การตรวจเอกสาร

กล้วยไม้เป็นพืชที่จัดอยู่ใน Family Orchidaceae ประกอบด้วยกล้วยไม้ชนิดต่างๆ ประมาณ 15,000-30,000 ชนิด (species) และ มากกว่า 800 สกุล (genera) กล้วยไม้ไทยที่ได้รับความนิยมปลูกเลี้ยงได้แก่ สกุลกุหลาบ (*Aerides* spp.), สกุลเข็ม (*Ascocemtrum* spp.), สกุลสิงโตกลอกตา (*Bulbophyllum* spp.), สกุลคาแลนเธ (*Calanthe* spp.), สกุลซีโลจีเน (*Coelogyne* spp.), สกุลซิมบิเดียม (*Cymbidium* spp.),สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.),สกุลม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima*) เป็นต้น สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.) เป็นสกุลที่ใหญ่ที่สุดสกุลหนึ่งมีประมาณ 1,400 ชนิด เป็นไม้ตัดดอกและไม้กระถางที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย (ดรรชิต ธรรมศิริ, 2547) จากการสำรวจกล้วยไม้พื้นเมืองในเขตจังหวัดสกลนครและจังหวัดใกล้เคียง พบว่ามีมากถึง 23 สกุล จำนวน 47 ชนิด และมีหลายชนิดที่มีลักษณะดอกที่สวยงามเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค และสามารถนำมาผลิตในเชิงการค้าได้หลายชนิด เช่น สกุลหวาย ได้แก่ เอื้องผึ้ง เอื้องสาย เอื้องเค้าก่ว สกุลกุหลาบ ได้แก่ พวงมาลัย กุหลาบเหลืองโคราช กุหลาบแดง กุหลาบกระเป๋าเปิด สกุลช้าง ได้แก่ ช้างกระ ไอยเรศ เขาแกะ สกุลแวนด้า ได้แก่ สามปอย นก สามปอยขุนตาล (ราตรีและคณะ, 2542)

ในการจำแนกชนิดของกล้วยไม้สามารถทำได้หลายวิธีคือ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology), การศึกษาระดับดีเอ็นเอ โดยวิธีการที่ใช้กันมากคือ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ได้แก่ Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) (Botstein *et al.,* 1980), Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) (Vos *et al.*, 1995), และ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Williams *et al.*, 1990) เป็นต้น สำหรับเทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจหาความหลากหลายของดีเอ็นเอซึ่งถูกสุ่มเพิ่มปริมาณส่วนของดีเอ็นเอโดยใช้ primer เพียงชนิดเดียวขนาดประมาณ 8-10 nucleotides ใน genome อาจมีหลายบริเวณที่ primer เข้าไปเกาะได้ ถ้า primer เข้าไปเกาะในบริเวณที่ห่างไกลกันมากหรือในทิศทางเดียวกันจะไม่เกิดผลผลิตจากการทำปฏิกิริยา PCR (Williams *et al.*, 1990)

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เพื่อใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชเป็นการศึกษาถึงรูปแบบของแถบชิ้นดีเอ็นเอที่แยกออกจากกันบนตัวกลางตามโครงสร้างของดีเอ็นเอพืชซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะต้น ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากพืชแต่ละต้นจะสามารถตรวจสอบซ้ำและให้ผลที่เหมือนกันตลอด (Morris, 1994) นอกจากนี้การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ถูกนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์พืช (marker-assisted breeding) (Peleman and van der voort, 2003) ในปัจจุบันได้มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอในกล้วยไม้หลายชนิด (สุภาพ และคณะ, 2548;ประเดิม, 2543; Mant *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2000; Gustafsson, 2000)

ปัจจุบันเทคนิคที่ใช้ในการตรวจลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprint) มีดังนี้

1.การทำไฮบริไดเซชั่น (Hybridization) ได้แก่

- อาร์เอฟแอลพี (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) คือการหาความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอ ที่เกิดจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) นำมาแยกขนาดโดยวิธี อะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส แล้วทำ Southern bolt hybridization กับตัวตรวจหา (probe) ที่เหมาะสม ซึ่งอาจติดฉลากด้วยสารกัมมัตรภาพรังสีหรือสารที่ซึ่งง่ายต่อการตรวจหา เพื่อหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกับตัวตรวจหาที่ใช้ (Botstein *et al.*, 1980)

2. การใช้ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) เป็นการวิเคราะห์ดีเอ็นเอจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับช่วงของดีเอ็นเอ โดยต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายก่อน

จากการรายงานการค้นพบเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นสั้นๆ ซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่นหลายชนิด หลักการทำพีซีอาร์ ขั้นตอนแรก ต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์สั้นๆ 2 ชนิด แต่ละชนิดมีเบสคู่ผสมกับส่วนปลาย 3' ของเส้นดีเอ็นเอที่ต้องการนั้น เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ใช้โดยทั่วไปมีความยาวประมาณ 20-35 เบสแล้วนำโอลิโกไทด์ทั้งสองชนิดใส่ร่วมกับดีเอ็นเอทั้งหมดที่แยกได้จากเซลล์ โดยใส่ในปริมาณที่มากเกินพอ ทำให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน แล้วจึงลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์ซึ่งมีเบสเป็นคู่กับยีนที่ต้องการและมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนอื่นๆ มาจับคู่กับเส้นดีเอ็นเอที่ต้องการ เปลี่ยนอุณหภูมิเพื่อให้เหมาะกับการใช้งานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสพร้อม ทั้งใส่เอนไซม์ลงในปฏิกิริยาจะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้น การเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพไปเป็นสายเดี่ยว ลดอุณหภูมิเพื่อให้เกิดการจับตัวของไพรเมอร์กับส่วนปลายดีเอ็นเอนั้น แล้วเปลี่ยนเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับเอนไซม์ที่ใส่ลงไป ทำซ่นนี้ 30-40 รอบ ปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการก็จะเพิ่มขึ้นหลายล้านเท่า (สุรินทร์ ,2536)

ในปัจจุบันเทคนิคพีซีอาร์ที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ได้แก่

-อาร์เอพีดี(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) คือเทคนิคในการตรวจหาความหลากหลายของดีเอ็นเอซึ่งถูกสุ่มเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยไม่ทราบลำดับเบสในบริเวณที่เพิ่มโดยใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียว (single primer) ขนาดป ระมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้นมีโอกาสที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้ในหลายบริเวณ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้ในบริเวณที่ห่างไกลกันมากๆ หรือในทิศทางเดียวกันจะไม่เกิดผลผลิตขึ้นจากการทำปฏิกริยาพีซีอาร์ (Williams *et al.*,1990)

การตรวจผลของอาร์เอพีดีนั้นจะใช้วิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (agarose gel electrophoresis) ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้แยกกรดนิวคลีอิคออกจากกันด้วยสนามไฟฟ้า โดยอาศัยความแตกต่างของชนิด และปริมาณของประจุ ขนาด และรูปร่างของโมเลกุลของสารที่ต้องการจะแยกนั้น

การแยกชีวโมเลกุลในสนามไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซีสจะทำในตัวกลาง โดยการใส่สารที่ต้องการแยกลงในตัวกลาง แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าให้ผ่านตัวกลางนั้น ดังนั้นจึงมีอิเล็คโตรโฟรีซีสหลายชนิดทั้งนี้ขึ้นกับตัวกลาง เช่น โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (polyacrylamine gel electrophoresis) เมื่อใช้โพลีอะคริลาไมล์เจล, starch gel electrophoresis เมื่อ ใช้ starch gel เป็นต้น ส่วนอะคริลาไมด์เจลในการแยกดีเอ็นเอด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็คโตรโฟรีซีส จะใช้บัฟเฟอร์ ซึ่งมี pH ประมาณ 8 ซึ่งที่ pH นี้ ดีเอ็นเอจะมีประจุลบเนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟอตเฟตทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนตัวเข้าสู่ขั้วบวกของสนามไฟฟ้าบนตัวกลาง (ศิริพร, 2531)

เทคนิคอาร์เอพีดีมีข้อดีที่สามารถทำพีซีอาร์ได้โดยไม่ต้องทราบลำดับเบสที่บริเวณใดเลยของดีเอ็นเอในจีโนมโดยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอได้เหมือนกับอาร์เอฟแอลพี แต่ตรวจสอบผลได้ง่ายและรวดเร็วกว่า ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ต่ำกว่าวิธีอื่น (สุรินทร์, 2536; พรพันธ์,2538) แต่มีข้อด้อยคือตรวจสอบได้เฉพาะลักษณะเด่น การตรวจสอบสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันมากหรือมีความแตกต่างกันของยีนเพียงไม่กี่ตำแหน่งทำได้ยาก การทำซ้ำอาจไม่ได้ผลเหมือนเดิมเนื่องจากไพรเมอร์จะเข้าไปจับบนดีเอ็นเอต้นแบบโดยสุ่ม โดยอาจไปจับตำแหน่งอื่นบนจีโนมทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่เปลี่ยนไป (พรพันธ์,2538)

- ดีเอเอฟ (DNA Amplification Fingerprinting , DAF) เป็นเทคนิคที่เหมือนกับ อาร์เอพีดี แต่ใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสสั้นกว่า โดยมีขนาดประมาณ 5 เบส และตรวจสอบโดยใช้โพลีอะครีลาไมด์เจล (Polyacrylamide gel) กับ silver staining วิธีการนี้สามารถตรวจนับแถบดีเอ็นเอได้มากกว่า วิธีอาร์เอพีดี เนื่องจากโพลีอะครีลาไมด์เจลสามารถแยกแถบดีเอ็นเอขนาดเล็กได้ดีกว่า (Caetano-Anolles *et al.*, 1991)

-เอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) คือเทคนิคการตรวจหาความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอ ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ร่วมกับการใช้เทคนิคพีซีอาร์ (Vos *et al.*, 1995)

-อาร์เอเอ็มพีโอ (Random Amplified Microsatellite Polymorphism, RAMPO) คือเทคนิคในการใช้ตรวจหาความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอาร์เอพีดี โดยการใช้ตัวตรวจหาชนิดไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite probe) ซึ่งติดฉลากด้วยฟลูออเรสซีน (fluorescein) (Richardson *et al.*, 1995)

-เอสทีอาร์อาร์ (Short Tandemly Repeated Repetitive Sequence, STRR) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบหาความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสซ้ำของดีเอ็นเอขนาดสั้นๆ เรียงตามลำดับต่อกันเป็นช่วงๆ (Rasmussen และ Svenning, 1998)

-เอเอสอาร์ (Simple Sequence Repeats, SSR) หรือ microsattelites คือเทคนิคในการตรวจหาความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่รวมเอาลำดับเบสซ้ำซึ่งมีความยาว 2-5 เบส ที่ซ้ำกันเป็นจำนวนมากและกระจายอยู่บนโครโมโซม โดยการใช้ไพรเมอร์ที่มี

ลำดับเบสตรงบริเวณส่วนนอกของลำดับเบสซ้ำ ซึ่งเป็นส่วนที่อนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดในการเพิ่มปริมาณของไมโครแซทเทลไลท์ (Zietkiewicz *et al.*,1994)

เทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่ได้ถูกนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้ในงานวิจัยด้านการเกษตรอย่างมากมาย เพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อการจำแนกพันธุ์ในพืชหลายชนิด เช่น การจำแนกหัวหอม (*Allium cepa*) และ*Allium* ชนิดอื่นๆ โดยการใช้ไพรเมอร์จำนวน 20 ชนิด ซึ่งแถบดีเอ็นเอจำนวน 91 แถบ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 7 ชนิด ที่ทำให้เกิด polymorphism ระหว่างพันธุ์ โดยมีดัชนีความเหมือนภายในชนิดอยู่ในช่วง 0.41 – 0.77 (Wikie *et al.*, 1993) การตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมัน(*Elaeis guineensis*) ด้วยเทคนิคอาร์พีดี โดยการใช้ไพรเมอร์ 20 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 9 ชนิด สามารถแสดง polymorphism ในช่วง 0.2 2.3 kb และค่าดัชนีความเหมือนภายในชนิดอยู่ในช่วง 0.16 – 10.44 (Shah *et al.*, 1994) การ ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าว (*Oryza sativa* L.) ซึ่งเป็นข้าวนาดอน จำนวน 9 สายพันธุ์ และข้าวนาลุ่ม จำนวน 4 สายพันธุ์ พบว่าการใช้ไพรเมอร์ 42 ชนิด ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวน 260 แถบ และ 80 เปอร์เซ็นของแถบดีเอ็นเอนั้นแสดง polymorphism โดยมีดัชนีความเหมือนภายในกลุ่มทั้ง 13 สายพันธุ์ อยู่ในช่วง 0.21 – 0.80 (Yu และ Nguyen, 1993) การศึกษา polymorphism ในกล้วยไม้สกุลแคทลียาด้วยเทตนิคอาร์พีดี โดยการใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด พบว่าไพรเมอร์จำนวน 9 ชนิดทำให้เกิด unique DNA fingerprint โดยดัชนีความเหมือนระหว่างชนิดอยู่ในช่วง 0.22 – 0.61 (Benner *et al.*, 1995) วินิตชาญ (2540) นำเทคนิคอาร์พีดีมาใช้แยกความแตกต่างของหญ้าแฝก 10 พันธุ์ ด้วยการใช้ไพรเมอร์ 144 ชนิด พบว่ามีอยู่ 12 ชนิด ที่ทำให้เกิด polymorphism นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจแยกหญ้าแฝกหอมและหญ้าแฝกดอนได้ด้วย สำหรับการนำเทคนิคอาร์เอพีดีมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ ในปี 1991 Michelmore และคณะ ได้ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับยีนต้านทานต่อโรคราน้ำค้างในผักกาดหอมโดยใช้วิธี bulked segregrant analysis ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่ามีไพรเมอร์ 3 ชนิด จาก 100 ชนิด ที่สามารถใช้ตรวจหายีนดังกล่าว การตรวจสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายโดย Kelly และ Miklas (1998) ที่อยู่ใกล้กับยีนต้านทานต่อโรคในถั่วลันเตา (*Phaseolus vulgaris* L.) เพื่อช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ สามารถตรวจพบไพรเมอร์จำนวน 25 ชนิด ซึ่งอยู่ใกล้กับยีนต้านทานต่อโรคของ common bean

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ด้วยการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ อันเป็นเครื่องหมายที่บ่งชี้ถึงเอกลักษณ์ของกล้วยไม้แต่ละชนิดได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดของกล้วยไม้ ตลอดจนสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการวิเคราะห์หาโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อเป็นเครื่องมือช่วยในการคัดเลือกลักษณะของกล้วยไม้ที่ต้องการอย่างมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต

099486

อุปกรณ์และวิธีการ

1. กล้วยไม้ท้องถิ่นสกุลหวายที่ใช้ในการศึกษา

เป็นกล้วยไม้ที่ได้จากการรวบรวมจากจังหวัดสกลนครและพื้นที่ใกล้เคียง จำนวน 18 ชนิด (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 กล้วยไม้ท้องถิ่นสกุลหวายที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับที่	ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์
1	เอื้องสายล่องแล่ง	*Dendrobium aphyllum*
2	เอื้องคำป๊อก	*Dendrobium capillipes*
3	เอื้องเงินแดง	*Dendrobium cariniferum*
4	เอื้องเมี้ยง	*Dendrobium devonianum*
5	เอื้องเงิน	*Dendrobium draconis*
6	เอื้องคำฝอย	*Dendrobium harveyanum*
7	เอื้องผึ้งแคระ	*Dendrobium ilndleyi*
8	เอื้องไม้เท้าฤาษี	*Dendrobium pendulum*
9	เอื้องแปรงสีฟัน	*Dendrobium secundum*
10	เอื้องเค้ากิ่ว	*Dendrobium signatum*
11	เอื้องจำปาน่าน	*Dendrobium sulcatum*
12	เอื้องม่อนไข่	*Dendrobium thyrsiflorum*
13	เอื้องคำปากไก่	*Dendrobium trigonopus*
14	เอื้องสายน้ำผึ้ง	*Dendrobium primulinum*
15	เอื้องสายน้ำผึ้งลาว	*Dendrobium primulinum*
16	เอื้องตะขาบ	*Dendrobium ochreatum*
17	สามปอยขุนตาล	*Vanda denisoniana*
18	เอื้องเข็มแสด	*Ascocentrum miniatum*

วิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ

1. เอื้องสายล่องแล่ง

2. เอื้องคำป๊อก

3. เอื้องเงินแดง

4. เอื้องเมี้ยง

5. เอื้องเงิน

6. เอื้องคำฝอย

ภาพที่ 1 ลักษณะของกล้วยไม้ท้องถิ่นสกุลหวายที่ใช้ในการศึกษา

7. เอื้องผึ้งแคระ

8. เอื้องไม้เท้าฤาษี

9. เอื้องแปรงสีฟัน

10. เอื้องเค้ากิ่ว

11. เอื้องจำปาน่าน

12. เอื้องม่อนไข่

ภาพที่ 1 (ต่อ) ลักษณะของกล้วยไม้ท้องถิ่นสกุลหวายที่ใช้ในการศึกษา

13. เอื้องคำปากไก่

14. เอื้องสายน้ำผึ้ง

15. เอื้องสายน้ำผึ้งลาว

16. เอื้องตะขาบ

17. สามปอยขุนตาล

18. เอื้องเข็มแสด

ภาพที่ 1 (ต่อ) ลักษณะของกล้วยไม้ท้องถิ่นสกุลหวายที่ใช้ในการศึกษา

2. การสกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้

การสกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ สกัดด้วยชุดสกัด DNA – sabai kit (คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) โดยการบดตัวอย่างใบอ่อนกล้วยไม้ในไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียดแล้วตักใส่ microfuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หรือประมาณ 1/3 ของหลอด (ประมาณ 100 มิลลิกรัมของตัวอย่าง) เติม buffer DA ที่อุ่น 65 °C 500 µl และ เติม buffer DB ที่อุ่น 65 °C 40 µl vortex นาน 10 วินาที บ่มที่ 65 °C นาน10 นาที ใน waterbath แล้วย้ายหลอดมาตั้งที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที เติม RNaseA 5 µl (10 mg/ ml) แล้วผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 °C นาน15 นาที จากนั้นเติม Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1) 500 µl vortex นาน 10 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงแบบตั้งโต๊ะที่ความเร็ว รอบ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ดูดส่วนใสชั้นบน 500 µl ใส่ใน microfuge tube หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol ที่แช่เย็น 500 µl กลับหลอดไปมา นาน 30 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่ 4 °C นาน 10 นาที ดูดสารละลายทิ้ง นำตะกอนดีเอ็นเอมาล้างด้วย 80% ethanol ปริมาตร 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ที่ 4 °C นาน 10 นาที ดูดสารละลายทิ้ง นำตะกอนดีเอ็นเอไปทำให้แห้ง แล้วละลายในตัวทำละลายคือ 1xTE buffer และนำมาตรวจหาปริมาณดีเอ็นเอรวมด้วยวิธี gel electrophoresis บน 0.8 % Agarose Gel ใน 1XTAE buffer และเปรียบเทียบขนาดด้วย 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA) โดยนำเจลมาย้อมสีด้วย Ethidium bromide ตรวจดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 320 nm และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิตอล

3. การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ทำการทดสอบเบื้องต้นสำหรับไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยการใช้ไพรเมอร์จากที่มีการรายงานการทดลองโดย สุภาพ และคณะ, 2548 ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและชัดเจนในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า จำนวน 17 ชนิด (ตารางที่ 2) โดยสังเคราะห์ไพรเมอร์อาร์เอพีดีที่บริษัท Pacific Science และบริษัท BioDesign

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

หมายเลขไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ที่มา
S1	GTTTCGCTCC	Pacific Science
S21	CAGGCCCTTC	Pacific Science
S23	AGTCAGCCAC	Pacific Science
S33	CAGCACCCAC	Pacific Science
S59	CTGGGGACTT	Pacific Science
S62	GTGAGGCGTC	Pacific Science
S65	GATGACCGCC	Pacific Science
S73	AAGCCTCGTC	Pacific Science
S79	GTTGCCAGCC	Pacific Science
S80	ACTTCGCCAC	Pacific Science
S90	AGGGCCGTCT	Pacific Science
S93	CTCTCCGCCA	Pacific Science
S147	AGATGCAGCC	Pacific Science
P2672	AAGGCGCGAACG	Pacific Science
P2674	GAGCTCCCGACA	BioDesign
ISSR11	GAGAGAGAGAGAGAGAC	Pacific Science
ISSR25	ACACACACACACACACT	BioDesign

3.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างกล้วยไม้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยดัดแปลงมาจาก Padmalatha, K. and Prasad, M. N. V., 2006 ซึ่งมีองค์ประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีปริมาตรรวม 20 µl ในแต่ละปฏิกิริยา ประกอบด้วย DNA Template 50 ng, 10x PCR buffer (100mM Tris-HCl, 500mM KCl, 0.8% Nonidet P-40, 20 mM $MgCl_2$ pH 8.8) 2 µl, 3mM $MgCl_2$ (Fermentas, USA), 2 mM dNTPs 2 µl, 7.5 µM of single RAPD primer, 0.3 µl (5 unit/ µl) of Taq DNA Polymerase (Fermentas, USA) และน้ำกลั่น 12.6 µl

สำหรับสภาวะของปฏิกิริยา PCR ซึ่งใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อง Thermal Cycler (Bioer Technology, Japan) โปรแกรมการทำงานประกอบด้วยการคลายเกลียวและการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 ^{o}C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วยที่อุณหภูมิ 94 ^{o}C นาน 45 วินาที อุณหภูมิ 37 ^{o}C นาน 1 นาที อุณหภูมิ 72 ^{o}C นาน 1 นาที จำนวน 30 รอบ และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้สมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 72 ^{o}C นาน 7 นาที จำนวน 1 รอบ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงสภาวะสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ (^{o}C)	เวลา
Initial denaturation	94	3 mins
Denaturation	94	45 sec
Annealing	37	1 min (30 รอบ)
Extension	72	1 min
Final extension	72	7 mins

4. การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์

ทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธี gel electrophoresis บน 2 % Agarose Gel ใน 1XTAE buffer และเปรียบเทียบขนาดด้วย 1 Kb DNA ladder (Fermentas, USA) แล้วนำมาย้อมสีด้วย Ethidium bromide ตรวจดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 320 nm และถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิตอล

5. การวิเคราะห์ความแตกต่าง

เปรียบเทียบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างกล้วยไม้ที่ศึกษาโดยดูจากจำนวนและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้

6. สถานที่ทำการทดลอง

ทำการทดลองที่คณะเทคโนยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี และสถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรสกลนคร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน

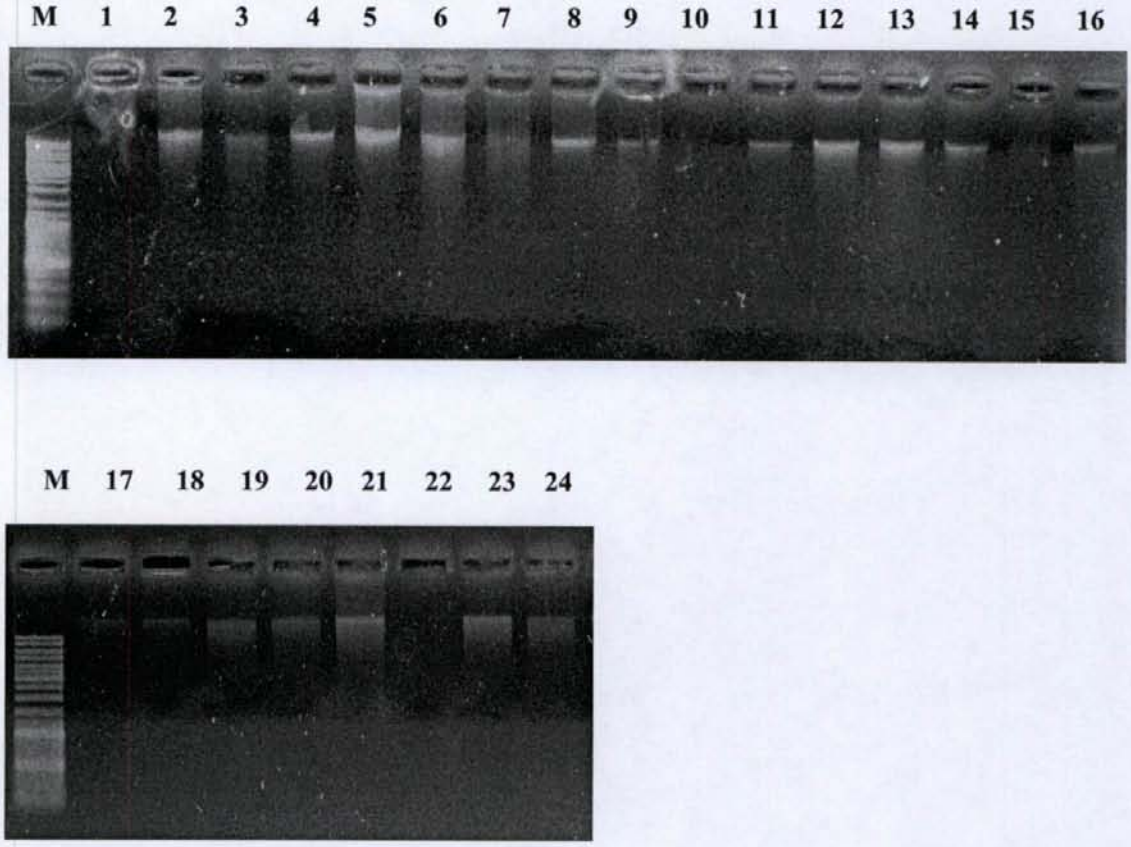
7. ระยะเวลาทำการวิจัย

ระยะเวลาทำการวิจัยตั้งแต่ ตุลาคม 2549 ถึง กันยายน 2551

ผลและวิจารณ์

การสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของกล้วยไม้จำนวน 24 ตัวอย่าง (ภาพที่ 2) และวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis และวัดการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 320 nm พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้คุณภาพค่อนข้างดี แต่มีกล้วยไม้บางชนิด เช่น เอื้องเงิน เอื้องเงินแดง เอื้องเค้าก๋ว เอื้องม่อนไข่ เอื้องคำปากไก่ เอื้องแปรงสีฟัน เอื้องจำปาน่าน สามปอยขุนตาล เข็มแสด เป็นต้น ที่ดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะเป็นเมือกเนื่องจากมีปริมาณของโพลีแซคคาไรด์ปนและไม่สามารถกำจัดออกไปจากดีเอ็นเอในขั้นตอนของการสกัดได้ จึงควรหาวิธีการเพิ่มเติมในการขจัดสารพวกโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งจะเป็นการช่วยลดปัญหาการรบกวนของโพลีแซคคาไรด์ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในขั้นตอนของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

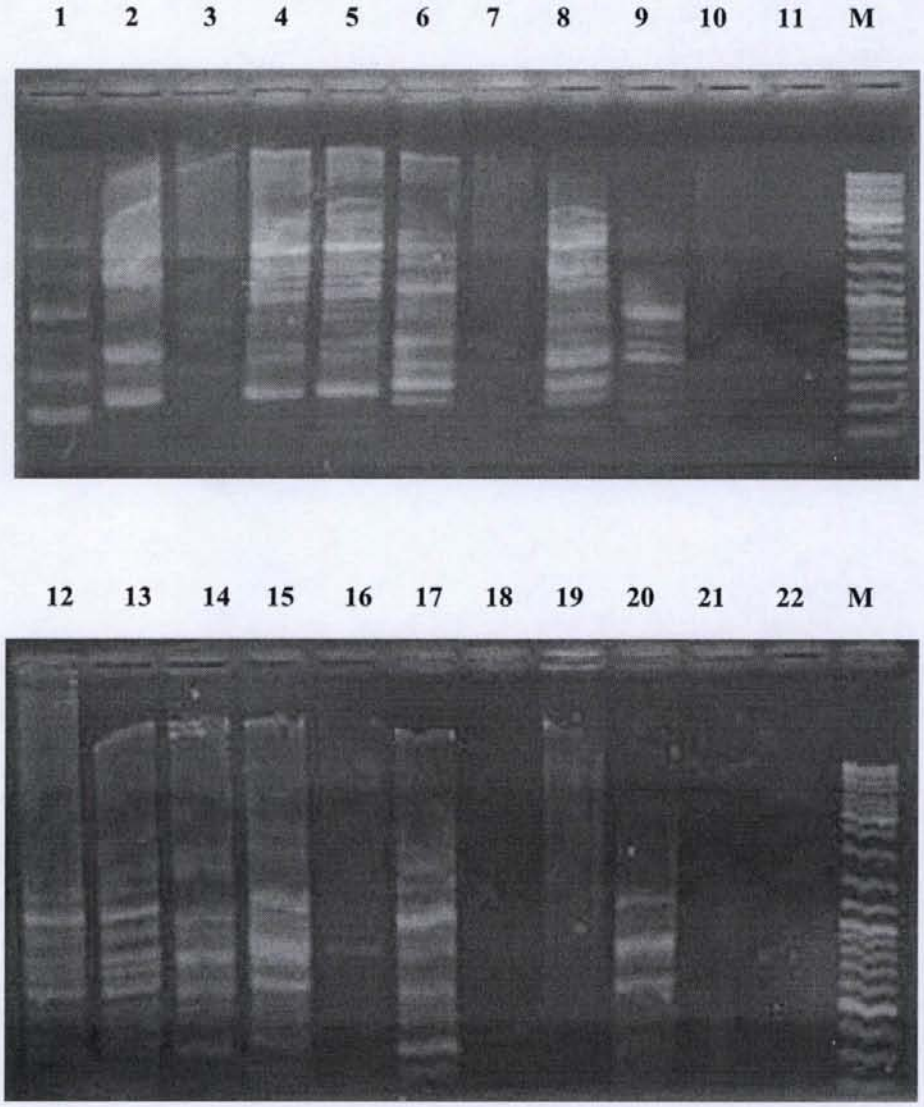


ภาพที่ 2 แสดงปริมาณดีเอ็นเอรวมที่ได้จากการสกัดตัวอย่างใบอ่อนกล้วยไม้ท้องถิ่นสกุลหวายที่ใช้ในการศึกษาด้วยวิธี gel electrophoresis บน 0.8 % Agarose Gel และเปรียบเทียบขนาดด้วย 1 Kb DNA ladder

M = 1 Kb DNA ladder,1 เอื้องเงิน, 2 เอื้องสายน้ำผึ้ง, 3 เอื้องคำป๊อก, 4 เอื้องเงินแดง, 5 เอื้องสายมรกต, 6 เอื้องคำ, 7 เอื้องสายน้ำเขียว, 8 หวายตะมอย, 9 เอื้องเมี่ยง, 10 เอื้องสายล่องแล่ง, 11 เอื้องทอง, 12 เอื้องคำฝอย, 13 เอื้องผึ้ง, 14 เอื้องเค้าก่ิวลูกผสม, 15 เอื้องผึ้งแคระ, 16 เอื้องจำปาน่าน, 17 เอื้องม่อนไข่, 18 เอื้องคำปากไก่, 19 เอื้องสายน้ำผึ้งลาว, 20 เขาแพะ, 21 พวงหยก, 22 เอื้องตะขาบ, 23 สามปอยขุนตาล, 24 เอื้องแปรงสีฟัน

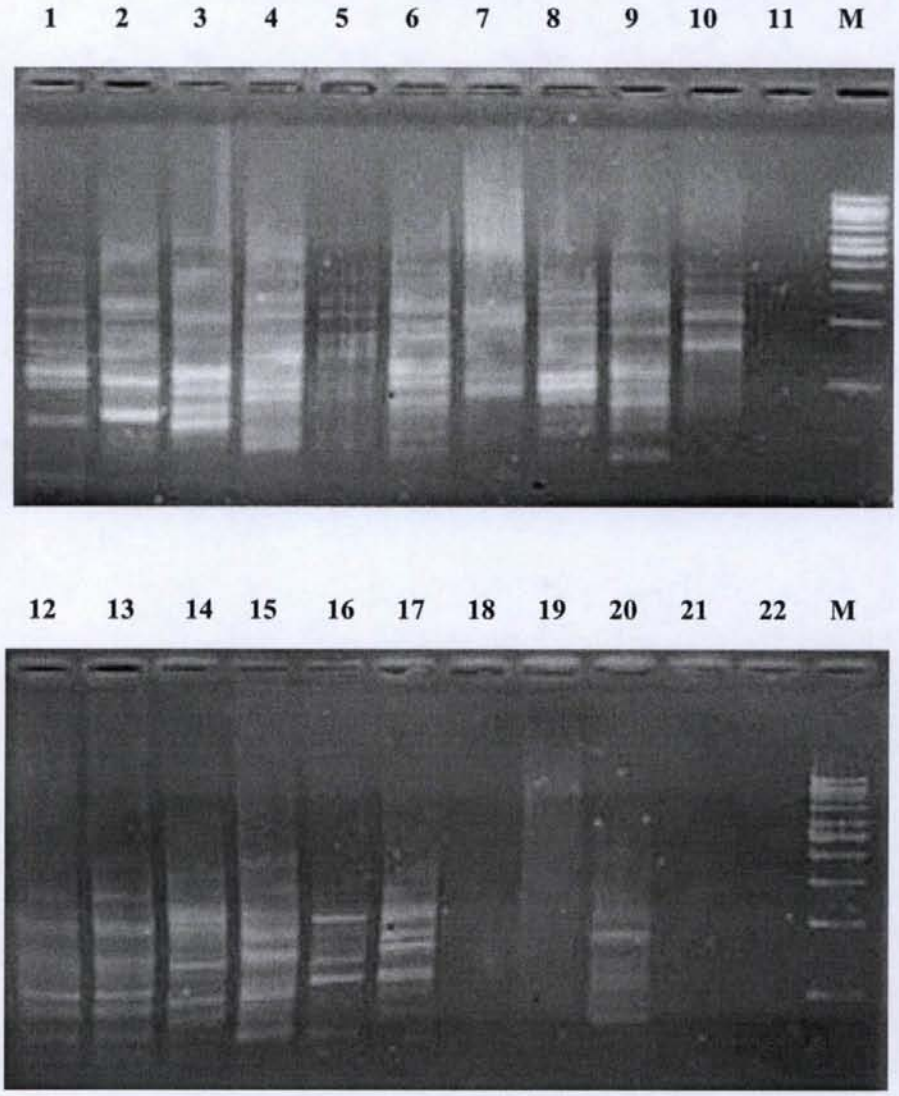
การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

จากการทดสอบไพรเมอร์ จำนวน 17 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ จำนวน 4 ชนิด คือ S73, S90, S147 และ ISSR11 ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนจำนวน 9, 6, 7 และ 6 แถบ ขนาดตั้งแต่ 200-2500 คู่เบส (ภาพที่ 3-6) ในกล้วยไม้ที่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้คุณภาพค่อนข้างดี แต่ในกล้วยไม้ที่ไม่สามารถกำจัดโพลีแซคคาไรด์ออกไปจากดีเอ็นเอที่ได้พบว่าไม่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิด ซึ่งกล้วยไม้แต่ละชนิดให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันไป ยกเว้นเอื้องสายน้ำผึ้งและเอื้องสายน้ำผึ้งลาวที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมือนกันเมื่อสังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ S73, S90 และ S147 และให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างเอื้องสายล่องแล่งที่มีลักษณะทางสรีรวิทยาของส่วนดอกที่คล้ายคลึงกันมากกับเอื้องสายน้ำผึ้งลาว



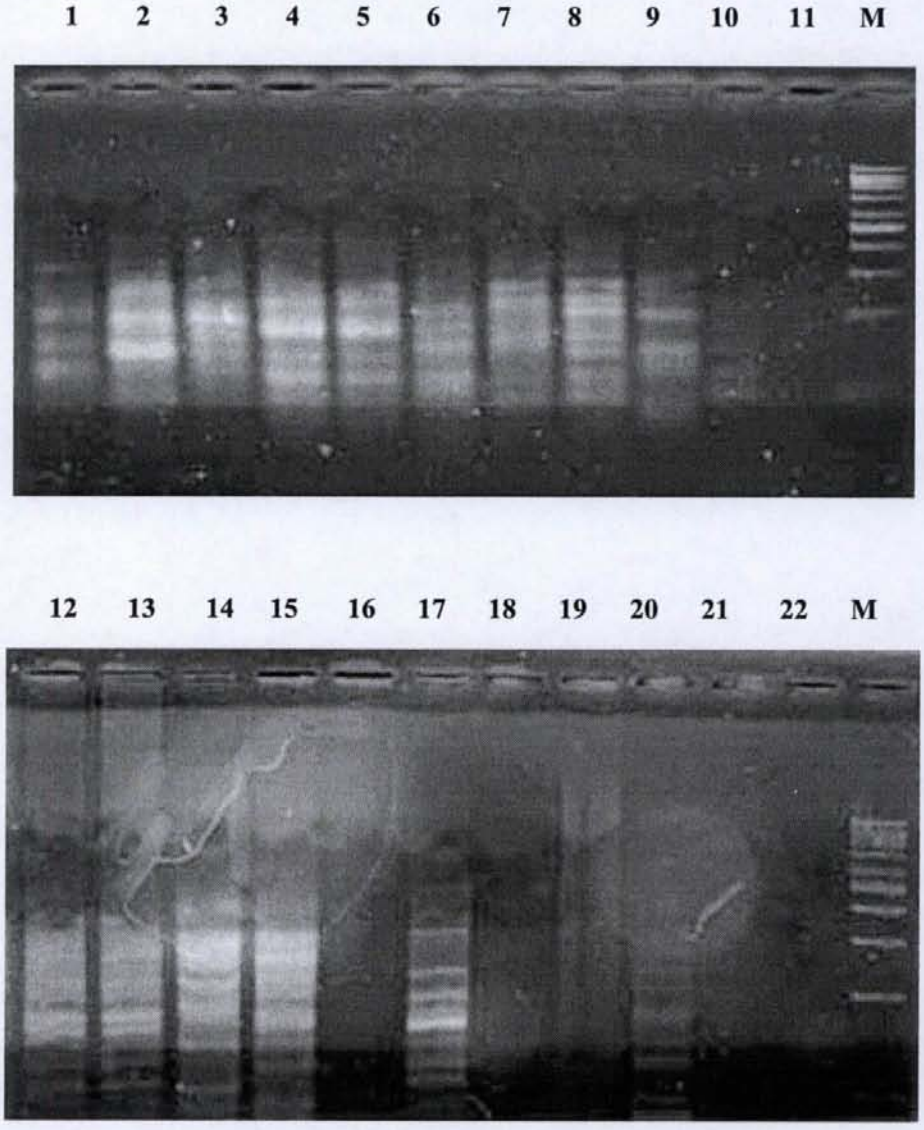
ภาพที่ 3 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอกล้วยไม้ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ S73

M = 1 Kb DNA ladder, 1 เอื้องสายล่องแล่ง, 2 เอื้องคำป๊อก, 3 เอื้องผึ้งแคระ, 4 เอื้องเมี้ยง, 5 เอื้องเงิน, 6 เอื้องคำฝอย, 7 - , 8 ไม้เท้าฤาษี, 9 เอื้องเค้าก่ิว, 10 เอื้องม่อนไข่, 11 เอื้องคำปากไก่, 12 เอื้องสายน้ำผึ้งลาว, 13 เอื้องสายน้ำผึ้ง, 14 เอื้องตะขาบ, 15 สามปอยขุนตาล, 16 เข็มแสด, 17 เอื้องคำฝอย, 18 เอื้องจำปาน่าน, 19 เอื้องแปรงสีฟัน, 20 สามปอยขุนตาล, 21 เอื้องเงินแดง, 22เอื้องแปรงสีฟัน



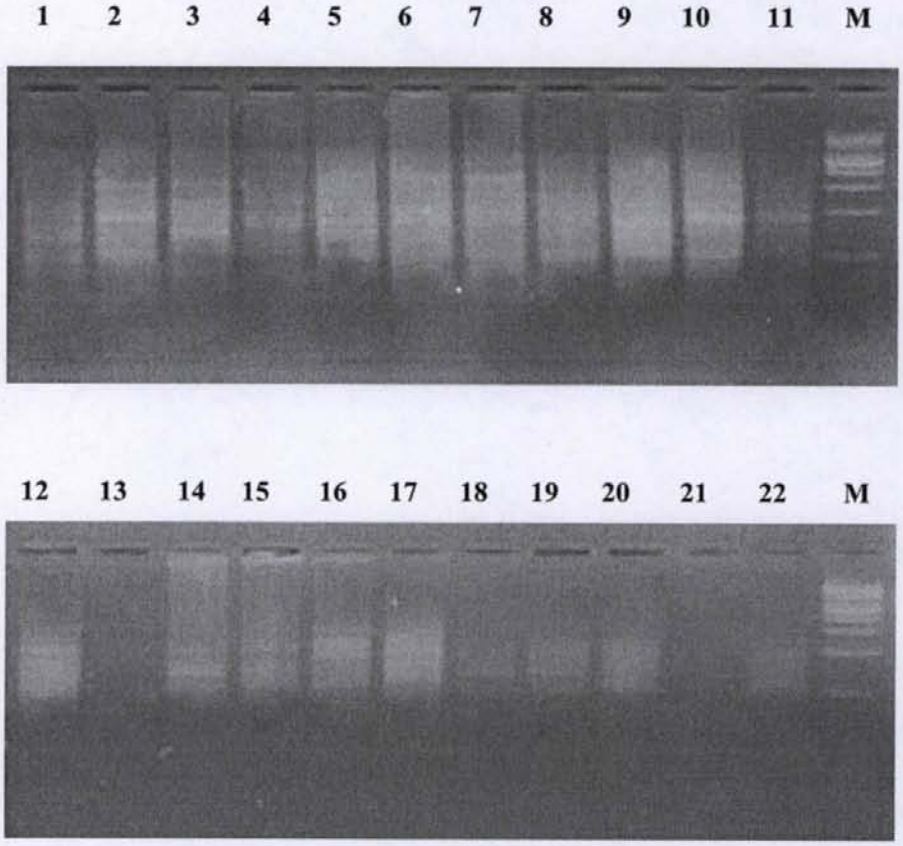
ภาพที่ 4 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอกล้วยไม้ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ S90

M = 1 Kb DNA ladder, 1 เอื้องสายล่องแล่ง, 2 เอื้องคำป๊อก, 3 เอื้องผึ้งแคระ, 4 เอื้องเมี้ยง, 5 เอื้องเงิน, 6 เอื้องคำฝอย, 7 - , 8 ไม้เท้าฤาษี, 9 เอื้องเค้ากิ่ว, 10 เอื้องม่อนไข่, 11 เอื้องคำปากไก่, 12 เอื้องสายน้ำผึ้งลาว, 13 เอื้องสายน้ำผึ้ง, 14 เอื้องตะขาบ, 15 สามปอยขุนตาล, 16 เข็มแสด, 17 เอื้องคำฝอย, 18 เอื้องจำปาน่าน, 19 เอื้องแปรงสีฟัน, 20 สามปอยขุนตาล, 21 เอื้องเงินแดง, 22เอื้องแปรงสีฟัน



ภาพที่ 5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอกล้วยไม้ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ S147

M = 1 Kb DNA ladder, 1 เอื้องสายล่องแล่ง, 2 เอื้องคำป๊อก, 3 เอื้องผึ้งแคระ, 4 เอื้องเมี้ยง, 5 เอื้องเงิน, 6 เอื้องคำฝอย, 7 - , 8 ไม้เท้าฤาษี, 9 เอื้องเค้ากิ่ว, 10 เอื้องม่อนไข่, 11 เอื้องคำปากไก่, 12 เอื้องสายน้ำผึ้งลาว, 13 เอื้องสายน้ำผึ้ง, 14 เอื้องตะขาบ, 15 สามปอยขุนตาล, 16 เข็มแสด, 17 เอื้องคำฝอย, 18 เอื้องจำปาน่าน, 19 เอื้องแปรงสีฟัน, 20 สามปอยขุนตาล, 21 เอื้องเงินแดง, 22เอื้องแปรงสีฟัน



ภาพที่ 6 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอกล้วยไม้ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR11

M = 1 Kb DNA ladder, 1 เอื้องสายล่องแล่ง, 2 เอื้องคำป๊อก, 3 เอื้องสายมรกต, 4 เอื้องผึ้งแคระ, 5 หวายตะมอย, 6 เอื้องเมี้ยง, 7 เอื้องเงิน, 8 เอื้องคำฝอย, 9 เอื้องผึ้ง, 10 ไม้เท้าฤาษี, 11 เอื้องแปรงสีฟัน, 12 เอื้องเค้าก่ิว, 13 เอื้องม่อนไข่, 14 เอื้องคำปากไก่, 15 เอื้องสายน้ำผึ้งลาว,16 สายน้ำผึ้ง,17 เอื้องตะขาบ, 18 สามปอยขุนตาล, 19 เข็มแสด, 20 เอื้องแปรงสีฟัน, 21 เอื้องครั่งสายสั้น, 22 เอื้องแปรงสีฟัน

สรุปผลการทดลอง

1. การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของกล้วยไม้จำเป็นต้องหาวิธีการเพิ่มเติมที่สามารถนำมาใช้ในสกัดดีเอ็นเอได้อย่างมีคุณภาพกับกล้วยไม้ทุกชนิด ซึ่งมีผลต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีและการให้แถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและสามารถนำมาใช้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมได้

2. ไพรเมอร์ จำนวน 4 ชนิด คือ S73, S90, S147 และ ISSR11 ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันไปในกล้วยไม้แต่ละชนิด