

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุล หวาย หมู่นิโกรเฮิร์ชชูเอ และลูกผสมด้วยแฮตอาร์เอพีดี

Genetic Relationships between *Dendrobium* Section *Nigrohirsutae* and their Hybrids base on HAT-RAPD

จุฑาทิพย์ พันธุ์รูปท้าว และธีระชัย ธนาพันธ์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนาพันธ์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Jutatip Phanroopthaw 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

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่นิโกรเฮิร์ชชูเอและลูกผสม 15 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด ผลการวิจัยพบว่าไพรเมอร์ 39 ชนิด สามารถเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 17 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด 240 แถบ ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของกล้วยไม้สกุล หวายหมู่นิโกรเฮิร์ชชูเอและลูกผสมทั้ง 15 พันธุ์ ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับพันธุ์ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายหมู่นิโกรเฮิร์ชชูเอและลูกผสมได้ทั้ง 15 พันธุ์ โดยแบ่งเป็น 7 กลุ่ม มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.20 ถึง 0.78

คำสำคัญ : สกุลหวาย; หมู่นิโกรเฮิร์ชชูเอ; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; แฮตอาร์เอพีดี

Abstract

High annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique was used to study the genetic relationships between 15 *Dendrobium* section *Nigrohirsutae* and their

hybrids. Seventy-two random primers were used for DNA amplification and 39 primers could be used to DNA amplification. Seven teen primers which gave clear amplified products were generated DNA fingerprinting. Among these bands, 240 bands were found to be polymorphic bands that the results showed significant differences among 15 cultivars by using specific fragments for each cultivar. A dendrogram, which constructed base on polymorphic bands using the NTSYS-pc version 2.0 program, showed genetic similarities among the 15 cultivars and classified to 7 clusters with similarity coefficients ranging 0.20 to 0.78.

Keywords: *Dendrobium*; section *Nigrohirsutae*; genetic relationship; HAT-RAPD

1. คำนำ

กล้วยไม้สกุลเด็นโรเบียม (*Dendrobium*) หรือสกุลหวายเป็นสกุลใหญ่ โดยมีถิ่นกำเนิดอยู่เขตทวีปเอเชีย นักพฤกษศาสตร์ได้จำแนกออกเป็นหมู่ 41 หมู่ (อบฉันท, 2542) โดยเฉพาะประเทศไทยพบการกระจายพันธุ์อยู่ตามธรรมชาติอย่างมากมาย จึงทำให้ประเทศไทยกลายเป็นศูนย์กลางของการขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย และเพื่อรองรับการขยายตัวของอุตสาหกรรมกล้วยไม้โลก ที่มีแนวโน้มการค้าเพิ่มสูงขึ้นทุกปี จึงมีการผสมพันธุ์กล้วยไม้พันธุ์ใหม่ ๆ เพื่อตอบสนองความต้องการของตลาด ทำให้เกิดเป็นกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสม (hybrid) ปัจจุบันประเทศไทยมีบทบาทสำคัญในการผลิตกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมสำหรับการส่งออกเพื่อจำหน่ายสู่ตลาดกล้วยไม้โลก (สำนักพัฒนาการค้าและธุรกิจการเกษตรและอุตสาหกรรม กรมการค้าส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ, 2558) ซึ่งกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมทุกชนิดในอุตสาหกรรมการค้าในขณะนี้ เป็นกล้วยไม้ที่ผ่านการปรับปรุงจากพ่อแม่พันธุ์พื้นเมืองทั้งสิ้น จึงส่งผลให้ลักษณะฟีโนไทป์ (phenotype) ของกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมมีความหลากหลายจำนวนมาก ทั้งโครงสร้างดอกหรือสีดอกที่สวยงาม อีกทั้งยังส่งผลถึงความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ระดับชีวโมเลกุลอีกด้วย ด้วยความนิยมการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุล

หวายนั้น ส่งผลให้ต้นพ่อแม่พันธุ์พื้นเมืองที่แท้จริงถูกละทิ้งความสำคัญ โดยไม่มีการเพาะปลูกและอาจสูญพันธุ์ในอนาคต รวมถึงเกิดการสูญเสียลักษณะที่สำคัญทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย (Peyachoknagul *et al.*, 2014)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็นเครื่องหมายที่มีบทบาทสำคัญในการจำแนกชนิดพันธุ์ ซึ่งอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ในโมเลกุลดีเอ็นเอช่วงหนึ่ง เพื่อระบุความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (สุริพร, 2546) เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันหรือพีซีอาร์ (PCR, polymorphic chain reaction) มีหลายเทคนิค ได้แก่ เอสเอสอาร์ (SSR, simple sequence repeats) (Brown *et al.*, 1996) ไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter simple sequence repeat) (Zhang *et al.*, 2010) อาร์เอฟพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990) และเทคนิคอื่น ๆ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ให้ข้อมูลถูกต้องและแม่นยำสูง

การวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายหมู่ไนโกรเฮิร์ซและลูกผสมในประเทศไทยมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยแฮตอาร์เอฟพีดี (HAT-RAPD, high annealing

temperature-random amplified polymorphic DNA) ซึ่งเป็นเทคนิคที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) (นฤมล และคณะ, 2556) ซึ่งวิธีทำไม่ยุ่งยาก ไม่ซับซ้อน ทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว รวมทั้งประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker technique) ชนิดอื่น (Sitthiphrom *et al.*, 2006) โดยข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับเป็นแนวทางในการวางแผนการอนุรักษ์ การปรับปรุงพันธุ์ และการใช้ประโยชน์จากกล้วยไม้ที่ยั่งยืนต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 กล้วยไม้สกุลหวายหมู่ในโครเซอร์ซูเรและลูกผสม

กล้วยไม้สกุลหวายหมู่ในโครเซอร์ซูเรและลูกผสมที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 15 พันธุ์ ได้แก่ (1) เอื้องปากนกแก้ว (*D. cruentum* Rchb.f.) (2) เอื้องเงินหลวง (*D. formosum* Roxb. ex Lindl.) (3) ลูกผสม 1 : ดอนมารี (Dawn Maree) = เอื้องปากนกแก้ว x เอื้องเงินหลวง (4) ลูกผสม 2: รุ่งกมล เวศย์วรุฒม์ (Roongkamol Vejvarut) = ดอนมารี x เอื้องเงินหลวง (5) ลูกผสม 3: กรีนแลนเทิร์น (Green Lanturn) = ดอนมารี x เอื้องปากนกแก้ว (6) ลูกผสม 4: ลูกผสมดอนมารี (Dawn Maree hybrid) = ดอนมารี x เอื้องแฉะหอม (7) เอื้องแฉะหอม (*D. scabrilingue* Lindl.) (8) เอื้องเงิน (*D. draconis* Rchb. f.) (9) เอื้องทอง (*D. ellipsophyllum* Tang & Wang) (10) ลูกผสม 5: เอื้องเงินหลวง x เอื้องทอง (11) เอื้องตาเหิน (*D. infundibulum* Lindl.) (12) เอื้องนางชี (*D. kontumense* Gagnep.) (13) เอื้องแฉะภูกระตัง (*D. christyanum* Rchb.f.) (14) ลูกผสม 6: ฟรอสต์ดอนปากแดง (Frosty Dawn var. red labellum) = ดอนมารี x ไลม์ฟรอส (Lime Frost) = เอื้องปากนกแก้ว x เอื้องแฉะ และ

(15) ลูกผสม 7: ฟรอสต์ดอนปากเหลือง (Frosty Dawn var. yellow labellum) = ดอนมารี x ไลม์ฟรอส (Lime Frost) = เอื้องปากนกแก้ว x เอื้องแฉะ โดยเก็บรวบรวมและนำมาเพาะปลูกจนออกดอกและจำแนกพันธุ์เบื้องต้นโดยการตรวจสอบลักษณะสัณฐาน (morphology) โครงสร้างลำต้น ลักษณะใบ รวมถึงโครงสร้างดอก

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ในโครเซอร์ซูเรและลูกผสมทั้ง 15 พันธุ์ ด้วยวิธีประยุกต์ของ Doyle และ Doyle (1987) โดยนำใบกล้วยไม้ปริมาณ 3-4 กรัม บดในโกร่งด้วยบัพเฟอร์สกัด (extraction buffer; 4 % CTAB, 2.5 M NaCl, 0.6 % SDS, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 0.1 % sodium metabisulfite) 20 มิลลิลิตร พอลิไวนิลไพร์โรลิโดน (PVP) 0.3 กรัม และ 2-mercaptoethanol 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่แล้วเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ (linear polyacrylamide) 100 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) 1 เท่า แล้วบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 15 นาที และล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล แล้วละลายตะกอนด้วยบัพเฟอร์ (TE buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นจึงเติมเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอ (RNase A 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 1.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที หลังจากครบระยะเวลาสกัดด้วยฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์

(phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25:24:1) 500 ไมโครลิตร และสกัดด้วย คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิแอลกอฮอล์ (24:1) จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมลิเียร์พอลิอะคริลาไมด์ 5 ไมโครลิตร เติมน้ำละลายโซเดียมอะซิเตต (3 M sodium acetate pH 5.2) 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทั้งหมด และเติมไอโซโพรพานอล 1 เท่า แล้วบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g นาน 15 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล และทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งละลายตะกอนในบัฟเฟอร์ 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose) ที่ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแอสตอร์เอฟีดี

ขั้นแรกเป็นการคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยนำดีเอ็นเอผสมของกล้วยไม้สกุลหวายหนูในโกรเซอร์ซูเรและลูกผสมทั้ง 15 พันธุ์ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 72 ชนิด (Wako Company, Japan) ซึ่งมีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ โดยปฏิกิริยามีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม (ng) ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1 mg/ml BSA, 10 mM (NH₄)₂SO₄) และมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์แบบสุ่ม 250 นาโน โมลาร์ (nM) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (RBC Bioscience, Taiwan) 1 ยูนิต

(unit) ภายใต้สภาวะที่ดัดแปลงจากงานวิจัยของ นฤมล และคณะ (2555) ซึ่งมี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที บ่มที่ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และบ่มที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) และตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet)

ขั้นที่สองเป็นการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยนำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนแรกมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายหนูในโกรเซอร์ซูเรและลูกผสมแต่ละสายพันธุ์ แล้วนำไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA) จากนั้นบันทึกภาพเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป

2.4 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายหนูในโกรเซอร์ซูเรและลูกผสมทั้ง 15 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแอสตอร์เอฟีดี โดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 0 แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity index) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 (Rohlf, 2002)

3. ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟพีดี

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่โนโกรเฮอร์ชเชและลูกผสมจำนวน 15 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 39 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และพบว่าไพรเมอร์ 17 ชนิด ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจน

(คิดเป็น 23.61 เปอร์เซ็นต์)

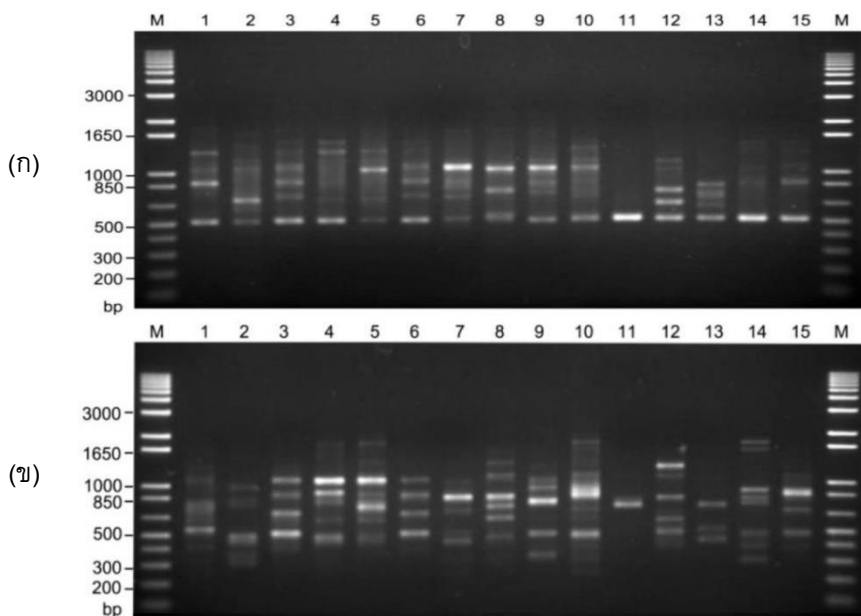
เมื่อนำไพรเมอร์ 17 ชนิด มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่โนโกรเฮอร์ชเชและลูกผสมทั้ง 15 พันธุ์ พบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 1,086 แถบ (คิดเป็น 63.88 เปอร์เซ็นต์) โดยมีขนาดอยู่ระหว่าง 150 ถึง 3,000 คู่เบส และพบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง (polymorphic band) เฉลี่ย 14.12 แถบต่อไพรเมอร์ (คิดเป็น 99.41 เปอร์เซ็นต์) โดยไพรเมอร์ D23 ให้แถบ

ตารางที่ 1 ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอจำเพาะ และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่โนโกรเฮอร์ชเชและลูกผสมจำนวน 15 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟพีดี

Random primer	Nucleotide Sequence 5'→3'	Total bands	Polymorphic loci	Monomorphic loci	% Polymorphic
A22	AGAATTGGACCA	69	14	-	100
A24	CTCCTGCTGTTG	81	16	-	100
A27	ATCGCGGAATA	58	14	-	100
A29	GGTTCGGAATG	57	11	-	100
A30	GACCTGCGATCT	40	13	-	100
A31	AAGGCGCGAACG	38	9	-	100
B22	GGTGACTGGTGG	52	10	1	90
B23	GGTGCCGGAGCA	82	12	-	100
B27	GGCGGTTATGAA	68	16	-	100
B32	ATCGCGGCTTAT	53	15	-	100
C21	GGAGAGCGGACG	65	15	-	100
C28	GTCGACGCATCA	82	14	-	100
C31	TCTGCTGACCGG	69	12	-	100
D23	ACCATCAAACGG	63	21	-	100
E23	AGGTACGCCGCA	61	10	-	100
F23	CCATCCGCACGA	70	18	-	100
F25	CCAGATCCGAAT	78	20	-	100
รวม (total)		1,086	240	1	-
ค่าเฉลี่ย (average)		63.88	14.12	0.06	99.41

ดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างมากที่สุดถึง 21 แถบ (ตารางที่ 1) นอกจากนั้นยังพบว่าไพรเมอร์ B22 ให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันทั้งหมด (monomorphic

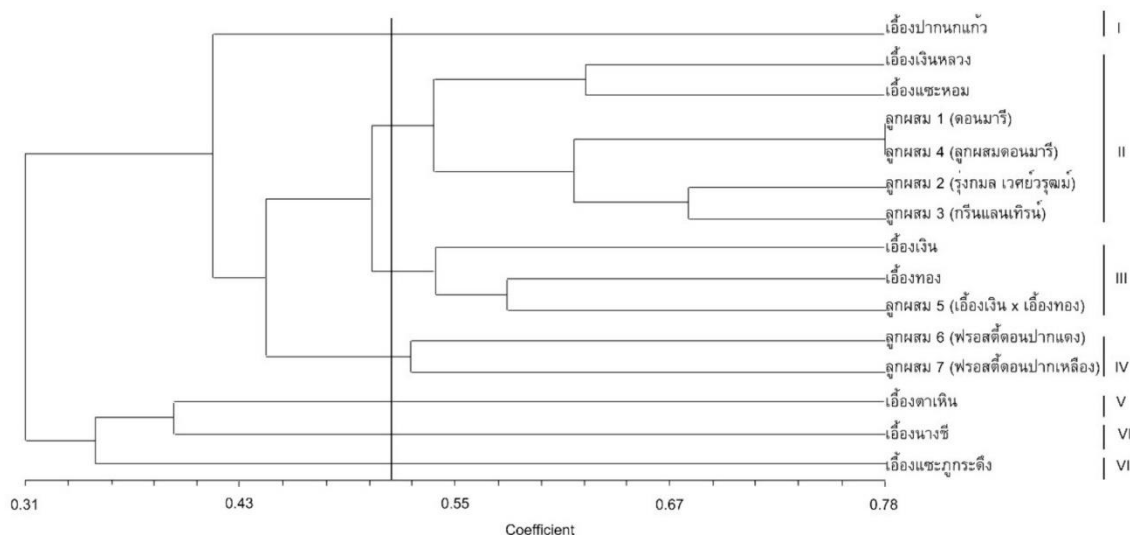
band) 1 แถบ ขนาดประมาณ 500 คู่เบส (รูปที่ 1) โดยแถบดีเอ็นเอดังกล่าวอาจเป็นลักษณะพันธุกรรมเฉพาะของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ในโกรเซอร์ซูเร



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ในโกรเซอร์ซูเรและลูกผสมที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ B22 (ก) และ D23 (ข) [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA) และ 1-15 คือ (1) เอื้องปากนกแก้ว (2) เอื้องเงินหลวง (3) ลูกผสม 1 (ดอนมารี) (4) ลูกผสม 2 (รุ่งกมล เวศย์วุฒม์) (5) ลูกผสม 3 (กรีนแลนด์เทิร์น) (6) ลูกผสม 4 (ลูกผสมดอนมารี) (7) เอื้องแซะหอม (8) เอื้องเงิน (9) เอื้องทอง (10) ลูกผสม 5 (เอื้องเงินหลวง x เอื้องทอง) (11) เอื้องตาเหิน (12) เอื้องนางชี (13) เอื้องแซะภูกระดัง (14) ลูกผสม 6 (ฟรอสต์ดอนปากแดง) และ (15) ลูกผสม 7 (ฟรอสต์ดอนปากเหลือง) ตามลำดับ]

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมดด้วยโปรแกรม NTSY-pc รุ่น 2.0 และจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ได้ดังรูปที่ 2 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) อยู่ระหว่าง 0.20 ถึง 0.78 โดยพบว่าลูกผสมดอนมารีและดอนมารีมีความใกล้เคียงกันมากที่สุด (0.78) ในขณะที่ลูกผสมดอนมารีแตกต่างจากเอื้องแซะภูกระดังมากที่สุด (0.20) (ตารางที่ 2)

เมื่อพิจารณาที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนที่ 0.51 พบว่าสามารถแยกกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ในโกรเซอร์ซูเรและลูกผสมเป็น 7 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ เอื้องปากนกแก้ว กลุ่ม 2 ได้แก่ เอื้องเงินหลวง เอื้องแซะหอม ลูกผสม 1 (ดอนมารี) ลูกผสม 4 (ลูกผสมดอนมารี) ลูกผสม 2 (รุ่งกมล เวศย์วุฒม์) และลูกผสม 3 (กรีนแลนด์เทิร์น) กลุ่ม 3 ได้แก่ เอื้องเงิน เอื้องทอง และลูกผสม 5 (เอื้องเงินหลวง x เอื้องทอง) กลุ่ม 4 ได้แก่ ลูกผสม 6



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ในโครเออร์ซูเรและลูกผสม 15 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตตอร์เอดี้ดี

ตารางที่ 2 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ไทรโครซิสและลูกผสม 15 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

[illegible]

(ฟรอสต์ต่อนปากแดง) และลูกผสม 7 (ฟรอสต์ต่อนปากเหลือง) กลุ่ม 5 ได้แก่ เอื้องตาเหิน กลุ่ม 6 ได้แก่ เอื้องนางชี และกลุ่ม 7 ได้แก่ เอื้องแซะภูกระดึง ซึ่งจากการศึกษาลักษณะสัณฐานพบว่า กล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมมีโครงสร้างดอกใกล้เคียงกับพ่อแม่พันธุ์ และการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA พบว่ามีความสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานดังกล่าวได้แก่ ลูกผสม 1 (ดอนมาริ) มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนใกล้เคียงกับพ่อหรือแม่เท่ากัน โดยใกล้เคียงกับแม่ (เอื้องปากนกแก้ว) (0.52) และใกล้เคียงกับพ่อ (เอื้องเงินหลวง) (0.58) ส่วนลูกผสม 2 (รุ่งกมลเวศย์วรุณม) ใกล้เคียงกับแม่ (ดอนมาริ) (0.65) และใกล้เคียงกับพ่อ (เอื้องเงินหลวง) (0.67) เป็นต้น

3.2 อภิปรายผล

เทคนิคอาร์เอฟดีคือเทคนิคที่ใช้ไฟรเมอร์แบบสุ่มเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยขั้นตอนการเข้าจับของไฟรเมอร์ (annealing temperature) จะใช้อุณหภูมิประมาณ 35-42 องศาเซลเซียส (Williams *et al.*, 1990) แต่เพื่อเพิ่มความถูกต้องของลายพิมพ์ดีเอ็นเอให้มากขึ้น จึงมีการพัฒนาเป็นเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี โดยเพิ่มอุณหภูมิช่วงการเข้าจับของไฟรเมอร์สูงขึ้นเป็น 46-62 องศาเซลเซียส (Xiang *et al.*, 2003; Boonsrangsom *et al.*, 2008) ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มความจำเพาะของการเข้าจับระหว่างไฟรเมอร์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีผลต่อผลผลิตจากปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสให้เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงมีจำนวนแถบดีเอ็นเอลดลง แต่มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น (นฤมล และคณะ, 2556)

งานวิจัยนี้ เมื่อสกัดแยกดีเอ็นเอและนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยแฮตอาร์เอฟดี ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ไฟรเมอร์แบบสุ่ม แล้ววิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ พบว่าแฮตอาร์เอฟดีสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายหมู่

โนโกรเฮอร์ซูเรและลูกผสมทั้ง 15 พันธุ์ ได้เป็น 7 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ระบุว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับลักษณะสัณฐาน (นฤมล และคณะ, 2557) นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีสามารถจัดจำแนกและแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชลูกผสมได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Sitthiphrom *et al.*, 2006; Chundet *et al.*, 2007)

เทคนิคแฮตอาร์เอฟดีสามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการประเมินความสัมพันธ์ของพืชในวงศ์จำปา (วรสิรา และคณะ, 2556) กล้วยสกุลมิวซา (จิตติพร และคณะ, 2556) แพร่เชียงไฮ้ (เกียรติชัย และคณะ, 2556) หม้อข้าวหม้อแกงลิง (เกียรติชัย และคณะ, 2557) ผักกาด (จาตุรงค์ และคณะ, 2557) ขมิ้น (วรสิรา และคณะ, 2557) ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์กล้วยพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (จิตติพร และคณะ, 2557) กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม (เกียรติชัย และคณะ, 2557) กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (วรสิรา และคณะ, 2557) ข้าวมีสี (จาตุรงค์ และคณะ, 2557) กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย (นฤมล, 2557) กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม (จินต์, 2558) นอกจากนี้เทคนิคแฮตอาร์เอฟดียังสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการกลายในถั่วเขียว (จาตุรงค์ และคณะ, 2556) ได้อีกด้วย

4. สรุป

เมื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่โนโกรเฮอร์ซูเรและลูกผสมจำนวน 15 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี โดยใช้ไฟรเมอร์แบบสุ่ม 17 ชนิด แล้ววิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 พบว่ากล้วยไม้สกุลหวายหมู่โนโกรเฮอร์ซูเรและลูกผสมมีความแตกต่างทางพันธุกรรม สามารถจำแนกเป็น 7 กลุ่ม และ

พบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเฉลี่ย 0.50 โดยลูกผสมตอนมารีและตอนมารีมีความใกล้เคียงกันมากที่สุด (0.78) ซึ่งไพรเมอร์แบบสุ่ม 16 ชนิด ได้แก่ A22, A24, A27, A29, A30, A31, B23, B27, B32, C21, C28, C31, D23, E23, F23 และ F25 พบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างสูง (คิดเป็น 100 เบส) และพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันในทุกพันธุ์ขนาดประมาณ 500 คู่เบส จากไพรเมอร์ B22 ดังนั้นผลการวิจัยนี้สามารถนำไปเป็นแนวทางในการวางแผนการอนุรักษ์ การปรับปรุงพันธุ์ และการใช้ประโยชน์จากกล้วยไม้ที่ยั่งยืนต่อไป

5. รายการอ้างอิง

- เกียรติชัย แซ่ใต้, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 92-101.
- เกียรติชัย แซ่ใต้, เปรมณัช ขุนปักซี่, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแพรวเชียงไฮ้ (*Portulaca grandiflora*) ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Genet. S1: 226-229.
- เกียรติชัย แซ่ใต้, เปรมณัช ขุนปักซี่, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 237-242.
- จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การประยุกต์เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีเพื่อตรวจสอบการกลายในถั่วเขียว, Thai J. Genet. S1: 248-252.
- จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 113-122.
- จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, เปรมณัช ขุนปักซี่, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกฝักกาดด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 3: 23-28.
- จินต์ ทองสม, นฤมล ธนานันต์ และชีระชัย ธนานันต์, 2558, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มด้วยแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 476-484.
- จิตติพร ไท้มโสภา, ชีระชัย ธนานันต์, บุญหงษ์ จงคิด และนฤมล ธนานันต์, 2557, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์กล้วยพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 3: 36-44.
- จิตติพร ไท้มโสภา, เปรมณัช ขุนปักซี่, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสกุลมิวชาด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Genet. S1: 201-205.
- นฤมล ธนานันต์, จิตติพร ไท้มโสภา และชีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-179.
- นฤมล ธนานันต์, จิตติพร ไท้มโสภา และชีระชัย ธนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 102-108.

นฤมล ธนानันต์, วิทยาพรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย
 ธนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์
 ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้อง
 สายด้วยเครื่องหมายแอสตอาร์เอฟดี, ว.
 วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 99-108.

นฤมล ธนานันต์, สุรีย์พร พุ่มเอี่ยม และธีระชัย
 ธนานันต์, 2556, การจำแนกพันธุ์และ
 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้าง
 และลูกผสมด้วยเครื่องหมายแอสตอาร์เอฟดี, ว.
 วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21: 360-370.

วริสรา แทนสง่า, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล
 ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการ
 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ
 กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) ด้วยเทคนิค
 แอสตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci.
 Technol. 3: 102-112.

วริสรา แทนสง่า, ธีระชัย ธนานันต์, บุญหงษ์ จงคิด
 และนฤมล ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์
 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนก
 ชนิดด้วยเทคนิคแอสตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci.
 Technol. 3: 29-35.

วริสรา แทนสง่า, เปรมณัช ขุนปักษ์, ธีระชัย
 ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การ
 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช
 ในวงศ์จำปาด้วยเทคนิคแอสตอาร์เอฟดี, Thai
 J. Genet. S1: 196-200.

สำนักพัฒนาการค้าและธุรกิจการเกษตรและอุตสาหกรรม
 กรมการส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ,
 สินค้ากล้วยไม้, แหล่งที่มา : [http://www.ditp.
 go.th/contents_attach/92375/92375.pdf](http://www.ditp.go.th/contents_attach/92375/92375.pdf), 21
 ธันวาคม 2558.

สุรีย์พร เกตุงาม, 2546, เครื่องหมายดีเอ็นเอในงาน
 ปรับปรุงพันธุ์พืช, ว.วิชาการ ม.อบ. มหา
 วิทยาลัยอุบลราชธานี 5(2): 37-59.

อบจันท์ ไทยทอง, 2542, กล้วยไม้เมืองไทย,

สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.

Boonsrangsom, T., Pongtongkam, P.,
 Masuthon, S. and Peyachoknagul, S.,
 2008, Development of microsatellite
 markers for *Dendrobium* orchids, Thai J.
 Genet. 1: 47-56.

Brown, S.M., Szewc-McFadden, A.K. and
 Kresovich, S., 1996, Development and
 Application of Simple Sequence Repeat
 (SSR) Loci for Plant Genome Analysis,
 pp. 147-159, In Jauhar, P.P. (Ed.),
 Methods of Plant Genome Analysis, Their
 Merits and Pitfalls, CRS Press, Boca
 Raton, F.L., U.S.A.

Chundet, R., Cutler, R.W., Tasanon, M. and
 Anuntalabhochai, S., 2007, Hybrid
 detection in Lychee (*Litchie chinensis*
 Sonn.) cultivars using HAT-RAPD
 markers, Sci. Asia Res. 33: 307-311.

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.

Peyachoknagul, S., Mongkolsiriwatan, C.,
 Wannapinpong, S., Huehne, P.S. and
 Srikulnath, K., 2014, Identification of
 native *Dendrobium* species in Thailand by
 PCR-RFLP of rDNA-ITS and chloroplast
 DNA, Sci. Asia Res. 40: 113-120.

Rohlf, F., 2002, NTSYS-pc Numerical
 Taxonomy and Multivariate Analysis
 System, Applied Biostatistics, New York.

Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T.,
 1989, Molecular Cloning: A Laboratory
 Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor

- Laboratory Press, New York.
- Sitthiphrom, S., Marha, J. and Anuntalabho-
chai, S., 2006, Development of sequence-
characterized DNA marker linked to
temperature insensitivity for fruit produc-
tion in Longan (*Dimocarpus longan* Lour.)
cultivars, Sci. Asia Res. 33: 307-311.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J.,
Rafalski, J.A. and Tingey, S.U., 1990,
DNA polymorphisms amplified by arbitrary
primers are useful as genetic markers,
Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535.
- Williams J., Kubelik A., Livak K., Rafalski J.
and Tingey SV., 1990, DNA polymer-
phisms amplified by arbitrary primers are
useful as genetic markers, Nucl. Acids
Res. 18: 653.
- Xiang, N., Hong, Y. and Lam-Chan, L.T., 2003,
Genetic analysis of tropical orchid hybrids
(*Dendrobium*) with fluorescence amplified
fragment length polymorphism (AFLP),
Hort. Sci. 128: 731-735.
- Zhang, F., Lu, Y., Dong, H. and Guo, S., 2010,
Analysis of genetic stability through inter
simple sequence repeats molecular
markers in micro propagated plantlets of
Anoectochilus formosanus Hayata, a
medicinal plant, Biol. Pharm. Bull. 33:
384-388.