

การวิเคราะห์องค์ประกอบของแอนโทไซยานิน
และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของดอกกล้วยไม้ช้าง

Analysis of Anthocyanin Components and Genetic Relationship
of *Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl. Flower

ณัฐดนัย สุเมธาโชติพงษ์^{1*}, กรวรรณ ศรีงาม², วีณัน บัณฑิตย์^{1,3} และ ณัฏฐา โพธารมณ¹
Natdanai Sumaythachotphong^{1*}, Korawan Sringarm², Weenun Bundithya^{1,3}
and Nuttha Potapohn¹

¹ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

¹Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

²Department of Animal and Aquatic Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

³ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (AG-BIO/PERDO-CHE) จ.นครปฐม 73140

³Center of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science and Technology Postgraduate Education and Research
Development Office, Commission on Higher Education (AG-BIO/PERDO-CHE), Nakhon Pathom 73140, Thailand

*Corresponding author: Email: donn027@hotmail.com

(Received: 26 April 2017; Accepted: 19 July 2017)

Abstract: *Rhynchostylis gigantea* is an epiphytic orchid commonly found in Thailand. Generally, there are four varieties of this species, pure white flower (*R. gigantea* var. *harrisoniana*), white with red-spots, white with red-blotches and solid red flower (*R. gigantea* var. *rubrum*). Recently, the new hybrid types having orange and pink-orange flowers have been developed. Thus, Anthocyanin pigment components of flower colors of this species are of interest to study. HPLC technique was used to identify pigments of *R. gigantea* flowers. Genetic variation of *R. gigantea* flowers was studied by RAPD technique using 20 random primers. It was found that primers OPF01, OPF04, OPF05, OPF06, OPF09, OPF12 and OPF14 were able to reveal genetic variation especially OPF01 and OPF06. The selected primers could classify *R. gigantea* varieties into 3 groups with relevance to flower color characteristics and anthocyanin derivatives. The first group was pure white flower which did not have anthocyanin derivative in flower. The next group having 78% genetic similarity was composed of white with red-spots and white with red-blotches flowers, the main components in flower colors were pelargonidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, delphinidin and kuromanin. The last group was dark red and orange flowers with 65.6% genetic similarity contained kuromanin, pelargonidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, delphinidin and cyanidin as main components in flower colors.

Keywords: *Rhynchostylis gigantea*, flower color, pigment, HPLC, RAPD, genetic relationship

บทคัดย่อ: กล้วยไม้ช้าง (*Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl.) เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย และเป็นกล้วยไม้พื้นถิ่นของประเทศไทย โดยทั่วไปมี 4 สายพันธุ์ คือ ช้างเผือก (ดอกสีขาวล้วน) ช้างกระ (ดอกสีขาวมีจุดสีม่วงแดงกระจายบนกลีบดอก) ช้างพลาย (ดอกสีขาวมีแต้มหรือปื้นสีม่วงแดงกระจายบนกลีบดอก) และช้างแดง (ดอกสีม่วงแดงเข้ม) ปัจจุบันกล้วยไม้ช้างได้รับการปรับปรุงพันธุ์ให้มีสีสันใหม่ ๆ ออกมา เช่น ช้างส้ม (ดอกสีส้มอมชมพูอ่อน) และช้างชมพู (ดอกสีชมพูอมม่วงอ่อน) เป็นต้น จึงน่าจะมีการศึกษาองค์ประกอบของสารให้สีในกลุ่มแอนโทไซยานินในดอกกล้วยไม้ช้าง การใช้เทคนิคเอชพีแอลซีเพื่อจำแนกสารให้สีในกลีบดอก และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้างโดยเทคนิคอาร์เอฟดีที่ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 20 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ OPF01, OPF04, OPF05, OPF06, OPF09, OPF12 และ OPF14 สามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้ โดยไพรเมอร์ OPF01 และ OPF06 สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดแบ่งกลุ่มสายพันธุ์กล้วยไม้ช้างออกเป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะสีที่ปรากฏบนกลีบดอก สารให้สีที่เป็นองค์ประกอบของสีดอกและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยกลุ่มที่ 1 ได้แก่ ช้างเผือก ไม่ปรากฏสารให้สีในกลุ่มแอนโทไซยานินในดอก กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ช้างกระและช้างพลาย มีพื้นที่ขาวและมีจุดหรือแต้มสีม่วงแดง พบ pelargonidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, delphinidin และ kuromanin เป็นองค์ประกอบหลักของสีดอก มีความเหมือนทางพันธุกรรม 78% ส่วนกลุ่มที่ 3 ได้แก่ ช้างแดงและช้างส้ม มีพื้นที่สีทึบ พบ kuromanin, pelargonidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, delphinidin และ cyanidin เป็นองค์ประกอบหลัก มีความเหมือนทางพันธุกรรม 65.6%

คำสำคัญ: กล้วยไม้ช้าง สีดอก สารให้สี เอชพีแอลซี อาร์เอฟดี ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

คำนำ

ประเทศไทยสามารถผลิตกล้วยไม้ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้หลายสกุล เป็นผู้ผลิตกล้วยไม้ที่สำคัญของโลก มีปริมาณและมูลค่าการส่งออกสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง จึงมีการศึกษาค้นคว้าเพื่อพัฒนาการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ให้ต้นทุนการผลิตต่ำลง เพิ่มปริมาณและคุณภาพให้สูงขึ้น มีการปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์ใหม่ๆ ที่เป็นสายพันธุ์การค้าให้มีความหลากหลายมากขึ้น เพื่อตอบสนองต่อความต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ โดยเฉพาะการพัฒนาและการผลิตกล้วยไม้ไทยพันธุ์แท้และกล้วยไม้ไทยลูกผสม ซึ่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศไทย เช่น กล้วยไม้ช้าง ตลอดจนชนิดและสกุลใกล้เคียง เป็นต้น

กล้วยไม้ช้าง (*Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl.) เป็นกล้วยไม้พื้นถิ่นของประเทศไทยที่มีเอกลักษณ์เฉพาะชนิด ลักษณะเด่นคือ ความสวยงามของช่อดอกที่มีความหลากหลายในด้านสีสันและลวดลายบนกลีบดอก และมีกลิ่นหอม (ณัฐา, 2545) จึงเป็นที่ต้องการของตลาดและมีแนวโน้มของความต้องการเพิ่มขึ้น กล้วยไม้ช้างอยู่ในเผ่า (tribe) Vandaeae ซึ่งเป็นเผ่าที่มีความหลากหลาย

ทางพันธุกรรมสูง เช่น สกุลช้าง (*Rhynchostylis*) สกุลกุหลาบ (*Aerides*) สกุลเข็ม (*Ascocentrum*) และสกุลแวนด้า (*Vanda*) เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถผสมพันธุ์กันได้ ทั้งในสกุลเดียวกันและข้ามสกุล ทำให้มีความหลากหลายด้านสายพันธุ์ ทั้งรูปทรง พอร์มดอก สีสัน และกลิ่น (ครรชิต, 2547)

สีของดอกไม้เกิดจากการสะสมสารให้สีที่แตกต่างกัน เช่น คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ และแอนโทไซยานิน (Kazama *et al.*, 2003) สีของดอกกล้วยไม้ที่เป็นสารให้สีในกลุ่มแอนโทไซยานินเป็นสารให้สีที่ละลายน้ำได้ ซึ่งพบในแวคิวโอลของเซลล์ให้สีแดง-ม่วง-น้ำเงินในดอกไม้ ปัจจุบันได้มีการค้นพบ 6 ชนิดหลัก ได้แก่ pelargonidin, cyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin และ malvidin (นิตยา และคณะ, 2551) การศึกษาสารให้สีในกลุ่มแอนโทไซยานินครั้งแรกในดอกกล้วยไม้พันธุ์ *Dendrobium comutum* Hook. f และ *Dendrobium crocatum* Hook. f พบว่าเป็นชนิด cyanidin-3-glucoside (Lowry and Keong, 1973) ต่อมาได้มีการค้นพบ cyanidin-3-(6-malonylglucoside)-7, 3'-di-(4-glucosyl-p-hydroxybenzoyl glucoside) ในดอกกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* พันธุ์ Pramot ซึ่งเป็นดอก

กล้วยไม้ที่มีสีแดงม่วง (Saito *et al.*, 1994) และ Tatsuzawa *et al.* (2004) ได้พบ cyanidin 3, 7, 3'-triglucoside และ delphinidin 3, 7, 3'-triglucoside ในกล้วยไม้สกุลแวนด้าลูกผสม

กล้วยไม้สกุลช้างมีสีของกลีบดอกอยู่ในโทนสีแดง-ม่วง-ชมพู ปัจจุบันได้รับการพัฒนาพันธุ์โดยการผสมข้ามสายพันธุ์หรือข้ามสี ให้ดอกมีสีสันและลวดลายที่แตกต่างหลากหลาย ทำให้ยากต่อการจำแนกหรือแบ่งกลุ่มสายพันธุ์ การใช้เครื่องหมายโมเลกุล โดยเฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้บ่งชี้ความจำเพาะของพืชชนิดหนึ่งหรือสายพันธุ์หนึ่ง สามารถใช้จำแนกความแตกต่างในระดับจีโนมได้ ซึ่งเกิดจากความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์หรือเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545) ดังนั้นการวิเคราะห์สารให้สีกลุ่มแอนโทไซยานินและอนุพันธ์ในดอกกล้วยไม้ช้าง โดยเทคนิคเอสพีแอลซี ประกอบกับการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เพื่อการจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์และจัดแบ่งกลุ่มสายพันธุ์ภายในชนิด (species) เดียวกัน โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ช้าง จึงเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์และเป็นแนวทางในการพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้สกุลช้างและกลุ่มสกุลใกล้เคียง เพื่อการผลิตเชิงการค้าต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

กล้วยไม้ช้างที่ใช้ในการศึกษา 5 สายพันธุ์ คือ ช้างเผือก ช้างกระ ช้างพลาย ช้างแดง และช้างส้ม (ภาพที่ 1) โดยใช้ตัวอย่างดอกกล้วยไม้ช้างจาก 5 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 3 ต้น (3 ช่อ) การศึกษาแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ 1) วิเคราะห์สารให้สีกลุ่มแอนโทไซยานินและอนุพันธ์ในดอกกล้วยไม้ช้าง โดยสกัดสารให้สีตามวิธีการของ Rodriguez-Saona and Wrolstad (2005) คัดแยกสารให้สีและทำให้บริสุทธิ์ตามลำดับขั้น (sequential extractions) ตามวิธีการของ Durst and Wrolstad (2005) และ Rodriguez-Saona and Wrolstad (2005) วิเคราะห์รูปแบบ ชนิด และปริมาณของสารให้สี โดยใช้เครื่อง HPLC รุ่น CLASS-VP V 6.14 SP2 (Shimadzu, Japan) ตามวิธีการของ Junka

et al. (2007) และใช้สารละลายมาตรฐาน 8 ชนิด คือ cyanin, kuromanin, keracyanin, pelargonidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, delphinidin, cyanidin และ pelargonidin ในการวิเคราะห์อนุพันธ์ของแอนโทไซยานิน และ 2) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้าง โดยสกัดจีโนมดีเอ็นเอจากดอกกล้วยไม้ช้าง ตามวิธีการ CTAB คัดแปลงของ Taywiya *et al.* (2008) และ แสงทอง และคณะ (2559) คัดกรองไพรเมอร์อาร์เอพีดีสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ตามวิธีการของ Taywiya *et al.* (2008) และ Phengprachanh *et al.* (2013) จากไพรเมอร์ OPF 20 ไพรเมอร์ และคัดเลือกไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ โดยคำนวณขนาดโมเลกุลด้วยโปรแกรม Gene Tool และประมวลผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วย Gene Directory โดยใช้ UPGMA cluster analysis เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตามลักษณะสีที่ปรากฏบนกลีบดอกกล้วยไม้ช้าง

ผลการทดลองและวิจารณ์

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสีดอกกล้วยไม้ช้าง

สารให้สีกลุ่มแอนโทไซยานินเป็นสารประกอบที่อยู่ในกลุ่มของสารประกอบฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารให้สีธรรมชาติและจัดเป็นสารทุติยภูมิที่พบในพืช (Grotewold, 2006) ปัจจุบันได้มีการค้นพบ anthocyanidins ทั้งหมดประมาณ 20 ชนิด แต่มี 6 ชนิดหลัก ที่เป็นที่รู้จักและได้มีการศึกษาค้นคว้าเชิงลึก ได้แก่ pelargonidin, cyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin และ malvidin ซึ่งแต่ละชนิดมีสีที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับความเป็นกรด-เบส (pH) ชนิดและจำนวนน้ำตาลที่มาเกาะ และจำนวน aliphatic หรือ aromatic acid (Mazza and Miniati, 1993) จำนวนของ hydroxyl group (-OH) และ/หรือ methyl group (-CH₃) ณ ตำแหน่ง R3' และ R5' บนวงแหวน B (Tanaka *et al.*, 2008)



Figure 1. Five varieties of *Rhynchosstylis gigantea* (1: white flower; 2: white with red pink-spots flower; 3: white with red-blotches flower; 4: dark red flower and 5: orange flower)

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสีดอกกล้วยไม้ช้างและการกระจายตัวของสารให้สีในกลุ่มแอนโทไซยานิน โดยแยกวิเคราะห์ในกลีบดอก (sepal และ petal) และกลีบปาก (lip) ด้วยเทคนิคเอชพีแอลซี พบว่าดอกของช้างกระ ช้างพลาย และช้างแดง ซึ่งอยู่ในกลุ่มสีชมพู-ม่วงแดง มีสารให้สีที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ pelargonidin-3-O-glucoside ทั้งกลีบดอกและกลีบปาก ในกลีบปากมีปริมาณสารสีสูงกว่าในกลีบดอก โดยช้างแดงพบ pelargonidin-3-O-glucoside ทั้งในกลีบดอกและกลีบปากสูงสุด ปรากฏที่ retention time (RT) 29.76 และ 29.42 (ภาพที่ 2G: peak ที่ 18 และ ภาพที่ 2H: peak ที่ 24) มีปริมาณ 7.61 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ในกลีบดอก และ 11.04 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ในกลีบปาก (ตารางที่ 1) ตามลำดับ รองลงมาคือ ช้างพลาย ปรากฏที่ RT 29.47 และ 29.66 (ภาพที่ 2E: peak ที่ 6 และ ภาพที่ 2F: peak ที่ 10) มีปริมาณ 1.72 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ในกลีบดอก และ 7.49 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ในกลีบปาก (ตารางที่ 1) และช้างกระ ปรากฏที่ RT 29.43 และ 29.38 (ภาพที่ 2C: peak ที่ 1 และ ภาพที่ 2D: peak ที่ 3) มีปริมาณ 0.23 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ในกลีบดอก และ 0.86 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ในกลีบปาก (ตารางที่ 1) ตามลำดับ

ส่วนสารให้สีที่เป็นองค์ประกอบรองคือ peonidin-3-O-glucoside โดยช้างแดงมีปริมาณมากที่สุด ปรากฏที่ RT 30.30 และ 29.89 (ภาพที่ 2G: peak ที่ 19 และ ภาพที่ 2H: peak ที่ 24) คือ 2.33 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ในกลีบดอก และ 2.23 มิลลิกรัม ต่อ 100

กรัม น้ำหนักสด ในกลีบปาก (ตารางที่ 1) ตามลำดับ รองลงมาคือช้างพลาย ปรากฏที่ RT 29.98 และ 30.18 (ภาพที่ 2E: peak ที่ 7 และ ภาพที่ 2F: peak ที่ 11) มีปริมาณ 0.07 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ในกลีบดอก และ 0.79 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ในกลีบปาก (ตารางที่ 1) ตามลำดับ และช้างกระ ปรากฏที่ RT 30.05 และ 30.02 (ภาพที่ 2C: peak ที่ 2 และ ภาพที่ 2D: peak ที่ 4) มีปริมาณ 0.13 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ในกลีบดอก และ 0.74 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักสด ในกลีบปาก (ตารางที่ 1) ตามลำดับ และ cyanidin, delphinidin, keracyanin หรือ antirrhinin (cyanidin-3-O-rutinoside), kuromanin หรือ chrysanthemin (cyanidin-3-O-glucoside) และ cyanin พบเฉพาะช้างแดงและช้างพลาย ซึ่งในกลีบดอกช้างแดง ปรากฏที่ RT 34.25, 32.32, 28.89, 28.42 และ 24.49 (ภาพที่ 2G: peak ที่ 21; ภาพที่ 2G: peak ที่ 20; ภาพที่ 2G: peak ที่ 17; ภาพที่ 2G: peak ที่ 16 และ ภาพที่ 2G: peak ที่ 14) ตามลำดับ ส่วนกลีบปาก พบ cyanidin, delphinidin, kuromanin และ cyanin (cyanidin-3,5-O-diglucoside) ปรากฏที่ RT 33.48, 31.72, 28.20 และ 24.76 (ภาพที่ 2H: peak ที่ 27; ภาพที่ 2H: peak ที่ 26; ภาพที่ 2G: peak ที่ 23 และ ภาพที่ 2G: peak ที่ 22) ตามลำดับ และในกลีบดอกช้างพลาย พบ cyanidin, delphinidin, keracyanin และ kuromanin ปรากฏที่ RT 33.74, 31.94, 28.62 และ 28.16 (ภาพที่ 2E: peak ที่ 41; ภาพที่ 2E: peak ที่ 40; ภาพที่ 2E: peak ที่ 6 และ ภาพที่ 2E: peak ที่ 5) ตามลำดับ ส่วนกลีบปาก พบ cyanidin, delphinidin, kuromanin และ cyanin ปรากฏที่ RT 34.11, 32.26, 28.35 และ 24.68 (ภาพที่ 2F: peak

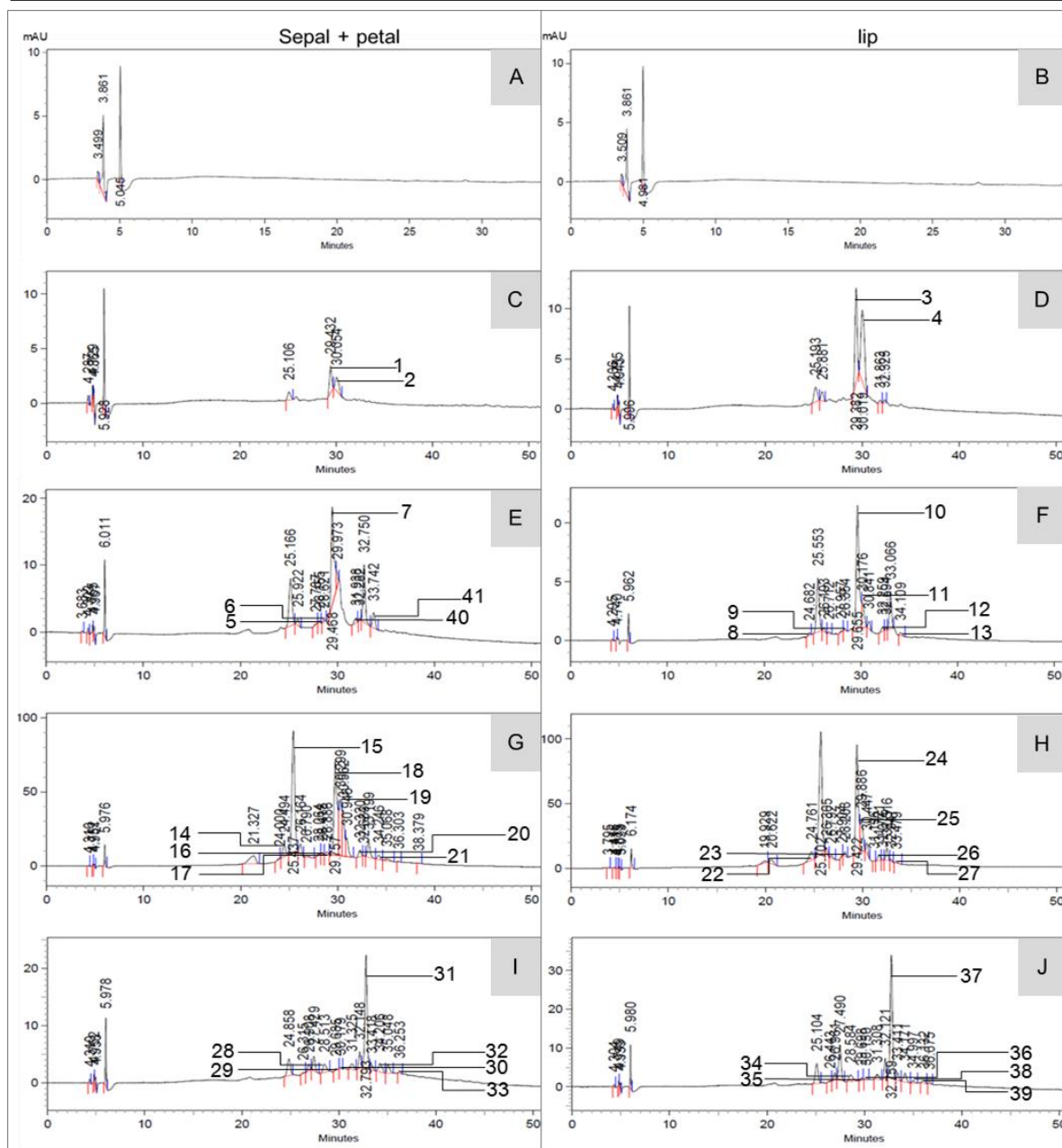


Figure 2. HPLC Chromatographs of anthocyanin derivatives from five varieties of *Rhynchosyilis gigantean* (A: white flower (sepal+petal); B: white flower (lip); C: white with red pink-spots flower (sepal+petal); D: white with red pink-spots flower (lip); E: white with red-blotches flower (sepal+petal); F: white with red-blotches flower (lip); G: dark red flower (sepal+petal); H: dark red flower (lip); I: orange flower (sepal+petal) and J: orange flower (lip))

Table 1. Anthocyanin derivatives content of *Rhynchosstylis gigantea* flower

Anthocyanin derivatives (mg/100g fresh weight)	R1		R2		R3		R4		R5	
	Sepal	lip	Sepal	lip	Sepal	lip	Sepal	lip	Sepal	lip
	+petal		+petal		+petal		+petal		+petal	
Cyanin	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	0.12	0.90	1.24	Nd.	Nd.
Kuromanin	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	0.03	0.14	0.07	0.43	0.34	0.65
Keracyanin	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	0.03	Nd.	0.16	Nd.	Nd.	Nd.
Cyanidin	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	0.62	Nd.	0.84	0.47	0.70	1.30
Peonidin-3-O-glucoside	Nd.	Nd.	0.13	0.74	0.07	0.79	2.33	2.26	0.03	0.06
Delphinidin	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	0.07	0.12	0.38	0.45	1.97	4.31
Pelargonidin-3-O-glucoside	Nd.	Nd.	0.23	0.86	1.72	7.49	7.61	11.04	0.03	0.10
Pelargonidin	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	Nd.	0.20	0.76

R1: white flower; R2: white with red pink-spots flower; R3: white with red-blotches flower; R4: dark red flower and R5: orange flower; Nd. = Not detected; (Shimadzu CLASS-VP V 6.14 SP2; 520 nm; LOD = 0.005 mg/100g; LOQ = 0.01 mg/100g)

ที่ 13; ภาพที่ 2F: peak ที่ 12; ภาพที่ 2F: peak ที่ 9 และ ภาพที่ 2F: peak ที่ 8) ตามลำดับ

ในดอกช้างล้มซึ่งอยู่ในโหนดสีส้มอมชมพู-ม่วง (กลีบปากสีชมพู-ม่วง) มีสารให้สีที่เป็นองค์ประกอบหลัก คือ delphinidin ทั้งกลีบดอกและกลีบปาก ซึ่งในกลีบปาก มีปริมาณสารสีสูงกว่าในกลีบดอก โดยปรากฏที่ retention time (RT) 32.78 และ 32.79 (ภาพที่ 2I: peak ที่ 31 และ ภาพที่ 2J: peak ที่ 37) มีปริมาณ 1.97 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ในกลีบดอก และ 4.31 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ในกลีบปาก ตามลำดับ องค์ประกอบรอง คือ cyanidin ปรากฏที่ RT 34.28 และ 34.21 (ภาพที่ 2I: peak ที่ 32 และ ภาพที่ 2J: peak ที่ 38) มีปริมาณ 0.70 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ในกลีบดอก และ 1.30 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ในกลีบปาก (ตารางที่ 1) ตามลำดับ และยังพบ pelargonidin kuromanin และ peonidin-3-O-glucoside โดยกลีบดอก ปรากฏที่ RT 36.43 28.55 และ 30.19 (ภาพที่ 2I: peak ที่ 33; ภาพที่ 2I: peak ที่ 28 และ ภาพที่ 2I: peak ที่ 30) ตามลำดับ ส่วนกลีบปาก ปรากฏที่ RT 36.25 28.51 และ 30.18 (ภาพที่ 2J: peak ที่ 30; ภาพที่ 2J: peak ที่ 39 และ ภาพที่ 2J: peak ที่ 35) ตามลำดับ

สารให้สีในดอกกล้วยไม้หลายชนิดเป็นสารให้สี กลุ่มแอนโทไซยานิน ซึ่งทำให้เกิดสีน้ำเงิน ม่วง แดง ชมพู (Junka *et al.*, 2007) และสีส้ม พบอยู่ในรูปของออกซิเนียมไอออน (oxonium ion) (Jackman and Smith, 1996) การศึกษาในกุหลาบมาลัยแดง (*Aerides multiflora*) และ ไอยเรศ (*Rhynchosstylis retusa*) โดยเฉพาะไอยเรศซึ่งอยู่ในสกุลช้างและมีดอกคล้ายกันกับช้างกระและช้างพลาย พบ pelargonidin และ cyanidin เป็นองค์ประกอบหลักของสารให้สีในกลีบดอก และฟ้ามุ่ย (*Vanda coerulea*) พบ delphinidin เป็นองค์ประกอบหลัก (นิตยา และคณะ, 2551) นอกจากนี้ kuromanin และ keracyanin ยังพบได้ในช้างแดง การศึกษาในครั้งนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์แท้และลูกผสม (*Dendrobium gouldii* K280-6, *Dendrobium bigibbum* 'blue' และ *Dendrobium Kultana* 'blue') ที่มีสีดอกอยู่ในกลุ่มสีส้มอมชมพู (peach-colored flowers) พบว่ามีสารให้สีชนิด pelargonidin glucoside เป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนกลุ่มสีม่วงแดง ม่วงน้ำเงิน ม่วงปนเหลือง ม่วงอมเทาปนเหลือง หรือเหลือง อมส้ม และน้ำตาล ซึ่งสีดอกดังกล่าวประกอบด้วยสารให้สีชนิด cyanidin เป็นหลัก และ peonidin เป็นองค์ประกอบรอง (Kuehnle *et al.*, 1997)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

- การคัดกรองไพรเมอร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้าง 5 สายพันธุ์ (ช้างเผือก ช้างกระ ช้างพลาย ช้างแดง และช้างลัม) โดยใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดีในการคัดกรองเบื้องต้น ใช้ไพรเมอร์กลุ่ม OPA, OPD, OPF และ OPG และพบว่าไพรเมอร์กลุ่ม OPF สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้ช้างได้ดี (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF01-20 พบว่าไพรเมอร์ OPF01, OPF04, OPF05, OPF06, OPF09, OPF12 และ OPF14 สามารถทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอต้นแบบ ปรากฏเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอหลายแถบที่ชัดเจน และมีความแตกต่างกันทั้งหมด 161 แถบ โดยไพรเมอร์ OPF01 และ OPF06 ให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันชัดเจนในแต่ละตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้างแต่ละตัวอย่าง แสดงผลดังนี้ ไพรเมอร์ OPF01 และ OPF06 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง 38 และ 19 แถบ ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ซึ่งไพรเมอร์อาร์เอพีดีมีความเหมาะสมและ

ให้ผลดีในกล้วยไม้หลายชนิด เช่นการศึกษากล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิสและสกุลใกล้เคียง 36 ตัวอย่าง จาก 30 ชนิด ซึ่งเป็นตัวแทนของ 8 หมู่ ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่ามี 6 ไพรเมอร์ คือ OPAK10, OPD03, OPF01, OPF02, OPF09 และ OPF14 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และมีความแตกต่างกันทั้งหมด 82 แถบ (Taywiya *et al.*, 2008) และไพรเมอร์อาร์เอพีดี 12 ชนิด สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 98 แถบ (87.5%) ในกล้วยไม้วิ้งแคระ (มัลลิกา และคณะ, 2557) การศึกษากล้วยไม้สกุลช้าง 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มเขาแกะ ได้แก่ เขาแกะเผือก และเขาแกะธรรมดา 2) กลุ่มช้าง ได้แก่ ช้างแดง ช้างเผือก ช้างกระ และช้างประหลาด โดยใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดี 24 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ที่สามารถนำมาจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกลุ่มเขาแกะได้ คือ ไพรเมอร์ OPAK01, OPAK11, OPD16, OPF10, OPF12 และ OPF16 ส่วนกลุ่มช้าง คือ ไพรเมอร์ OPAK10, OPD06, OPD10, OPF07 และ OPF10 (สุพิศตรา และวิณัน, 2548)

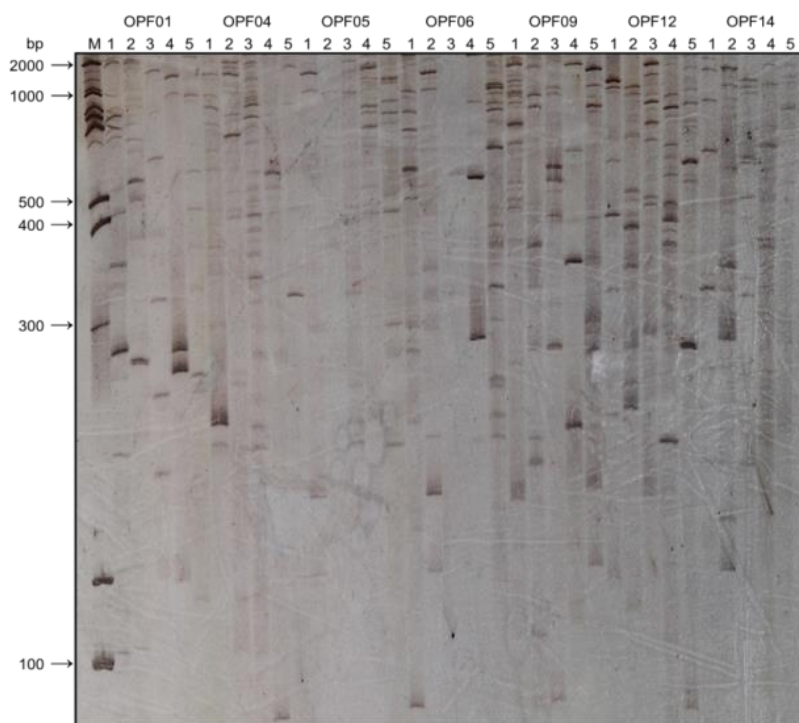


Figure 3. Polymorphic profiles of *Rhynchosstylis gigantea* by 7 RAPD primers (1: white flower; 2: white with red pink-spots flower; 3: white with red-blotches flower; 4: dark red flower and 5: orange flower; M: 100 bp plus marker)

- การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้าง

เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์ทั้งหมดมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้ช้างตามลักษณะสีดอกได้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) แต่เมื่อพิจารณาการจัดกลุ่มจากแต่ละไพรเมอร์ พบว่ามีความสอดคล้อง เมื่อทำซ้ำยังให้ผลเช่นเดิม โดยไพรเมอร์คัดเลือก OPF01 และ OPF06 เมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการใช้ไพรเมอร์เดี่ยวและรวม พบว่าแต่ละไพรเมอร์สามารถจำแนกกล้วยไม้ช้างเผือก ช้างกระ ช้างพลาย ช้างแดง และช้างส้ม ได้ 2 กลุ่มหลักที่มีความเหมือนกันทางพันธุกรรม 38% กลุ่มที่ 1 มีพีนกลีบดอกสีขาว ได้แก่ ช้างเผือก ช้างกระ และช้างพลาย มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม 58% และ 66% เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF01 และ OPF06 ตามลำดับ ในกลุ่มแรกนี้ สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ 1.1 ช้างเผือก พีนกลีบดอกสีขาวล้วน (ไม่มีจุดกระ) 1.2 ช้างกระและช้างพลาย พีนกลีบดอกสีขาวมีจุดกระและแต้มสีม่วงแดง โดยไพรเมอร์ OPF01 และ OPF06 สามารถจัดกลุ่มช้างกระกับช้างพลาย ได้ที่ความเหมือนทางพันธุกรรม 75% และ 83% ตามลำดับ (ภาพที่ 4 และ ภาพที่ 5) และกลุ่มที่ 2 มีพีนกลีบดอกสีทึบ ได้แก่ ช้างแดงและช้างส้ม มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรม 70% และ 58% เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF01 และ OPF06 ตามลำดับ (ภาพที่ 4 และ ภาพที่ 5) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำข้อมูลจาก 2 ไพรเมอร์ มาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่าช้างกระและช้างพลายมีค่าความเหมือนทาง

พันธุกรรมภายในกลุ่มเท่ากับ 60.5% ส่วนช้างแดงและช้างส้มมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 65.6% แสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างช้างแดงและช้างส้มสูงขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะสีดอกที่ปรากฏแตกต่างกัน (ภาพที่ 6) ไพรเมอร์กลุ่ม OPF มีความเหมาะสมสำหรับการจัดจำแนกและแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลช้าง โดยใช้ไพรเมอร์ OPF07, OPF10, OPF12 และ OPF16 (สุพัตรา และวีถัน, 2548) และไพรเมอร์ OPF01, OPF02, OPF09 และ OPF14 สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์กล้วยไม้ฟาแลนนอปซิสและสกุลใกล้เคียงได้ (Taywiya et al., 2008)

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารให้สีในดอกกล้วยไม้ช้างด้วยเทคนิค HPLC และเครื่องหมายดีเอ็นเอ พบว่าสามารถจัดแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามความสัมพันธ์ของลักษณะที่ปรากฏบนกลีบดอก สารให้สีที่เป็นองค์ประกอบของสีดอก และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ช้างเผือก ไม่ปรากฏสารให้สีกลุ่มแอนโทไซยานินในดอก กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ช้างกระและช้างพลาย มีพีนสีขาวและมีจุดหรือแต้มสีม่วงแดง พบอนุพันธ์ของแอนโทไซยานินชนิด pelargonidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, delphinidin และ kuromanin เป็นองค์ประกอบหลักของสีดอก มีความเหมือนทางพันธุกรรม 78% ส่วนกลุ่มที่ 3 ได้แก่ ช้างแดงและช้างส้ม มีพีนสีทึบ พบอนุพันธ์ของแอนโทไซยานินชนิด kuromanin, pelargonidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, delphinidin และ cyanidin

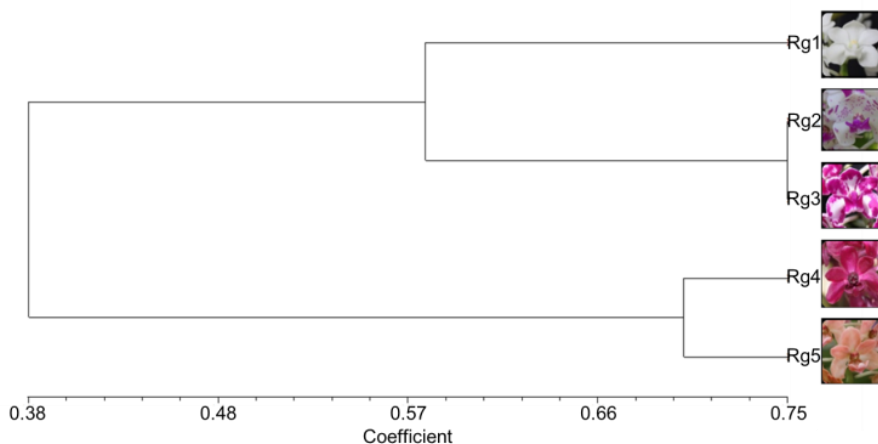


Figure 4. Dendrogram of *Rhynchosstylis gigantea* derived from a UPGMA cluster analysis by primer OPF01

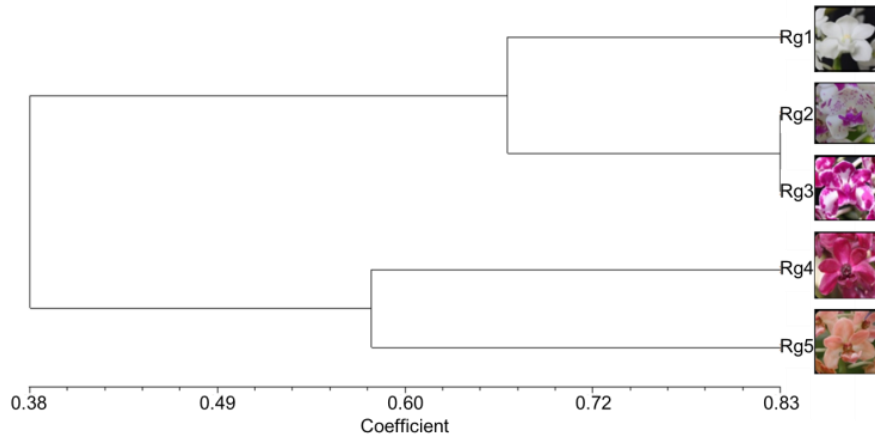


Figure 5. Dendrogram of *Rhynchostylis gigantea* derived from a UPGMA cluster analysis by primer OPF06

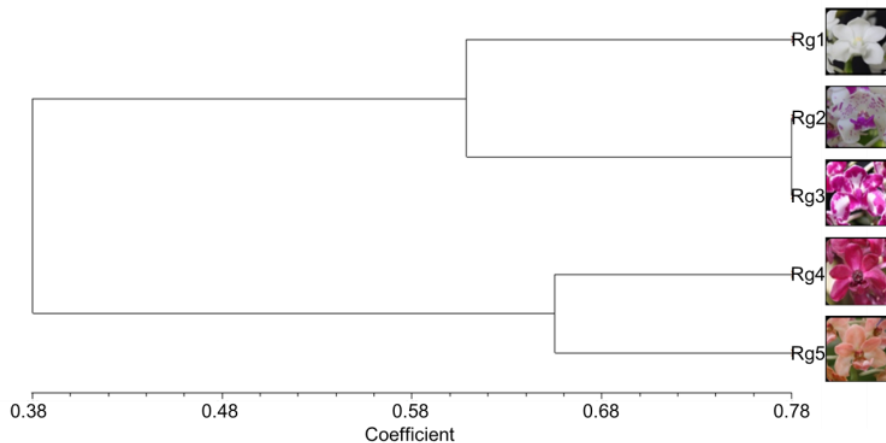


Figure 6. Dendrogram of *Rhynchostylis gigantea* derived from a UPGMA cluster analysis by primer OPF01

เป็นองค์ประกอบหลักของสีดอก มีความเหมือนทางพันธุกรรม 65.6% โดยสารให้สีที่พบในดอกกล้วยไม้ช้างทุกสายพันธุ์ (ยกเว้นช้างเผือก) คือ pelargonidin-3-O-glucoside และ peonidin-3-O-glucoside ส่วน pelargonidin พบเฉพาะในช้างส้ม

สรุป

สารให้สีกลุ่มแอนโทไซยานินที่เป็นองค์ประกอบหลักในดอกกล้วยไม้ช้าง คือ pelargonidin-3-O-glucoside, peonidin-3-O-glucoside, delphinidin และ

kuromanin พบในดอกของช้างแดง ช้างพลาย ช้างกระ และช้างส้ม องค์ประกอบรองคือ cyanin พบในดอกของช้างแดงและช้างพลาย และ cyanidin พบในดอกของช้างแดงและช้างส้ม keracyanin พบเฉพาะในดอกช้างแดงและช้างพลาย ส่วน pelargonidin พบเฉพาะในดอกช้างส้ม ไพรเมอร์ OPF01 และ OPF06 สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดแบ่งกลุ่มกล้วยไม้ช้าง 5 สายพันธุ์ ได้ 3 กลุ่ม ตามลักษณะสีที่ปรากฏชนิดของสารให้สีที่เป็นองค์ประกอบและลายพิมพ์ดีเอ็นเอคือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ช้างเผือก กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ช้างกระและช้างพลาย และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ ช้างแดงและช้างส้ม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์
ห้องปฏิบัติการกลางศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และ
ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย
เชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ และ ศูนย์ความเป็นเลิศด้าน
เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานักนิเทศศึกษาและ
วิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงาน
คณะกรรมการการอุดมศึกษา (AG - BIO/ PERDO -
CHE) อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

เอกสารอ้างอิง

- ครรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้.
อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ. 283
หน้า.
- ณัฐา ควรประเสริฐ. 2545. กล้วยไม้วิทยา 1. ภาควิชา
พืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย
เชียงใหม่, เชียงใหม่. 76 หน้า.
- นิตยา จันกา เฉลิมชัย วงษ์อารี และ ศิริชัย กัลยาณรัตน์.
2551. แอนโทไซยานินในดอกกล้วยไม้พันธุ์แท้
3 สายพันธุ์ในเผ่า VANDEAE Lindley. วารสาร
วิทยาศาสตร์เกษตร 39: 3 (พิเศษ): 339-342.
- มัลลิกา ดวงเขตต์ ณัฐา โพธารมณ์ และ วิวัฒน์ บัณฑิตย์.
2557. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง
พันธุกรรมของ *Doritis pulcherrima* Lindl. ต้น
แคระ โดยเทคนิคอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์.
วารสารเกษตร 30(2): 99-109.
- สุพัตรา เจริญภักดี และ วิวัฒน์ บัณฑิตย์. 2548. การ
วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่
สัมพันธ์กับลักษณะดอกของ กล้วยไม้สกุลช้าง.
วารสารเกษตร 21(2): 99-105.
- สุรินทร์ ปิยะโชติคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดี
เอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอฟแอลพี.
สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ. 116 หน้า.
- แสงทอง พงษ์เจริญกิต จันท์เพ็ญ สระระวีรุช เจริญกิจ
และ ฉันทนา วิชรรัตน์. 2559. การศึกษา

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำไยด้วย
เทคนิคไอดีอาร์เอฟดี. วารสารเกษตร 32(1):
1-8.

- Durst, R.W. and R.E. Wrolstad. 2005. Separation
and characterization of anthocyanins by
HPLC. pp. 33-45. In: R.E. Wrolstad, T.E.
Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid,
S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D.M. Smith
and P. Sporns (eds.). Handbook of Food
Analytical Chemistry: Pigments, Colorants,
Flavors, Texture, and Bioactive Food
Components. John Wiley & Sons, Inc.,
Hoboken, New Jersey.
- Grotewold, E. 2006. The genetics and biochemistry
of floral pigments. Annual Review of Plant
Biology 57: 761-780.
- Jackman, R.L. and J.L. Smith. 1996. Anthocyanins
and betalains. pp. 244-309. In: G. A. F.
Hendry and J. D. Houghton (eds.). Natural
Food Colorants. 2nd ed. Chapman and
Hall, Glasgow.
- Junka, N., C. Wongs-Aree, S. Kanlayanarat and K.
Thunomchit. 2007. Predominance of
cyanidin found in flower from two species of
Aerides orchid. Acta Horticulturae 755:
549-556.
- Kazama, K., N. Noda and M. Suzuki. 2003.
Flavonoid composition related to petal color
in different lines of *Clitoria ternatea*.
Phytochemistry 64: 1133-1139.
- Kuehnle, A.R., D.H. Lewis, K.R. Markham, K.A.
Mitchell, K.M. Davies and B.R. Jordan.
1997. Floral flavonoids and pH in
Dendrobium orchid species and hybrids.
Euphytica 95(2): 187-194.
- Lowry, J.B. and S.C. Keong. 1973. A preliminary
study of Malaysian orchid pigments. Malay
Journal of Science 2: 115-121.

- Mazza, G. and E. Miniati. 1993. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. CRC Press, Boca Raton. 362 p.
- Phengphachanh, B., D. Naphrom, W. Bundithya and N. Potapohn. 2013. Differential gene expression during flower bud initiation and flower bud development of *Rhynchosstylis gigantea* (Lindl.) Ridl. Journal of Agricultural Technology 9: 1285-1295.
- Rodriguez-Saona, L.E. and R.E. Wrolstad. 2005. Extraction, isolation and purification of anthocyanins. pp. 7-17. In: R.E. Wrolstad, T.A. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D.M. Smith and P. Sporns (eds.). Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture and Bioactive Food Components. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Saito, N., K. Toki, K. Uesato, A. Shigihara and T. Honda. 1994. An acylated cyanidin glycoside from the red-purple flowers of *Dendrobium*. Phytochemistry 37: 245-248.
- Tanaka, Y., N. Sasaki and A. Ohmiya. 2008. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. The Plant Journal 54: 733-749.
- Tatsuzawa, F., N. Saito, H. Seki, M. Yokoi, T. Yukawa, K. Shinoda and T. Honda. 2004. Acylated anthocyanins in the flowers of *Vanda* (Orchidaceae). Biochemical Systematic and Ecology 32: 651-664.
- Taywiya, P., W. Bundithya and N. Potapohn. 2008. Analysis of genetic relationship of the genus *Phalaenopsis* by RAPD technique. Acta Horticulturae 788: 39-42.
-