การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบในประเทศไทยด้วยเทคนิค SRAP

Evaluation of Genetic Diversity in Thai *Aerides* Orchids using SRAP Technique

มลิวรรณ นาคขุนทด*, นริศศา เจริญศรี และอนุพันธ์ กงบังเกิด

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

Maliwan Nakkuntod* Naritsa Charoensi and Anupan Kongbangkerd

Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Tha Pho, Muang, Phitsanulok 65000

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลกุหลาบหรือเอื้องกุหลาบ (*Aerides*) จัดเป็นกล้วยไม้ที่มีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นไม้ตัดดอกหรือส่งออกของประเทศไทย เนื่องจากรูปทรงดอกที่สวยงามคล้ายนก และกล้วยไม้ในสกุลนี้ยังสามารถผสมข้ามชนิดและข้ามสกุลได้ง่าย ด้วยเหตุนี้จึงเกิดสายพันธุ์ใหม่ ๆ ขึ้นมากมายในปัจจุบัน การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบในประเทศไทยทั้ง 7 ชนิด เปรียบเทียบกับสกุลแวนด้า 3 ชนิด และสกุลช้าง 2 ชนิด ด้วยเทคนิค SRAP โดยสุ่มเลือกจาก 100 คู่ไพรเมอร์ โดยผลการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ SRAP จำนวน 8 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนทั้งหมด 164 แถบ ขนาดประมาณ 50-2,000 คู่เบส โดย 163 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่พบแตกต่างกันในทุกชนิดที่ศึกษา และเมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่าง พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.039-0.891 โดยเหมือนกันน้อยที่สุด คือ กุหลาบขาว 3 กับกุหลาบมาลัยแดง 3 และเหมือนกันมากที่สุด คือ เข็มขาวกับเขาแกะ ขณะที่ในกล้วยไม้สกุลกุหลาบนั้นค่าสัมประสิทธ์ความเหมือนที่มากที่สุด คือ กุหลาบขาว 3 และ 4 (0.625) ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากล้วยไม้สกุลกุหลาบนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาก

คำสำคัญ : กล้วยไม้; เครื่องหมายดีเอ็นเอ; ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Abstract

The orchids in genus *Aerides* are highly potential to develop into cut flower or export plants of Thailand because of their bird-like beauty flower. The plants in this genus can be easily crossed to produce both inter-specific and inter-generic hybrids are occurred nowadays. This research aimed to evaluate genetic diversity of 7 species of Thai *Aerides* compared with 3 species of *Vanda* and 2

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** maliwann@nu.ac.th

species of *Rhynchostylis* using SRAP (sequence-related amplified polymorphism) technique. One hundred of SRAP primer pairs were screened while 8 primer pairs were chosen because they showed distinguish bands. One hundred and sixty three polymorphic bands were presented from totally 164 generated bands ranged in size from about 50-2,000 bp from all samples. The similarity index was varied from 0.039 between *A. odorata*3 and *A. multiflora*3 to 0.891 between *V. lilacina* and *R. coelestis* whereas the highest similarity index within *Aerides* was between *A. odorata*3 and 4 (0.625). Therefore, there is a high genetic diversity among *Aerides* orchids in Thailand.

Keywords: orchid; DNA marker; genetic diversity

1. บทนำ

กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) เป็นกล้วยไม้อิงอาศัยที่พบกระจายพันธุ์ทั่วไปในเขตร้อนของทวีปเอเชีย ตั้งแต่ประเทศอินเดียไปจนถึงทางตอนใต้ของประเทศจีน และหมู่เกาะนิวกินี เป็นกล้วยไม้ที่จัดได้ว่ามีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูง เนื่องจากช่อดอกเด่น มีกลิ่นหอมและสีสันสวยงาม และรูปร่างดอกยังมีความจำเพาะคล้ายรูปนกด้วย กล้วยไม้สกุลกุหลาบนี้พบได้ในป่าทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยเกาะอาศัยอยู่ตามต้นไม้ใหญ่ บางชนิดเจริญอยู่บนหิน โดยเป็นต้นเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มใหญ่ มีลำต้นกลมยาว ต้นแก่มักจะแตกกิ่งใกล้โคนต้น รากเป็นรากอากาศ ใบรูปขอบขนานเรียงสลับซ้ายขวา โคนใบเป็นกาบหุ้มลำต้น ช่อดอกเกิดตามซอกใบ ส่วนใหญ่จะห้อยลง ดอกบานเต็มที่มีขนาดประมาณ 2-3 เซนติเมตร สามารถบานได้หลายวันและมีกลิ่นหอมมาก โดยจะออกดอกในช่วงฤดูร้อนถึงต้นฤดูฝน กลีบเลี้ยงและกลีบดอกคล้ายกัน กลีบปากมีเดือยซึ่งมักจะงอและเบนออกทางด้านหน้า กลีบปากแบ่งเป็น 3 พู ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของกล้วยไม้สกุลนี้ เส้าเกสรค่อนข้างสั้นและส่วนปลายมีจะงอยแหลม ในธรรมชาติพบขึ้นตามป่าเบญจพรรณ ป่าดิบ บางชนิดพบตามป่าชายหาด และป่าชายเลน ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่เลี้ยงง่ายและมีบทบาทสาคัญในการผสมพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ [1] โดยประเทศไทยมีกล้วยไม้สกุลกุหลาบ 7 ชนิด ซึ่งเดิมมี 8 ชนิด แต่มีการย้ายไปอยู่ในสกุลแวนด้า 1 ชนิด คือ *Vanda flabellata* เนื่องจากการตรวจสอบในระดับของดีเอ็นเอทั้งบริเวณคลอโรพลาสต์และนิวเคลียส [2,3] กล้วยไม้สกุลกุหลาบนอกจากเลี้ยงง่ายและมีดอกที่สวยงามแล้วยังมีคุณค่าในทางด้านการผสมพันธุ์ สามารถผสมพันธุ์ได้ทั้งภายในสกุลและข้ามสกุล ได้แก่ เมื่อนำไปผสมกับสกุลแวนด้าก็จะได้เป็นสกุลแอริโดแวนด้า (*Aeridovanda*) แต่เมื่อนำไปผสมกับสกุลช้างก็จะได้เป็นแอริโดสไตลิส (*Aeridostylis*) เป็นต้น ซึ่งการผสมข้ามสกุลนั้นเป็นที่นิยมเพื่อให้ได้ลักษณะตามที่ต้องการ มีประโยชน์ทางด้านเศรษฐกิจ ในประเทศไทยจะมีช่วงออกดอกอยู่ในเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายนหรือกรกฎาคมของทุกปี ซึ่งเจริญเติบโตได้ในทุกภาค จัดเป็นพันธุ์ที่พบได้ไม่ยากนัก

การศึกษาวิจัยทางดีเอ็นเอของกล้วยไม้มีมากมาย ตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอจนถึงการใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุลต่าง ๆ เช่น RAPD, RFLP หรือแม้แต่การหาลำดับดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตาม ยังมีการศึกษาน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาแขนงอื่น เช่น การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ด้วยลักษณะของใบกล้วยไม้นั้นมีลักษณะอวบน้ำและแข็งมาก ดังนั้นเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอจึงมีความสำคัญมากตั้งแต่ในขั้นตอนแรก โดยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการสกัด

ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้าง ที่ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี ได้แก่ วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle ในปี ค.ศ. 1987 และชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ NucleoSpin® Plant ผลการศึกษาพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบของกล้วยไม้สกุลช้างโดยวิธีดัดแปลงนั้นจะได้ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอไม่แตกต่างจากชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ NucleoSpin® Plant [4] ชนิดของตัวอย่างพืชเป็นอีกปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการสกัดดีเอ็นเอก็คือตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง ซึ่งจะเกิดจากผลของสาร secondary metabolites และน้ำมันหลายชนิดที่พืชสร้างขึ้น พบว่าในตัวอย่างสดจะเกิดกระบวนการเมทาบอลิซึมขึ้นมาก ทำให้ไปมีผลขัดขวางการสกัดดีเอ็นเอและไปควบคุมการทำปฏิกิริยาของสารเคมีที่ใช้ทั้งในการสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แต่สำหรับตัวอย่างแห้งนั้น พืชบางชนิดสร้างสารประกอบฟีนอลในปริมาณมาก เมื่อแห้งแล้วเป็นสีน้ำตาล ทำให้สารสกัดดีเอ็นเอที่ได้มีสีเหลืองถึงน้ำตาลตามไปด้วย อย่างไรก็ตาม พืชแต่ละชนิดและแต่ละอวัยวะก็มีสารต่าง ๆ แตกต่างกัน เช่น การสกัดดีเอ็นเอจากใบมะขามที่จำเป็นต้องมีการปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในแต่ขั้นตอนเพื่อให้สารละลายเป็นกลาง ก่อนจะดำเนินการในขั้นตอนต่อไป [5] รวมถึงการรายงานวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากสนที่มีใบแหลม (*Cupressus sempervirens* L.) และแข็ง โดยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปที่มีการปรับประยุกต์ขั้นตอนให้เหมาะสม พบว่าได้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณมากพอที่จะสามารถนำไปใช้ศึกษาต่อได้ [6] ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการสกัดดีเอ็นเอมีอยู่หลายวิธีด้วยกัน ซึ่งลักษณะใบของกล้วยไม้ที่อวบน้ำ แข็ง และมีคาร์โบไฮเดรตมากเป็นปัญหาหลักในการสกัดดีเอ็นเอ

ในประเทศไทยมีการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ เพื่อการจัดจำแนกสายพันธุ์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอต่าง ๆ เช่น วริสรา และคณะ ในปี พ.ศ. 2557 ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดจำแนกกล้วยไม้สกุลกุหลาบในประเทศไทย 12 พันธุ์ และเอื้องหนวดพราหมณ์อีก 1 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD) และไอเอสเอสอาร์ (ISSR) ซึ่งเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีจะรวมดีเอ็นเอของกล้วยไม้เข้าด้วยกันแล้วใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 12 เบส จำนวน 6 ชุด ชุดละ 12 ชนิด ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ส่วนเทคนิคไอเอสเอสอาร์จะใช้ไพรเมอร์สำหรับไมโครแซทเทลไลต์ที่มีขนาด 17-18 เบส จำนวน 35 ชนิด จากการศึกษาพบว่าทั้งสองเทคนิคดังกล่าวสามารถจัดจำแนกกล้วยไม้ได้ทั้ง 13 พันธุ์ ซึ่งให้ค่าความเหมือนต่ำ แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้กลุ่มนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง นอกจากนี้ผลวิเคราะห์ยังสามารถจัดกลุ่มได้ไม่เหมือนกัน ซึ่งอาจเนื่องจากปริมาณข้อมูลของแถบดีเอ็นเอและจำนวนรูปแบบแถบดีเอ็นเอนั้นแตกต่างกัน โดยเทคนิคแฮต-อาร์เอพีดีปรากฏแถบดีเอ็นเอ จำนวน 323 แถบ ขนาดประมาณ 250 ถึง 2,900 คู่เบส มีแถบที่แตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ 323 แถบ สามารถแยกได้เป็น 5 กลุ่ม โดยมีค่าความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.26 ถึง 0.70 ในขณะที่เทคนิคไอเอสเอสอาร์ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 160 แถบ ขนาด 100 ถึง 3,000 คู่เบส เป็นแถบที่แตกต่างกัน 157 แถบ จัดกลุ่มได้ 6 กลุ่ม ซึ่งมีค่าความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.33 ถึง 0.73 เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากทั้งสองเทคนิคมาวิเคราะห์ร่วมกันพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มกล้วยไม้ออกเป็น 5 กลุ่ม เช่นเดิม และเทคนิคแฮตอาร์-เอพีดียังมีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานมากกว่าเทคนิคไอเอสเอสอาร์อีกด้วย [7] ขณะเดียวกันนฤมล และคณะ ในปี พ.ศ. 2557 ก็ได้จัดจำแนกพันธุ์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ 12 พันธุ์ และเอื้องหนวดพราหมณ์อีก 1

พันธุ์ ด้วยลำดับเบสของตำแหน่งจำเพาะ โดยศึกษาดีเอ็นเอบริเวณ ITS ในนิวเคลียสของยีน *matK*, *rpoC1*, *rpoB* และบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ในคลอโรพลาสต์ จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่าไม่สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้ครบทุกตัวอย่าง แต่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *matK* และบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* ได้ครบทุกตัวอย่าง ซึ่งมีขนาดประมาณ 900 และ 800 เบส ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 ปรากฏว่ายีน *matK* ที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 877 เบส มีความแตกต่างกันในกล้วยไม้แต่ละตัวอย่าง 43 ตำแหน่ง สร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 4.0 เลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ neighbor-joining พบว่าไม่สามารถแยกกล้วยไม้ 6 พันธุ์ ออกจากกันได้ สำหรับบริเวณระหว่างยีน *psbA-trnH* มีขนาด 889 เบส โดยมี 166 ตำแหน่งที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ แต่ยังไม่สามารถแยกกล้วยไม้ 6 พันธุ์ ออกจากกันได้เช่นกัน จึงนำข้อมูลจากทั้งสองตำแหน่งมาวิเคราะห์ร่วมกันแล้วสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ปรากฏว่ายังไม่สามารถแยกเอื้องกุหลาบชมพูกระบี่กับเอื้องกุหลาบน่านออกจากกันได้ จึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *rpoB* เพิ่มเติม ซึ่งยีน *rpoC1* นี้มีขนาด 529 เบส พบ 15 ตำแหน่ง ที่แตกต่างกันในกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ และยีน *rpoB* มีขนาด 362 เบส พบ 7 ตำแหน่ง ที่มีความแตกต่างกันในกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ เมื่อพิจารณาแล้วพบว่าสามารถแยกเอื้องกุหลาบชมพูกระบี่กับเอื้องกุหลาบน่านออกจากกันได้ โดยสรุปแล้วคือ การใช้ข้อมูลจากดีเอ็นเอหลายตำแหน่งมาวิเคราะห์จะช่วยให้สามารถจัดจำแนกกล้วยไม้ได้ดีขึ้น [8] ในปีเดียวกันนี้ นฤมล และคณะ ได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ 15 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี โดยการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่ามีไพร์เมอร์ 57 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์มา 24 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับตัวอย่างกล้วยไม้สกุลกุหลาบทุกพันธุ์ พบว่าให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 467 แถบ แตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ 463 แถบ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e และจัดกลุ่มแบบ UPGMA แล้วสร้างแผนภูมิ ปรากฏว่าแบ่งได้ 6 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐาน [9]

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต รวมไปถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ด้วย โดยเทคนิค sequence related amplified polymorphism (SRAP) จัดเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจในการนำมาศึกษา เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SRAP เป็นเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่ถูกคิดค้นและพัฒนาโดย Li และ Quiros ในปี ค.ศ. 2001 โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) โดยการนำดีเอ็นเอในจีโนม (genomic DNA) ของสิ่งมีชีวิตมาเพิ่มปริมาณในส่วนของ open reading frame (ORF) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ส่วนหน้า (forward primer) และไพรเมอร์ส่วนหลัง (reverse primer) ที่มีขนาด 17-18 เบส แต่ละไพรเมอร์ประกอบด้วยสองส่วน คือ ส่วนแรกเป็นลำดับเบสหลัก (core sequence) ขนาด 13-14 เบส โดย 10-11 เบสแรก ด้านปลาย 5′ เป็นลำดับเบสที่ไม่มีความจำเพาะเรียกว่าลำดับเบสส่วนเติม (filler sequence) ตามด้วยลำดับเบสจำเพาะคือ CCGG สำหรับไพรเมอร์ส่วนหน้าและ AATT สำหรับไพรเมอร์ส่วนหลัง ส่วนที่สอง คือ เบสแบบคัดเลือก (selective base) จำนวน 3 เบส ด้านปลาย 3′ ในส่วนของลำดับเบสส่วนเติมของไพรเมอร์ส่วนหน้า และไพร

เมอร์ส่วนหลังต้องไม่เหมือนกัน ไพรเมอร์ต้องไม่เกิด hairpin หรือ secondary structure และต้องมีเปอร์เซ็นต์ GC สูงประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์ จากไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ทำให้ตำแหน่งที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในจีโนม มีแนวโน้มเป็นส่วนของยีนมากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบสุ่มชนิดอื่น สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะใช้วิธี step up PCR คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ต่ำที่ 35 องศาเซลเซียส 5 รอบ เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ดี แล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นที่ 52 องศาเซลเซียสอีก 30-35 รอบ เพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่มาจาก 5 รอบแรกเท่านั้น ทำให้ผลที่ได้มีความคงที่ หลังจากนั้นจะตรวจสอบผลโดยใช้ polyacrylamide gel ที่มีสารที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (denaturing polyacrylamide gel) และทำให้ได้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก การข่มของแถบดีเอ็นเอจากเครื่องหมาย SRAP นี้มีทั้งข่มสมบูรณ์ (dominant) และข่มร่วม (codominant) แต่เนื่องจากไม่สามารถระบุได้ว่าแถบดีเอ็นเอแถบใดข่มร่วมกับแถบใด จึงต้องตรวจสอบในรูปของการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งตรงกัน เครื่องหมายโมเลกุลนี้ทดสอบโดยการหาลำดับเบสในลูกผสมของ *Brassica oleracea* L. ระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่เป็น double haploid หลังจากการศึกษาลำดับเบสแล้ว พบว่าประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ ของลำดับเบสที่หาได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสของยีนใน GenBank และ 20 เปอร์เซ็นต์ ของเครื่องหมาย SRAP แสดงการข่มแบบข่มร่วมกัน (co-dominant) จึงตรวจสอบในรูปของการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งตรงกัน นอกจากนี้ยังนำเทคนิค SRAP ไปใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในพืชอื่น ๆ อีก เช่น มันฝรั่ง ข้าวกระเทียม แอปเปิ้ล Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.), rapeseed (*Brassica napus* L.) citrus และ celery [10] รวมถึงการศึกษาใน *Brassica rapa* เพื่อหายีนต้านทานต่อโบรอน [11] รวมถึงฟักทอง [12] อ้อย [13] กล้วย [14] ผักกาดเขียว [15] หญ้าฝรั่ง [16] สน [17] และแตงโม [18] รวมทั้งกล้วยไม้สกุลหวายด้วย [19]

ดังนั้นจากข้อมูลข้างต้นเทคนิค SRAP น่าจะมีศักยภาพในการนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ในสกุลกุหลาบและใกล้เคียงได้ เพื่อความเข้าใจทางพันธุกรรมของพืชในสกุลนี้มากยิ่งขึ้น

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างใบอ่อนกล้วยไม้จากแหล่งรวบรวมเอกชนจำนวน 26 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างกล้วยไม้ในสกุลกุหลาบจำนวน 7 ชนิด 18 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิดและคาดว่าเป็นลูกผสมจำนวน 2 ตัวอย่าง กล้วยไม้ในสกุลแวนด้า 3 ชนิด 4 ตัวอย่าง และกล้วยไม้ในสกุลช้าง 2 ชนิด 2 ตัวอย่าง (ตาราง 1) โดยเก็บใบใส่ใน silica gel เพื่อให้ใบแห้ง แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีดัดแปลงของ Dolye และ Dolye (1987) จากนั้นตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis บนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 % และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอก่อนนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค SRAP ต่อไป

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค sequence related amplified polymorphism (SRAP)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP เริ่มจากนำดีเอ็นเอกล้วยไม้ 3 ตัวอย่าง ของแต่ละสกุล ได้แก่ *Aerides odorata*, *Vanda flabellate* และ *Rhynchostylis gigantea* มาคัดเลือก โดยใช้การจับคู่

ไพรเมอร์ M1-M10 เป็น forward primer กับ E1-E10 เป็น reverse primer จำนวน 100 คู่ไพรเมอร์ (ตาราง 2) โดยคัดเลือกจากคู่ไพรเมอร์คู่ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 3 ตัวอย่าง และให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน หลังจากนั้นนำไพรเมอร์ที่คัดเลือกแล้วมาเพิ่มปริมาณกับทุกตัวอย่างตามตาราง 1 ภายใต้สภาวะที่กำหนด โดย 5 รอบแรก ใช้อุณหภูมิ annealing 35 องศาเซลเซียส และอีก 35 รอบ ใช้อุณหภูมิ annealing 52 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปตรวจสอบโดยใช้อะกาโรสเจล 1.7 % ใน 1x TAE buffer ความต่างศักย์ 100 โวลต์

ตาราง 1 ตัวอย่างกล้วยไม้ที่ใช้ในการวิจัย

ชนิดที่	ชื่อพื้นเมือง	ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวอย่าง	ตัวอย่างที่
1	กุหลาบกระเป๋าเปิด	*Aerides falcata* Lindl. & Paxton.	3	1,2,3
2	กุหลาบกระเป๋าปิด/กุหลาบขาว	*A. odorata* Lour.	4	4,5,6,7
3	กุหลาบเหลืองโคราช	*A. houlletiana* Rchb. f.	2	8,9
4	กุหลาบแดง	*A. crassifolia* Parish ex Burb.	2	10,11
5	กุหลาบเอราวัณ	*A. rosea* Lodd. Ex Lindl. & Paxton	3	12,13,14
6	กุหลาบมาลัยแดง	*A. multiflora* Roxb.	3	15,16,17
7	กุหลาบกระบี่	*A. krabiense* Seidenf.	1	18
8	กุหลาบอินทจักร	*Vanda flabellate* (Rolfe ex. Downie)	2	19,20
9	กุหลาบ	*Aerides* sp.	2	21,22
10	เข็มขาว	*V. lilacina* Teijsm. & Binn.	1	23
11	ฟ้ามุ่ย	*V. coerulca* Griff. ex Lindl.	1	24
12	ช้างกระ	*Rhynchostylis gigantea* (Lindl.) Ridl.	1	25
13	เขาแกะ	*R. coelestis* (Rchb.f.) Rchb.f. ex H.J.Veitch	1	26

2.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

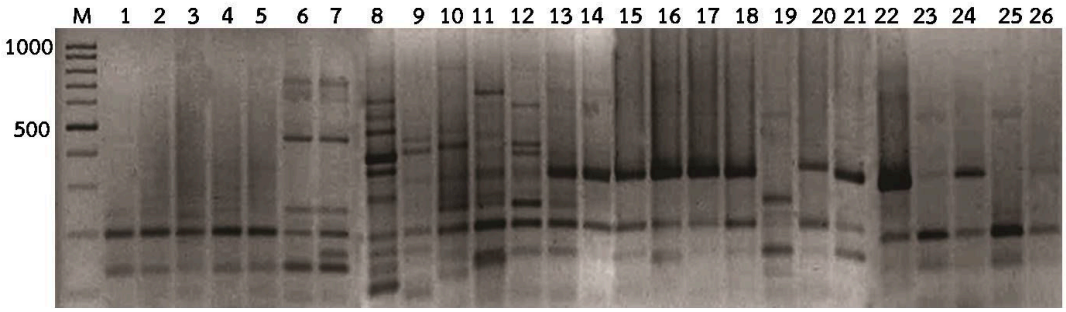
นำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลชัดเจนมาแปลผล โดยให้ค่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในตำแหน่งหนึ่ง ๆ เป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์หาความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 [20] และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) [21]

3. ผลและวิจารณ์

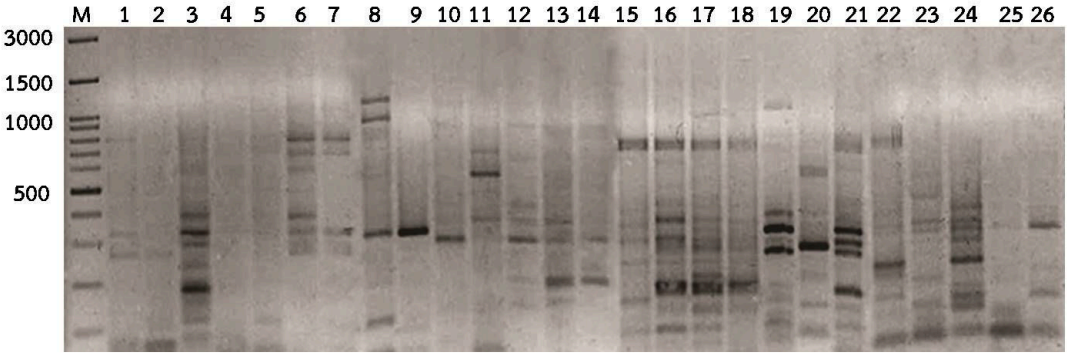
การสกัดดีเอ็นเอจากใบแห้งของกล้วยไม้สกุลกุหลาบและสกุลใกล้เคียง จำนวน 26 ตัวอย่าง โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจาก Doyle และ Doyle (1987) พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอจากใบแห้งได้ดีเนื่องจากใบแห้งจะ

ตาราง 2 ลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ M1-M10 (forward) และ E1-E10 (reverse)

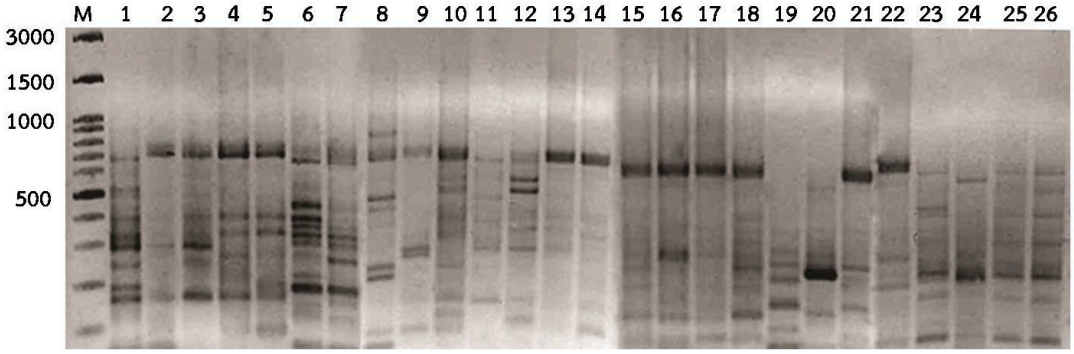
Forward primer	ลำดับเบส 5′→3′	Reverse primer	ลำดับเบส 5′→3′
M1	TGAGTCCAAACCGGAAA’	E1	GACTGCGTACGAATTAAC
M2	TGAGTCCAAACCGGAAG	E2	GACTGCGTACGAATTAAT
M3	TGAGTCCAAACCGGAAC	E3	GACTGCGTACGAATTGA
M4	TGAGTCCAAACCGGAAT	E4	GACTGCGTACGAATTGCA
M5	TGAGTCCAAACCGGAGC	E5	GACTGCGTACGAATTCAA
M6	TGAGTCCAAACCGGACA	E6	GACTGCGTACGAATTCAG
M7	TGAGTCCAAACCGGACC	E7	GACTGCGTACGAATTCAC
M8	TGAGTCCAAACCGGATA	E8	GACTGCGTACGAATTCGT
M9	TGAGTCCAAACCGGTAG	E9	GACTGCGTACGAATTTGA
M10	TGAGTCCAAACCGGTCA	E10	GACTGCGTACGAATTTGC



รูปที่ 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ M2/E4 ทั้ง 26 ตัวอย่าง (ตาราง 1), M คือ 100 bp (Gene Direx)



รูปที่ 2 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ M3/E1 ทั้ง 26 ตัวอย่าง (ตาราง 1), M คือ 100 bp (Gene Direx)



รูปที่ 3 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ M3/E3 ทั้ง 26 ตัวอย่าง (ตาราง 1), M คือ 100 bp (Gene Direx)

มีประมาณน้ำในเซลล์น้อย ใบบาง ทำให้บดได้ง่าย แต่ใบของกล้วยไม้บางตัวอย่างมีลักษณะแข็ง เหนียว มีเส้นใยค่อนข้างมาก จึงต้องใช้ไนโตรเจนเหลวในปริมาณที่มากขึ้นเพื่อป้องการเกิดสารประกอบประเภทฟีนอล ซึ่งมีผลต่อความสะอาดของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ยิ่งไปกว่านั้นใบของกล้วยไม้สกุลนี้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูง การสกัดดีเอ็นเอแบบ large scale จึงได้ปริมาณดีเอ็นเอมาก แต่มีคาร์โบไฮเดรตมากด้วยเช่นกัน ซึ่งจะไปขัดขวางการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จึงใช้การสกัดดีเอ็นเอแบบ small scale สำหรับบางตัวอย่างที่มีคาร์โบไฮเดรตมาก

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับตัวอย่างกล้วยไม้สกุลกุหลาบจาก 100 คู่ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นไพรเมอร์แบบสุ่ม พบว่าไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณและปรากฏแถบดีเอ็นเอครบทุกตัวอย่างมีจำนวน 15 คู่ไพรเมอร์ แต่มีเพียง 8 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณและปรากฏแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนที่สุด จึงเลือก 8 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ M2E4, M2E5, M2E6, M2E7, M3E1, M3E3, M3E4 และ M3E5 มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบและสกุลใกล้เคียงต่อไป โดย 8 คู่ไพรเมอร์ นั้น มี 3 คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและปริมาณมาก คือ M2E4 (รูปที่ 1), M3E1 (รูปที่ 2) และ M3E3 (รูปที่ 3) จากทั้ง 8 คู่ไพรเมอร์ จะให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 164 แถบ โดยเฉลี่ย 20 แถบต่อไพรเมอร์ โดยมีขนาดตั้งแต่ 50-2,000 เบส และพบว่ามี 163 แถบที่เป็น polymorphic band ของทุกตัวอย่าง และมี 1 แถบ ที่เป็น mono-morphic band โดยพบในไพรเมอร์ M2/E4 ซึ่งจะเห็นได้ว่าเทคนิค SRAP นั้นสามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจำนวนมาก

หลังจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยการให้สัญลักษณ์ 1 และ 0 พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ของแต่ละตัวอย่างอยู่ในช่วง 0.039-0.891 เมื่อพิจารณาทุกตัวอย่าง โดยคู่ตัวอย่างที่มีแถบดีเอ็นเอที่คล้ายกันน้อยสุด คือ กุหลาบขาว 3 กับกุหลาบมาลัยแดง 3 ขณะที่คู่ตัวอย่างที่คล้ายกันมากที่สุด คือ เข็มขาวกับเขาแกะ และเมื่อพิจารณาภายในสกุล *Aerides* พบความคล้ายสูงสุดที่ 0.625 ระหว่างกุหลาบขาว 3 และกุหลาบขาว 4 (รูปที่ 4)

จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ พบว่าสามารถแยกกล้วยไม้สกุลกุหลาบออกได้เป็น 2 กลุ่ม ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ มลิวรรณ และคณะ ในปี พ.ศ. 2558 ที่ใช้เทคนิค PCR-RFLP แล้วความ

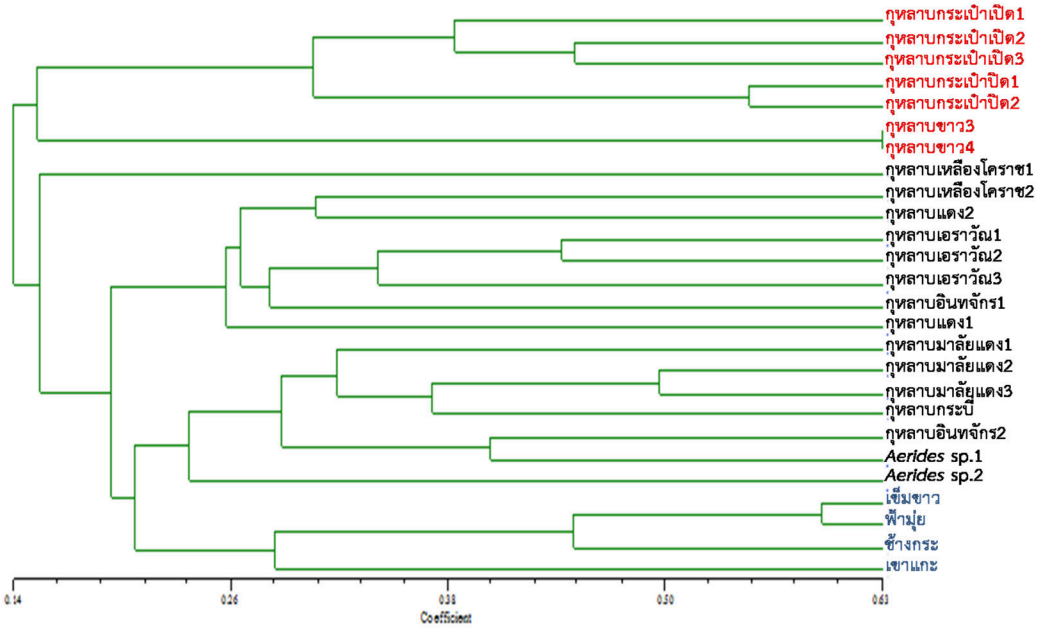
สัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบ่งเป็น 2 กลุ่ม แต่ตัวอย่างในกลุ่มแตกต่างกัน [22] น่าจะเนื่องจากในการทดลองนั้นใช้เฉพาะส่วนของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์เท่านั้น แต่การศึกษานี้เป็นดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ โดยในการศึกษาครั้งนี้กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยกล้วยไม้ 2 ชนิด 7 ตัวอย่าง ได้แก่ กุหลาบกระเป๋าปิด 2 ตัวอย่าง กุหลาบขาว 2 ตัวอย่าง และกุหลาบกระเป๋าเปิด 3 ตัวอย่าง โดยกุหลาบกระเป๋าปิดและกุหลาบขาวนั้นเป็นกล้วยไม้ชนิดเดียวกัน แต่ต่างกันที่สีดอก โดยกุหลาบกระเป๋าปิดมีดอกจะมีสีชมพูม่วง ขณะที่กุหลาบขาวมีดอกสีขาว นอกจากความแตกต่างในเรื่องของสีดอกแล้ว ยังพบว่ากุหลาบกระเป๋าปิดที่พบได้ในภาคเหนือจะมีโครโมโซมเป็นเตตราพลอยด์ (tetraploid-4n) ขณะที่กุหลาบขาวที่พบทางภาคใต้จะมีโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ (diploid-2n) [23] และเมื่อพิจารณาลักษณะภายนอกของกล้วยไม้กลุ่มนี้ทั้ง 2 ชนิด พบว่าจะมีลักษณะหลายประการที่คล้ายคลึงกัน เช่น มีกลีบปาก 3 ส่วน มีเส้าเกสรยาว โดยรวมมีความคล้ายคลึงกันแตกต่างกันเฉพาะลักษณะของปากหรือที่เรียกว่ากระเป๋า โดยกุหลาบกระเป๋าปิดส่วนของปากจะปิดคลุมส่วนของเส้าเกสรไว้ ส่วนจากกุหลาบกระเป๋าเปิดกระเป๋าจะเปิดอ้าออก ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างกล้วยไม้ที่เหลือทั้งหมด โดยตัวอย่างกล้วยไม้สกุลกุหลาบที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลายประการที่คล้ายคลึงกัน เช่น เส้าเกสรสั้น กลีบดอกและกลีบเลี้ยงมีลักษณะโค้งกลม กลีบปากด้านข้างมีขนาดเล็ก ซึ่งกุหลาบอินทจักรเป็นกล้วยไม้ในสกุลแวนด้าซึ่งแทรกอยู่ในสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ โดยกุหลาบอินทจักรทั้ง 2 ตัวอย่าง แยกกันอยู่คนละกลุ่มย่อยเนื่องมาจากมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมาก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีความผันแปรมาก และก่อนหน้านี้การจัดจำแนกกุหลาบอินทจักรยังมีความสับสนอยู่ โดยแต่เดิมนั้นมีการจัดให้อยู่ในสกุลกุหลาบ เพราะลักษณะฐานเส้าเกสรยาว มีกลีบปากที่เคลื่อนที่ได้ คือไม่ยึดติดแน่นอยู่กับเส้าเกสร [24] และจัดให้อยู่ในสกุลแวนด้าเนื่องจากมีลักษณะเดือยดอกสั้น กลีบปากกว้าง [25-27] แต่ต่อมาพบว่าได้มีจัดให้กุหลาบอินทจักรให้ไปอยู่ในสกุลแวนด้าเนื่องจากมีการนำข้อมูลทาง ชีวโมเลกุลมาสนับสนุน [28,29] ประกอบกับกุหลาบอินทจักรมีลักษณะของกลีบปาก และเส้าเกสรที่แตกต่างจากกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยข้อมูลดีเอ็นเอในนิวเคลียสบริเวณ nrITS และคลอโรพลาสต์บริเวณ *matK* และ *trnL-trnL-F* ยังพบอีกว่ากุหลาบอินทจักรจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุลแวนด้า ซึ่งแยกออกจากสกุลกุหลาบได้อย่างชัดเจน [30] แต่จากการวิจัยครั้งนี้พบว่ากุหลาบอินทจักรมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ *Aerides* sp.1 ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่ากล้วยไม้สกุลกุหลาบชนิดที่ 1 นี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุลแวนด้า และจากการวิเคราะห์โครโมโซมของกล้วยไม้กลุ่มนี้ยังเป็นเหตุผลหนึ่งที่สามารถบอกได้ว่ากล้วยไม้สกุลกุหลาบและกล้วยไม้สกุลแวนด้ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก [31-34] (รูปที่ 5)

4. สรุปผลการวิจัย

การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB ซึ่งดัดแปลงมาจาก Doyle และ Doyle นั้นสามารถใช้ในการสกัดดีเอ็นเอในกล้วยไม้ได้ทุกตัวอย่าง และสามารถใช้ได้ดีกับตัวอย่างใบแห้ง ส่วนการคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมกับตัวอย่างของกล้วยไม้สกุลกุหลาบจาก 100 คู่ไพรเมอร์ มีจำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ ที่เหมาะสมในการใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเทคนิค SRAP นี้สามารถพบ polymorphic band ได้มากกว่า 90 % และชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดอยู่ในช่วง 50-2,000 คู่เบส นอกจากนี้ยังสรุปได้ว่ากล้วยไม้ในสกุลกุหลาบนี้มีความผันแปรที่สูงมากทั้งในระดับชนิดและระดับสกุล

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
1	1.000																									
2	0.394	1.000																								
3	0.375	0.452	1.000																							
4	0.206	0.348	0.333	1.000																						
5	0.243	0.333	0.364	0.550	1.000																					
6	0.277	0.106	0.139	0.115	0.159	1.000																				
7	0.242	0.098	0.118	0.107	0.117	0.625	1.000																			
8	0.090	0.105	0.125	0.094	0.125	0.087	0.106	1.000																		
9	0.085	0.171	0.163	0.161	0.139	0.099	0.091	0.236	1.000																	
10	0.098	0.150	0.122	0.171	0.150	0.122	0.185	0.237	0.244	1.000																
11	0.130	0.167	0.186	0.088	0.105	0.113	0.123	0.169	0.306	0.238	1.000															
12	0.074	0.116	0.163	0.103	0.091	0.181	0.162	0.119	0.178	0.261	0.286	1.000														
13	0.087	0.143	0.140	0.167	0.111	0.167	0.164	0.175	0.286	0.282	0.353	0.444	1.000													
14	0.047	0.129	0.128	0.154	0.094	0.059	0.065	0.170	0.290	0.250	0.242	0.237	0.444	1.000												
15	0.196	0.125	0.149	0.143	0.125	0.108	0.134	0.125	0.250	0.146	0.214	0.163	0.225	0.158	1.000											
16	0.196	0.186	0.224	0.211	0.159	0.128	0.188	0.164	0.273	0.196	0.213	0.145	0.250	0.136	0.395	1.000										
17	0.156	0.200	0.186	0.194	0.167	0.039	0.043	0.169	0.237	0.182	0.200	0.125	0.278	0.206	0.308	0.500	1.000									
18	0.122	0.161	0.154	0.240	0.125	0.058	0.063	0.105	0.281	0.211	0.235	0.143	0.212	0.207	0.250	0.342	0.400	1.000								
19	0.089	0.114	0.143	0.063	0.083	0.101	0.129	0.138	0.189	0.256	0.286	0.308	0.344	0.188	0.143	0.174	0.125	0.219	1.000							
20	0.157	0.114	0.184	0.128	0.167	0.162	0.176	0.118	0.149	0.113	0.170	0.130	0.152	0.091	0.289	0.333	0.310	0.195	0.156	1.000						
21	0.186	0.132	0.131	0.078	0.111	0.198	0.230	0.145	0.182	0.186	0.200	0.200	0.280	0.204	0.327	0.339	0.294	0.200	0.260	0.404	1.000					
22	0.133	0.171	0.136	0.241	0.171	0.068	0.091	0.115	0.122	0.159	0.205	0.128	0.154	0.212	0.220	0.244	0.270	0.281	0.100	0.227	0.161	1.000				
23	0.189	0.214	0.162	0.160	0.133	0.127	0.140	0.151	0.258	0.128	0.176	0.122	0.226	0.269	0.194	0.140	0.176	0.269	0.194	0.119	0.234	0.182	1.000			
24	0.068	0.088	0.179	0.143	0.088	0.104	0.115	0.103	0.200	0.175	0.194	0.167	0.242	0.286	0.179	0.268	0.265	0.321	0.250	0.220	0.245	0.235	0.296	1.000		
25	0.211	0.161	0.126	0.107	0.125	0.090	0.136	0.125	0.171	0.122	0.167	0.067	0.176	0.207	0.184	0.133	0.167	0.200	0.147	0.140	0.171	0.171	0.478	0.194	1.000	
26	0.175	0.156	0.150	0.143	0.121	0.104	0.097	0.143	0.235	0.146	0.194	0.167	0.242	0.286	0.211	0.156	0.229	0.276	0.290	0.136	0.200	0.200	0.891	0.357	0.429	1.000

รูปที่ 4 ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบและสกุลใกล้เคียงทั้งสิ้น 26 ตัวอย่าง (ตาราง 1)



รูปที่ 5 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบร่วมกับกล้วยไม้สกุลอื่น

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2559 เลขที่โครงการ R2559C124 และความอนุเคราะห์สถานที่ รวมถึงอุปกรณ์ในการทำวิจัยจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย

นเรศวร พร้อมกันนี้ ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คงศักดิ์ พร้อมเทพ และคุณสมภพ พินิจสำหรับอนุเคราะห์ตัวอย่างกล้วยไม้ที่ใช้ในการศึกษา

6. รายการอ้างอิง

[1] อบฉันท์ ไทยทอง, 2543, กล้วยไม้เมืองไทย, บ้านและสวน, กรุงเทพฯ, 461 น.

[2] Chase, M.W., Cameron, K.M., Barrett, R.L. and Freudenstein, J.V., 2003, DNA data and Orchidaceae systematics: A new phylogenetic classification, pp. 69-89, In Dixon, K.W., Kell, S.P., Barrett, R.L. and Cribb, P.J. (Eds.), Orchid Conservation, Natural History Publications (Borneo), Kota Kinabalu.

[3] van den Berg, C., Goldman, D.H., Freudenstein, J.V., Pridgeon, A.M., Cameron, K.M. and Chase, M.W., 2005, An overview of the phylogenetic relationships within Epidendroideae inferred from multiple DNA regions and recircumscription of the Epidendreae and Arethuseae (Orchidaceae), Amer. J. Bot. 92: 613-624.

[4] Doyle, J. and Doyle, J., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 11-15.

[5] กนกรัตน์ พิมพาพันธ์ และเพ็ชรลดา พิลึก, 2552, สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากใบมะขาม, ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

[6] Doulis, A.G., Harfouche, A.L. and Aravanopoulos, F.A., 2000, Rapid, high quality DNA isolation from cypress (*Cupressus sempervirens* L.) needles and optimization of the RAPD's marker technique, Plant Mol. Biol. Rep. 17: 1-14.

[7] วริสรา แทนสง่า, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3: 103-112.

[8] นฤมล ธนานันต์, ฐิติพร โท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 99-108.

[9] นฤมล ธนานันต์, วริสรา แทนสง่า และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 317-326.

[10] Li, G. and Quiros, C.F., 2001, Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*, Theor. Appl. Genet. 103: 455-461.

[11] Kaur, S., Ford, R., Nicolas, M., Norton, R. and Taylor, P.W.J., 2004. Selection of parents for studying B tolerance in *Brassica rapa*, In New Directions for a Diverse Planet: Proceedings for the 4th International Crop Science Congress, Brisbane.

[12] Ferriol, M., Pico, B. and Nuez, F., 2003, Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers, Theor. Appl. Genet. 107: 271-282.

[13] Suman, A., Kimbeng, C.A., Edma, S.J. and Veremis, J., 2008, Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers for assessing genetic relationships and diversity in sugarcane germplasm collections, Plant Genet. Resour. C. 6: 222-231.

[14] Youssef, M., James, A.C., Rivera-Madrid, R., Ortiz, R. and Escobedo-Graciamedrano, R.M., 2011, Musa genetic diversity revealed by SRAP and AFLP, Mol. Biotechnol. 47: 189-199.

[15] Luo, Y.X., Du, D.Z., Fu, G., Xu, L., Li, X.P., Xing, X.R., Yao, Y.M., Zhang, X.M., Zhao, Z. and Liu, H.D., 2011, Inheritance of leaf color and sequence-related amplified polymorphic (SRAP) molecular markers linked to the leaf color gene in *Brassica juncea*, Afr. J. Biotechnol. 10: 14724-14730.

[16] Babaei, S., Talebi, M. and Zeinali, H., 2014, Analysis of genetic diversity among saffron (*Crocus sativus*) accessions from different regions of Iran as revealed by SRAP markers, Sci. Hort. 171: 27-31.

[17] Xie, Q., Liu, Z., Wang, S. and Li, Z., 2015, Genetic diversity and phylogenetic relationships among five endemic *Pinus* taxa (Pinaceae) of China as revealed by SRAP markers, Biochem. Syst. Ecol. 62: 115-120.

[18] Inan, N., Yildiz, M., Sensoy, S., Kafkas, S. and Abak, K., 2012, Efficacy of ISSR and SRAP techniques for molecular characterization of some cucurbita genotypes including naked (Hull-less) seed pumpkin, J. Anim. Plant Sci. 22: 126-136.

[19] Cai, X., Feng, Z., Zhang, X., Xu, W., Hou, B. and Ding, X., 2011, Genetic diversity and population structure of an endangered orchid (*Dendrobium loddigesii* Rolfe) from China revealed by SRAP markers, Sci. Hort. 129: 877-881.

[20] Rohlf, F.J., 2002, NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Inc., New York, 44 p.

[21] Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy. Freeman and Co., San Francisco. 573 p.

[22] มลิวรรณ นาคขุนทด, ศิริรัตน์ อุดอินทร์ และอนุพันธ์ กงบังเกิด, 2015, การจัดจำแนกกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีบริเวณดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์, Thai J. Genet. 8: 160-166.

[23] นิรนาม, 2558, เอื้องกุหลาบกระเป๋าปิด, แหล่งที่มา : http://www.myfirstbrain.com/student_view.aspx?ID=22105, 21 เมษายน 2558.

[24] Seidenfaden, G., 1988, Orchid genera in Thailand XIV: Fifty-nine Vandoid genera,

Opera Bot. 95: 1-357.

[25] Garay, L.A., 1972. On the systematics of the monopodial orchids I, Bot. Mus. Leaf. Harv. Univ. 23: 149-212.

[26] Seidenfaden, G., 1987, Orchid genera in Thailand Vol. Vl, Neottioideae Lindl. Kobenhavn. Dansk. Botanisk. Arkiv. Bind. 32: 116-117.

[27] Christenson, E.A., 1987, The Taxonomy of *Aerides* and related genera, Proceedings of the 12th World Orchid Conference, Tokyo.

[28] Topik, H., Yukawa, T. and Ito, M., 2005, Molecular phylogenetics of subtribe Aeridinae (Orchidaceae): Insights from plastid *matk* and nuclear ribosomal ITS sequences, J. Plant Res. 18: 271-284.

[29] Carlsward, B.S., Whitten, W.M., Williams, N.H. and Benny, B., 2006, Molecular phylogenetics of Vandeae (Orchidaceae) and the evolution of leaflessness, Amer. J. Bot. 93: 770-786.

[30] Kocyan, A., de Vogel, E.F., Corti, E. and Gravendeel, B., 2008, Molecular phylogeny of *Aerides* (Orchidaceae) based on one nuclear and two plastid markers: A step forward in understanding the evolution of the Aeridinae, Mol. Phylogenet. Evol. 48: 422-443.

[31] Tanaka, R. and Kamemoto, H., 1961, Meiotic chromosome behavior in some intergeneric hybrids of the *Vanda alliance*, Amer. J. Bot. 48: 573-582.

[32] Shindo, K. and Kamemoto, H., 1962. Genome relationships of Neofinetia Hu and some allied genera of the Orchidaceae, Cytologia 27: 402-409.

[33] Shindo, K. and Kamemoto, H, 1963, Karyotype analysis of some Sarcanthine orchids, Amer. J. Bot. 50: 73-79.

[34] Tara, M. and Kamemoto, H., 1970. Karyotype relationships in the Sarcanthinae (Orchidaceae), Amer. J. Bot. 57: 176-182.