

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของชนิดกล้วยไม้
ในสกุลเอื้องเทียนด้วยไอเอสเอสอาร์
Genetic Relationships Among Orchid Species
in Genus *Coelogyne* base on ISSR

ภัทรา หงษ์ทองดี และธีระชัย ธนानันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Pattra Hongtongdee 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

กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (*Coelogyne*) เป็นพืชอิงอาศัยที่มีดอกขนาดใหญ่และสวยงาม จัดเป็นกล้วยไม้ที่พบตามธรรมชาติได้ยาก เนื่องจากมีปัจจัยจำกัดหลายด้านที่ส่งผลต่อการงอกของเมล็ดและการเจริญเติบโต ปัจจุบันพบว่าเอื้องเทียนในธรรมชาติลดปริมาณลงอย่างรวดเร็วและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ อีกทั้งการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานทำได้ยากและต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญที่มีประสบการณ์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเอื้องเทียน จำนวน 14 ชนิด ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ โดยคัดกรองไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ 35 ชนิด สำหรับใช้ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าไพรเมอร์ 14 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และไพรเมอร์ 9 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน ขนาด 500-2,000 คู่เบส รวมทั้งหมด 203 แถบ โดยมีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับชนิดกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนแต่ละชนิด จำนวน 17 แถบ เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS รุ่น 2.0 พบว่าเอื้องเทียนลำเตี้ยมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับเอื้องเทียนปากดำมากที่สุด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายเท่ากับ 0.63

คำสำคัญ : เอื้องเทียน; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; ไอเอสเอสอาร์

*ผู้รับผิดชอบบทความ : narumolpla@yahoo.com

DOI 10.14456/tstj.2016.27

Abstract

Coelogyne are epiphytic plants, which have large and beautiful flowers. These orchids are rare in the nature because of the limited factors that affect growth and seed germination. Recently, the native *Coelogyne* have dramatically reduced, extinction and their morphological identification is much more difficult and need the expert who experienced. In this research, the DNA fingerprints were generated to evaluate the genetic relationships among 14 *Coelogyne* species by using inter-simple sequence repeat (ISSR) techniques with 35 microsatellite primers. The results showed that 14 primers were capable to DNA amplification and 9 primers were gave 203 clearly DNA bands with about 500-2000 bp in sizes. Moreover, 17 DNA bands were specific to each orchid species. The dendrogram was constructed using NTSYS (version 2.0) software based on the comparison of similarity coefficients used for cluster analysis, It was found that *Coelogyne lentiginosa* and *Coelogyne brachyptera* were most closely related with similarity coefficient of 0.63.

Keywords: *Coelogyne*; genetic relationship; ISSR (inter-simple sequence repeat)

1. บทนำ

กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (*Coelogyne*) เป็นกล้วยไม้ที่มีดอกสวยงามขนาดใหญ่ 3-5 ดอกต่อช่อ ดอกโดยช่อดอกงอกออกจากโคนต้น มีใบประดับเป็นกาบขนาดยาวพอ ๆ กับความยาวของกลีบดอก มักมีกลิ่นหอมอ่อน ๆ ที่ปากมักมีแต้มสีสดไล่ลดไล่ต่าง ๆ กันตามแต่ละชนิด กล้วยไม้สกุลนี้เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย จำพวกที่มีการเจริญทางด้านข้าง มีเหง้าหรือมีส่วนทอดเลื้อยหรือไหล เมื่อต้นเจริญเต็มที่แล้วสามารถแตกต้นใหม่หรือหน่อใหม่จากโคนกอหรือตามลำข้อของต้นได้ เจริญเติบโตตามโขดหินหรือต้นไม้ ชอบแสงแดดจัดถึงแสงปานกลาง ตามธรรมชาติพบในบริเวณป่าดิบเขาของภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงใต้ มักมีดอกในช่วงเดือนมีนาคมถึงเมษายน เป็นกลุ่มกล้วยไม้ที่มีความหลากหลาย สำนวนพบแล้วประมาณ 250 ชนิด โดยแพร่กระจายพันธุ์ในเขตร้อนของทวีปเอเชีย จัดเป็นกล้วยไม้ที่พบได้ยากในธรรมชาติชนิดหนึ่ง การ

ขยายพันธุ์เกิดแบบอาศัยเพศด้วยการแพร่กระจายของเมล็ด แต่เนื่องจากมีปัจจัยจำกัดหลายประการที่ส่งผลต่อการงอกของเมล็ดในสภาพธรรมชาติ ได้แก่ การไม่มีอาหารสะสมในเอนโดสเปิร์ม (endosperm) ความต้องการราที่จำเพาะเพื่อช่วยในการงอกของเมล็ด เป็นต้น จึงทำให้อัตราการงอกเป็นต้นใหม่เพื่อเพิ่มจำนวนประชากรนั้นอยู่ในอัตราที่ต่ำมาก ส่วนการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้น เอื้องเทียนสามารถแตกกอใหม่ได้ แต่อัตราการเพิ่มจำนวนก็ต่ำด้วยเช่นกัน โดยปัจจัยของกล้วยไม้เองและการตัดไม้ทำลายป่าส่งผลให้ในปัจจุบันกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนตามแหล่งธรรมชาติมีน้อยมาก และอยู่ในภาวะใกล้สูญพันธุ์ เนื่องจากสิ่งแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงส่งผลให้กล้วยไม้สกุลนี้ลดปริมาณลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่ากล้วยไม้แต่ละชนิดในสกุลนี้มีลักษณะพื้นฐานคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นจึงแยกได้ยาก อย่างไรก็ตาม การศึกษาลักษณะทางนุกรมของกล้วยไม้สกุลนี้เป็นสิ่งจำเป็น ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นแนวทางในการอนุรักษ์ต่อไป ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้

สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter-simple sequence repeat) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา [1] มีความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) และให้ความหลากหลาย (polymorphism) หรือความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ในลายพิมพ์ ดีเอ็นเอสูง ใช้เวลาน้อย วิธีการไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน [2] โดยงานวิจัยที่เคยรายงานมาก่อนพบว่าเทคนิคไอเอสเอสอาร์ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่น่าเชื่อถือมากกว่าเทคนิคอาร์เอฟพีดี (RAPD, random amplified polymer-phic DNA) เนื่องจากใช้อุณหภูมิในขั้นตอนการเข้าจับของไพรเมอร์ (primer) กับดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) สูงกว่า และไพรเมอร์ไมโครแซเทลไลต์ (microsatellite primer) ที่ใช้มีขนาดยาวมากกว่า [3-5] ดังนั้นเทคนิคไอเอสเอสอาร์จึงมีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาพันธุกรรมในกลุ่มประชากรของสิ่งมีชีวิต [6-8]

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน จำนวน 14 ชนิด ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ โดยสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอและแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน

กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน จำนวน 14 ชนิด รวบรวมจากแหล่งธรรมชาติต่าง ๆ ของประเทศไทย แต่ละชนิดมี 2-7 กอ นำมาปลูกเพื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานและดอก และใช้ใบสำหรับสกัดดีเอ็นเอ (ตารางที่ 1)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน ด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle [9] โดยบดใบกล้วยไม้ 3-4 กรัม ในบัฟเฟอร์สกัด [extraction buffer; 4 % cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB), 0.6 % sodium dodecyl sulfate (SDS), 2.5 M NaCl, 20 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 0.1 % sodium metabisulfite] 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมอร์แคปโทเอทานอล (2-mercaptoethanol) 20 ไมโครลิตร และพอลิไวนิลไพร์โรลิโดน (polyvinylpyrrolidone, PVP) 0.3 กรัม และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแยกสารละลายส่วนบนมาเติมลิเควอร์พอลิ อะคริลาไมด์ (linear polyacrylamide) 140 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g นาน 15 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้ง และล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ล้าง (washing buffer; 10 mM sodium acetate pH 5.2 และ 70 % ethanol) ปล่อยให้แห้ง เมื่อแห้งแล้วจึงละลายตะกอนในบัฟเฟอร์อาร์เอ็นเอสเอ (RNase buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 15 mM NaCl) 500 ไมโครลิตร เติมนอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอ (10 mg/ml RNase A) 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลากัดด้วย ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25:24:1) 1 ครั้ง และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม

ตารางที่ 1 กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน จำนวน 14 ชนิด ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่พบ
1. เอื้องเทียนใบแคบ	<i>Coelogyne Viscosa</i> Rchb. f.	ป่าดิบแล้ง ป่าผลัดใบ และป่าสนทุกภาค (ยกเว้นภาคกลาง)
2. เอื้องเทียนลำเขียว	<i>Coelogyne lentiginosa</i> Lindl.	ป่าดิบแล้งในภาคเหนือ ภาคตะวันตกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
3. เอื้องเทียนหิน	<i>Coelogyne calcicola</i> Kerr.	พม่า ยูนนาน ลาว และเวียดนาม (ยังมีรายงานว่าพบในธรรมชาติของไทย)
4. เอื้องเทียนน้อย	<i>Coelogyne lacteal</i> Rchb. f.	ป่าดิบแล้งและป่าสน ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
5. เอื้องเทียนส้ม	<i>Coelogyne fuscescens</i> var. brunnea	ป่าดิบเขาทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ
6. เอื้องเทียนบาร์บาตา	<i>Coelogyne barbata</i> Lindl. ex Griff.	ภูฏาน เนปาล พม่า จีน และเทือกเขาหิมาลัยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของอินเดีย (ยังมีรายงานว่าพบในธรรมชาติของไทย)
7. เอื้องมัน	<i>Coelogyne cumingii</i> Lindl.	ป่าดิบแล้งและป่าผลัดใบในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้
8. เอื้องหมาก	<i>Coelogyne trinervis</i> Lindl.	ป่าดิบแล้งและป่าผลัดใบทั่วทุกภาคของประเทศไทย
9. เอื้องสายเสียด	<i>Coelogyne rochussenii</i> (de Vriese) Kuntze	ป่าดิบเขา โดยพบมากที่เขาลงในภาคใต้ของไทย นอกจากนี้ยังพบในมาเลเซียและอินโดนีเซีย
10. เอื้องลำเทียนปากดำ	<i>Coelogyne brachyptera</i> Rchb. f.	ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคตะวันตกเฉียงใต้
11. เอื้องเทียนขาว	<i>Coelogyne nitida</i> (Wall. Mss.) Lindl.	ป่าดิบแล้งและป่าผลัดใบในประเทศไทย อินเดีย ภูฏาน บังกลาเทศ ลาว เมียนมาร์ เนปาล และจีน
12. เอื้องผาหมอก	<i>Coelogyne xyrekes</i> Ridl.	คาบสมุทรมลายู สุมาตรา และภาคใต้ของไทยในป่าดิบเขา
13. เอื้องเทียนใหญ่ลาว	<i>Coelogyne eberhardtii</i> Gagnep.	ลาวและเวียดนาม (ยังมีรายงานว่าพบในธรรมชาติของไทย)
14. เอื้องเทียนใบรี	<i>Coelogyne fimbriata</i> Lindl.	ป่าดิบทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก

: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) อีก 1 ครั้ง จากนั้นจึงย้ายสารละลายในส่วนบนมาเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ 70 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) ให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตร และเติมไอโซโพรพานอลให้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ $12,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วผึ่งตะกอนให้แห้ง เมื่อตะกอนแห้งดีแล้วจึงละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ทีอี (TE buffer; 10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1.0 mM EDTA) ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ [10]

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

2.3.1 การคัดเลือกชนิดไพรเมอร์

ตรวจสอบไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 35 ชนิด เพื่อหาไพรเมอร์ที่ตอบสนองต่อปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (PCR, polymerase chain reaction) โดยรวม ดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนทั้ง 14 ชนิด เป็นตัวอย่างเดียวกัน แล้วเพิ่มปริมาณในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 0.25 mM $MgCl_2$) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 μM ไพรเมอร์แบบสุ่ม 250 nM และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (RBC Bioscience, Taiwan) 1 ยูนิต โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์มี 3 ขั้นตอน ได้แก่ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศา

เซลเซียส 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 จากนั้นนำผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์มาตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ [11]

2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ที่คัดเลือกได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนแต่ละชนิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ หลังจากนั้นนำผลผลิตของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

2.3.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

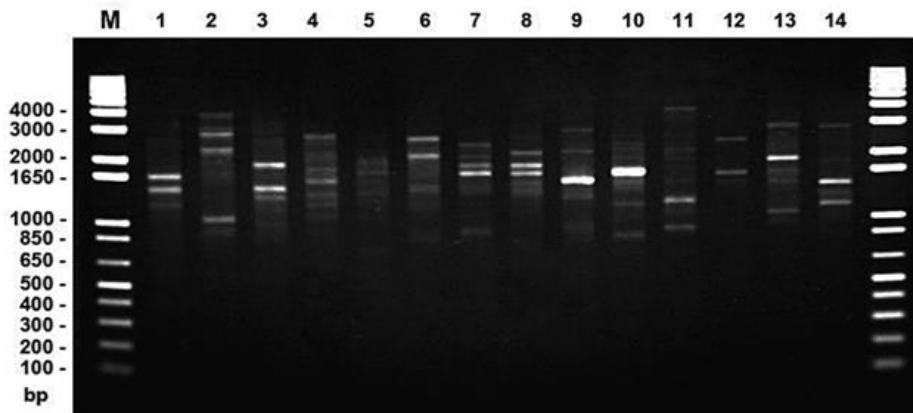
ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนที่ได้ เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 1 และถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 0 จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยหาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้าย (similarity coefficient) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 หลังจากนั้นจึงสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) [12]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 35 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 14 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่าไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนมี 9 ชนิด ได้แก่ M5, M10, M14, M15, M21, M24, M26,

M27 และ M34 (ตารางที่ 2) โดยพบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 203 แถบ มีขนาด 500-2,000 คู่เบส โดยมีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน

จำนวน 17 แถบ ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนแต่ละชนิดได้ ตัวอย่าง เช่น ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ M21 (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างจากเทคนิคไอเอสเอสอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ M21 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-14 คือ ดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนแต่ละชนิด ได้แก่ (1) เอื้องเทียนใบแคบ (2) เอื้องเทียนลำเขียว (3) เอื้องเทียนหิน (4) เอื้องเทียนน้อย (5) เอื้องเทียนส้ม (6) เอื้องเทียนบาร์บาตา (7) เอื้องมัน (8) เอื้องหมาก (9) เอื้องสายเส็ด (10) เอื้องลำเทียนปากดำ (11) เอื้องเทียนขาว (12) เอื้องผาหมอก (13) เอื้องเทียนใหญ่ลาว และ (14) เอื้องเทียนใบรี]

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ที่ใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์

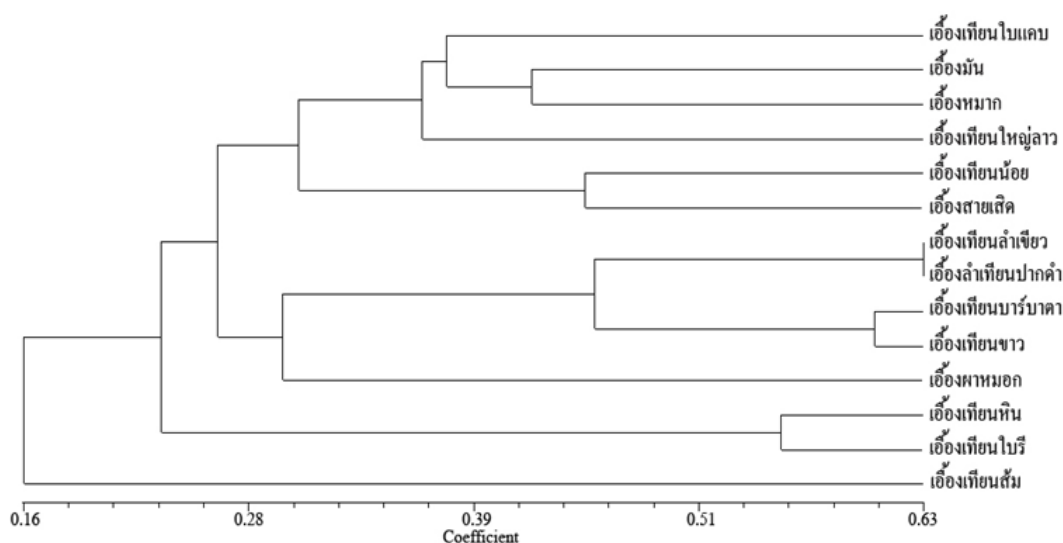
ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')
M05	ACACACACACACACACC
M10	GAGAGAGAGAGAGAGAC
M14	CACACACACACACACAG
M15	CTCTCTCTCTCTCTCTG
M21	TCTCTCTCTCTCTCTCG
M24	TCTCTCTCTCTCTCTCC
M26	CTCCTCCTCCTCCTCCTC
M27	GTCGTCGTCGTCGTCGTC
M34	CTTCTTCTTCTTCTTCTTG

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน 14 ชนิด ด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ 9 ชนิด ที่คัดเลือกได้นั้น ให้แถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 65 แถบ มีขนาดประมาณ 500-2,000 คู่เบส ซึ่งพบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ เช่นเดียวกับงานวิจัยที่เคยรายงานในพืชอื่น ๆ ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย [11] กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม [13] กล้วยไม้สกุลกุหลาบ [14] กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม [15] และข้าวมีสี [16]

เมื่อวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายพบว่ากล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนทั้ง 14 ชนิด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.16-0.63 เมื่อพิจารณาที่ค่าสัมประสิทธิ์ความ

คล้ายที่ 0.39 พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์สามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนออกเป็น 6 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เอื้องเทียนใบแคบ เอื้องมัน เอื้องหมาก และเอื้องเทียนใหญ่ลาว กลุ่ม 2 ได้แก่ เอื้องเทียนน้อย และเอื้องสายเส็ด กลุ่ม 3 ได้แก่ เอื้องเทียนลำเขียว และเอื้องลำเทียนปากดำ กลุ่ม 4 ได้แก่ เอื้องเทียนบาร์บาตา เอื้องเทียนขาว และเอื้องผาหมอก กลุ่ม 5 ได้แก่

เอื้องเทียนหิน และเอื้องเทียนใบรี และกลุ่ม 6 เอื้องเทียนส้ม (รูปที่ 2) โดยเอื้องเทียนลำเขียวกับเอื้องลำเทียนปากดำมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.63 ส่วนเอื้องเทียนส้มมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับเอื้องเทียนชนิดอื่น ๆ น้อยที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.16



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนที่ได้จากเทคนิคไอเอสเอสอาร์

การใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ในงานวิจัยครั้งนี้สามารถจัดจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้อย่างดี และสามารถยืนยันความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนแต่ละชนิดที่นำมาศึกษาได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเทคนิคไอเอสเอสอาร์เป็นเทคนิคที่สามารถใช้สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียนได้ โดยสามารถประยุกต์ใช้กับพืชชนิดอื่น ๆ ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม หากเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ในการศึกษาให้มากขึ้นจะทำให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

4. สรุป

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของชนิดกล้วยไม้ในสกุลเอื้องเทียน จำนวน 14 ชนิด โดยใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ เมื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ 9 ชนิด พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 500-2,000 คู่เบส รวมทั้งหมด 203 แถบ โดยมีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับชนิดกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน จำนวน 17 แถบ เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่าเอื้องเทียนลำเขียวมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับเอื้องลำเทียนปากดำมากที่สุด โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายเท่ากับ 0.63

5. รายการอ้างอิง

- [1] Godwin, I.G., Mace, E.S., and Nurzuhairawaity, 2001, Genotyping Pacific Island Taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] germplasm, pp. 109-128, In Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants, Henry, R. (Ed.), CAB International, Oxon.
- [2] อรรถธรณ ชลวณิชย์, 2547, การวิเคราะห์ไอเอสเอสอาร์ของเปล้าใหญ่ (*Croton oblongifolius*) ในประเทศไทย, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- [3] Cao, P.J., Yao, Q.F., Ding, B.Y., Zeng, H.Y., Zhong, Y.X., Fu, C.X. and Jin, X.F., 2006, Genetic diversity of *Sinojackia dolichocarpa* (Styracaceae) a species endangered and endemic to China detected by inter simple sequence repeat (ISSR), *Biochem. Sys. Ecol.* 34: 231-239.
- [4] Nagaoka, A. and Ogihara, Y., 1997, Applicability of inter-simple sequence repeats polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers, *Theor. Appl. Genet.* 95: 597-602.
- [5] Tsumura, Y., Ohba, K. and Strauss, S.H., 1996, Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*), *Theor. Appl. Genet.* 9: 40-45.
- [6] Barth, S., Melchinger, A.E. and Lubberstedt, T., 2002, Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. Investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers, *Mol. Ecol.* 11: 495-505.
- [7] Esselman, E.J., Li, J.Q., Crawford, D.J., Windus, J.L. and Wolfe, A.D., 1999, Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): Comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers, *Mol. Ecol.* 8: 443-451.
- [8] Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D., 1994, Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification, *Genomics* 20: 176-183.
- [9] 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.
- [10] Sambrook, J., Fritschi, E.F. and Maniatis, T., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [11] ฐิติพร ไท้มโสภา, ชีระชัย ชนนานันต์ และนฤมล ชนนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดีและไอเอสเอสอาร์, *Thai J. Sci. Technol.* 3: 82-91.

- [12] Rohlf, F.J., 2002, NTSYS pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Inc., New York.
- [13] เกียรติชัย แซ่ใต้, ชีระชัย ธนानันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 92-101.
- [14] วริสรา แทนสง่า, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 102-112.
- [15] จินต์ ทองสม, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2558, การจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 475-484.
- [16] จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 1: 248-252.