

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์ กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ในโกรเซอร์ซูเท และลูกผสมด้วย ไอเอสเอสอาร์

Genetic Relationship Assessment and Identification of *Dendrobium* Section *Nigrohirsutae* and their Hybrids by Using ISSR

ธีระชัย ธนาพันธ์ และจุฑาทิพย์ พันธุ์รูปท้าว

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนาพันธ์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Theerachai Thanananta and Jutatip Phanroopthaw

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

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) หมู่ในโกรเซอร์ซูเท (*Nigrohirsutae*) เป็นไม้ดอกที่นิยมใช้ในการประดับตกแต่งอาคารและสถานที่ ปัจจุบันกล้วยไม้หมู่นี้มักผ่านการปรับปรุงจากพ่อแม่พันธุ์ดั้งเดิม จึงสูญเสียลักษณะทางพันธุกรรมบางอย่าง ดังนั้นการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์ด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลจึงมีความสำคัญ ทั้งนี้เพื่อการอนุรักษ์และการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป งานวิจัยนี้ได้ระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ในโกรเซอร์ซูเท และลูกผสม จำนวน 10 พันธุ์ ด้วยไอเอสเอสอาร์ พบว่าสามารถระบุพันธุ์ได้ทั้ง 10 พันธุ์ แต่พบว่าไพรเมอร์สำหรับไอเอสเอสอาร์ให้ค่า PIC เฉลี่ย 0.27 ซึ่งแสดงว่ามีประสิทธิภาพในการระบุพันธุ์อยู่ในระดับปานกลาง

คำสำคัญ : สกุลหวาย; หมู่ในโกรเซอร์ซูเท; ไอเอสเอสอาร์; การระบุพันธุ์; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

Abstract

Dendrobium section *Nigrohirsutae* are flowering plants used for decorate buildings and places. Currently, these orchids have been improvement from native parents by breeding program and they were loss of certain genetic characteristics. To determine genetic relationships and identify species or hybrids by molecular genetic techniques are important in planning for the conservation and breeding in the future. In this research, 10 varieties of *Dendrobium* section *Nigrohirsutae* and their hybrids were used to study using inter-simple sequence repeat (ISSR). All of 10 varieties were identified. But, the average of polymorphic information content (PIC) = 0.27, it shown to be effective in identifying the species at medium level.

Keywords: *Dendrobium*; *Nigrohirsutae*; ISSR; identification; genetic relationship

1. คำนำ

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) พบการกระจายพันธุ์ทั่วทวีปเอเชีย ซึ่งมีประเทศไทยเป็นศูนย์กลางของการกระจายพันธุ์ ส่วนใหญ่จะพบได้ตามธรรมชาติในบริเวณภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ ปัจจุบันพบมากกว่า 150 พันธุ์ แบ่งเป็นหมู่ 41 หมู่ (อบฉินท์, 2542)

ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกกล้วยไม้ตัดดอก และกล้วยไม้กระถางปริมาณหลายตันต่อปี (สำนักพัฒนาการค้าและธุรกิจการเกษตรและอุตสาหกรรมกรรมการส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ, 2558) จึงมีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อรองรับความต้องการของผู้บริโภค ส่งผลให้กล้วยไม้เกิดความหลากหลายมากยิ่งขึ้น ทั้งโครงสร้าง สีเส้น และช่อดอก รวมถึงมีกลิ่นหอมและอายุการปักแจกันที่นานขึ้น แต่การปรับปรุงพันธุ์อาจส่งผลกระทบต่อการสูญเสียลักษณะที่สำคัญทางพันธุกรรมของกล้วยไม้พันธุ์แท้ และอาจสูญพันธุ์ได้ในอนาคต (Peyachoknagul *et al.*, 2014) ด้วยเหตุนี้การระบุพันธุ์กล้วยไม้พันธุ์แท้ และลูกผสมต่าง ๆ จึงมีความจำเป็นเร่งด่วน ทั้งนี้เพื่อการอนุรักษ์พันธุ์แท้ไว้เป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เป็น

ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ตำแหน่งหนึ่งที่เกิดความผันแปร (variation) ซึ่งเรียกว่าความหลากหลาย (polymorphism) พบได้ทั้งนิวคลีโอไทด์ในนิวเคลียส (nuclear genome) ไมโทคอนเดรีย (mitochondrial genome) และคลอโรพลาสต์ (chloroplast genome) โดยแสดงความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดหรือพันธุ์ (สุรินทร์, 2552)

เครื่องหมายดีเอ็นเอนิยมตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR, polymerase chain reaction) ซึ่งสะดวก รวดเร็ว และค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก โดยให้ไพรเมอร์ (primer) เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย (target site) แล้วเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอนั้น เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์มีหลายเครื่องหมาย ได้แก่ อาร์เอฟดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990) เอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphism) (Vos *et al.*, 1995; Xiang *et al.*, 2003) เอสเอสอาร์ (SSR, simple sequence repeat) (Gianfranceschi *et al.*, 1998) ไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter simple sequence repeat) (Zieykiewiez *et al.*, 1994; Amirul *et al.*, 2015) เป็นต้น

ไอเอสเอสอาร์เป็นเทคนิคการใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับซ้ำ (repeated sequence) เข้าจับกับตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) ที่พบความผันแปรและกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม (genome) แล้วเพิ่มชนิดเอ็นเอที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ ซึ่งเทคนิคนี้นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) การสร้างแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic linkage map) (Hou *et al.*, 2006; Qi, 2008; Wu *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009)

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชเช และลูกผสมที่พบในประเทศไทย จำนวน 10 พันธุ์ ด้วยไอเอสเอสอาร์เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการอนุรักษ์พันธุ์แท้ไว้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 ตัวอย่างกล้วยไม้

กล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชเช และลูกผสม จำนวน 10 พันธุ์ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ (1) กล้วยไม้พันธุ์แท้ (native species) ได้แก่ เอื้องปากนกแก้ว (*D. cruentum* Rchb. f.) เอื้องเงินหลวง (*D. formosum* Roxb. ex Lindl.) เอื้องแซะหอม (*D. scabrilingue* Lindl.) เอื้องเงิน (*D. draconis* Rchb. f.) และเอื้องทอง (*D. ellipsophyllum* Tang & Wang) ซึ่งพบได้ในป่าตามภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย และ (2) กล้วยไม้ลูกผสม ได้แก่ ดอนมารี (Dawn Maree = เอื้องปากนกแก้ว x เอื้องเงินหลวง) รุ่งกมล เวศย์วรุณ (Roongkamol Vejvarut = ดอนมารี x เอื้องเงินหลวง) กรีนแลนเทิร์น (Green Lanturn = ดอนมารี x เอื้องปากนกแก้ว) ลูกผสมดอนมารี (Dawn Maree hybrid = ดอนมารี x เอื้องแซะหอม) และ เอื้องเงินหลวง x เอื้องทอง

ซึ่งเป็นกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์การค้าที่เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

คัดเลือกใบกล้วยไม้แบบสุ่มเก็บและนำมาสกัดดีเอ็นเอรวม (total DNA) ด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) (จุฑาทิพย์ และคณะ, 2559) แล้วตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

คัดเลือกไพรเมอร์แบบไมโครแซทเทลไลท์ที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจากไพรเมอร์ 35 ชนิด ซึ่งไพรเมอร์มีขนาด 16-18 นิวคลีโอไทด์ โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชเช และลูกผสม 10 พันธุ์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (จุฑาทิพย์ และคณะ, 2559) ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 3 ขั้นตอน ได้แก่ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ (นฤมล และคณะ, 2555) แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

2.4 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) โดยศึกษารูปแบบการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากการปรากฏแถบดีเอ็นเอของพ่อ แม่ และลูกผสม โดยให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ

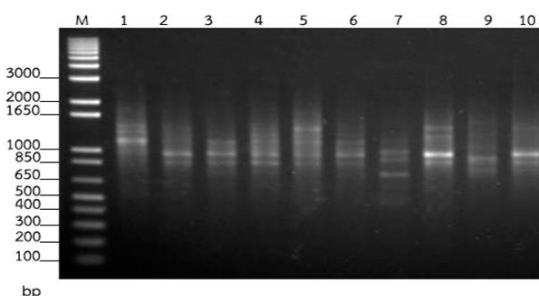
เท่ากับ 1 และที่ไม่ปรากฏเท่ากับ 0 แล้ววิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYTS-pc รุ่น 2.0 (Rohlf, 2002) เพื่อหาค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) และคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ตามวิธีของ Nei และ Li แล้วสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยเลือกการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) จากนั้นประเมินประสิทธิภาพของไพรเมอร์ทั้งหมดที่เลือกใช้จากค่า PIC (polymorphic information content) ด้วยโปรแกรม Power Marker รุ่น 3.25 (<http://statgen.ncsu.edu/powermarker>)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

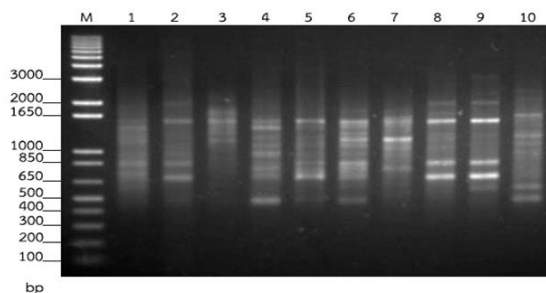
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชูลู และลูกผสม 10 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์แบบไมโครแซทเทลไลท์ 35 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 12 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณและให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจน (คิดเป็น 34.29 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ M1 [(AG)₈G] 9 แถบ, M2 [(AC)₈G] 12 แถบ, M4 [(AG)₈C] 10 แถบ, M5 [(AC)₈C] 11 แถบ, M10 [(GA)₈C] 11 แถบ, M14 [(CA)₈G] 13 แถบ, M15 [(CT)₈G] 8 แถบ, M16 [(CG)₈C] 9 แถบ, M21 [(TC)₈G] 10 แถบ, M24 [(TC)₈C] 7 แถบ, M26 [(CT)₈C] 9 แถบ และ M27 [(CTC)₈] 12 แถบ โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายทั้งสั้น 121 แถบ (คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์) มีขนาดประมาณ 380-3,000 คู่เบส ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์แสดงความจำเพาะต่อกล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชูลู และลูกผสมแต่ละพันธุ์ ตัวอย่าง เช่น ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ M4 และ M27 ดังรูปที่ 1ก และ 1ข

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่ปรากฏในลูกผสม พบว่ามี 7 รูปแบบ

(ตารางที่ 2) โดยดอนมารีและเอื้องเงินหลวง x เอื้องแซะหอม มีแถบดีเอ็นารูปแบบ VII มากที่สุด (คิดเป็น 18.75 และ 30.14 เปอร์เซ็นต์) คือ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ รุ่งกมล เวศย์วรุณมีรูปแบบ III และ VII มากที่สุด (คิดเป็น 22.16 เปอร์เซ็นต์) คือ แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อ ตามลำดับ กรีนแลนด์เทิร์นพบแถบ



(ก)



(ข)

รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชูลู และลูกผสมที่ได้จากไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ M4 (ก) และ M27 (ข) [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA) และ 1-10 คือ (1) เอื้องปากนกแก้ว (2) เอื้องเงินหลวง (3) ดอนมารี (4) รุ่งกมล เวศย์วรุณ (5) กรีนแลนด์เทิร์น (6) ลูกผสมดอนมารี (7) เอื้องแซะหอม (8) เอื้องเงิน (9) เอื้องทอง (10) เอื้องเงินหลวง x เอื้องทอง ตามลำดับ]

ดีเอ็นเอรูปแบบ VI มากที่สุด (คิดเป็น 29.03 เปอร์เซ็นต์) คือ แถบ ดีเอ็นเอไม่ปรากฏเช่นเดียวกับ พันธุ์แม่ ลูกผสมดอนมารีพบแถบดีเอ็นเอรูปแบบ III

มากที่สุด (คิดเป็น 28.85 เปอร์เซ็นต์) คือ แถบ ดีเอ็นเอปรากฏเช่นเดียวกับพันธุ์แม่

ตารางที่ 2 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ลูกผสมที่ได้จากไอเอสเอสอาร์

รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	การปรากฏและไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ			แถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชูเช และลูกผสมที่ได้จากไอเอสเอสอาร์									
	พันธุ์แม่	พันธุ์พ่อ	ลูกผสม	ดอนมาลี		รุ่งกมล เวศย์วรมณ์		กรีนแลนด์เทิร์น		ลูกผสมดอนมารี		เอื้องเงินหลวง x เอื้องทอง	
				จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%	จำนวน	%
I	+	+	+	3	4.69	11	16.18	5	8.06	5	9.62	4	5.48
II	+	+	-	9	14.00	1	1.47	8	12.90	0	0.00	5	6.85
III	+	-	+	10	15.63	15	22.16	5	8.06	15	28.85	5	6.85
IV	+	-	-	11	17.19	7	10.29	16	25.81	13	25.00	17	23.29
V	-	+	+	9	14.06	8	11.76	2	3.23	2	3.85	7	9.59
VI	-	+	-	10	15.63	11	16.18	18	29.03	7	13.46	13	17.81
VII	-	-	+	12	18.75	15	22.16	8	12.00	10	19.23	22	30.14
รวม				64		68		62		52		73	

เมื่อคำนวณค่า PIC พบว่าไพรเมอร์สำหรับไอเอสเอสอาร์ให้ค่า PIC เฉลี่ย 0.27 ซึ่งสามารถระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชูเช และลูกผสม 10 พันธุ์ ได้ในระดับปานกลาง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bolaric และคณะ (2005)

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่ากล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชูเช และลูกผสม 10 พันธุ์ มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.00 ถึง 0.69 (รูปที่ 2) ซึ่งสามารถระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชูเช และลูกผสมทั้ง 10 พันธุ์ (รูปที่ 3) อยางไรก็ตาม แม้ว่าไอเอสเอสอาร์จะเคยมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพสูงในการระบุพันธุ์พืชลูกผสม (Liwang *et al.*, 2007; Ramya and Kabwe, 20012; Che *et al.*, 2013; Claudineia *et al.*, 2013) แต่งานวิจัยนี้พบว่าไอเอสเอสอาร์มีประสิทธิภาพในการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชูเช และลูกผสม 10 พันธุ์ ในระดับปานกลาง เช่นเดียวกับงานวิจัย

อื่นที่เคยรายงานมาก่อน (ฐิติพร และคณะ, 2557; เกียรติชัย และคณะ, 2557; วริศรา และคณะ, 2557; จาตุรงค์ และคณะ, 2557; จินต์ และคณะ, 2558; ธีระชัย และคณะ, 2559) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการระบุพันธุ์น้อยกว่าแฮตอาร์เอฟดี (จุฑาทิพย์ และคณะ, 2559)

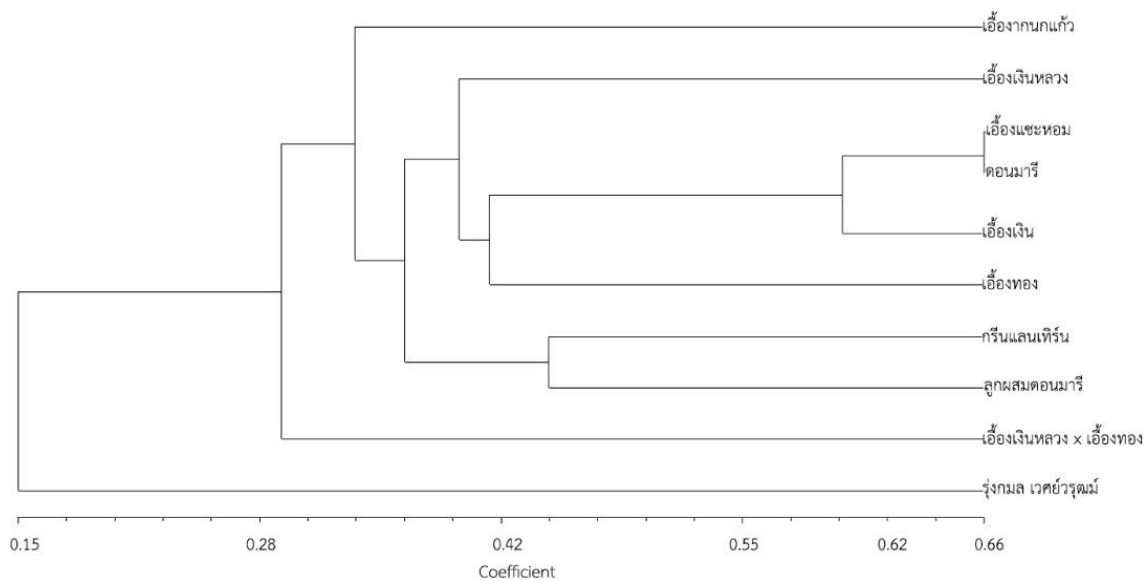
เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชูเช และลูกผสม 10 พันธุ์ ที่ได้จากไอเอสเอสอาร์ พบว่าสามารถระบุพันธุ์ได้ครบทั้งหมด แต่ไม่ค่อยจะสอดคล้องกับลักษณะสัณฐาน ตัวอย่าง เช่น ดอนมารีกับลูกผสมดอนมารีมีลักษณะที่ใกล้เคียงกันมาก ต่างกันเพียงขนาดช่อดอกและสีปากดอก ขณะที่ลำต้น ใบ และโครงสร้างดอกของดอนมารีต่างจากเอื้องและหอยอย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเกิดจากจำนวนแถบดีเอ็นเอของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไอเอสเอสอาร์ในงานวิจัยครั้งนี้ยังมีไม่มากพอสำหรับการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกัน จึงควรเพิ่มปริมาณลายพิมพ์ดีเอ็นเอให้มากขึ้น หรือตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น

เพิ่มเติม เช่น เอสเอสอาร์ อาร์เอฟเอลพี หรือ
วิเคราะห์หลายพหุพีดีเอ็นเอร่วมกับแอตอาร์เอฟดี

(จุฬาทิพย์ และคณะ, 2559)

เอื้อปากนกแก้ว	1.00									
เอื้อเงินหลวง	0.38	1.00								
เอื้อแซะหอม	0.39	0.37	1.00							
เอื้อเงิน	0.39	0.48	0.63	1.00						
เอื้อทอง	0.26	0.35	0.36	0.49	1.00					
ดอนมारी	0.35	0.39	0.69	0.59	0.39	1.00				
รุ่งกมล เวศย์วุฒม์	0.13	0.09	0.21	0.25	0.11	0.28	1.00			
กรีนแลนเทิร์น	0.34	0.43	0.31	0.46	0.34	0.41	0.14	1.00		
ลูกผสมดอนมारी	0.26	0.30	0.32	0.26	0.36	0.46	0.41	0.44	1.00	
เอื้อเงินหลวง x เอื้อทอง	0.17	0.26	0.31	0.32	0.34	0.32	0.00	0.32	0.33	1.00

รูปที่ 2 ค่าดัชนีความเหมือนของกล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชูเช และลูกผสมด้วยไอเอสเอสอาร์



รูปที่ 3 ค่าดัชนีความเหมือนของกล้วยไม้สกุลหวาย หมูไนโกรเฮอร์ชูเช และลูกผสมด้วยไอเอสเอสอาร์

4. สรุป

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมูในโครเซอร์ซูเรและลูกผสม 10 พันธุ์ ด้วยไอเอสเอสอาร์พบว่าสามารถระบุพันธุ์ได้ครบทั้ง 10 พันธุ์ ซึ่งไพรเมอร์ทั้งหมดให้ค่า PIC เฉลี่ย 0.27 โดยผลจากการวิจัยครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอนุรักษ์และการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

5. รายการอ้างอิง

- เกียรติชัย แซ่ใต้, ชีระชัย ธนानันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 92-101.
- จาดุรงค์ สัมฤทธิ์, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 113-122.
- จินต์ ทองสม, ชีระชัย ธนานันต์, นฤมล ธนานันต์, 2558, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มด้วยแฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 475-484.
- จุฑาทิพย์ พันธุ์ปัทมา, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2559, การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายหมูในโครเซอร์ซูเรและลูกผสมด้วยแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 5: 76-87.
- จิตติพร โทมัสโสภา, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเทคนิค

แฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 82-91.

ชีระชัย ธนานันต์, ภัทรา หงษ์ทองดี และนฤมล ธนานันต์, 2559, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของชนิดกล้วยไม้ในสกุลเอื้องเทียนด้วยไอเอสเอสอาร์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 24: 342-350.

นฤมล ธนานันต์, จิตติพร โทมัสโสภา และชีระชัย ธนานันต์, 2555, การระบุพันธุ์ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-179.

วิริสา แทนสง่า, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 102-112.

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

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, เครื่องหมายดีเอ็นเอจากพื้นฐานสู่การประยุกต์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อบฉันทน์ ไทยทอง, 2542, กล้วยไม้เมืองไทย, สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.

Amirul, M., Abdul, S.J., Mohd, Y.R., Azizah, A.H., Ibrahim, W.A. and Abdul, M., 2015, Genetic diversity analysis among collected purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions using ISSR markers, Acad. Sci. 338: 1-11.

Bolaric, S., Barth, S., Melchinger, A.E., Posselt, U.K., 2005, Genetic diversity in European

- perennial ryegrass cultivars investigated with RAPD markers, Plant. Breed. 124: 161-166.
- Che, D.D., Su, C.Y., Zhang, J.Z., Chen, X., Ma. X., Wang, N. and Li, W.T., 2013, ISSR analysis of hybrid descendants of roses, J. North. Agric. Uni. 20: 1-4.
- Claudineia, F.N., Juliano, L.F., Andressa, L.G., Mario, S.C., Moacir, P. and Geraldo, M., 2013, The genetic diversity of strawberry (*Fragria ananassa* Duch.) hybrids based on ISSR markers, Acta. Sci. Agron. 35: 443-452.
- 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.
- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M. and Gessler, C., 1998, Simple sequence repeat for the genetic analysis of apple, Theor. Appl. Genet. 8: 1069-1076.
- Hou, Y.J., He, Q. and Liang, G.L., 2006, ISSR analysis of the hybrid descendants of tea camellias, South. J. Agr. 28: 267-270.
- Liwang, L., Guang, L. and Yiqin, G., 2007, Evolution of genetic purity of F₁ hybrid seeds in cabbage with RAPD, ISSR, SRAP, and SSR markers, Hort. Sci. 42: 724-727.
- 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.
- Qi, M., 2008, Hybrid identification of *Cunninghamia lanceolata* x *Platycladus orientalis* based on ISSR markers, Zhejiang Forestry College 25: 666-669.
- Ramya, N. and Kabwe, K.N., 2012, Genetic variation in *Picea mariana* x *P. rubens* hybrid populations assessed with ISSR and RAPD markers, Amer. J. Plant. Sci. 3: 731-737.
- 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.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, T. and Van, T., 1995, A new technique for DNA fingerprinting, Nucl. Acids Res. 23: 4407-4414.
- Williams, J., Kubelik, A., Livak, K., Rafalski, J. and Tingey, S.V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535.
- Wu, X.W., Cui, G.F. and Wu, L.F., 2009, Identification of ISSR in lily hybrids, Acta Horticulturae Sinica 39: 749-754.
- 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.
- Zhou, L.H., Zhang, J.Z. and Li, Z., 2009, Genetic

diversity of different roses revealed by
ISSR, Genom. Appl. Biol. 28: 311-315.
Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D.,
1994, Genome fingerprinting by simple

sequence repeat (SSR) anchored
polymerase chain reaction amplification,
Genomics 20: 176-183.