

การจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม
ของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม
ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์
Identification and Genetic Relationship Analysis
of *Bulbophyllum* Section *Sestochilus*
Using HAT-RAPD and ISSR Markers

เกียรติชัย แซ่ใต้ และธีระชัย ธนาคันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนาคันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Kiattichai Saetai 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

สิงโตกลอกตา (*Bulbophyllum*) เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ อยู่ในวงศ์ Orchidaceae พบได้ในป่าเขตร้อน ปัจจุบันกล้วยไม้กลุ่มนี้ลดปริมาณลงอย่างรวดเร็ว อีกทั้งการจำแนกกล้วยไม้กลุ่มนี้ด้วยลักษณะสัณฐานนั้นทำได้ยากและต้องใช้ความเชี่ยวชาญ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อใช้จัดจำแนกชนิดและพันธุ์ในระดับโมเลกุล ซึ่งสามารถช่วยวางแผนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป โดยศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามที่พบในประเทศไทย จำนวน 12 ชนิด ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีและเทคนิคไอเอสเอสอาร์ โดยในส่วนของเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 20 ชนิด และในส่วนของเทคนิคไอเอสเอสอาร์ ใช้ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 11 ชนิด พบว่าเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีและเทคนิคไอเอสเอสอาร์ สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์ นอกจากนี้ยังสามารถจำแนกชนิดได้โดยใช้

ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีความเหมือน 0.23-0.49 และ 0.16-0.49 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลแถบดีเอ็นเอของทั้งสองเทคนิคมาวิเคราะห์ผลร่วมกัน พบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้กลุ่มนี้ได้เป็น 5 กลุ่ม โดยมีค่าดัชนีความเหมือน 0.20-0.49 เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแต่ละเครื่องหมายเทียบกับลักษณะฐานพบว่าการใช้เทคนิคแอสทาร์เอพีดีและเทคนิคไอเอสเอสอาร์ร่วมกันให้ผลดีที่สุด

คำสำคัญ : สกุลสิงโตกลอกตา; การจำแนก; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; แอสทาร์เอพีดี; ไอเอสเอสอาร์

Abstract

Bulbophyllum is one of the largest orchids genus belonging to family Orchidaceae and well-known as tropical area plants. Nowadays *Bulbophyllum* are dramatically reduced and its morphological identification is much more difficult which requires skilled and experienced persons. So it is necessary to understand the genetic diversity and DNA fingerprinting of orchids to identify and classify correctly in the molecular level that lead to the plans for orchids conservation and breeding program in the future. In this study, 20 random primers of HAT-RAPD technique and 11 microsatellite primers of ISSR technique were used to study the genetic relationship among 12 species of *Sestochilus* section, member of *Bulbophyllum* found in Thailand. The result showed that HAT-RAPD markers and ISSR markers are able to make the differences among 12 species with specific DNA bands even by using as only one primer. A dendrogram constructing based on polymorphic bands showed genetic similarities among 12 clusters with the similarity coefficients ranging from 0.23 to 0.49 and 0.16 to 0.49, respectively. It also provides an analysis of genetic diversity using the DNA band of two markers analysis together. A dendrogram constructed showed genetic similarities among 12 clusters with the similarity coefficients ranging from 0.20 to 0.49 as well as the analysis of genetic diversity. Molecular markers and morphology comparative analysis found that using HAT-RAPD technique and ISSR technique analysis together give the best results.

Keywords: *Bulbophyllum*; identification; genetic relationship; HAT-RAPD; ISSR

1. คำนำ

กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตา (*Bulbophyllum*) เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ จัดอยู่ในวงศ์ย่อย Epidendroideae พบตามธรรมชาติมากกว่า 2,000 ชนิด มีการจัดจำแนกเป็นหมู่โดยนำลักษณะที่ใกล้เคียงกันมารวมไว้ในหมู่เดียวกัน เพื่อให้จำแนกและตรวจสอบชนิดพันธุ์ได้ง่าย โดยแต่ละหมู่มีลักษณะแตกต่างกันไป ซึ่งจำแนกได้เป็น 15 หมู่

กล้วยไม้กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม [*Sestochilus* (Breda) Benth. & Hook. f.] มีลักษณะสำคัญ คือ มีลำลูกกล้วยปรากฏเด่นชัดตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ แต่ละลำลูกกล้วยมีเพียงใบเดียว ใบใหญ่และกว้าง แผ่นใบหนา โดยในประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม 12 ชนิด ได้แก่ สิงโตประหลาด (*B. affine*) สิงโตชุกชุกชุก (*B. dayanum*) สิงโตอีเคอร์ (*B.*

ecomutum) สิงโตสยาม (*B. lobbii*) สิงโตกำมปูใหญ่ (*B. macranthum*) สิงโตกำมปูแดง (*B. patens*) สิงโตงาม (*B. orectopetalum*) สิงโตเขี้ยวเขียงดาว (*B. pectinatum*) พญาสิงโต (*B. polystictum*) สิงโตปากนกแก้ว (*B. psittacoglossum*) สิงโตอาจารย์เต็ม (*B. smitinandii*) และสิงโตสุคริณ (*B. rugosum*) (สลิล, 2553)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามที่มีอยู่ในประเทศไทยด้วยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาจากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี (HAT-RAPD, high annealing temperature - random amplified polymorphic DNA) และเทคนิคไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter-simple sequence repeat) โดยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์หรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) (Williams *et al.*, 1990) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้สะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น (สุรินทร์, 2552) เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ เป็นเทคนิคที่รวมเอาข้อดีของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphisms) และเครื่องหมายอาร์เอฟดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) ไว้ด้วยกัน (Bao and Jonathan, 2001) ปัจจุบันนิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเทคนิคไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เช่นเดียวกับเทคนิคอาร์เอฟดี โดยมีหลักการ คือ ใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นไมโครแซทเทลไลท์ความยาวประมาณ 16-25 นิวคลีโอไทด์ และเติมนิวคลีโอไทด์คัดเลือก โดยไพรเมอร์จะเข้าจับตำแหน่งไมโคร-

แซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่ง ใกล้ ๆ กัน แล้วเพิ่มปริมาณขั้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างไมโครแซทเทลไลท์ 2 ตำแหน่ง ซึ่งเรียกขั้นดีเอ็นเอนี้ว่าไอเอสเอสอาร์ ข้อดีของเครื่องหมายนี้ คือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ และมีความสามารถในการทำซ้ำสูง (Powell *et al.*, 1996; สุรินทร์, 2552)

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม

กล้วยไม้ที่ใช้ในการวิจัยนี้คือกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม 12 ชนิด ที่พบในประเทศไทย ได้แก่ สิงโตกำมปูใหญ่ สิงโตกำมปูแดง สิงโตประหลาด สิงโตอาจารย์เต็ม พญาสิงโต สิงโตสยาม สิงโตงาม สิงโตอีคอร์ สิงโตยุกขยุย สิงโตเขี้ยวเขียงดาว สิงโตปากนกแก้ว และสิงโตสุคริณ

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) โดยบดใบกล้วยไม้ 3-4 กรัม ในบัฟเฟอร์สกัด [extraction buffer; 4 % cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB), 0.6 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 M NaCl, 20 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 0.1 % sodium metabisulfite] 20 มิลลิลิตร ซึ่งมีเมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol) 20 ไมโครลิตร และพอลิไวนิลไพร์โรลิโดน (polyvinylpyrrolidone, PVP) 0.3 กรัม โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 5

นาที่ หลังจากนั้นจึงแยกสารละลายส่วนบนมาเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ (linear polyacrylamide) 140 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ล้าง (washing buffer; 10 mM sodium acetate pH 5.2 และ 70 % ethanol) ปล่อยให้แห้งและละลายตะกอนในบัฟเฟอร์อาร์เอ็นเอสเอ (RNase buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 15 mM NaCl) 500 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอ (10 mg/ml RNase A) 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลากัดด้วยฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25:24:1) 1 ครั้ง และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) อีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นจึงย้ายสารละลายส่วนบนมาเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ 70 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) ให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร และเติมไอโซโพรพานอลให้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ทีอี (TE buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1.0 mM EDTA) ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ใน

เจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแอสตาเรียพีดีและไอเอสเอสอาร์

2.3.1 การคัดเลือกชนิดไพรเมอร์

นำดีเอ็นเอผสมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคแอสตาเรียพีดีใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 72 ชนิด แบ่งเป็นไพรเมอร์ชุด A2, B2, C2, D2, E2 และ F2 จากบริษัท Wako Company (ประเทศญี่ปุ่น) ส่วนเทคนิคไอเอสเอสอาร์ใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเป็นไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 35 ชนิด และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 2.5 mM MgCl₂) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 μ M ไพรเมอร์แบบสุ่ม 250 nM และเอนไซม์ Taq DNA polymerase (Invitrogen™ life technology, Brazil) 1 ยูนิต (นฤมล และคณะ, 2555)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมือ 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 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 หลังจากนั้นตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

โดยใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกจากขั้นตอน 2.3.1 มาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามแต่ละชนิด และตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด ที่ได้จากเทคนิคแอสตอร์เอพีดีและไอเอส-เอสอาร์ โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 จากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002) โดยแบ่งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ออกเป็น การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากเทคนิคแอสตอร์เอพีดี เทคนิคไอเอสเอสอาร์ และทั้งสองเทคนิคร่วมกัน

3. ผลการวิจัย

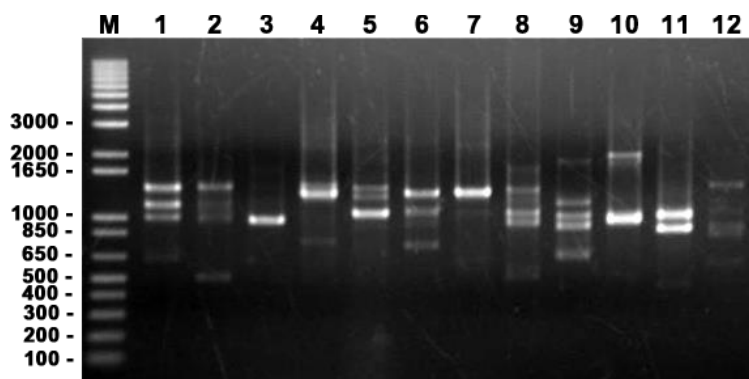
ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของเทคนิคแอสตอร์เอพีดีโดยใช้ดีเอ็นเอผสมเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) พบว่ามีไพรเมอร์ 23 ชนิด จากทั้งหมด 72 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 20 ชนิด มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 18 ชนิด ที่สามารถใช้แยกกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด ได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ดังตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ A22 ในรูปที่ 1 นอกจากนี้พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามแต่ละชนิด โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอปรากฏแถบดีเอ็นเอ 408 แถบ มีขนาด 200-3,000 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก

โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่าสามารถสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ได้ดังรูปที่ 2 และมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่างชนิด 0.23-0.49 โดยพบว่าสิงโตสยามและสิงโตงามมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.49 ในขณะที่สิงโตปากนกแก้วต่างจากสิงโตสุคริณมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.15 ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มได้ 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สิงโตกำมปูใหญ่ สิงโตกำมปูแดง และสิงโตประหลาด กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สิงโตอาจารย์เต็ม สิงโตสยาม สิงโตงาม และพญาสิงโต กลุ่มที่ 3 ได้แก่ สิงโตอีคอร์ กลุ่มที่ 4 ได้แก่ สิงโตขยุกขยู่ สิงโตเขี้ยวเขี้ยวดาว และสิงโตปากนกแก้ว และกลุ่มที่ 5 ได้แก่ สิงโตสุคริณ

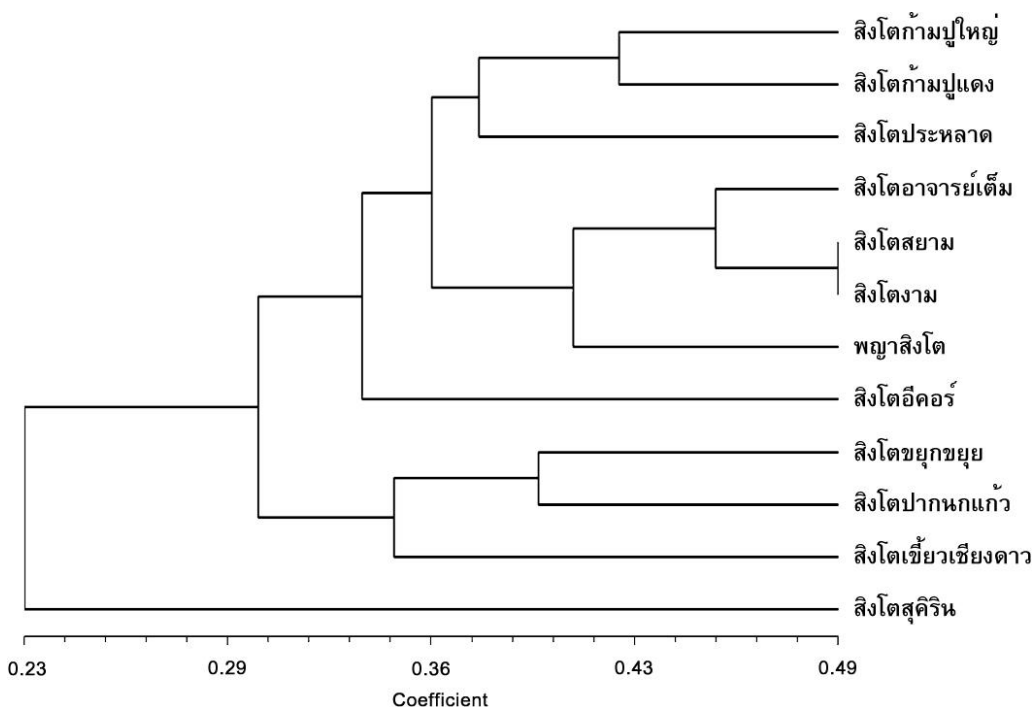
ส่วนเทคนิคไอเอสเอสอาร์พบว่ามีไพรเมอร์ 14 ชนิด จากทั้งหมด 35 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 11 ชนิด มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่ามีไพรเมอร์ 10 ชนิด ที่สามารถใช้แยกกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด ได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ดังตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ M01 ในรูปที่ 3 นอกจากนี้พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามแต่ละชนิด โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 217 แถบ มีขนาด 200-3,000 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่าสามารถสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ได้ดังรูปที่ 4 และมีค่าดัชนีความเหมือนระหว่างชนิด 0.16-0.49 โดยพบว่าสิงโตสยามและสิงโตงามมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด โดยมีค่าดัชนีความเหมือน 0.49 ในขณะที่สิงโตกำมปูใหญ่ต่างจากสิงโตสุคริณมากที่สุด โดยมีค่าดัชนีความเหมือน 0.06 ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มได้ 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สิงโตกำมปู

ใหญ่ สิงโตกำปูแดง และสิงโตประหลาด กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สิงโตอาจารย์เต็ม สิงโตสยาม และสิงโตงาม กลุ่มที่ 3 ได้แก่ สิงโตยุกขยุย สิงโตเขี้ยวเข็ญดาว

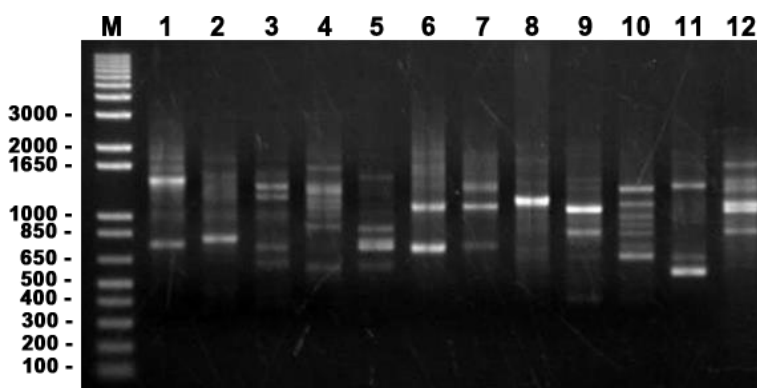
และสิงโตปากนกแก้ว กลุ่มที่ 4 ได้แก่ สิงโตอีคอร์ และกลุ่มที่ 5 ได้แก่ พญาสิงโตและสิงโตสุคริน



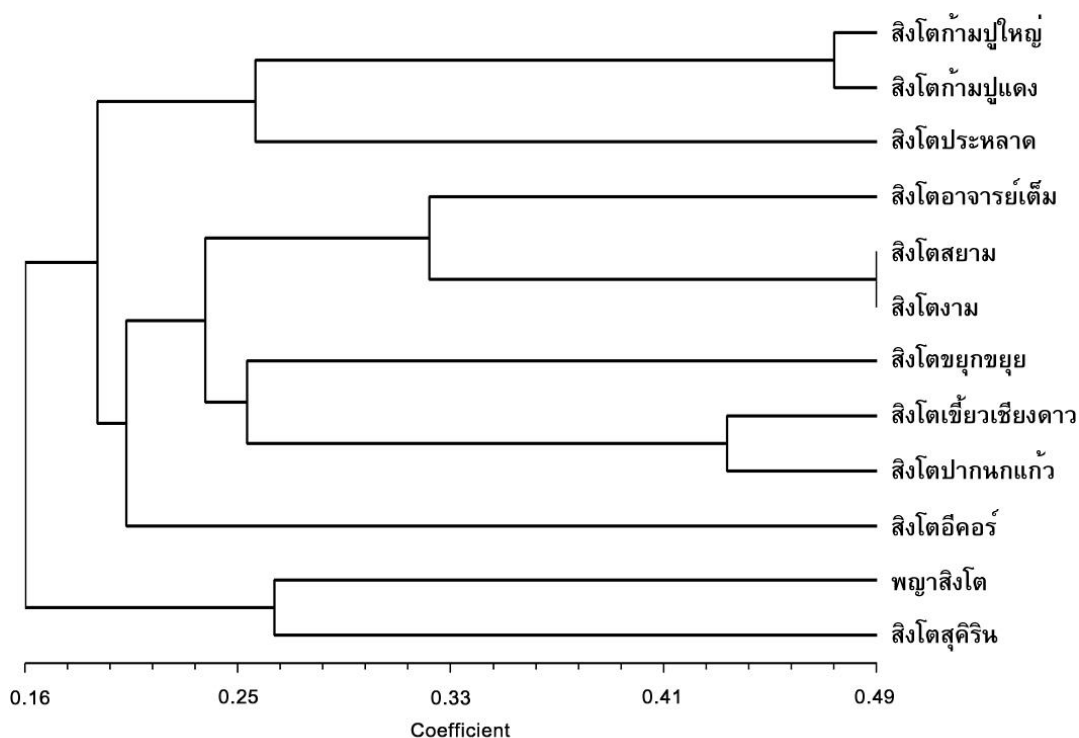
รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแอสตอร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ A22 โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA) และ 1 คือ สิงโตกำปูใหญ่ 2 คือ สิงโตกำปูแดง 3 คือ สิงโตประหลาด 4 คือ สิงโตอาจารย์เต็ม 5 คือ พญาสิงโต 6 คือ สิงโตสยาม 7 คือ สิงโตงาม 8 คือ สิงโตอีคอร์ 9 คือ สิงโตยุกขยุย 10 คือ สิงโตเขี้ยวเข็ญดาว 11 คือ สิงโตปากนกแก้ว และ 12 คือ สิงโตสุคริน



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามที่ได้จากเทคนิคแอสตอร์เอพีดี



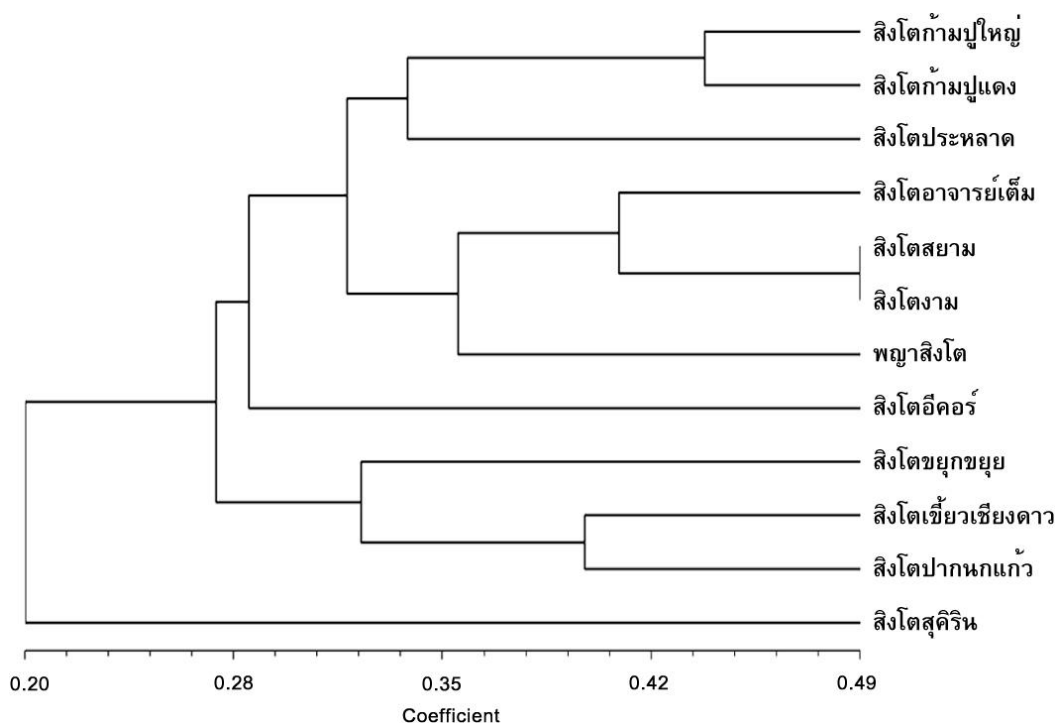
รูปที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ M01 โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA) และ 1 คือ สิงโตกำมปูใหญ่ 2 คือ สิงโตกำมปูแดง 3 คือ สิงโตประหลาด 4 คือ สิงโตอาจารย์เต็ม 5 คือ พญาสิงโต 6 คือ สิงโตสยาม 7 คือ สิงโตงาม 8 คือ สิงโตอีคอร์ 9 คือ สิงโตขยุกขยิก 10 คือ สิงโตเขี้ยวเข็ญดาว 11 คือ สิงโตปากนกแก้ว และ 12 คือ สิงโตสุคริน



รูปที่ 4 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์

เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากทั้งเทคนิค แอสตอร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามร่วมกันด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่าสามารถสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ได้ดังรูปที่ 5 มีค่าดัชนีความเหมือนระหว่างชนิด 0.20-0.49 โดยพบว่า สิงโตสยามและสิงโตงามมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.49 ในขณะที่ สิงโตปากนกแก้วต่างจากสิงโตสุคริณมากที่สุด มีค่า

ดัชนีความเหมือน 0.13 ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มได้ 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สิงโตกำมปูใหญ่ สิงโตกำมปูแดง และสิงโตประหลาด กลุ่มที่ 2 ได้แก่ สิงโตอาจารย์เต็ม สิงโตสยาม สิงโตงาม และพญาสิงโต กลุ่มที่ 3 ได้แก่ สิงโตอีคอร์ กลุ่มที่ 4 ได้แก่ สิงโตขุขย และสิงโตเขียวเชียงดาว และสิงโตปากนกแก้ว และกลุ่มที่ 5 ได้แก่ สิงโตสุคริณ ซึ่งผลที่ได้มีความคล้ายคลึงกับการจำแนกด้วยลักษณะ สัณฐานมากกว่าการใช้เพียงเทคนิคใดเทคนิคหนึ่ง ดังที่กล่าวมาแล้ว



รูปที่ 5 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามที่ได้จากเทคนิคแอสตอร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์

4. วิจารณ์

การตรวจสอบกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามด้วยเทคนิคแอสตอร์เอพีดี พบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันและสามารถจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโต

สยามได้ เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่าความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นมีความสอดคล้องกับการจำแนกชนิดตามลักษณะสัณฐาน และจากผลการวิเคราะห์ทั้งหมดทำให้กล่าวได้ว่าสามารถใช้เครื่องหมายแอสตอร์เอพีดีในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง

พันธุ์กรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามได้ เช่นเดียวกับการศึกษาในพืชสกุล *Ficus* (วิศัย และสมบุญณ์, 2548)

การตรวจสอบกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ พบว่าสามารถใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุ์กรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามได้เช่นเดียวกับการศึกษาในยางพารา (ยศินทร์ และปรียา, 2550) และมะพร้าว (นภาพร และอนุชิตรา, 2555)

5. สรุป

จากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่ากล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด ต่างมีความแตกต่างกันในเชิงพันธุ์กรรม เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มีแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามแต่ละชนิด และยังสามารถใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อนำมาใช้แยกความแตกต่างของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการศึกษาวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีร่วมกับเทคนิคไอเอสเอสอาร์ให้แผนภูมิความสัมพันธ์ที่ดีที่สุด

6. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภายใต้ "ทุนวิจัยทั่วไป"

7. เอกสารอ้างอิง

นฤมล ธนาคันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนาคันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอก

มะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-179.

นภาพร แก้วดวงดี และอนุชิตรา แซ่ตั้ง, 2555, ความสัมพันธ์ทางพันธุ์กรรมของสายพันธุ์มะพร้าว, ว.ก้าวหน้าโลกวิทยาศาสตร์ปีที่ 12(1): 108-120.

ยศินทร์ กิจจันทรโรภาส และปรียา พวงสำลี หวังสมนึก, 2550, ความหลากหลายทางพันธุ์กรรมของยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) สิบสามสายพันธุ์ในประเทศไทย, ว.วิทยาศาสตร์เกษตร 38(พิเศษ): 19-24.

วิศัย พรหมเทพ และสมบุญณ์ อนันตลาโภชัย, 2548, การวิเคราะห์พันธุ์กรรมพืชสกุล *Ficus* spp. โดยเทคนิค HAT-Random amplified polymorphic DNA, ว.ศูนย์วิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร 2(1): 39-50.

สลิล สิทธิจักรธรรม, 2553, กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาในประเทศไทย, สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล, 2552, เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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.

Powell, W., Machray, C. and Provan, J., 1996, Polymorphism revealed by simple sequence repeats, *Trends Plant Sci.* 1: 215-222.

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., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.