การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี

Assessment of Genetic Diversity among *Aerides* Using HAT-RAPD Markers

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

วริสรา แทนสง่า และธีระชัย ธนานันต์*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Narumol Thanananta

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

Warisara Tansa-nga and Theerachai Thanananta*

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

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลกุหลาบเป็นกล้วยไม้ที่มีความสำคัญและได้รับความนิยม จึงมีการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการผสมพันธุ์และขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ดังนั้นการจำแนกพันธุ์ด้วยลักษณะสัณฐานจึงมีความยุ่งยากและเกิดความสับสนง่าย งานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมาตรวจสอบพันธุ์กล้วยไม้สกุลกุหลาบ 15 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 57 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 24 ชนิด ซึ่งให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลกุหลาบแต่ละพันธุ์ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ออกจากกันได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์ ผลการวิจัยพบว่ามีไพรเมอร์ 20 ชนิด ที่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้งหมดได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.37 ถึง 0.75 นอกจากนั้นผลการวิจัยครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีสามารถระบุพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบและสามารถใช้วางแผนการผสมพันธุ์เพื่อพัฒนาพันธุ์ใหม่ได้

คำสำคัญ : สกุลกุหลาบ; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; เครื่องหมายดีเอ็นเอ; แฮตอาร์เอพีดี

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

Abstract

Aerides is an important and most popular Thai orchid. High genetic diversity was found in this genus according to cross breeding and propagation by using tissue culture. Therefore, identification base on morphology may cumbersome and confusing easily. High annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique was used to identify 15 cultivars of *Aerides*. The total 72 random primers were screened and 57 primers could be used for DNA amplification. Twenty-four primers were selected and used analyze each DNA cultivars of *Aerides*. These results showed differences among 15 cultivars with specific DNA bands. Twenty of 24 random primers were able to identify each cultivars even though using as only one primer. A dendrogram based on polymorphic bands showed genetic similarities among *Aerides* with similarity coefficients ranging 0.37-0.75. Finally, these results indicate that the HAT-RAPD markers capable to specify *Aerides*, which used to planning in the breeding program.

Keywords: *Aerides*; genetic relationship; DNA marker; HAT-RAPD

1. บทนำ

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ เนื่องจากดอกกล้วยไม้มีสีสันสวยงาม มีความหลากหลายของรูปร่างดอก ขนาด และรูปทรงช่อดอก รวมทั้งมีอายุปักแจกันที่ยาวนานเมื่อเปรียบเทียบกับไม้ตัดดอกทั่วไป ดังนั้นกล้วยไม้จึงเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีการขยายตลาดและเพิ่มปริมาณการส่งออกมากขึ้นทุกปี อีกทั้งยังมีมูลค่าการส่งออกสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ของมูลค่ารวมในการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับของประเทศไทย โดยมีมูลค่าการส่งออกในแต่ละปีไม่ต่ำกว่า 3,500 ล้านบาท [1]

กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) หรือเอื้องกุหลาบเป็นกล้วยไม้ที่พบตามธรรมชาติในป่าทั่วทุกภาคของประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเกาะอาศัยอยู่ตามต้นไม้ ซึ่งอาจขึ้นเป็นต้นเดียวโดด ๆ หรือขึ้นเป็นกลุ่มใหญ่ มีการเจริญเติบโตแบบฐานเดี่ยว (monopodial growth) บางต้นมียอดเดียว บางต้นแตกเป็นกอ มีหลายยอด เมื่อต้นสูงหรือยาวขึ้นจะห้อยย้อยลงมา แต่ปลายยอดยังคงชี้ขึ้นข้างบน ช่อดอกส่วนใหญ่โค้งปลายช่อห้อยลงมา รากเป็นระบบรากอากาศ ดอกมีขนาดปานกลาง มักมีกลิ่นหอม มีเดือยดอก (spur) เรียวแหลมหรือปลายงอนออกมาทางด้านหน้าของดอก ซึ่งเป็นลักษณะที่แตกต่างกับกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ กลีบดอกผึ่งผายสวยงามสะดุดตา เป็นกล้วยไม้ที่ปลูกเลี้ยงง่าย มีบทบาทสำคัญในการผสมพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ สามารถผสมในสกุลเดียวกันและผสมข้ามสกุลต่าง ๆ เช่น ผสมกับสกุลแวนดา (*Vanda*) เป็นสกุลแอริโด-แวนดา (*Aeridovanda*) ผสมกับสกุลช้าง (*Rhyncho-stylis*) เป็นสกุลแอริโดสไตลิส (*Aeridostylis*) [2]

ปัจจุบันพื้นที่ป่าของประเทศไทยลดลงมาก และสภาพดินฟ้าอากาศเปลี่ยนแปลงบ่อย ส่งผลให้เอื้องกุหลาบและกล้วยไม้อื่น ๆ ลดปริมาณลงอย่างรวดเร็ว อีกทั้งผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้มักนิยมผสมข้ามพันธุ์ อีกทั้งมีการนำเอื้องกุหลาบจากต่างประเทศ ได้แก่ ลาว พม่า กัมพูชา มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย เป็นต้น เข้ามาผสมพันธุ์กับกล้วยไม้ในประเทศ ดังนั้นจึงมีความ

จำเป็นเร่งด่วนที่จะต้องศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบในประเทศไทย ทั้งนี้เพื่อจัดจำแนกชนิดและพันธุ์ในระดับโมเลกุล ซึ่งสามารถนำไปใช้วางแผนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

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

ด้วยความสำคัญดังกล่าว ผู้วิจัยจึงศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบที่พบในประเทศไทยด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA) [12,13] โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) ซึ่งใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เพียงชนิดเดียวเพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ ประหยัดค่าใช้จ่าย และสามารถให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแต่ละพันธุ์ [14]

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กล้วยไม้สกุลกุหลาบ

กล้วยไม้สกุลกุหลาบที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้จำนวน 15 พันธุ์ ได้แก่ (1) เอื้องกุหลาบแดง (*Aerides crassifolia* C.S.P.Parish ex Burb.) (2) เอื้องกุหลาบมาลัยแดง (*Aerides multiflora* Roxb.) (3) เอื้องกุหลาบขาว (*Aerides odorata* Lour. var. white) (4) เอื้องกุหลาบกระเป๋าปิด (*Aerides odorata* Lour.) (5) เอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิด (*Aerides falcata* Lindl. & Paxton) (6) เอื้องกุหลาบพวงชมพู (*Aerides falcata* Lindl. & Paxton var. pink) (7) เอื้องกุหลาบเหลืองโคราช (*Aerides houlettiana* Rchb. f.) (8) เอื้องกุหลาบอินทจักร (*Aerides flabellata* Rolfe ex Downie) (9) เอื้องกุหลาบชมพูกระบี่ (*Aerides krabiense* Seidenf.) (10) เอื้องกุหลาบน่าน (*Aerides rosea* Lodd. ex Lindl. & Paxton) (11) เอื้องกุหลาบลอเรนเซีย (*Aerides lawrenciae* Rchb. f.) (12) ลูกผสมของกุหลาบเหลืองโคราช x กุหลาบอินทจักร (13) ลูกผสมของกุหลาบลอเรนเซีย x กุหลาบอินทจักร (14) กุหลาบโกกิ (*Aerides* Koki) ซึ่งเป็นลูกผสมของกุหลาบเหลืองโคราช x กุหลาบลอเลนเซีย และ (15) เอื้องหนวดพราหมณ์ (*Seidenfadenia mitrata* Rchb. f. Garay) ซึ่งเดิมจัดอยู่ในสกุลกุหลาบก่อนแยกเป็นสกุลใหม่ ดังนั้นจึงใช้เป็นตัวอย่างกล้วยไม้นอกกลุ่ม (out group)

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle [15] โดยบดใบกล้วยไม้สกุลกุหลาบในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด แล้วนำผงใบ 3-5 กรัม บ่มในบัฟเฟอร์สกัด (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] 10 มิลลิลิตร ซึ่งมี 2-mercapto-ethanol 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 ผสมให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเทสารละลายทิ้งและล้างตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ล้าง (washing buffer; 10 mM sodium acetate pH 5.2 และ 70 % ethanol) ปล่อยให้แห้งและละลายตะกอนในบัฟเฟอร์อาร์เอ็นเอส (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 เมื่อครบเวลาสกัดด้วย ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25:24:1) 1 ครั้ง และสกัดด้วย คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) อีก 1 ครั้ง หลังจากนั้นจึงย้ายสารละลายใสส่วนบนมาเติม linear polyacrylamide 70 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 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 แล้วละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ทีอี (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 โดยรวมดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 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 [14,17]

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 [14]

2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 15 พันธุ์ โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอกล้วยไม้กุหลาบแต่ละพันธุ์ โดยได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 15 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยเลือกการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) [18]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ไพรเมอร์แบบสุ่มที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 15 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 57 ชนิด (หรือคิดเป็น 79.17 เปอร์เซ็นต์) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

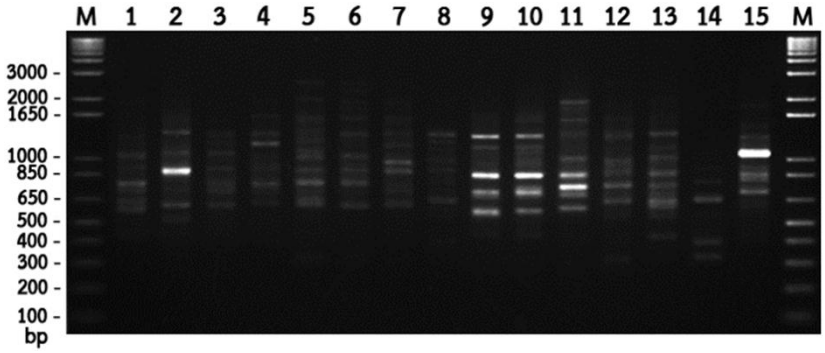
3.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ

เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์แบบสุ่ม 24 ชนิด ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลกุหลาบแต่ละพันธุ์ จำนวน 15 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 467 แถบ ขนาดประมาณ 300-3,000 คู่เบส (base pairs, bp) ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทุกพันธุ์ (monomorphic band) 4 แถบ (หรือคิดเป็น 0.90 เปอร์เซ็นต์) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่พบต่างกันในแต่ละพันธุ์ (polymorphic band) 463 แถบ (หรือคิดเป็น 99.10 เปอร์เซ็นต์)

โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีนั้นมีรูปแบบจำเพาะต่อกล้วยไม้สกุลกุหลาบแต่ละพันธุ์ (ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอดังรูปที่ 1) และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมาย ดีเอ็นเอสำหรับจัดจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลกุหลาบได้ นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ซึ่งให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างของสกุลกุหลาบแต่ละพันธุ์ออกจากกันได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จำนวน 20 ชนิด ได้แก่ A21, A25, A29, A31, A32, B22, B25, B27, B32, C24, C28, C29, C31, D22, D23, D25, E26, E32, F29 และ F32

3.3 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่ากล้วยไม้สกุลกุหลาบที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ทั้ง 15 พันธุ์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.37 ถึง 0.75 เฉลี่ย 0.45 (รูปที่ 2) เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.49 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของกล้วยไม้สกุลกุหลาบได้ 6 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ เอื้องกุหลาบแดง กลุ่ม 2 ได้แก่ เอื้องกุหลาบมาลัยแดง เอื้องกุหลาบชมพู กระบี่ และเอื้องกุกลาบน่าน กลุ่ม 3 ได้แก่ เอื้องหนวดพราหมณ์ กลุ่ม 4 ได้แก่ เอื้องกุหลาบขาว กลุ่ม 5 ได้แก่ เอื้องกุหลาบกระเป๋าปิด เอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิด เอื้องกุหลาบพวงชมพู เอื้องกุหลาบเหลืองโคราช และเอื้องกุหลาบลอเรนเซีย และกลุ่ม 6 ได้แก่ ลูกผสมของกุหลาบเหลืองโคราช x กุหลาบอินทจักร ลูกผสมของกุหลาบลอเรนเซีย x กุหลาบอินทจักร กุหลาบโกกิ และเอื้องกุหลาบอินทจักร (รูปที่ 3)



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ C28 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลกุหลาบ ได้แก่ (1) เอื้องกุหลาบแดง (2) เอื้องกุหลาบมาลัยแดง (3) เอื้องกุหลาบขาว (4) เอื้องกุหลาบกระเป๋าปิด (5) เอื้องกุหลาบกระเป๋าเปิด (6) เอื้องกุหลาบพวงชมพู (7) เอื้องกุหลาบเหลืองโคราช (8) เอื้องกุหลาบอินทจักร (9) เอื้องกุหลาบชมพูกระบี่ (10) เอื้องกุหลาบน่าน (11) เอื้องกุหลาบลอเรนเซีย (12) ลูกผสมของกุหลาบเหลืองโคราช x กุหลาบอินทจักร (13) ลูกผสมของกุหลาบลอเรนเซีย x กุหลาบอินทจักร (14) กุหลาบโกกิ และ (15) เอื้องหนวดพราหมณ์]

3.4 อภิปรายผล

การตรวจสอบกล้วยไม้สกุลกุหลาบ 15 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี เมื่อสกัดแยกดีเอ็นเอและนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 24 ชนิด พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันและใช้ในการจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลกุหลาบได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีในการจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลกุหลาบได้เช่นเดียวกับข้าว [14] พืชวงศ์จำปา [19] กล้วย [20] แพรเซี่ยงไฮ้ [21] ถั่วเขียว [22] กล้วยไม้ช้าง [23] กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย [24] และหม้อข้าวหม้อแกงลิง [25] โดยกล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 15 พันธุ์ สามารถแยกได้โดยใช้ไพรเมอร์เดี่ยว นอกจากนั้นยังพบว่าไพรเมอร์บางชนิดสามารถแยกกล้วยไม้สกุลกุหลาบออกเป็นกลุ่ม ๆ เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอในแต่ละพันธุ์พบว่าสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบได้ โดยแบ่งกล้วยไม้สกุลกุหลาบเป็น 6 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานในแต่ละกลุ่ม ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบได้

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

	Aerides crassifolia	*Aerides multiflora*	*Aerides odorata* var. white	*Aerides odorata*	*Aerides falcata*	*Aerides falcata* var. pink	*Aerides houlettiana*	*Aerides flabellata*	*Aerides krabiense*	*Aerides rosea*	*Aerides lawrenciae*	*A. houlettiana* x *A. flabellata*	*A. lawrenciae* x *A. flabellata*	*Aerides* Koki	*Seidenfadenia mitrata*
Aerides crassifolia	1.00														
Aerides multiflora	0.42	1.00													
Aerides odorata var. white	0.46	0.42	1.00												
Aerides odorata	0.45	0.43	0.54	1.00											
Aerides falcata	0.44	0.49	0.47	0.58	1.00										
Aerides falcata var. pink	0.44	0.48	0.44	0.53	0.66	1.00									
Aerides houlettiana	0.43	0.47	0.49	0.58	0.61	0.62	1.00								
Aerides flabellata	0.32	0.38	0.34	0.34	0.36	0.34	0.40	1.00							
Aerides krabiense	0.43	0.60	0.41	0.45	0.51	0.50	0.50	0.38	1.00						
Aerides rosea	0.44	0.56	0.39	0.47	0.49	0.47	0.48	0.36	0.75	1.00					
Aerides lawrenciae	0.45	0.42	0.41	0.48	0.50	0.50	0.55	0.32	0.49	0.49	1.00				
A. houlettiana x *A. flabellata*	0.48	0.46	0.47	0.48	0.48	0.44	0.46	0.42	0.48	0.50	0.44	1.00			
A. lawrenciae x *A. flabellata*	0.45	0.45	0.41	0.41	0.50	0.46	0.51	0.49	0.47	0.48	0.53	0.56	1.00		
Aerides Koki	0.37	0.41	0.36	0.37	0.41	0.38	0.37	0.36	0.41	0.44	0.38	0.52	0.48	1.00	
Seidenfadenia mitrata	0.44	0.50	0.38	0.36	0.47	.045	0.42	0.39	0.49	0.46	0.44	0.43	0.43	0.43	1.00

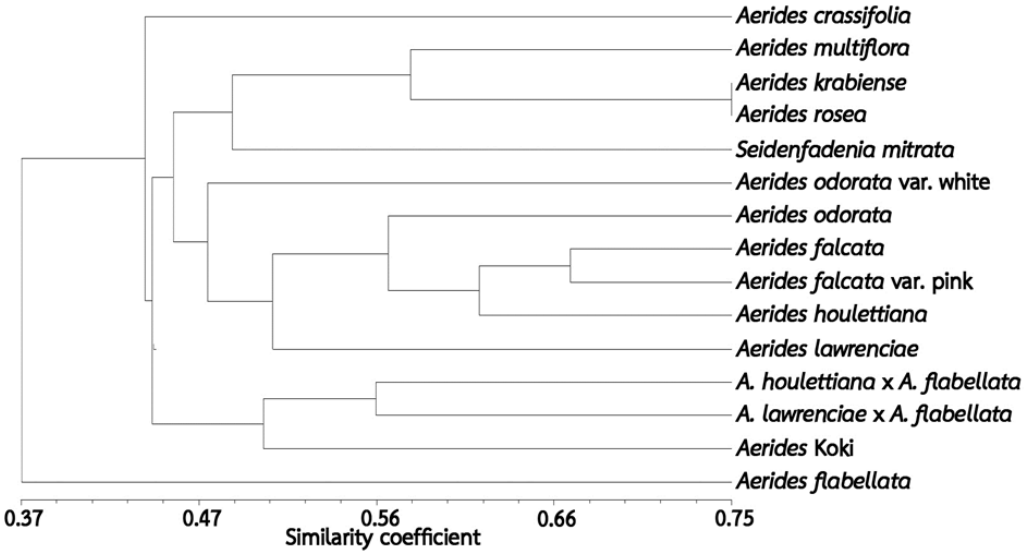
รูปที่ 3 ค่าดัชนีความเหมือนของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ 15 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

4. สรุป

การตรวจสอบกล้วยไม้สกุลกุหลาบ จำนวน 15 พันธุ์ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 24 ชนิด พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์ และพบไพรเมอร์ 20 ชนิด ที่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 15 พันธุ์ ได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสร้างลายพิมพ์แฮตอาร์เอพีดี เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.37 ถึง 0.75 โดยแผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบทั้ง 15 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีในการวิจัยครั้งนี้สามารถแยกกล้วยไม้สกุลกุหลาบออกเป็น 6 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มมีความสอดคล้องกับลักษณะสัณฐาน

5. กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปีงบประมาณ 2556



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ 15 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

6. เอกสารอ้างอิง

[1] ศูนย์ข้อมูลการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, รายงานข้อมูลการค้าระหว่างประเทศของไทย, แหล่งที่มา : http://www2.ops3.moc.go.th/, 5 เมษายน 2557.

[2] ๑๐๘ พรรณไม้ไทย, กล้วยไม้สกุลกุหลาบ *Aerides*, แหล่งที่มา : http://www.panmai.com/Orchid/Aer/aer.shtml, 5 เมษายน 2557.

[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 และณัฐา 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] นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-188.

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

[19] วริสรา แทนสง่า, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในวงศ์จำปาด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Genet. S1: 196-200.

[20] ฐิติพร โท้มโสภา, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยสกุลมิวซาด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Genet. S1: 201-205.

[21] เกียรติชัย แซ่ไต่, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแพรเซี่ยงไฮ้ (*Portulaca grandiflora*) ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Genet. S1: 226-229.

[22] จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2556, การประยุกต์เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีเพื่อตรวจสอบการกลายในถั่วเขียว, Thai J. Genet. S1: 248-252.

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

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

[25] เกียรติชัย แซ่ไต่, เปรมณัช ขุนปักษี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกหม้อข้าวหม้อแกงลิงด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22: 237-242.