14505

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีที่ 22 ฉบับที่ 1 มกราคม - มีนาคม 2557

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี

Assessment of Genetic Relationships among *Dendrobium* Group Ueang Sai Using HAT-RAPD Markers

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

ฐิติพร โท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Narumol Thananta

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

Titiporn Thomsopa and Theerachai Thananta*

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

บทคัดย่อ

เอื้องสายเป็นกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มหนึ่งที่นิยมปลูกเลี้ยงตามอาคารบ้านเรือนเช่นเดียวกับกล้วยไม้ชนิดอื่น ซึ่งมีการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการผสมพันธุ์และขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ดังนั้นการจำแนกชนิดด้วยลักษณะสัณฐานอาจมีความยุ่งยากและเกิดความสับสนได้ง่าย งานวิจัยนี้จึงนำเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมาตรวจสอบพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย 15 พันธุ์ ซึ่งเป็นกล้วยไม้กลุ่มเอื้องสาย 14 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 51 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 24 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายแต่ละพันธุ์ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์ นอกจากนั้นยังพบไพรเมอร์ 20 ชนิด ที่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 15 พันธุ์ ได้โดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.27 ถึง 0.71 โดยผลการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีสามารถระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย ซึ่งใช้วางแผนการผสมพันธุ์เพื่อพัฒนาพันธุ์ใหม่ ๆ ได้

คำสำคัญ : สกุลหวาย; เอื้องสาย; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; เครื่องหมายดีเอ็นเอ; แฮตอาร์เอพีดี

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

Abstract

Ueang Sai is a group of genus *Dendrobium* which the popular orchids of growers by dwellings as well as other species. The improved varieties by breeding and propagation using tissue culture to generated a high genetic diversity. Therefore, identification base on morphology may be cumbersome and confusing easily. High annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique was used to identify 15 species (varieties) of *Dendrobium*, which 14 species were the members of Ueang Sai group. The total 72 random primers were screened and 51 primers could be used for DNA amplification. Twenty-nine primers were selected and used analyze each DNA species of Ueang Sai group. The result showed differences among 15 species with specific DNA bands. In addition, 20 of 24 random primers were able to identify each species even though using as only one primer. A dendrogram based on polymorphic bands showed genetic similarities among Ueang Sai group with similarity coefficients ranging 0.27-0.71. Finally, these results indicate that the HAT-RAPD markers capable to specify Ueang Sai group, which used to planning in the breeding program.

Keywords: *Dendrobium*; Ueang Sai; genetic relationship; DNA marker; HAT-RAPD

1. บทนำ

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

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) เป็นกล้วยไม้สกุลที่ใหญ่ที่สุด พบแพร่กระจายทั้งในทวีปเอเชียและหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก จำแนกเป็น 20 หมู่ ค้นพบแล้วไม่น้อยกว่า 1,000 ชนิด [2] บางชนิดนิยมนำมาปรับปรุงพันธุ์ด้วยการผสมพันธุ์ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) และความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) สูง

กล้วยไม้กลุ่มเอื้องสาย (Ueang Sai) เป็น 1 ใน 3 กลุ่ม ของหมู่ยูจิแนนเธ (Eugenanthe) ซึ่งอยู่ในสกุลหวาย มีลำต้นหรือลำลูกกล้วยยาวเรียวห้อยลงเป็นสายยาว ในช่วงฤดูร้อนจะสลัดใบทิ้งหมดและออกดอกเกือบตลอดทั้งลำลูกกล้วย [2] ซึ่งมีความสวยงามมาก จึงได้รับความนิยมและนำออกจากป่ามาปลูกตามบ้านเรือน ปัจจุบันพื้นที่ป่าของประเทศไทยลดลงมาก และสภาพดินฟ้าอากาศเปลี่ยนแปลงบ่อย ส่งผลให้เอื้องสายและกล้วยไม้ต่าง ๆ ลดปริมาณลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนั้นผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้มักนิยมผสมข้ามพันธุ์ อีกทั้งมีการนำเอื้องสายจากต่างประเทศ ได้แก่ ลาว พม่า กัมพูชา มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ เป็นต้น

เข้ามาผสมพันธุ์กับกล้วยไม้ในประเทศ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นเร่งด่วนที่จะต้องศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายพันธุ์แท้ในประเทศไทย ทั้งนี้เพื่อจัดจำแนกชนิดและพันธุ์ในระดับโมเลกุล ซึ่งสามารถใช้วางแผนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

การวิจัยกล้วยไม้ที่เคยรายงานมาก่อนนี้ พบว่ามีนักวิจัยประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอหลายชนิดในกล้วยไม้หลายสกุล โดยเฉพาะกล้วยไม้สกุลหวาย ซึ่งมีความหลากหลายสูงทั้งในพันธุ์แท้และลูกผสม [3-5] นอกจากนั้นยังมีรายงานในกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส (*Phalaenopsis*) [6-8] สกุลแวนดา (*Vanda*) [9] และสกุลช้าง [10,11] เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการจำแนกชนิดของเอื้องสายพันธุ์แท้ที่ปลูกเลี้ยงในประเทศไทย

ด้วยความสำคัญดังกล่าว ผู้วิจัยจึงศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องสายด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature - random amplified polymorphic DNA) [12,13] โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) ซึ่งจะใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เพียงชนิดเดียวสำหรับสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ ประหยัดค่าใช้จ่าย และสามารถให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแต่ละพันธุ์ กล่าวคืองานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีในการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย

กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายมีการเจริญเติบโตแบบฐานร่วม (sympodial) หรือประเภทแตกกอ กล่าวคือ มีลำลูกกล้วย (pseudobulb) ซึ่งเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะแตกหน่อเป็นลำลูกกล้วยใหม่และรวมกันเป็นกอ มีใบแข็งหนาสีเขียว ดอกมีกลีบเลี้ยง (sepal) 3 กลีบ และกลีบดอก (petal) 3 กลีบ กลีบดอก 2 กลีบ ด้านข้างมีรูปร่างลักษณะและขนาดเท่ากัน ส่วนโคนของอีกกลีบดอกมีลักษณะยื่นออกไปทางด้านหลังบริเวณส่วนล่างของดอกและประสานเชื่อมติดกับสันหลังของเส้าเกสร (column) โดยส่วนฐานของเส้าเกสรยื่นออกมามีลักษณะคล้ายเดือยเรียกว่าเดือยดอก (mentum) โดยกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกันในลักษณะสัณฐาน (morphology) ทั้งลำลูกกล้วย ใบ และดอก แต่ที่ชัดเจนที่สุดคือดอก [14]

กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ จำนวน 14 พันธุ์ ได้แก่ (1) เอื้องสายไหมหรือเอื้องสายล่องแล่ง [*D. aphyllum* (Roxb.) Fisch.] (2) เอื้องสายไหมเขาใหญ่ (*D. aphyllum* vir. Khao Yai) (3) เอื้องสายไหมเชียงตุง (*D. aphyllum* vir. Chiang Tung) (4) เอื้องสายนกกระจิบ (*D. aphyllum* x self) (5) เอื้องสายม่านพระอินทร์ (*D. devonianum* Paxt.) (6) เอื้องสายน้ำผึ้งลาว (*D. primulinum* vir. Laos) (7) เอื้องสายประสาทหรือเอื้องสายเหลือง (*D. primulinum* vir. yellow pseudobulb) (8) เอื้องสายน้ำผึ้ง (*D. primulinum* Lindl.) (9) เอื้องสายน้ำนม (*D. cretaceum* Lindl.) (10) เอื้องสายม่วง (*D. lituiflorum* Lindl.) (11) เอื้องสายน้ำครั่ง (*D. parishii* Rchb. f.) (12) เอื้องสายหลวง (*D. anosmum* Lindl.) (13) เอื้องสายมรกต (*D. chrysanthum* Lindl.) และ(14) เอื้องสายน้ำเขียว

(*D. crepidatum* Lindl. & Paxt.) โดยมีกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องเก๊ากิ่ว 1 พันธุ์ คือ เอื้องคำกิ่วเวียดนาม (*D. haniffll* Ridl.) เป็นกล้วยไม้สกุลหวายนอกกลุ่ม (out group)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลหวายด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle [15] โดยบดใบกล้วยไม้สกุลหวายในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด แล้วนำผงใบ 6 กรัม บ่มใน extraction buffer [4x CTAB; 4 % cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), 0.6 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 M NaCl, 20 mM ethylene-diamine tetraacetic acid (EDTA), 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 0.1 % sodium metabisufite] 10 มิลลิลิตร ซึ่งมี 2-mercaptoethanol 20 ไมโครลิตร และ polyvinylpyrrolidone (PVP) 0.3 กรัม โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาเติม คลอโรฟอร์ม : 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. การตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยรวมดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 15 พันธุ์ (ในปริมาณที่เท่า ๆ กัน) เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 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 0.25 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 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 15 พันธุ์ โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ โดยได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 15 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 หลังจากนั้นจึงสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) [19]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ไพรเมอร์แบบสุ่มที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 15 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 51 ชนิด (หรือคิดเป็น 70.81 เปอร์เซ็นต์) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

3.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย

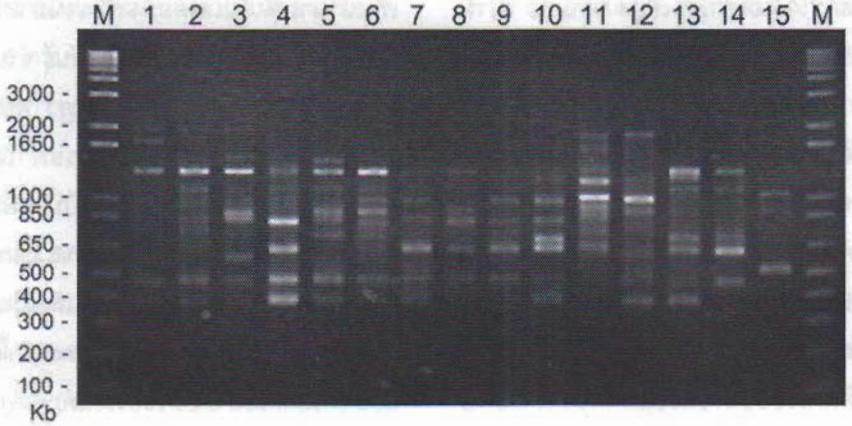
เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์แบบสุ่ม 24 ชนิด ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายแต่ละพันธุ์ จำนวน 15 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 502 แถบ ขนาดประมาณ 250-3,000 คู่เบส (base pairs, bp) ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกพันธุ์ (monomorphic band) 501 แถบ (หรือคิดเป็น 99.80 เปอร์เซ็นต์) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบต่างกันในแต่ละพันธุ์ (polymorphic band) 1 แถบ (หรือคิดเป็น 0.20 เปอร์เซ็นต์)

โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีนั้นมีรูปแบบจำเพาะต่อกล้วยไม้สกุลหวายแต่ละพันธุ์ (ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังรูปที่ 1) และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจัดจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายได้ นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ซึ่งให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างของสกุลหวายแต่ละพันธุ์ออกจากกันได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว จำนวน 20 ชนิด ได้แก่ A21, A24, A25, B25, B27, B32, C21, C22, C26, C28, C29, D21, D22, D25, E23, E24, F22, F26, F27 และ F28

3.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่ากล้วยไม้สกุลหวายที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ทั้ง 15

พันธุ์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.27 ถึง 0.71 เฉลี่ย 0.37 (รูปที่ 2) ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของกล้วยไม้สกุลหวายได้ 7 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ เอื้องสายไหม เอื้องสายไหมเขาใหญ่ เอื้องสายไหมเชียงตุง เอื้องสายนกกระจิบ และเอื้องสายม่านพระอินทร์ กลุ่ม 2 ได้แก่ เอื้องสายน้ำผึ้งลาว กลุ่ม 3 ได้แก่ เอื้องสายประสาท เอื้องสายน้ำผึ้งไทย และเอื้องสายน้ำนม กลุ่ม 4 ได้แก่ เอื้องสายม่วง กลุ่ม 5 ได้แก่ เอื้องสายน้ำครั่ง และเอื้องสายหลวง กลุ่ม 6 ได้แก่ เอื้องสายมรกต และเอื้องสายน้ำเขียว และกลุ่ม 7 ได้แก่ เอื้องคำกิ่วเวียดนาม (รูปที่ 3)



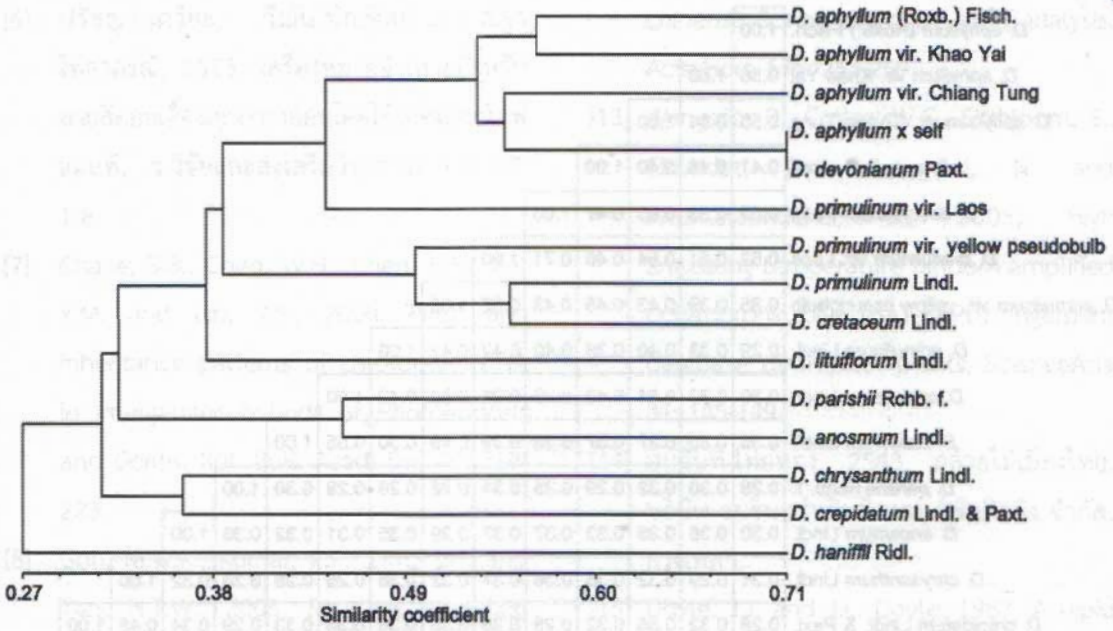
รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ A24 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (InvitrogenTM Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวาย ได้แก่ เอื้องสายไหม เอื้องสายไหมเขาใหญ่ เอื้องสายไหมเชียงตุง เอื้องสายน้ำผึ้งลาว เอื้องสายนกกระจิบ เอื้องสายม่านพระอินทร์ เอื้องสายประสาท เอื้องสายม่วง เอื้องสายน้ำผึ้งไทย เอื้องสายน้ำนม เอื้องสายน้ำเขียว เอื้องสายน้ำครั่ง เอื้องสายหลวง และเอื้องคำกิ่วเวียดนามตามลำดับ]

3.4 อภิปรายผล

การตรวจสอบกล้วยไม้สกุลหวาย 15 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อสกัดแยกดีเอ็นเอและนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 24 ชนิด พบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันและสามารถจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายได้อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายได้เช่นเดียวกับลำไย [20] พืชสกุล *Ficus* [21] และพยาธิใบไม้ [22] โดยกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 15 พันธุ์ สามารถแยกได้โดยใช้ไพรเมอร์เดียว นอกจากนั้นยังพบว่าไพรเมอร์บางชนิดสามารถแยกกล้วยไม้สกุลหวายออกเป็นกลุ่ม ๆ

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอในแต่ละพันธุ์ พบว่าสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายได้ โดยแบ่งกล้วยไม้สกุลหวายเป็น 7 กลุ่ม ซึ่งสมาชิกในแต่ละกลุ่มมีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกัน

ดังนั้นเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีจึงสามารถใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายได้



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย 15 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีได้ปรับอุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ (annealing) ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้สูงขึ้น โดยทั่วไปเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) จะใช้อุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ประมาณ 35-42 องศาเซลเซียส แต่เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีได้ปรับอุณหภูมิขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์เป็น 46-62 องศาเซลเซียส [3,4] ซึ่งจะช่วยให้ไพรเมอร์แบบสุ่มเข้าจับที่ตำแหน่งจำเพาะมากยิ่งขึ้น ลดการกระจายตัวในการเกาะให้น้อยลง และทำให้ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพิ่มมากขึ้น โดยจะเห็นจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมีแถบดีเอ็นเอชัดเจนมากกว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี [23]

4. สรุป

การตรวจสอบกล้วยไม้สกุลหวาย จำนวน 15 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 24 ชนิด พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับพันธุ์ และมีไพรเมอร์ 20 ชนิด ที่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 15 พันธุ์ ได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสร้างลายพิมพ์แฮตอาร์เอพีดี เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.27 ถึง 0.71 โดยแผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 15 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีในการวิจัยครั้งนี้สามารถแยกกล้วยไม้สกุลหวายออกเป็น 7 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มมีความสอดคล้องกับลักษณะสัณฐาน

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี 2555

6. เอกสารอ้างอิง

[1] กระทรวงพาณิชย์, ข้อมูลเศรษฐกิจการค้า : สถิติ

	D. aphyllum (Roxb.) Fisch.	*D. aphyllum* vir. Khao Yai	*D. aphyllum* vir. Chiang Tung	*D. aphyllum* x self	*D. devonianum* Paxt.	*D. primulinum* vir. Laos	*D. primulinum* vir. yellow pseudobulb	*D. primulinum* Lindl.	*D. cretaceum* Lindl.	*D. lituiflorum* Lindl.	*D. parishii* Rchb. f.	*D. anosmum* Lindl.	*D. chrysanthum* Lindl.	*D. crepidatum* Lindl. & Paxt.	*D. haniffll* Ridl.
D. aphyllum (Roxb.) Fisch.	1.00														
D. aphyllum vir. Khao Yai	0.56	1.00													
D. aphyllum vir. Chiang Tung	0.55	0.54	1.00												
D. aphyllum x self	0.41	0.46	0.40	1.00											
D. devonianum Paxt.	0.53	0.53	0.55	0.47	1.00										
D. primulinum vir. Laos	0.52	0.51	0.54	0.46	0.71	1.00									
D. primulinum vir. yellow pseudobulb	0.35	0.39	0.43	0.45	0.43	0.52	1.00								
D. primulinum Lindl.	0.29	0.33	0.40	0.38	0.40	0.42	0.42	1.00							
D. cretaceum Lindl.	0.30	0.33	0.34	0.42	0.33	0.38	0.50	0.42	1.00						
D. lituiflorum Lindl.	0.35	0.35	0.37	0.37	0.38	0.39	0.49	0.30	0.55	1.00					
D. parishii Rchb. f.	0.28	0.30	0.32	0.29	0.35	0.31	0.28	0.28	0.29	0.30	1.00				
D. anosmum Lindl.	0.30	0.36	0.35	0.33	0.37	0.37	0.29	0.35	0.31	0.32	0.36	1.00			
D. chrysanthum Lindl.	0.31	0.29	0.32	0.33	0.36	0.37	0.32	0.36	0.28	0.28	0.28	0.32	1.00		
D. crepidatum Lindl. & Paxt.	0.28	0.32	0.35	0.32	0.28	0.33	0.35	0.33	0.36	0.33	0.29	0.34	0.45	1.00	
D. haniffll Ridl.	0.27	0.28	0.29	0.29	0.29	0.29	0.31	0.28	0.28	0.28	0.28	0.29	0.29	0.29	1.00

รูปที่ 3 ค่าดัชนีความเหมือนของกล้วยไม้สกุลหวาย 15 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

การค้าระหว่างประเทศของไทย, แหล่งที่มา : http://www.moc.go.th, 10 เมษายน 2556.

[2] ๑๐๘ พรรณไม้ไทย, กล้วยไม้สกุลกล้วยไม้สกุลหวาย *Dendrobium*, แหล่งที่มา : http://www.panmai.com, 10 เมษายน 2556.

[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 finger printing 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] ปรัชญา เตวิยะ, วีณัน บัณฑิตย์ และ ณัฐา โพธาภรณ์, 2553, เครื่องหมายจำเพาะสำหรับลายสีดอกเอื้องเขากวางอ่อนโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี, ว.วิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 27: 1-8.

[7] 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.

[8] 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.

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

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

[11] 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.

[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, ScienceAsia 31: 145-149.

[14] อบฉันท์ ไทยทอง, 2543, กล้วยไม้เมืองไทย, บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ.

[15] Doyle, J.J. and J.L. Doyle, 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. Technol. 1: 127-133.

[18] นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 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.) ในเขตภาค เหนือตอนบนของประเทศไทยโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

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

[22] ประลองยุทธ ศรีปาลวิทย์ และชโลบล วงศ์สวัสดิ์, 2550, การวิเคราะห์พันธุกรรมของพยาธิใบไม้ *Stellantchasmus falcatus* โดยเทคนิค HAT-RAPD, ว.มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา 2(1): 14-22.

[23] นฤมล ธนานันต์, สุรีย์พร พุ่มเอี่ยม และธีระชัย ธนานันต์, 2556, การจำแนกพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21: 360-370.