

บทความวิจัย (Research Article)

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤๅษีจากพื้นที่สองจังหวัดภาคเหนืออาศัยเทคนิคเอเอฟแอลพี

กนกอร ศรีม่วง^{1*} ศุภลักษณ์ ภูมิคง²**Genetic relationship among *Paphiopedilum parishii* (Rchb.f.) Stein, from two sources of Northern provinces using amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique**Kanok-orn Srimuang^{1*}, Supalak Pumikong²¹ International Professional Training and Service in Agriculture and Food, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao Province 56000² The Botanical Garden Organization, Ministry of Natural Resources and Environment, Mae Rim District, Chiangmai Province 50180

* Correspondence to E-mail: s.kanokorn@gmail.com

Naresuan Phayao J. 2019;12(2):41-45.

Received: 27 February 2019, Revised: 23 August 2019, Accepted: 27 August 2019

บทคัดย่อ

กล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤๅษี *Paphiopedilum parishii* (Rchb.f.) Stein นิยมเรียกชื่อตามแหล่งพบ อย่างเช่น รองเท้านารีเมืองกาญจน์ รองเท้านารีเชียงใหม่ สำหรับรองเท้านารีเชียงใหม่บางรายงานยังเรียกชื่อวิทยาศาสตร์ *Paphiopedilum dianthum* Tang & Wang คณะผู้ประพันธ์มุ่งหมายศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรองเท้านารีหวดฤๅษีจาก 2 แหล่งของจังหวัดภาคเหนือ อาศัยเทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรค่อนข้างต่ำ ค่าเฉลี่ยร้อยละ 66.11

คำสำคัญ: พืชวงศ์กล้วยไม้ กล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤๅษี ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

Abstract

The lady slipper, *Paphiopedilum parishii* (Rchb.f.) Stein (lady slipper), is named based on their habitat such as Kanchanaburi, and Chiang Dao. For *P. parishii* (Chiang Dao) district is also namely *P. dianthum* Tang & Wang. The authors aimed to investigate the genetic relationship of lady slippers among the samples from 2 sources, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique. The results revealed relatively low genetic differentiation (66.11%).

Keywords: Orchidaceae; *Paphiopedilum parishii* (Rchb.f.) Stein; genetic relationship

¹ ศูนย์ฝึกอบรมวิชาชีพและบริการนานาชาติด้านเกษตรและอาหาร คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

² องค์การสวนพฤกษศาสตร์ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม อำเภอแม่อริม จังหวัดเชียงใหม่ 50180

คำนำ

กล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤาษี *Paphiopedilum parishii* (Rchb.f.) Stein นิยมเรียกชื่อตามแหล่งพบ อย่างเช่น กล้วยไม้รองเท้านารีเมืองกาญจน์ รองเท้านารีเชียงดาว เป็นกล้วยไม้อิงอาศัยวงศ์ Orchidaceae ลำต้นสั้นและแตกกอ ใบ รูปเข็มขัดไม่มีลาย กว้าง 3.5 ถึง 4 ซม. ยาว 30 ถึง 40 ซม. ดอกออกเป็นช่อ ตามซอกใบ ช่อดอกยาว 30 ถึง 60 ซม. จำนวน 4 ถึง 7 ดอกต่อช่อ สีเหลืองแกมเขียว กลีบเลี้ยงกลีบบนแผ่ตั้งปลายแหลม กลีบดอกเรียวยาวและบิดเป็นเกลียว ยาว 7 ถึง 9 ซม. มีตุ่มสีม่วงคล้ำบริเวณโคนกลีบ กลีบกระเป๋าสีเขียวแกมน้ำตาล ดอกบานเต็มที่ กว้าง 6 ซม. พบตามป่าเขาหินปูน และป่าดิบเขา ณ ระดับความสูง 1,000 ถึง 1,300 เมตรแพร่กระจายจากประเทศอินเดียไปจนถึงภูมิภาคอินโดจีน ส่วนประเทศไทยกระจายจากภาคเหนือไปจนถึงภาคตะวันตกของประเทศ ออกดอกช่วงเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม [1]

การศึกษามุ่งหมายเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤาษี จาก 2 ถิ่นอาศัย ประกอบด้วย กาญจนบุรี และเชียงดาว อาศัยเทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) และระบุหาความแตกต่างทางพันธุกรรม [2] ด้วยบางรายงานยังเรียกชื่อวิทยาศาสตร์ของรองเท้านารีเชียงดาวเป็นชื่อ *Paphiopedilum dianthum* Tang & Wang

วัสดุและวิธีการ

เก็บตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤาษีจากสองแหล่ง ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ นิยมเรียกรองเท้านารีเชียงดาว และกลุ่มที่ 2 อำเภออุ้มผาง จังหวัดตาก นิยมเรียกรองเท้านารีหวดฤาษีหรือรองเท้านารีเมืองกาญจน์ กลุ่มตัวอย่างละ 10 ต้น ส่วนรองเท้านารีตัวอย่างเปรียบเทียบกับตัวอย่างชนิดพันธุ์ *Paphiopedilum dianthum* จากประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (รองเท้านารีลาว)

เตรียมตัวอย่างใบให้แห้งของรองเท้านารีด้วยซิลิกา (silica gel) บดตัวอย่างใบด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผง สกัดดีเอ็นเอด้วย cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) ตามวิธีการของ Doyle และ Doyle [3] วิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP ตามวิธีของ Vos และคณะ [4] เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ตัดดีเอ็นเอ ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *EcoRI* และ *MseI* จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) 2 ครั้ง ใช้คู่ผสมไพรเมอร์+1 และไพรเมอร์+3 จำเพาะกับตัวปรับเอนไซม์สองชนิดให้เข้ากัน (adapter) ตามลำดับรวมทั้งหมด 64 คู่ไพรเมอร์ หลังจากนั้น คัดเลือกเฉพาะคู่ไพรเมอร์แสดงแถบดีเอ็นเอชัดเจน และจำนวนแถบดีเอ็นเอมาก วิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอในประชากร (polymorphism)

แปลงข้อมูลแถบสารพันธุกรรมเป็นข้อมูลแบบ binary กรณีพบแถบสารพันธุกรรม ณ ตำแหน่งหนึ่งๆ ให้คะแนนเท่ากับ 1 ส่วนกรณีไม่พบแถบดีเอ็นเอ ณ ระดับเดียวกันนั้น ให้คะแนนเท่ากับ 0 คำนวณค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYS-pc Package [5] หาค่าดัชนีความเหมือน (similarity Index - S) [6] คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance - DI) [7] วิเคราะห์จัดกลุ่ม (cluster analysis) แต่ละตัวอย่างโดยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic averages - UPGMA [8] สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ตัวประกอบหลัก (principle component analysis - PCA) เป็นกราฟการกระจายตัว

วิเคราะห์ความผันแปร และความหลากหลายทางพันธุกรรมตามหลักการสมมูลของ Hardy-Weinberg ด้วยโปรแกรม POPGENE [9] เพื่อคำนวณค่าประมาณความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในแต่ละประชากร ประกอบด้วย gene diversity (HS) เปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิก (polymorphic loci - P%) และ Shannon's information index of diversity (IS) คำนวณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรและชนิดพันธุ์ (species) ด้วยวิธีการของ Nei และ Li [6] ประกอบด้วย HT, P%, IS และค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (genetic

differentiation among population) ด้วยเทคโนโลยีตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ (geospatial technologies - GST)

ผลการศึกษา

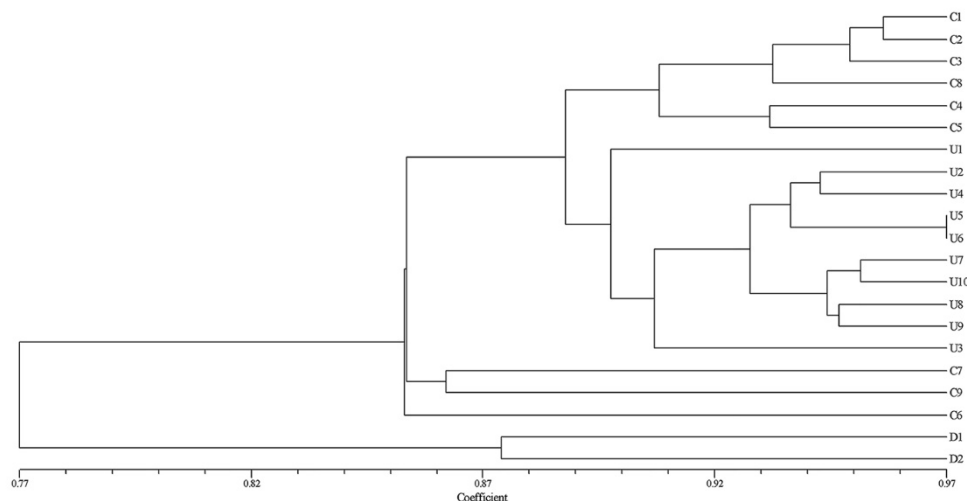
ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤาษี อาศัยเทคนิค AFLP จากไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบมีจำนวน 8 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน รวมถึงมีความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอในแต่ละชนิดได้แก่ E-AAG/M-CAG, E-AAG/M-CAT, E-AAG/M-CTG, E-AAG/M-CTT, E-ACA/M-CAC, E-ACG/M-CAC, E-AGC/M-CAG และ E-AGC/M-CTG ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 151 แถบ คิดเป็นสัดส่วนของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน (percentage of polymorphic band) ค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 66.11

วิเคราะห์และจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.01e ใช้สูตรของ Nei and Li [6] คำนวณหาค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ของตัวอย่างแล้วสลับกันจนครบทุกตัวอย่าง จากนั้นนำค่าที่ได้เปรียบเทียบจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี

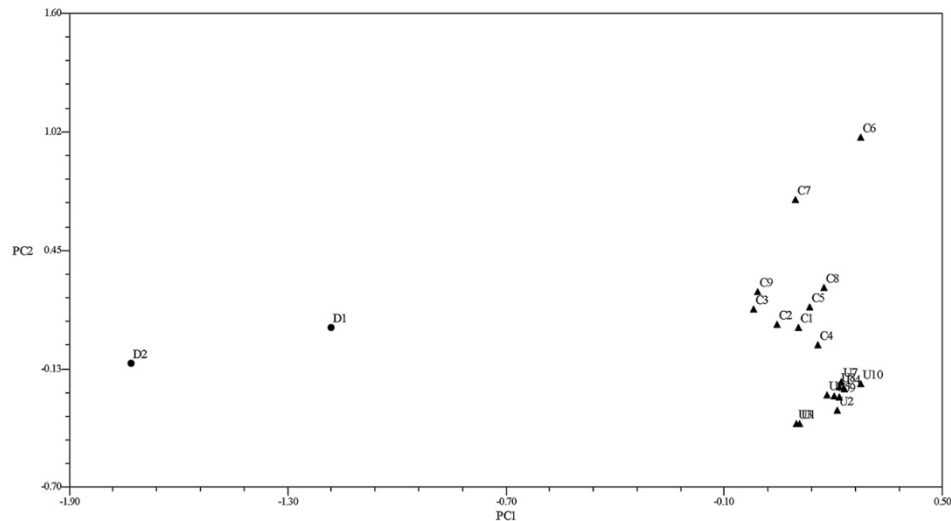
UPGMA และแสดงผลในรูปแบบของพงสาวลี (dendrogram) **ภาพ 1** พบตัวอย่างประชากรแยกเป็นกลุ่มตามแหล่งที่มา สัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันของรองเท้านารีหวดฤาษีอยู่ระหว่าง 0.81 ถึง 0.97 จัดว่าสูงมาก และค่าเฉลี่ยความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมร้อยละ 85

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤาษีในระดับชนิด พบค่าความหลากหลายของยีน (Nei's 1973 gene diversity; HT) เท่ากับ 0.17 ± 0.03 Shannon's Information index, Lewontin (1972) (IS) เท่ากับ 0.13 ± 0.02 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (GST) เท่ากับ 0.21 แสดงให้เห็นประชากรจากเชียงใหม่และประชากรจากอุ้มผางมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ

วิเคราะห์องค์ประกอบหลัก เพื่อจัดกลุ่มและแสดงผลโดยเขียนกราฟสองมิติ พบการเกาะกันของกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤาษีในประเทศไทยทั้งสองประชากร ได้แก่ ประชากรจากอำเภอเชียงดาวและประชากรจากอำเภออุ้มผาง แยกออกจากกล้วยไม้รองเท้านารี *P. dianthum* อย่างชัดเจน **ภาพ 2**



ภาพ 1 แผนภูมิพงสาวลีความสัมพันธ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีเชียงดาว (C), รองเท้านารีอุ้มผาง (U), *P. dianthum* (D) อาศัย UPGMA



ภาพ 2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอาศัยวิธีวิเคราะห์ตัวประกอบหลักจากแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีหวดฤาษีเชียงดาว (C), รองเท้านารีอุ้มผาง (U), *P. dianthum* (D)

วิจารณ์

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรระดับต่ำมาก ใกล้เคียงกับการศึกษาหนึ่งในประเทศไทย [10] แสดงให้เห็นการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมอันเกิดขึ้นจริงในปัจจุบัน อาจเป็นผลจากการกระทำของมนุษย์ด้วยการเก็บกล้วยไม้จากป่า หรือทำลายป่าแหล่งอาศัยจนเกิดการแยกขาดของกลุ่มประชากร [11,12] รองเท้านารีจากเชียงดาว และจากอุ้มผาง เป็นกลุ่มเดียวกันกล่าวคือ *Paphiopedilum parishii* (Rchb.f.) Stein แยกกลุ่มจากกล้วยไม้รองเท้านารีลาว *P. dianthum* อย่างชัดเจน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้นิพนธ์ขอขอบคุณกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ผู้อำนวยการความสะดวกการศึกษาในเขตพื้นที่อนุรักษ์ และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเชียงดาว รวมถึงโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และมหาวิทยาลัยพะเยา ผู้ให้การสนับสนุนทางการเงิน

เอกสารอ้างอิง

1. Academic Segment, Resear and Development Center. *Paphiopedilum parishii* (Rchb.f.) The Botanical Garden Organization (BGO) , Ministry of Natural Resource and Environmental, Thailand. Available from: http://www.qsb.org/database/botanic_book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=1350
2. Surin Peyachoknagul. DNA markers: from basic to application. Bangkok: Kasetsart University; 2009.
3. Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 1990;12(1):13-15.
4. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprintings. Nucleic Acid Res. 1995; 23:4407-4414.
5. Rolf FJ. NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1. User Guide. New York: Exeter Setauket; 2000.

6. Nei M, Li WH. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(10):5269-5273.
7. Nei M. Genetic distance between populations. *Am Nat*. 1972; 106:283-292.
8. Sneath PHA, Sokal RR, Numerical Taxonomy: The principles and practice of numerical classification. San Francisco: Freeman WH and Company; 1973.
9. Yeh FC, Yang RC, Boyle T. Popgene. Microsoft Window- based freeware for population genetic analysis. Release 1.31. Canada; University of Alberta; 1999.
10. Wanichkul J, Changtragoon S. Investigation of genetic diversity of *Paphiopedilum exul* by using AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers. *Proceeding of biodiversity Research from the past to the future*; 2005 Aug 21-24; Phetchaburi, Thailand.
11. Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge: Cambridge University Press; 2002. 617 p.
12. Li A, Luo YB, Xiong ZT, Ge S. A preliminary study on conservation genetics of three endangered orchids species. *Acta Botanica Sinica*. 2002;44(2):250-252.