Thai J. Genet. 2013, 6(1) : 1-10

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลช้าง (*Rhynchostylis* Bl.; Orchidaceae) ด้วยวิธี Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Genetic relationship of *Rhynchostylis* Bl. (Orchidaceae) based on Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

ธนากร วงษศา[1] อภินันท์ ลิ้มมงคล[2] และอนุพันธ์ กงบังเกิด[3]*

Thanakorn Wongsa[1], Apinun Limmongkon[2], Anupan Kongbangkerd[3]*

[1]โปรแกรมวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร กำแพงเพชร 62000

[2]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

[3]หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

[1]Biology Program, Faculty of Science and Technology, Kamphaeng Phet Rajabhat University, Kamphaeng Phet 62000

[2]Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000

[3]Plant Tissue Culture Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000

** Corresponding author: anupank@nu.ac.th*

บทคัดย่อ

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลช้าง (*Rhynchostylis* Bl.) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) พบว่ามีไพรเมอร์ *Eco*RI-*Mse*I จำนวน 15 คู่ไพรเมอร์ สามารถแยกความแตกต่างของตัวอย่างที่ศึกษาทั้ง 23 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบว่ากล้วยไม้สกุลช้าง 4 กลุ่ม ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1,522 แถบ เป็นแถบที่ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง 1,504 แถบ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ Polymorphism เท่ากับ 98.72 เปอร์เซ็นต์ การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA และ PCoA พบว่าสามารถจัดแบ่งกลุ่มย่อยของไอยเรศ (*R. retusa*) และ ไอยเรศน่าน (*Rhynchostylis* sp.) ได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้การจัดกลุ่มด้วยวิธี AFLP ยังมีความสอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้สกุลช้าง

ABSTRACT

Study of genetic relationship among *Rhynchostylis* species using Amplified Fragment

Length Polymorphism (AFLP) technique showed that fifteen AFLP primer combinations (*Eco*RI-*Mse*I) were able to distinguish all 23 samples. The results showed that 4 groups of *Rhynchostylis* generated a total of 1,522 fragments, of which 1,504 fragments (98.72 %) were polymorphic. The UPGMA and PCoA cluster analysis resulted in clearly separated *Rhynchostylis* sp. from *R. retusa* Bl. Besides, the molecular classification based on AFLP technique was in good agreement with morphological classifications of *Rhynchostylis*.

คำสำคัญ: กล้วยไม้สกุลช้าง, เครื่องหมาย AFLP, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

Keywords: *Rhynchostylis*, AFLP marker, genetic relationship

บทนำ

กล้วยไม้สกุลช้าง *Rhynchostylis* Bl. (Orchidaceae) จัดเป็นพืชหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นกล้วยไม้ที่ได้รับความนิยมในการปลูกเลี้ยงทั้งในและต่างประเทศ เนื่องจากเป็นกล้วยไม้ที่สวยงามทั้งรูปทรง ต้น ช่อดอก และมีกลิ่นหอมมาก กล้วยไม้สกุลช้าง พบได้ทั่วไป 3 ชนิด และ 2 ชนิดย่อย (WSCP, 2012) คือ ช้างกระ (*R. gigantea*) เขาแกะ (*R. coelestis*) ไอยเรศ (*R. retusa*) มีเขตการกระจายพันธุ์ตั้งแต่ อินเดีย จีนตอนใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ พม่า ลาว เวียดนาม ไทย กัมพูชา มาเลเซีย และ *R. gigantea* subsp. *violacea* พบที่ประเทศฟิลิปปินส์ ส่วนช้างค่อม (*R. gigantea* subsp. *gigantea*) นั้นพบปะปนกับช้างกระทั่วไป แต่มีลักษณะใบป้อมสั้นกว่าช้างกระ ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลช้าง พบว่ามีกล้วยไม้ที่เรียกว่าไอยเรศน่าน (*Rhynchostylis* sp.) พบที่จังหวัดน่าน (อนุพันธ์ และคณะ, 2550) มีลักษณะของดอกที่มีความคล้ายกันกับกลุ่มไอยเรศ แต่ลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการที่มีความแตกต่างออกไป นอกจากนี้ยังมีรายงานการสำรวจกล้วยไม้ไอยเรศน่านในประเทศลาว แต่ยังไม่มีการระบุชนิด (Svengsuksa and Lamzai, 2005) ด้วยเหตุนี้การจัดกลุ่มของกล้วยไม้ไอยเรศน่านให้อยู่ในกลุ่มของไอยเรศ โดยอาศัยลักษณะที่สังเกตได้จากภายนอกเพียงอย่างเดียวนั้น จึงอาจจะยังไม่มีความถูกต้องและชัดเจนมากนัก ในปัจจุบันข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลช้าง ยังไม่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวาง รวมทั้งข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลช้าง ยังมีค่อนข้างจำกัด มีเพียงรายงานการศึกษาการจัดกลุ่มของกล้วยไม้สกุลช้าง จากความแปรปรวนทางพันธุกรรมตามลักษณะของสีดอก ด้วยเครื่องหมาย RAPD (สุพัตรา และวีณัน, 2548) รวมถึงการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไอยเรศ ด้วยเครื่องหมาย RAPD และ ISSR (Parab and Krishnan, 2008) แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงการจัดจำแนกกล้วยไม้สกุลช้างในระดับพันธุกรรมที่ชัดเจน ซึ่งการศึกษาโดยใช้เครื่องหมาย AFLP มีข้อดีมากกว่าเครื่องหมาย RAPD หลายประการ โดยเฉพาะการทำซ้ำแต่ละครั้งให้ผลการทดลองที่แน่นอน และให้ข้อมูลทางพันธุกรรมครอบคลุมทั้งจีโนมของพืช ดังนั้นเป็นสิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งในการศึกษาข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมในระดับชีววิทยาโมเลกุลของกล้วยไม้สกุลช้าง เพื่อเป็นข้อมูลในการจัดจำแนกประเภทของกล้วยไม้สกุลช้าง และใช้ในการศึกษาความหลากหลายทาง

พันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลช้างต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลช้างและวิธีการสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างกล้วยไม้สกุลช้างจำนวน 23 ตัวอย่าง ได้แก่ ช้างกระ (*R. gigantea*) 9 ตัวอย่าง เขาแกะ (*R. coeleatis*) 3 ตัวอย่าง ไอยเรศ (*R. retusa*) 5 ตัวอย่าง และไอยเรศน่าน (*Rhynchostylis* sp.) 6 ตัวอย่าง (Table 1) โดยนำใบอ่อนของตัวอย่างทั้งหมดมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Doyle and Doyle (1987) หรือสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ NucleoSpin® Plant (Macherey-Nagel) ซึ่งดีเอ็นเอจากทั้ง 2 วิธี มีคุณภาพที่ดี และสามารถนำมาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค AFLP ได้ไม่แตกต่างกัน (ธนากร และคณะ, 2551)

Table 1 Detail of Thailand *Rhynchostylis* species used in this study.

Name of the species	Accession code	Source
Rhynchostylis gigantea	Rg1/ Rg39	Nakhon Sawan/ Sakon Nakhon
R. gigantea var. *harrisonianum*	Rg30, Rg33	Cultivated (white)- Nakhon Sawan
R. gigantea var. *rubrum*	Rg27, Rg28	Cultivated (red)-Nakhon Sawan
R. gigantea var. *petiolata*	Rg40/ Rg2	Kamphaeng Phet/ Nakhon Sawan
R. gigantea var. *gigantea*	Rg21	Tak
R. retusa	Rr1, Rr2/ Rr3/ Rr7,Rr8	Krabi/ Phrae/ Tak
R. coelestis	Rc3/ Rc8/ Rc10	Nakhon Sawan/ Tak/ Cultivated (Pink)-Kamphaeng Phet
Rhynchostylis sp.	R.sp1- R.sp6	Nan

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก 4 กลุ่มตัวอย่างของ ช้างกระ (*R. gigantea*) เขาแกะ (*R. coeleatis*) ไอยเรศ (*R. retusa*) และไอยเรศน่าน (*Rhynchostylis* sp.) มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ตามวิธีการของ Vos *et al.* (1995) โดยนำดีเอ็นเอมาตัดอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Eco*RI และ *Mse*I จากนั้นเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ adaptor นำดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ adaptor มาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ครั้ง โดยการเพิ่มปริมาณครั้งแรก (pre-selective amplification) ใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือก 1 เบสที่ปลาย 3' ได้แก่ E.A (5'-GACTGCGTACCAATTCA-3') และ M.C (5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3') ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ 72°C 2 นาที ตามด้วย 20 รอบ ของ 94°C 30 วินาที, 56°C 1 นาที และ 72°C 1 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ในครั้งแรกมาเพิ่มปริมาณครั้งที่สอง (selective amplification) ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ 1 รอบ ที่ 94°C 30 วินาที, 65°C 30 วินาที และ 72°C 1 นาที แล้วลดอุณหภูมิช่วง annealing (65°C) ลงรอบละ 0.7°C จำนวน 12 รอบ และต่อด้วยรอบสุดท้ายที่ 94°C 30 วินาที, 56°C 30 วินาที และ 72°C 1 นาที โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกจำนวน 3 เบส คือ E-ANN 8 ไพร

เมอร์ และ M-CNN 8 ไพรเมอร์ จากนั้นคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม ต่อการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากทั้งหมด 64 คู่ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 15 คู่ (E-ACC/M-CAA, E-ACT/M-CAA, E-AGG/M-CAA, E-ACC/M-CAG, E-ACG/M-CAT, E-AGC/M-CAT, E-AGG/M-CAT, E-ACC/M-CTA, E-ACG/M-CTA, E-ACA/M-CTC, E-AGG/M-CTC, E-ACT/M-CTG, E-AGC/M-CTG, E-AGG/M-CTG, E-AGC/M-CAA) ที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในพอลิอะคริลาไมด์เจล 6 เปอร์เซ็นต์ และย้อมเจลด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท ด้วยวิธีของ Benbouza *et al.* (2006)

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธี AFLP มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยแปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างกล้วยไม้สกุลช้าง 23 ตัวอย่าง โดยให้สัญลักษณ์เป็น “1” เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้สัญลักษณ์เป็น “0” เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.20e (Rohlf, 2000) สร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA; Sneath and Sokal, 1973) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ด้วยวิธี Jaccard’s similarity coefficients (Jaccard, 1908) จัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี principal coordinate analysis (PCoA) คำนวณค่า Mantel’s correlation test (cophenetic correlation coefficient, r; Mantel, 1967; Sokal and Rohlf, 1994) และประเมินความเชื่อมั่นของแผนภูมิทางพันธุกรรม โดยการทำ bootstrap ด้วยโปรแกรม freetree (Hampl *et al.*, 2001)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลช้าง ซึ่งเป็นรายงานการศึกษาครั้งแรก โดยวิเคราะห์ข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค AFLP ของกล้วยไม้สกุลช้างทั้งหมด 23 ตัวอย่าง จากคู่ไพรเมอร์ 15 คู่ พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 1,522 แถบ มีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน 1,504 แถบ และมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันจำนวน 19 แถบ คิดเป็นร้อยละของ polymorphism เท่ากับ 98.72 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังพบคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอ ที่จำเพาะต่อชนิดพันธุ์ (Figure 1)

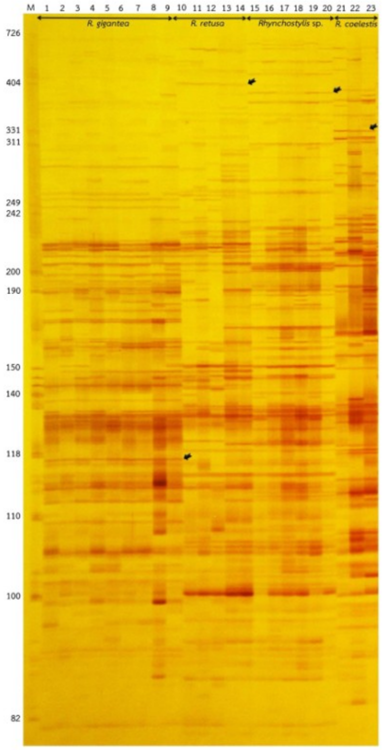

Figure 1 AFLP profile generated using primer pair E-AGC/M-CAT, *R. gigantea* (1-9) *R. retusa* (10-14) *Rhynchostylis* sp. (15-20) and *R. coelestis* (21-23). Arrows show unique molecular bands specific for different *Rhynchostylis* groups.

จำนวนหลายแถบดีเอ็นเอ (Table 2) ซึ่งแถบดีเอ็นเอเหล่านี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมาย Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) เพื่อใช้ตรวจสอบชนิดพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วอีกด้วย เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือนและความแตกต่างของ Jaccard's similarity coefficients (Table 3) และนำไปจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA พบว่าการจัดกลุ่มกล้วยไม้สกุลช้างทั้ง 23 ตัวอย่าง สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มเขาแกะ (*R. coelestis*) จำนวน 3 ตัวอย่าง กลุ่มที่สอง คือ กลุ่มช้างกระ (*R. gigantea*) จำนวน 9 ตัวอย่าง กลุ่มที่สาม คือ ไอยเรศ (*R. retusa*) จำนวน 5 ตัวอย่าง และกลุ่มที่สี่ คือ กลุ่มไอยเรศน่าน (*Rhynchostylis* sp.) จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยแต่ละกลุ่มมีค่า Jaccard's similarity coefficients อยู่ในช่วง 0.4297-0.6152, 0.5331-0.8839, 0.4070-0.8535 และ 0.5157-0.8381 ตามลำดับ (Table 3)

Table 2 Number of unique molecular bands specific each *Rhynchostylis* species detected upon AFLP analysis using primer combination

Primer pair	Number of unique marker				Total number of unique marker per primer pair
	R. gigantea	*R. coelestis*	*R. retusa*	*Rhynchostylis* sp.	
E-ACT/M-CAA	5	5	2	5	17
E-AGG/M-CAA	7	3	2	3	15
E-AGC/M-CAT	10	14	4	7	35
E-AGG/M-CAT	3	7	4	6	20
Total	25	29	12	11	87

Table 3 Minimum-Maximum Percentage similarity matrix from 23 *Rhynchostylis* accessions generated form Jaccard's similarity coefficient

	R. gigantea	*R. retusa*	*R. coelestis*	*Rhynchostylis* sp.
R. gigantean	0.5331-0.8839			
R. retusa	0.2212-0.2975	0.4070-0.8535		
R. coelestis	0.1579-0.1958	0.1450-0.2154	0.4297-0.6152	
Rhynchostylis sp.	0.2088-0.2839	0.2906-0.4205	0.1696-0.2108	0.5157-0.8381

การจัดกลุ่มทั้งแบบ UPGMA (Figure 2) และ PCoA (Figure 3) จากข้อมูลการศึกษาด้วย AFLP พบว่าให้ผลสอดคล้องกับความสัมพันธ์ของการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เมื่อพิจารณากล้วยไม้ในกลุ่มเขาแกะ พบว่ามีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของลำต้น ใบ และลักษณะช่อดอก (Figure 4G, 4H) แตกต่างจากกล้วยไม้สกุลช้างกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน กล้วยไม้ใน

กลุ่มเขาแกะจึงถูกจัดแยกออกเป็นกลุ่มแรกจากกล้วยไม้สกุลช้างกลุ่มอื่นๆ (Figure 2 และ 3) สำหรับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างกล้วยไม้กลุ่มช้างกระนั้น มีทั้งตัวอย่างที่ได้มาจากธรรมชาติและจากการปลูกเลี้ยงคัดเลือกสายพันธุ์ พบว่า มีความแปรปรวนของลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แสดงออก ได้แก่ ความแปรปรวนของสีดอกที่มีความหลากหลายตั้งแต่ ดอกสีขาวทั้งดอก (ช้างเผือก: *R. gigantea* var. *harrisonianum*; Figure 4M) ดอกสีแดงทั้งดอก (ช้างแดง: *R. gigantea* var. *rubrum*; Figure 4L) ดอกที่มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกสีขาวแต่กลีบปากมีสีชมพู (ช้างประหลาด: *R. gigantea* var. *petiolata*; Figure 4J และ 4N) หรือ ดอกที่มีกลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีจุดกระสีชมพู (ช้างกระ: *R. gigantea*; Figure 4I) หรือต้นที่มีลักษณะของใบใหญ่และสั้น เป็นสันชี้ขึ้น (ช้างค่อม*: R. gigantea* var. *gigantea*; Figure 4K) เมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP พบว่าตัวอย่างทั้ง 9 ตัวอย่าง มีลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ถึงแม้ว่าตัวอย่างที่ศึกษานั้นมาจากต่างแหล่งกันก็ตาม หรือตัวอย่างที่มีสีดอกต่างกันก็ตาม แต่ยังคงมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน โดยผลจากการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และ PCoA จัดไว้ในกลุ่มช้างกระกลุ่มเดียวกัน

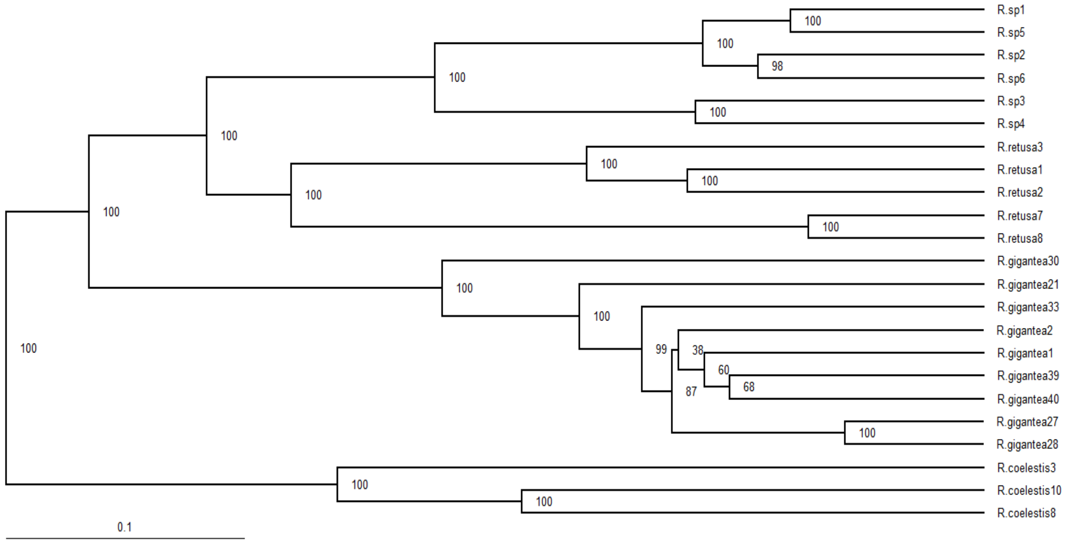
R.sp1
R.sp5
R.sp2
R.sp6
R.sp3
R.sp4
R.retusa3
R.retusa1
R.retusa2
R.retusa7
R.retusa8
R.gigantea30
R.gigantea21
R.gigantea33
R.gigantea2
R.gigantea1
R.gigantea39
R.gigantea40
R.gigantea27
R.gigantea28
R.coelestis3
R.coelestis10
R.coelestis8
100
100
98
100
100
100
100
100
100
100
100
100
100
99
38
60
87
68
100
100
100
100
0.1

Figure 2 Dendrogram of 23 *Rhynchostylis* accessions resulting from the UPGMA cluster analysis based on Jaccard's similarity coefficients values obtained from the AFLP data. Node support was estimated with 1,000 bootstrap replicates.

ในกลุ่มที่สามและกลุ่มที่สี่ คือ กลุ่มของไอยเรศจำนวน 5 ตัวอย่าง และกลุ่มไอยเรศน่าน (*Rhynchostylis* sp.) จำนวน 6 ตัวอย่าง เป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์กันมากกว่ากล้วยไม้สกุลช้างในกลุ่มอื่น แม้ว่าตัวอย่างของกลุ่มไอยเรศมาจากแหล่งตัวอย่างต่างกัน คือ แพร่ ตาก และกระบี่ ในการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA และ PCoA นั้นได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรม ที่มีความใกล้ชิดกันกับกล้วยไม้กลุ่มไอยเรศน่าน จากจังหวัดน่าน แต่ไม่พบว่ามีตัวอย่างของกลุ่มไอยเรศและไอยเรศน่าน อยู่รวมกันในกลุ่มบนกิ่งเดียวกันแต่อย่างใด (Figure 2) แม้ว่าไอยเรศ

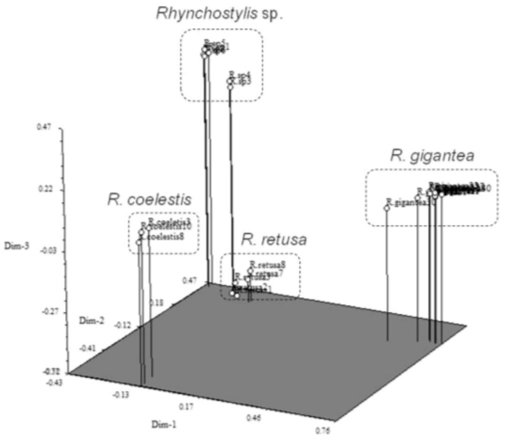

Figure 3 Pattern of relationships among 23 *Rhynchostylis* accessions revealed by Principal coordinate analysis (PCoA) based on AFLP.

น่านมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา สีของปลายรากที่เป็นสีแดงเข้ม (Figure 4F) ความกว้างของใบเฉลี่ย 2.97 ซม. และความยาวใบเฉลี่ย 26.61ซม. มากกว่าของไอยเรศ (Figure 4E) ซึ่งมีความกว้างของใบเฉลี่ย 1.84 ซม. และความยาวใบเฉลี่ย 19.11 ซม. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (n=10 ; $p<0.05$) อีกทั้งบริเวณปลายใบและโคนใบของไอยเรศน่านยังมีลักษณะเป็นจุดม่วง หรือเป็นปื้นสีม่วงแดง (Figure 4B และ 4O) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับลักษณะของใบช้างแดงอีกด้วย เมื่อนำข้อมูล AFLP มาวิเคราะห์จัดกลุ่มด้วยวิธี PCoA ที่มีองค์ประกอบหลักที่ 1, 2 และ 3 ครอบคลุมความแปรปรวน 24.57, 19.44 และ 12.52 เปอร์เซ็นต์ ของความแปรปรวนทั้งหมด

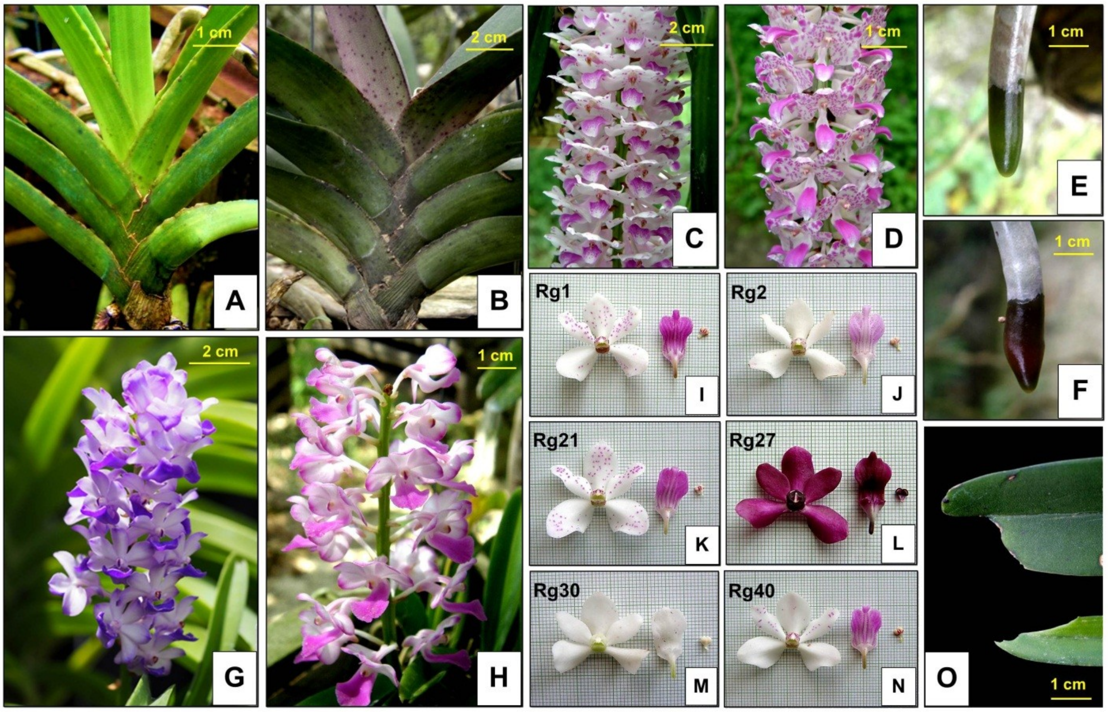

Figure 4 Morphology of *Rhynchostylis*; *R. retusa* [stem (A), leaf apex (O-lower), root tip (E), inflorescence (C)] *Rhynchostylis* sp. [stem (B), leaf apex (O-upper), root tip (F), inflorescence (D)] *R. coelestis* [blue (G), pink flower (H)] and *R. gigantea* (I-N). See color figure on the journal website.

ตามลำดับ และมีความสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA (Figure 2) อีกทั้งการจัดกลุ่มด้วยวิธี PCoA ชี้ชัดถึงการแยกกลุ่มของไอยเรศน่านเป็นกลุ่มย่อยจากกลุ่มไอยเรศอย่างชัดเจนอีกด้วย (Figure 3) และเมื่อพิจารณาถึงค่า cophenetic correlation coefficient (r) ซึ่ง Sirithunya *et al.* (2001) รายงานว่า ค่า r ที่อยู่ระหว่าง 0.9-1.0 มีความสอดคล้องของค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมที่ได้จากกระบวนการจัดกลุ่ม กับค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเริ่มต้นค่อนข้างมากที่สุด จากผลการทดลอง r = 0.99 ถือว่าค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมที่ได้จากกระบวนการจัดกลุ่ม สอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมเริ่มต้นมากที่สุด หรือแสดงว่าข้อมูลที่ได้มีความน่าเชื่อถือสูง (Mantel, 1967; Sokal and Rohlf, 1994; Spooner *et al.*, 2005)

จากการศึกษาของ พรพันธ์ และคณะ (2544) โดยศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้าง และสกุลใกล้เคียงโดยใช้คลอโรพลาสต์ยีน *rbc* L และ *pet* A และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*I และ *Hae*III พบว่ายังไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลช้าง ได้แก่ ช้างกระ ช้างเผือก ช้างแดง ไอยเรศ และเขาแกะ ออกเป็นกลุ่มที่ชัดเจนได้ ในขณะที่ข้อมูลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP ในการศึกษานี้ สามารถแยกกล้วยไม้สกุลช้างออกเป็นกลุ่มเขาแกะ ช้างกระ ไอยเรศ และ ไอยเรศน่านได้อย่างชัดเจน เนื่องจากวิธี AFLP ให้ข้อมูลที่แสดงความแตกต่างของการจัดกลุ่มได้ดีกว่าข้อมูลจาก PCR-RFLP (Lin *et al.*, 1996) หรือจากการใช้ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่สามารถแสดงให้เห็นถึงความผันแปรที่เกิดขึ้นได้ (Despres *et al.*, 2003; Spooner *et al.*, 2005) นอกจากนี้วิธี AFLP ยังมีข้อดี คือมีความน่าเชื่อถือในการทำซ้ำสูงและได้ผลการทดลองที่เหมือนเดิม นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ให้ข้อมูลจำนวนมากต่อการทำแต่ละครั้ง ซึ่งข้อดีเหล่านี้มีประโยชน์อย่างมาก สำหรับการศึกษาและจำแนกกลุ่มของพืชบางชนิดที่มีความใกล้ชิดกัน (Spooner *et al.*, 2005)

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลช้างด้วยวิธี AFLP จำนวน 23 ตัวอย่าง โดยจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA และ PCoA พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน คือสามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มช้างกระ กลุ่มเขาแกะ และกลุ่มไอยเรศ โดยข้อมูล AFLP สามารถแยกไอยเรศน่าน (*Rhynchostylis* sp.) ออกจากกลุ่มไอยเรศเป็นกลุ่มย่อยชัดเจน ซึ่งมีความเป็นไปได้ในการจัดไอยเรศน่าน (*Rhynchostylis* sp.) เป็นชนิดย่อยของไอยเรศ หรือสายพันธุ์ย่อยของไอยเรศต่อไป อีกทั้งยังพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อไปใช้ประโยชน์ในการจำแนกสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลช้างต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมจิตต์ หอมจันทร์ ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด ดร.ปราณี นางงาม และ ดร.ประสุข โฆษวิฑิตกุล ที่ได้ให้คำแนะนำและช่วยเหลือ แก้ไขปัญหาต่างๆ ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวรที่สนับสนุนทุนในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

พรพันธ์ ภู่พร้อมพันธ์ ขนิษฐา ดวงสงค์ และรัฐพล ศรีเผื่อน (2542) รายงานการวิจัยเรื่อง การตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ไทยสกุลแวนด้าฟ้ามุ่ย (DNA fingerprinting of Thai native orchid *Vanda coerulea*) มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ธนากร วงษศา อภินันท์ ลิ้มมงคล และอนุพันธ์ กงบังเกิด (2551) การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้าง. NU Sci J 5: 165–175.

สุพัตรา เจริญภักดี และวีณัน บัณฑิตย์. (2548) การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับลักษณะดอกของกล้วยไม้สกุลช้าง. วารสารเกษตร. 21: 99–105.

อนุพันธ์ กงบังเกิด สานิตย์ ศรีเริญ และธนากร วงษศา (2550) ความหลากหลายของกล้วยไม้บริเวณป่าชุมชนหมู่บ้านมณีพฤกษ์ ตำบลงอบ อำเภอทุ่งช้าง จังหวัดน่าน. NU Sci J 4: 177–187.

Benbouza H, Jacquemin JM, Baudoin JP and Mergeai G (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. Biotechnol Agron Soc Environ 10: 77–81.

Despres L, Gielly L, Redoutet B and Taberlet P (2003) Using AFLP to resolve phylogenetic relations in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. Mol Phylogenet Evol 27:185–196.

Doyle J and Doyle J (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull 19: 11–15.

Hampl V, Pavlícek A and Flegr J (2001) Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with a freeware program FreeTree: Application to Trichomonad parasites. Int J Syst Evol Microbiol 51: 731–735.

Jaccard P (1908) Nouvelles recherché sur la distribution florale. Bull Soc Vaud Sci Nat 44: 223–270.

Lin JJ, Kuo J, Ma J, Saunders JA, Beard HS, MacDonald MH, Kenworthy W, Ude GN and Matthews BF (1996) Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. Plant Mol Biol Rep 14: 156–169.

Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalizes regression approach. Cancer Res. 27: 209–220.

Parab GV and Krishnan S. (2008) Assessment of genetic variation among populations of *Rhynchostylis retusa*, an epiphytic orchid from Goa, India using ISSR and RAPD markers. Indian J Biotechnol. 7: 313–319.

Rohlf FJ (2000) NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.02e. User Guide. Exeter Software, Se tauket, New York, New York, USA.

Sirithunya P, Roumn E, Mongkolsamrit S, Sriprakhon S, Hutamekalin P, Mayteeworakoon S. and Sreewongchai T. (2001) Molecular Genetic Analysis of Diversity of Blast Pathogen in Thailand. Yothee Laboratory Unit. Bangkok.

Sneath PHA and Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy. Freeman and Co., San Francisco.

Sokal RR and Rohlf J (1994) Biochemistry: The Principle and Practice of Statistics in Biological Research. 3rd ed. Freeman and Co. New York.

Spooner DM, Peralta IE and Knapp S (2005) Comparison of AFLP with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [*Solamun* L. section Lycopersicon (Mill.) Wettst.]. Taxon 54: 43–61.

Svengsuksa B. and Lamzai V. (2005) Field guide the wild orchids of P.D.R. Vientiane Lao PDR: National University of Lao PDR.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M (1995) AFLP, a new technique for DNA finger printing. Nucleic Acids Res 23: 4407–4414.

WCSP (2012) World Checklist of Selected Plant Families. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew, http://apps.kew.org/wcsp/ (3 June 2012)