

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิด
ของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย
Brachypetalum หมู่ *Brachypetalum* ด้วยเครื่องหมายสก็อต
Genetic Relationship Assessment and Identification of
Paphiopedilum Subgenus *Brachypetalum* Section
Brachypetalum Using SCoT Markers

ธีระชัย ธานันต์ และทีปกา มีเสงี่ยม

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตร อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Theerachai Thanananta and Teepaka Meesangiem

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

ปัจจุบันกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ อีกทั้งการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานทำได้ยากและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญที่มีประสบการณ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงประยุกต์ใช้เครื่องหมายสก็อตในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* จำนวน 14 ชนิด ที่พบในประเทศไทย โดยใช้ไพรเมอร์ 80 ชนิด ซึ่งคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 22 ชนิด พบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 332 แถบ มีขนาดประมาณ 250-3100 คู่เบส โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย 313 แถบ เมื่อคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้รองเท้านารีเป็น 3 กลุ่ม มีค่าดัชนีความเหมือน 0.30-0.79 จากแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่ารองเท้านารีฟาหอยกับรองเท้านารีเหลืองปราจีนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.79 ดังนั้นเครื่องหมายสก็อตจึงใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum*

สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ได้ และข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้วางแผนการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : กล้วยไม้รองเท้านารี; สกุล *Paphiopedilum*; หมู่ *Brachypetalum*; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; เครื่องหมายสก็อต

Abstract

Nowadays the members of genus *Paphiopedilum* are endangered and their morphological identifications are difficult and needed the experts. Thus, this research used SCoT markers to create a DNA fingerprint and an assessment of genetic relationship among 14 species of genus *Paphiopedilum* subgenus *Brachypetalum* section *Brachypetalum* in Thailand. The total 80 primers were screened. Twenty-two selected SCoT primers amplified 332 clear and reproducible bands, with sizes ranging from 250 to 3100 bp. Among them, 313 bands were polymorphic. The similarity coefficients were calculated and a dendrogram was constructed based on polymorphic bands using the UPGMA, NTSYS-pc software version 2.0. The result showed that, *Paphiopedilum* could be classified into three clusters with similarity coefficients ranging from 0.30-0.79. The dendrogram analysis of SCoT markers revealed the closed relation between *P. bellatulum* and *P. concolor* subsp. *Reynieri* with similarity coefficient of 0.79. Finally, these results indicate that the SCoT markers are capable of assessment of genetic relationship among *Paphiopedilum* subgenus *Brachypetalum* section *Brachypetalum*, which can be used for planning in the breeding program.

Keywords: lady's slipper orchid; *Paphiopedilum*; *Brachypetalum*; genetic relationship; SCoT marker

1. คำนำ

กล้วยไม้เป็นไม้ตัดดอกที่นิยม เนื่องจากดอกกล้วยไม้มีสีสันสวยงาม มีอายุการใช้งานนาน และให้ผลตอบแทนสูง (ส้าอรงค์, 2549) กล้วยไม้เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญที่สุดของไทย ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและผู้ส่งออกดอกกล้วยไม้เขตร้อนมากเป็นอันดับหนึ่งของโลก และสามารถผลิตและส่งออกกล้วยไม้รองเท้านารีได้ในปริมาณมาก (วิเคราะห์โดยกรมส่งเสริมการเกษตร) กล้วยไม้รองเท้านารีมีแหล่งกำเนิดอยู่ในเขตอบอุ่น และเขตร้อนโดยเฉพาะแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยประเทศไทยพบกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* รวม 18 ชนิด จากที่พบทั่วโลกประมาณ

70 ชนิด (อุไร, 2541) ในธรรมชาติกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ที่อาศัยบนดิน กึ่งดิน และบางชนิดอาจอาศัยแบบอิงอาศัยได้เช่นกัน (เศรษฐมนตร์, 2551) ปัจจุบันมีการตัดไม้ทำลายป่าและการนำกล้วยไม้รองเท้านารีป่ามาจำหน่ายโดยไม่ได้รับอนุญาต ส่งผลให้กล้วยไม้รองเท้านารีมีโอกาสนสูญพันธุ์ได้ง่าย โดยอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดพันธุ์สัตว์ป่าและพืชป่าที่กำลังจะสูญพันธุ์ (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES) ได้ระบุให้กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นพืชอนุรักษ์ในบัญชีที่ 1 เป็นชนิดพันธุ์ที่ได้มาจากป่าหรือเป็นของป่า และใกล้สูญพันธุ์ จึงห้ามทำการค้า

โดยเด็ดขาด (ยกเว้นกรณีที่ได้จากการขยาย พันธุ์ เทียม หรือเพาะพันธุ์ หรือการศึกษาวิจัย) (กรม วิชาการเกษตร, 2518) อีกทั้งการจำแนกด้วย ลักษณะสัณฐาน (morphology) ทำได้ยากและต้อง อาศัยผู้เชี่ยวชาญที่มีประสบการณ์ ดังนั้นการศึกษา ลักษณะทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลนี้จึงเป็น สิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ช่วงใดช่วงหนึ่ง ของดีเอ็นเอที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ถึง ความแตกต่างหรือความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมี ชีวิตได้ (สุรินทร์, 2552) โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์หรือพีซี อาร์ (PCR, polymerase chain reaction) เป็นวิธีที่ ทำได้ง่ายและรวดเร็ว ตัวอย่าง เช่น เครื่องหมายอาร์ เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) (William *et al.*, 1990) และเครื่องหมายสก็อต (SCoT, start-codon targeted) (Collard and Mackill, 2009) โดยเครื่องหมายสก็อตนั้นเป็น เครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพเมื่อเปรียบเทียบกับ เครื่องหมายชนิดอื่น (Wu *et al.*, 2013) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้เครื่องหมายสก็อตในการสร้าง ไลบรารีพหุดีเอ็นเอและประเมินความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphio- pedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachy- petalum* จำนวน 14 ชนิด ที่พบในประเทศไทย ซึ่ง มีประโยชน์ในการวางแผน การอนุรักษ์และการผลิต เพื่อส่งเสริมทางการค้า

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphio- pedilum*

กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphio- pedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachy- petalum* ที่พบในประเทศไทย จำนวน 14 ชนิด

ได้แก่ (1) รองเท้านารีฝ่าหอย (*P. bellatulum*) (2) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*P. concolor* subsp. *Reynieri*) (3) รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม (*P. concolor* var. *Tonkinense*) (4) รองเท้านารี เหลืองกาญจน์ (*P. concolor* var. *Concolor*) (5) รองเท้านารีเหลืองอุดร (*P. concolor* subsp. *Hennisianum*) (6) รองเท้านารีเหลืองสิงขร (*P. concolor* var. *Longipetalum*) (7) รองเท้านารี เหลืองตรัง (*P. godefroyae*) (8) รองเท้านารีเหลือง พังงา (*P. godefroyae* var. *Leucochilum*) (9) รองเท้านารีขาวชุมพร (*P. godefroyae* var. *Leucochilum*) (10) รองเท้านารีช่องอ่างทอง (*P. godefroyae* var. *Ang-thong*) (11) รองเท้านารีขาว สตุล (*P. niveum*) (12) รองเท้านารีขาวพังงา (*P. thianum*) (13) รองเท้านารีเกรย์ (*P. Greyi*) และ (14) รองเท้านารีเหลืองประจวบ (*P. concolor* var. *Chlorophyllum*)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบของรองเท้านารีด้วย วิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธี ของนฤมล และคณะ (2555) จากนั้นตรวจสอบ ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง อัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็ก- โโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose) ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 และคำนวณ อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย เครื่องหมายสก็อต

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย เครื่องหมายสก็อตมี 2 ขั้นตอน คือ (1) การตรวจหา ไพรเมอร์ที่ตอบสนองต่อปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยรวมดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารี จำนวน 14

ชนิด (ในปริมาณที่เท่ากัน) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส ไพรเมอร์ที่ใช้ จำนวน 80 ชนิด มีขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ (Luo *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2013) แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยทำอิเล็กโทรโฟเรซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และ (2) คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกลายไม้ร่องเท้านารีได้มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกัลยไม้ร่องเท้านารีแต่ละชนิดด้วยเครื่องหมายสก็อต

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 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) และมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์ 250 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (Unit) ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์สมี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ (นฤมล และ คณะ, 2555)

2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากเครื่องหมายสก็อตในกัลยไม้ร่องเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ทั้ง 14 ชนิด โดยการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น พันธุ์ที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งจะให้สัญลักษณ์เป็น 1 ส่วนพันธุ์ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่

ตำแหน่งเดียวกันนั้นจะให้สัญลักษณ์เป็น 0 จากนั้นหาค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยการเลือกการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สได้

เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอกลายไม้ร่องเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 ชนิด ด้วยเครื่องหมายสก็อต โดยใช้ไพรเมอร์ 80 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 48 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ (หรือคิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์)

3.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกัลยไม้ร่องเท้านารี

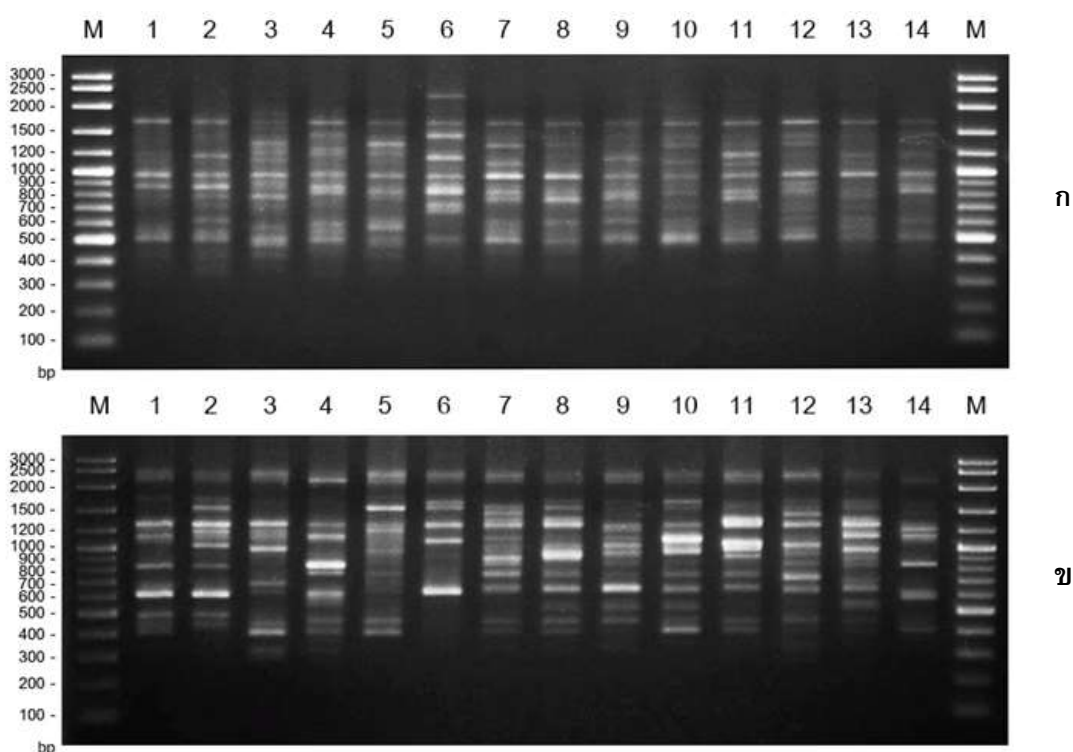
เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปริมาณสูงอย่างชัดเจนและให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ จำนวน 22 ชนิด นำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกัลยไม้ร่องเท้านารี ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 332 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 250 ถึง 3,100 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความหลากหลาย (monomorphic band) จำนวน 19 แถบ (คิดเป็น 5.72 %) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย (polymorphic band) จำนวน 313 แถบ (คิดเป็น 94.28 %) โดยมีไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายสูง (คิดเป็น 100 %) จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ SCoT13, SCoT14, SCoT39, SCoT61, SCoT64, SCoT66, SCoT67 และ SCoT80 ดังตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน เช่น ไพรเมอร์ SCoT35 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 17 แถบ มีขนาด 450-2,400 คู่เบส ดังรูปที่ 1ก และไพรเมอร์ SCoT80 ให้แถบดีเอ็นเอ

ที่มีความหลากหลายมากที่สุดถึง 26 แถบ มีขนาด 300-2,400 คู่เบส ดังรูปที่ 1ข

3.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ 22 ชนิด พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.30-0.79 ดังรูปที่ 2 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ได้ดังรูปที่ 3 เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.445 สามารถแบ่งกล้วยไม้รองเท้านารีเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้อง

กับลักษณะสัณฐาน กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รองเท้านารีฝายหอย รองเท้านารีเหลืองปราจีน และรองเท้านารีเหลืองประจวบ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม รองเท้านารีเหลืองอุดร และรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองสิงขร รองเท้านารีเหลืองตรัง รองเท้านารีเหลืองพังงา รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีขาวชุมพร รองเท้านารีช่องอ่างทอง รองเท้านารีขาวพังงา และรองเท้านารีเกรย์ ซึ่งพบว่ารองเท้านารีฝาย



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 ชนิด ที่ได้จากเครื่องหมายสก็อต โดยใช้ไพรเมอร์ SCoT35 (ก) และไพรเมอร์ SCoT80 (ข) [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้านารี ได้แก่ (1) รองเท้านารีฝายหอย (2) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (3) รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม (4) รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (5) รองเท้านารีเหลืองอุดร (6) รองเท้านารีเหลืองสิงขร (7) รองเท้านารีเหลืองตรัง (8) รองเท้านารีเหลือง (9) รองเท้านารีขาวชุมพร (10) รองเท้านารีช่องอ่างทอง (11) รองเท้านารีขาวสตูล (12) รองเท้านารีขาวพังงา (13) รองเท้านารีเกรย์ และ (14) รองเท้านารีเหลืองประจวบ]

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความหลากหลายของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 14 ชนิด

ชื่อ ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ ทั้งหมด	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอที่มี ความหลากหลาย	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอที่ไม่มี ความหลากหลาย	เปอร์เซ็นต์ ความหลากหลาย
SCoT1	CAACAATGGCTACCACCA	4	3	1	75.00
SCoT12	ACGACATGGCGACCAACG	15	14	1	93.33
SCoT13	ACGACATGGCGACCATCG	12	12	0	100.00
SCoT14	ACGACATGGCGACCACGC	11	11	0	100.00
SCoT35	CATGGCTACCACCGCCCC	17	14	3	82.35
SCoT39	ACGACATGGCGACCAGCG	19	19	0	100.00
SCoT40	ACGACATGGCGACCACGT	13	12	1	92.31
SCoT50	ACAATGGCTACCACTGGG	18	17	1	94.44
SCoT51	ACAATGGCTACCACTGTC	10	9	1	90.00
SCoT52	ACAATGGCTACCACTGCA	20	19	1	95.00
SCoT58	ACAATGGCTACCACTAGG	16	15	1	93.75
SCoT59	ACAATGGCTACCACCATC	9	7	2	77.78
SCoT61	CAACAATGGCTACCACCG	18	18	0	100.00
SCoT64	ACCATGGCTACCACGGTC	13	13	0	100.00
SCoT65	ACCATGGCTACCACGGCA	18	17	1	94.44
SCoT66	ACCATGGCTACCAGCGAG	13	13	0	100.00
SCoT67	ACCATGGCTACCAGCGGC	17	17	0	100.00
SCoT69	ACCATGGCTACCAGCGCA	16	15	1	93.75
SCoT70	ACCATGGCTACCAGCGCG	20	18	2	90.00
SCoT77	CCATGGCTACCACTACCC	12	11	1	91.67
SCoT79	CCATGGCTACCACTAGCT	15	13	2	86.67
SCoT80	CCATGGCTACCACTAGCG	26	26	0	100.00
รวม (total)		332	313	19	-
ค่าเฉลี่ย (average)		15.10	14.23	0.86	92.30

หอยและรองเท้านารีเหลืองปราจีนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.79 เช่นเดียวกับงานวิจัยของประเดิม (2543) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารี

หมู่ Brachypetalum ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) โดยพบว่ารองเท้านารีฝายหอยและรองเท้านารีเหลืองปราจีนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความ

เหมือน 0.54 ในขณะที่รองเท่านั้นรีฟาหอยกับ
รองเท่านั้นรีเหลืองสิงขร และรองเท่านั้นรีเหลืองอุดร
กับรองเท่านั้นรีเกรย์แตกต่างกันมากที่สุด มีค่าดัชนี
ความเหมือน 0.30 และสามารถจำแนกกล้วยไม้
รองเท่านั้นรีเหลืองตรัง รองเท่านั้นรีขาวสตูล และ
รองเท่านั้นรีขาวพังงา ออกจากกันได้ แต่จัดเป็นกลุ่ม
เดียวกัน ซึ่งกล้วยไม้รองเท่านั้นรีทั้ง 3 ชนิด มีความ

ผิวน้ำแปรของลักษณะสัณฐาน (morphology) บางต้น
 มีลักษณะดอกและใบที่ใกล้เคียงกัน มีการกระจาย
 พันธุ์ในเขตพื้นที่เดียวกัน โดยเฉพาะจังหวัดพังงา
 สุราษฎร์ธานี กระบี่ และตรัง (อรุณรัตน์ และคณะ,
 2555) ซึ่งจัดกลุ่มอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับรองเท้านารี
 เหลืองพังงา รองเท้านารีขาวชุมพร และรองเท้านารี
 ช่ออ่างทองที่มีถิ่นกำเนิดในแถบภาคใต้เช่นกัน

รองเท้านารีผ้าทอย	1.00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		</
-------------------	------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----

รูปที่ 2 ค่าดัชนีความเหมือนของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 ชนิด ที่ได้จากเครื่องหมายสัณฐาน

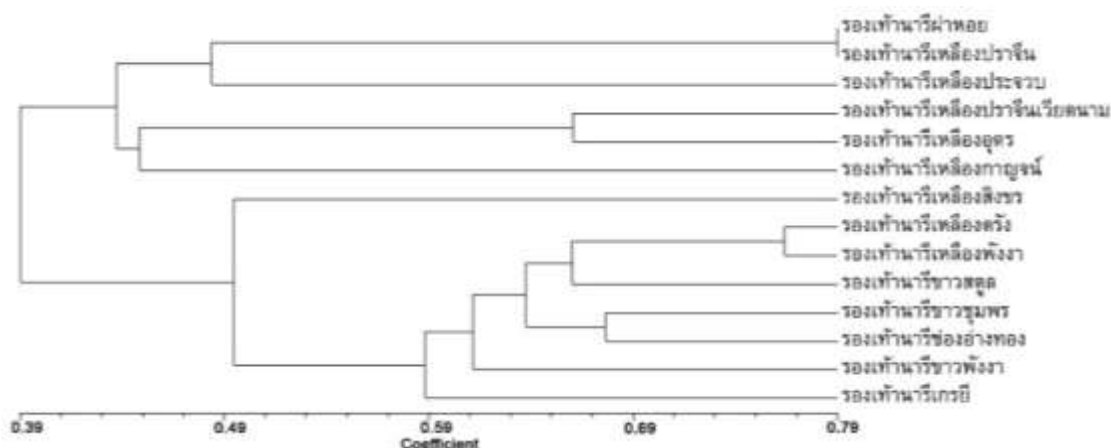
ดังนั้นจึงสามารถใช้เครื่องหมายสก็อต
ประเมินความสัมพันธ์และจำแนกพันธุ์กล้วยไม้
รองเท้านารีทั้ง 14 ชนิด ได้เช่นเดียวกับ Luo และ
คณะ (2010) ที่ศึกษาในมะม่วง และ Feng และคณะ
(2015) ที่ศึกษาในกล้วยไม้สกุลหวาย

สำหรับในประเทศไทยนั้น พบว่ามีการใช้
เครื่องหมายสก็อตเพื่อวิเคราะห์ความผันแปรทาง
พันธุกรรม (genetic variation) ของต้นรักแกนมอ

(กรองทอง และคณะ, 2557) และพบว่ามีการใช้
เครื่องหมายดีเอ็นเอหลายชนิดเพื่อประเมินความ
สัมพันธ์กล้วยไม้ ตัวอย่าง เช่น การใช้เครื่องหมาย
แฮตอาร์เอฟพีดีและเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ในการ
ประเมินความสัมพันธ์กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้อง
สาย (ฐิติพร และคณะ, 2557) กล้วยไม้สิงโตกลอก
ตา (เกียรติชัย และคณะ, 2557) กล้วยไม้สกุล
กุหลาบ (วริสรา และคณะ, 2557) กล้วยไม้สกุล

แวนด้าหมูเข็ม (จินต์ และคณะ, 2558) กล้วยไม้สกุล
หวายหมูในโครเซอร์ซูเรและลูกผสม (จุฑาทิพย์

และคณะ, 2559) และกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (ภัทรา
และคณะ, 2559)



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ร่องเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู *Brachypetalum* 14 ชนิด ที่ได้จากเครื่องหมายสก็อต

4. สรุป

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอกล้วยไม้ร่องเท้านารี
สกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู
Brachypetalum 14 ชนิด ด้วยเครื่องหมายสก็อต
โดยใช้ไพรเมอร์ 80 ชนิด สามารถคัดเลือกไพรเมอร์
ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 22 ชนิด ชนิด พบ
แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 332 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่
ไม่มีความหลากหลาย 19 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่
มีความหลากหลาย 313 แถบ โดยพบไพรเมอร์ที่ให้
แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายสูง (คิดเป็น 100 %)
8 ชนิด ได้แก่ SCoT13, SCoT14, SCoT39, SCoT61,
SCoT64, SCoT66, SCoT67 และ SCoT80

เมื่อคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและ
วิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่ม
แบบ UPGMA สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้ร่องเท้านารี
เป็น 3 กลุ่ม ซึ่ง สอดคล้องกับลักษณะสัณฐาน มีค่า
ดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.30 ถึง 0.79 และจาก
ข้อมูลการประเมินความสัมพันธ์กล้วยไม้ร่องเท้านารี
สกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum*

หมู *Brachypetalum* ในประเทศไทย สามารถใช้เป็น
ข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนการอนุรักษ์ รวมทั้ง
การปรับปรุงพันธุ์และการผลิตผลได้อย่างยั่งยืนต่อไป

5. รายการอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร, 2518, คู่มือจำแนกพืชอนุรักษ์
ตาม พ.ร.บ., กระทรวงเกษตรและสหกรณ์,
กรุงเทพฯ.
กรทอง ใจแก้วแดง, วิชาญ เอียดทอง และสุนทร
ปิยะโชคณากุล, 2557, การวิเคราะห์ความ
ผันแปรทางพันธุกรรมของต้นรักแกนมอใน
ประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมาย Start Codon
Targeted (SCoT), Thai J. Forest. 33(2): 19-27.
เกียรติชัย แซ่ใต้, ชีระชัย ชนาคันต์ และณฤมล ธนา
นันต์, 2557, การจำแนกและวิเคราะห์ความ
สัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโต
กลอกตาหมูสิงโตสยามด้วยเครื่องหมายแฮด
อาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci.
Tech. 2: 92-101.

- จินต์ ทองสม, ชีระชัย ธนानันต์, นฤมล ธนานันต์, 2558, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มด้วยแอตอาร์เอฟพีดีและไอเอสเอสอาร์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 475-484.
- จุฑาทิพย์ พันธุ์ปัทมา, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2559, การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ในไกรเซอร์ซูเรและลูกผสมด้วยแอตอาร์เอฟพีดี, Thai J. Sci. Technol. 5: 77-87.
- จิตติพร โทมัสโสภา, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเทคนิคแอตอาร์เอฟพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 82-91.
- นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และชีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแอตอาร์เอฟพีดี, Thai J. Sci. Tech. 1: 169-179.
- ประเดิม วนิชชนานันท์, 2543, การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีหมวด *Brachypetalum* ด้วยเทคนิค RAPD, ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ภัทรา หงษ์ทองดี, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2559, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของชนิดกล้วยไม้ในสกุลเอื้องเทียนด้วยไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Tech. 2: 343-350.
- วริศรา แทนสง่า, ชีระชัย ธนานันต์ และ นฤมล ธนานันต์, 2557, การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเครื่องหมายแอตอาร์เอฟพีดี, Thai J. Sci. Tech. 3: 317-326.
- เศรษฐมนันต์ กาญจนกุล, 2551, ร้อยพรรณพฤกษากล้วยไม้รองเท้านารี, สำนักพิมพ์เศรษฐศิลป์, กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สำอองค์ เนตรนารี, 2549, กล้วยไม้, พิมพ์ครั้งที่ 5, เกษตรสยามบุ๊คส์, กรุงเทพฯ.
- อรุณรัศมี วณิชชานนท์, อุบลวรรณ อุโพธิ์, ศุภลักษณ์ ภูมิคง, ชัยพฤกษ์ วีระวงศ์, ประพจน์ สัตถาภรณ์, วรพจน์ ล้อมลิ้ม, และบุญทัน บุญชูตา, 2555, ลักษณะสัณฐานบางประการ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของรองเท้านารีขาวพังงา รองเท้านารีขาวสตูล และรองเท้านารีเหลืองตรังในบางพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย, รายงานการวิจัย, สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ, สงขลา.
- อุไร จิรมงคลการ, 2541, กล้วยไม้รองเท้านารี, พิมพ์ครั้งที่ 1, บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิง จำกัด (มหาชน), 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 marker in plants, *Plant Mol. Biol. Rep.* 27: 86-93.
- 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.
- Feng, S., He, R., Yang, S., Chen, Z., Jiang, M., Lu, J. and Wang, H., 2015, Start codon targeted (SCoT) and target region amplification polymorphism (TRAP) for evaluating the genetic relationship of *Dendrobium* species, *Gene* 567: 182-188.

- 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, NTSYpc 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.
- 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.* 8: 6531-6535.
- 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.