

การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
ของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วย
เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์
Identification and Genetic Relationship Analysis of
Dendrobium spp., Ueang Sai group, Using
HAT-RAPD and ISSR Techniques

ฐิติพร ไท้มโสภา และธีระชัย ธนาพันธ์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนาพันธ์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Titiporn Thomsopa and Theerachai Thanananta

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Narumol Thanananta*

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,
Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายเป็นกล้วยไม้ที่สวยงามและนิยมใช้เป็นพุ่มแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์ แต่ปัจจุบันข้อมูลความสัมพันธ์นั้นยังมีไม่ครบถ้วน รวมทั้งการจำแนกชนิดตามลักษณะสัณฐานมีความยุ่งยากและเกิดความสับสน งานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มที่คัดเลือกมา 20 ไพรเมอร์ และเทคนิคไอเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ที่คัดเลือกมา 14 ไพรเมอร์ เพื่อตรวจสอบกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย จำนวน 13 ชนิด พบว่าสายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคทั้งสองสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด ออกจากกันได้ เมื่อนำสายพิมพ์ดีเอ็นเอมาวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA พบว่าเทคนิคทั้งสองสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายที่ใช้ในการศึกษา 13 ชนิด ออกจากกันได้เป็น 7 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะสัณฐาน ดังนั้นเทคนิคทั้งสองจึงสามารถใช้ในการจำแนกชนิดและบอกความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : สกุลหวาย; เอื้องสาย; การจำแนก; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; แอสตาร์เอพีดี; ไอเอสเอสอาร์

Abstract

Dendrobium spp., Ueang Sai group, is a beautiful Thai orchid and commonly used as a parental line in orchid breeding. At present the relationship of *Eugenanthe* is not complete and identification of *Eugenanthe* based on morphology is difficult and confused. High annealing temperature - random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) with 20 random primers and inter-simple sequence repeat (ISSR) with 14 microsatellite primers were used to identify 13 samples of *Dendrobium* spp., Ueang Sai group. DNA fingerprinting obtained by the two techniques could distinguish all 13 species. A dendrogram constructed based on polymorphic bands with UPGMA method showed that *Dendrobium* spp., Ueang Sai group, in this study could be divided into seven groups which is similar to their morphologies. Both markers can be used to identify and analyze the genetic relationship of *Dendrobium* spp., Ueang Sai group, and this information can be used in the breeding program in the future.

Keywords: *Dendrobium*; Ueang Sai; genetic relationship; identification; HAT-RAPD; ISSR

1. คำนำ

กล้วยไม้เป็นพืชดอกเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยมูลค่าการส่งออกกล้วยไม้ของประเทศไทยในแต่ละปีมีมูลค่าหลายล้านบาท ซึ่งกล้วยไม้ที่นิยมส่งออกจากประเทศไทย ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวาย มอคคารา และแวนดา จากข้อมูลสำนักงานเศรษฐกิจเกษตรพบว่าประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของกล้วยไม้ที่ส่งออกจากประเทศไทย เป็นกล้วยไม้สกุลหวายและพันธุ์ลูกผสมของสกุลหวาย กล้วยไม้สกุลหวายเป็นสกุลที่มีจำนวนชนิดมากที่สุด นักพฤกษศาสตร์จึงได้จำแนกกล้วยไม้สกุลหวายออกเป็นหมู่ได้ 41 หมู่ เช่น หมู่ฟาแลน-แนนเท (Phalaenanthae) หมู่เซอราโทเบียม (Ceratobium) หมู่แคลลิสตา (Callista) และหมู่ไนโกรเฮอร์ซูเท (Nigrohirsutae) (Baker and Baker, 1996) ซึ่งในประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลเหล่านี้ตามธรรมชาติมากกว่า 150 ชนิด ทุกชนิดเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย ลักษณะต้นมีทั้งแบบที่เป็น

ลำกลมยาว ลำต้นรูปปลุกกล้วย รูปกระสวย รูปเหลี่ยม ตลอดจนพวกที่ลำต้นผอมยาวคล้ายเส้นลวดแตกต่างกันไป (อบฉันท, 2543)

ปัจจุบันความต้องการทางตลาดของกล้วยไม้มีมากขึ้น และต้องการกล้วยไม้ที่มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น ทำให้มีการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้อย่างแพร่หลาย ซึ่งการปรับปรุงพันธุ์จำเป็นต้องใช้ข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) มาช่วยวิเคราะห์เพื่อใช้ในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์ นอกจากนี้ต้องมีการจำแนกชนิดและพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์ที่นำมาใช้ให้ถูกต้อง ซึ่งการใช้ลักษณะสันฐานสามารถทำได้ยาก และมีความสับสนอยู่มาก ดังนั้นจึงศึกษาการจำแนกชนิดและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล (molecular technique) ได้แก่ เทคนิคแอสตาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature - random amplified polymorphic DNA) และไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter-simple sequence repeat) ซึ่งเป็น

เทคนิคที่สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ได้โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือเทคนิคพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) ซึ่งเทคนิคทั้งสองจะมีความแตกต่างกันที่ความจำเพาะของไพรเมอร์ (primer) กับดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) โดยเทคนิคแอสตาร์ทเอพีดีใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม (random) ส่วนเทคนิคไอเอสเอสอาร์ใช้ไพรเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์แบบไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite) โดยข้อดีของเทคนิคทั้งสอง คือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่ต้องทราบข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequence) ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเออื่น (สุรินทร์, 2552)

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ใช้เทคนิคแอสตาร์ทเอพีดีและไอเอสเอสอาร์ในการจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กล้วยไม้สกุลหวาย

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) กลุ่มเอื้องสาย (Ueang Sai group) ที่พบในประเทศไทย 13 ชนิด ได้แก่ เอื้องสายไหม [*D. aphyllum* (Roxb.) Fischer] เอื้องสายมานะพระอินทร์ (*D. devonianum* Paxt.) เอื้องสายม่วง (*D. lituiflorum* Lindl.) เอื้องสายน้ำผึ้งไทย (*D. primulinum* Lindl.) เอื้องสายน้ำนม (*D. cretaceum* Lindl.) เอื้องสายมรกต (*D. chrysanthum* Lindl.) เอื้องสายน้ำเขียว (*D. crepidatum* Lindl. & Paxton) เอื้องสายน้ำครึ่ง (*D. parishii* Rchb. f.) เอื้องสายหลวง (*D. anosmum* Lindl.) เอื้องสายนางนวล (*D. crocatum* Hook. f.)

เอื้องไม้เท้าฤาษี (*D. pendulum* Roxb.) เอื้องสายสามสี (*D. crystallinum* Rchb. f.) และเอื้องสายสี่ดอก (*D. cumulatum* Lindl.) ซึ่งเก็บจากป่าในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย นำมาปลูกจนออกดอกเพื่อตรวจสอบและยืนยันพันธุ์โดยใช้ลักษณะพื้นฐาน

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) โดยบดใบกล้วยไม้ 3-4 กรัม ในบัฟเฟอร์สกัด [extraction buffer; 4 % cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), 0.6 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 M NaCl, 20 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 0.1 % sodium metabisulfite] 20 มิลลิลิตร ซึ่งมีเมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol) 20 ไมโครลิตร และพอลิไวนิลไพร์โรลิโดน (polyvinylpyrrolidone, PVP) 0.3 กรัม โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจึงแยกสารละลายใสส่วนบนมาเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ (linear polyacrylamide) 140 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ล้าง (washing buffer; 10 mM sodium acetate pH 5.2 และ 70 % ethanol) ปล่อยให้แห้งและละลายตะกอนในบัฟเฟอร์อาร์เอ็นเอสเอ (RNase buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 15 mM NaCl) 500 ไมโครลิตร เติมนิวคลีเอสอาร์เอ็นเอสเอ (10 mg/ml

RNase A) 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลากัดด้วยฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25:24:1) 1 ครั้ง และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) อีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นจึงย้ายสารละลายใส่ส่วนบนมาเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมต์ 70 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) ให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร และเติมไอโซโพรพานอลให้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ทีอี (TE buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1.0 mM EDTA) ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2.3.1 เทคนิคแอสตาร์เอพีดี

เทคนิคแอสตาร์เอพีดี มี 2 ขั้นตอน คือ (1) การตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่ตอบสนองต่อปฏิกิริยาแลกโซพอลิเมอเรส โดยรวมดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด (ในปริมาณที่เท่า ๆ กัน) เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาแลกโซพอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 72 ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ชุด A2, B2, C2, D2, E2 และ F2 จากบริษัท Wako Company (Japan) ซึ่งมีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ และ (2) การ

ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายแต่ละชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม (ng) ด้วยปฏิกิริยาแลกโซพอลิเมอเรสในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 2.5 mM MgCl₂) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์แบบสุ่ม 250 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (Invitrogen™ life technology, Brazil) 1 ยูนิต

ปฏิกิริยาแลกโซพอลิเมอเรสมี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ (นฤมล และคณะ, 2555) แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.3.2 เทคนิคไอเอสเอสอาร์

เทคนิคไอเอสเอสอาร์ มี 2 ขั้นตอน คือ (1) การตรวจหาไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ (repeated nucleotide sequence) ที่ตอบสนองต่อปฏิกิริยาแลกโซพอลิเมอเรส โดยรวมดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด (ในปริมาณที่เท่า ๆ กัน) เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาแลกโซพอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ จำนวน 35 ไพรเมอร์ ซึ่งมีขนาด 16-18 นิวคลีโอไทด์ และ (2) การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายแต่ละชนิด แล้ว

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับเทคนิคแอสตาร์ทเอพีดี แต่เปลี่ยนไพรเมอร์เป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ

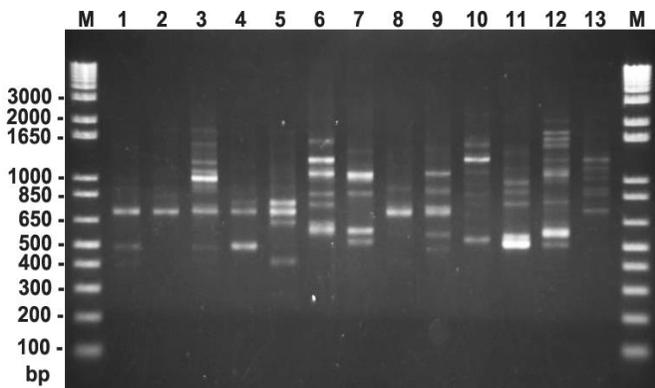
2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด ที่ได้จากเทคนิคแอสตาร์ทเอพีดีและไอเอสเอสอาร์ โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

3. ผลและวิจารณ์

การใช้เทคนิคแอสตาร์ทเอพีดีตรวจสอบดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ 72 ไพรเมอร์ พบว่ามี 28

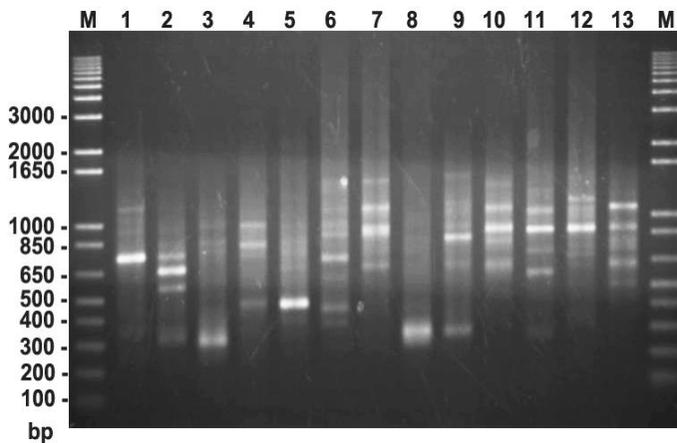
ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ (คิดเป็น 38.88 เปอร์เซ็นต์) หลังจากนั้นจึงคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ปริมาณสูงอย่างชัดเจนและให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ ซึ่งคัดเลือกได้ทั้งหมด 20 ไพรเมอร์ เมื่อนำมาตรวจสอบดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายแต่ละชนิด พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอรวม 389 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 250-3,000 คู่เบส โดยทั้งหมดเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายรูป (polymorphism) นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด ออกจากกันได้ด้วยการใช้เพียงไพรเมอร์เดียวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จำนวน 16 ไพรเมอร์ ได้แก่ A22, B21, B22, B27, C21, C24, C29, C31, D31, E22, E23, E24, E31, E32, F25 และ F31 ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์มีรูปแบบจำเพาะต่อกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายแต่ละชนิด ดังตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ C24 ในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายที่ได้จากเทคนิคแอสตาร์ทเอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ C24 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-13 คือ (1) เอื้องสายใหม่ (2) เอื้องสายม่านพระอินทร์ (3) เอื้องสายม่วง (4) เอื้องสายน้ำผึ้งไทย (5) เอื้องสายน้ำนม (6) เอื้องสายมรกต (7) เอื้องสายน้ำเขียว (8) เอื้องสายน้ำครึ่ง (9) เอื้องสายหลวง (10) เอื้องสายนางนวล (11) เอื้องไม้เท้าฤๅษี (12) เอื้องสายสามสี และ (13) เอื้องสายสีดอก]

การใช้เทคนิคแอสตาเรียพีดีตรวจสอบดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ 35 ไพรเมอร์ พบว่ามี 20 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ (คิดเป็น 57.14 เปอร์เซ็นต์) เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ปริมาณสูงอย่างชัดเจนและให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ จำนวน 14 ไพรเมอร์ มาตรวจสอบดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย 13 ชนิด พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอรวม

205 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 250-3,000 คู่เบส โดยทั้งหมดเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย โดยพบไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด ออกจากกันได้ด้วยการใช้เพียงไพรเมอร์เดียวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จำนวน 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ M01, M02, M04, M20, M27 และ M29 โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์มีรูปแบบจำเพาะต่อกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายแต่ละชนิด ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ M01 ในรูปที่ 2



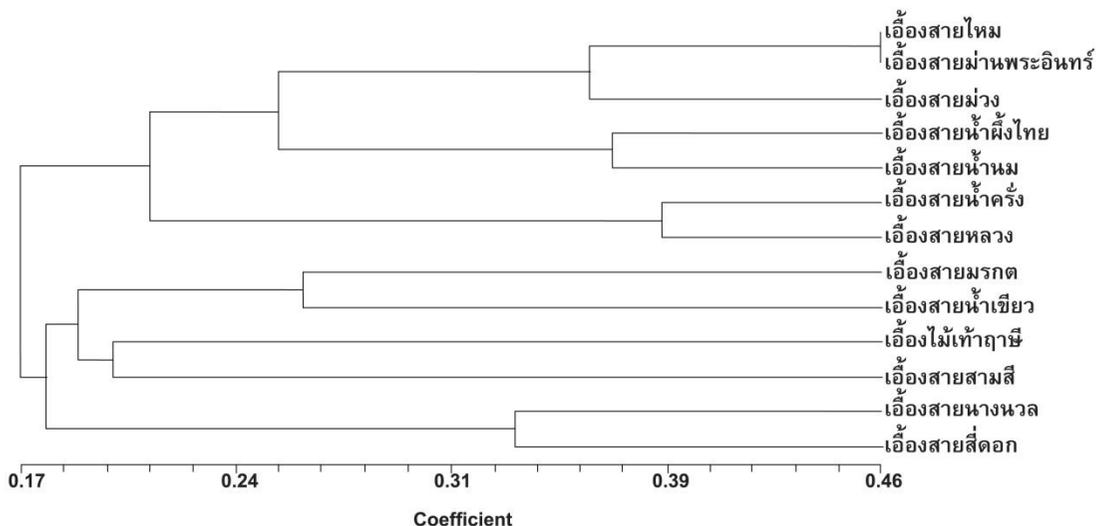
รูปที่ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ M01 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-13 คือ (1) เอื้องสายไหม (2) เอื้องสายมานพระอินทร์ (3) เอื้องสายม่วง (4) เอื้องสายน้ำผึ้งไทย (5) เอื้องสายน้ำนม (6) เอื้องสายมรกต (7) เอื้องสายน้ำเขียว (8) เอื้องสายน้ำครึ่ง (9) เอื้องสายหลวง (10) เอื้องสายนางนวล (11) เอื้องไม้เท้าฤๅษี (12) เอื้องสายสามสี และ (13) เอื้องสายสีดอก]

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแอสตาเรียพีดีและไอเอสเอสอาร์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภูมิตามความสัมพันธ์ พบว่ากล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายที่ใช้ในการวิจัยทั้ง 13 ชนิด มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.17-0.46 และ 0.13-0.62 ตามลำดับ โดยเมื่อพิจารณาแผนภูมิตามความสัมพันธ์ที่

ได้จากเทคนิคแอสตาเรียพีดีที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.27 (รูปที่ 3) และที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์ที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.29 (รูปที่ 4) พบว่าสามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายเป็น 7 กลุ่มเหมือนกัน คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ เอื้องสายไหม เอื้องสายมานพระอินทร์ และเอื้องสายม่วง กลุ่ม 2 ได้แก่ เอื้องสายน้ำผึ้งไทย และเอื้องสายน้ำนม กลุ่ม 3 ได้แก่ เอื้องสายน้ำครึ่ง และเอื้องสายหลวง กลุ่ม 4

สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายเป็น 7 กลุ่ม โดยสมาชิกในแต่ละกลุ่มเหมือนกับแผนภูมิความสัมพันธ์ของ

กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายที่ได้จากแต่ละเทคนิค



รูปที่ 5 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์

การวิเคราะห์หลายพหุมิติเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์แสดงให้เห็นว่าเทคนิคทั้งสองสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ออกจากกันได้ด้วยการใช้เพียงโปรแกรมเดียวสร้างหลายพหุมิติเอ็นเอ แสดงถึงประสิทธิภาพของเทคนิคทั้งสองในการจัดจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบหาพ่อแม่พันธุ์ในพันธุ์ลูกผสมได้ นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายแต่ละชนิดซึ่งแถบดีเอ็นเอนี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายต่อไป เช่นเดียวกับงานวิจัยพืชสกุลระกำที่พัฒนาเครื่องหมายสการ์ (SCAR marker) ที่จำเพาะต่อพันธุ์จากหลายพหุมิติเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี (วลัยลักษณ์, 2553)

การแบ่งกลุ่มของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด ออกเป็น 7 กลุ่ม ตามแผนภูมิความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์ได้ พบว่าสมาชิกในแต่ละกลุ่มมีลักษณะพื้นฐานใกล้เคียงกัน เช่น รูปร่างและสีของดอก ซึ่งผลการวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (นฤมล และคณะ, 2557) แต่งานวิจัยนี้ใช้จำนวนตัวอย่างกล้วยไม้เพิ่มขึ้น ได้แก่ เอื้องสายนางนวล เอื้องไม้เท้าฤาษี เอื้องสายสามสี และเอื้องสายสีดอก โดยผลการวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นว่าเทคนิคทั้งสองสามารถระบุความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนปรับปรุงพันธุ์

อย่างไรก็ตาม แผนภูมิความสัมพันธ์ซึ่งมีการจัดกลุ่มกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายเป็น 7 กลุ่ม นั้น ได้พิจารณาจากค่าดัชนีความเหมือนที่

ต่างกันเล็กน้อย กล่าวคือ เทคนิคแอสตอร์เอพีดีพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.27 ในขณะที่เทคนิคไอเอสเอสอาร์พิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.29 โดยความแตกต่างนี้เป็นผลมาจากปริมาณข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ใช้ในการวิเคราะห์ต่างกัน ซึ่งทำให้เทคนิคทั้งสองมีประสิทธิภาพในการจำแนกไม่เท่ากัน เช่นเดียวกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาเปรียบเทียบผลของเทคนิคอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลวานิลลา (Verma *et al.*, 2009) ที่พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเทคนิคทั้งสองมีความแตกต่างกัน เนื่องจากปริมาณข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่นำมาวิเคราะห์ต่างกัน

นอกจากนั้นแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเทคนิคแอสตอร์เอพีดีร่วมกับเทคนิคไอเอสเอสอาร์นั้น ก็สามารถแบ่งกลุ่มกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด เป็น 7 กลุ่ม เช่นเดียวกับแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเทคนิคแอสตอร์เอพีดีหรือเทคนิคไอเอสเอสอาร์เพียงอย่างเดียว ซึ่งเป็นการยืนยันความถูกต้องของความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่ได้จากเทคนิคทั้งสองอีกด้วย

4. สรุป

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย 13 ชนิด ด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดีพบว่ากล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิดสามารถแยกได้ด้วยการใช้เพียงไพรเมอร์เดี่ยวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยไพรเมอร์ที่สามารถแยกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายออกจากกันได้ทั้ง 13 ชนิด มี 16 ไพรเมอร์ ได้แก่ A22, B21, B22, B27, C21, C24, C29, C31, D31, E22, E23, E24, E31, E32, F25 และ F31 ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย 13 ชนิดด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์พบ 6 ไพรเมอร์ โดย

ไพรเมอร์ที่สามารถแยกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายออกจากกันได้ทั้ง 13 ชนิด มี 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ M01, M02, M04, M20, M27 และ M29

แผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเทคนิคทั้งสองให้ผลเหมือนกัน คือ สามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายทั้ง 13 ชนิด ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ออกเป็น 7 กลุ่ม โดยสมาชิกในแต่ละกลุ่มมีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกัน

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภายใต้ "ทุนวิจัยทั่วไป"

6. เอกสารอ้างอิง

นฤมล ชนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ชนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-179.

นฤมล ชนานันต์, จิตติพร โทมัสโสภา และธีระชัย ชนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมายแอสตอร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 99-108.

วัลย์ลักษณ์ หัตถบุรณ์, 2553, การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรี, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, เครื่องหมายดีเอ็นเอจากพื้นฐานสู่การประยุกต์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อบฉันท์ ไทยทอง, 2543, กล้วยไม้เมืองไทย, บมจ.อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

- Baker, M.L. and Baker, C.O., 1996, Orchid Species Culture *Dendrobium*, Timber Press, Portland.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Rohlf, F.J., 2002, NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Inc., New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Verma, P., Debasis, C., Satya, N.J., Devesh, K.M., Pradhyumna, K.S., Samir, V.S. and Rakesh, T., 2009, The extent of genetic diversity among *Vanilla* species: Comparative results for RAPD and ISSR, *Indust. Crops Prod.* 29: 581-589.