



วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

กล้วยไม้ นับเป็นพืชหนึ่งที่มีความหลากหลายทั้งทางด้านรูปร่าง ขนาดลำต้น และใบ ส่วนของดอกก็มีความหลากหลาย และยังสามารถผสมพันธุ์ข้ามชนิด และข้ามสกุลได้อย่างกว้างขวาง (ฐนิตา, 2550) การนำข้อมูลไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ การจำแนก หรือบ่งชี้ชนิดหรือพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจทำได้ยาก ยกเว้นระยะที่มีดอก และในระยะเวลาเจริญเติบโตทางด้านลำต้น (ศิริลักษณ์ และคณะ, 2548)

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis* sp.) ซึ่งเป็นกล้วยไม้สกุลเล็กๆ และมีเพียงไม่กี่ชนิดในโลก ชอบขึ้นเป็นกลุ่มตามพื้นทราย ขอกหิน หรือบนหิน ตามป่าโปร่ง ใบหนาและค่อนข้างกว้าง ดอกมีความหลากหลาย ตั้งแต่สีเกือบขาว ขาวอมชมพู ชมพูอ่อน ไปจนถึงสีม่วงอมชมพูเข้ม (อบฉันท, 2543) กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งนี้ ประกอบด้วย กล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima*) กล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var *buyssonana*) และกล้วยไม้ม้าบิน (*Doritis pulcherrima* var *chumpornensis*) ที่พบบริเวณภาคใต้ของไทย โดยทั้งสามพันธุ์นี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความโดดเด่นของดอกแตกต่างกัน (ระพี, 2530) การจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ในอดีตจัดเป็นส่วนหนึ่งของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* โดยมีชื่อเรียกว่า *Phalaenopsis pulcherrima* และเป็นสกุลย่อยที่สองของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* (Christenson, 2001) ซึ่งอาจเกิดจากความสับสนในการจำแนกความแตกต่างของนักอนุกรมวิธาน เนื่องจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Goh et al, 2005) แม้กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจะเป็นสกุลเล็กๆ และมีเพียงไม่กี่ชนิดในโลกแต่ประเทศไทยก็ยังเป็นแหล่งกำเนิดธรรมชาติของกล้วยไม้สกุลนี้ที่พบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย (ระพี, 2530;

อบฉันท, 2545) โดยเฉพาะกล้วยไม้แดงอุบลที่พบมากในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี (ไพบุลย์, 2521; ศรีประไพ และคณะ, 2543) และพบว่าขณะนี้ปริมาณของกล้วยไม้แดงอุบลในสภาพธรรมชาติได้ลดลงมาก การทราบข้อมูลฐานพันธุกรรม จะเป็นแนวทางในการอนุรักษ์ และเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ของกล้วยไม้พื้นเมืองสกุลนี้ต่อไป

การจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งโดยใช้ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาอาจทำได้ยากในระยะต้นยังเล็ก เนื่องจากลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยามีความคล้ายคลึงกัน แต่เมื่อมีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น และระยะออกดอก จะสามารถแยกความแตกต่างของกล้วยไม้แดงอุบล กล้วยไม้ม้าวิ่งและกล้วยไม้ม้าบินได้อย่างชัดเจน โดยกล้วยไม้แดงอุบลจะมีลักษณะดอกพู่ ขนาดดอกโต กล้วยไม้ม้าวิ่งจะมีลักษณะดอกคู่ ขนาดดอกเล็กกว่ากล้วยไม้แดงอุบล และกล้วยไม้ม้าบินจะมีลักษณะดอกพู่ กลีบดอกหยาบ ดอกมีขนาดเล็ก ดังนั้นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจึงมีความจำเป็นในการตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์ โดยไม่ต้องรอถึงระยะออกดอก เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบได้ในระดับจีโนมไทป์ในขณะที่ต้นยังเล็ก มีความ

เที่ยงตรงสูง จึงไม่มีผลกระทบจากสภาพแวดล้อมและอิทธิพลจากปฏิกริยาร่วมระหว่างสภาพแวดล้อมกับสารพันธุกรรมเข้ามาเกี่ยวข้อง ทำให้ผลการคัดเลือกแม่นยำเที่ยงตรง สะดวกและรวดเร็ว มีจำนวนเครื่องหมายในปริมาณมาก (abundance) ให้ผลการวิเคราะห์คงที่ (สุริพร, 2546) ดังนั้น จึงนิยมนำเครื่องหมาย PCR-based marker มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิงโดยเทคนิคอาร์เอพีดี จำนวน 50 สายต้น จาก 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดร้อยเอ็ด และจังหวัดมุกดาหาร ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการศึกษาระดับความเข้มข้นขององค์ประกอบสารละลายในปฏิกริยาอาร์เอพีดีที่เหมาะสมในกล้วยไม้สกุลม้าวิง พบว่า ระดับความเข้มข้นขององค์ประกอบสารละลายฟิซอร์ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างลายพิมพ์อาร์เอพีดีของกล้วยไม้สกุลม้าวิงในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ 10 นาโนกรัม แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 2.5 มิลลิโมลาร์ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต dNTPs 200 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์อาร์เอพีดี 0.6 ไมโครโมลาร์ และ สารละลาย PCR buffer 1X จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิงโดยใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดีทั้งหมด จำนวน 110 ไพรเมอร์พบว่า มีไพรเมอร์อาร์เอพีดีที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และแสดงความแตกต่างระหว่างสายต้น (polymorphism) จำนวน 27 ไพรเมอร์ นำไปสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิง ได้เครื่องหมายอาร์เอพีดีที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิง (polymorphic bands) จำนวน 204 เครื่องหมาย ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมโดยวิธีของ Dice (Dice's Similarity coefficient) โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี พบว่ามีค่าตั้งแต่ 0.43 ถึง 0.98 คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.69 การจัดกลุ่มความเหมือนทางพันธุกรรม (UPGMA clusters analysis) และการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (PCA) โดยใช้ค่าความเหมือนทางพันธุกรรม พบว่า สามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิงได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยสามารถแยกกลุ่มกล้วยไม้ม้าวิง และกล้วยไม้แดงอุบลได้อย่างชัดเจน ค่าผลรวมที่ได้จากการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก สามปัจจัยแรกสามารถอธิบายความผันแปรทั้งหมดของการประเมินความเหมือนทางพันธุกรรมได้ 43.71 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิงจำนวน 51 สายต้น จาก 5 จังหวัด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดร้อยเอ็ด จังหวัดเลย จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดมุกดาหาร และ จังหวัดศรีสะเกษ โดยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์เอเอฟแอลพี (*EcoRI*+ 3/*MseI*+3) จำนวน 12 คู่ไพรเมอร์ ได้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิง (AFLP markers) จำนวน 319 เครื่องหมาย โดยไพรเมอร์แต่ละคู่ให้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีเฉลี่ยสูงถึง 26.58 เครื่องหมาย ค่า PIC ของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี จำนวน 319 เครื่องหมาย มีค่าตั้งแต่ 0.01-0.50 โดยมีค่า PICs ในช่วง 0.46-0.50 คิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเครื่องหมายทั้งหมด ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมโดยวิธีของ Dice มีค่าตั้งแต่ 0.46 ถึง 0.98 คิดเป็น ค่าเฉลี่ย 0.67 การจัดกลุ่มทางพันธุกรรม (UPGMA cluster analysis) และการ

วิเคราะห์ปัจจัยหลัก (PCA) สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้สกุลม้าวังได้เป็น 4 กลุ่ม และแยกกลุ่มกล้วยไม้ม้าวัง และกล้วยไม้แดงอุบลได้อย่างชัดเจน ผลการวิเคราะห์ PCA สามพารามิเตอร์แรก สามารถอธิบายความผันแปร ของการประเมินความเหมือนทางพันธุกรรมได้ 52.82 เปอร์เซ็นต์

จากผลการวิจัยการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวัง โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีและเครื่องหมายเอเอฟแอลพี ให้ผลสอดคล้องกัน โดยสามารถจัดกลุ่มของกล้วยไม้แดงอุบล และกล้วยไม้ม้าวังได้อย่างชัดเจน โดยไม่ต้องรอถึงระยะการออกดอก ซึ่งต้องใช้เวลานาน 3-4 ปี ผลการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอให้ผลสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในกล้วยไม้สกุลม้าวัง จะใช้ลักษณะของดอกและใบเป็นลักษณะที่บ่งชี้ถึงเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า กล้วยไม้สกุลม้าวังที่รวบรวมจากจังหวัดมุกดาหารในสายต้น MDD20 และ LO2 ขณะต้นยังเล็กจัดอยู่ในกลุ่มของกล้วยไม้แดงอุบล เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี และเครื่องหมายเอเอฟแอลพี สามารถยืนยันได้ว่าสายต้นMDD20 และ LO2 เป็นกล้วยไม้ม้าวัง และเมื่อถึงระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ พบว่า MDD20 มีลักษณะเป็นกล้วยไม้ม้าวัง ทั้งนี้ ดูจากลักษณะใบที่มีลักษณะเรียวยาว ส่วน LO2 เมื่อถึงระยะออกดอก พบว่ามีลักษณะเป็นกล้วยไม้ม้าวัง โดย มีลักษณะดอกกลุ่ม สีขาว สอดคล้องกับการวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ดังนั้น แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในการจำแนกและจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวังได้อย่างชัดเจน ซึ่งข้อดีคือ สามารถจำแนกได้ตั้งแต่ต้นยังเล็กอยู่ ไม่ต้องรอจนถึงระยะออกดอก อีกทั้งให้ผลแม่นยำกว่า เนื่องจากการจำแนกในระดับจีโนมไทป์ ดังนั้น สภาพแวดล้อมจึงไม่มีอิทธิพลต่อลักษณะดังกล่าว

จากการวิเคราะห์ความเหมือนทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวังโดยเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ พบว่า สามารถบ่งชี้ข้อมูลทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวังได้อย่างชัดเจน ซึ่งข้อมูลทางพันธุกรรมนั้นสอดคล้องกับข้อมูลทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ม้าวัง และกล้วยไม้แดงอุบล โดยกล้วยไม้ม้าวังจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากกล้วยไม้แดงอุบลอย่างชัดเจน แต่ลักษณะความแตกต่างดังกล่าวนั้นสามารถแสดงให้เห็นชัดเจนในระยะที่มีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นเต็มที่ และระยะออกดอก และจากการศึกษา พบว่ากล้วยไม้สกุลม้าวังที่มีแหล่งกำเนิด และพื้นที่การเจริญเติบโตที่แตกต่างกันจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างของสภาพแวดล้อม และความอุดมสมบูรณ์ของดินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตการขยายพันธุ์ และการกระจายพันธุ์ กล้วยไม้ที่รวบรวมมาจากพื้นที่เดียวกัน หรือใกล้เคียงกันจะมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในกลุ่มสูง เนื่องจากเกิดการผสมภายในกลุ่มเดียวกัน (inbreeding) ดังนั้นการใช้สภาพพื้นที่ (geographical classification) ของแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกัน สามารถนำมาใช้ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Li et al (2002)

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเทคนิคอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี ในการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิงจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 32 สายต้น พบว่าจากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิง จากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี จำนวน 22 assays สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิงได้ 272 ตำแหน่ง โดยมี polymorphic markers จำนวน 165 เครื่องหมาย คิดเป็นค่าเฉลี่ย 7.5 เครื่องหมาย ต่อไพรเมอร์ ในขณะที่การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี จำนวน 12 assays ได้ polymorphic markers จำนวนสูงถึง 299 เครื่องหมาย คิดเป็นค่าเฉลี่ยของจำนวน polymorphic marker สูงถึง 26.58 เครื่องหมายต่อคู่ไพรเมอร์ โดย เทคนิคเอเอฟแอลพี มีค่า effective multiplex ratio และค่า marker index สูงกว่า เทคนิคอาร์เอพีดี ถึง 3.5 และ 2.9 เท่า ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีมีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิงจากแหล่งกระจายพันธุ์ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ (อาร์เอพีดี และ เอเอฟแอลพี) แสดงให้เห็นว่า เชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิงดังกล่าวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ โดยมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (Dice's similarity coefficient) เฉลี่ย 0.67-0.69 และสามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้ม้าวิง และกล้วยไม้แดงอุบลออกจากกันได้อย่างชัดเจน จาก การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเทคนิคอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพีในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิง แสดงให้เห็นว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีมีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ให้ ค่า effective multiplex ratio และ marker index สูงกว่าเทคนิคอาร์เอพีดี อย่างไรก็ตามเครื่องหมายอาร์เอพีดียังเป็นเทคนิคที่นิยมนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยาก และ มีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการใช้เทคนิคอื่นๆ ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิงนี้ จะเป็นฐานข้อมูลสำคัญทางพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิงเพื่อการค้าต่อไปในอนาคต