

การจำแนกชนิดและการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดี Identification and Assessment of Genetic Relationship Among *Coelogyne* (Orchidaceae) Using HAT-RAPD

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

ภัทรา หงษ์ทองดี และธีระชัย ธนานันต์*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Narumol Thanananta

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

Pattra Hongtongdee and Theerachai Thanananta*

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

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนพบได้ตามป่าชุ่มน้ำเขตร้อนและป่าดงดิบ เป็นกล้วยไม้ที่มีดอกสีนวลสวยงาม มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ ดูแลเพาะเลี้ยงง่าย และทนต่อความแห้งแล้ง จึงได้รับความนิยมในการปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับ ปัจจุบันการจำแนกพันธุ์โดยดูเพียงลักษณะฐานทำได้ยากและมีความผิดพลาดสูง ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาการจำแนกชนิดและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ไพรเมอร์ ผลการวิจัยพบว่า 37 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเอื้องเทียนทั้ง 14 ชนิด ได้ หลังจากนั้นได้คัดเลือกมา 31 ไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งปรากฏว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ โดยพบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด 257 แถบ นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกเอื้องเทียนแต่ละชนิดออกจากกันได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว จำนวน 10 ไพรเมอร์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่าง 0.31 ถึง 0.64 และสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนออกเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งผลการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ในการวางแผนเพื่อการอนุรักษ์และการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : กล้วยไม้; สกุลเอื้องเทียน; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การจำแนก; แอสตาร์เอฟีดี

Abstract

The *Coelogyne* can be found from tropical lowland forests to montage rainforests. The plants have beautiful, fragrant flowers, can tolerate drought and neglect. So, *Coelogyne* are popular orchids of growers by dwellings. Nowadays identification based on morphology is difficult and high error. Thus, High annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique was used to identify and assessment 14 species of *Coelogyne*. The total 72 random primers were screened and 37 primers could be used for DNA amplification. And then, selected thirty-one primers that can gave clear amplified products for used to construct DNA fingerprints. The result showed differences among 14 samples with specific DNA bands and were 257 polymorphic bands. In addition, 10 of 31 random primers were found to identify each sample using only one primer. A dendrogram, which constructed base on polymorphic bands using the NTSYS program, showed genetic similarities among the 14 species of *Coelogyne* with similarity coefficients ranging from 0.31 to 0.64 and separated to 5 clusters. Finally these results indicate that the HAT-RAPD markers capable to specify *Coelogyne*, which used to planning in the breeding program and maintain.

Keywords: orchid; *Coelogyne*; genetic relationship; identification; HAT-RAPD

1. คำนำ

กล้วยไม้เป็นพืชที่มีความสวยงามทั้งสัดส่วนของต้น ใบ ร่วมกับองค์ประกอบของดอกที่มีลวดลาย และสีอันสวยงาม จึงทำให้กล้วยไม้ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก นำมาปลูกตามบ้านเรือนเป็นไม้ดอกไม้ประดับ รวมถึงมีการปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะดอก และลำต้นสวยงามมากยิ่งขึ้น โดยประเทศไทยได้ชื่อว่าเป็นดินแดนแห่งกล้วยไม้ เนื่องจากมีสภาพภูมิประเทศที่เหมาะสม มีป่าไม้ที่อุดมสมบูรณ์ เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของกล้วยไม้ในแต่ละปีมีการค้าขายกล้วยไม้ทั้งในและนอกประเทศเป็นจำนวนมาก ประเทศไทยจึงเป็นผู้ผลิตและส่งออกดอกกล้วยไม้เขตร้อนอันดับ 1 ของโลก มีอัตราเพิ่มของมูลค่าการส่งออกดอกกล้วยไม้ และต้นกล้วยไม้ในช่วงปี พ.ศ. 2552-2559 ร้อยละ 19.09 และ 25.31 ตามลำดับ โดยมีสัดส่วนการ

ส่งออกดอกกล้วยไม้ประมาณร้อยละ 85 และต้นกล้วยไม้ประมาณร้อยละ 15 ของมูลค่าการส่งออกของกล้วยไม้ทั้งหมด (คณะกรรมการกล้วยไม้แห่งชาติ, 2553) ทำให้อุตสาหกรรมกล้วยไม้ของไทยสามารถสร้างรายได้นำเงินเข้าสู่ประเทศได้เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังช่วยให้เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกล้วยไม้มีรายได้ และมีความมั่นคงในอาชีพ

กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนจัดเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย ลำลูกกล้วยรูปไข่ มีตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ มีเพียงปล้องเดียว ใบรูปรีจนถึงรูปแถบ ออกที่ปลายลำ มี 1-2 ใบ ใบอ่อนม้วนตามแนวยาว มีอายุหลายฤดูก่อนหลุดร่วง ช่อดอกเป็นช่อกระจุก ออกปลายหน่อใหม่หรือออกที่ปลายลำที่เจริญเต็มที่ ช่อดอกมีทั้งตั้งตรง ทอดเอียง และห้อยลง มีสีดอกหลายสี ได้แก่ สีขาว สีเขียว สีเหลือง จนถึงสีส้ม กลีบดอกเป็นรูปแถบ กลีบปากอยู่ทางด้านล่าง มักมี

หุบปากรูปสามเหลี่ยม เส้าเกรสเรียงยาวและที่ปลายแผ่เป็นครีบลายหมวก สกุลนี้มีการกระจายพันธุ์ในเขตร้อนของทวีปเอเชียพบประมาณ 250 ชนิด และในประเทศไทยพบแล้ว 27 ชนิด (สลิล, 2548) สกุลเอื้องเทียนมีการลดจำนวนลงเรื่อย ๆ เนื่องจากการตัดไม้ทำลายป่า ทำให้ที่อยู่อาศัยของกล้วยไม้ลดลง อีกทั้งกล้วยไม้ยังต้องการองค์ประกอบอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เช่น อาหาร เมื่อปัจจัยที่สำคัญต่อกล้วยไม้ลดลง ส่งผลให้กล้วยไม้ค่อย ๆ ลดจำนวนลง แพรวขยายพันธุ์ตามธรรมชาติได้น้อยลง เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ จึงต้องมีการศึกษาเพื่อจำแนกและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนทั้งนี้เพื่อนำมาใช้ในการวางแผนในการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ โดยอาจทำได้ด้วยการดูลักษณะสัณฐาน (morphology) ภายนอก เช่น ดอก ใบ ราก แต่วิธีนี้มักมีความผิดพลาดสูง เนื่องจากอาจมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ทำให้ลักษณะภายนอกของกล้วยไม้เปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ยังต้องมีความเชี่ยวชาญในการแยกความแตกต่างของกล้วยไม้แต่ละชนิดอีกด้วย ดังนั้นจึงควรใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มาช่วยในการจำแนกและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยเนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอบางประเภทมีประสิทธิภาพสูง ทำได้ง่าย รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย สามารถตรวจสอบได้ครอบคลุมทั่วทั้งจีโนม และไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง

งานวิจัยที่เคยรายงานก่อนหน้านี้พบว่า นักวิจัยได้ประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการจำแนกและประเมินความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สำเร็จมาแล้วหลายสกุล ได้แก่ กล้วยไม้ช้างและลูกผสม (นฤมล, 2556) กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย (นฤมล, 2557) กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (วรสิรา, 2557)

กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม (เกียรติชัย และคณะ, 2557) เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้กับพืชอื่น ได้แก่ พืชในวงศ์จำปา (วรสิรา และคณะ, 2556) กล้วยสกุลมิวซา (จิตติพร และคณะ, 2556) แพร่เชียงไต้ (เกียรติชัย และคณะ, 2556) หม้อข้าวหม้อแกงลิง (เกียรติชัย และคณะ, 2557) ผักกาด (จาตุรงค์ และคณะ, 2557) ขมิ้น (วรสิรา และคณะ, 2557) ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์กล้วยพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (จิตติพร และคณะ, 2557) ข้าวมีสี (จาตุรงค์ และคณะ, 2557) สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อย

ด้วยความสำคัญดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการจำแนกชนิดและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA) ซึ่งเป็นวิธีที่ปรับปรุงมาจากเทคนิคอาร์เอฟพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) คือ มีการเพิ่มอุณหภูมิ (annealing temperature) ในขั้นตอนการเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ของไพรเมอร์ (primer) จาก 35-42 เป็น 46-62 องศาเซลเซียส ซึ่งจะให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) มีความชัดเจนมากขึ้นและให้แถบดีเอ็นเอ (DNA band) ที่มีความหลากหลายรูป (polymorphism) เพิ่มขึ้น (Anuntalabhochai *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตาม เทคนิคแฮตอาร์เอฟพีดีอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม (Welsh and McClelland, 1990) ไพรเมอร์จะเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบภายในจีโนม โดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจง (arbitrary primer) หรือไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

รวมทั้งประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker technique) ชนิดอื่น (Sitthiphrom *et al.*, 2006)

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างกล้วยไม้

กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (*Coelogyne*) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จำนวน 14 ชนิด ได้แก่ (1) เอื้องเทียนใบแคบ (*C. viscosa* Rchb. f.) (2) เอื้องเทียนลำเขียว (*C. lentiginosa* Lindl.) (3) เอื้องเทียนหิน (*C. calcicola* Kerr.) (4) เอื้องเทียนน้อย (*C. lactea* Rchb. f.) (5) เอื้องเทียนส้ม (*C. fuscescens* var. *brunnea*) (6) เอื้องเทียนบาร์บาตา (*C. barbata* Lindl. ex Griff.) (7) เอื้องมัน (*C. cumingii* Lindl.) (8) เอื้องหมาก (*C. trinervis* Lindl.) (9) เอื้องเทียนขาว [*C. nitida* (Wall. Mss.) Lindl.] (10) เอื้องสายเสริต [*C. rochussenii* (de Vriese) Kuntze] (11) เอื้องลำเทียนปากดำ (*C. brachyptera* Rchb. f.) (12) เอื้องเทียนไหฉู้ลาว (*C. eberhardtii* Gagnep.) (13) เอื้องผาหมอก (*C. xyrekes* Ridl.) และ (14) เอื้องเทียนใบรี (*C. fimbriata* Lindl.)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบกล้วยไม้เอื้องเทียนทั้ง 14 ชนิด มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1978) โดยชั่งชิ้นส่วนใบกล้วยไม้ 2-3 กรัม เติมน้ำบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer ที่ประกอบด้วย 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) ซึ่งอุ่นในอ่างน้ำอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเติมพอลิไวนิลไพโรลิโดน (polyvinyl pyrrolidone, PVP) 0.3 กรัม ลงในโกร่ง บดให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน เทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำเบตาเมอแคปโทเอทานอล (β -mercaptoethanol) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้ว

นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการกลับหลอดไปมาเป็นระยะ ๆ แล้ววางไว้ให้เย็นลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol, 24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ตูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ (linear polyacrylamide) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (เปิดฝาหลอด) ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ทีอี (TE buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม RNaseA ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงสู่หลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด หลอดละ 500 ไมโครลิตร เติมน้ำฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol, 25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาตูดสารละลายใสส่วนบนลงสู่หลอดใหม่ แล้วเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 x g เป็น

เวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารละลายใส่ส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมลิเเนอร์ฟอลิอะครีลาไมด์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 x g รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (เปิดฝาหลอด) ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ที่อัมปรีมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยมวลต่อปริมาตร ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที แล้วตรวจสอบด้วยเครื่อง gel documentation เพื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) โดยเจือจางสารละลายดีเอ็นเอ 50 เท่า และหาอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

2.4 การสร้างเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดี

2.4.1 การคัดกรองไพรเมอร์

นำดีเอ็นเอของเอื้องเทียนทั้งหมดมา

เจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นดูดสารละลายดีเอ็นเอของเอื้องเทียนทั้ง 14 ชนิด ชนิดละ 10 ไมโครลิตร ผสมลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร หลอดเดียวกันนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาแลงซ์พอลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ชุด A2, B2, C2, D2, E2 และ F2 จากบริษัท Wako Company (Japan) ซึ่งมีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ โดยองค์ประกอบของสารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ ดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม (ng) บัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 2.5 mM MgCl₂) ไพรเมอร์แบบสุ่ม 250 นาโนโมลาร์ นิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (RBC Taq DNA polymerase) 1 ยูนิต (unit) (น.ถ.ม., 2555)

ปฏิกิริยาแลงซ์พอลิเมอเรสประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ (1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ annealing ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำรวม 40 รอบ และ (3) complete extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น.ถ.ม., 2555)

2.4.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนการคัดกรองไพรเมอร์ มาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนทั้งหมด แล้วนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาแลงซ์พอลิเมอเรสมาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส

ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์นาน 5 นาที แล้วนำไปถ่ายภาพเจลด้วยเครื่อง gel documentation

2.5 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ โดยถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอจะให้ค่าเท่ากับ 1 และถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจะให้ค่าเท่ากับ 0 จากนั้นนำผลการนับแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pairgroup method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

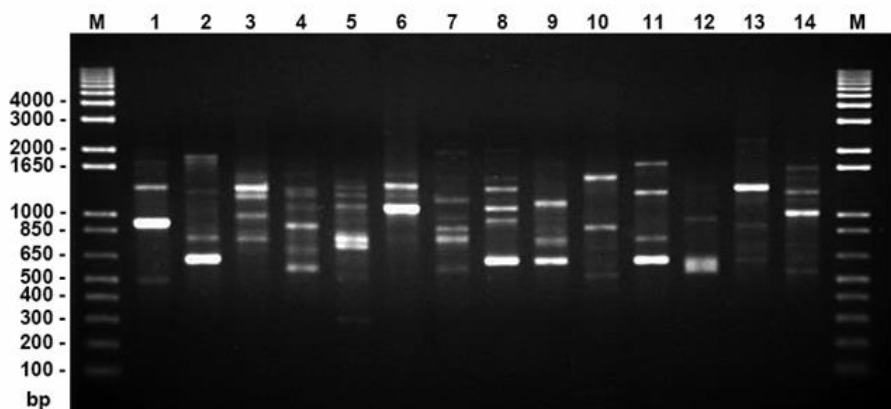
3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ของเทคนิคแอสตาเรียพีดีที่ใช้ดีเอ็นเอผสมเป็นดีเอ็นเอแม่แบบโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเอื้องเทียนทั้ง 14 ชนิด จำนวน 37 ไพรเมอร์ (คิดเป็น 51.39 %) จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลอย่างชัดเจนมา 31 ไพรเมอร์ เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเอื้องเทียนทั้ง 14 ชนิด (รูปที่ 1) ปรากฏว่ามีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 257 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ค่าแตกต่างกันในแต่ละชนิดของเอื้องเทียน (polymorphic band) ขนาดประมาณ 300-3000 คู่เบส ซึ่งเทคนิคแอสตาเรียพีดีนี้จะให้ไพรเมอร์แบบสุ่มเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบในตำแหน่งที่ต่างกัน ขึ้นอยู่กับว่าตำแหน่งที่เข้าจับนั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงหรือไม่ โดยอาจมีการเพิ่ม ขึ้น การขาดหายไป หรือการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าจับ จึงให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน (สุรินทร์, 2552) ทำให้สามารถจำแนกและประเมิน

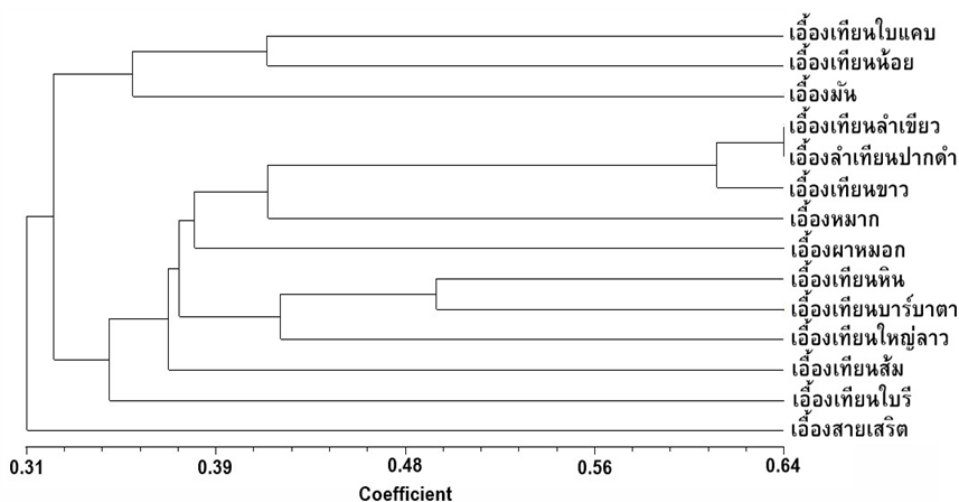
ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้ นอกจากนี้ ยังพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเอื้องเทียนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเอื้องเทียนชนิดนั้น ๆ จึงสามารถจำแนกเอื้องเทียนแต่ละชนิดออกจากกันได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว มีทั้งหมด 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ A27, A30, A32, B21, B27, C21, C24, C29, D22 และ F29

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยบันทึกการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ แล้วให้ค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏแถบให้ค่าเท่ากับ 0 จากนั้นนำไปหาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ 14 ชนิด มีค่า 0.31-0.64 โดยเอื้องเทียนลำเขียวและเอื้องลำเทียนปากดำมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนมากที่สุด คือ 0.64 ในขณะที่เอื้องสายเสริตมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนน้อยที่สุด คือ 0.31 ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เอื้องเทียนใบแคบ เอื้องเทียนน้อย กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เอื้องมัน กลุ่มที่ 3 แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยที่ 3.1 ได้แก่ เอื้องเทียนลำเขียว เอื้องลำเทียนปากดำ เอื้องเทียนขาว เอื้องหมาก เอื้องผาหมอก เอื้องเทียนหิน เอื้องเทียนบาร์บาตา เอื้องเทียนใหญ่ลาว และกลุ่มย่อยที่ 3.2 ได้แก่ เอื้องเทียนส้ม กลุ่มที่ 4 ได้แก่ เอื้องเทียนใบปรี และกลุ่มที่ 5 ได้แก่ เอื้องสายเสริต (รูปที่ 2)

เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่าเอื้องเทียนลำเขียวและเอื้องลำเทียนปากดำมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากัน คือ 0.64 (รูปที่ 3) สอดคล้องกับผลการวิจัยของ ภัทรา และคณะ (2559) ซึ่งได้จำแนกและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ แสดงว่าเอื้องเทียนลำเขียวและเอื้อง



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดีโดยใช้ไพรเมอร์ F23 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA) และ 1-14 คือ (1) เอื้องเทียนใบแคบ (2) เอื้องเทียนลำเขียว (3) เอื้องเทียนหิน (4) เอื้องเทียนน้อย (5) เอื้องเทียนส้ม (6) เอื้องเทียนบาร์บาตา (7) เอื้องมัน (8) เอื้องหมาก (9) เอื้องเทียนขาว (10) เอื้องสายเสริต (11) เอื้องลำเทียนปากดำ (12) เอื้องเทียนใหญ่ลาว (13) เอื้องผาหมอก และ (14) เอื้องเทียนใบรี ตามลำดับ]



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนทั้ง 14 ชนิด ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี

ลำเทียนปากดำมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก โดยคาดว่าอาจเป็นเอื้องเทียนชนิดเดียวกันมาก่อน แต่เมื่อมีการแพร่กระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในภูมิประเทศต่าง ๆ ของประเทศไทย ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากการผสมพันธุ์และการคัดเลือกโดยธรรมชาติ โดยการมีวิวัฒนาการ

ร่วมกัน และอาจมีอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมในพื้นที่นั้น ในขณะที่เอื้องสายเสริตมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกับเอื้องเทียนชนิดอื่นน้อยที่สุด คือ 0.31 ซึ่งมีความแตกต่างมากที่สุดและถูกจัดกลุ่มแยกออกจากอีก 4 กลุ่ม สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานเนื่องจากเอื้องสายเสริตจัดอยู่ในหมู่ Tomentosae

ที่มีลักษณะการออกดอกแบบเป็นช่อทั้งห้อยลง
ประมาณ 12-26 ดอกต่อช่อ แตกต่างกับเอื้องเทียน
ชนิดอื่นที่ออกดอกแบบช่อตั้งตรงหรือทอดเอียง

จำนวน 4-6 ดอกต่อช่อ จึงมีแนวโน้มว่าอาจเป็น
บรรพบุรุษของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน

เอื้องเทียนใบแคบ	1.00																		
เอื้องเทียนลำเขี้ยว	0.32	1.00																	
เอื้องเทียนหิน	0.32	0.47	1.00																
เอื้องเทียนน้อย	0.41	0.35	0.35	1.00															
เอื้องเทียนส้ม	0.26	0.38	0.38	0.26	1.00														
เอื้องเทียนบาร์บตา	0.37	0.39	0.49	0.34	0.33	1.00													
เอื้องมัน	0.33	0.28	0.31	0.38	0.33	0.32	1.00												
เอื้องหมาก	0.39	0.45	0.39	0.38	0.35	0.37	0.31	1.00											
เอื้องเทียนขาว	0.26	0.61	0.33	0.25	0.37	0.38	0.25	0.39	1.00										
เอื้องสายเสริต	0.28	0.29	0.34	0.30	0.33	0.27	0.32	0.36	0.22	1.00									
เอื้องลำเทียนปากดำ	0.30	0.64	0.42	0.36	0.37	0.42	0.25	0.40	0.61	0.32	1.00								
เอื้องเทียนใหญ่ลาว	0.39	0.36	0.43	0.34	0.42	0.41	0.35	0.30	0.32	0.32	0.40	1.00							
เอื้องผาหมอก	0.37	0.39	0.39	0.38	0.38	0.35	0.33	0.39	0.36	0.36	0.39	0.35	1.00						
เอื้องเทียนใบรี	0.28	0.35	0.40	0.29	0.29	0.40	0.32	0.37	0.28	0.28	0.37	0.29	0.34	1.00					
เอื้องเทียนใบแคบ																			
เอื้องเทียนลำเขี้ยว																			
เอื้องเทียนหิน																			
เอื้องเทียนน้อย																			
เอื้องเทียนส้ม																			
เอื้องเทียนบาร์บตา																			
เอื้องมัน																			
เอื้องหมาก																			
เอื้องเทียนขาว																			
เอื้องสายเสริต																			
เอื้องลำเทียนปากดำ																			
เอื้องเทียนใหญ่ลาว																			
เอื้องผาหมอก																			
เอื้องเทียนใบรี																			

รูปที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของเอื้องเทียนทั้ง 14 ชนิด ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟอี

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงประสิทธิภาพของ
เทคนิคแฮตอาร์เอฟอีในการจำแนกและประเมิน
ความ สัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้อง
เทียนได้ เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น ได้แก่ พืชในวงศ์
จำปา (วริศรา และคณะ, 2556) กล้วยสกุลมิวซา
(จิตติพร และคณะ, 2556) แพร่เชียงไฮ้ (เกียรติชัย
และคณะ, 2556) หม้อข้าวหม้อแกงลิง (เกียรติชัย
และคณะ, 2557) ผักกาด (จาตุรงค์ และคณะ,
2557) ขมิ้น (วริศรา และคณะ, 2557) ข้าวพันธุ์ขาว
ดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์กล้วยพันธุ์ขาวดอก
มะลิ 105 (จิตติพร และคณะ, 2557) กล้วยไม้สกุล
สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม (เกียรติชัย และคณะ,

2557) กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (วริศรา และคณะ,
2557) ข้าวมีสี (จาตุรงค์ และคณะ, 2557) กล้วยไม้
สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย (นฤมล, 2557) กล้วยไม้
สกุลแวนด้าหมู่เข็ม (จินต์, 2558) นอกจากนี้เทคนิค
แฮตอาร์เอฟอียังสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจ
สอบการกลายในถั่วเขียว (จาตุรงค์ และคณะ,
2556) ได้อีกด้วย

4. สรุป

การจำแนกและการประเมินความสัมพันธ์
ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วย
เครื่องหมายแฮตอาร์เอฟอีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม

72 ไพรเมอร์ ผลการวิจัยพบว่าเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีมีประสิทธิภาพในการจำแนกและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้ โดยสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนแต่ละชนิดออกจากกันได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวจำนวน 10 ไพรเมอร์ เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS และจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่าสามารถแบ่งได้ 5 กลุ่ม นอกจากนี้ยังพบว่าเอื้องลำเทียนปากดำและเอื้องเทียนลำเขียวมีความเหมือนกันทางพันธุกรรมมากที่สุด มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน คือ 0.64 และพบว่าเอื้องสายเสริมีความแตกต่างมากที่สุด ซึ่งคาดว่าอาจเป็นบรรพบุรุษของสกุลเอื้องเทียน

5. รายการอ้างอิง

- เกียรติชัย แซ่ใต้, ชีระชัย ธนानันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 92-101.
- เกียรติชัย แซ่ใต้, เปรมณัช ขุนปักซี่, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 237-242.
- เกียรติชัย แซ่ใต้, เปรมณัช ขุนปักซี่, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแพรวเซียงไฮ้ (*Portulaca grandiflora*) ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Genet. 2013, S1: 226-229.
- คณะกรรมการกล้วยไม้แห่งชาติ, ยุทธศาสตร์การแข่งขันกล้วยไม้ไทยในตลาดโลก พ.ศ. 2554-2559, แหล่งที่มา : http://www.agriman.doae.go.th/home/agri1/agri1.3/strategics_2554/06_orchid2554-2559.pdf, 10 กุมภาพันธ์ 2559.
- 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, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกผักกาดด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, 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 และข้าวสายพันธุ์กลายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 3: 36-44.
- จิตติพร ไท้มโสภา, เปรมณัช ขุนปักซี่, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลมิวชาด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Genet. S1: 201-205.
- นฤมล ธนานันต์, จิตติพร ไท้มโสภา และชีระชัย ธนา

- นันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมายแอสตอร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 102-108.
- นฤมล ธนानันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ชาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-188.
- นฤมล ธนานันต์, สุริย์พร พุ่มเอี่ยม และธีระชัย ธนานันต์, 2556, การจำแนกพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมด้วยเครื่องหมายแอสตอร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21: 360-370.
- ภัทรา หงษ์ทองดี, นฤมล ธนานันต์ และธีระชัย ธนานันต์, 2559, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24: 342-350.
- วริสรา แทนสง่า, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) ด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 102-112.
- วริสรา แทนสง่า, ธีระชัย ธนานันต์, บุญหงษ์ จงคิด และนฤมล ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนก
- ขมิ้นด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 3: 29-35.
- วริสรา แทนสง่า, เปรมณัช ขุนปักษ์, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในวงศ์จำปาด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดี, Thai J. Genet. S1: 196-200.
- สลิล สิทธิสัจธรรม, 2549, กล้วยไม้ป่าเมืองไทย, สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Anuntalabhochai, S., Chandet, R., Chiangda, J. and Apavatjirut, P., 2000, Genetic diversity within Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis, Acta Hort. 575: 253-259.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1978, 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.
- Welsh, J., and McClelland, M., 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, Nucl. Acids Res. 18: 7213-7218.