การจำแนกพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี

Identification and Genetic Relationship of *Rhynchostylis gigantea* and their Hybrids Using HAT-RAPD Markers

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

สุรีย์พร พุ่มเอี่ยม และธีระชัย ธนานันต์*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Narumol Thanananta

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,
Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

Sureeporn Pumeiam and Theerachai Thanananta*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Centre,
Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลช้างเป็นกล้วยไม้ไทยที่มีความสำคัญและได้รับความนิยม แต่ปัจจุบันการจำแนกพันธุ์ตามสัณฐานวิทยามีความยุ่งยากและเกิดความสับสน เนื่องจากมีการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการผสมพันธุ์และขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงนำเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมาตรวจสอบพันธุ์กล้วยไม้ช้างและลูกผสม 13 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 41 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 29 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมแต่ละพันธุ์ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับพันธุ์ นอกจากนั้นยังพบไพรเมอร์ 5 ชนิด ที่สามารถจำแนกกล้วยไม้ช้างและลูกผสมทั้ง 13 พันธุ์ ได้โดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.61 ถึง 0.84 โดยผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีใช้ระบุชนิดของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมได้ ซึ่งสามารถ

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** thana@tu.ac.th

นำไปวางแผนการผสมพันธุ์เพื่อพัฒนาพันธุ์ใหม่ ๆ ในอนาคต

คำสำคัญ : กล้วยไม้ช้าง, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม, การจำแนก, เครื่องหมายดีเอ็นเอ, แฮตอาร์เอพีดี

Abstract

Rhynchostylis is one of an important and popular orchid in Thailand. However, identification based on morphology is difficult and because of the occurrence of new varieties from breeding program and tissue culture. High annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique was used to identify 13 samples of *Rhynchostylis gigantea* and their hybrids. The total 72 random primers were screened and 41 primers could be used for DNA amplification. Twenty-nine primers which gave clear amplified products were selected and used to analyze all samples. The result showed differences among 13 samples with specific DNA bands. In addition, 5 of 29 random primers were found to identify each sample using only one primer. A dendrogram based on polymorphic bands showed genetic similarities among *R. gigantea* and their hybrids with similarity coefficients ranging from 0.61 to 0.84. Finally, these results indicated that the HAT-RAPD markers are capable of *R. gigantea* and their hybrids verification, which will be useful in the breeding program.

Key words: *Rhynchostylis gigantea*, genetic relationship, identification, DNA marker, HAT-RAPD

1. บทนำ

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ เนื่องจากดอกกล้วยไม้มีสีสันสวยงาม มีความหลากหลายของรูปร่างดอก ขนาด และรูปทรงช่อดอก รวมทั้งมีอายุปักแจกันที่ยาวนานเมื่อเปรียบเทียบกับไม้ตัดดอกทั่วไป ดังนั้นกล้วยไม้จึงเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีการขยายตลาดและเพิ่มปริมาณการส่งออกมากขึ้นทุกปี อีกทั้งยังมีมูลค่าการส่งออกสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ของมูลค่ารวมในการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับทั้งหมดของประเทศไทย โดยมีมูลค่าการส่งออกในแต่ละปีไม่ต่ำกว่า 4,000 ล้านบาท [1]

การค้ากล้วยไม้ของตลาดโลกมีทั้งไม้ตัดดอกและไม้กระถาง โดยปัจจุบันนิยมขยายพันธุ์กล้วยไม้ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นจำนวนมาก อีกทั้งมีการผสมภายในพันธุ์ ผสมข้ามพันธุ์ ผสมข้ามชนิด และผสมข้ามสกุล ทั้งนี้เพื่อให้ได้พันธุ์ที่แปลกใหม่และดึงดูดความสนใจจากผู้บริโภค

กล้วยไม้สกุลช้าง (*Rhynchostylis*) มีลักษณะลำต้นสั้นแข็งแรง ใบแข็งแรง หนาอวบน้ำ บางชนิดใบเล็กยาว ปลายใบหยักมนหรือเป็นฟันแหลม ใบมีลายเป็นเส้นขนานหลายเส้นตามแนวยาวของใบ ช่อดอกตั้งโค้งหรือห้อยย้อยลงมา ดอกจะออกกันแน่นช่อ กลีบดอกชั้นนอก (กลีบเลี้ยง) โตกว่ากลีบดอกชั้นใน ปากไม่มีข้อพับ ปากจะเชื่อมต่อกับฐานเส้าเกสร เดือยดอกชี้ไปข้างหลัง แต่ปลายปากชี้ไปข้างหน้า ไม่มีหูหรือมีขนาดเล็ก เส้าเกสรและฐานเส้าเกสรสั้น มีเรณู 2 ก้อน ปัจจุบันกล้วยไม้สกุลช้างจำแนกเป็น 4 ชนิด

ได้แก่ ไอยเรศหรือพวงมาลัย (*R. retusa*) เขาแกะ (*R. coelestis*) ช้าง (*R. gigantea*) และช้างฟิลิปปินส์ (*R. violacea*) โดยพบการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในประเทศไทยเพียง 3 ชนิด คือ ไอยเรศ เขาแกะ และช้าง ส่วนช้างฟิลิปปินส์พบในประเทศฟิลิปปินส์ [2]

กล้วยไม้ช้างเป็นกล้วยไม้กระถางที่ได้รับความนิยมและมีราคาค่อนข้างสูงมาก เพราะมีดอกและช่อดอกขนาดใหญ่ อีกทั้งดอกยังมีกลิ่นหอมแรง จากการขยายพันธุ์ด้วยการผสมข้ามร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทำให้กล้วยไม้ช้างมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ค่อนข้างสูง การจำแนกพันธุ์กล้วยไม้ช้างและลูกผสมต่าง ๆ ด้วยสัณฐานวิทยา กล่าวคือ การดูเพียงลักษณะภายนอก เช่น ดอก ใบ ราก จึงมีความยากลำบากและเกิดข้อผิดพลาดได้ง่าย ดังนั้นเทคโนโลยีเกี่ยวกับเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ซึ่งใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตสำเร็จมาแล้วหลายชนิดจะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) และการจำแนก (identification) พันธุ์กล้วยไม้ช้างและลูกผสม

การวิจัยกล้วยไม้ที่เคยรายงานมาก่อนนี้ พบว่ามีนักวิจัยประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอหลายชนิดในกล้วยไม้หลายสกุล โดยเฉพาะกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) ซึ่งมีความหลากหลายสูงทั้งในพันธุ์แท้และลูกผสม [3-5] นอกจากนั้นยังมีรายงานในกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส (*Phalaenopsis*) [6-8] สกุลแวนดา (*Vanda*) [9] รวมทั้งสกุลช้าง [10,11] อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการจำแนกพันธุ์กล้วยไม้ช้าง

ด้วยความสำคัญดังกล่าว ผู้วิจัยจึงศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature-random amplified polymerphic DNA) [12,13] โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) ซึ่งใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เพียงชนิดเดียวเพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ ประหยัดค่าใช้จ่าย และให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแต่ละพันธุ์

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กล้วยไม้ช้างและลูกผสม

กล้วยไม้ช้างพบการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติในเกือบทุกภาคของประเทศไทย ยกเว้นภาคใต้ เป็นกล้วยไม้ที่มีลำต้นขนาดใหญ่สมชื่อ ใบหนาและมีลายสีเขียวแก่สลับกับสีเขียวอ่อนเป็นทางขนานกันตามความยาวของใบ เห็นได้ชัดทั้งผิวใบด้านบนและด้านล่าง ปลายใบหยักมนเป็น 2 แฉก ช่อดอกโค้งแต่ไม่ถึงกับห้อยย้อย [14] โดยทั่วไปดอกจะมีพื้นสีขาว มีจุดกระสีม่วงแดงชัดเจน และมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงแบ่งกล้วยไม้ช้างที่พบในธรรมชาติเป็นช้างเผือก ช้างกระ และช้างแดง ซึ่งมีลักษณะทั่วไปดังนี้

2.1.1 ช้างเผือก มีกลีบดอกสีขาวบริสุทธิ์ อาจมีสีเขียวหรือสีเหลืองอ่อนที่ปาก

2.1.2 ช้างกระ กลีบดอกมีพื้นสีขาว มีจุดกระสีม่วงแดงเป็นเม็ดเล็กหรือใหญ่ก็ได้ที่กลีบดอกทุกกลีบ บางต้นอาจมีเพียง 2-3 จุด หรือมีมากมายเต็มกลีบดอกก็ได้ ปากมีสีม่วงแดง มีทั้งสีอ่อนและสีเข้ม

2.1.3 ช้างแดง กลีบดอกมีพื้นเป็นสีม่วงแดง อาจมีสีขาวหลงเหลืออยู่บ้างที่โคนกลีบดอก แต่

ถ้าไม่มีสีขาวปนอยู่เลยจะถือว่าดีมาก

โดยกล้วยไม้ช้างและลูกผสมที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ จำนวน 13 พันธุ์ แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกล้วยไม้ช้างที่พบในธรรมชาติ 3 พันธุ์ ได้แก่ ช้างกระ ช้างเผือก และช้างแดง กลุ่มที่ 2 เป็นกล้วยไม้ช้างลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกและรับรองพันธุ์ 5 พันธุ์ ได้แก่ ช้างพลาย ช้างชมพู ช้างประหลาด ช้างส้ม และช้างการ์ตูน และกลุ่มที่ 3 เป็นกล้วยไม้ช้างลูกผสมใหม่ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ลูกผสม 1 (ช้างแดง x ช้างชมพู) ลูกผสม 2 (ช้างแดง x ช้างพลาย) ลูกผสม 3 (ช้างพลาย x ช้างการ์ตูน) ลูกผสม 4 (ช้างเผือก x ช้างประหลาด) และลูกผสม 5 (ช้างการ์ตูน x ช้างพลาย)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ช้างและลูกผสมด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle [15] โดยบดใบกล้วยไม้ช้างและลูกผสมในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด แล้วนำผงใบ 6 กรัม บ่มใน extraction buffer [4x CTAB; 4 % cethyltrimethyl 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 metabisufite] 20 มิลลิลิตร ซึ่งมี 2-mercaptoethanol 20 ไมโครลิตร และ polyvinyl-pyrrolidone (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 นาที หลังจากนั้นจึงแยกสารละลายใสส่วนบนมาเติม linear polyacrylamide 140 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วย washing buffer (10 mM sodium acetate pH 5.2 และ 70 % ethanol) ปล่อยให้แห้งและละลายตะกอนใน RNase buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 15 mM NaCl) 500 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RNase A (10 mg/ml) 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาสกัดด้วยฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25:24:1) 1 ครั้ง และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) อีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นจึงย้ายสารละลายใสส่วนบนมาเติม linear polyacrylamide 70 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) ให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร และไอโซโพรพานอลให้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย 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) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ [16]

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

2.3.1 การตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิ

เมอเรส โดยรวมดีเอ็นเอกล้วยไม้ช้างและลูกผสมทั้ง 13 พันธุ์ (ในปริมาณที่เท่า ๆ กัน) เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม จำนวน 72 ชนิด คือไพรเมอร์ชุด A2, B2, C2, D2, E2 และ F2 จากบริษัท Wako Company (Japan) ซึ่งมีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม (ng) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 2.5 mM $MgCl_2$) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์แบบสุ่ม 250 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, Vivantis Technologies Sdn Bhd, Malaysia) 1 ยูนิต [17,18]

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมี 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 แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ [18]

2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมทั้ง 13 พันธุ์ โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอกล้วยไม้ช้างและลูกผสมแต่ละพันธุ์ โดยได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยไม้ช้างและลูกผสมทั้ง 13 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) [19]

3. ผลและวิจารณ์

3.1 ไพรเมอร์แบบสุ่มที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

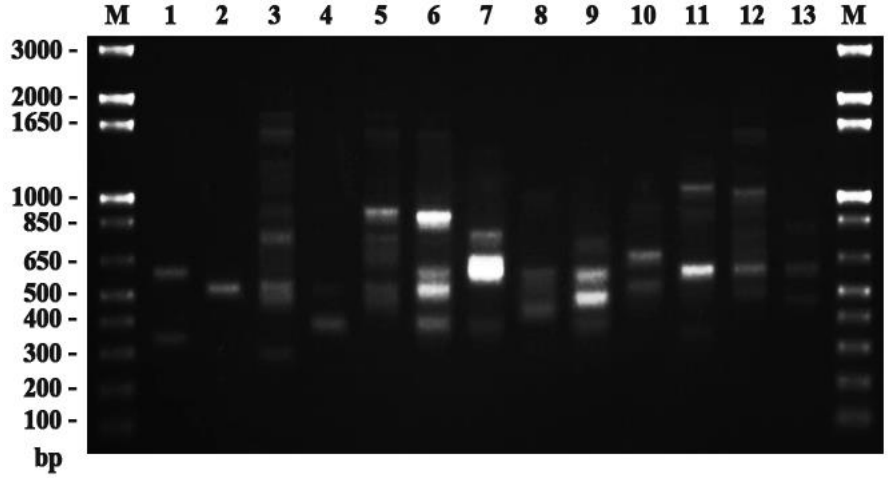
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมทั้ง 13 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 41 ชนิด (หรือคิดเป็น 56.44 เปอร์เซ็นต์) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

3.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ช้างและลูกผสม

เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์แบบสุ่ม 29 ชนิด ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยไม้ช้างและลูกผสมแต่ละพันธุ์ จำนวน 13 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 250 แถบ ขนาดประมาณ 300-3,000 คู่เบส (base pairs, bp) ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกพันธุ์ (monomorphic band) 41 แถบ (หรือคิดเป็น 16.40 เปอร์เซ็นต์) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบต่างกันในแต่ละพันธุ์ (polymorphic band) 209 แถบ (หรือคิดเป็น 83.60 เปอร์เซ็นต์)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีนั้นมีรูปแบบจำเพาะต่อกล้วยไม้ช้างและลูกผสมแต่ละพันธุ์ (รูปที่ 1) และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจัดจำแนก

พันธุ์กล้วยไม้ช้างและลูกผสมได้ นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ซึ่งให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมแต่ละพันธุ์ออกจากกันได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ A31 (5′-AAG-GCG-CGA-ACG-3′), E23 (5′-AGG-TAC-GCC-GCA-3′), E24 (5′-CCG-GAG-TGG-ATG-3′) , F25 (5′-CCA-GAT-CCG-AAT-3′) และ F27 (5′-CAG-GTG-GGA-GTA -3′)



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ F25 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-13 คือ ช้างกระ ช้างการ์ตูน ช้างส้ม ลูกผสม 1 (ช้างแดง x ช้างชมพู) ช้างชมพู ลูกผสม 2 (ช้างแดง x ช้างพลาย) ช้างเผือก ลูกผสม 3 (ช้างพลาย x ช้างการ์ตูน) ช้างประหลาด ช้างแดง ลูกผสม 4 (ช้างเผือก x ช้างประหลาด) ช้างพลาย และลูกผสม 5 (ช้างการ์ตูน x ช้างพลาย) ตามลำดับ]

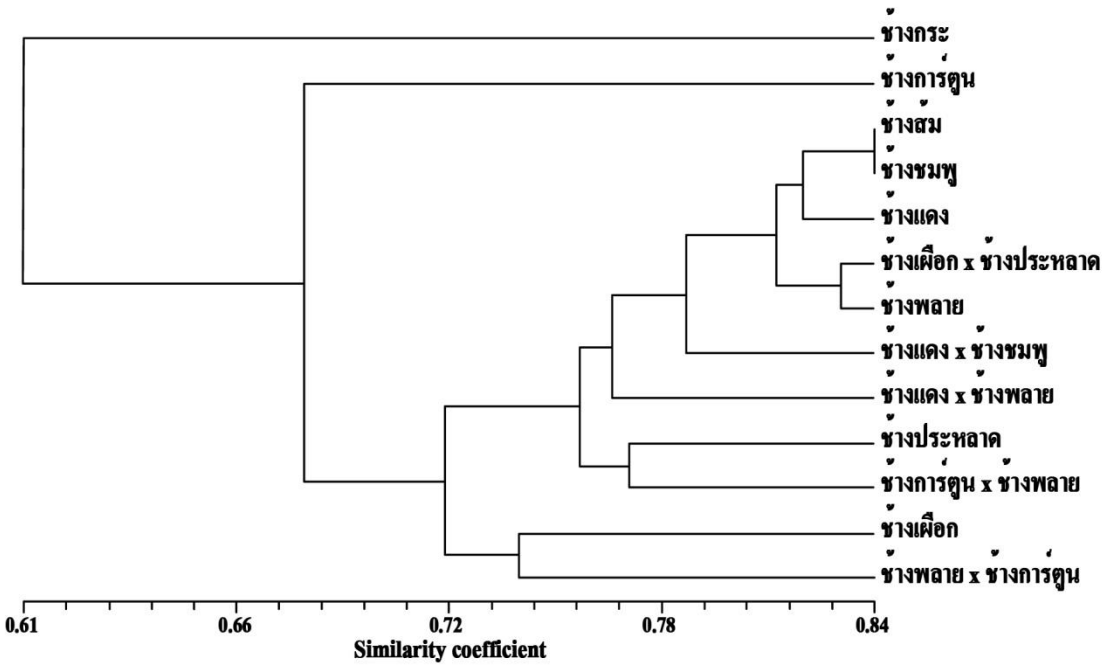
3.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่ากล้วยไม้ช้างและลูกผสมที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ทั้ง 13 พันธุ์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.61 ถึง 0.84 เฉลี่ย 0.73

เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.71 พบว่าแบ่งกล้วยไม้ช้างและลูกผสมเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ ช้างกระ กลุ่ม 2 ได้แก่ ช้างการ์ตูน และกลุ่ม 3 ได้แก่ ช้างส้ม ช้างชมพู ช้างแดง ลูกผสม 4 (ช้างเผือก x ช้างประหลาด) ช้างพลาย ลูกผสม 1 (ช้างแดง x ช้างชมพู) ลูกผสม 2 (ช้างแดง x ช้างพลาย) ช้างประหลาด ลูกผสม 5 (ช้างการ์ตูน x ช้างพลาย) ช้างเผือก และลูกผสม 3 (ช้างพลาย x ช้างการ์ตูน) (รูปที่ 2)

เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.73 พบว่าแบ่งกล้วยไม้ช้างและลูกผสมเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ ช้างกระ กลุ่ม 2 ได้แก่ ช้างการ์ตูน กลุ่ม 3 ได้แก่ ช้างส้ม ช้างชมพู ช้างแดง ลูกผสม 4 (ช้างเผือก x ช้างประหลาด) ช้างพลาย ลูกผสม 1 (ช้าง

แดง x ช้างชมพู) ลูกผสม 2 (ช้างแดง x ช้างพลาย) ช้างประหลาด และลูกผสม 5 (ช้างการ์ตูน x ช้างพลาย) และกลุ่ม 4 ได้แก่ ช้างเผือก และลูกผสม 3 (ช้างพลาย x ช้างการ์ตูน) (รูปที่ 3)



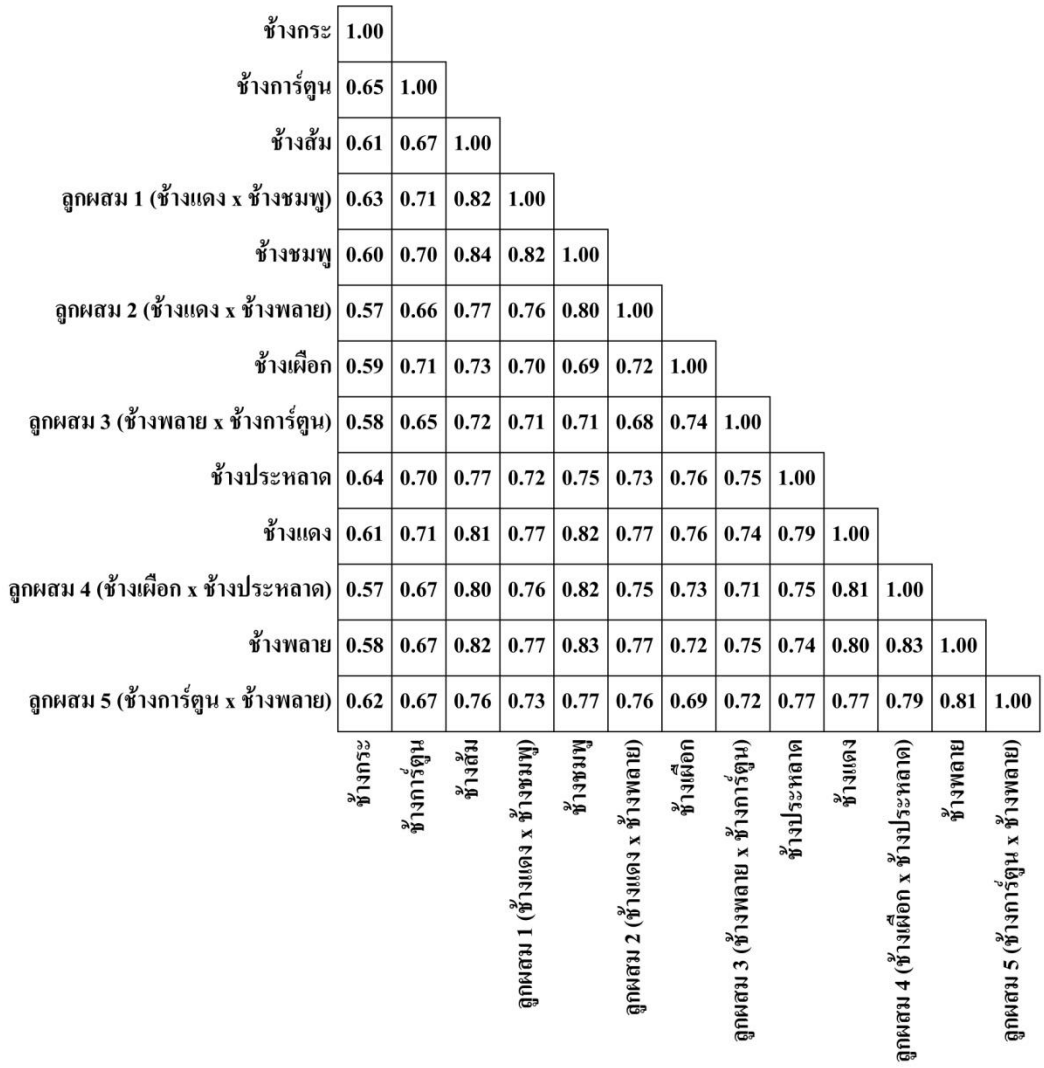
รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมทั้ง 13 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

3.4 อภิปรายผล

กล้วยไม้ช้างและลูกผสมที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นกล้วยไม้ช้างที่พบในธรรมชาติ 3 พันธุ์ คือ ช้างกระ ช้างเผือก และช้างแดง เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมทั้ง 13 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 29 ชนิด (รูปที่ 2) พบว่ากล้วยไม้ช้างพันธุ์ช้างกระต่างจากกล้วยไม้ช้างพันธุ์อื่นและลูกผสมมากที่สุด โดยแยกออกมาจากอีก 3 กลุ่ม และมีแนวโน้มว่าเป็นบรรพบุรุษ (ancestor) ของกล้วยไม้ช้างทั้งหมด สอดคล้องกับประวัติความเป็นมาและบันทึกของศาสตราจารย์ระพี สาคริก ซึ่งกล่าวว่าอันที่จริงแล้วช้างแดงก็คือช้างกระนั่นเอง กล่าวคือ จุดสีม่วงแดงถ้ามีจำนวนมากและขนาดใหญ่จะเชื่อมติดกันจนไม่เห็นสีขาวเลย เช่นเดียวกันกับช้างเผือกที่ไม่มีจุดสีม่วงแดงเลยจึงเห็นแต่พื้นสีขาวเท่านั้น ดังนั้นในธรรมชาติช้างแดงและช้างเผือกจึงหายากมาก แต่พบช้างกระกระจายพันธุ์อยู่มากที่สุด และในกลุ่มของช้างกระด้วยกันก็จะมีลักษณะที่เรียกว่าประหลาด คือ ถ้ามีจุดกระเล็กน้อยเกือบเป็นช้างเผือกหรือมีจุดกระมากมายเป็นปื้นโต ๆ เกือบเป็นช้างแดง บางคนก็เรียกช้างเผือกกระหรือช้างแดงกระ แล้วแต่ว่าจะคล้ายช้างเผือกหรือช้างแดงมากกว่า [14]

กล้วยไม้ช้างลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกและรับรองพันธุ์ 5 พันธุ์ ได้แก่ ช้างพลาย ช้างชมพู ช้างประหลาด ช้างส้ม และช้างการ์ตูน เกิดจากผู้

เพาะเลี้ยงกล้วยไม้และนักปรับปรุงพันธุ์ได้ผสมพันธุ์ข้ามด้วยวิธีถ่ายละอองเกสรและเพาะเมล็ดกล้วยไม้จากฝักด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยช้างพลายได้จากการคู่ผสมระหว่างช้างแดงกับช้างเผือก ช้างประหลาดได้จากการคู่ผสมระหว่างช้างแดงกับช้างกระ ช้างชมพูได้จากการคู่ผสมระหว่างช้างแดงกับช้างแดง และช้างการ์ตูนได้จากการคู่ผสมระหว่างช้างเผือกกับช้างแดง [14] โดยแต่ละคู่ผสมจะให้ลูกผสมที่มีความหลากหลาย แต่สามารถคัดเลือกลูกผสมที่เด่นมาผสมตัวเอง แล้วคัดเลือกจนได้ลักษณะที่คงที่ เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ช้างและลูกผสม (รูปที่ 2) พบว่ากล้วยไม้ช้างลูกผสมที่ผ่านการคัดเลือกและรับรองพันธุ์ดังกล่าวมีการกระจายอยู่ในทั้ง 3 กลุ่ม อย่างไรก็ตาม พบว่าช้างส้มและช้างชมพูมีความใกล้ชิดกันมาก และใกล้ชิดกับและช้างแดง เนื่องจากทั้งช้างส้มและช้างชมพูเป็นลูกผสมที่เกิดจากช้างแดงเป็นแม่



รูปที่ 3 ค่าดัชนีความเหมือนของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมทั้ง 13 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

กล้วยไม้ช้างลูกผสมใหม่ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ลูกผสม 1 (ช้างแดง x ช้างชมพู) ลูกผสม 2 (ช้างแดง x ช้างพลาย) ลูกผสม 3 (ช้างพลาย x ช้างการ์ตูน) ลูกผสม 4 (ช้างเผือก x ช้างประหลาด) และลูกผสม 5 (ช้างการ์ตูน x ช้างพลาย) นั้น เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ช้างและลูกผสม (รูปที่ 2) ที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.71 พบว่ากล้วยไม้ช้างลูกผสมใหม่นี้มีการกระจายอยู่ในกลุ่ม 3 เท่านั้น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนภายในกลุ่มอยู่ระหว่าง 0.68 ถึง 0.84 เฉลี่ย 0.78 (รูปที่ 2)

เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีได้ปรับอุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ (annealing) ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้สูงขึ้น โดยทั่วไปเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) จะใช้อุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ประมาณ 35-42 องศาเซลเซียส แต่เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีได้ปรับอุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์เป็น 46-62 องศาเซลเซียส [3,4] ซึ่งจะช่วยให้ไพรเมอร์แบบสุ่มเข้าจับที่ตำแหน่งจำเพาะมากยิ่งขึ้น ลดการกระจายตัวในการเกาะให้น้อยลง และทำให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพิ่มมากขึ้น โดยจะเห็นจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมีแถบดีเอ็นเอชัดเจนมากกว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี

การวิจัยนี้แสดงถึงศักยภาพของเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีในการจำแนกพันธุ์กล้วยไม้ช้างและลูกผสมได้เช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น เช่น ลำไย [20] พืชสกุล *Ficus* [21] กล้วยไม้ช้างและลูกผสม [18]

4. สรุป

การตรวจสอบกล้วยไม้ช้างและลูกผสมจำนวน 13 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 29 ชนิด พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับพันธุ์ และตรวจพบไพรเมอร์ 5 ชนิด ที่สามารถจำแนกกล้วยไม้ช้างและลูกผสมทั้ง 13 พันธุ์ ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.61 ถึง 0.84 และแผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมทั้ง 13 พันธุ์ ซึ่งได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.73 สามารถแยกกล้วยไม้ช้างและลูกผสมเป็น 4 กลุ่ม โดยแยกกล้วยไม้ช้างพันธุ์ช้างกระซึ่งเป็นบรรพบุรุษของกล้วยไม้ช้างไว้เป็นอีกกลุ่มหนึ่งต่างหาก

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี 2554

6. เอกสารอ้างอิง

[1] กระทรวงพาณิชย์, ข้อมูลเศรษฐกิจการค้า : สถิติการค้าระหว่างประเทศของไทย, แหล่งที่มา : http://www.moc.go.th, 2 เมษายน 2556.

[2] ๑๐๘ พรรณไม้ไทย, กล้วยไม้สกุลช้าง *Rhynchostylis*, แหล่งที่มา : http://www.panmai.com, 8 พฤษภาคม 2554.

[3] Xiang, N., Hong, Y. and Lam-Chan, L.T., 2003, Genetic analysis of tropical orchid hybrids (*Dendrobium*) with fluorescence amplified fragment length polymorphism (AFLP), J. Amr. Soc. Hort. Sci. 128: 731-735.

[4] Boonsrangsom, T., Pongtongkam, P., Masuthon, S. and Peyachoknagul, S., 2008, Development of microsatellite markers for

Dendrobium orchids, Thai J. Genet. 1: 47-56.

[5] Pathak, H. and Jaroli, D.P., 2012, DNA fingerprinting analysis of eight species of *Dendrobium* found in Western Ghats using RAPD and ISSR markers, Ind. J. Fundament. Appl. Life Sci. 2: 306-311.

[6] Chang, S.B., Chen, W.H., Chen, H.H., Fu, Y.M. and Lin, Y.S., 2000, RFLP and inheritance patterns of chloroplast DNA in intergeneric hybrids of *Phalaenopsis* and *Doritis*, Bot. Bull. Acad. Sin. 41: 219-223.

[7] Goh, M.W.K., Kumar, P.P., Lim, S.H. and Tan, H.T.W., 2005. Random amplified polymorphic DNA analysis of the moth orchids, *Phalaenopsis* (Epidendroideae: Orchidaceae), Euphytica 141: 11-22.

[8] ปรัชญา เตวิยะ, วีณัน บัณฑิตย์ และณัฐา โพธาภรณ์, 2553, เครื่องหมายจำเพาะสำหรับลายสีดอกเอื้องเขากวางอ่อนโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี, ว.วิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 27: 1-8.

[9] Phuekvilai, P., Pongtongkam, P. and Peyachoknagul, S., 2009, Development of microsatellite markers for *Vanda* orchid, Kasetsart J. (Nat. Sci.) 43: 497-506.

[10] Parab, G.V. and Krishnan, S., 2008. Assessment of genetic variation among populations of *Rhynchostylis retusa*, an epiphytic orchid from Goa, India using ISSR and RAPD markers, Ind. J. Biotechnol. 7: 313-319.

[11] ธนากร วงษศา, อภินันท์ ลิ้มมงคล และอนุพันธ์ กงบังเกิด, 2551, การเปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้าง, NU Sci. J. 5: 165-175.

[12] Anuntalabhochai, S., Chandet, R., Chiangda, J. and Apavatjrut, P., 2000, Genetic diversity within Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis, Acta Hort. 575: 253-259.

[13] Wangspa, R., Cutler, W.C., Sitthipom, S., Chundet, R., Dumampai, N. and Anuntalabhochai, S., 2005, High annealing temperature random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) fingerprint database of tropical plants, SciAsia 31: 145-149.

[14] Ben orchid, Orchid species: สกุลช้าง (Rhynchostylis), แหล่งที่มา : http://webcache.googleusercontent.com/search? q=cache:tRzOpWKPWIwJ:orchid1234.comyr.com, 7 มีนาคม 2555.

[15] 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.

[16] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

[17] นฤมล ธนานันต์, เมธินี เจริญไชย และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Tech. 1: 127-133.

[18] นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกกล้วยไม้ช้างและลูกผสมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ

พันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-179.

[19] Rohlf, F.J., 2002, NTSYpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Inc., New York.

[20] เจนจิรา มาหา, 2545, การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของลำไย (*Dimocarpus iongan* Lour.) ในเขตภาคเหนือตอนบนของประเทศไทยโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

[21] วิศัย พรหมเทพ และสมบรูณ์ อนันตลาโภชัย, 2548, การวิเคราะห์พันธุกรรมพืชสกุล *Ficus* spp. โดยเทคนิค HAT-Random Amplified Polymorphic DNA, ว.ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร 2(1): 39-50.