

การประเมินความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
ของกล้วยไม้เนกคัมไฟ และกล้วยไม้สปีชีส์ใกล้เคียงที่พบในประเทศไทย

ด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์

Assessment of Genetic Diversity and Relationships
of *Anoectochilus burmannicus* and Related Species
in Thailand Using ISSR Marker

นฤมล เข้มกลัดเงิน* และ ยุพเยาว์ คบพิมาย

สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สุภชัย สุรณารณชัย และ รามิล จิระภิญโญ

สาขาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

Naruemon Khemkladngoen* and Yuppayao Kopimai

Division of Genetics, Faculty of Science, Maejo University

Supachai Suranapornchai and Ramin Jirapinyo

Division of Horticulture, Faculty of Agricultural Production, Maejo University

Received: April 9, 2024 ; Revisions: April 17, 2024 ; Accepted: May 3, 2024

บทคัดย่อ

กล้วยไม้เนกคัมไฟ (*Anoectochilus burmannicus*) เป็นกล้วยไม้ดินที่มีคุณค่าเชิงสมุนไพร เนื่องจากมีถิ่นที่อยู่จำเพาะ และมีปริมาณลดลงในธรรมชาติ จึงมีการจัดพื้นที่อนุรักษ์ในเขต อ.แม่อิง จ.เชียงใหม่ แต่ยังไม่มียางานเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ในพื้นที่อนุรักษ์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้เนกคัมไฟในพื้นที่อนุรักษ์ และกล้วยไม้ในสกุล *Anoectochilus* อื่นๆ ที่รวบรวมจากพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย โพรเมอร์ของเครื่องหมาย ISSR 7 เครื่องหมายถูกนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้เนกคัมไฟ กล้วยไม้ *A. albolineatus* *A. roxburghii* *A. elwesii* และ *O. lanceolatus* จำนวนทั้งหมด 33 ตัวอย่าง เครื่องหมายที่ใช้สามารถแยกกล้วยไม้ทั้ง 5 สปีชีส์ออกจากกัน และสามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่ม ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเนกคัมไฟในพื้นที่อนุรักษ์อยู่ในระดับปานกลาง โดยมีค่า Nei's genetic diversity (H) และ Shannon's information index (I) เท่ากับ 0.22 และ 0.33 ตามลำดับ สำหรับ *A. albolineatus* *A. roxburghii* และ *A. elwesii* มีค่า H และ I อยู่ในช่วง 0.12-0.15 และ 0.19-0.23 ตามลำดับ ในขณะที่ *O. lanceolatus* มีค่าความ

หลากหลายต่ำ ($H=0.07$, $I=0.10$) งานวิจัยนี้เป็นการรายงานความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุล *Anoectochilus* ในประเทศไทยเป็นครั้งแรก ความรู้ในงานวิจัยนี้อาจใช้เป็นแนวทางในการอนุรักษ์เพื่อการใช้ประโยชน์กล้วยไม้กลุ่มนี้ต่อไปได้

คำสำคัญ: กล้วยไม้สกุล *Anoectochilus*; นกคุ้มไฟ; เครื่องหมายดีเอ็นเอ; ความหลากหลายทางพันธุกรรม; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

Abstract

Anoectochilus burmannicus, a terrestrial orchid, holds potential as a medicinal plant. However, due to its restricted habitat and deforestation, its natural population has declined. Consequently, its habitat in Chiang Mai province, Thailand, has been designated as a conservation area. Nonetheless, the genetic diversity of this species in the region remains largely unknown. The objective of the study was to assess the genetic relationships and diversity of *A. burmannicus* and related species collected from northern Thailand. Thirty-three DNA samples of *A. burmannicus*, *A. albolineatus*, *A. roxburghii*, *A. elwesii* and *O. lanceolatus* were analyzed using seven inter-simple sequence repeat (ISSR) primers. A total of 82 bands were obtained, showing 98.9% polymorphism. All five studied species were clearly separated and clustered into two groups based on genetic analysis. Nei's genetic diversity (H) and Shannon information index (I) of *A. burmannicus* were 0.22 and 0.33, respectively, indicating moderate genetic diversity. For *A. albolineatus*, *A. roxburghii* and *A. elwesii*, H ranged from 0.12 to 0.15, and I ranged from 0.19 to 0.23. In contrast, genetic diversity in *O. lanceolatus* was low ($H=0.07$, $I=0.10$). These results represent the first report on the genetic relationships and diversity of *Anoectochilus* sp. in Thailand. This information may be crucial for developing genetic conservation strategies for these species in Thailand.

Keywords: *Anoectochilus* sp.; *Anoectochilus burmannicus*; DNA markers; Genetic diversity; Genetic relationships

1. บทนำ

กล้วยไม้ดินสกุล *Anoectochilus* หรือสกุลว่านนกคุ้ม เป็นกล้วยไม้ขนาดเล็ก อาศัยบนดิน มีการกระจายพันธุ์ในเขตอบอุ่นและเขตร้อนของทวีปเอเชีย ในประเทศไทยพบเฉพาะในป่าไม้ผลัดใบทุกภูมิภาค (Sitthisajjathum, 2007) กล้วยไม้ในสกุลนี้หลายชนิดมีสรรพคุณทางยาโดยใช้เป็นยาสมุนไพร เช่น กล้วยไม้ *A. formosamus* HAYATA *A. kosunensis* *A. roxburghii* พบว่ามีสรรพคุณใช้รักษาโรคความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคเกี่ยวกับตับและไต เป็นต้น (Du et al., 2008; Ye et al., 2017) Cai และคณะ (2015) ได้พบสารชนิดใหม่ชื่อ elwesoside ซึ่งเป็น

สารในกลุ่ม flavonol triglycoside จาก *A. elwesii* โดยพบว่า สารชนิดนี้สามารถเพิ่มหรือกระตุ้นเซลล์ที่ดื้อต่อฮอร์โมนอินซูลิน (HepG2 cells) ให้ดูดซึมกลูโคสได้มากขึ้น นอกจากนี้การศึกษารสชาติของนกคุ้มไฟ (*A. burmannicus*) ที่เก็บจากบริเวณภาคเหนือของประเทศไทยพบว่า มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และฤทธิ์ต้านภาวะดื้อต่อฮอร์โมนอินซูลิน (anti-insulin resistance) ในเซลล์ จึงมีศักยภาพที่จะใช้เป็นยาทางเลือก เพื่อป้องกันและรักษาโรคเรื้อรังที่เกิดจากการอักเสบต่างๆ เช่น โรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ (Budluang et al., 2017; Karinchai et al., 2021)

แต่อย่างไรก็ตาม กล้วยไม้กลุ่มนี้เป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นพบได้ในบางพื้นที่ของประเทศไทย มีถิ่นอาศัยบนดินร่วนปนทรายหรือดินที่มีเศษซากพืชทับถมในป่าดิบเขาและป่าดิบแล้งที่ระดับความสูง 800-1200 เมตรจากระดับน้ำทะเล เช่น กล้วยไม้ นกคุ้มไฟ (*A. burmannicus*) มีเขตกระจายพันธุ์บริเวณเชียงใหม่ ตาก และเลย *A. elwesii* พบได้ที่เชียงใหม่ นครสวรรค์ เลย และกาญจนบุรี *A. roxburghii* พบที่เชียงใหม่ พืชญโลก เลย และชัยภูมิ *A. albolineatus* พบที่เชียงใหม่ พืชญโลก และนครราชสีมา เนื่องจากกล้วยไม้กลุ่มนี้เป็นกล้วยไม้ที่จำเพาะต่อถิ่นที่อยู่จึงทำให้มีจำนวนน้อยมากในธรรมชาติ และมีจำนวนลดลง (Sitthisajjathum, 2007) ดังนั้นหากจะนำกล้วยไม้กลุ่มนี้มาใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน จำเป็นต้องวางแผนการอนุรักษ์ควบคู่ไปด้วย ในปัจจุบันกลุ่มชาวบ้านหมู่บ้านปงไคร้ ต.โป่งแยง อ.แมริม จ.เชียงใหม่ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่พบกล้วยไม้ นกคุ้มไฟ มีการกำหนดพื้นที่อนุรักษ์พืชชนิดนี้ในธรรมชาติ แต่ยังไม่มียางานเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ นกคุ้มไฟในบริเวณอนุรักษ์นี้

เครื่องหมายดีเอ็นเอถูกนำมาใช้เพื่อบ่งชี้ความจำเพาะหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งระหว่างสปีชีส์ ภายในสปีชีส์ หรือแต่ละตัวบุคคลได้ สามารถใช้หาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษาได้อีกด้วย เครื่องหมาย ISSR เป็นเครื่องหมายที่ใช้ไพรเมอร์เป็นลำดับของไมโครแซทเทลไลท์และเพิ่มปลายด้านใดด้านหนึ่งด้วยเบสชนิดอื่น 1-3 ตัว เช่น A(CA)_nCTG หรือ (AC)_nGA เป็นต้น จึงเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่อยู่ระหว่างลำดับไมโครแซทเทลไลท์ที่กระจายตัวทั่วจีโนมของสิ่งมีชีวิต จึงมีโอกาสดูความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอสูง มีความจำเพาะเจาะจงจากเบสที่เพิ่มเข้าไปจึงทำซ้ำได้ ไพรเมอร์ไม่จำเพาะเจาะจงต่อสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Peyachoknagul, 2009) จึงทำให้เครื่องหมายนี้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เช่น การใช้เครื่องหมาย ISSR และ DAMD (Directed Amplification of Minisatellite DNA regions) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สำคัญทางชีวเคมีของประชากรที่ใกล้สูญพันธุ์ของ *Dendrobium nobile* (เอื้องเกือกัว) ซึ่งพบเครื่องหมายดีเอ็นเอ/แถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับปริมาณสาร phytochemical ด้วย (Bhattacharyya et al., 2015) Zhang และคณะ (2010) ใช้เครื่องหมาย ISSR เพื่อวิเคราะห์กลุ่มประชากรกล้วยไม้ *A. formosanus* HAYATA ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมา 5 ปี และตรวจสอบความเสถียรทางพันธุกรรมของประชากร นอกจากนี้ เครื่องหมาย ISSR ยังถูกนำมาศึกษาความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชสมุนไพรและกล้วยไม้หลายชนิด เช่น พืชสมุนไพรสิรินธรวัลลี (*Phanera sirindhorniae*) พืชสมุนไพร *Euphorbia resinifera* กล้วยไม้ *Oeceoclades maculata* กล้วยไม้สกุลกุหลาบ *Aerides maculosum* และกล้วยไม้นางอ้วนน้อย (*Habenaria dentata*) เป็นต้น (Abd-dada et al., 2023; Parab et al., 2008; Sakulsathaporn et al., 2023; Ueno et al., 2015; Yang et al., 2023) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้เครื่องหมาย ISSR ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมใน

ประชากรกล้วยไม้สกุลคัมไพในพื้นที่อนุรักษ์ของหมู่บ้านปงไคร้ ต.โป่งแยง อ.แม่วิม จ.เชียงใหม่ พร้อมทั้งวิเคราะห์ความหลากหลายและความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ดินสกุล *Anoectochilus* ชนิดอื่น ๆ ที่พบในประเทศไทยด้วย ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะนำไปใช้ในการวางแผนสร้างแนวทางในการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ในกล้วยไม้กลุ่มนี้ต่อไป

2. วิธีการ

2.1 ตัวอย่างพืช

พืชที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีจำนวน 34 ตัวอย่าง ประกอบด้วยกล้วยไม้ดินสกุล *Anoectochilus* และสกุลใกล้เคียงจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ 1) *Anoectochilus burmanicus* (นกกุ่มไฟ) จำนวน 17 ตัวอย่าง ได้แก่ ABU02, ABU09, ABU11, ABU15, ABU23, ABU27, ABU29, ABU30, ABU32, ABU33, ABU38, ABU41, ABU42, ABU44, ABU47, ABU48 และ ABU49 ซึ่งเก็บรวบรวมจากพื้นที่อนุรักษ์กล้วยไม้สกุลคัมไพของบ้านปงไคร้ อ.แม่วิม จ.เชียงใหม่ 2) *A. albolineatus* ชื่อเดิม *A. siamensis* จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ Asi_ST1, Asi_ST2, Asi_ST3, Asi_ST6, Asi_P4 และ Asi_P5 รวบรวมจากพื้นที่ จ. เชียงใหม่ 3) *A. roxburghii* จำนวน 5 ตัวอย่าง ได้แก่ ARO6, ARO8, ARO9, ARO11 และ ARO12 รวบรวมจากพื้นที่ จ. พิษณุโลก 4) *A. elwesii* จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ AEL_ST12, AEL_ST23 และ AEL_ST25 รวบรวมจากพื้นที่ จ. เชียงใหม่ และ 5) *Odontochilus lanceolatus* จำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ Ola_ST21, Ola_ST22 รวบรวมจากพื้นที่ จ. เชียงใหม่ และใช้กล้วยไม้ *Ludisia discolor* เป็น outgroup จำนวน 1 ตัวอย่าง

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี modified CTAB (Hwang & Kim, 2000) มีวิธีการดังนี้ บดใบกล้วยไม้ น้ำหนักประมาณ 100 มิลลิกรัม ในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด หลังจากนั้นใส่ในสารละลาย CTAB ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และเติม β -mercaptoethanol ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแล้วดูดสารละลายใส่หลอดใหม่และเติมเอนไซม์ RNase A นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) ในอัตราส่วน 1:1 นำไปปั่นเหวี่ยงแล้วดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท 0.3 โมลาร์ และเอทานอล ปริมาตรเป็น 2 เท่าของสารละลายส่วนบนที่ได้ หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE pH 8.0 ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย ISSR

เครื่องหมาย ISSR จำนวน 7 เครื่องหมาย (Table 1) จากงานวิจัยของ Das และคณะ (2011) Taheri และคณะ (2012) และ สถาพรและคณะ (2019) ถูกนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างต่าง ๆ องค์ประกอบของปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์ประกอบด้วย ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 20 นาโนกรัม (ng) สารละลาย 1x DreamTaq Green PCR Master Mix (ThermoScientific, USA) ไพรเมอร์ ISSR 0.4 ไมโครโมลาร์ (μ M) และน้ำในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร (μ l) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์มี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, อุณหภูมิ Ta องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากนั้นจึงตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

Table 1 Information of primers and their number of amplified and polymorphic bands

Primer name	Primer sequences (5' → 3')	Annealing temperature (Ta)	No. of amplified bands	No. of polymorphic bands	% of polymorphic bands
808	(AG) ₈ C	58°C	9	9	100
811	(GA) ₈ C	52°C	15	15	100
812	(GA) ₈ A	52°C	8	8	100
818	(CA) ₈ G	52°C	10	10	100
834	(AG) ₈ YT	55°C	14	13	92.8
847	(CA) ₈ RC	58°C	10	10	100
880	(GGAGA) ₃	52°C	16	16	100
total	-	-	82	81	98.97

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ให้สัญลักษณ์เป็น 1 ถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้สัญลักษณ์เป็น 0 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ นำค่าสัญลักษณ์ที่ได้จากทุกไพรเมอร์มาวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) ด้วยโปรแกรม FreeTree (Pavlicek et al., 1999) และ TreeView (Page, 1996)

ประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม popgene เวอร์ชัน 1.31 โดยนำข้อมูลค่าสัญลักษณ์ 0 และ 1 ที่ได้จากทุกไพรเมอร์ไปวิเคราะห์ค่า polymorphic loci, percentage of polymorphic loci, gene diversity (H) และ Shannon's information index (I)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้พันธุ์คัมไพ และกล้วยไม้สปีชีส์ใกล้เคียงที่ศึกษา

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างแต่ละสปีชีส์ พบว่าทั้ง 7 ไพรเมอร์ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างสปีชีส์ ให้แถบที่ชัดเจน และทำซ้ำได้ เหมาะสมที่จะนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยไพรเมอร์ทั้ง 7 เครื่องหมาย

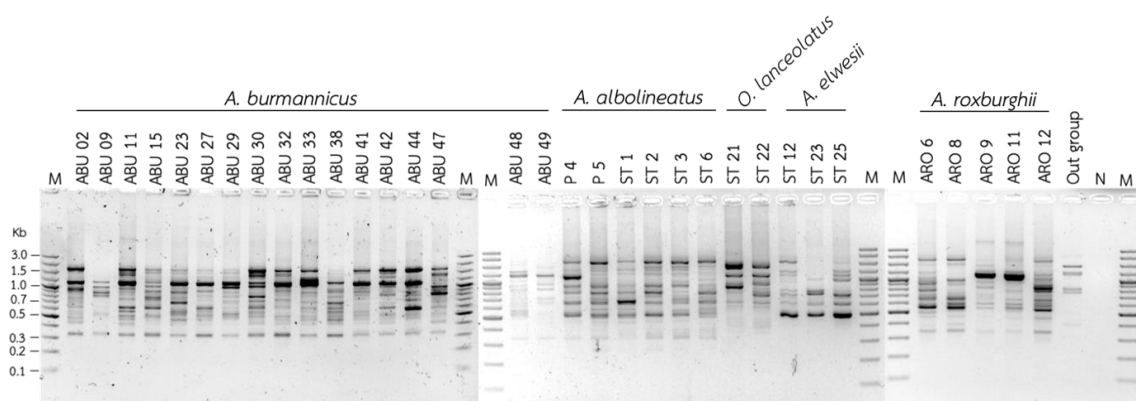


Figure 1 DNA fingerprints of *A. burmannicus* and related species using primer 811. Outgroup: *Ludisia discolor*. N: negative control, H₂O. M: 1 kb plus DNA ladder (ThermoScientific, USA).

Table 2 Range of genetic similarity coefficients within and between species of *Anoectochilus* sp. and *O. lanceolatus* obtained from 7 ISSR primers

<i>A. burmannicus</i> (ABU)	0.491-0.901				
<i>A. albolineatus</i> (Asi)	0.430-0.705	0.646-0.825			
<i>A. roxburghii</i> (ARO)	0.437-0.687	0.451-0.685	0.667-0.812		
<i>O. lanceolatus</i> (OLa)	0.265-0.479	0.412-0.529	0.324-0.451	0.811	
<i>A. elwesii</i> (AEL)	0.231-0.559	0.351-0.551	0.361-0.594	0.471-0.597	0.656-0.721
	<i>A. burmannicus</i> (ABU)	<i>A. albolineatus</i> (Asi)	<i>A. roxburghii</i> (ARO)	<i>O. lanceolatus</i> (OLa)	<i>A. elwesii</i> (AEL)

Note: Genetic similarity coefficients of the same sample were not included in this table. So, the maximum coefficient within species was not 1.

ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 200 – 2,000 คู่เบส จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบในแต่ละไพรเมอร์อยู่ในช่วง 8-16 แถบ (Table 1) ไพรเมอร์ 880 ให้แถบดีเอ็นเอสูงสุดคือ 16 แถบ รองลงมาคือ ไพรเมอร์ 811 (Fig. 1) ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 15 แถบ เมื่อวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมด มีแถบดีเอ็นเอหลากหลายรูปแบบจำนวน 81 แถบ จากทั้งหมด 82 แถบ คิด

เป็นร้อยละ 98.9 แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย ISSR เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชกลุ่มนี้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tran และคณะ (2022) ที่เครื่องหมาย ISSR ทำให้เกิดความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอในกล้วยไม้กลุ่ม jewel orchids ในเวียดนาม คิดเป็นร้อยละ 100 นอกจากนี้เครื่องหมาย ISSR ยังสามารถตรวจพบ somaclonal variation ในกล้วยไม้ *A. formosanus* HATAYA ที่ถูกขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลามากกว่า 5 ปีได้ (Zhang et al., 2010)

Table 3 genetic similarity coefficients between samples obtained from 7 ISSR primers

ABU09	0.643																		
ABU11	0.747	0.615																	
ABU15	0.757	0.625	0.795																
ABU23	0.686	0.6	0.759	0.718															
ABU27	0.789	0.623	0.8	0.835	0.8														
ABU29	0.758	0.679	0.8	0.757	0.771	0.901													
ABU30	0.763	0.606	0.824	0.786	0.75	0.765	0.763												
ABU32	0.765	0.655	0.753	0.737	0.694	0.795	0.735	0.795											
ABU33	0.677	0.692	0.676	0.571	0.606	0.657	0.71	0.694	0.781										
ABU38	0.725	0.678	0.769	0.727	0.712	0.757	0.725	0.709	0.817	0.708									
ABU41	0.708	0.691	0.757	0.685	0.754	0.8	0.8	0.667	0.746	0.656	0.824								
ABU42	0.735	0.655	0.779	0.711	0.667	0.74	0.765	0.718	0.629	0.594	0.732	0.806							
ABU44	0.758	0.643	0.773	0.703	0.657	0.732	0.788	0.711	0.676	0.71	0.725	0.738	0.794						
ABU47	0.657	0.667	0.658	0.64	0.648	0.722	0.657	0.701	0.812	0.667	0.686	0.727	0.696	0.657					
ABU48	0.571	0.609	0.523	0.563	0.6	0.59	0.571	0.515	0.621	0.615	0.576	0.582	0.552	0.5	0.596				
ABU49	0.545	0.667	0.5	0.54	0.644	0.567	0.618	0.554	0.632	0.706	0.586	0.556	0.491	0.509	0.571	0.756			
	ABU02	ABU09	ABU11	ABU15	ABU23	ABU27	ABU29	ABU30	ABU32	ABU33	ABU38	ABU41	ABU42	ABU44	ABU47	ABU48			

3.2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้พันธุ์คัมไฟ และกล้วยไม้สปีชีส์ใกล้เคียง

เมื่อวิเคราะห์ความเหมือนทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างต่าง ๆ ที่เกิดจากไพรเมอร์ ISSR ด้วยโปรแกรม FreeTree พบว่ากล้วยไม้ดินทั้ง 5 สปีชีส์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างตัวอย่างอยู่ในช่วง 0.23 – 0.90

(Table 3 - 6) กล้วยไม้หน่อกุ่มไฟ (*A. burmannicus*) มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์กว้างที่สุดคือ อยู่ในช่วง 0.49-0.90 (Table 2) รองลงมาคือกล้วยไม้ *A. albolineatus* และ กล้วยไม้ *A. roxburghii* ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ในช่วง 0.65-0.83 และ 0.67-0.81 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์พบว่า กล้วยไม้หน่อกุ่มไฟ (*A. burmannicus*) มีความเหมือนทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ *A. albolineatus* หรือ *A. roxburghii* มากกว่า ระหว่างหน่อกุ่มไฟกับ *A. elwesii* หรือ *O. lanceolatus* (Table 2)

Table 4 genetic similarity coefficients between samples obtained from 7 ISSR primers (Continual)

Asi_P4	0.492	0.549	0.543	0.522	0.585	0.545	0.557	0.507	0.571	0.561	0.625	0.567	0.571	0.59	0.548	0.706
Asi_P5	0.486	0.467	0.557	0.538	0.595	0.507	0.486	0.525	0.5	0.485	0.575	0.522	0.556	0.514	0.507	0.533
Asi_ST1	0.431	0.509	0.514	0.521	0.551	0.514	0.523	0.48	0.478	0.525	0.618	0.594	0.537	0.554	0.485	0.582
Asi_ST2	0.478	0.456	0.5	0.507	0.535	0.528	0.537	0.545	0.522	0.508	0.543	0.515	0.551	0.567	0.529	0.596
Asi_ST3	0.516	0.5	0.479	0.514	0.545	0.478	0.484	0.556	0.5	0.517	0.523	0.525	0.531	0.548	0.54	0.577
Asi_ST6	0.455	0.536	0.533	0.514	0.571	0.507	0.515	0.553	0.529	0.516	0.58	0.585	0.618	0.636	0.567	0.607
OLa_ST21	0.389	0.355	0.42	0.4	0.474	0.416	0.361	0.415	0.378	0.265	0.453	0.479	0.459	0.333	0.411	0.323
OLa_ST22	0.412	0.345	0.416	0.395	0.417	0.384	0.324	0.436	0.371	0.313	0.451	0.388	0.4	0.382	0.377	0.31
AEI_ST12	0.523	0.473	0.514	0.466	0.406	0.486	0.462	0.453	0.448	0.459	0.559	0.531	0.507	0.554	0.424	0.364
AEI_ST23	0.452	0.346	0.394	0.457	0.333	0.328	0.323	0.472	0.313	0.379	0.431	0.361	0.406	0.419	0.317	0.231
AEI_ST25	0.492	0.436	0.486	0.466	0.435	0.4	0.4	0.48	0.418	0.492	0.471	0.406	0.478	0.492	0.424	0.364
ARO6	0.515	0.571	0.56	0.486	0.6	0.507	0.485	0.526	0.559	0.548	0.638	0.585	0.559	0.455	0.567	0.536
ARO8	0.557	0.51	0.6	0.551	0.585	0.545	0.525	0.507	0.54	0.526	0.688	0.6	0.603	0.525	0.516	0.471
ARO9	0.492	0.545	0.541	0.575	0.58	0.543	0.462	0.507	0.507	0.492	0.559	0.531	0.567	0.554	0.545	0.473
ARO11	0.492	0.582	0.541	0.493	0.638	0.543	0.523	0.533	0.478	0.525	0.559	0.563	0.597	0.585	0.485	0.509
ARO12	0.523	0.582	0.514	0.521	0.551	0.457	0.462	0.507	0.478	0.525	0.559	0.438	0.478	0.462	0.455	0.545
Out group	0.157	0.195	0.3	0.136	0.145	0.143	0.157	0.328	0.264	0.298	0.259	0.24	0.226	0.235	0.269	0.146
	ABU02	ABU09	ABU11	ABU15	ABU23	ABU27	ABU29	ABU30	ABU32	ABU33	ABU38	ABU41	ABU42	ABU44	ABU47	ABU48

Table 5 genetic similarity coefficients between samples obtained from 7 ISSR primers (Continual)

Asi_P4	0.6																		
Asi_P5	0.475	0.646																	
Asi_ST1	0.519	0.7	0.783																
Asi_ST2	0.571	0.677	0.676	0.758															
Asi_ST3	0.51	0.667	0.758	0.787	0.825														
Asi_ST6	0.582	0.721	0.686	0.738	0.806	0.742													
OLa_ST21	0.328	0.418	0.5	0.451	0.493	0.412	0.5												
OLa_ST22	0.316	0.476	0.444	0.448	0.522	0.469	0.529	0.811											
AEL_ST12	0.333	0.467	0.435	0.5	0.455	0.393	0.492	0.535	0.597										
AEL_ST23	0.314	0.351	0.364	0.426	0.444	0.414	0.387	0.471	0.531	0.721									
AEL_ST25	0.407	0.467	0.551	0.438	0.545	0.525	0.462	0.507	0.537	0.656	0.721								
ARO6	0.545	0.525	0.686	0.646	0.537	0.613	0.576	0.417	0.324	0.431	0.387	0.492							
ARO8	0.52	0.536	0.615	0.567	0.452	0.561	0.525	0.388	0.349	0.4	0.386	0.5	0.754						
ARO9	0.444	0.467	0.667	0.563	0.485	0.59	0.585	0.423	0.358	0.438	0.361	0.531	0.738	0.733					
ARO11	0.481	0.5	0.638	0.594	0.515	0.59	0.585	0.423	0.358	0.5	0.361	0.531	0.708	0.667	0.813				
ARO12	0.556	0.533	0.638	0.563	0.515	0.623	0.554	0.451	0.448	0.469	0.393	0.594	0.8	0.733	0.75	0.75			
Out group	0.2	0.217	0.327	0.28	0.308	0.383	0.275	0.386	0.34	0.32	0.298	0.32	0.314	0.13	0.24	0.24	0.28		
	ABU49	Asi_P4	Asi_P5	Asi_ST1	Asi_ST2	Asi_ST3	Asi_ST6	OLa_ST21	OLa_ST22	AEL_ST12	AEL_ST23	AEL_ST25	ARO6	ARO8	ARO9	ARO11	ARO12		

เมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมมาสร้างเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 7 เครื่องหมายสามารถใช้แบ่งกลุ่มกล้วยไม้ดินทั้ง 5 สปีชีส์ออกจากกันได้ (Fig. 2) โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ 1) กลุ่ม A ประกอบด้วยกล้วยไม้สกุลคัมไฟ (*A. burmannicus*) กล้วยไม้ *A. albolineatus* และ กล้วยไม้ *A. roxburghii* และ 2) กลุ่ม B ประกอบด้วยกล้วยไม้ *A. elwesii* และ *O. lanceolatus* ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะลายบนใบของกล้วยไม้ โดยกลุ่ม A เป็นกล้วยไม้ที่มีเส้นลวดลายบนใบหรือจัดเป็นกล้วยไม้กลุ่ม jewel orchids ส่วนกลุ่ม B เป็นกล้วยไม้ที่ไม่มีเส้นลวดลายบนใบ ใบมีสีเขียวเข้ม

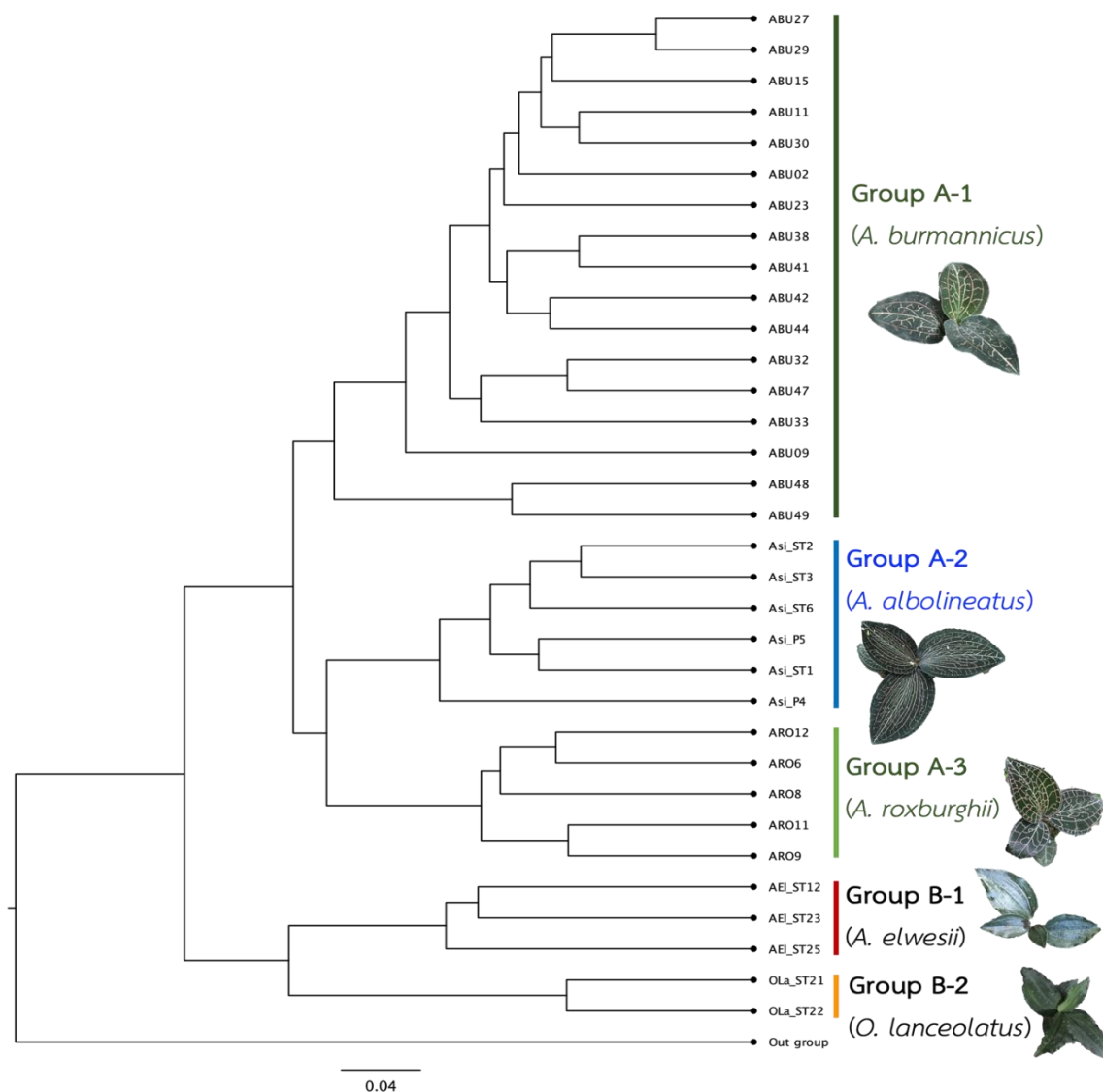


Figure 2. A dendrogram of *Anoectochilus* sp. and *O. lanceolatus* based on UPGMA cluster analysis of the genetic similarity.

Table 6 genetic diversity of the studied species

Species	Sample size	No. of Polymorphic loci	Percentage of polymorphic loci	H (gene diversity)	I (Shannon's information index)
<i>A. burmannicus</i>	17	54	65.85 %	0.2158	0.3263
<i>A. albolineatus</i>	6	38	46.34 %	0.1510	0.2306
<i>A. roxburghii</i>	5	33	40.24 %	0.1477	0.2195
<i>A. elwesii</i>	3	28	34.15 %	0.1276	0.1902
<i>O. lanceolatus</i>	2	14	17.07 %	0.0707	0.1032

Note: H = Nei's (1973) gene diversity

3.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้เนกคัมไฟ และกล้วยไม้สปีชีส์ใกล้เคียงที่ศึกษา

เมื่อพิจารณาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแต่ละสปีชีส์โดยใช้ค่า gene diversity (H) (Nei, 1973) และ Shannon's information index (I) สำหรับเครื่องหมาย ISSR ที่มีรูปแบบการซ้ำของเครื่องหมายแบบซ้ำสมบูรณ์ (dominant marker) จะมีค่า H และ I อยู่ในช่วง 0 - 0.5 หากประชากรที่ศึกษามีค่า H และ I สูง แสดงว่าเป็นประชากรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Peyachoknagul, 2009) ในงานวิจัยนี้พบว่า กล้วยไม้เนกคัมไฟ (*A. burmannicus*) มีค่า H และ I เท่ากับ 0.22 และ 0.33 ตามลำดับ (Table 6) ซึ่งมีค่าสูงที่สุด แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้เนกคัมไฟ (*A. burmannicus*) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกล้วยไม้สปีชีส์อื่น ๆ ที่ศึกษาในงานวิจัยนี้ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Huang และคณะ (2023) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย ISSR และ SRAP ในประชากร *A. roxburghii* หลายพื้นที่ในประเทศไทย พบว่ามีค่า H และ I อยู่ในช่วง 0.22 - 0.24 และ 0.34 - 0.38 ตามลำดับ สำหรับค่า H และ I ของประชากรกล้วยไม้ *A. albolineatus* *A. roxburghii* *A. elwesii* และ *O. lanceolatus* มีค่าต่ำ อาจเป็นเพราะจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาน้อย และตัวอย่างถูกเก็บในบริเวณใกล้เคียงกัน เนื่องจากตัวอย่างของสปีชีส์เหล่านี้ถูกเก็บจากพื้นที่ธรรมชาติ มีถิ่นที่อยู่จำกัด และมีปริมาณน้อยในธรรมชาติ ดังนั้นหากต้องการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มข้างต้น ควรสำรวจในบริเวณที่กว้าง และหลากหลายพื้นที่มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ในบริเวณที่นักวิจัยสำรวจ พบกล้วยไม้เหล่านี้ในธรรมชาติน้อยมาก หากต้องการนำพืชกลุ่มนี้มาใช้ประโยชน์ ควรวางแผนการอนุรักษ์ควบคู่กันไปด้วย ตามแนวทางเดียวกันกับการกำหนดพื้นที่อนุรักษ์และใช้ประโยชน์ของกล้วยไม้เนกคัมไฟของบ้านปางไคร้ อ.แมริม จ.เชียงใหม่

4. สรุป

เครื่องหมาย ISSR สามารถใช้ประเมินความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้เนกคัมไฟและกล้วยไม้สปีชีส์ใกล้เคียงที่ศึกษาได้ ไพรเมอร์ ISSR ทั้ง 7 เครื่องหมายให้ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอสูงถึงร้อยละ 98.9 และสามารถแยกกล้วยไม้ทั้ง 5 สปีชีส์ออกจากกันได้ โดยพบว่ากล้วยไม้เนกคัมไฟมีความเหมือนทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ

กล้วยไม้ *A. albolineatus* และ *A. roxburghii* และกล้วยไม้้นกคุ้มไฟในพื้นที่อนุรักษ์ฯ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับปานกลาง แต่มีความหลากหลายสูงกว่ากล้วยไม้ *A. albolineatus* *A. roxburghii* *A. elwesii* และ *O. lanceolatus* ที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ งานวิจัยนี้เป็นการรายงานความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุล *Anoectochilus* ในประเทศไทยเป็นครั้งแรก ความรู้ในงานวิจัยนี้อาจใช้เป็นแนวทางในการอนุรักษ์เพื่อการใช้ประโยชน์กล้วยไม้กลุ่มนี้ต่อไปได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2560 ภายใต้กลุ่มเรื่องโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) และผู้ทำวิจัยขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ (อพ.สธ.-มจ.) ชุมชนบ้านปงไคร้ อ.แมริม จ. เชียงใหม่ และ ดร. สันติ วัฒนฐานะ ที่ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างพืช

6. เอกสารอ้างอิง

- Abd-dada, H., Bouda, S., Khachtib, Y., Bella, Y.A., & Haddioui, A. (2023). Use of ISSR markers to assess the genetic diversity of an endemic plant of Morocco (*Euphorbia resinifera* O. Berg). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 21(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00543-4>
- Bhattacharyya, P., Kumaria, S., & Tandon, P. (2015). Applicability of ISSR and DAMD markers for phyto-molecular characterization and association with some important biochemical traits of *Dendrobium nobile*, an endangered medicinal orchid. *Phytochemistry*, 117, 306- 316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.022>
- Budluang, P., Pitchakarn, P., Ting, P., Temviriyankul, P., Wongnoppawich, A., & Imsumran, A. (2017). Anti-inflammatory and anti-insulin resistance activities of aqueous extract from *Anoectochilus burmannicus*. *Food Science & Nutrition*, 5(3), 486-496. <https://doi.org/10.1002/fsn3.416>
- Cai, J., Zhao, L., & Zhu, E. (2015). A new flavonol triglycoside derived from *Anoectochilus elwesii* on stimulating glucose uptake in insulin-induced human HepG2 cells. *Natural Product Research*, 29(15), 1414-1418. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.1003135>
- Das, A., Kesari, V., Satyanarayana, V.M., Parida, A., & Rangan, L. (2011). Genetic relationship of *Curcuma* species from Northeast India using PCR-based markers. *Molecular Biotechnology*, 49(1), 65- 76. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9379-5>

- Du, X.-M., Irino, N., Furusho, N., Hayashi, J., & Shoyama, Y. (2008). Pharmacologically active compounds in the *Anoectochilus* and *Goodyera* species. *Journal of Natural Medicines*, 62(2), 132-148. <https://doi.org/10.1007/s11418-007-0169-0>
- Huang, J.C., Wan, S.Q., Chen, Y., Li, L.H., Zhang, Z.L., Zhu, J.J., Wu, M., Xing, B.C., Shao, Q.S., & Lu, C.F. (2023). Genetic diversity of *Anoectochilus roxburghii* based on ISSR and SRAP molecular markers. *Journal of Zhejiang Agricultural and Forestry University*, 40(1), 22–29. <https://doi.org/10.11833/j.issn.2095-0756.20220473>
- Hwang, S.-K., & Kim, Y.-M. (2000). A Simple and Reliable Method for Preparation of Cross-Contamination-Free Plant Genomic DNA for PCR-Based Detection of Transgenes. *BMB Reports*, 33.
- Karinchai, J., Budluang, P., Temviriyankul, P., Ting, P., Nuchuchua, O., Wongnoppavich, A., Imsumran, A., & Pitchakarn, P. (2021). Bioassay-guided study of the anti-inflammatory effect of *Anoectochilus burmannicus* ethanolic extract in RAW 264.7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 280, 114452. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114452>
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(12), 3321-3323. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>
- Page, R.D.M. (1996). Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Bioinformatics*, 12(4), 357-358. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/12.4.357>
- Parab, G.V., Krishnan, S., Janarthnam, M.K., Sivaprakash, K.R., & Parida, A. (2008). ISSR and RAPD Markers Assessed Genetic Variation of *Aerides maculosum* — an Epiphytic Orchid from Goa, India. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 17(1), 107-109. <https://doi.org/10.1007/BF03263271>
- Pavlíček, A., Hrdá, S., & Flegr, J. (1999). Free-Tree--freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica (Praha)*, 45(3), 97-99.
- Peyachoknagul, S. (2009). *DNA marker: from basic to application* (1 ed.). Kasetsart University Press. (in Thai)
- Sakulsathaporn, A., Choradet, I., & Roopkham, C. (2023). Genetic Diversity of the Endemic Species *Phanera sirindhorniae* in the Mekong Basin of Thailand Based on ISSR Markers. *Trends in Sciences*, 20(12), 7053. <https://doi.org/10.48048/tis.2023.7053>
- Sitthisajjathum, S. (2007). *Wild orchid of Thailand* (3rd Edition ed.). Baanlaesuan. (in Thai)
- Sukjit, S., Sakulsingharoj, C., Nonthasawatsri, C., & Khemkladngoen, N. (2019). Application of Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers for Verification of Interspecific Hybrids between

- Paracurcuma* and *Eucurcuma*. *Thai Journal of Science and Technology*, 8(3) , 287- 299.
<https://doi.org/https://doi.org/10.14456/tjst.2019.37> (in Thai)
- Taheri, S., Abdullah, T.L., Abdullah, N.A., & Ahmad, Z. (2012). Genetic relationships among five varieties of *Curcuma alismatifolia* (Zingiberaceae) based on ISSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 11(3), 3069-3076. <https://doi.org/10.4238/2012.August.31.4>
- Tran, T.H.I., Pham, M., Huong, T., Widiarsih, S., & Ho, V.T. (2022). Investigation of the genetic diversity of jewel orchid in Vietnam using RAPD and ISSR markers. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230950>
- Ueno, S., Rodrigues, J.F., Alves-Pereira, A., Pansarin, E.R., & Veasey, E.A. (2015). Genetic variability within and among populations of an invasive, exotic orchid. *AoB PLANTS*, 7. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv077>
- Yang, Y., Tang, J., Zou, R., Luo, Y., Deng, Z., Li, D., Chai, S., & Wei, X. (2023). The Genetic Diversity and Genetic Structure of the Germplasm Resources of the Medicinal Orchid Plant *Habenaria dentata*. *Genes*, 14(9), 1749. <https://www.mdpi.com/2073-4425/14/9/1749>
- Ye, S. , Shao, Q. , & Zhang, A. (2017) . *Anoectochilus roxburghii*: A review of its phytochemistry, pharmacology, and clinical applications. *Journal of Ethnopharmacology*, 209, 184- 202. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.07.032>
- Zhang, F., Lv, Y., Dong, H., & Guo, S. (2010). Analysis of Genetic Stability through Intersimple Sequence Repeats Molecular Markers in Micropropagated Plantlets of *Anoectochilus formosanus* HAYATA, a Medicinal Plant. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 33, 384- 388. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.384>