ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม ด้วยแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์

Genetic Relationship among *Vanda* Section Ascocentrum Based on HAT-RAPD and ISSR

จินต์ ทองสม และธีระชัย ธนานันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Jin Tongsom 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

กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มมีดอกขนาดเล็ก พบกระจายในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งปัจจุบันนิยมนำมาปรับปรุงพันธุ์เป็นกล้วยไม้ลูกผสม ทำให้การจำแนกชนิดและพันธุ์ตามลักษณะสัณฐานมีความยุ่งยากและเกิดความสับสน ดังนั้นจึงใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์เพื่อประเมินความสัมพันธ์ของพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม จำนวน 10 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 21 ชนิด สำหรับแฮตอาร์เอพีดี และใช้ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ 7 ชนิด สำหรับไอเอสเอสอาร์ พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างกันทั้งหมด 372 แถบ และ 99 แถบ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นในแต่ละพันธุ์พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงอยู่ระหว่าง 0.30 ถึง 0.70 และ 0.26 ถึง 0.71 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Mental test พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์กันเท่ากับ 0.76 แสดงว่าเทคนิคเครื่องหมายทั้งสองสามารถนำมาวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกันได้ โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงอยู่ระหว่าง 0.29 ถึง 0.70 และมีค่า PIC เฉลี่ย 0.26 เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA พบว่าแผนภูมิที่ได้ทั้ง 3 แผนภูมิ นั้นจำแนกกลุ่มได้เหมือนกัน ดังนั้นจึงสรุปว่า

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** narumolpla@yahoo.com

เทคนิคเครื่องหมายทั้งสองมีประสิทธิภาพในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มได้

คำสำคัญ : สกุลแวนด้า; กล้วยไม้เข็ม; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; แฮตอาร์เอพีดี; ไอเอสเอสอาร์

Abstract

Vanda section Ascocentrum is orchid that has tiny petal. It almost distributes on Southeast Asia and usually cross breeds for new hybrids with other *Vanda* in recently. Result in *Vanda* section Ascocentrum identification base on morphology have been confusion and unclearly. Therefore HAT-RAPD and ISSR techniques were used to assessment of genetic relationships among 10 species of *Vanda* section Ascocentrum. There were used 21 random primers for HAT-RAPD and 7 microsatellite primers for ISSR were selected. The total 372 and 99 bands were detected respectively. The both DNA marker techniques were produced different DNA fingerprinting that was analyzed similarity coefficient. There were 0.30-0.70 and 0.26-0.72 respectively and analyzed correlation coefficient with the Mental test is 0.76. It was indicated that the data from both DNA marker techniques can be analyze together, similarity coefficient was 0.29-0.70 and PIC average 0.26. The dendrogram were constructed based on UPGMA method showed similar among 3 dendrograms of *Vanda* section Ascocentrum. Consequently, both DNA marker techniques were effectively to assessment of genetic relationships and identify species of *Vanda* section Ascocentrum.

Keywords: *Vanda;* Ascocentrum; genetic relationship; HAT-RAPD; ISSR

1. บทนำ

กล้วยไม้เป็นพืชดอกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีประมาณ 7-10 % ของพืชดอกทั้งหมด [1,2] โดยกล้วยไม้ในสกุลแวนด้า (*Vanda*) เป็นที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์ด้วยการผสมข้ามเพื่อความสวยงาม ซึ่งประเทศไทยนิยมเพาะเลี้ยงและส่งขายทั้งในและต่างประเทศ เนื่องจากกล้วยไม้ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีความหลากหลายของชนิดและเป็นแหล่งกล้วยไม้เขตร้อนสำคัญของโลก [3] ดังนั้นจึงมีการศึกษาความหลากหลายและนำมาพัฒนาพันธุ์เพื่อให้ได้กล้วยไม้สวยงามใหม่ ๆ เพิ่มขึ้น [4]

กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม (Ascocentrum) เป็นกล้วยไม้มีขนาดเล็กทั้งต้น ช่อดอก และขนาดดอก รวมทั้งมีดอกที่สีสันสดใสสะดุดตามากกว่ากล้วยไม้พันธุ์อื่น ๆ จึงทำให้ดูงดงามและเล็กกะทัดรัด โดยธรรมชาติกล้วยไม้สกุลนี้กระจายพันธุ์อยู่ในทวีปเอเชีย ตั้งแต่อินเดีย ศรีลังกา พม่า ไทย ลงไปถึงอินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ ซึ่งในวงการกล้วยไม้ทราบกันดีว่ากล้วยไม้สกุลนี้พบตามธรรมชาติเพียง 5-6 ชนิด เท่านั้น โดยพบในภาคพื้นเอเชียตะวันออกเฉียงใต้โดยเฉพาะในป่าของประเทศไทย ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งกำเนิดของชนิดที่

สวยงาม ในประเทศไทยพบ 4 พันธุ์ คือ เข็มแสด เข็มแดง เข็มม่วง เข็มชมพู และที่พบในภูมิภาคเดียวกันอีก 2 พันธุ์ คือ เข็มเวียดนาม และเข็มยูนนาน [5] ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะสัณฐาน (morphology) ที่คล้ายคลึงกันของกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้งพันธุ์แท้และลูกผสม [6] ส่งผลให้การจัดจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้าแต่ละชนิดได้ไม่ชัดเจน [7] ยากต่อการแยกพันธุ์กล้วยไม้ ดังนั้นจึงเลือกใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อใช้จัดจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) สามารถใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม การจัดจำแนก การศึกษาวิวัฒนาการและสภาพแวดล้อมของสิ่งมีชีวิต โดยพิจารณาจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ที่คล้ายคลึงกันและแตกต่างกันของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด [8] โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงลักษณะการข่มร่วม (co-dominance marker) และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงลักษณะการข่มสมบูรณ์ (dominance marker) [9] โดยใช้การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิดนิยมใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) เนื่องจากง่าย เร็ว ราคาถูก และให้ข้อมูลมาก [10] ซึ่งมีรายงานการวิจัยว่าใช้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ดอกออกมาอย่างต่อเนื่อง เช่น การวิเคราะห์กล้วยไม้สกุลแวนด้า สกุลกะเรกะร่อน สกุลรองเท้านารี ส่วนเทคนิคไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter-simple sequence repeat) ก็นิยมนำมาใช้ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิดเช่นกัน ได้แก่ ละหุ่ง และกล้วยไม้สกุลวานิลา ซึ่งอาจวิเคราะห์ร่วมกับร่วมกับเทคนิคอาร์เอพีดี [2,11-14] แต่อย่างไรก็ตาม ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีมักให้ผลการตรวจสอบซ้ำไม่เหมือนเดิม ดังนั้นเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA) จึงได้พัฒนาขึ้นเพื่อลดข้อด้อยของเทคนิคอาร์เอพีดี กล่าวคือ เมื่อตรวจสอบซ้ำแล้วจะได้ผลเหมือนเดิม โดยเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอนการเข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ของไพรเมอร์ (primer) ซึ่งมีรายงานว่าสามารถใช้ในการประเมินความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบและสกุลหวายกลุ่มเอื้องสายได้อย่างมีประสิทธิภาพ [15,16]

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม

กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มพบในประเทศไทย 4 พันธุ์ ได้แก่ เข็มแสด [*Vanda garayi* (chictenson) L.M. Gardiner] เข็มแดง [*V. curvifolia* (Lindl.) L.M. Gardiner] เข็มแสดดอกเหลือง (*V. garayi* var. yellow) เข็มม่วง [*V. ampullacea* (Roxb.) L.M. Gardiner] และกล้วยไม้สกุลเข็มหายากอีก 2 พันธุ์ ได้แก่ เข็มเวียดนาม [*V. christensoniana* (Haager) L.M. Gardiner] และเข็มยูนนาน (*V. nana* L.M. Gardiner) นอกจากนี้ยังมีกล้วยไม้สกุลเข็มม่วงที่เกิดการเปลี่ยน แปลงของสีกลีบดอก 3 พันธุ์ ได้แก่ เข็มม่วงเผือก (*V. ampullacea* var. album) เข็มม่วงดอกส้ม (*V. ampullacea* var. aurantiacum) เข็มม่วงดอกแดง (*V. ampullacea* var. moulmeinense) และเข็มเวียดนามดอกส้ม (*V. christensoniana* var. orange) ที่นำมาใช้ศึกษาในครั้งนี้

2.2 การสกัดแยกดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้

สกัดแยกดีเอ็นเอจากกล้วยไม้สกุลเข็มด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle [17] โดยชั่งชิ้นส่วนใบกล้วยไม้ 3-4 กรัม แล้วนำมาบดในโกร่งให้ละเอียดเป็นผงโดยใช้ไนโตรเจนเหลว เติม EB buffer

(extraction buffer ที่ประกอบด้วย 4 % CTAB, 2.5 M NaCl, 0.6 % SDS, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 0.1 % sodium metabisulfite) เติม polyvinylpyrrolidone (PVP) 0.3 กรัม และเบตาเมอแคปโทเอทานอล (β-mercaptoethonol) 20 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอด เซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม chloro-form : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 *xg* เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม linear polyacrylamide และ isopropanol ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 *xg* เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 1 mM EDTA pH 8.0) จากนั้นเติม RNase A (10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วถ่ายลงสู่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 *xg* เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 *xg* เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วน บนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม linear polyacrylamide ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลาย 3 M sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 *xg* นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนด้วย TE buffer แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาแยกขนาดด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโทมิเตอร์ (spectrophotometer)

2.3 การทำแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์

นำสารละลายดีเอ็นเอปริมาณ 100 นาโนกรัม (ng) มาใช้เป็นแม่แบบ ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ (5 μM) และบัฟเฟอร์ (10X) $MgCl_2$ (50 mM) dNTP (2 mM) *Tag* DNA polymerase (5 U/μl) (RBCBioscience, Taiwan) กำหนดสภาวะที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5

เปอร์เซ็นต์เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละตัวอย่างทำซ้ำอย่างน้อย 3 รอบ ทั้งนี้เพื่อยืนยันความน่าเชื่อถือของผลการวิจัย [18]

คัดเลือกไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primers) 72 ชนิด ของบริษัท Wako company (Japan) [19] และไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite primer) 35 ชนิด [15] เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์ โดยตรวจหาไพรเมอร์ที่ตอบสนองต่อปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แล้วนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์เพื่อใช้ในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มทั้ง 10 พันธุ์ โดยตรวจสอบความหลากรูป (polymorphism) ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้และคัดเลือกลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

2.4 การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยแปลงข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยวิธีของ Dice หรือ Nei และ Li แล้วจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) จากนั้นวิเคราะห์ค่าเมทริกซ์ (matrix) ระยะห่างทางพันธุกรรม ซึ่งผลจากการลดขนาดเมทริกซ์ของคู่ตัวอย่าง (taxon) ที่มีค่าระยะห่างใกล้กันมากที่สุดจะสามารถสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม NTSYS version 2.0 [20] หลังจากนั้นจึงวิเคราะห์ความเข้ากันได้ของแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์ด้วยวิธี Mental test ในการวิเคราะห์ผล แล้วตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยคำนวณค่า polymorphic information content (PIC) ด้วยโปรแกรม Power Marker version 3.25 [21]

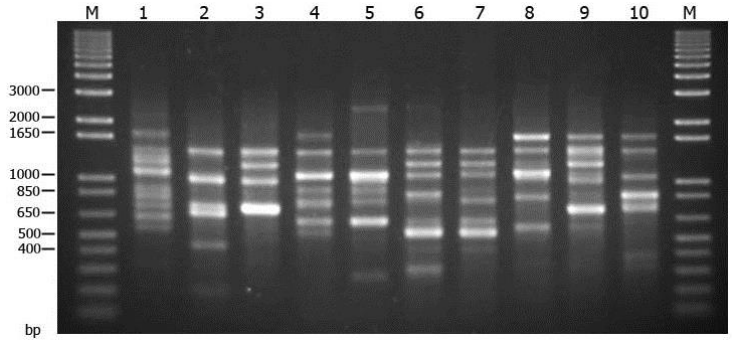
3. ผลการวิจัย

3.1 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

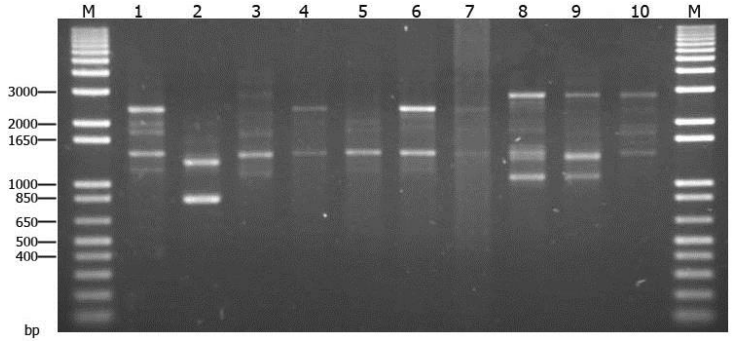
ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 72 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม 42 ชนิด (คิดเป็น 70 %) แล้วคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนและให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ พบว่ามีไพรเมอร์ 21 ชนิด ที่เหมาะสมต่อการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มทั้ง 10 พันธุ์ (ตัวอย่างแสดงดังรูปที่ 1) โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มีแถบดีเอ็นเอรวม 372 แถบ มีขนาดระหว่าง 250 ถึง 3,000 คู่เบส และพบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความหลากรูป (polymorphic band) 367 แถบ มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันอยู่ระหว่าง 0.26 ถึง 0.71 ค่า PIC เฉลี่ย 0.26 เมื่อพิจารณาที่ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันที่ 0.35 สามารถแบ่งกลุ่มของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเฉพาะที่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มทั้ง 10 ชนิด

3.2 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

ไพรเมอร์ไมโครแซทเทิลไลท์จำนวน 35 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม 16 ชนิด (คิดเป็น 45.7 %) แล้วคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนและให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ พบว่ามีไพรเมอร์ 7 ชนิด ที่เหมาะสมต่อการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มทั้ง 10 พันธุ์ (ตัวอย่างแสดงดังรูปที่ 2) โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้มีแถบดีเอ็นรวม 99 แถบ มีขนาดระหว่าง 250 ถึง 3,000 คู่เบส และพบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความหลากรูป 98 แถบ มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันอยู่ระหว่าง 0.16 ถึง 0.69 ค่า PIC เฉลี่ย 0.26 เมื่อ



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ B31 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Lift Technology, USA) และ 1-10 คือ กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม 10 ชนิด ได้แก่ (1) เข็มแดง (2) เข็มแสดดอกเหลือง (3) เข็มแสด (4) เข็มม่วง (5) เข็มม่วงเผือก (6) เข็มม่วงดอกแดง (7) เข็มม่วงดอกส้ม (8) เวียดนาม (9) เข็มเวียดนามดอกส้ม และ (10) เข็มยูนนาน]



รูปที่ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ M34 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Lift Technology, USA) และ 1-10 คือ กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม 10 ชนิด ได้แก่ (1) เข็มแดง (2) เข็มแสดดอกเหลือง (3) เข็มแสด (4) เข็มม่วง (5) เข็มม่วงเผือก (6) เข็มม่วงดอกแดง (7) เข็มม่วงดอกส้ม (8) เวียดนาม (9) เข็มเวียดนามดอกส้ม และ (10) เข็มยูนนาน]

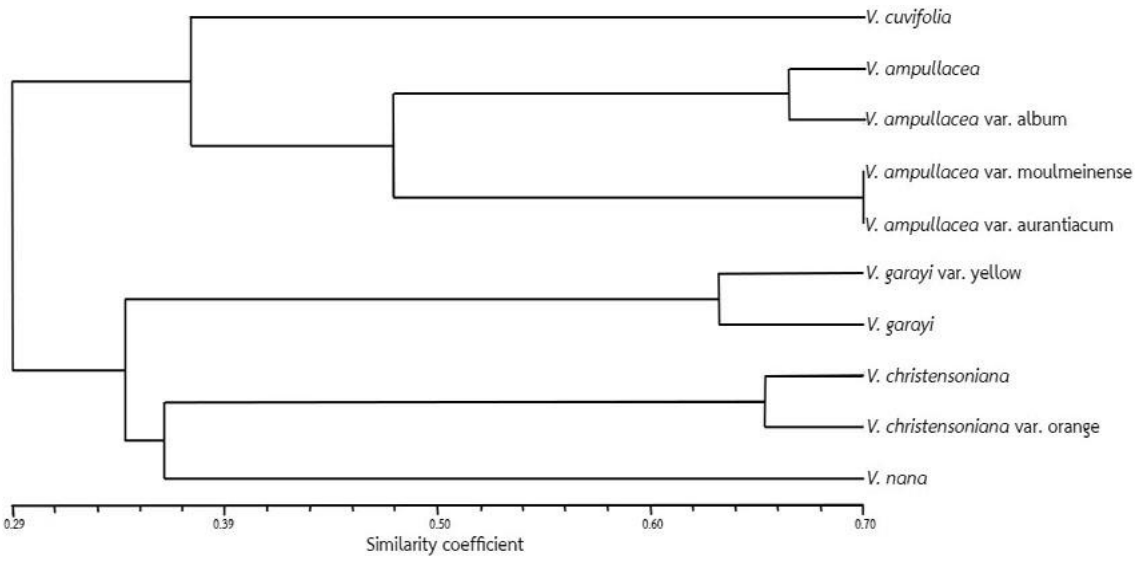
พิจารณาที่ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันที่ 0.37 สามารถแบ่งกลุ่มของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มเป็น 4 กลุ่ม

3.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีร่วมกับเทคนิคไอเอสเอสอาร์

ผลจากการคำนวณความสอดคล้องกัน (concordance) ของผลการประเมินความสัมพันธ์ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและเทคนิคไอเอสเอสอาร์ด้วยวิธี Mental test พบว่ามีค่า r = 0.76 ซึ่งแสดงว่าผลจากเทคนิคทั้งสองมีความสอดคล้องกันในระดับปานกลาง และแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากลายพิมพ์

ดีเอ็นเอของเทคนิคทั้งสองให้ผลสอดคล้องกัน ดังนั้นจึงสามารถประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มด้วยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีร่วมกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์ได้

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีร่วมกับเทคนิคไอเอสเอสอาร์ โดยสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันอยู่ระหว่าง 0.23 ถึง 0.69 มีค่า PIC เฉลี่ย 0.26 เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันที่ 0.37 สามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มออกได้เป็น 4 กลุ่ม (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มซึ่งสร้างจากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีร่วมกับเทคนิคไอเอสเอสอาร์

4. วิจารณ์

แฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์เป็นเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพต่อการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม เนื่องจากพบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้ในการจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มได้ อีกทั้งยังสามารถนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคทั้งสองมาวิเคราะห์ร่วมกัน ทั้งนี้เพื่อปรับปรุงแผนภูมิความสัมพันธ์ให้มีความแม่นยำมากขึ้น

เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ที่สร้างจากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เทคนิคไอเอสเอสอาร์ และเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีร่วมกับเทคนิคไอเอสเอสอาร์ พบว่าทั้ง 3 แผนภูมิ สามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มออกเป็นกลุ่มได้รูปแบบเดียวกันสอดคล้องกันทั้งหมด

เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันที่ 0.37 พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทั้ง 3 แผนภูมิสามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มออกได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับแหล่งที่พบกล้วยไม้แต่ละชนิดและสอดคล้องลักษณะที่แสดงออก อาทิ ในกลุ่มที่ 1 เข็มแดงและเข็มม่วงจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานและการกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้

สกุลแวนด้าหมู่เข็มทั้งสองชนิดนี้ โดยพบในบริเวณใกล้เคียงกัน ซึ่งเข็มม่วงมักเจริญเติบโตและกระจายในบริเวณที่สูงกว่าเข็มแดง [5] นอกจากนี้ยังพบว่าการกลาย (mutation) และการคัดเลือก (selection) ตามธรรมชาตินั้นมีผลต่อการวิวัฒนาการและการกลายพันธุ์ของเข็มม่วง โดยหากเกิดการกลายในยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสีดอก ก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงสีดอกของเข็มม่วงจากสีม่วงเป็นสีขาว ทำให้ได้เข็มม่วงเผือก ซึ่งเป็นการกลายที่มีอิทธิพลทำให้เกิดความบกพร่องต่อลักษณะที่แสดงออก หรือการผสมข้ามอาจส่งผลต่อยีนในวิถีการสร้างแอนโทไซยานิน (anthocyanin) [22] ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีดอกของเข็มม่วงจากสีม่วงเป็นสีแดงหรือสีส้ม ทำให้ได้เข็มม่วงดอกแดงและเข็มม่วงดอกส้ม ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด เนื่องจากมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันมากที่สุด (0.70) อย่างไรก็ตาม อาจเป็นไปได้ว่าเกิดการกลายและวิวัฒนาการร่วมกัน

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยเข็มแสดและเข็มแสดดอกเหลือง ซึ่งมีความใกล้ชิดกันเนื่องจากเข็มแสดดอกเหลืองเป็นพันธุ์กลายมาจากเข็มแสด โดยผลการวิจัยนี้สามารถจำแนกพันธุ์แท้กับพันธุ์กลายของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มได้ เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าเข็มแสดดอกเหลืองใกล้ชิดกับเข็มแสด ซึ่งสอดคล้องกลับลักษณะสีดอกที่แสดงออกมา ดังนั้นแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์จึงมีประสิทธิภาพต่อการจำแนกพันธุ์กลายและพันธุ์แท้ได้ รวมทั้งยังสอดคล้องกับการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐาน

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ เข็มเวียดนามกับเข็มเวียดนามดอกส้มอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เนื่องจากเข็มเวียดนามดอกส้มเกิดจากการกลายด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและส่งผลให้สีดอกเปลี่ยนแปลงสีดอกจากสีชมพูเป็นสีส้ม ซึ่งแตกต่างจากสีเดิม โดยความแตกต่างทางพันธุกรรมนี้อาจเกิดจากการกลายในจีโนมและส่งผลต่อยีนที่ควบคุมสีดอกในวิถีการสร้างแอนโทไซยานิน

และกลุ่มที่ 4 เข็มยูนนาน ซึ่งงานวิจัยนี้กำหนดให้เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม เนื่องจากเข็มยูนนานจัดอยู่ในหมู่แอสโคเซนโทรซิส (section Ascocentrosis) [23] แต่มีความใกล้ชิดกับกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม เนื่องจากลักษณะรูปร่างและแหล่งที่พบใกล้เคียงกับเข็มเวียดนามจึงมีความใกล้ชิดกัน และก่อนหน้านี้เคยถูกจำแนกให้อยู่กลุ่มเดียวกับหมู่เข็ม อย่างไรก็ตาม ผลการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับการจัดจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มใหม่ ทั้งนี้ Gardiner และคณะ [7] ได้ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบางตำแหน่ง โดยแหล่งที่พบกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มแต่ละพันธุ์จะกระจายอยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ซึ่งเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์ก็สามารถแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ต่าง ๆ ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Gardiner ในปี ค.ศ. 2013 [7,23]

การจัดจำแนกกลุ่มกล้วยไม้สกุลแวนด้าใหม่โดยพิจารณาจากยีนบางตำแหน่ง เช่นเดียวกับการประเมินความสัมพันธ์ในกล้วยไม้สกุลแวนด้าบางชนิด สกุลรองเท้านารี สกุลกะเรกะร่อน สกุลกุหลาบ สกุลหวาย และสกุลวานิลา [2,11-12,14-16] พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และการศึกษาทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการวิเคราะห์เพียงยีนบางตำแหน่ง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกกล้วยไม้พันธุ์กลายกับพันธุ์แท้ได้ ซึ่งมีประโยชน์ต่อปรับปรุงพันธุ์ การอนุรักษ์ และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ตามลักษณะทางภูมิศาสตร์ [24] อย่างไรก็ตาม เนื่องจากเทคนิคทั้งสองเป็นเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบที่แสดงลักษณะการข่มสมบูรณ์ ดังนั้นจึงให้ค่า PIC ในระดับกลาง และให้ข้อมูลตำแหน่งของยีนหรือโลไซ (loci) ลักษณะเด่นด้อยไม่ได้ แต่สามารถนำข้อมูลที่ได้นี้ไปใช้ในการจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มได้

เป็นข้อมูลพื้นฐานในปรับปรุงพันธุ์เพื่อพัฒนากล้วยไม้ให้มีค่าทางเศรษฐกิจมากขึ้น [8] และสนับสนุนการจำแนกกลุ่มใหม่ที่แสดงลักษณะความสัมพันธ์ร่วมกันในกล้วยไม้สกุลแวนด้า [23]

5. รายการอ้างอิง

[1] Dresser, R.L., 1993, Phylogeny and Classification of the Orchid Family, Dioscorides Press, Oregon.

[2] Lim, S.H., Teng, P.C.P., Lee, Y.H. and Goh, C.J., 1998, RAPD analysis of some species in the genus *Vanda* (Orchidaceae), Ann. Bot. 83: 193-196.

[3] นฤทธิ์ เจริญกิจประเสริฐ, 2550, คู่มือปลูกเลี้ยงกล้วยไม้, พิมพ์ครั้งที่ 1, เกษตรสยามบุ๊คส์, กรุงเทพฯ.

[4] กมลวรรณ เตชะวนิช, 2552, กล้วยไม้ : คู่มือการปลูกและสายพันธุ์ยอดนิยม, พิมพ์ครั้งที่ 1, บริษัท ไทยควอลิตี้บุ๊คส์ (2006) จำกัด, กรุงเทพฯ.

[5] บรรณ บูรณะชนบท, 2542, กล้วยไม้สกุลเข็ม, พิมพ์ครั้งที่ 3, สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม, นนทบุรี.

[6] Pridgeon, A.M., Cribb, P.J., Chase, M.W. and Rasmussen, F.N., 2014, Genera Orchidacearum Volume 6: Epidendroideae, Oxford University Press, Oxford.

[7] Gardiner, L.M., Kocyan, A., Motes, M., Roberts, D.L. and Emerson, B.C., 2013, Molecular phylogenetics of *Vanda* and related genera (Orchidaceae), Bot. J. Linn. Soc. 173: 549-572.

[8] Agarwal, M., Shrivastava, N. and Padh, H., 2008, Advances in molecular marker techniques and their applications in plants sciences, Plant cell Rep. 27: 617-631.

[9] สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

[10] ธีระชัย ธนานันต์, 2553, พันธุศาสตร์โมเลกุล, พิมพ์ครั้งที่ 1, บริษัท แดเน็กซ์ อินเตอร์คอร์ปอเรชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

[11] Choi, S.H., Kim, M.J., Lee, J.S. and Ryu, K.H., 2006, Genetic diversity and phylogenetic relationships among and within species of oriental cymbidiums based on RAPD analysis, Sci. Hort. 108: 79-85.

[12] Chung, S.Y., Choi, S.H., Kim, M.J., Yoon, K.E., Lee, G.P., Lee, J.S. and Ryu, K.H., 2006, Genetic relationships and differentiation of *Paphiopedilum* and *Phragmepedium* based on RAPD analysis, Sci. Hort. 109: 153-159.

[13] Gajeraa, B.B., Kumara, N., Singha, Amritpal, S., Punvara, B.S., Ravikirana, R., Subhasha, N. and Jadejab, G.C., 2010, Assessment of genetic diversity in castor (*Ricinus communis* L.) using RAPD and ISSR markers, Ind. Crops Prod. 32: 491-498.

[14] Verma, P.C., Chakravarty, D., Jena, S.N., Mishra, D.K., Singh, P.K., Sawant, S.V. and Tuli, R. 2009, The extent of genetic diversity among *Vanilla* species:

Comparative resultd for RAPD and ISSR, Ind. Crops Prod. 29: 581-589.

[15] วริสรา แทนสง่า, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 102-112.

[16] นฤมล ธนานันต์, ฐิติพร โท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(1): 102-108.

[17] Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1978, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 11-15.

[18] Henry, R.J., 1997, Practical/applications of Plant Molecular Biology, Chapman and Hall, London.

[19] 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.

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

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

[22] Kriangphan, N., Vuttipongchaikij, S., Kittiwongwattana, C., Suttangkakul, A., Pinmanee, P., Sakulsathaporn, A., Suwimon, R., Suputtitada, S., Chanvivattana, Y. and Apisitwanich, S., 2015, Effects of sequence and expression of eight anthocyanin biosynthesis genes on floral coloration in four *Dendrobium* hybrids, Hort. J. 84: 83-92.

[23] Gardiner, L.M., 2012, New combinations in the genus *Vanda* (Orchidaceae), Phytotaxa 61: 47-54.

[24] Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K. and Kahl, G., 2005, DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods, and Applications, 2nd Ed., CRC Press, Florida.