

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของ กล้วยไม้สกุลก้านก้อด้วยเครื่องหมายสก็อต

Genetic Relationship Assessment and Identification of Orchids in the Genus *Eria* Using SCoT Markers

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์ และธีระชัย ธนานันต์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Narumol Thanananta

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

Jutamas Jiemjuejun and Theerachai Thanananta*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลก้านก้อ 15 ชนิด ด้วยเครื่องหมายสก็อต (SCoT) จากการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลก้านก้อด้วยไพรเมอร์สก็อต 80 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 35 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ หลังจากนั้นจึงเลือกไพรเมอร์ 21 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุกรรม พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของกล้วยไม้สกุลก้านก้อทั้ง 15 ชนิด ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับชนิด เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 พบว่าสามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลก้านก้อทั้ง 15 ชนิด เป็น 3 กลุ่ม ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.37 ถึง 0.64

คำสำคัญ : กล้วยไม้; สกุลก้านก้อ; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การระบุชนิด; เครื่องหมายสก็อต

Abstract

Start codon targeted (SCoT) markers were used to study the genetic relationships of 15 *Eria* species. Thirty-five from 80 SCoT primers could be used for DNA amplification. Twenty-one primers

which gave clear amplified products were used to generate DNA fingerprint for genetic analysis. The results showed significant difference among 15 *Eria* species, giving specific fragments for each species. A dendrogram, which was constructed based on polymorphic bands using the NTSYS-pc version 2.0 program, showed genetic similarities among 15 *Eria* species, resulting in their classification into 3 groups with similarity coefficients ranging from 0.37 to 0.64.

Keywords: orchid; *Eria*; genetic relationship; identification; SCoT marker

1. คำนำ

กล้วยไม้เป็นไม้ตัดดอกที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายและเป็นพืชดอกเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากดอกกล้วยไม้มีสีสันสวยงาม มีความหลากหลายของสี สัน รูปทรงของดอก และชนิดพันธุ์ รวมถึงดอกกล้วยไม้สามารถใช้ประโยชน์ในงานต่าง ๆ เช่น จัดเป็นช่อดอกไม้ ปักแจกัน จัดกระเช้าดอกไม้ จึงทำให้ผู้บริโภคมีโอกาสเลือกใช้ได้มาก และที่สำคัญ คือ ดอกกล้วยไม้มีอายุการใช้งานได้นานกว่าดอกไม้ชนิดอื่น

ปัจจุบันกล้วยไม้ถือเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของไทย อุตสาหกรรมกล้วยไม้ของประเทศไทยได้เจริญก้าวหน้ามาก จึงทำให้ประเทศไทยสามารถส่งทั้งดอกและต้นกล้วยไม้ไปจำหน่ายยังต่างประเทศ นำรายได้เข้าประเทศในแต่ละปีมูลค่าหลายล้านบาท (คณะกรรมการกล้วยไม้แห่งชาติ, 2553) นอกจากนี้ประเทศไทยยังได้รับการยกย่องให้เป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญที่สุดของโลกอีกด้วย ซึ่งปัจจุบันการผลิตกล้วยไม้ในประเทศไทยจึงเป็นการผลิตเพื่อการค้ามากขึ้น โดยมีการศึกษาหาวิธีลดต้นทุนการผลิต การเพิ่มผลผลิตและคุณภาพ รวมถึงมีการผสมพันธุ์เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ ๆ และคัดเลือกต้นที่กลายพันธุ์ด้วยวิธีต่าง ๆ

กล้วยไม้สกุลก้านก่อ (*Eria*) พบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1825 โดยชื่อสกุลมีรากศัพท์มาจากภาษากรีกว่า “Erion” แปลว่า “ขนแกะ” ซึ่งหมายถึงขน

อ่อนนุ่มที่กลีบเลี้ยง (สลิล, 2549) ลักษณะโดยทั่วไปของกล้วยไม้สกุลก้านก่อ เป็นกล้วยไม้อิงอาศัยที่เจริญทางด้านข้าง ลำลูกกล้วยมีขนาดเล็กจนถึงมีขนาดใหญ่ มีหลายข้อปล้องและมีหลายรูปทรง มีทั้งชนิดขึ้นชิดกันเป็นกอและขึ้นห่าง ๆ กันบนเหง้า ใบมีหลายรูปทรง ออกที่ข้อหรือออกที่ใกล้ยอด มีหลายใบเรียงสลับ โคนใบมักเป็นกาบ ใบอ่อนพับตามแนวยาว ช่อดอกเป็นช่อกระจะ ออกด้านข้างหรือที่ใกล้ยอด มีตั้งแต่ข้อเดียวจนถึงหลายข้อ ตั้งตรงหรือทอดเอียง ดอกมีจำนวนน้อยจนถึงมาก (วิชา, 2543) กล้วยไม้สกุลนี้มีการกระจายพันธุ์ในเขตอบอุ่นและเขตร้อนของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยพบประมาณ 500 ชนิด แต่ประเทศไทยพบเพียง 63 ชนิด ทั้งในป่าผลัดใบและไม้ผลัดใบ พบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (อาภรณ์, 2552)

ปัจจุบันกล้วยไม้สกุลก้านก่อเป็นกล้วยไม้ที่ได้รับความนิยมและมีราคาค่อนข้างสูง เนื่องจากกล้วยไม้ชนิดนี้จัดเป็นกล้วยไม้ป่าหายาก และพบจำนวนน้อยในธรรมชาติ อีกทั้งดอกกล้วยไม้สกุลก้านก่อมีลักษณะโดดเด่นแตกต่างจากกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ จึงทำให้เป็นที่ต้องการของตลาดเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตาม มีปัญหาเกี่ยวกับการการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐาน (morphology) ภายนอก เช่น ดอก ใบ ราก โดยมีความยากลำบากและอาจทำให้เกิดข้อผิดพลาดได้ง่าย ดังนั้นเทคโนโลยีเกี่ยวกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ซึ่งใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตจึงมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวิเคราะห์

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) และการจำแนก (identification) พันธุ์กล้วยไม้สกุล ก้านก่อ

รายงานการวิจัยกล้วยไม้ที่เคยมีมาก่อนนี้ พบว่ามีนักวิจัยประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ หลายชนิดในกล้วยไม้หลายสกุล ได้แก่ กล้วยไม้ช้าง และลูกผสม (นฤมล และคณะ, 2556) กล้วยไม้สกุล หวาย กลุ่มเอื้องสาย (นฤมล และคณะ, 2557) กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (วริศรา และคณะ, 2557) กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตา หมูสิงโตสยาม (เกียรติชัย และคณะ, 2557) เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้กับพืชอื่น ได้แก่ พืชในวงศ์จำปา (วริศรา และคณะ, 2556) กล้วยสกุลมิวซา (ฐิติพร และคณะ, 2556) แพร่เชียงไต้ (เกียรติชัย และคณะ, 2556) หม้อข้าวหม้อแกงลิง (เกียรติชัย และคณะ, 2557) ผักกาด (จาดุรงค์ และคณะ, 2557) ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์กล้วยของพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (ฐิติพร และคณะ, 2557) ข้าวมีสี (จาดุรงค์ และคณะ, 2557) ขมิ้น (วริศรา และคณะ, 2557) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลก้านก่อ

จากความสำคัญดังกล่าว ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลก้านก่อด้วยเครื่องหมายสก็อต (SCoT, start codon targeted) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดหนึ่ง que พัฒนาขึ้นโดย Collard และ Mackill (2009) โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction, PCR) เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยไพรเมอร์ (primer) ขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เพียงชนิดเดียว ซึ่งไพรเมอร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ATG ที่ เป็นรหัสเริ่มต้น (start codon) ด้วย ซึ่งให้ลายพิมพ์ ดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและมีความหลากหลาย (polymorphism) อีกทั้งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ใช้

ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูล ลำดับเบสของดีเอ็นเอ ประหยัดค่าใช้จ่าย และให้ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแต่ละพันธุ์

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลก้านก่อ

กล้วยไม้สกุลก้านก่อที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 15 ชนิด ได้แก่ (1) เอื้องดาวเรียง [*Eria javanica* (SW.) Blume] (2) เอื้องน้มนดอกน้อย (*Eria eriopsidobulbon* C.S.P. Parish & Rchb.f.) (3) เอื้องคำหิน [*Eria lasiopetala* (Willd.) Ormerod] (4) เอื้องเต่าทอง [*Eria ornata* (Blume) Lindl.] (5) เอื้องน้มนาง (*Eria pannea* Lindl.) (6) เอื้องหวดปลาหมึก (*Eria sarcophylla* Schltr.) (7) เอื้องอินจัน [*Eria biflora* (Griff.) Lindl.] (8) เอื้องน้มนดอกยสุเทพ (*Eria sutepensis* Rolfe ex Downie) (9) เอื้องศรีประภา (*Eria cristata* Rolfe) (10) เอื้องน้มนมาเลย์ (*Eria xanthocheila* Ridl.) (11) โรบัสตา [*Eria robusta* (Blume) Lindl.] (12) เอื้องช่อเงินยวง (*Eria globulifera* Seidenf.) (13) เอื้องกระเพาะปลา (*Eria acervata* Lindl.) (14) เอื้องตาลหิน (*Eria discolor* Lindl.) และ (15) เอื้องน้มนปากตัด (*Eria truncata* Lindl.)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลก้านก่อ ทั้ง 15 ชนิด ด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธีของ นฤมล และคณะ (2555) จากนั้น ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ และคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย เครื่องหมายสก็อต

2.3.1 การตรวจหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

โดยรวมดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลก้านก้อทั้ง 15 ชนิด เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยการใช้ไพรเมอร์จำนวน 80 ชนิด ซึ่งมีขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ (Luo *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2013) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.1), 0.1% Triton™ X-100 และ 2.5 mM MgCl₂) และมีนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์ 250 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis technologies Sdn Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (Unit) ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร (นฤมล, 2555)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ (นฤมล, 2555)

2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลก้านก้อทั้ง 15 ชนิด

โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลก้านก้อทั้งหมด และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แล้วตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เป็นเวลา 5 นาที

และตรวจสอบด้วยเครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (gel documentation) (นฤมล, 2555)

2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลก้านก้อทั้ง 15 ชนิด ที่ได้จากเครื่องหมายสก็อต มาตรวจสอบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ โดยถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอจะให้ค่าเท่ากับ 1 และถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจะให้ค่าเท่ากับ 0 จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การตรวจหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

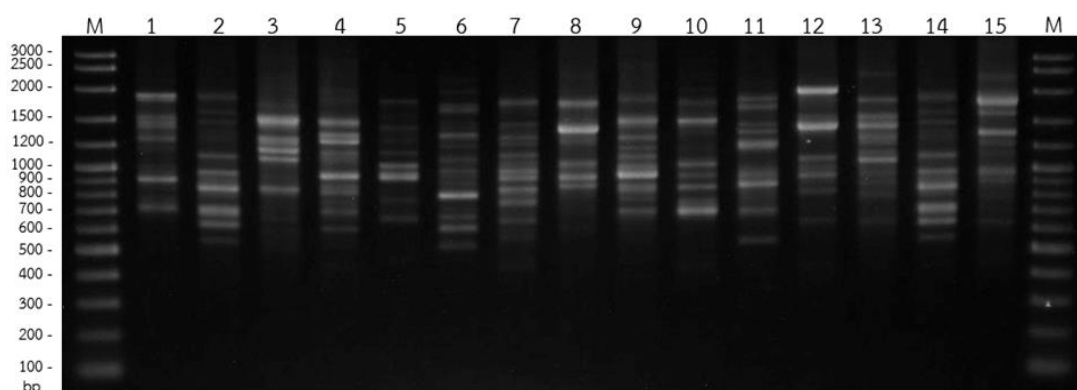
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของกล้วยไม้สกุลก้านก้อทั้ง 15 ชนิด ด้วยเครื่องหมายสก็อตด้วยการใช้ไพรเมอร์จำนวน 80 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 35 ชนิด (หรือคิดเป็น 43.75 เปอร์เซ็นต์) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลก้านก้อ

เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 21 ชนิด (ได้แก่ SCot30, SCot35, SCot47, SCot50, SCot52, SCot53, SCot54, SCot55, SCot59, SCot60, SCot61, SCot63, SCot65, SCot66, SCot70, SCot71, SCot72, SCot73, SCot74, SCot76 และ SCot77) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาสร้างลายพิมพ์ ดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลก้านก้อแต่ละชนิด จำนวน 15 ชนิด (รูปที่ 1) ด้วยเครื่องหมายสก็อต ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอ

รวมทั้งสิ้น 399 แถบ ขนาดประมาณ 250-3,000 คู่เบส (base pairs, bp) ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกชนิด (monomorphic band) 3 แถบ (หรือคิดเป็น 0.75 เปอร์เซ็นต์) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบต่างกันในแต่ละชนิด (polymorphic band) 396 แถบ (หรือคิดเป็น 99.25 เปอร์เซ็นต์) เครื่องหมายสก็อตเป็นเครื่องหมายที่ใช้ไพรเมอร์ขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ เพียงชนิดเดียว ซึ่งไพรเมอร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ATG อยู่ด้วย โดยไพรเมอร์จะเข้าจับ

กับดีเอ็นเอแม่แบบในตำแหน่งที่แตกต่างกัน จึงทำให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชแต่ละชนิดแตกต่างกัน (สุรินทร์, 2552) ทำให้สามารถจำแนกและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลก้านก่อได้ นอกจากนี้ยังพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลก้านก่อแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน จึงสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก่อแต่ละชนิดออกจากกันด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลก้านก่อโดยใช้ไพรเมอร์ SCot60 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™), 1-15 คือ (1) เอื้องดาวเรือง (2) เอื้องน้มนอกน้อย (3) เอื้องคำหิน (4) เอื้องเต่าทอง (5) เอื้องนิ้วนาง (6) เอื้องหวดปลาหมึก (7) เอื้องอินจัน (8) เอื้องน้มนอดยสุเทพ (9) เอื้องศรีประภา (10) เอื้องน้มนมาเลย์ (11) โรบัสตา (12) เอื้องช่อเงินยวง (13) เอื้องกระเพาะปลา (14) เอื้องตาลหิน และ (15) เอื้องน้มนปากตัด]

3.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยบันทึกการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ แล้วให้ค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏแถบให้ค่าเท่ากับ 0 จากนั้นนำไปหาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของกล้วยไม้สกุลก้านก่อที่ใช้ในงานวิจัยนี้ 15 ชนิด มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.37-0.64 โดยเอื้องอินจันกับเอื้องน้มน

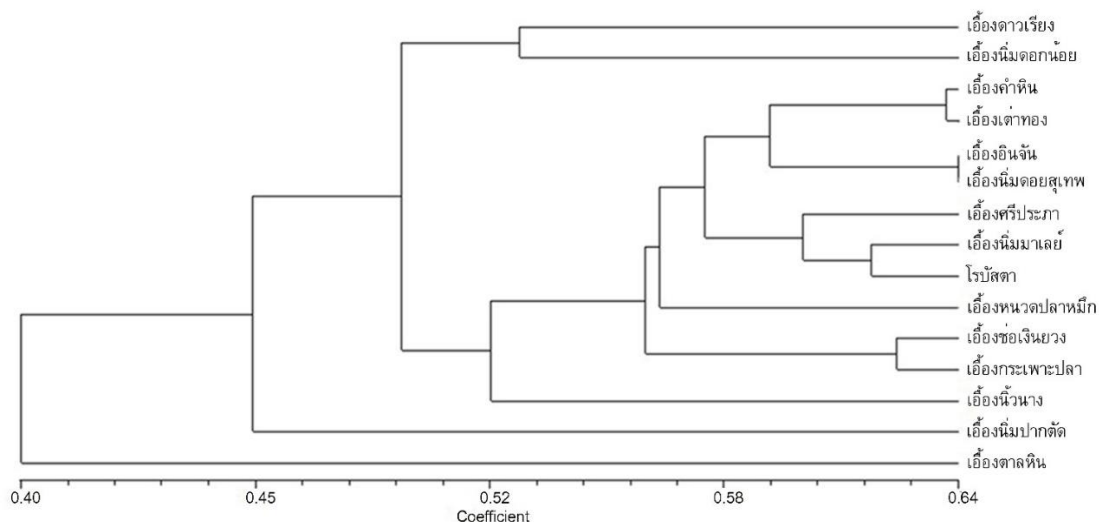
ดอยสุเทพมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนมากที่สุด คือ 0.64 ในขณะที่เอื้องตาลหินกับเอื้องน้มนมาเลย์มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนน้อยที่สุด คือ 0.37 ซึ่งสามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลก้านก่อที่ใช้ในงานวิจัยนี้ 15 ชนิด เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เอื้องตาลหิน กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เอื้องน้มนปากตัด กลุ่มที่ 3 แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่ 3.1 ได้แก่ เอื้องคำหิน เอื้องเต่าทอง เอื้องอินจัน เอื้องน้มนอดยสุเทพ เอื้องศรีประภา เอื้องน้มนมาเลย์ โรบัสตา เอื้องหวด

ปลาหมึก เอื้องช่อเงินยวง เอื้องกระพาะปลา และ เอื้องนั้วนาง และกลุ่มที่ 3.2 ได้แก่ เอื้องดาวเรียง และเอื้องนั้มดอกน้อย (รูปที่ 2)

3.4 อภิปรายผล

เครื่องหมายสก็อตนั้นเป็นเครื่องหมาย ดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดย Collard และ Mackill (2009) โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 18 นิวคลีโอไทด์

เพียงชนิดเดียวที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ATG อยู่ด้วย ใช้อุณหภูมิสำหรับ annealing 50 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม สมบัติของเครื่องหมายสก็อต คือ เป็นเครื่องหมายที่ ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก ผลการตรวจสอบ มีความน่าเชื่อถือ และมีประสิทธิภาพต่อการระบุ ความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชได้



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลก้านก้อทั้ง 15 ชนิด ที่ได้จากเครื่องหมายสก็อต

ในงานวิจัยนี้ เมื่อสกัดแยกดีเอ็นเอและ นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายสก็อต ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอ แม่แบบ (DNA template) โดยสุ่ม แล้ววิเคราะห์แถบ ดีเอ็นเอจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าเครื่องหมาย สก็อตสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลก้านก้อทั้ง 15 ชนิด ออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะ สัณฐาน (morphology) ของกล้วยไม้สกุลก้านก้อ เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่าเอื้องอินจัน และเอื้องนั้มดอยสุเทพมีค่าสัมประสิทธิ์ความ เหมือนกันมากที่สุด คือ 0.64 (รูปที่ 3) แสดงให้เห็น ว่าเอื้องอินจันและเอื้องนั้มดอยสุเทพมีความสัมพันธ์ ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากที่สุด ในขณะที่เอื้องตาล

หินมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกับชนิดอื่น ๆ น้อย ที่สุด และถูกจัดกลุ่มแยกออกจาก 2 กลุ่ม ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงแสดงประสิทธิภาพของเครื่องหมาย สก็อตที่สามารถใช้ในการจำแนกและประเมิน ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลก้านก้อ นอกจากนี้ ยังสามารถประยุกต์ใช้กับพืชอื่น เช่น ต้นรักแกนมอ (กรองทอง และคณะ, 2557)

4. สรุป

เมื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ กล้วยไม้สกุลก้านก้อทั้ง 15 ชนิด ด้วยเครื่องหมาย สก็อต โดยใช้ไพรเมอร์ 21 ชนิด พบแถบดีเอ็นเอที่ ให้ความแตกต่างสูง และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม

สำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 และจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่ากล้วยไม้สกุลก้านก้อมีความแตกต่างทางพันธุกรรม สามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่ม นอกจากนี้ยังพบว่าเอื้องอินจันและเอื้องนันทอย

สุเทพมีความใกล้ชิดกันมากที่สุด และพบว่าเอื้องตาลินมีความแตกต่างจากกล้วยไม้สกุลกันก่อนอื่นมากที่สุด ซึ่งคาดว่าอาจเป็นบรรพบุรุษของกล้วยไม้สกุลกันก่อน

เอื้องดาวเรียง	1.000																			
เอื้องน้มดอกน้อย	0.526	1.000																		
เอื้องคำหิน	0.513	0.564	1.000																	
เอื้องเต่าทอง	0.553	0.500	0.636	1.000																
เอื้องนิ้วนาง	0.492	0.440	0.522	0.574	1.000															
เอื้องหนวดปลาหมึก	0.472	0.429	0.547	0.592	0.556	1.000														
เอื้องอินจัน	0.506	0.459	0.583	0.606	0.562	0.541	1.000													
เอื้องน้มคอยสุเทพ	0.532	0.462	0.585	0.587	0.513	0.577	0.639	1.000												
เอื้องศรีประภา	0.508	0.470	0.530	0.627	0.469	0.570	0.569	0.622	1.000											
เอื้องน้มมาเลย์	0.562	0.460	0.533	0.562	0.484	0.519	0.527	0.569	0.591	1.000										
โรบัสตา	0.528	0.509	0.575	0.582	0.508	0.588	0.570	0.622	0.607	0.616	1.000									
เอื้องซอเงินยวง	0.517	0.466	0.588	0.533	0.497	0.561	0.578	0.625	0.579	0.558	0.616	1.000								
เอื้องกระเพาะปลา	0.526	0.448	0.524	0.529	0.505	0.533	0.494	0.583	0.520	0.536	0.577	0.623	1.000							
เอื้องตาลหิน	0.402	0.377	0.405	0.419	0.387	0.404	0.413	0.384	0.378	0.366	0.367	0.425	0.433	1.000						
เอื้องน้มปากตัด	0.433	0.417	0.474	0.471	0.446	0.440	0.434	0.488	0.444	0.392	0.466	0.515	0.531	0.420	1.000					

รูปที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของกล้วยไม้สกุลกันก่อกับทั้ง 15 ชนิด ที่ได้จากเครื่องหมายสัณฐาน

5. รายการอ้างอิง

กรองทอง ใจแก้วแดง, วิชาญ เอียดทอง และสุรินทร์
ปิยะโชคนากุล, 2557, การวิเคราะห์ความผัน
แปรทางพันธุกรรมของต้นรักแกนมอใน
ประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมาย Start Codon
Targeted(SCoT), Thai J. Forest. 33(2): 19-27.
เกียรติชัย แซ่ใต้, เปรมณัช ขุนปักซี่, วีระชัย ธนา
นันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การประเมิน
ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแพรวเชียงใหม่

(*Portulaca grandiflora*) ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Genet. 1: 226-229.

เกียรติชัย แซ่ไต้, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนา
 นันต์, 2557, การจำแนกและวิเคราะห์ความ
 สัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโต
 กลอกตาหมู่สิงโตสยามด้วยเครื่องหมายแอส
 อาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci.
 Technol. 3: 92-101.

เกียรติชัย แซ่ใต้, เปรมณัช ขุนปักซี่, ชีระชัย ธนา

- นันต์ และนฤมล ธนानันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยเทคนิคแอสตอร์เอฟีดี้, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 237-242.
- 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, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีด้วยเทคนิคแอสตอร์เอฟีดี้และไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 113-122.
- จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, เปรมณัช ขุนปักษ์, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกผักกาดด้วยเทคนิคแอสตอร์เอฟีดี้, Thai J. Sci. Technol. 3: 23-28.
- จิตติพร โทมัสโสภา, เปรมณัช ขุนปักษ์, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสกุลมิวซาดด้วยเทคนิคแอสตอร์เอฟีดี้, Thai J. Genet. 1: 201-205.
- จิตติพร โทมัสโสภา, ชีระชัย ธนานันต์, บุญหงษ์ จงคิด และนฤมล ธนานันต์, 2557, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และข้าวสายพันธุ์กล้วยพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเครื่องหมายแอสตอร์เอฟีดี้, Thai J. Sci. Technol. 3: 36-44.
- นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และชีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแอสตอร์เอฟีดี้, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-188.
- นฤมล ธนานันต์, สุริย์พร พุ่มเอี่ยม และชีระชัย ธนานันต์, 2556, การจำแนกพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมด้วยเครื่องหมายแอสตอร์เอฟีดี้, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21: 360-370.
- นฤมล ธนานันต์, จิตติพร โทมัสโสภา และชีระชัย ธนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมายแอสตอร์เอฟีดี้, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 99-108.
- วริสรา แทนสง่า, เปรมณัช ขุนปักษ์, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในวงศ์จำปาด้วยเทคนิคแอสตอร์เอฟีดี้, Thai J. Genet. 1: 196-200.
- วริสรา แทนสง่า, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) ด้วยเทคนิคแอสตอร์เอฟีดี้และไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 102-112.
- วริสรา แทนสง่า, ชีระชัย ธนานันต์, บุญหงษ์ จงคิด และนฤมล ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกขมิ้นด้วยเทคนิคแอสตอร์เอฟีดี้, Thai J. Sci. Technol. 3: 29-35.
- วิชา ธิติประเสริฐ, 2543, คู่มือจำแนกกล้วยไม้ไทย (Manual for Identification of Thai Orchids), สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- สลิล สิทธิจักรธรรม, 2549, กล้วยไม้ป่าเมืองไทย, สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.
- สุนทร ปิยะโชคณากุล, 2552, เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อาภรณ์ อุดมศิลป์ และคณะ, 2552, กล้วยไม้ป่าเขต

- รักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง, กองคุ้มครองพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าตามอนุสัญญา กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช, กรุงเทพฯ.
- Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J., 2009, Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants, *Plant Mol. Biol. Rep.* 27: 86-93.
- 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.
- Luo, C., Hea, X.H., Chena, H., Oua, S.J. and Gaoa, M.P., 2010, Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using start codon targeted (SCoT) markers, *Biochem. Syst. Ecol.* 6: 1176-1184.
- Rohlf, F.J., 2002, NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Inc., New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Wu, J.M., Li, Y.R., Yang, L.T., Fang, F.X., Song, H.Z., Tang, G.Q., Wang, M. and Weng, M.L., 2013, cDNA-SCoT: A novel rapid method for analysis of gene differential expression in sugarcane and other plants, *Aust. J. Crop Sci.* 7: 659-664.