

การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*)

ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์

Identification and Genetic Relationship Analysis of *Aerides* Varieties Using High Annealing Temperature - Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Techniques

วาริสรา แทนสง่า และธีระชัย ธนานันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Warisara Tansa-nga 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

กล้วยไม้สกุลกุหลาบเป็นกล้วยไม้ที่มีความสวยงามและมีกลิ่นหอม จึงนิยมนำมาปลูกเลี้ยงเป็นไม้ประดับ แต่เนื่องจากกล้วยไม้สกุลนี้มีลักษณะลำต้นและใบคล้ายกัน การจำแนกพันธุ์โดยใช้ลักษณะสัณฐานขณะที่ไม่มีดอกจึงทำได้ยาก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์มาตรวจสอบและจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลกุหลาบ 13 พันธุ์ ผลการวิจัยพบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มที่คัดเลือกแล้ว 20 ไพรเมอร์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 323 แถบ ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างกันในกล้วยไม้สกุลกุหลาบแต่ละพันธุ์ 321 แถบ ส่วนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ที่คัดเลือกแล้ว 10 ไพรเมอร์ ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 160 แถบ ซึ่ง

เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างกันในกลุ่มไม้สกุลกุหลาบแต่ละพันธุ์ 157 แถบ เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากเทคนิคแอสตาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์มาจัดกลุ่มโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มไม้สกุลกุหลาบได้เป็น 5 และ 6 กลุ่ม ตามลำดับ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.26-0.70 และ 0.33-0.73 ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากเทคนิคทั้งสองมาวิเคราะห์ร่วมกันพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มไม้สกุลกุหลาบได้เป็น 5 กลุ่ม เช่นเดียวกับเทคนิคแอสตาร์เอพีดี

คำสำคัญ : สกุลกุหลาบ; การจำแนก; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; แอสตาร์เอพีดี; ไอเอสเอสอาร์

Abstract

Aerides is a beautiful and fragrance orchid species, which is popular by grown as ornamental plants. Most *Aerides* spp. have similar stems and leaves. Therefore, identification based on morphology is difficult when flower was absent. Thus, HAT-RAPD and ISSR were used to verify and identify 13 varieties of *Aerides*. Twenty random primers for HAT-RAPD were selected and a total 323 scorable bands were observed. Three hundred and twenty one of these were polymorphic. In ISSR analysis 10 microsatellite primers were selected generating a total 160 scorable band, in which 157 were polymorphic. Cluster analysis of HAT-RAPD and ISSR data using the NTSYS-pc version 2.0 to calculate the similarity coefficient resulted into 5 and 6 clusters with similarity coefficients index ranged from 0.26 to 0.70. and 0.33 to 0.73, respectively. Cluster analysis of combined HAT-RAPD and ISSR data consisted of 5 clusters similar to the result of HAT-RAPD.

Keywords: *Aerides*; identification; genetic relationship; HAT-RAPD; ISSR

1. คำนำ

กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) พบได้ในพื้นที่ทุกภาคของประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีต้นกลมยาว รากเป็นระบบรากอากาศ ใบรูปขอบขนานเรียงสลับซ้ายขวา โคนใบเป็นกาบหุ้มต้น ช่อดอกส่วนใหญ่จะห้อยลง กลีบเลี้ยงและกลีบดอกจะคล้ายกัน กลีบปากมีเดือยซึ่งมักจะงอและเบนออกทางด้านหน้าซึ่งเป็นลักษณะเด่นของกล้วยไม้สกุลนี้ ดอกมีรูปร่าง สีสันสวยงาม และมีกลิ่นหอม เป็นกล้วยไม้ที่เลี้ยงง่าย (อบฉันท, 2543) ด้วยเหตุนี้จึงได้รับความนิยมนำไปปลูกเลี้ยงและผสมพันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ แต่ปัจจุบันการจำแนกพันธุ์โดยใช้ลักษณะสัณฐานเพียงอย่างเดียวทำได้ยาก จึงใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เข้ามาช่วย

เทคนิคแอสตาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature - random amplified polymorphic DNA) เป็นเทคนิคที่สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่หรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) (Williams *et al.*, 1990) ซึ่งสะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น (สุรินทร์, 2552)

เทคนิคไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter-simple sequence repeat) เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ (micro-

satellite) 2 ตำแหน่ง ไมโครแซทเทลไลต์คือชิ้น ดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซ้ำ (repetitive DNA) เรียงต่อเนื่องกันในจีโนม แต่ละชุดซ้ำ ประกอบด้วย 1-6 นิวคลีโอไทด์ พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ไมโครแซทเทลไลต์พบกระจายแบบไม่สม่ำเสมอทั่วทั้งจีโนม พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง และส่วนใหญ่พบในบริเวณที่ไม่ใช่ยีน (non-coding region) ซึ่งความผันแปรจำนวนซ้ำของ ไมโครแซทเทลไลต์ในจีโนมสามารถประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ (สุรินทร์, 2552) เทคนิคไอเอสเอสอาร์ ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสเช่นเดียวกับ เทคนิคแอสตาเรียเฟอติ มีหลักการคือใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นไมโครแซทเทลไลต์และเติมนิวคลีโอไทด์คัดเลือก โดยไพรเมอร์จะเข้าจับกับ ไมโครแซทเทลไลต์ 2 ตำแหน่ง ใกล้เคียง กัน แล้วเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอระหว่างไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 2 ตำแหน่ง นั้น ซึ่งเรียกชิ้นดีเอ็นเอนี้ว่าไอเอสเอสอาร์ โดยมีข้อดี คือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว และต้นทุนไม่สูงมากนัก ส่วนข้อด้อยคือเป็นเครื่องหมายที่แสดงการข้ามแบบสมบูรณ์ (complete dominant) (Powell *et al.*, 1996; สุรินทร์, 2552)

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อจำแนกพันธุ์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเทคนิคแอสตาเรียเฟอติและเทคนิคไอเอสเอสอาร์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กล้วยไม้สกุลกุหลาบ

ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลกุหลาบในประเทศไทย 13 พันธุ์ ได้แก่ เอื้องกุหลาบแดง (*A. crassifolia* C.S.P. Parish ex Burb.) เอื้องกุหลาบมาลัยแดง (*A. multiflora* Roxb. var. *multiflora*) เอื้องกุหลาบขาว (*A. odorata* var. *albino*) เอื้องกุหลาบกระเป๋

ปิด (*A. odorata* Lour.) เอื้องกุหลาบกระเป๋เปิด (*A. falcata* Lindl. & Paxton) เอื้องกุหลาบพวงชมพู (*A. falcata* var. *puangchompoo*) เอื้องกุหลาบเหลืองโคราช (*A. houlettiana* Rchb. f.) เอื้องกุหลาบอินทจักร (*A. flabellata* Rolfe ex Downie) เอื้องกุหลาบชมพูกระเป๋ (*A. krabiense* Seidenf.) เอื้องกุหลาบน่าน (*A. rosea* Lodd. ex Lindl. & Paxton) เอื้องกุหลาบลอเลนเซีย (*A. lawrenceae* Lour.) เอื้องกุหลาบควินควิลเนอรา (*A. quinquevulnera* Lindl.) และเอื้องหวดพราหมณ์ (*Seidenfadenia mitrata* Rchb. f. Garay)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบกล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 13 พันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) โดยบดใบกล้วยไม้ 3-4 กรัม ในบัฟเฟอร์สกัด [extraction buffer; 4 % cetyltrimethyl 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 (polyvinyl-pyrrolidone, 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 หลังจากนั้นจึงแยกสารละลายในส่วนบนมาเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ (linear polyacrylamide) 140 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้ง

และล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ล้าง (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 เติมนิวคลีโอไซด์อาร์เอ็นเอสเอ (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 หลังจากนั้นจึงย้ายสารละลายใส่ส่วนบนมาเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ 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) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟทีและไอเอสเอสอาร์

2.3.1 การตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยรวมดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุล

กล้วยไม้ทั้ง 13 พันธุ์ เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เทคนิคแฮตอาร์เอฟทีใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม ขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 6 ชุด ชุดละ 12 ชนิด คือไพรเมอร์ชุด A2, B2, C2, D2, E2 และ F2 จากบริษัท Wako Company (Japan) ส่วนเทคนิคไอเอสเอสอาร์ใช้ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ ขนาด 17-18 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 35 ชนิด ได้แก่ M01-M35 โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม (ng) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในบัฟเฟอร์ 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) ไพรเมอร์ 250 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, Vivantis Technologies Sdn Bhd, Malaysia) 1 ยูนิต (นฤมล และคณะ, 2555) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมี 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 จากนั้นตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ (นฤมล และคณะ, 2555)

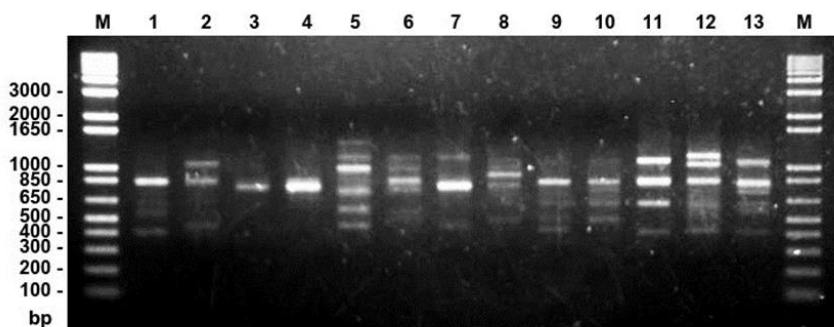
2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลกล้วย โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลกล้วยแต่ละพันธุ์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (นฤมล และคณะ, 2555)

2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลกล้วยที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟทีและ

ไอเอสเอสอาร์ โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 และ

สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)



รูปที่ 1 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลกุหลาบโดยใช้ไพรเมอร์ C21 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA) 1-13 คือ เอื้องกุหลาบแดง เอื้องกุหลาบมาลัยแดง เอื้องกุหลาบขาว เอื้องกุหลาบกระเป๋าบิด เอื้องกุหลาบกระเป๋าบิด เอื้องกุหลาบพวงชมพู เอื้องกุหลาบเหลืองโคราช เอื้องกุหลาบอินทจักร เอื้องกุหลาบชมพูกระปิ เอื้องกุหลาบน่าน เอื้องกุหลาบlossenเซีย เอื้องหวดพราหมณ์ และเอื้องกุหลาบควินควิล-เนอรา ตามลำดับ]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 เทคนิคแอสตาร์เอพีดี

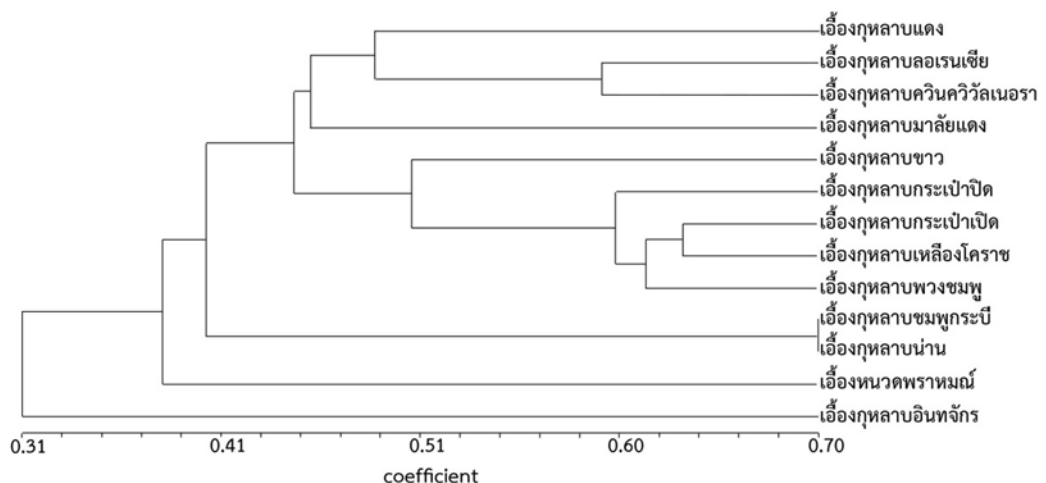
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเทคนิคแอสตาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 39 ชนิด (หรือคิดเป็น 54.17 เปอร์เซ็นต์) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์แบบสุ่มที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน 20 ชนิด ได้แก่ A22, A30, A32, B21, B22, B23, B25, B27, B32, C21, C28, C29, C31, D23, E23, E24, E31, E32, F23 และ F31 มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลกุหลาบแต่ละพันธุ์ด้วยเทคนิคแอสตาร์เอพีดี ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอรวม 323 แถบ ขนาดประมาณ 250-2,900 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกพันธุ์ (monomorphic

band) 2 แถบ (หรือคิดเป็น 0.62 เปอร์เซ็นต์) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบต่างกันในแต่ละพันธุ์ (polymorphic band) 321 แถบ (หรือคิดเป็น 99.38 เปอร์เซ็นต์) โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแอสตาร์เอพีดีนั้นมีรูปแบบจำเพาะต่อกล้วยไม้สกุลกุหลาบแต่ละพันธุ์ ดังตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ C21 ในรูปที่ 1 และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจัดจำแนกกล้วยไม้สกุลกุหลาบได้ นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของกล้วยไม้สกุลกุหลาบแต่ละพันธุ์ออกจากกันด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จำนวน 13 ชนิด ได้แก่ A22 (5'-GCCTGCCTCAG-3'), B21 (5'-AAGCC TATACCA-3'), B25 (5'-AGCACTGAATCT-3'),

B27 (5'-GGCGGTTATGAA-3'), B32 (5'-ATCGC GGCTTAT-3'), C21 (5'-GGAGAGCGGACG-3'), C28 (5'-GTCGACGCATCA-3'), C29 (5'-GTCG CCTTACCA-3'), C31 (5'-TCTGCTGACCGG-3'), E23 (5'-AGGTACGCCGCA-3'), E24 (5'-CCGG AGTGATG-3'), E31 (5'-GAGGACAGCAA-3') และ E32 (5'-CAGGAACAGCAA-3')

เมื่อวิเคราะห์หลายพหุดีเอ็นเอที่ได้จาก เทคนิคแฮตอาร์เอฟพีด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณ ค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (รูปที่ 2) พบว่ากล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 13 พันธุ์ ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.26-0.70 เฉลี่ย 0.48 ถ้าพิจารณาที่ค่าสัมประสิทธิ์ ความเหมือน 0.45 พบว่าสามารถแบ่งกล้วยไม้สกุล

กุหลาบทั้ง 13 พันธุ์ เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ เอื้องกุหลาบแดง เอื้องกุหลาบลอเลนเซีย เอื้อง กุหลาบควินควิลเนอรา และเอื้องกุหลาบมาลัยแดง กลุ่ม 2 ได้แก่ เอื้องกุหลาบขาว เอื้องกุหลาบกระเป๋ าเปิด เอื้องกุหลาบกระเป๋ าปิด เอื้องกุหลาบเหลือง โคราช และเอื้องกุหลาบพวงชมพู กลุ่ม 3 ได้แก่ เอื้องกุหลาบชมพูกระปี่ และเอื้องกุหลาบนำ น กลุ่ม 4 ได้แก่ เอื้องหวดพราหมณ์ และกลุ่มที่ 5 ได้แก่ เอื้องกุหลาบอินทจักร ซึ่งสมาชิกในแต่ละกลุ่ม มีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกัน ผลการวิจัยนี้แสดงว่า กล้วยไม้สกุลกุหลาบมีความหลากหลายทาง พันธุกรรมสูง โดยแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง ระหว่างพันธุ์นั้นสามารถใช้เป็นเครื่องหมายแฮต- อาร์เอฟพีสำหรับการจำแนกกล้วยไม้สกุลกุหลาบได้



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟพี

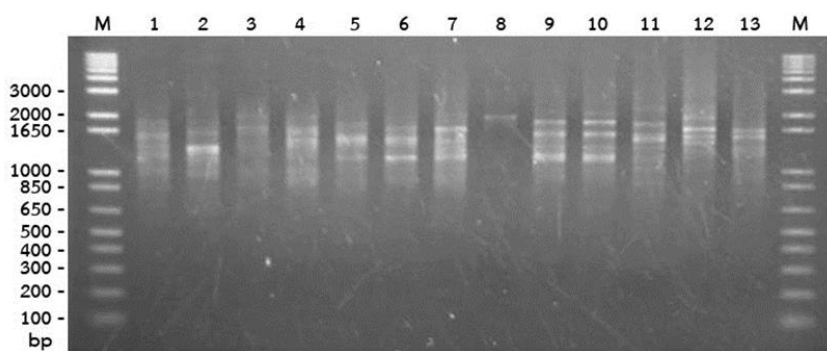
3.2 เทคนิคไอเอสเอสอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของ กล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์โดย ใช้ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ 35 ชนิด พบว่า ไพรเมอร์ 16 ชนิด (หรือคิดเป็น 45.71 เปอร์เซ็นต์) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือก

ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ที่สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน 10 ชนิด ได้แก่ M01, M04, M05, M07, M14, M20, M24, M27, M29 และ M35 มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุล กุหลาบแต่ละพันธุ์ ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอรวม 160 แถบ ขนาด

ประมาณ 100-3,000 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกพันธุ์ 3 แถบ (หรือคิดเป็น 1.88 เปอร์เซ็นต์) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบต่างกันในแต่ละพันธุ์ 157 แถบ (หรือคิดเป็น 98.12 เปอร์เซ็นต์) โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์ มีรูปแบบจำเพาะต่อกล้วยไม้สกุลกุหลาบแต่ละพันธุ์ ดังตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ M05 ในรูปที่ 3 และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจัดจำแนกตัวอย่าง

ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบได้ นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ซึ่งให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างของกล้วยไม้สกุลกุหลาบแต่ละพันธุ์ออกจากกันได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ M05 [(AC)₈C], M07 [(GA)₈G], M20 [(TG)₈G], M24 [(TC)₈C], M27 [(GTC)₆], M29 [(CAC)₆] และ M35 [(CTG)₆]

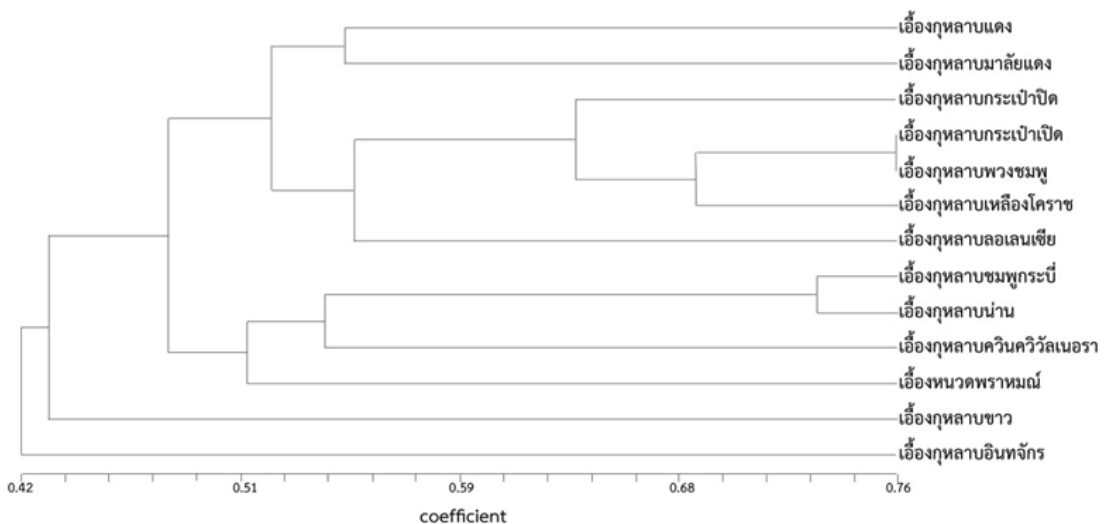


รูปที่ 3 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลกุหลาบโดยใช้ไพรเมอร์ M05 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA) 1-13 คือ เอื้องกุหลาบแดง เอื้องกุหลาบมาลัยแดง เอื้องกุหลาบขาว เอื้องกุหลาบกระเป๋าคัด เอื้องกุหลาบกระเป๋าคัด เอื้องกุหลาบพวงชมพู เอื้องกุหลาบเหลืองโคราช เอื้องกุหลาบอินทจักร เอื้องกุหลาบชมพู กระบี่ เอื้องกุหลาบน่าน เอื้องกุหลาบลอเลนเซีย เอื้องหวดพราหมณ์ และเอื้องกุหลาบควินควิล-เนอรา ตามลำดับ]

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (รูปที่ 4) พบว่ากล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 13 พันธุ์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.33-0.73 เฉลี่ย 0.53 ถ้าพิจารณาที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.53 พบว่าสามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 13 พันธุ์ เป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ เอื้องกุหลาบแดง และเอื้องกุหลาบมาลัยแดง กลุ่ม 2

ได้แก่ เอื้องกุหลาบกระเป๋าคัด เอื้องกุหลาบกระเป๋าคัด เอื้องกุหลาบพวงชมพู เอื้องกุหลาบเหลืองโคราช และเอื้องกุหลาบลอเลนเซีย กลุ่ม 3 ได้แก่ เอื้องกุหลาบชมพู กระบี่ เอื้องกุหลาบน่าน และเอื้องกุหลาบควินควิลเนอรา กลุ่ม 4 ได้แก่ เอื้องหวดพราหมณ์ กลุ่มที่ 5 ได้แก่ เอื้องกุหลาบขาว และกลุ่มที่ 6 ได้แก่ เอื้องกุหลาบอินทจักร ผลการวิจัยนี้แสดงว่ากล้วยไม้สกุลกุหลาบมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์สามารถใช้เป็นเครื่องหมาย

ไอเอสเอสอาร์สำหรับการจำแนกกล้วยไม้สกุล กุหลาบได้



รูปที่ 4 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์

3.3. เทคนิคแฮตอาร์เอฟพีที่ร่วมกับเทคนิคไอเอสเอสอาร์

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟพีที่ร่วมกับเทคนิคไอเอสเอสอาร์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (รูปที่ 5) พบว่ากล้วยไม้สกุลกุหลาบที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ทั้ง 13 พันธุ์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.32-0.71 เฉลี่ย 0.52 เมื่อพิจารณาที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.47 พบว่าสามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลกุหลาบเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ เอื้องกุหลาบแดง เอื้องกุหลาบมาลัยแดง เอื้องกุหลาบลอเลนเซีย และเอื้องกุหลาบควินควิลเนอรา กลุ่ม 2 ได้แก่ เอื้องกุหลาบขาว เอื้องกุหลาบกระเป๋าบิด เอื้องกุหลาบกระเป๋เปิด เอื้องกุหลาบพวงชมพู และเอื้องกุหลาบเหลืองโคราช กลุ่ม 3 ได้แก่ เอื้องกุหลาบชมพูกระปี่ และเอื้องกุหลาบน่าน กลุ่ม 4 ได้แก่ เอื้องหวดพราหมณ์ และกลุ่ม 5 ได้แก่ เอื้องกุหลาบอินทจักร

3.4 การอภิปรายผลการวิจัย

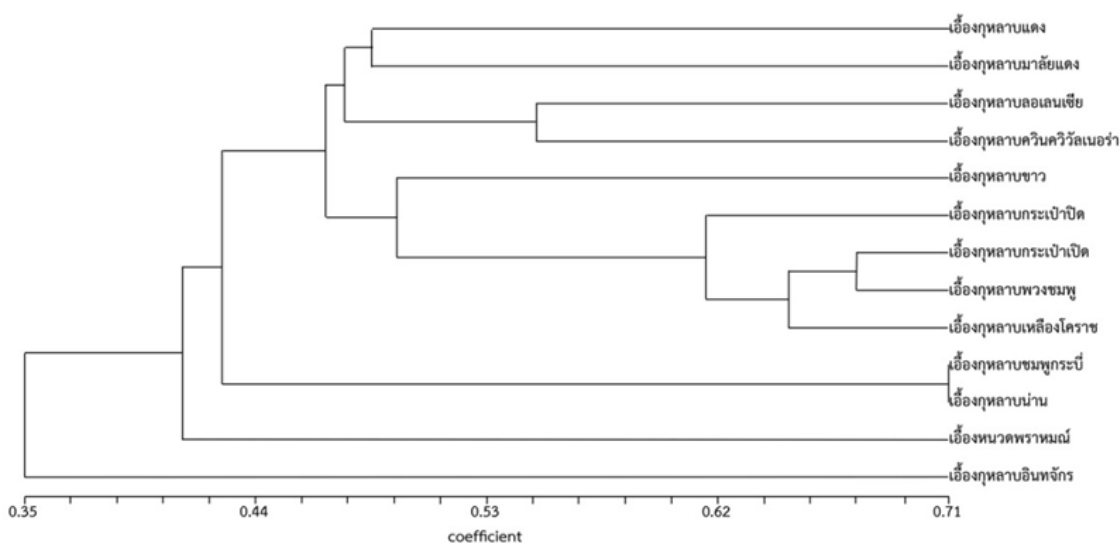
ผลการวิจัยพบว่าเทคนิคแฮตอาร์เอฟพีดีและเทคนิคไอเอสเอสอาร์สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 13 พันธุ์ ได้ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเฉลี่ย 0.48 และ 0.53 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้สกุลกุหลาบมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

เมื่อวิเคราะห์ผลการแบ่งกลุ่มของเทคนิคทั้งสองพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มกล้วยไม้สกุลกุหลาบได้ไม่เท่ากันและสมาชิกภายในกลุ่มมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากหลายปัจจัย เช่น ปริมาณข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคทั้งสองต่างกันและมีเปอร์เซ็นต์ความหลากหลายต่างกัน จึงทำให้มีศักยภาพในการจำแนกต่างกัน (Guasmi *et al.*, 2012) โดยสมาชิกในแต่ละกลุ่มที่ได้จากการแบ่งด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟพีดีมีความสอดคล้องกับลักษณะฐานฐานมากกว่า

เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมที่ได้จากทั้งสองเทคนิคพบว่าเอื้อง

หมวดพราหมณ์ซึ่งเดิมจัดอยู่ในสกุลกุหลาบโดย Heinrich Gustav Reichenbach (ปี ค.ศ. 1864) แต่ปัจจุบันได้ย้ายไปอยู่ในสกุล *Seidenfadenia* โดย Gunnar Seidenfaden (ปี ค.ศ. 1972) (Hansen, 2000) มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมกับเอื้องกุหลาบพันธุ์อื่น 12 พันธุ์ มากกว่าเอื้องกุหลาบอินทจักร ดังนั้นเอื้องหมวดพราหมณ์จึงมี

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับกล้วยไม้สกุลกุหลาบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าเอื้องหมวดพราหมณ์ซึ่งได้ย้ายไปอยู่สกุลอื่น แต่กลับมีความใกล้ชิดกับสกุลกุหลาบมากกว่าเอื้องกุหลาบอินทจักรซึ่งอยู่ในสกุลเดียวกัน (นฤมล และคณะ, 2557)



รูปที่ 5 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบที่ได้จากเทคนิคแอสตอร์เอพีตีร่วมกับเทคนิคไอเอสเอสอาร์

เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่าเอื้องกุหลาบกระเป๋าบิดกับเอื้องกุหลาบขาว ซึ่งอยู่ในสปีชีส์เดียวกันถูกจำแนกออกจากกันไปอยู่คนละกลุ่ม ทั้งนี้อาจเนื่องจากเอื้องกุหลาบกระเป๋าบิดเมื่อเกิดการกลาย (mutation) ตามธรรมชาติ โดยทำให้สีที่กลีบปากหายไปกลายเป็นลักษณะเผือก (albino) ปรากฏชัดเจน ส่วนการกลายในบริเวณอื่น ๆ ของจีโนมไม่ปรากฏ ดังนั้นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จึงมีความแตกต่างไปจากเดิมมาก

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแอสตอร์เอพีตีร่วมกับเทคนิคไอเอสเอสอาร์พบว่าให้ผลสอดคล้องกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก

เทคนิคแอสตอร์เอพีตีมากกว่า เนื่องจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแอสตอร์เอพีตีมีความหลากหลายมากกว่า

งานวิจัยนี้แสดงถึงศักยภาพของเทคนิคแอสตอร์เอพีตีและไอเอสเอสอาร์ในการจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลกุหลาบได้เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น เช่น สหราชอาณาจักร (พีระวุฒิ และคณะ, 2556) กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย (นฤมล และคณะ, 2557) มะพร้าว (นภาพร และอนุชรา, 2555) และกล้วยไม้สกุลเข็มบีเดียม (Sharma et al., 2013)

4. สรุป

เทคนิคแอสตอร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 13 พันธุ์ออกจากกันได้โดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่าสามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 13 พันธุ์ เป็น 5 และ 6 กลุ่ม ตามลำดับ โดยการแบ่งกลุ่มจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแอสตอร์เอพีดีพบว่าสมาชิกในกลุ่มมีลักษณะฐานใกล้เคียงกัน ส่วนการแบ่งกลุ่มจากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์นั้นมี 1 กลุ่ม ที่ต่างไปจากเทคนิคแอสตอร์เอพีดี คือ เอื้องกุหลาบขาว โดยแยกออกมาเป็นกลุ่มใหม่

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป”

6. เอกสารอ้างอิง

นภาพร แก้วดวงดี และอนุชิตา แซ่ตั้ง, 2555, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์มะพร้าว, ว.ก้าวหน้าโลกวิทยาศาสตร์ 12(1): 108-120.

นฤมล ธนानันต์, จูติพร โทมัสโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมายแอสตอร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 99-108.

นฤมล ธนานันต์, วริศรา แทนสง่า และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเครื่องหมายแอสตอร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 317-326.

นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ พันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol 1: 169-179.

พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์ และยุวดี พีระพรพิศาล, 2556, ความสัมพันธ์เชิงนิเวศวิทยาและสัณฐานวิทยาทางกายภาพของสาหร่ายเตา *Spirogyra* sp. ในภาคเหนือของประเทศไทย, ว.มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา 8(1): 1-8.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, 2552, เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อบฉันท์ ไทยทอง, 2543, กล้วยไม้เมืองไทย, พิมพ์ครั้งที่ 1, บมจ. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิง, กรุงเทพฯ.

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.

Guasmi, F., Elfalleh, W., Hannachi, H., Feres, K., Touil, L., Marzougui, N., Triki, T. and Ferchichi, A., 2012, The Use of ISSR and RAPD Markers for Genetic Diversity among South Tunisian Barley, *International Scholarly Research Network* 2012, 10 p.

Hansen, E., 2000, *Orchid Fever*, Methuen Publishing, London.

Powell, W., Machray, C. and Provan, J., 1996, Polymorphism revealed by simple sequence repeats, *Trends Plant Sci.* 1: 215-222.

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 Press, New York.
- Sharma, S.K., Kumaria, S., Tandon, P. and Rao, S.R., 2013, Assessment of genetic variation and identification of species-specific ISSR markers in five species of *Cymbidium* (Orchidaceae), J. Plant Biochem. Biotechnol. 22: 250-255.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535.