0.024	0.024	0.024	0.021	0.021	0.022	0.027	0.032	0.034	0.034	0.034	0.021	0.021	0.021	0.013	0.013	0.013	0.013	0.002			
37.PTA_RK1	0.022	0.022	0.022	0.026	0.026	0.026	0.026	0.024	0.024	0.022	0.026	0.027	0.022	0.022	0.022	0.026	0.022	0.022	0.022	0.022	0.019	0.019	0.021	0.026	0.030	0.035	0.035	0.035	0.019	0.019	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.000	0.002		
38.PTAA_CM1	0.022	0.022	0.022	0.026	0.026	0.026	0.026	0.024	0.024	0.022	0.026	0.027	0.022	0.022	0.022	0.026	0.022	0.022	0.022	0.022	0.019	0.019	0.021	0.026	0.030	0.035	0.035	0.035	0.019	0.019	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.000	0.002	0.000	
39.PTAA_RK2	0.022	0.022	0.022	0.026	0.026	0.026	0.026	0.024	0.024	0.022	0.026	0.027	0.022	0.022	0.022	0.026	0.022	0.022	0.022	0.022	0.019	0.019	0.021	0.026	0.030	0.035	0.035	0.035	0.019	0.019	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.000	0.000	0.000	0.000
40.PTAA_RK3	0.022	0.022	0.022	0.026	0.026	0.026	0.026	0.024	0.024	0.022	0.026	0.027	0.022	0.022	0.022	0.026	0.022	0.022	0.022	0.022	0.019	0.019	0.021	0.026	0.030	0.035	0.035	0.035	0.019	0.019	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.000	0.002	0.000	0.000

ตาราง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbcL* ด้วยวิธี pairwise distance

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1.CCA_MR3																																
2.CCA_RK2	0.004																															
3.CCL_PR1	0.006	0.006																														
4.CCL_PR2	0.000	0.004	0.006																													
5.CDE_PH	0.006	0.002	0.007	0.006																												
6.CDE_RK	0.002	0.002	0.004	0.002	0.004																											
7.CHE_PH	0.004	0.004	0.006	0.004	0.006	0.002																										
8.CPU_MR	0.007	0.004	0.009	0.007	0.006	0.006	0.007																									
9.CRU_MR3	0.000	0.004	0.006	0.000	0.006	0.002	0.004	0.007																								
10.CRU_PR4	0.000	0.004	0.006	0.000	0.006	0.002	0.004	0.007	0.000																							
11.CRU_RK1	0.000	0.004	0.006	0.000	0.006	0.002	0.004	0.007	0.000	0.000																						
12.CRUA_RK	0.000	0.004	0.006	0.000	0.006	0.002	0.004	0.007	0.000	0.000	0.000																					
13.CSU_MR	0.000	0.004	0.006	0.000	0.006	0.002	0.004	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000																				
14.CTR_MR1	0.006	0.006	0.007	0.006	0.006	0.004	0.002	0.009	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006																			
15.CTR_NN	0.006	0.006	0.007	0.006	0.006	0.004	0.002	0.009	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.000																		
16.CTR_PR2	0.007	0.007	0.009	0.007	0.007	0.006	0.004	0.011	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.002	0.002																	
17.CTR_RK	0.007	0.007	0.009	0.007	0.007	0.006	0.004	0.011	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.002	0.002	0.000																
18.CVE_MR3	0.007	0.011	0.013	0.007	0.013	0.009	0.011	0.015	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.013	0.013	0.015	0.015															
19.CVE_MR4	0.000	0.004	0.006	0.000	0.006	0.002	0.004	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	0.006	0.007	0.007	0.007														
20.CELO_PH1	0.007	0.004	0.009	0.007	0.006	0.006	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.009	0.009	0.011	0.011	0.015	0.007													
21.CELO_PH2	0.006	0.002	0.007	0.006	0.004	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.007	0.007	0.009	0.009	0.013	0.006	0.006												
22.CELO_RK	0.006	0.002	0.007	0.006	0.004	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.007	0.007	0.009	0.009	0.013	0.006	0.006	0.000											
23.CEOB_RK	0.006	0.002	0.007	0.006	0.004	0.004	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.007	0.007	0.009	0.009	0.013	0.006	0.006	0.000	0.000										
24.PFL_RK2	0.002	0.002	0.004	0.002	0.004	0.000	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.004	0.006	0.006	0.009	0.002	0.006	0.004	0.004	0.004									
25.PFL_RK3	0.002	0.002	0.004	0.002	0.004	0.000	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.004	0.006	0.006	0.009	0.002	0.006	0.004	0.004	0.004	0.000								
26.PIN_RK	0.002	0.002	0.004	0.002	0.004	0.000	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.004	0.006	0.006	0.009	0.002	0.006	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000							
27.PMI_RK5	0.002	0.002	0.004	0.002	0.004	0.000	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.004	0.006	0.006	0.009	0.002	0.006	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000						
28.PMI_RK7	0.002	0.002	0.004	0.002	0.004	0.000	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.004	0.006	0.006	0.009	0.002	0.006	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000					
29.PTA_MR	0.002	0.002	0.004	0.002	0.004	0.000	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.004	0.006	0.006	0.009	0.002	0.006	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000				
30.PTA_RK1	0.002	0.002	0.004	0.002	0.004	0.000	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.004	0.006	0.006	0.009	0.002	0.006	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
31.PTAA_CM	0.002	0.002	0.004	0.002	0.004	0.000	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.004	0.006	0.006	0.009	0.002	0.006	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
32.PTAA_RK2	0.002	0.002	0.004	0.002	0.004	0.000	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.004	0.006	0.006	0.009	0.002	0.006	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
33.PTAA_RK3	0.002	0.002	0.004	0.002	0.004	0.000	0.002	0.006	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.004	0.004	0.006	0.006	0.009	0.002	0.006	0.004	0.004	0.004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

ตาราง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ด้วยวิธี pairwise distance

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1.CCL_PR1											
2.CDE_PH1	0.013										
3.CLY_RK1	0.021	0.035									
4.CLY_RK2	0.021	0.035	0.000								
5.CLY_RK3	0.021	0.035	0.000	0.000							
6.CMA_RK1	0.017	0.004	0.039	0.039	0.039						
7.CMA_RK4	0.017	0.004	0.039	0.039	0.039	0.000					
8.CSU_MR1	0.004	0.017	0.017	0.017	0.017	0.021	0.021				
9.CTR_MR1	0.030	0.017	0.053	0.053	0.053	0.021	0.021	0.035			
10.CTR_RK1	0.030	0.017	0.053	0.053	0.053	0.021	0.021	0.035	0.000		
11.PFL_RK2	0.042	0.046	0.028	0.028	0.028	0.051	0.051	0.042	0.066	0.066	
12.PTAA_RK2	0.035	0.044	0.017	0.017	0.017	0.049	0.049	0.030	0.063	0.063	0.011

ตาราง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ด้วยวิธี pairwise distance

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1.CCL_PR1																			
2.CMA_RK4	0.022																		
3.CMA_MR1	0.017	0.005																	
4.CHE_PH1	0.017	0.010	0.005																
5.CLY_RK1	0.005	0.022	0.017	0.017															
6.CLY_RK2	0.002	0.019	0.014	0.014	0.002														
7.CLY_RK3	0.005	0.022	0.017	0.017	0.000	0.002													
8.CPU_MR	0.005	0.022	0.017	0.017	0.000	0.002	0.000												
9.CSU_MR1	0.005	0.022	0.017	0.017	0.000	0.002	0.000	0.000											
10.CTR_PR2	0.014	0.007	0.002	0.002	0.014	0.012	0.014	0.014	0.014										
11.CTR_RK	0.014	0.007	0.002	0.002	0.014	0.012	0.014	0.014	0.014	0.000									
12.CELO_RK	0.024	0.027	0.022	0.022	0.024	0.022	0.024	0.024	0.024	0.019	0.019								
13.CEOB_RK	0.052	0.049	0.049	0.049	0.052	0.049	0.052	0.052	0.052	0.047	0.047	0.027							
14.PMI_RK4	0.029	0.031	0.027	0.022	0.029	0.027	0.029	0.029	0.029	0.024	0.024	0.034	0.059						
15.PMI_RK5	0.029	0.031	0.027	0.022	0.029	0.027	0.029	0.029	0.029	0.024	0.024	0.034	0.059	0.000					
16.PTA_PR	0.036	0.039	0.034	0.034	0.031	0.034	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.037	0.062	0.039	0.039				
17.PTA_RK	0.031	0.034	0.029	0.024	0.031	0.029	0.031	0.031	0.031	0.027	0.027	0.036	0.062	0.007	0.007	0.044			
18.PTA_MR	0.062	0.070	0.064	0.059	0.062	0.059	0.062	0.062	0.062	0.062	0.062	0.072	0.099	0.041	0.041	0.080	0.044		
19.PTAA_CM	0.091	0.099	0.094	0.088	0.091	0.088	0.091	0.091	0.091	0.091	0.091	0.099	0.127	0.064	0.064	0.104	0.072	0.099	
20.PFL_RK2	0.036	0.044	0.039	0.034	0.036	0.034	0.036	0.036	0.036	0.036	0.036	0.047	0.072	0.017	0.017	0.054	0.014	0.044	0.062

ตาราง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *rbcL* ด้วยวิธี pairwise distance

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1.CCA_MR3																														
2.CCA_RK2	0.002																													
3.CCL_PR1	0.015	0.015																												
4.CCL_PR2	0.012	0.014	0.003																											
5.CDE_PH1	0.015	0.013	0.005	0.004																										
6.CDE_RK1	0.013	0.013	0.003	0.003	0.002																									
7.CPU_MR1	0.015	0.014	0.008	0.007	0.006	0.006																								
8.CRU_MR3	0.002	0.003	0.015	0.012	0.015	0.013	0.015																							
9.CRU_PR4	0.003	0.005	0.016	0.014	0.016	0.015	0.017	0.003																						
10.CRU_RK1	0.000	0.002	0.015	0.012	0.015	0.013	0.015	0.002	0.003																					
11.CRUA_RK1	0.002	0.003	0.015	0.012	0.015	0.013	0.015	0.000	0.003	0.002																				
12.CSU_MR1	0.000	0.002	0.015	0.012	0.015	0.013	0.015	0.002	0.003	0.000	0.002																			
13.CTR_MR1	0.011	0.011	0.012	0.011	0.011	0.010	0.015	0.011	0.013	0.011	0.011	0.011																		
14.CTR_NN1	0.011	0.011	0.012	0.011	0.011	0.010	0.015	0.011	0.013	0.011	0.011	0.011	0.000																	
15.CTR_PR2	0.013	0.013	0.014	0.013	0.013	0.012	0.016	0.013	0.015	0.013	0.013	0.013	0.002	0.002																
16.CVE_MR3	0.007	0.009	0.020	0.017	0.020	0.018	0.021	0.007	0.005	0.007	0.007	0.007	0.016	0.016	0.018															
17.CVE_MR4	0.006	0.008	0.019	0.016	0.019	0.017	0.020	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.015	0.015	0.017	0.008														
18.CELO_PH1	0.021	0.019	0.016	0.015	0.013	0.013	0.017	0.021	0.022	0.021	0.021	0.021	0.018	0.018	0.020	0.026	0.025													
19.CELO_PH2	0.020	0.018	0.015	0.015	0.012	0.012	0.016	0.020	0.022	0.020	0.020	0.020	0.017	0.017	0.019	0.025	0.024	0.003												
20.CELO_RK1	0.020	0.018	0.015	0.015	0.012	0.012	0.016	0.020	0.022	0.020	0.020	0.020	0.017	0.017	0.019	0.025	0.024	0.003	0.000											
21.CEOB_RK1	0.020	0.018	0.015	0.015	0.012	0.012	0.016	0.020	0.022	0.020	0.020	0.020	0.017	0.017	0.019	0.025	0.024	0.003	0.000	0.000										
22.PFL_RK2	0.009	0.009	0.010	0.009	0.010	0.009	0.013	0.009	0.011	0.009	0.009	0.009	0.007	0.007	0.009	0.015	0.014	0.016	0.015	0.015	0.015									
23.PFL_RK3	0.009	0.009	0.010	0.009	0.010	0.009	0.013	0.009	0.011	0.009	0.009	0.009	0.007	0.007	0.009	0.015	0.014	0.016	0.015	0.015	0.015	0.000								
24.PIN_RK1	0.010	0.010	0.011	0.010	0.011	0.009	0.014	0.010	0.012	0.010	0.010	0.010	0.008	0.008	0.009	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.006	0.006							
25.PMI_RK5	0.010	0.010	0.011	0.010	0.011	0.009	0.014	0.010	0.012	0.010	0.010	0.010	0.008	0.008	0.009	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.006	0.006	0.000						
26.PMI_RK7	0.010	0.010	0.011	0.010	0.011	0.009	0.014	0.010	0.012	0.010	0.010	0.010	0.008	0.008	0.009	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.006	0.006	0.000	0.000					
27.PTA_MR1	0.013	0.013	0.015	0.015	0.015	0.014	0.016	0.013	0.015	0.013	0.013	0.013	0.012	0.012	0.014	0.018	0.017	0.022	0.021	0.021	0.021	0.010	0.010	0.006	0.006	0.006				
28.PTA_RK1	0.013	0.013	0.015	0.015	0.015	0.014	0.016	0.013	0.015	0.013	0.013	0.013	0.012	0.012	0.014	0.018	0.017	0.022	0.021	0.021	0.021	0.010	0.010	0.006	0.006	0.006	0.000			
28.PTAA_CM1	0.013	0.013	0.015	0.015	0.015	0.014	0.016	0.013	0.015	0.013	0.013	0.013	0.012	0.012	0.014	0.018	0.017	0.022	0.021	0.021	0.021	0.010	0.010	0.006	0.006	0.006	0.000	0.000		
30.PTAA_RK2	0.013	0.013	0.015	0.015	0.015	0.014	0.016	0.013	0.015	0.013	0.013	0.013	0.012	0.012	0.014	0.018	0.017	0.022	0.021	0.021	0.021	0.010	0.010	0.006	0.006	0.006	0.000	0.000	0.000	
31.PTAA_RK3	0.013	0.013	0.015	0.015	0.015	0.014	0.016	0.013	0.015	0.013	0.013	0.013	0.012	0.012	0.014	0.018	0.017	0.022	0.021	0.021	0.021	0.010	0.010	0.006	0.006	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000

ตาราง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ด้วยวิธี pairwise distance

	1	2	3	4	5	6	7
1.CCL_PR1							
2.CDE_PH1	0.007						
3.CLY_RK2	0.008	0.014					
4.CLY_RK3	0.008	0.014	0.000				
5.CSU_MR1	0.015	0.020	0.016	0.016			
6.CTR_MR1	0.021	0.016	0.028	0.028	0.023		
7.PFL_RK2	0.021	0.023	0.018	0.018	0.021	0.026	
8.PTAA_RK	0.027	0.030	0.020	0.020	0.023	0.033	0.013

ตาราง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ด้วยวิธี pairwise distance

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1.CCL_PR1															
2.CLY_RK2	0.004														
3.CLY_RK3	0.005	0.001													
4.CMA_MR1	0.018	0.018	0.019												
5.CPU_MR1	0.006	0.002	0.001	0.020											
6.CSU_MR1	0.015	0.013	0.012	0.018	0.013										
7.CTR_PR2	0.016	0.016	0.017	0.004	0.018	0.016									
8.CELO_RK1	0.023	0.023	0.024	0.026	0.025	0.029	0.024								
9.CEOB_RK1	0.034	0.034	0.035	0.037	0.036	0.040	0.035	0.010							
10.PFL_RK2	0.024	0.024	0.025	0.023	0.026	0.024	0.021	0.034	0.044						
11.PMI_RK4	0.022	0.022	0.023	0.019	0.024	0.022	0.017	0.028	0.038	0.013					
12.PMI_RK5	0.022	0.022	0.023	0.019	0.024	0.022	0.017	0.028	0.038	0.013	0.000				
13.PTA_MR1	0.040	0.038	0.039	0.039	0.040	0.038	0.037	0.050	0.060	0.029	0.023	0.023			
14.PTA_PR1	0.031	0.029	0.028	0.028	0.029	0.027	0.026	0.035	0.045	0.034	0.023	0.023	0.032		
15.PTA_RK1	0.028	0.026	0.027	0.025	0.028	0.026	0.023	0.036	0.046	0.017	0.010	0.010	0.017	0.018	
16.PTAA_CM1	0.051	0.049	0.050	0.050	0.051	0.049	0.048	0.060	0.070	0.036	0.032	0.032	0.038	0.041	0.028

ตาราง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbcL* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ด้วยวิธี pairwise distance

	1	2	3	4	5	6
1.CCL_PR1						
2.CDE_PH	0.010					
3.CSU_MR	0.005	0.011				
4.CTR_MR1	0.017	0.010	0.018			
5.CTR_RK	0.018	0.011	0.019	0.001		
6.PFL_RK2	0.015	0.017	0.014	0.024	0.025	
7.PTAA_RK2	0.015	0.019	0.012	0.026	0.027	0.002

ตาราง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbcL* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ด้วยวิธี pairwise distance

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.CCL_PR1												
2.CHE_PH	0.010											
3.CPU_MR	0.007	0.011										
4.CSU_MR	0.005	0.009	0.004									
5.CTR_PR2	0.011	0.003	0.013	0.010								
6.CTR_RK	0.011	0.003	0.013	0.010	0.000							
7.CELO_RK	0.015	0.013	0.014	0.014	0.014	0.014						
8.CEOB_RK	0.026	0.024	0.025	0.025	0.025	0.025	0.011					
9.PFL_RK2	0.018	0.016	0.019	0.017	0.019	0.019	0.022	0.033				
10.PMI_RK5	0.015	0.010	0.016	0.014	0.014	0.014	0.017	0.027	0.007			
11.PTA_MR	0.029	0.026	0.030	0.027	0.030	0.030	0.033	0.044	0.019	0.018		
12.PTA_RK1	0.016	0.011	0.017	0.015	0.015	0.015	0.018	0.029	0.006	0.003	0.019	
13.PTAA_CM	0.040	0.038	0.042	0.039	0.042	0.042	0.044	0.055	0.026	0.027	0.042	0.031

ตาราง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ด้วยวิธี pairwise distance

	1	2	3	4	5	6	7
1.CCL_PR1							
2.CLY_RK1	0.009						
3.CLY_RK2	0.008	0.001					
4.CLY_RK3	0.009	0.000	0.001				
5.CMA_RK4	0.019	0.026	0.025	0.026			
6.CSU_MR1	0.004	0.004	0.006	0.004	0.021		
7.CTR_RK1	0.021	0.028	0.027	0.028	0.013	0.024	
8.PFL_RK2	0.033	0.028	0.027	0.028	0.041	0.033	0.043

ตาราง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ร่วมกับยีน *rbcL* และบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ด้วยวิธี pairwise distance

	1	2	3	4	5
1.CCL_PR1					
2.CDE_PH1	0.007				
3.CSU_MR1	0.012	0.015			
4.CTR_MR1	0.017	0.012	0.017		
5.PFL_RK2	0.015	0.017	0.015	0.018	
6.PTAA_RK2	0.019	0.021	0.016	0.023	0.009

ตาราง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ร่วมกับยีน *rbcL* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ด้วยวิธี pairwise distance

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.CCL_PR1									
2.CSU_MR1	0.012								
3.CTR_PR2	0.014	0.013							
4.CELO_RK1	0.018	0.021	0.019						
5.CEOB_RK1	0.025	0.028	0.026	0.007					
6.PFL_RK2	0.017	0.016	0.016	0.023	0.030				
7.PMI_RK5	0.016	0.015	0.013	0.020	0.026	0.009			
8.PTA_MR1	0.027	0.025	0.026	0.034	0.040	0.019	0.015		
9.PTA_RK1	0.020	0.018	0.017	0.025	0.031	0.011	0.006	0.011	
10.PTAA_CM1	0.035	0.033	0.033	0.040	0.047	0.023	0.021	0.025	0.018

ตาราง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ด้วยวิธี pairwise distance

	1	2	3	4
1.CCL_PR1				
2.CLY_RK2	0.006			
3.CLY_RK3	0.007	0.001		
4.CSU_MR1	0.012	0.012	0.011	
5.PFL_RK2	0.026	0.023	0.024	0.026

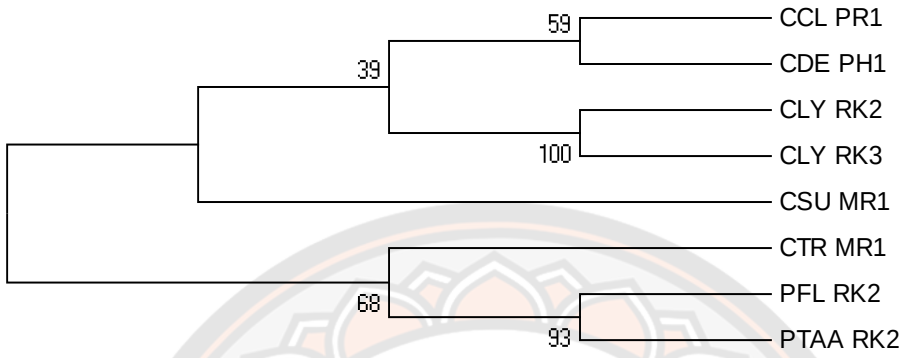
ตาราง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbcL* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ด้วยวิธี pairwise distance

	1	2	3
1.CCL_PR1			
2.CSU_MR	0.005		
3.CTR_RK	0.017	0.017	
4.PFL_RK2	0.022	0.021	0.029

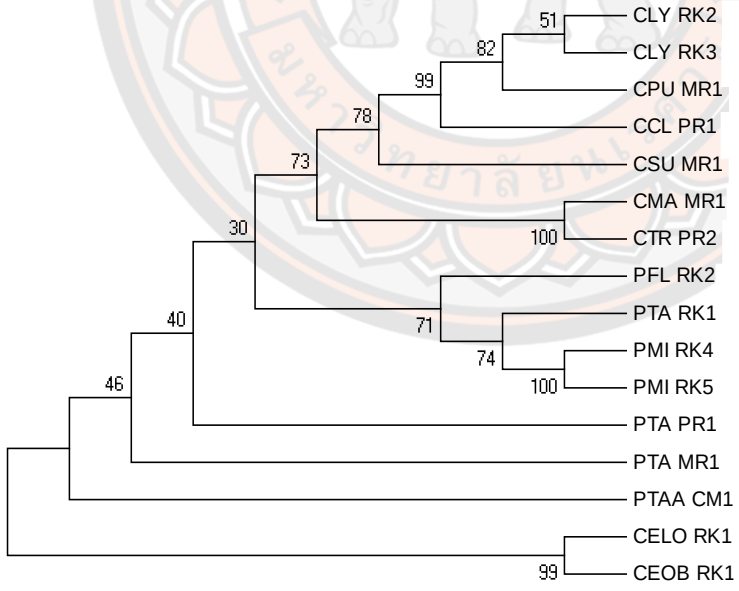
ตาราง ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ร่วมกับยีน *rbcL* บริเวรระหว่างยีน *psbA-trnH* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ด้วยวิธี pairwise distance

	1	2
1.CCL_PR1		
2.CSU_MR1	0.010	
3.PFL_RK2	0.020	0.019

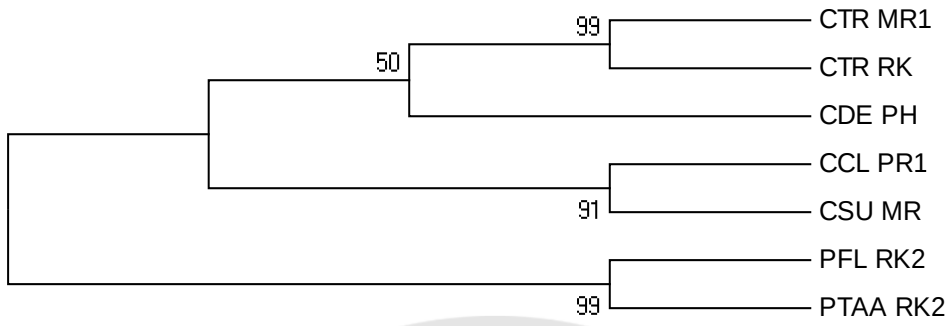
ภาคผนวก ซ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน



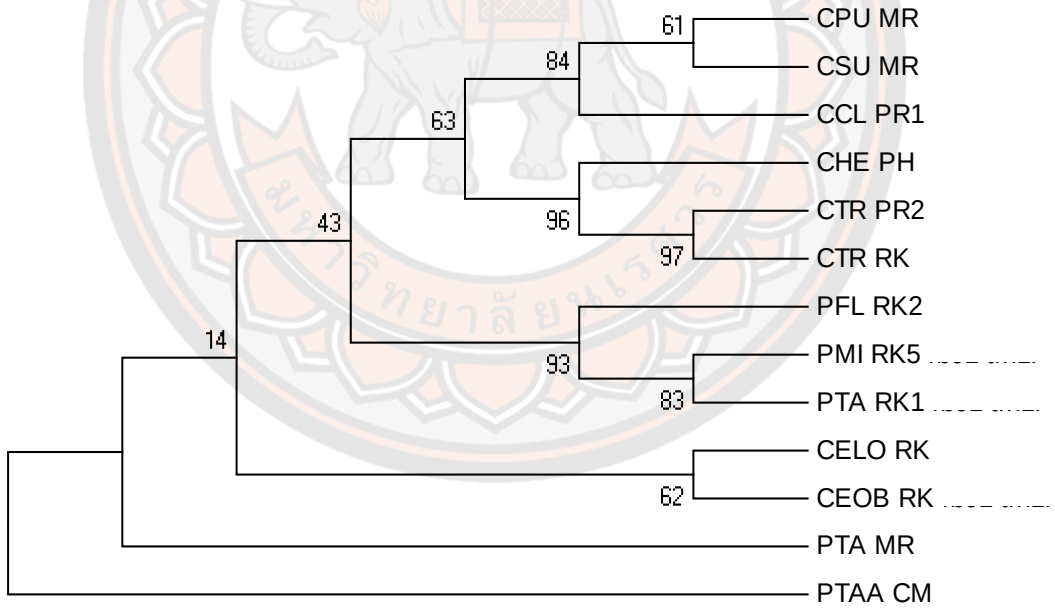
ภาพ Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *matK* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* โดยใช้วิธี UPGMA



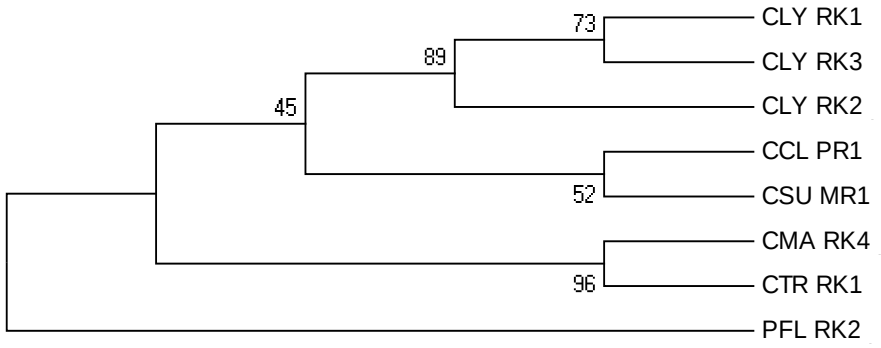
ภาพ Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *matK* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* ใช้วิธี UPGMA



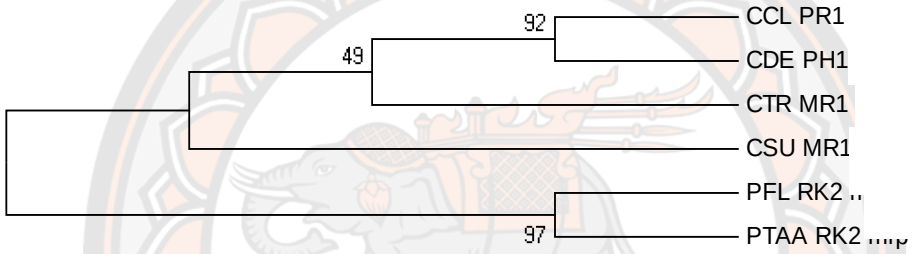
ภาพ Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *rbcL* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* โดยใช้วิธี UPGMA



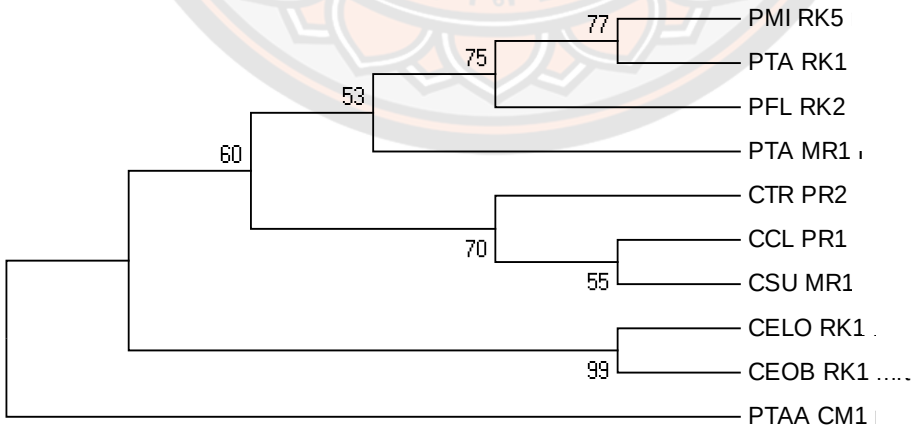
ภาพ Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *rbcL* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* โดยใช้วิธี UPGMA



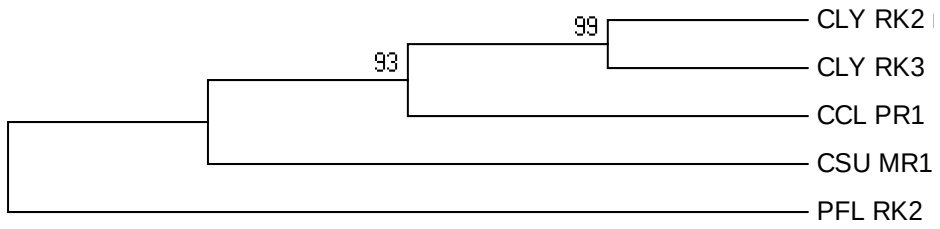
ภาพ Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ร่วมกับบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* โดยใช้วิธี UPGMA



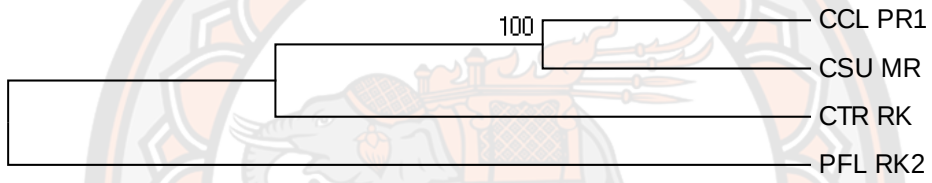
ภาพ Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ยีน *rbcL* และบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* โดยใช้วิธี UPGMA



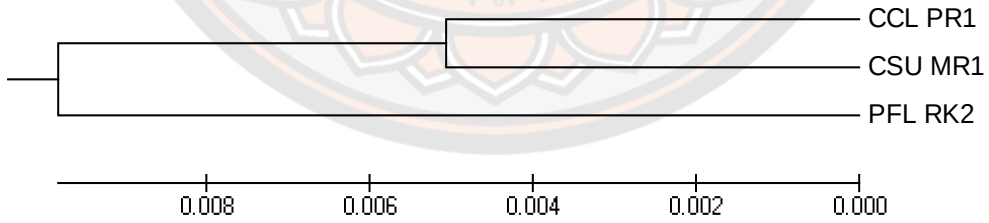
ภาพ Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ยีน *rbcL* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* โดยใช้วิธี UPGMA



ภาพ Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* โดยใช้วิธี UPGMA



ภาพ Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *rbcL* บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* โดยใช้วิธี UPGMA



ภาพ Phylogenetic tree ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *matK* ยีน *rbcL* บริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-trnF* โดยใช้วิธี UPGMA