การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้า ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

Genetic Relationship Assessment of *Vanda* Using HAT-RAPD Technique

นฤมล ธนานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ จังหวัดปทุมธานี

เอกวิทย์ อธิพงษ์อาภรณ์ และ ธีระชัย ธนานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

Narumol Thanananta*

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage Pathum Thani Province

Eakwit Atiphongarporn and Theerachai Thanananta

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Centre

Received: February 29, 2024 ; Revisions: March 10, 2024 ; Accepted: March 12, 2024

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลแวนด้าเป็นกล้วยไม้เชิงพาณิชย์ที่มีความสำคัญมากเป็นอันดับสองรองจากกล้วยไม้สกุลหวาย มีชนิดและลูกผสมหลากหลายจึงทำให้เกิดความยุ่งยากในการจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานและเกิดการสับสนได้ง่าย ดังนั้นจึงนำเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมาประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้า 12 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์แบบสุ่ม 30 จาก 72 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากนั้นจึงคัดเลือกไพรเมอร์แบบสุ่ม 18 ชนิด เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งได้ผลว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้ง 12 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และพบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับกล้วยไม้สกุลแวนด้าแต่ละชนิด นอกจากนั้นงานวิจัยนี้ยังพบไพรเมอร์แบบสุ่ม 14 ชนิด ที่มีแนวโน้มจะใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลแวนด้าได้ โดยแผนภูมิความสัมพันธ์ที่สร้างได้จากแถบดีเอ็นเอซึ่งให้ความหลากรูปสามารถแบ่งกล้วยไม้สกุลแวนด้าเป็น 3 กลุ่ม มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน 0.37 ถึง 0.69

คำสำคัญ: กล้วยไม้; สกุลแวนด้า; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; แฮตอาร์เอพีดี

**Corresponding author: narumol@vru.ac.th*

Abstract

The *Vanda* is the second most important commercial orchid after the *Dendrobium*. There are many species and hybrids, making it difficult to classify by morphology and easily confused. High annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique was used to identify 12 samples of *Vanda*. The total 72 random primer were screened and 30 primers could be used for DNA amplification. 18 primers were selected and used to analyze all the DNA samples. Total 211 bands were detected, of which 206 were gave different DNA fingerprinting and all cultivars were clearly differentiated by using 14 primers. A dendrogram constructed based on polymorphic bands showed genetic similarities among Vanda each cultivar with similarity coefficients ranging 0.37-0.69. The HAT-RAPD markers developed can be used to identify Vanda cultivar and plan to breeding program.

Keywords: orchid; *Vanda*; genetic relationship; HAT-RAPD

1. บทนำ

กล้วยไม้สกุลแวนด้า (*Vanda*) จัดอยู่ในวงศ์ย่อย (subfamily) Epidendroideae เผ่า (tribe) Vandeae เผ่าย่อย (subtribe) Aeridinae พบแพร่กระจายในบริเวณเขตร้อนชื้น ได้แก่ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย และออสเตรเลีย (Thaithong, 2008) กล้วยไม้สกุลแวนด้ายังคงเป็นพืชที่มีปัญหาในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและการจัดจำแนกภายในกลุ่ม เนื่องจากมีความหลากหลายของชนิดพันธุ์ที่เกิดจากการผสมข้ามเองในธรรมชาติและลูกผสมที่เกิดจากฝีมือมนุษย์ โดยหากสามารถสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) จะทำให้จำแนกกลุ่มในกล้วยไม้สกุลนี้ได้ชัดเจนมากขึ้น ปัจจุบันตลาดกล้วยไม้เขตร้อนได้ขยายเพิ่มขึ้นมาก ซึ่งมีกล้วยไม้สกุลแวนด้ารวมอยู่ด้วย ดังนั้นการขาดข้อมูลความสัมพันธ์และการขาดวิธีการจำแนกกล้วยไม้ที่ถูกต้องจะเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการส่งออกกล้วยไม้

กล้วยไม้สกุลแวนด้ามีลำต้นเดี่ยว ไม่แตกกอ และเจริญเติบโตออกทางยอด ซึ่งเรียกว่าโมโนโพเดียม (monopodial) มีใบแตกออกจากลำต้น 2 ข้าง ตรงข้ามกัน และยอดเจริญขึ้นข้างบน มีช่อดอกตั้ง ก้านช่อดอกยาวและแข็ง ดอกค่อนข้างใหญ่และบานเป็นระยะเวลานาน กลีบดอกชั้นนอกและชั้นในมีขนาดไล่เลี่ยกัน แผ่นกลีบดอกโต แต่โคนกลีบคอด ปากมีเดือยสั้น ๆ (Thaithong, 2008) การจำแนกด้วยลักษณะสัณฐานจะใช้รูปร่างลักษณะของใบเป็นเกณฑ์ ซึ่งจำแนกเป็น 4 ประเภท ได้แก่ (1) แวนด้าใบกลม (terete leaved) มีใบกลมยาวทรงกระบอก ต้นสูง ข้อห่าง เช่น โมก (*V. teres*) ฮุกเกอเรียนา (*V. hookeriana*) ไอ้หนวด (*V. tricuspidata*) (2) แวนด้าใบแบน (strap leaved) มีใบแผ่แบนออก หน้าตัดของใบคล้ายรูปตัววี มีข้อถี่ ปล้องสั้น ใบซ้อนชิดกัน ปลายใบมักโค้งลงมา และปลายใบมีจักเป็นแฉก เช่น ฟ้ามุ่ย (*V. coerulea*) ฟ้ามุ่ยน้อย (*V. coerulescens*) แซนเดอเรียนา (*V. sanderiana*) (3) แวนด้าก้างปลา (semi-terete leaved) มีรูปทรงใบและลำต้นแบบกึ่งใบกลมกับใบแบน เช่น อะเมสเซียนา (*V. amesiana*) คิมบาลเลียนา (*V. kimballiana*) และ (4) แวนด้าใบร่อง (quarter-tereteleaved) มีรูปทรงของใบและลำต้นคล้ายคลึงกับแวนด้าใบแบน

การจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้าด้วยการพิจารณาเพียงลักษณะสัณฐานนั้น อาจเกิดความสับสนได้ง่ายและจำเป็นต้องอาศัยความเชี่ยวชาญเฉพาะ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าและตรวจหาเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD marker) ที่ใช้ระบุชนิดกล้วยไม้สกุลแวนด้าได้ ซึ่งจะได้ข้อมูลพื้นฐานที่สามารถประยุกต์ใช้ในการวางแผนอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์เพื่อการค้า

2. วิธีการ

2.1 *กล้วยไม้สกุลแวนด้า*

ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้าที่ใช้ในงานวิจัยนี้มี 12 ชนิด ได้แก่ 1-ฟ้ามุ่ย (*V. coerulea*) 2-ฟ้ามุ่ยน้อย (*V. coerulescens*) 3-สามปอยนกหรือสามปอยดง (*V. brunnea*) 4-สามปอยหางปลา (*V. liouvillei*) 5-สามปอยชมพู (*V. bensonii*) 6-สามปอยอินเดีย (*V. tessellata*) 7-สามปอยหลวงหรือสามปอยขุนตาล (*V. denisoniana*) 8-สามปอยชมพูเผือกหรือสามปอยขาว (*V. bensonii* var. alba) 9-เข็มขาว (*V. lilacina*) 10-เข็มเหลือง (*V. testacea*) 11-สามปอยสะแล่ง (*V. pumila*) และ 12-สามปอยชวาหรือไตรคัลเลอร์ (*V. tricolor* var. suavis)

2.2 *การสกัดดีเอ็นเอ*

นำใบสดของกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้ง 12 ชนิด มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al*., 1989)

2.3 *การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี*

ตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยรวมดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้ง 12 ชนิด เข้าด้วยกัน นำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยไพรเมอร์แบบสุ่ม ขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ จาก Wako Company (Japan) ทั้งหมด 6 ชุด คือ A2, B2, C2, D2, E2 และ F2 ซึ่งแต่ละชุดมีไพรเมอร์ 12 ชนิด รวมทั้งสิ้น 72 ชนิด จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้าแต่ละชนิด โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ซ้ำ 3 ครั้ง ทั้งนี้เพื่อยืนยันผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Thanananta *et. al.*, 2012)

2.4 *การวิเคราะห์ผล*

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้าที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

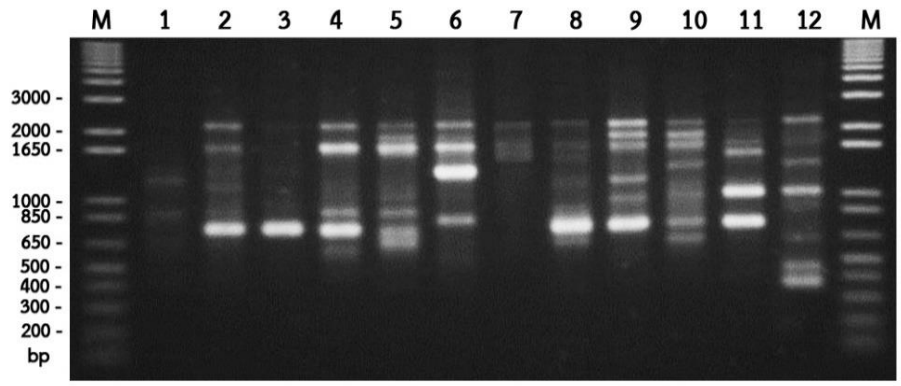

Figure 1 DNA fingerprinting of 12 *Vanda* species using HAT-RAPD by E24 primer (CCGGAGTGGATG) [Lane M: DNA marker 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), Lane 1-12: 12 species of *Vanda*]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 30 ชนิด (41.67 %) เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 18 ชนิด ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้าแต่ละชนิด จำนวน 12 ชนิด ปรากฏว่าพบแถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 211 แถบ ขนาดประมาณ 300-3,000 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความหลากรูป (monomorphic band) 1 แถบ (0.50 %) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูป (polymorphic band) 210 แถบ (99.50 %) โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมีรูปแบบจำเพาะต่อกล้วยไม้สกุลแวนด้าแต่ละชนิด (Fig. 1) และพบแถบดีเอ็นเอบางแถบที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจัดจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลแวนด้า นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของกล้วยไม้สกุลแวนด้าแต่ละชนิดออกจากกันด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว จำนวน 14 ชนิด ได้แก่ A21 (AGAATTGGACGA), A31 (AAGGCGCGAACG), A32 (TTGCCGGGACCA) ,B22 (GGTGACTGGTGG) , B23 (GGTGCCGGAGCA) , B32 (ATCGCGGCTTAT) , C29 (GTCGCCTTACCA) , C31 (TCTGCTGACCGG) , D23 (ACCATCAAACGG) , E22 (GGAATGGAACCG) , E23 (AGGTACGCCGCA),E24 (CCGGAGTGGATG), F27 (CAGGTGGGAGTA) และ F31 (ATCGTGACGCCG)

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่ากล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้ง 12 ชนิด ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.37 ถึง 0.69 (Fig. 2) เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.49 พบว่าแบ่งกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้ง 12 ชนิด เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 ได้แก่ ฟ้ามุ่ย และสามปอยนก กลุ่ม 2 ได้แก่ ฟ้ามุ่ยน้อย สามปอยหางปลา สามปอยชมพู สามปอยขาว สามปอยสะแล่ง เข็มขาว เข็มเหลือง สามปอยชวา และสามปอยอินเดีย และกลุ่ม 3 ได้แก่ สามปอยขุนตาล (Fig. 3) ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้สกุลแวนด้า

	V. coerulea	*V. coerulescens*	*V. brunnea*	*V. liouvillei*	*V. bensonii*	*V. tessellata*	*V. denisoniana*	*V. bensonii* var. alba	*V. lilacina*	*V. testacea*	*V. pumila*	*V. tricolor* var. suavis
V. coerulea	1.00											
V. coerulescens	0.54	1.00										
V. brunnea	0.50	0.57	1.00									
V. liouvillei	0.42	0.69	0.48	1.00								
V. bensonii	0.41	0.62	0.51	0.68	1.00							
V. tessellata	0.35	0.52	0.40	0.55	0.52	1.00						
V. denisoniana	0.36	0.42	0.36	0.37	0.43	0.37	1.00					
V. bensonii var. alba	0.46	0.69	0.56	0.66	0.69	0.52	0.52	1.00				
V. lilacina	0.39	0.58	0.41	0.54	0.55	0.47	0.30	0.59	1.00			
V. testacea	0.37	0.56	0.41	0.53	0.48	0.53	0.27	0.53	0.61	1.00		
V. pumila	0.40	0.57	0.48	0.56	0.56	0.51	0.33	0.56	0.48	0.46	1.00	
V. tricolor var. suavis	0.45	0.58	0.39	0.57	0.52	0.55	0.37	0.59	0.57	0.58	0.57	1.00

Figure 2 Genetic similarity coefficient matrix for 12 *Vanda* species by HAT-RAPD technique

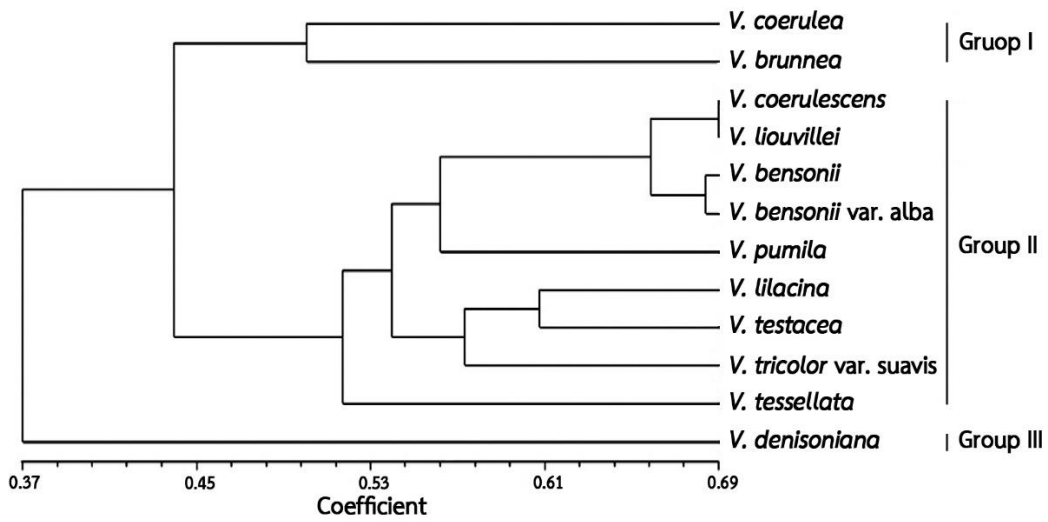

Figure 3 A dendrogram for 12 Vanda species by UPGMA cluster analysis of the genetic similarity values by HAT-RAPD technique

มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างชนิดใช้เป็นเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีสำหรับการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลแวนด้าได้ และแถบดีเอ็นเอบางแถบที่จำเพาะต่อชนิดสามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อชนิดของกล้วยไม้สกุลแวนด้า โดยผลงานวิจัยนี้สนับสนุนศักยภาพของเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีในการระบุชนิดพันธุ์พืชต่าง ๆ และสนับสนุน Lim และคณะ (1999) ที่ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้าบางชนิดและศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ซึ่งแบ่งกล้วยไม้สกุลแวนด้าเป็น 2 กลุ่ม นอกจากนั้นผลการวิจัยนี้ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญสำหรับใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาวิจัย การอนุรักษ์ การคุ้มครองพันธุ์พืช การปรับปรุงพันธุ์ และอื่น ๆ

เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีสามารถประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าเช่นเดียวกับพืชชนิดอื่น ได้แก่ กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม (Thongsom *et al*., 2015) กล้วยไม้สกุลหวาย (Phanroopthaw *et al*., 2016; Maneenet *et al*., 2017) กล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (Thanananta, *et al*., 2016) กล้วยไม้รองเท้านารี (Meesangiem, *et al*., 2018) ทุเรียน (Singhsilarak, *et al*., 2018) บัวสาย (Suksakul, *et al*., 2018) พืชครามสกุล *Indigofera* (Buaban, *et al*., 2020) เป็นต้น

4.สรุป

การตรวจสอบกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้ง 12 ชนิด ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 18 ชนิด พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะ และตรวจพบไพรเมอร์แบบสุ่ม 14 ชนิด ที่สามารถระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลแวนด้าด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.37 ถึง 0.69 และแผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลแวนด้าที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.49 สามารถแยกกล้วยไม้สกุลแวนด้าเป็น 3 กลุ่ม

5. References

Buaban, S., Thanananta, T. & Thanananta, N. (2020). Genetic relationship assessment of Indigofera using HAT-RAPD technique. *Thai Journal of Science Technology*, 9(3), 378-387.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19(1), 11-15.

Lim, S.H., Teng, P.C., Lee, Y.H & Goh C.J. (1999). RAPD analysis of some species in the genus Vanda (Orchidaceae). *Annals of Botany*, 83(2), 193-196.

Maneenet, T., Thanananta, T. & Thanananta, N. (2017). Analysis of genetic relationship and identification of Dendrobium section Callista using HAT-RAPD markers. *Thai Journal of Science Technology*, 6(4), 316-323.

Meesangiem, T., Damrianant, S., Thanananta, T. & Thanananta, N. (2018). Genetic relationship among Paphiopedilum subgenus Brachypetalum section Brachypetalum using HAT-RAPD markers. Thai *Journal of Science Technology*, 7(1), 99-105.

Phanroopthaw, J., Thanananta, T. & Thanananta, N. (2016). Genetic relationships between Dendrobium section Nigrohirsutae and their hybrids base on HAT-RAPD. *Thai Journal of Science Technology, 5(1)*, 77-87.

Rohlf, F.J. (2002). *NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Location: Applied Biostatistics, Inc., New York.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed*. Location: Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Singhsilarak, T., Thanananta, T. & Thanananta, N. (2018). Genetic relationship assessment and identification of durian using HAT-RAPD markers. *Thai Journal of Science Technology, 7(1)*, 89-98.

Suksakul, S., Thanananta, T. & Thanananta, N. (2018). Genetic relationship assessment and identification of Nymphaea sp. and their hybrids using HAT-RAPD. *Thai Journal of Science Technology, 7(4)*, 418-426.

Thaithong, O. (2008). *Orchids of Thailand*. Location: Amarin Corporations Public Company Limited, Bangkok, 461 p.

Thanananta, N., Hongtongdee, P. & Thanananta, T. (2016). Identification and assessment of genetic relationship among Coelogyne (Orchidaceae) using HAT-RAPD. *Thai Journal of Science Technology, 5(1)*, 88-97.

Thanananta, N., Prasit, V. & Thannananta, T. (2012). Identification of rice cultivars KDML105 and its improved cultivars by using HAT-RAPD technique. *Thai Journal of Science and Technology, 1(3)*, 169-179.

Tongsom, J., Thanananta, T. & Thanananta, N. (2015). Genetic relationship among Vanda section Ascocentrum based on HAT-RAPD and ISSR. *Thai Journal of Science and Technology, 23(3)*, 475-484.