อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ เรื่อง การตรวจสอบกล้วยไม้ดินลูกผสมข้ามสกุลระหว่างเอื้องดินใบหมากกับเอื้องดินใบไผ่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี

Molecular Characterization of Intergeneric hybrids between *Spathoglottis plicata* Bl. and *Arundina graminifolia* (D.Don) Hochr. Using PCR-RFLP

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 17 มิ.ย. 2558
เลขทะเบียน 1698065
เรียกหนังสือ ว QK 495 .D44 ม2นร 2557

โดย

ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด

ผศ.ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด

มิถุนายน 2557

สัญญาเลขที่ R2557C047

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ เรื่อง การตรวจสอบกล้วยไม้ดินลูกผสมข้ามสกุลระหว่างเอื้องดินใบหมากกับเอื้องดินใบไผ่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี

Molecular Characterization of Intergeneric hybrids between *Spathoglottis plicata* Bl. and *Arundina graminifolia* (D.Don) Hochr. Using PCR-RFLP

ผู้วิจัย

ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด

ผศ.ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

โครงการเรื่อง การตรวจสอบกล้วยไม้ดินลูกผสมข้ามสกุลระหว่างเอื้องดินใบหมากกับเอื้องดินใบไผ่ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี

ผู้วิจัย ดร.มลิวรรณนาคขุนทด
ผศ.ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด

บทคัดย่อ

การตรวจสอบลูกผสมข้ามสกุลของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ที่ได้จากการถ่ายฝากและนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ nrITS(nuclear ribosomal internal transcribed sequence) และตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด พบว่า เอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิดให้รูปแบบที่เหมือนกัน ขณะที่ 2 ชนิดจะให้รูปแบบที่แตกต่างกัน คือ *Alu*I และ *Taq*Iซึ่งจากการสุ่มตัวอย่างต้นที่เกิดจากการถ่ายฝากทั้งหมด 100 ต้น เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับรุ่นพ่อแม่ พบว่าความน่าจะเป็นที่จะได้ลูกผสมจากการถ่ายฝากเมื่อใช้เอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ คิดเป็น 9.62% และ 8.33% ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้ากับลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริง พบว่าการใช้เอื้องใบหมากเป็นต้นแม่ในการถ่ายฝากไม่ประสบผลสำเร็จ ขณะที่ถ้าใช้เอื้องดินใบไผ่เป็นต้นแม่ในการถ่ายฝากมีโอกาสประสบความสำเร็จมากกว่า

คำสำคัญ ลูกผสมข้ามสกุล เอื้องดินใบหมาก เอื้องดินใบไผ่ พีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี

Title Molecular Characterization of Intergeneric hybrids between *Spathoglottisplicata* Bl. and *Arundinagraminifolia* (D.Don) Hochr.Using PCR-RFLP

Authors Dr. Maliwan Nakkuntod
Asist. Prof. Dr.Anupan Kongbungkerd

ABSTRACT

Detection using polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in nrITS region of intergeneric hybrids between *Spathoglottisplicata* Bl. and*Arundinagraminifolia* (D.Don) Hochr. was investigated. The intergenericseeding originated from deposit pollination together with tissue culturetechnique. PCR-RFLP profiles were generated using seven restriction enzymes (REs).TwoREs, *Alu*Iand*Taq*I, created polymorphic banding profiles whereas the rest gave monomorphic. The studies showed that probability of the hybrids from the mother as *S. plicata* and *A. graminifolia* was 9.62% and 8.33% respectively. However, duration comparison of seed germination and seedling development with self-pollination and true intergenerichybrids showed that there was failure in case of *S. plicata* as mother in deposit pollination while *A. graminifolia* is a good mother in this case.

Keywords Intergeneric hybrids ,*Spathoglottis plicata, Arundina graminifolia,* PCR-RFLP

Executive Summary

กล้วยไม้เป็นพืชดอกที่มีความหลากหลายมากและมีความสำคัญในเชิงเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก โดยจัดเป็นประเทศที่มีการส่งออกกล้วยไม้มากที่สุดของโลกประเทศหนึ่ง ด้วยความต้องการกล้วยไม้ในปริมาณมาก ในปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยในการเพิ่มปริมาณให้เพียงพอต่อความต้องการ และยังมีการผสมพันธุ์เกิดขึ้นเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะเด่นตามที่ต้องการ แต่โดยส่วนใหญ่เป็นการผสมข้ามชนิดในสกุลเดียวกัน ซึ่งประสบความสำเร็จเป็นอย่างมาก แต่ก็ยังมีการผสมข้ามสกุลเกิดขึ้น เพื่อให้ได้ลักษณะที่เด่นที่แตกต่างกันออกไป

ในการวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นที่การตรวจสอบการผสมข้ามสกุลของเอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis plicata* Bl.) และเอื้องดินใบไผ่ (*Arundina graminifolia* (D.Don) Hochr.) จากการถ่ายฝากเมื่อมีการผสมเกสร เนื่องจากในธรรมชาตินั้นการผสมข้ามสกุลเกิดขึ้นได้น้อยมากหรือไม่เกิดขึ้นเลย รวมถึงการผสมเกสรโดยมนุษย์ก็ตาม บางครั้งก็ไม่สามารถทำได้ จึงนำเทคนิคการถ่ายฝากเข้ามาช่วย โดยทำการผสมละอองเรณูของตนเองเข้าไปพร้อมกับละอองเรณูของอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเมล็ดที่เกิดขึ้นนั้นจะไม่สามารถทราบได้เลยว่าเกิดจากละอองเรณูจากต้นใด จะต้องทำการเพาะปลูกจนได้ดอกเสียก่อนจึงจะสามารถระบุได้ แต่ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการตรวจสอบต้นอ่อนที่เกิดจากเมล็ดนั้นด้วยเทคนิคทางดีเอ็นเอเลย เพื่อให้รวดเร็ว ไม่ต้องรอถึงออกดอก โดยนำเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีเข้ามาใช้ ซึ่งจะทำการขยายเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในนิวเคลียสแล้วทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ เพื่อศึกษารูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เพื่อยืนยันลักษณะทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ดินลูกผสมเมื่อเปรียบเทียบกับรุ่นพ่อแม่

ผลการศึกษาสรุปได้ว่าสามารถตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี บริเวณ ITS ของกล้วยไม้ดินนี้ได้ด้วยเอนไซม์ *Taq*I และ *Alu*I ซึ่งสามารถให้รูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ และผลที่ได้จากทั้งสองเอนไซม์นี้สามารถบอกความเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่เกิดจากการถ่ายฝากได้ อีกทั้งยังสามารถคาดคะเนได้ว่าเป็นลูกผสมที่เกิดจากพ่อและแม่ต้นใดได้อีกด้วย แต่พบว่าเอนไซม์ 5 ชนิด ได้แก่ *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Msp*I และ *Rsa*I ไม่สามารถใช้ในการตรวจสอบลูกผสมข้ามสกุลที่เกิดขึ้นนี้ได้ เนื่องจากไม่สามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบของดีเอ็นเอได้นอกจากนี้ยังพบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่ไม่ถูกตัดอีกด้วย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้พบโอกาสที่จะเกิดลูกผสมข้ามสกุลจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ คือ 8.33% นอกจากนี้ยังสรุปได้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของบริเวณ ITS ของเอื้องดินใบหมากมากกว่าเอื้องดินใบไผ่จากจำนวนรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นนั่นเอง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ

สารบัญ

สารบัญตาราง

สารบัญภาพ

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ..... 1

วัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 2

ขอบเขตของงานวิจัย..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

สถานที่ทำการทดลอง..... 2

ระยะเวลาที่ทำการศึกษา..... 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชวงศ์กล้วยไม้..... 3

กล้วยไม้ที่นำมาใช้ศึกษา..... 4

การผสมพันธุ์กล้วยไม้..... 4

ดีเอ็นเอในพืช..... 5

ดีเอ็นเอในนิวเคลียส..... 5

การตรวจแยกสายพันธุ์พืชโดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ..... 6

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 9

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา..... 11

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยวิธีดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987)..... 11

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	โครงสร้างของไรโบโซมอลดีเอ็นเอในพืช	6
2	ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI A คือดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์และ B คือดีเอ็นเอที่ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์	8
3	ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ดิน 1-2 คือตัวอย่างจากธรรมชาติ 3-4 คือตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (Fermentas)	17
4	ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (A) ไม่เกิดผลผลิตพีซีอาร์ในตัวอย่างที่ 1-2 และเกิด non-specific ในตัวอย่างที่ 3-4 (B) non-specific ลดลง เห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน ขนาดประมาณ 900 คู่เบส โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (Fermentas)	18
5	การทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์ (A) ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ (B) หลังการทำให้บริสุทธิ์โดยการตัดเจล (C) หลังการทำให้บริสุทธิ์โดยไม่ผ่านการตัดเจล โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (Fermentas)	19
6	รูปแบบ monomorphic ของต้นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ โดยที่ 1 คือเอื้องดินใบหมาก2 คือเอื้องดินใบไผ่และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bpDNA ladder (Fermentas)	20
7	รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I (A) ภาพจากเจลจริง (B) ภาพไดอะแกรม โดยที่ 1-3 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 4 คือเอื้องดินใบไผ่ และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100bp DNA ladder (Fermentas)	22
8	รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I (A) ภาพจากเจลจริง (B) ภาพไดอะแกรม โดยที่ 1-3 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 4 คือเอื้องดินใบไผ่ต้นที่ 1 และ 2 ในขณะที่ 5 คือเอื้องดินใบไผ่ต้นที่ 3 และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100bp DNA ladder (Fermentas)	23
9	รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I (A) ภาพจากเจลจริง (B) ภาพไดอะแกรม 1-3 คือรูปแบบที่ 1-3 4-6 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 7 คือเอื้องดินใบไผ่และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน100 bp DNA ladder (Fermentas)	24

สารบัญภาพ(ต่อ)

10 รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I (A) ภาพจากเจลจริง (B) ภาพไดอะแกรม 1-4 คือรูปแบบที่ 1-4 5-7 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 8 คือ เอื้องดินใบไผ่และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)..... 25

11 รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ที่เกิด จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu* I (A) ภาพจากเจลจริง (B) ภาพไดอะแกรม 1-3 คือรูปแบบที่ 1-3 4-6 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 7 คือ เอื้องดินใบไผ่และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)..... 26

12 รูปแบบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I ของลูกผสมข้ามสกุล ที่ได้จากการถ่ายฝาก โดย 1-2 คือลูกผสมข้ามสกุลที่ได้จากการถ่ายฝากที่มี เอื้องดินใบหมากเป็นแม่ 3-4 คือลูกผสมข้ามสกุลที่ได้จากการถ่ายฝากที่มี เอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ 5-7 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 8 คือ เอื้องดินใบไผ่และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas) 27

13 รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I (A) ภาพจากเจลจริง (B) ภาพไดอะแกรม1-2 คือรูปแบบที่ 1-2 3-5 คือ เอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 6-7 คือเอื้องดินใบไผ่ รูปแบบที่ 1-2 ตามลำดับ และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)..... 28

14 รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ที่ เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I (A) ภาพจากเจลจริง (B) ภาพไดอะแกรม 1-4 คือรูปแบบที่ 1-4 5-7 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 8-9 คือเอื้องดินใบไผ่รูปแบบที่ 1-2 ตามลำดับและ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)..... 29

15 รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ที่เกิด จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I (A) ภาพจากเจลจริง (B) ภาพไดอะแกรม 1-2 คือรูปแบบที่ 1-2 3-5 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 6-7 คือเอื้องดินใบไผ่รูปแบบที่ 1-2 ตามลำดับและ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)..... 30

สารบัญภาพ(ต่อ)

16 รูปแบบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I ของลูกผสมข้ามสกุล ที่ได้จากการถ่ายฝาก โดย 1-2 คือลูกผสมข้ามสกุลที่ได้จากการถ่ายฝากที่มี เอื้องดินใบหมากเป็นแม่ 3-5 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 6-7 คือเอื้องดินใบไผ่และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน100 bp DNA Ladder (Fermentas).....31

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 ความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์.....14
2 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์..... 14
3 สารที่ใช้ในการตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ..... 16
4 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอ อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา.....16
5 ขนาดของแถบดีเอ็นเอพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Msp*I และ *Rsa*I..... 20
6 ขนาดของแถบดีเอ็นเอพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I..... 21
7 ขนาดของแถบดีเอ็นเอพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I..... 22
8 เปรียบเทียบระยะเวลาในการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นอ่อนของลูกผสมตัวเองของเอื้องดินใบหมากลูกผสมข้ามสกุล และลูกผสมจากการถ่ายฝากเมื่อมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่.....33
9 เปรียบเทียบระยะเวลาในการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นอ่อนของลูกผสมตัวเองของเอื้องดินใบไผ่และลูกผสมจากการถ่ายฝากเมื่อมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่.....33

บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญ

กล้วยไม้เป็นพืชดอกที่มีความหลากหลายมากและมีความสำคัญในเชิงเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก อีกทั้งยังเป็นประเทศที่ส่งออกกล้วยไม้มากที่สุดของโลก (สุภาพร หนูชนะภัยและบุญจิต ฐิตาภิวัฒนกุล, 2553) ด้วยความต้องการกล้วยไม้ในปริมาณมาก ในปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยในการเพิ่มปริมาณให้เพียงต่อความต้องการ และยังมีการผสมพันธุ์เกิดขึ้นเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะเด่นตามที่ต้องการ โดยส่วนใหญ่เป็นการผสมข้ามชนิดในสกุลเดียวกันซึ่งประสบความสำเร็จเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ยังมีการผสมข้ามสกุลเกิดขึ้น เช่น ลูกผสมข้ามสกุลระหว่าง *Aerides vandarum* Reichb. f. และ*Vanda stangeana* Reichb. f. (Kishor *et al.*, 2008) และ Diacattleya (Diaca.) ซึ่งเป็นลูกผสมข้ามสกุลระหว่างสกุล *Diacrium* และ*Cattleya*เป็นต้น ซึ่งจะทำให้ได้ลักษณะที่เด่นที่ต้องการแตกต่างกันออกไป

ในการวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นที่การผสมข้ามสกุลของเอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis plicata* Bl.) และเอื้องดินใบไผ่ (*Arundina graminifolia* (D.Don) Hochr.) โดยเอื้องดินใบหมากเป็นกล้วยไม้ดินพันธุ์แท้ของไทยที่พบตามชายป่า หรือทุ่งโล่งที่ชื้นแฉะทางภาคตะวันออกและภาคใต้ ดอกออกเป็นช่อตั้ง สีชมพูอมม่วง และสามารถออกดอกได้ตลอดปี ในปัจจุบันพบว่าสามารถปลูกได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย ปัจจุบันเอื้องดินใบหมากนี้ได้มีการนำมาพัฒนาสายพันธุ์เพื่อผลิตเป็นไม้กระถางเชิงการค้าอย่างต่อเนื่อง ขณะที่เอื้องดินใบไผ่เป็นกล้วยไม้ดินที่พบได้ทั่วประเทศ ตามชายป่า และทุ่งโล่ง สามารถทนต่อสภาพภูมิอากาศที่แห้งแล้งและร้อนได้ดี ออกดอกได้เกือบตลอดทั้งปี ดอกเป็นช่อ ทยอยบานทีละดอก มีกลิ่นหอม กลีบดอกสีชมพูอ่อน แต่กลีบปากมีสีชมพูเข้ม ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เหมาะสมในการนำมาพัฒนาและสร้างกล้วยไม้ดินลูกผสม

จากลักษณะที่กล่าวมาทำให้กล้วยไม้ดินทั้ง 2 ชนิดนี้ น่าจะมีศักยภาพที่ดีในการนำมาปรับปรุงพันธุ์เพื่อพัฒนาให้เกิดเป็นสายพันธุ์ใหม่ โดยใช้วิธีการผสมข้ามสกุล (Intergeneric hybridization) โดยการถ่ายฝากซึ่งอาจมีโอกาสได้ลูกผสมที่แท้จริง แล้วอาศัยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเข้ามาช่วยเพิ่มจำนวนลูกผสมใหม่ที่ได้จากแต่ละเมล็ดให้มีปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็ว จึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบต้นอ่อนที่เกิดจากเมล็ดนั้นด้วยเทคนิคทางดีเอ็นเอ โดยนำเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีเข้ามาใช้ โดยทำการขยายเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในนิวเคลียสแล้วทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ เพื่อศึกษารูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เพื่อยืนยันลักษณะทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ดินลูกผสมเมื่อเปรียบเทียบกับรุ่นพ่อแม่

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของเอื้องดินใบไผ่และเอื้องดินใบหมาก
2. เพื่อตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจริงที่เกิดขึ้นเมื่อใช้เอื้องดินใบหมากเป็นต้นแม่และเอื้องดินใบไผ่เป็นต้นพ่อ
3. เพื่อตรวจสอบลูกผสมที่เกิดขึ้นจากการผสมข้ามสกุลแบบถ่ายฝากระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่

3. ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษารูปแบบดีเอ็นเอของเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ที่เป็นต้นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์เปรียบเทียบกับลูกผสมข้ามสกุลทั้งที่เกิดจากการถ่ายฝากและไม่ถ่ายฝาก

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบรูปแบบดีเอ็นเอของเอื้องดินใบไผ่และเอื้องดินใบหมากที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ
2. ทราบรูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมข้ามสกุลจริงที่เกิดขึ้นเมื่อใช้เอื้องดินใบหมากเป็นต้นแม่และเอื้องดินใบไผ่เป็นต้นพ่อที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ
3. เพื่อระบุลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริงที่เกิดจากการผสมระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ที่ได้จากการถ่ายฝากเพื่อประโยชน์ในการนำไปขยายพันธุ์ต่อไป
4. สามารถระบุต้นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ของลูกผสมที่เกิดขึ้นได้

5. สถานที่ทำการทดลอง

หน่วยวิจัยพันธุศาสตร์และชีววิทยาโมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

6. ระยะเวลาที่ทำการศึกษา

เดือนมีนาคม พ.ศ. 2556 สิ้นสุดเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2557

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. พืชวงศ์กล้วยไม้

กล้วยไม้ หรือ เอื้อง เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่มีความหลากหลายมากที่สุดกลุ่มหนึ่ง อยู่ในวงศ์ Orchidaceaeโดยมีประมาณ 880 สกุล ที่พบในธรรมชาติประมาณ 25,000 ชนิด คิดเป็น 6-11% ของพืชมีเมล็ด มีการค้นพบราวๆ 800 ชนิดทุกๆปี มีการผสมข้ามชนิดและข้ามสกุลมากกว่า 30,000 คู่ผสม กล้วยไม้มีดอกสวยงาม หลากหลายสีสัน เป็นที่นิยมปลูกเลี้ยงกันทั่วโลกประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดพันธุ์กล้วยไม้ที่สวยงามหลายชนิดและมีการพัฒนากล้วยไม้ลูกผสมจำนวนมากขึ้นภายในประเทศ

กล้วยไม้มีความแตกต่างกันภายในวงศ์อย่างเห็นได้ชัด โดยทั่วไปลำต้นของกล้วยไม้ไม่มีแก่นและเปลือก เนื้อในเสมอกัน ลำต้นมี 2 ลักษณะ คือ ลำต้นแท้ มีข้อและปล้องเหมือนพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทั่วไป มีการเจริญเติบโตทางยอด ลำต้นเทียมหรือลำลูกกล้วยไว้สะสมอาหาร มีลำต้นเป็นเหง้า มีข้อและปล้องถี่ เจริญในแนวนอนไปตามผิวของเครื่องปลูก รากกลมอวบเป็นเส้นเล็กแข็งหรือแบนราบ มีทั้งรากดิน รากกึ่งดิน รากกึ่งอากาศ และรากอากาศ ใบเป็นใบเลี้ยงเดี่ยวมีลักษณะต่างกันออกไป เช่น รูปแถบ รูปกลมยาว หรือลดรูปเป็นเพียงเกล็ด แผ่นใบบางคล้ายใบหมากหนาอวบน้ำ หรือเป็นแท่งกลม ส่วนมากแล้วไม่มีส่วนที่เป็นก้านใบชัดเจน สีของใบเป็นสีเขียวสด บางชนิดเป็นสีม่วงคล้ำ บางชนิดก็มีลวดลาย ดอกออกที่ปลายลำต้น ซอกใบหรือข้างลำต้น ดอกเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อ แต่ละดอกมีกลีบเลี้ยง 3 กลีบเรียงสลับกันกับกลีบดอก 3 กลีบ กลีบดอกอันล่างมีลักษณะต่างออกไปเรียกว่ากลีบปากหรือกลีบกระเป๋าไว้สำหรับล่อแมลง ก้านเกสรตัวเมียและยอดเกสรตัวเมียเชื่อมติดกันกับเกสรตัวผู้เป็นเส้าเกสรอยู่กลางดอก เกสรตัวผู้อยู่รวมกันเป็นก้อนเป็นกลุ่มเรณู แต่ละอับเรณูมีฝาปิด มี 2, 4 หรือ 8 ก้อนแล้วแต่ชนิดกล้วยไม้ ยอดเกสรตัวเมียอยู่ใต้อับเรณู มีลักษณะเป็นเมือกเหนียว รังไข่อยู่ตรงส่วนของก้านดอก เมื่อได้รับการผสมจะเจริญไปเป็นเมล็ดต่อไป

กล้วยไม้เป็นไม้ตัดดอกยอดนิยม เนื่องจากมีลักษณะดอกและสีสันลวดลายสวยงาม เป็นไม้ตัดดอกที่มีอายุการใช้งานได้นานแหล่งกำเนิดกล้วยไม้ป่าที่สำคัญของโลกมี 2 แหล่งใหญ่ๆ ด้วยกันคือ ลาตินอเมริกากับเอเชียแปซิฟิค สำหรับในลาตินอเมริกาเป็นอาณาบริเวณอเมริกากลางติดต่อกับเขตเหนือของอเมริกาใต้ ส่วนแหล่งกำเนิดกล้วยไม้ป่าในภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิค มีประเทศไทยเป็นศูนย์กลาง จากการค้นพบประเทศไทยมีพันธุ์กล้วยไม้ป่าเป็นจำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมเอื้ออำนวยต่อการเจริญงอกงามของกล้วยไม้มาก และกล้วยไม้ป่าที่ในพบในภูมิภาคแถบนี้มีลักษณะเด่นที่เป็นเอกลักษณ์ของตนเองแตกต่างจากกล้วยไม้ในภูมิภาคลาตินอเมริกา

2. กล้วยไม้ที่นำมาใช้ศึกษา

เอื้องดินใบหมาก

เอื้องดินใบหมาก มีชื่อเรียกในประเทศไทยหลายชื่อเช่นว่านจุกม่วงพิศมรเอื้องดินหรือกระเทียมป่า มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Spathoglottis plicata* Bl.เป็นกล้วยไม้ดินพันธุ์แท้ของไทยที่พบ ตามชายป่าหรือทุ่งโล่งที่ชื้นแฉะทางภาคตะวันออกและภาคใต้ ดอกออกเป็นช่อตั้ง สีชมพูอมม่วง **และ** เป็นกล้วยไม้ที่ไม่ทิ้งใบสร้างหัวใหม่ออกไปเรื่อยๆสามารถออกดอกได้ตลอดปี ในปัจจุบันพบว่าสาม**ารถ** ปลูกได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย เอื้องดินใบหมากนี้ได้มีการนำมาพัฒนาสายพันธุ์เพื่อผลิตเป็น**ไม้** กระถางเชิงการค้าอย่างต่อเนื่อง

เอื้องดินใบไผ่

เอื้องดินใบไผ่หรือยี่โถปีนัง หรือหญ้าจิ้มฟันควาย มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Arundina graminifolia* (D.Don) Hochr. มีชื่อสามัญว่า bamboo orchid เนื่องจากมีลักษณะการเจริญเติบโตของต้นคล้ายกับต้นไผ่เป็นกล้วยไม้ดินที่พบได้ทั่วประเทศตามชายป่า และทุ่งโล่ง ที่ระดับความสูงตั้งแต่ 100-1,000 เมตร สามารถทนต่อสภาพภูมิอากาศที่แห้งแล้งและร้อนได้ดี จึงเจริญเติบโตได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย ออกดอกได้เกือบตลอดทั้งปี ดอกเป็นช่อ ทยอยบานทีละดอก มีกลิ่นหอม กลีบดอกสีชมพูอ่อน แต่กลีบปากมีสีชมพูเข้ม

3. การผสมพันธุ์กล้วยไม้

การผสมพันธุ์กล้วยไม้เกิดขึ้นเมื่อมีการถ่ายละอองเกสร (pollination) ตามด้วยการปฏิสนธิ (fertilization) วัตถุประสงค์การผสมพันธุ์กล้วยไม้ได้มีการทำขึ้นเพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนต้นให้มีจำนวนมากขึ้น อาจได้มาจากการผสมตัวเองหรือการผสมข้ามต้น (crossing)ในชนิดเดียวกัน ซึ่งการผสมตัวเองมีโอกาสที่จะได้ลูกผสมใหม่ที่ไม่เหมือนต้นแม่ทั้งหมดเพราะองค์ประกอบทางพันธุกรรมของกล้วยไม้จัดเป็นพวก highly heterozygous ทำให้เกิดการกระจายตัวของลักษณะต่างๆ อย่างมากมาย หรือถ้าเป็นการผสมข้ามต้นในชนิดเดียวกัน โอกาสที่จะได้ลูกผสมใหม่มีลักษณะแปลกๆ ก็สูงมากขึ้นอีก หรือเพื่อสร้างชนิดกล้วยไม้ใหม่ๆ ขึ้นมาที่มีลักษณะต่างไปจากพ่อและแม่ก็จัดเป็นการผสมข้ามอีกแบบหนึ่ง แต่วิธีการนี้เป็นการผสมข้ามชนิด (interspecific hybridization)หรือข้ามสกุล (intergeneric hybridization) ซึ่งหลังจากการทำการผสมพันธุ์กล้วยไม้แล้ว ไม่สามารถเก็บฝักได้อาจมีสาเหตุมาจากหลายประการ อาทิ ลักษณะทางพันธุกรรมที่ไม่สามารถเข้ากันได้ของคู่ผสมที่เลือกใช้เนื่องมาจากความห่างไกลของลักษณะทางพันธุกรรม หรืออาจเกิดมาจากการที่เกสรตัวผู้เป็นหมันเนื่องมาจากจำนวนชุดของโครโมโซมที่ผิดปกติ หรือต้นที่คัดเลือกมาเป็นต้นพ่อแม่พันธุ์ไม่เหมาะสมเข้ากันไม่ได้ หรือเกิดจากสภาพแวดล้อมในการผสมที่ไม่เหมาะสม เช่น ฝนตกชุก อากาศหนาวเย็น หรือร้อนจนเกินไป มีโรคหรือแมลงรบกวน ให้ปุ๋ยหรือสารเคมีเข้มข้นมากเกินไป หรือแม้กระทั่งน้ำที่ใช้อาจมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างไม่เหมาะสม เป็นต้น จึงทำให้การทำการผสมพันธุ์กล้วยไม้ล้มเหลว เช่น ไม่

เกิดฝักในการผสมข้ามสกุลระหว่าง *Distichophyllum*× *Formosae*(มาลินีอินทร์วงศ์และณัฐาโพธาภรณ์, 2553)นอกจากนี้ยังพบการผสมข้ามที่ประสบความสำเร็จ อาทิ การผสมข้ามสกุลระหว่าง *Aeridesvandarum*Reichb.fและ*Vandastangeana*Reichb.f(Kishor et al., 2008) *Renantheraimschootiana* Rolfe และ*Vanda coerulea*Griff.ex L. (Kishor and Sharma, 2008) เป็นต้น

4. ดีเอ็นเอในพืช

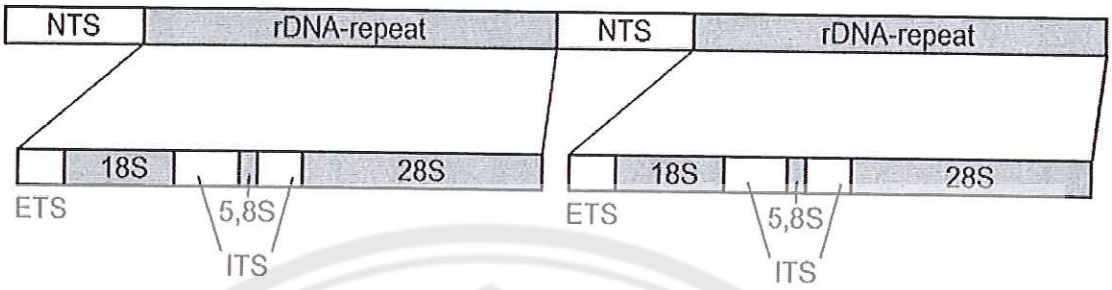
ดีเอ็นเอ (DNA: Deoxyribonucleic acid) เป็นสารพันธุกรรมที่กำหนดรหัสชีวิตของสิ่งมีชีวิต ความแตกต่างของการจัดเรียงตัวของเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ได้แก่ อะดีนีน(adenine), กวอนีน (guanine), ไซโตซีน(cytosine) และ ไทมีน (thymine) นี่เองที่มีผลทำให้เกิดความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต พืชแต่ละชนิดหรือแต่ละสายพันธุ์จะมีรหัสพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดหรือสายพันธุ์ได้ (สุรีพร เกตุงาม, 2546)โดยดีเอ็นเอในพืชสามารถพบได้จาก 3 แหล่ง นั่นคือ นิวเคลียส (nuclear DNA) ซึ่งถูกถ่ายทอดมาจากพ่อและแม่(paternal Inheritance) ในคลอโรพลาสต์ (chloroplastDNA)และในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA) ซึ่งถูกถ่ายทอดมาจากแม่เพียงฝ่ายเดียว(maternal Inheritance)

5. ดีเอ็นเอในนิวเคลียส

นิวเคลียส (nucleus) คือออแกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้มพบในเซลล์ยูแคริโอต ภายในบรรจุสารพันธุกรรม (genetic material) ซึ่งจัดเรียงตัวเป็นดีเอ็นเอ (DNA) สายยาวรวมตัวกับโปรตีนหลายชนิด เช่น ฮิสโตน (histone) เป็นโครโมโซม (chromosome) ยีน (gene) ต่างๆ ภายในโครโมโซมเหล่านี้ รวมเรียกว่า นิวเคลียสจีโนม (nuclear genome)

5.1 ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA)

ไรโบโซม (ribosome) เป็นโครงสร้างอย่างหนึ่งที่จำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของสิ่งมีชีวิต สำหรับสิ่งมีชีวิตในกลุ่มโปรคาริโอตและยูคาริโอต ซึ่งในยูคาริโอตนั้นจะมีไรโบโซมขนาด 80S ซึ่งประกอบด้วย small subunit และ large subunit ขนาด 40S และ 60S ตามลำดับ สำหรับหน่วยย่อย 40S จะประกอบด้วย 18S rRNAรวมอยู่กับโปรตีน ดีเอ็นเอบริเวณนี้จะเป็นดีเอ็นเอส่วนที่ถูกถอดรหัส (coding region) ไรโบโซมอลดีเอ็นเอจะจัดเรียงตัวเป็นหน่วยซ้ำ (repeat unit) เป็นพันๆ หน่วยซ้ำ หน่วยซ้ำของไรโบโซมอลดีเอ็นเอแยกจากกันโดย intergenic spacer (IGS) แต่ละหน่วยซ้ำประกอบด้วยส่วนที่ถูกถอดรหัสจากดีเอ็นเอเป็นอาร์เอ็นเอ (transcriped region)เริ่มตั้งแต่ส่วน external transcriped spacer (ETS) ถัดมาเป็น small rDNAคือยีน 18S ต่อมาเป็น ITS1 (internal transcriped spacer) ยีน 5.8S ITS2 และสุดท้ายเป็นยีน 26S ซึ่งเป็น large rDNA (ภาพ 1)



ภาพ 1 โครงสร้างของไรโบโซมอลดีเอ็นเอในพืช

ที่มา: http://en.wikipedia.org/wiki/Ribosomal_DNA

5.2 ดีเอ็นเอบริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacer)

ดีเอ็นเอบริเวณนี้อยู่ระหว่างไรโบโซมอลดีเอ็นเอขนาด 18S, 5.8S และ 26S ดีเอ็นบริเวณ ITS มีความยาวและลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่แน่นอนขึ้นกับชนิดของพืช ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 บริเวณ นั่นคือ ITS1 และ ITS2 ซึ่งอยู่ระหว่าง 18S และ 5.8S กับ 5.8S และ 26S ตามลำดับ ITS1 และ ITS2 เป็นส่วนหนึ่งของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ถูกถอดรหัสเป็นไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอแต่ไม่ได้อยู่ในโครงสร้างของไรโบโซมที่เป็นส่วนหนึ่งของการสร้างโปรตีน ซึ่ง ITS1 และ ITS2 นั้นมีตำแหน่งอยู่บริเวณ upstream และ downstream ของยีน 5.8S rDNAตามลำดับ สำหรับ external transcribed spacer ได้แก่ 3'ETS และ 5'ETS ซึ่งจะมีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณ 3'end และ 5'end ของ 35S rDNA ตามลำดับ ความหลากหลายที่เกิดขึ้นของบริเวณ spacer เกิดจากในระหว่างการสังเคราะห์ rRNA นั้นจะมีกระบวนการ processing หรือการตกแต่งโมเลกุลของ premature rRNAตรงบริเวณดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบกันเองระหว่างดีเอ็นเอในนิวเคลียร์จีโนม พบว่าดีเอ็นเอบริเวณ ITS นี้ถูกใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์มากที่สุด เนื่องจากมีบริเวณที่อนุรักษ์ จึงสามารถใช้เป็นตำแหน่งเกาะของ universal primer เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ได้ นอกจากนี้ดีเอ็นเอในบริเวณ ITS ยังสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ง่าย และยังมีความยาวพอเหมาะในการนำไปหาลำดับเบส โดยทั่วไปแต่ละส่วนของ ITS1 และ ITS2 จะยาวไม่เกิน 300 คู่เบส และความยาวรวมของ ITS1, ITS2 รวมทั้ง 5.8S ประมาณ 600-700 คู่เบส (สุชาดาสุขหร่อง, 2553)

6. การตรวจแยกสายพันธุ์พืชโดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึงดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ที่ตำแหน่งหนึ่งๆ บนโครโมโซมหรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบได้ก็เนื่องจากความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอจึงทำให้เกิดความ

หลากหลาย(polymorphism) เกิดขึ้นนั่นเอง โดยวิธีตรวจสอบความหลากหลายของดีเอ็นเอดังกล่าวนี้ทำได้หลายวิธี เช่น การหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ การตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมนำมาใช้การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือความมีเสถียรภาพทางพันธุกรรม เช่น เครื่องหมาย Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Kishor and Devi, 2009) และเครื่องหมาย Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (ธนากร วงษา, 2552) เป็นต้น

6.1 Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (PCR-RFLP) เป็นลายพิมพ์ที่สร้างโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอเฉพาะตัว สามารถใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ โดยความหมายทั่วไปของลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดอาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism) จะหมายถึงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายชนิด แล้วผ่านขั้นตอนการไฮบริดไดเซชั่นกับโพรบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีก่อนวิเคราะห์ผลซึ่งลายพิมพ์ชนิดนี้มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก ดังนั้นจึงมีการประยุกต์เป็นเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ซึ่งจะใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นในปริมาณน้อย ได้ผลรวดเร็ว ง่าย และปลอดภัยกว่า

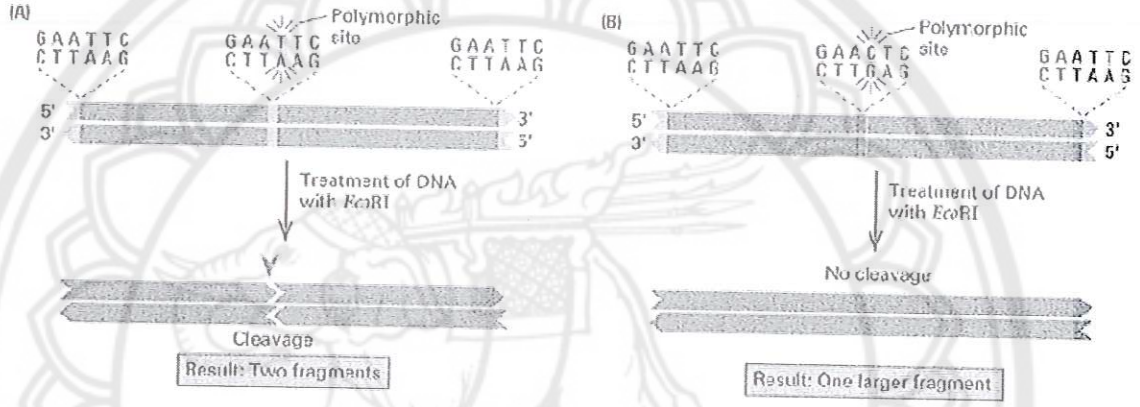
การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีอาศัยหลักความจำเพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยพีซีอาร์ การที่ดีเอ็นเอมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันแม้เพียงตัวเดียวก็เป็นตัวกำหนดได้ว่าเอนไซม์จะสามารถตัดได้หรือไม่ ความยาวของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดเป็นท่อนสามารถวิเคราะห์ความแตกต่างได้โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (สุชาดา สุขหร่อง, 2553)

6.2 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

เอนไซม์ตัดจำเพาะถูกพบครั้งแรกโดย Werner Arber โดยจะตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ภายในโมเลกุลของดีเอ็นเอตรงบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะหรือบริเวณใกล้เคียง โดยปกติเอนไซม์ตัดจำเพาะจะพบในระบบย่อยและดัดแปลงดีเอ็นเอแปลกปลอมของแบคทีเรียบางชนิด มีหน้าที่จดจำและทำลายดีเอ็นเอแปลกปลอมโดยการตัดดีเอ็นเอนั้นให้เป็นชิ้นสั้นๆ แต่จะไม่ทำลายดีเอ็นเอของเซลล์ตนเอง ทั้งนี้เพราะเบสบางตัวตรงบริเวณจำเพาะซึ่งเป็นบริเวณจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะจะถูกเปลี่ยนแปลงไปโดยการเติมหมู่เมทิลด้วยเอนไซม์เมทิลเลสเป็นผลให้บริเวณนั้นไม่ใช่บริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นๆ อีกต่อไป (จิตติมา เจริญพานิช,2553)

เอนไซม์ตัดจำเพาะมีคุณสมบัติในการจดจำลำดับเบสของดีเอ็นเอ แล้วจึงตัดดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่จดจำนั้น (ภาพ 2) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดนั้นๆ

ภายในระยะเวลาที่เหมาะสม ดีเอ็นเอจะถูกย่อยเป็นชิ้น จากนั้นอาจนำชิ้นดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ต่อด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งเอนไซม์นี้มีลำดับเบสจดจำได้ตั้งแต่ 4-8 คู่เบส แต่โดยทั่วไปนิยมใช้เอนไซม์ที่มีลำดับเบสจดจำขนาด 4 และ 6 คู่เบส เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีลำดับเบสจดจำขนาด 4 คู่เบสมีโอกาสที่จะตัดดีเอ็นเอได้มากกว่า โดยจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 4^4 หรือ 256 คู่เบส ในขณะที่เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีลำดับเบสจดจำขนาด 6 คู่เบส มีโอกาสที่จะตัดดีเอ็นเอได้น้อยกว่า โดยตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 4^6 หรือ 4,096 คู่เบส



ภาพ 2 ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI A คือดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ และ B คือดีเอ็นเอที่ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์

นอกจากนี้ลำดับของการใส่สารลงในปฏิกิริยาก็มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน ถ้าอยู่ในสภาพที่ไม่เหมาะสม โอกาสที่จะเสียสภาพก่อนที่จะทำปฏิกิริยามีสูงมาก ดังนั้นจึงควรใส่ น้ำ บัฟเฟอร์ และดีเอ็นเอ จากนั้นจึงผสมให้เข้ากันโดยการใช้นิ้วดีดเบาๆ แล้วจึงเติมเอนไซม์ตัดจำเพาะสุดท้าย เพราะขณะนั้นในหลอดมีสภาวะที่เหมาะสมแล้ว นอกจากนี้ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างในปฏิกิริยา โดย 1 ยูนิตของเอนไซม์ตัดจำเพาะหมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ตัดดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมในปริมาตร 50 ไมโครลิตรได้หมดภายในเวลา 1 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ดังนั้นถ้าเพิ่มจำนวนยูนิตของเอนไซม์ ระยะเวลาในการบ่มก็จะลดลงด้วย ในทางปฏิบัติมักใช้เอนไซม์ในปริมาณมากเกินพอในการย่อยดีเอ็นเอเพื่อให้สามารถตัดได้หมด (สุชาดา สุขหร่อง, 2553)

6.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสเป็นการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอผ่านเจลอะกาโรสภาพใต้สนามไฟฟ้า ใช้ในการตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในช่วง 100-1,000 คู่เบสได้ดี อะกา

โรสเจลในความเข้มข้นที่ต่างกันเหมาะในการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน ความเข้มข้นของเจลต่ำเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ เช่น จีโนมิกดีเอ็นเอ ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของเจลเป็น 1.2-2% เหมาะที่ใช้ในการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอในงานลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั่วไป เช่น RAPD, PCR-RFLP, RFLP แต่ถ้าเจลมีความเข้มข้นต่ำกว่า 0.6% จะนิ่มมาก ยากต่อการใช้งาน (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

7. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันมีกล้วยไม้ลูกผสมเกิดขึ้นมากมายทั้งที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดและผสมข้ามสกุล ซึ่งกล้วยไม้ดินนั้นจัดเป็นกล้วยไม้กลุ่มหนึ่งที่นิยมทำการผสมข้าม และมีสามารถในการผสมข้ามสกุลได้มากที่สุด

Kishor and Sharma (2008) ศึกษาการสร้างกล้วยไม้อิงอาศัยลูกผสมข้ามสกุลระหว่าง *Vanda coerulea* Griff. กับ *Ascocentrum ampullaceum* (Roxb.) Schltr. var. *auranticum* พบว่าสามารถให้ได้ลูกผสมใหม่ที่ชื่อ *Ascocenda* "Kangla" ที่เจริญเติบโตได้ดีและให้ดอกได้

นอกจากนี้ Kishor *et al.* (2008) ยังประสบความสำเร็จในการสร้างกล้วยไม้อิงอาศัยลูกผสมข้ามสกุลระหว่าง *Vanda stangeana* กับ *Aerides vandarum* และสามารถนำเมล็ดมาเพาะขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อได้

ในปีต่อมา Kishor *et al.* (2009) ก็ได้รายงานผลการตรวจสอบความมีเสถียรภาพทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ดินลูกผสมระหว่าง *Vanda stangeana* กับ *Aerides vandarum* เมื่อมีการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโต โดยตรวจสอบจากทั้งดีเอ็นเอในนิวเคลียสบริเวณ ITS และดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ที่ยีนบริเวณ *mat*K และ *trn*L-F โดยใช้เทคนิค ISSR เทคนิค RAPD และ เทคนิค PCR-RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิด ได้แก่ *Alu*I, *Bgl*II, *Dra*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Pst*I และ *Taq*I โดยทั้ง 3 เทคนิคเป็นการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น พบว่าลูกผสมที่เกิดขึ้นมีรูปแบบของดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวที่เหมือนกันทั้งหมดนั่นหมายความว่าลูกผสมที่เกิดขึ้นมีเสถียรภาพทางพันธุกรรมสูงแม้จะนำไปแยกขยายต่อโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลายรุ่นก็ตาม

โดย Arpita *et al.* (2012) ได้ทำการตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอของ*Hypericum perforatum* L. ที่ได้จากสภาพปลอดเชื้อโดยการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช ด้วยเทคนิค RAPD ร่วมกับ PCR-RFLP ในบริเวณ nrITS ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Eco*RV, *Cla*I และ *Hpa*II โดยเปรียบเทียบกับต้นแม่ พบว่าได้แถบดีเอ็นเอรูปแบบที่เหมือนกันเช่นกัน ดังนั้นจากผลการศึกษาเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าบริเวณ ITS สามารถเป็นบริเวณที่มีความเสถียรภาพที่สูง จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิคดังกล่าวได้

นอกจากเทคนิคดีเอ็นเอที่นำมาตรวจสอบลูกผสมในกล้วยไม้แล้วยังมีพืชชนิดอื่นๆ ที่มีการนำเทคนิคดีเอ็นเอเข้ามาช่วยในการตรวจสอบด้วย เช่น Songpanich and Hongtrakul (2010) ได้ทำการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของ Siam Blue Hardy ซึ่งเป็นลูกผสมบัวประดับระหว่างแม่สกุลย่อย

Nymphaea และพ่อสกุลย่อย *Brachyceras* โดยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ที่บริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Rsa*I, *Mse*I และ *Alu*I พบว่าสามารถยืนยันความเป็นลูกผสมได้

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

ศึกษากล้วยไม้ดิน จากการสุ่มตัวอย่างจาก 5 กลุ่มดังนี้

1. เอื้องดินใบหมากจากธรรมชาติ จำนวน 3 ตัวอย่าง
2. เอื้องดินใบไผ่จากธรรมชาติ จำนวน 3 ตัวอย่าง
3. ลูกผสมระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ด้วยเทคนิคการถ่ายฝากโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ จำนวน 52 ตัวอย่าง
4. ลูกผสมระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ด้วยเทคนิคการถ่ายฝากโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ จำนวน 48 ตัวอย่าง
5. ลูกผสมจริงระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่โดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ จำนวน 20 ตัวอย่าง

2. วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยวิธีดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987)

1. นำตัวอย่างพืชในส่วนของใบมาชั่งน้ำหนัก 0.1 กรัม บดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวแล้วถ่ายใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี 1X CTAB buffer (2% Cetyltrimethylammonium bromide, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mMTris pH 8.0) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ที่เติม β- mercaptoethanolปริมาตร 10 ไมโครลิตร

2. นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ ทุกๆ 10 นาที

3. เติม chloroform: isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันเบาๆ 2-3 ครั้ง

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

5. เติม RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

6. เติม phenol chloroform ปริมาตร 500 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้งเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงทีความเร็ว 13,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที

7. ดูดสารละลายส่วนบนใสในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

8. เติม chloroform: isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที

9. ดูดสารละลายส่วนบนใสในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

10. เติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 1/10 ของสารที่มี และเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารที่มีเขย่าให้เข้ากัน

11. นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาทีแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนไว้

12. ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตรเขย่าจนตะกอนหลุด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีเทส่วนใสทิ้ง

13. ทิ้งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

14. ละลายตะกอนด้วย TE buffer (0.01 M Tris pH 8.0, 0.001 M EDTA pH 8.0) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

15. เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

3. การตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล ที่มีความเข้มข้น 0.8%

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแต่ละวิธีมาผสมกับ 6X loading dye ซึ่งประกอบด้วยสี bromophenol blue และ sucrose สีจะเป็นตัวติดตามการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ แล้วนำมาแยกโดยให้เคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าในตัวกลางที่เป็นอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8% (w/v) ใน 1X TAE buffer ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จากนั้นนำไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) เพื่อให้เกิดการเรืองแสงเมื่อนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation) เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว จะสามารถบอกปริมาณของดีเอ็นเอได้โดยประมาณ รวมถึงสามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอได้ว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอและโปรตีนอยู่ด้วยหรือไม่ นอกจากนี้ยังทราบขนาดและการแตกหักของดีเอ็นเอที่สกัดได้อีกด้วยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมถาดสำหรับเทเจล (tray) และหวีเจล (comb) ให้เรียบร้อย

2. ชั่งผงอะกาโรสเจล0.8 กรัม และเติม 1X TAE buffer ที่เตรียมจาก 50X TAE (243.0 g Tris-acetate, 57.1 ml Glacial acetic acid, 100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3.หลอมอะกาโรสเจลให้ละลายโดยใช้ไมโครเวฟตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้หนาประมาณ 4-5 มิลลิเมตร ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

4.เมื่ออะกาโรสเจลแข็งตัวให้ดึงหวีออก แล้วนำไปวางในชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่มี 1X TAE buffer

5. ดูดสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6Xloading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องแผ่นเจลที่เตรียมไว้

7. ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์

8. ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปเป็นระยะทางประมาณ 3 ใน 4ของอะกาโรสเจล แล้วจึงปิดเครื่อง

9.นำอะกาโรสเจลมาย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที

10. จากนั้นนำอะกาโรสเจลมาล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกโดยแช่ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 5 นาที

11. แล้วนำอะกาโรสเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (Gel documentation) และบันทึกภาพ

4. การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการในหลอดทดลองโดยอาศัยหลักการการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA Replication) ซึ่งเป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ของดีเอ็นเอต้นแบบอย่างเฉพาะเจาะจงในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นจำนวนมาก ปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นแรก เรียกว่า Denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สอง เรียกว่า Annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงให้เหมาะสมกับไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบจับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สาม เรียกว่า Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยสังเคราะห์จากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ ตามข้อมูลบนสายดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์เองด้วยเครื่อง GeneAmp* PCR System 9700 (Applied Biosystems) คือ

17SE Primer 5' ATG GTC CGG TGA AGT GTT CG 3'

26SE Primer 5' CCC GGT TCG CTC GCC GTT AC 3'

(Kishor R., et al., 2009)

ซึ่งในปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้น จำเป็นต้องมีสารเคมีต่างๆ เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณ โดยสารแต่ละชนิดจะต้องมีการปรับสภาพให้เหมาะสมกับแต่ละบริเวณและแต่ละไพรเมอร์ รวมถึงระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ก็เช่นกัน ที่ต้องมีความเหมาะสมกับไพรเมอร์ที่ใช้ (ตาราง 1 และ 2)

ตาราง 1ความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
5X buffer	10	1X
25 mM $MgCl_2$	4	1.5 mM
10 mMdNTP	1	0.2 mM
10 mM17SE Primer	1	0.2 mM
10 mM26SE Primer	1	0.2 mM
Taq DNA polymerase (5 Unit/µl)	0.2	1 Unit/µl
DNA Template	1	50-100 ng
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	31.8	
Total	50	

ตาราง 2ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	
Pre-denaturation	94°C	4	
Denaturation	94°C	1	35 รอบ
Annealing	59°C	1	
Extension	72°C	1	
Final-extension	72°C	5	

5. การทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์

เมื่อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการจะทำทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ตามขั้นตอนพื้นฐานของบริษัท RBCBioscience ดังนี้

1. นำผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาโหลดในอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1% แล้วแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสด้วย 1X TAE buffer ที่เตรียมใหม่ เพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อน

2. เมื่อครบกำหนดเวลานำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพ แล้วตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่เตรียมไว้และทราบน้ำหนักเจลแล้วจากนั้นนำไปชั่งน้ำหนักเพื่อหาน้ำหนักเจล

3. เติม DF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต่อ 300 ไมโครกรัมของเจล

4. จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด

5. นำcolumn tube ใส่ใน collection tube แล้วดูดสารละลายที่ได้ทั้งหมดใส่ใน column tube

6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใน collection tube ทิ้ง

7. จากนั้นเติม wash buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีเทสารละลายใน collection tube ทิ้งแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

8. ย้าย column tube ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Elution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

9. ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

10. จากนั้นตรวจสอบผลผลิตที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ 1X TAE buffer ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แล้วนำไปโหลดบน 1% อะกาโรสเจล โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่แรงดัน 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพ

6. การตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอที่ใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

เอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ จะมีความจำเพาะต่อลำดับเบสบนดีเอ็นเอที่เรียงตัวจำนวน 4 และ 6 เบส จากนั้นจึงนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาแยกตามขนาดบนแผ่นวุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าเพื่อตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่าง โดยในแต่ละปฏิกิริยามีสารที่ใช้ ดังตาราง 3

ตาราง 3 สารที่ใช้ในการตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
DNA	10
Water sterile	3.7
Buffer	1
Restriction enzyme	0.3
Total	15

โดยทำการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกันทั้งหมด 7 ชนิดดังตาราง 4 ดังนี้

ตาราง 4 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอ อุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา

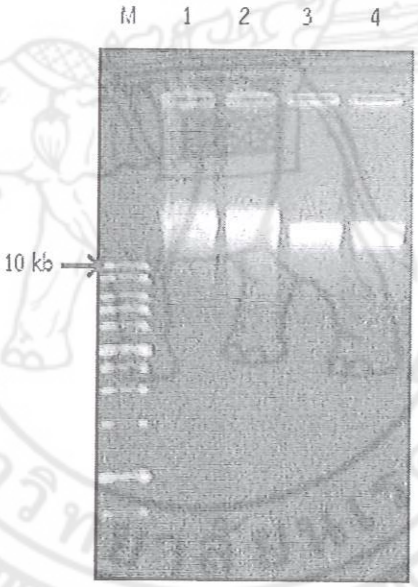
ชนิดเอนไซม์	ตำแหน่งจดจำ	อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)
*Alu*I	AG^CT	37	4
*Eco*RV	GAT^ATC	37	3
*Hae*III	GG^CC	37	3
*Hind*III	A^AGCTT	37	3
*Msp*I	C^CGG	37	3
*Rsa*I	GT^AC	37	3
*Taq*I	T^CGA	65	4

วิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 2% อะกาโรสเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่แรงดัน 50 โวลต์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพ

ผลการวิจัย

1. การสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ดินที่ได้จากในธรรมชาติและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ดินจากในธรรมชาติ 6 ตัวอย่าง และจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 120 ตัวอย่าง เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987) ได้สารละลายดีเอ็นเอที่ใสไม่มีสี จากนั้นทำการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8% พบว่าบางตัวอย่างเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนและเกิดการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเล็กน้อยทำให้เป็นรอย smear จางๆและบางตัวอย่างจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจนเพียงแถบเดียว และพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้ทั้งจากตัวอย่างในธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นมีขนาดของแถบดีเอ็นเอมากกว่า 10 กิโลเบส (ภาพ 3)

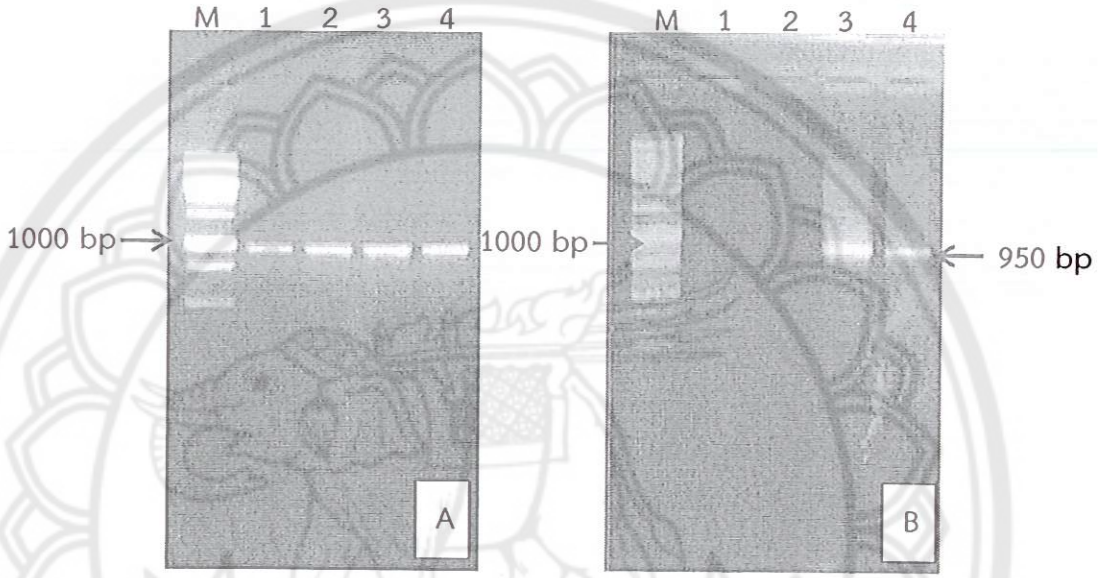


ภาพ 3 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ดิน 1-2 คือตัวอย่างจากธรรมชาติ 3-4คือ ตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และM คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobaseDNA ladder (Fermentas)

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์1 คู่ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 และ ITS2 ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ สารละลายดีเอ็นเอสามารถนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิช่วง Annealing เท่ากับ 55 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟริซิสบน1% อะกาโรสเจล พบว่าบางตัวอย่างไม่ทำให้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ และบาง

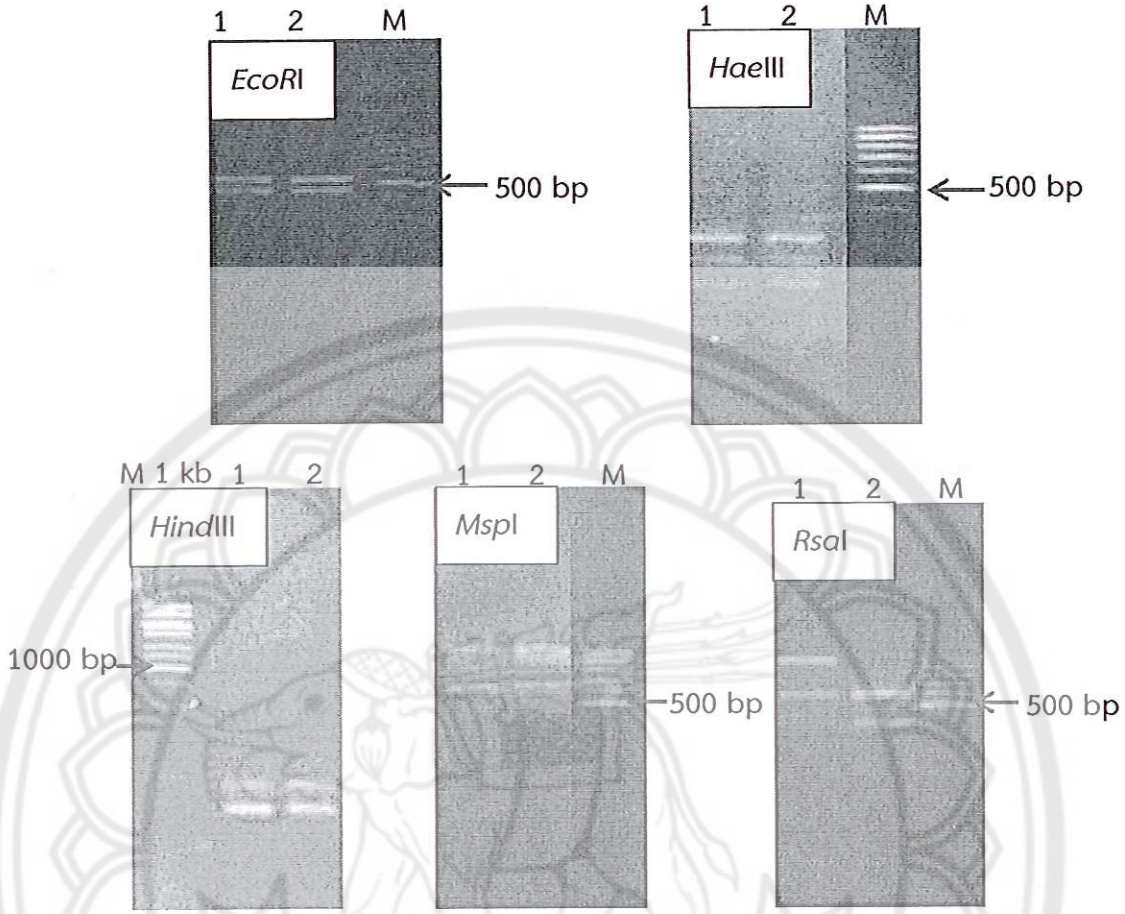
ตัวอย่างมี non-specific และรอย smear เกิดขึ้น ดังนั้นจึงทำการเจือจางตัวอย่างที่ไม่เกิดผลผลิต 10 เท่า และเพิ่มอุณหภูมิในขั้น Annealing เป็น 59 องศาเซลเซียส และทำการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟริซิสบน1% อะกาโรสเจลพบว่าผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้เกิดแถบของดีเอ็นเอชัดเจน โดยขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้คือประมาณ 950 คู่เบส (ภาพ 4)



ภาพ 4 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (A) ไม่เกิดผลผลิตพีซีอาร์ในตัวอย่างที่ 1-2 และเกิด non-specific ในตัวอย่างที่ 3-4(B) non-specific ลดลงเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน ขนาดประมาณ 950 คู่เบส โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobaseDNA ladder (Fermentas)

3. การทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์

ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ต้องทำให้มีความบริสุทธิ์ก่อนที่จะนำไปใช้ต่อไป การทำให้บริสุทธิ์ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการตัดแถบดีเอ็นเอจากเจลบริเวณแถบที่สว่างที่สุด เพื่อให้ได้ขนาดที่แน่นอน โดยทำการตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1% อะกาโรสเจลจะได้แถบดีเอ็นเอที่ไม่เกิด non-specific และรอย smear หรือการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยที่ไม่ผ่านการตัดแถบดีเอ็นเอจากเจล โดยวิธีการคล้ายคลึงกันแต่จะตัดเพียงบางขั้นตอนออกไปทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่เกิด non-specific และรอย smear เช่นกัน ซึ่งสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ทำให้มีความบริสุทธิ์สามารถนำไปใช้ในการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีต่อไป (ภาพ 5)



ภาพ 6 รูปแบบmonomorphic ของต้นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่างๆ โดยที่ 1 คือเอื้องดินใบหมาก2 คือเอื้องดินใบไผ่และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 1 Kb และ 100 bpDNA ladder (Fermentas)

ตาราง5 ขนาดของแถบดีเอ็นเอพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Msp*I และ *Rsa*I

ชนิดเอนไซม์ตัดจำเพาะ	ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเอื้องดินใบหมาก (คู่เบส)	ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเอื้องดินใบไผ่ (คู่เบส)
*Eco*RV	500, 400	500, 400
*Hae*III	300, 250, 200, 100	300, 250, 200, 100
*Hind*III	950, 750, 200	950, 750, 200
*Msp*I	950, 550, 400	950, 550, 400
*Rsa*I	950, 600, 350	600, 350

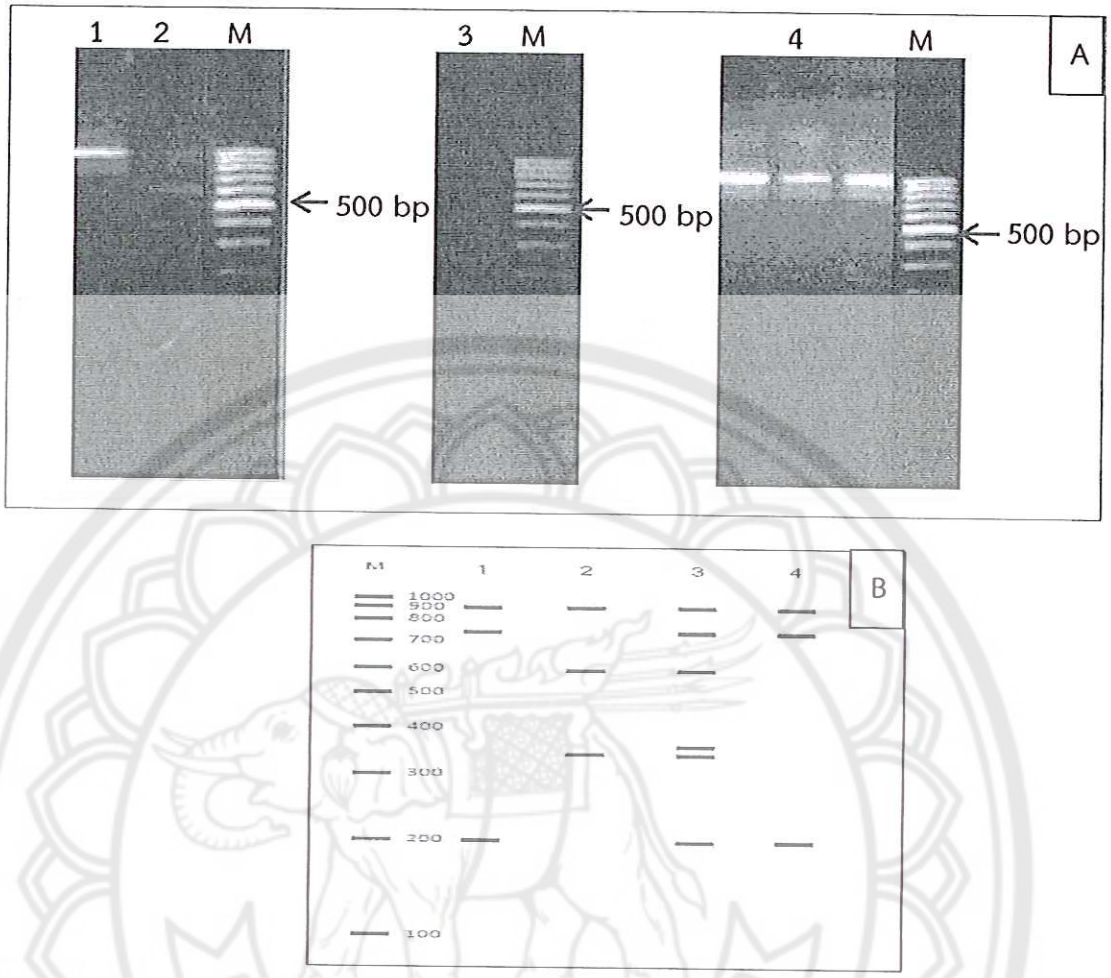
ในขณะที่เอนไซม์ตัดจำเพาะอีก 2 ชนิด คือ *AluI* และ *TaqI* นั้นทำให้เกิดรูปแบบของดีเอ็นเอที่ต่างกัน (polymorphic banding pattern) ของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบลูกผสมในครั้งนี้ได้ โดยเมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากต้นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์บริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ *AluI*และ *TaqI* จำนวนอย่างละ 3 ต้น รวมทั้งสิ้น 6 ตัวอย่าง พบว่าเมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ด้วยเอนไซม์ *AluI*จะให้รูปแบบของดีเอ็นเอของเอื้องดินใบหมากที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ โดยทั้ง 3 ตัวอย่างก็ได้รูปแบบที่แตกต่างกัน ขณะที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเอื้องดินใบไผ่จะให้เพียง 1 รูปแบบเท่านั้น (ตาราง 6) ดังภาพ 7และเมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI* จะให้รูปแบบดีเอ็นเอจากเอื้องดินใบไผ่ 3 รูปแบบ ขณะที่เอื้องดินใบไผ่จะให้ 2 รูปแบบ โดยมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 450 คู่เบส ที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ (ตาราง 7) ดังภาพ 8

ตาราง 6 ขนาดของแถบดีเอ็นเอพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *AluI*

ต้นที่	ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเอื้องดินใบหมาก(คู่เบส)	ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเอื้องดินใบไผ่ (คู่เบส)
1	950, 750, 200	950, 750, 200
2	950, 600, 350	950, 750, 200
3	950, 750, 600, 380, 350, 200	950, 750, 200

5. การตัดดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *AluI*

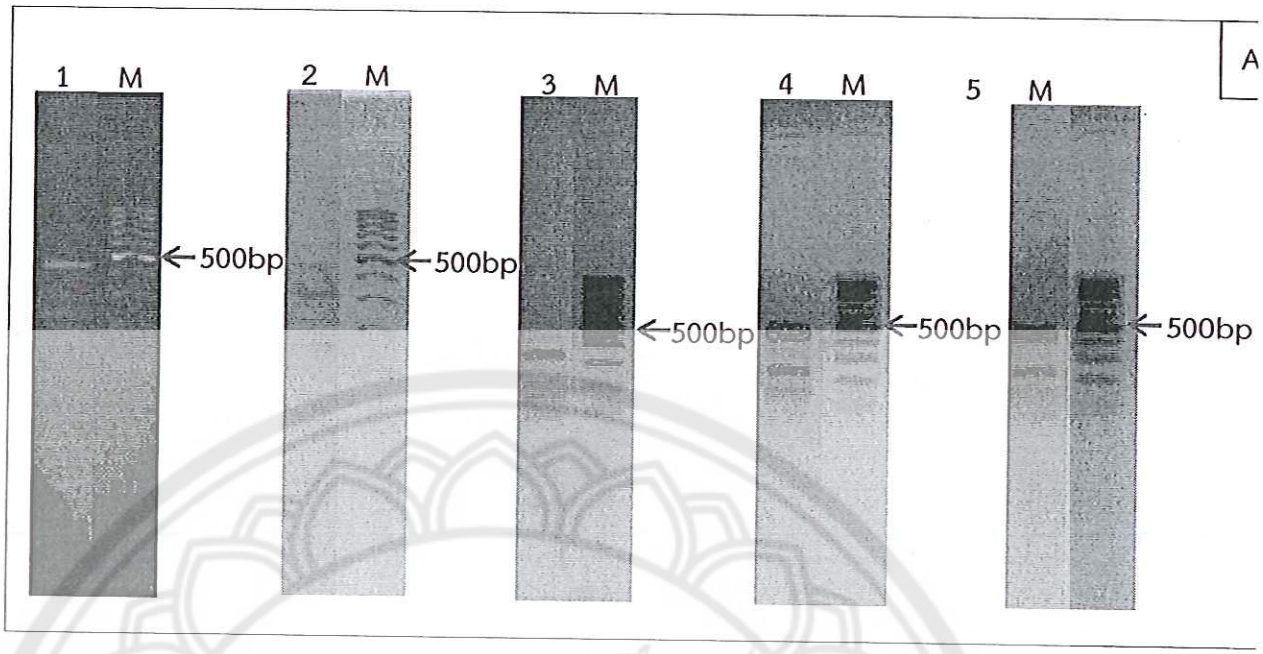
การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่บริเวณ ITS ด้วยเอนไซม์ *AluI*จำนวน 20 ตัวอย่าง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ (ภาพ 9) โดยพบรูปแบบที่ 1 จำนวน 13 ตัวอย่างพบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 950, 750, 200 คู่เบส ซึ่งสามารถระบุได้ว่ารูปแบบนี้น่าจะเป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่ต้นที่ 1 กับพ่อลูกผสมในรูปแบบที่ 2 พบจำนวน 2 ตัวอย่างซึ่งน่าจะเป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่ต้นที่ 1 เนื่องจากพบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 950, 750, 600, 350, 200คู่เบสและรูปแบบที่ 3 จำนวน 5 ตัวอย่าง พบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 950 คู่เบสเพียงแถบเดียวซึ่งไม่สามารถระบุได้ว่าเกิดจากแม่ต้นใด เนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวไม่สามารถตัดได้

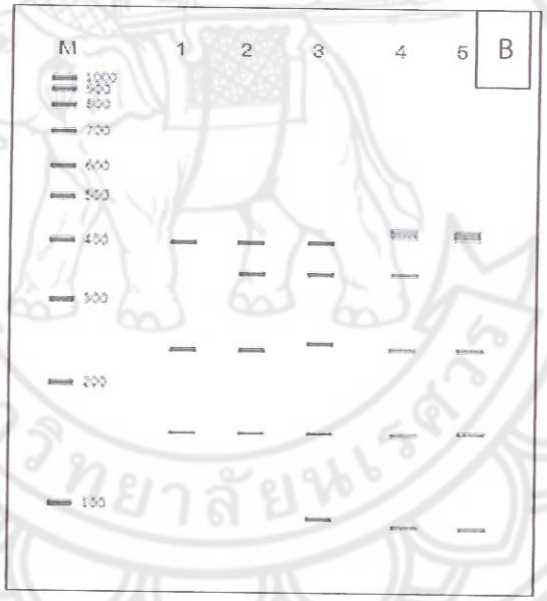


ภาพ 7 รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์*AluI*(A)ภาพจากเจลจริง (B)ภาพไดอะแกรม โดยที่ 1-3 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 4 คือเอื้องดินใบไผ่ และ M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100bpDNA ladder (Fermentas)

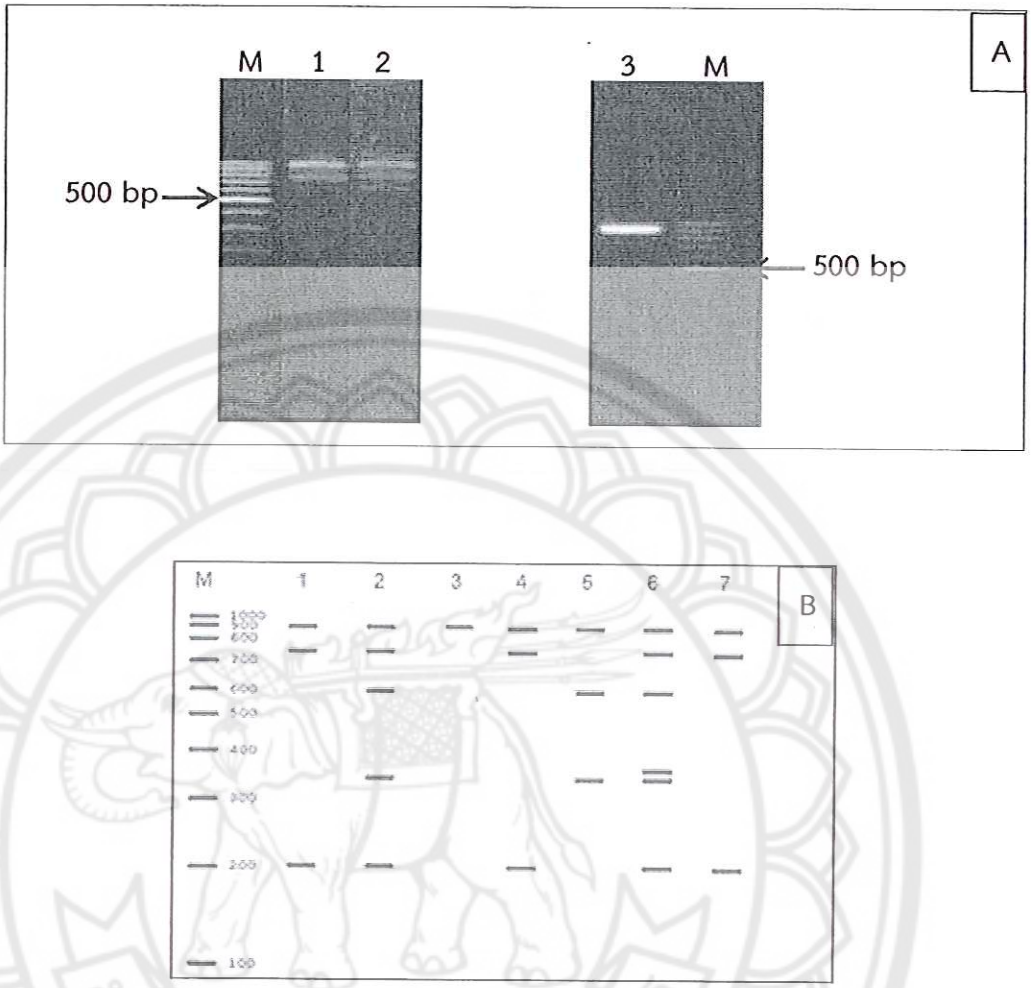
ตาราง 7 ขนาดของแถบดีเอ็นเอพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์*TaqI*

ต้นที่	ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเอื้องดินใบหมาก (คู่เบส)	ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเอื้องดินใบไผ่ (คู่เบส)
1	400, 250, 170	450, 350, 250, 170, 80
2	400, 350, 250, 170	450, 350, 250, 170, 80
3	400, 350, 250, 170, 80	450, 250, 170, 80





ภาพ 8 รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์*Taq*I (A) ภาพจากเจลจริง (B) ภาพไดอะแกรม โดยที่ 1-3 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 4 คือเอื้องดินใบไผ่ต้นที่ 1 และ 2 ในขณะที่ 5 คือเอื้องดินใบไผ่ต้นที่ 3 และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100bpDNA ladder (Fermentas)



ภาพ 9 รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I(A)ภาพจากเจลจริง (B)ภาพไดอะแกรม1-3 คือรูปแบบที่1-3 4-6 คือ เอื้องดินใบหมากต้นที่1-3 ตามลำดับ 7 คือเอื้องดินใบไผ่และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bpDNA ladder (Fermentas)

6. การตัดดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Alu*I

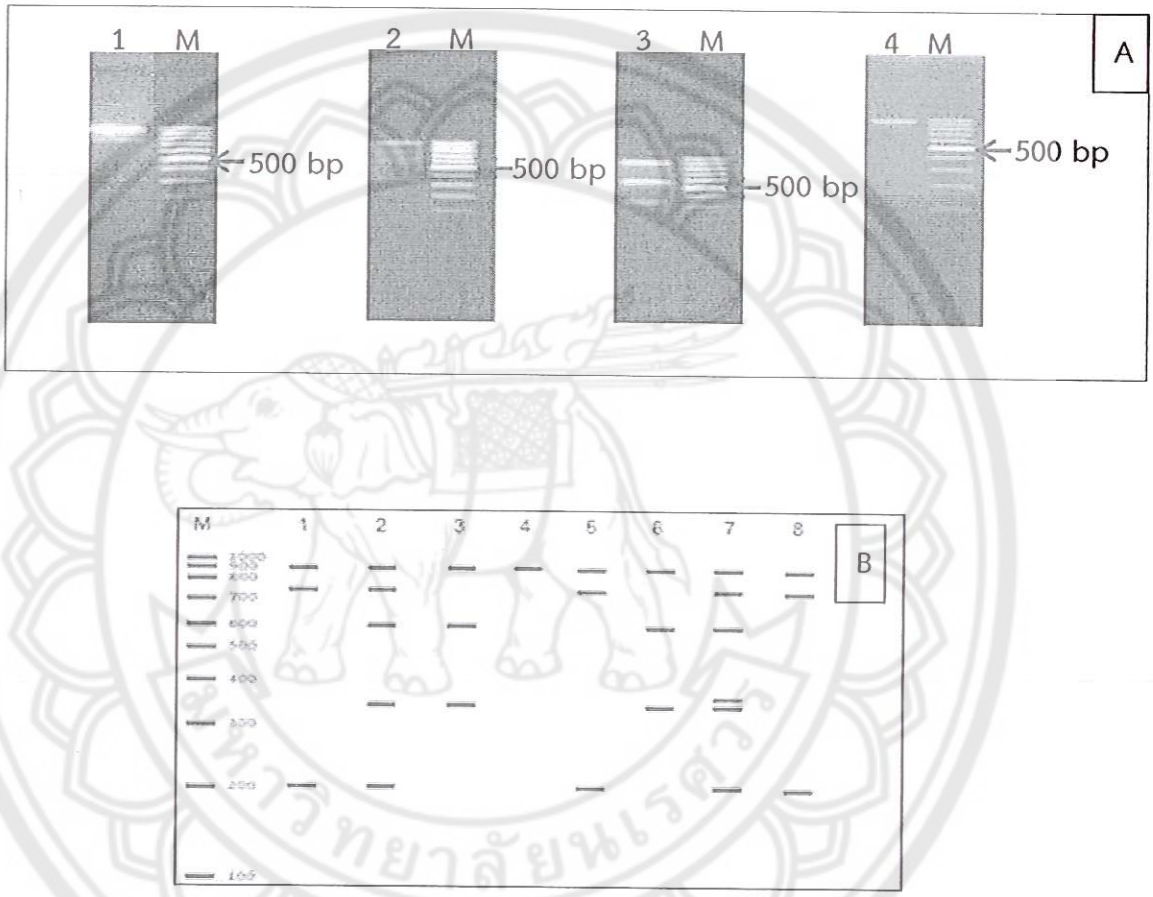
เมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Alu*I จำนวน 52 ตัวอย่าง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ (ภาพ 10)โดยรูปแบบที่ 1 พบจำนวน 1 ตัวอย่างโดยพบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 950, 750, 200คู่เบสซึ่งน่าจะเป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างแม่ต้นที่ 1 กับพ่อ หรือเกิดจากการผสมตัวเองของแม่ในต้นที่ 1 ก็เป็นได้ รูปแบบที่ 2 พบจำนวน 6 ตัวอย่างโดยพบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 950, 750, 600, 350, 200 คู่เบสซึ่งน่าจะเป็นลูกผสมที่เกิดแม่ต้นที่ 1 กับพ่อ เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอขนาด 600 และ 350 คู่เบส จากต้นแม่ และขนาด 750 และ 200 คู่เบส จากต้นพ่อ ในรูปแบบที่ 3 พบจำนวน 36 ตัวอย่าง

ว QK
Q95
.O6U
มาเหร
2557

i678306S

17 ส.ค. 2558 สำนักหอสมุด

ซึ่งรูปแบบนี้พบเป็นส่วนมาก โดยพบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 950, 600, 350คู่เบสจะเห็นได้ว่าไม่พบแถบดีเอ็นเอของเอื้องดินใบไผ่ที่มีขนาด 750 และ 200 คู่เบสเลย ดังนั้นจึงไม่น่าจะเป็นลูกผสมข้ามที่แท้จริง และรูปแบบที่ 4 จำนวน 9 ตัวอย่าง พบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 950 คู่เบสเพียงแถบเดียว จึงไม่สามารถระบุความเป็นลูกผสมได้

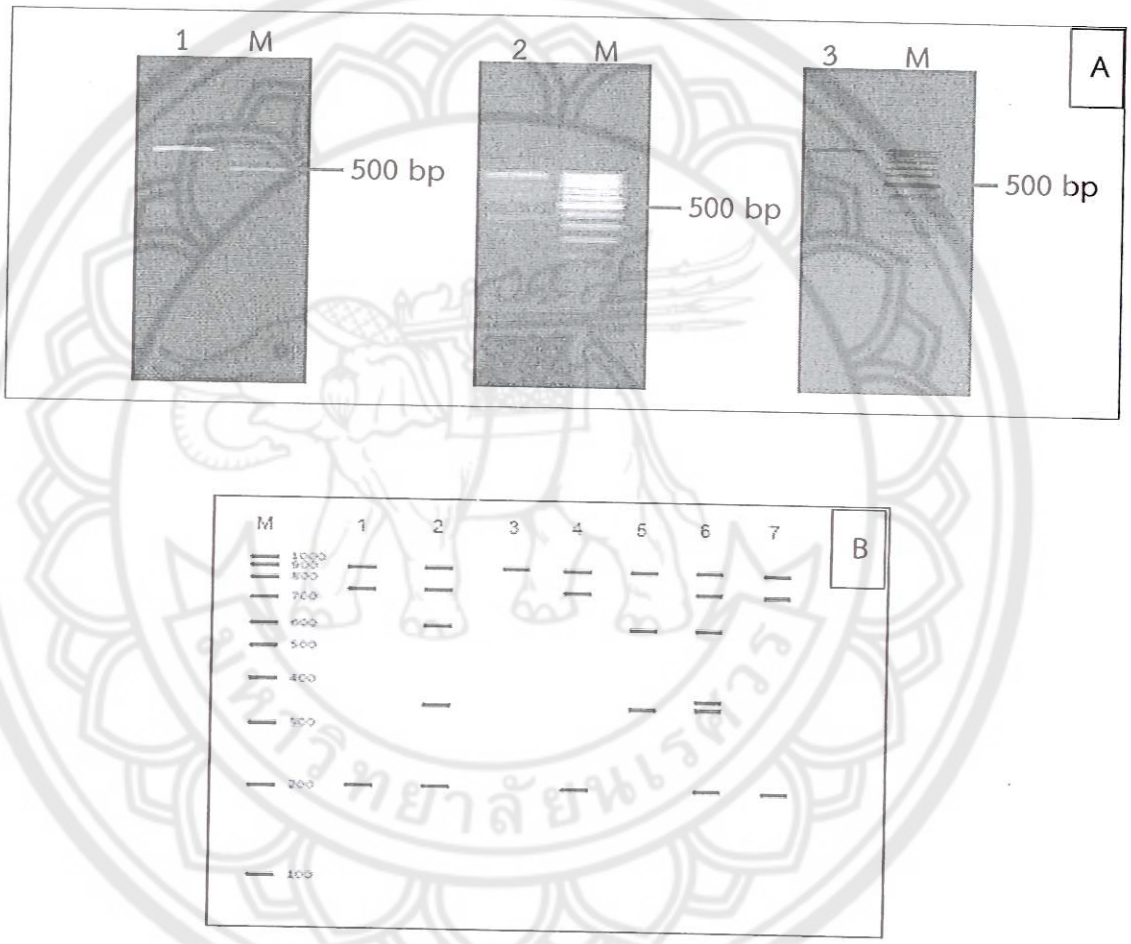


ภาพ 10 รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์*AluI*(A)ภาพจากเจลจริง (B) ภาพไดอะแกรม 1-4 คือรูปแบบที่ 1-4 5-7 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 8 คือเอื้องดินใบไผ่ และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bpDNA ladder (Fermentas)

7. การตัดดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *AluI*

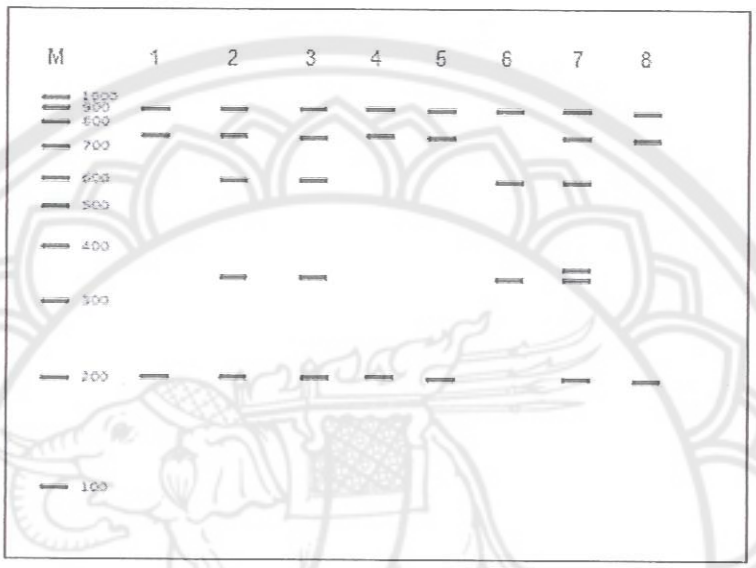
เมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *AluI* จำนวน 48 ตัวอย่าง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ (ภาพ 11)โดยรูปแบบที่ 1พบจำนวน 20 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 950, 750, 200 คู่เบสซึ่งมีโอกาสที่จะ

เป็นลูกผสมระหว่างแม่และพ่อต้นที่ 1 หรือเป็นการผสมตัวเองของเอื้องดินใบไผ่ นอกจากนี้ในรูปแบบที่ 2 พบจำนวน 4 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 950, 750, 600, 350, 200คู่เบสมีโอกาสเป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่และพ่อต้นที่ 2 เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอขนาด 750 และ 200 คู่เบสจากต้นแม่และขนาด 600 และ 350 คู่เบสจากต้นพ่อและในรูปแบบที่ 3 จำนวน 24 ตัวอย่างพบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 950 คู่เบสเพียงแถบเดียว ซึ่งไม่สามารถระบุความเป็นลูกผสมได้



ภาพ 11 รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์*Alu* I (A) ภาพจากเจลจริง (B) ภาพไดอะแกรม1-3 คือรูปแบบที่ 1-3 4-6 คือเอื้องดินใบหมาก ต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 7 คือเอื้องดินใบไผ่และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

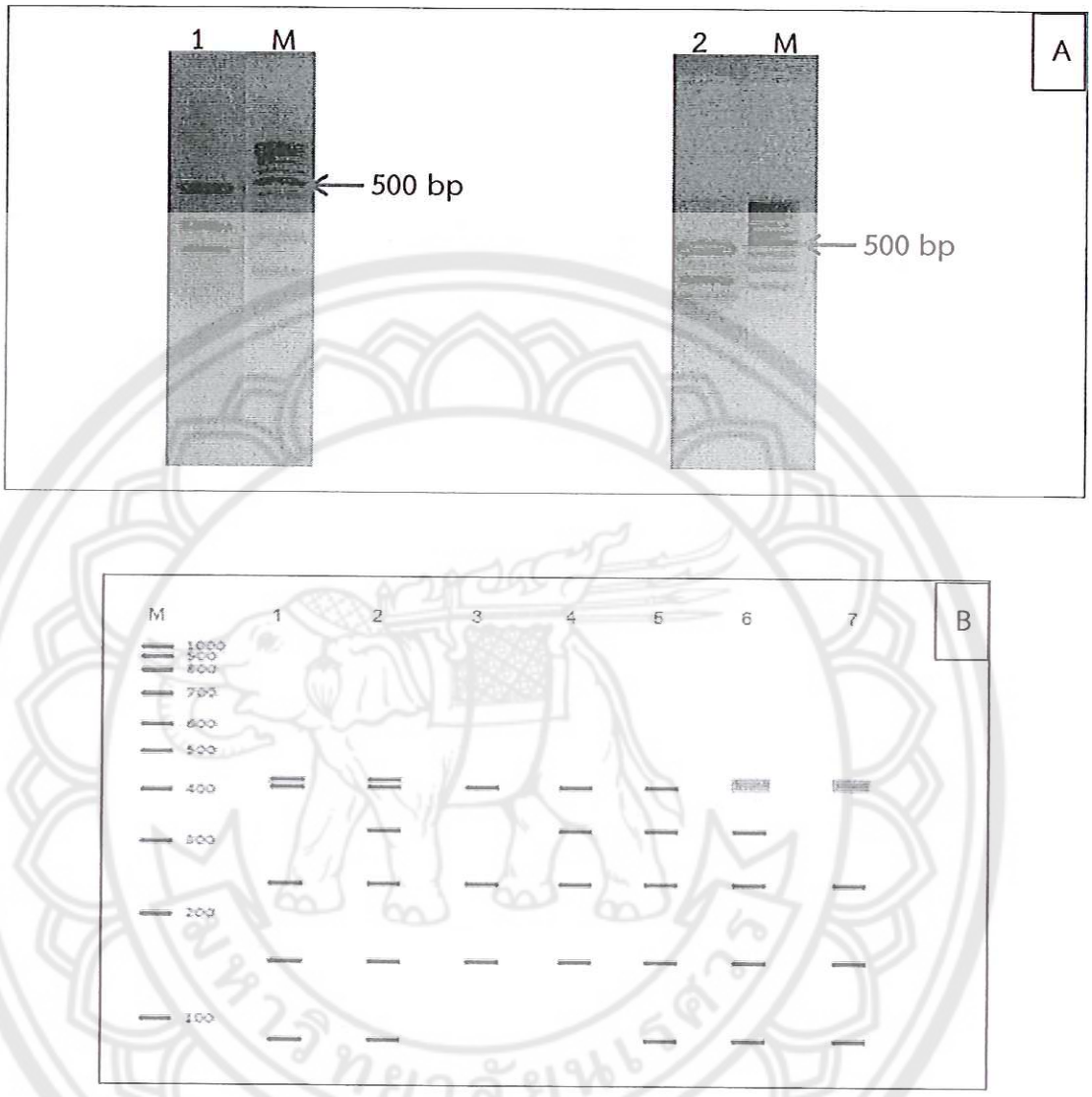
ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ *Alu*Iนั้น สามารถตัดดีเอ็นเอของลูกผสมที่ได้จากการถ่ายฝากแล้วให้รูปแบบของดีเอ็นเอต่างๆ (ภาพ 12) ที่สามารถบอกถึงโอกาสที่ตัวอย่างนั้นๆ จะเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริงโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ทั้งสิ้น 7 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 13, 86, 20, 21, 28, 29และ 74) ในขณะที่เมื่อมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่พบ 24 ตัวอย่าง



ภาพ 12 รูปแบบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*Iของลูกผสมข้ามสกุลที่ได้จากการถ่ายฝากโดย 1-2 คือลูกผสมข้ามสกุลที่ได้จากการถ่ายฝากที่มีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ 3-4 คือ ลูกผสมข้ามสกุลที่ได้จากการถ่ายฝากที่มีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ 5-7 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 8 คือเอื้องดินใบไผ่และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

8. การตัดดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามโดยเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Taq*I

การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Taq*I จำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นลูกที่เกิดจากการผสมข้ามที่แท้จริง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ (ภาพ 13) โดยรูปแบบที่ 1 พบ 19 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 450, 400, 250, 170, 80 คู่เบสสามารถบอกได้ว่าเป็นลูกผสมที่น่าจะเกิดจากการผสมระหว่างต้นแม่ต้นที่ 1 และต้นพ่อต้นที่ 3 และรูปแบบที่ 2 จำนวน 1 ตัวอย่าง พบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 450, 400, 350, 250, 170, 80 คู่เบสซึ่งไม่สามารถระบุต้นพ่อแม่ได้ จะเห็นได้ว่าลูกผสมที่แท้จริงนั้นจะปรากฏแถบของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400-450 คู่เบสที่มีความหนามาก ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอขนาด 450 และ 400 คู่เบสออกจากกันได้อย่างชัดเจน

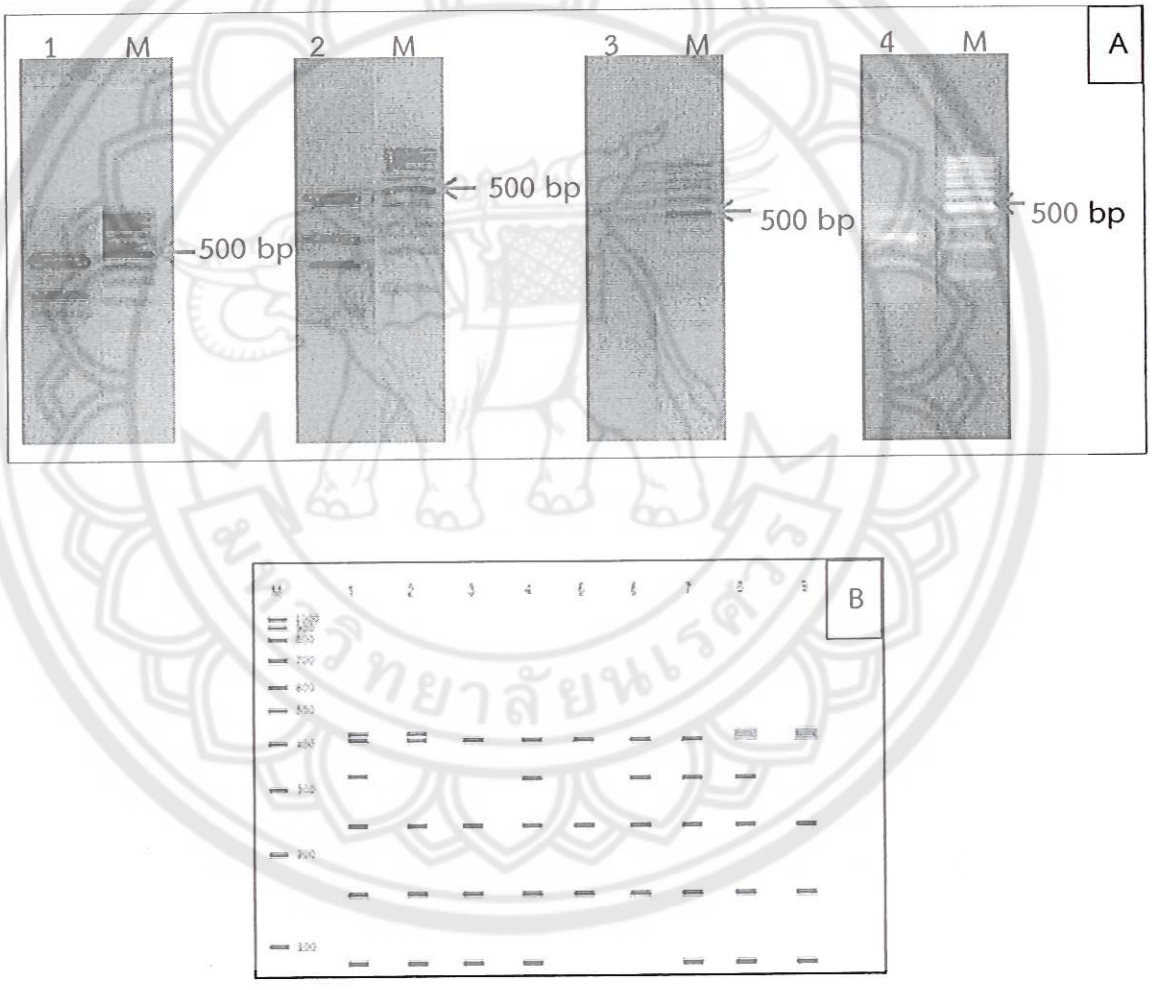


ภาพ 13 รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I (A) ภาพจากเจลจริง (B) ภาพไดอะแกรม 1-2 คือ รูปแบบที่ 1-2 3-5 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 6-7 คือเอื้องดินใบไผ่ รูปแบบที่ 1-2 ตามลำดับและ M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

9. การตัดดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Taq*I

เมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Taq*I จำนวน 52 ตัวอย่าง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ (ภาพ 14) รูปแบบที่ 1 พบจำนวน 15 ตัวอย่าง ซึ่งพบส่วนของดีเอ็นเอขนาด 450, 400, 350, 250, 170, 80 คู่

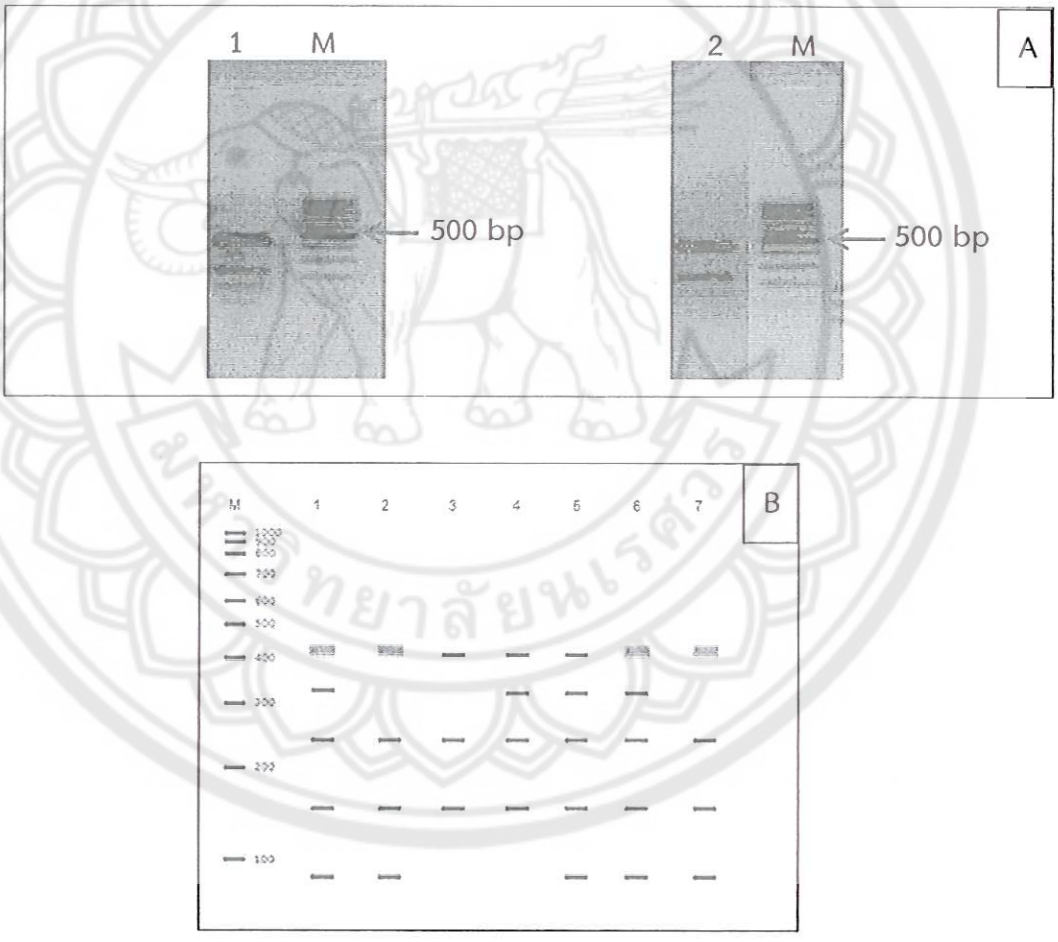
เบสในรูปแบบที่ 2 ทั้งสิ้น 2 ตัวอย่างพบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 450, 400, 250, 170, 80 คู่เบสซึ่งสามารถบอกได้ว่าน่าจะเป็นลูกผสมระหว่างต้นแม่ต้นที่ 1 และต้นพ่อต้นที่ 3 ดังนั้นตัวอย่างทั้งสองรูปแบบนี้พบว่าน่าจะเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริง เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอหนาขนาดประมาณ 450 คู่เบสที่ได้จากต้นพ่อ ขณะที่รูปแบบที่ 3 พบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 400, 250, 170, 80 คู่เบส จำนวน 3 ตัวอย่างและรูปแบบที่ 4 พบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 400, 350, 250, 170, 80 คู่เบส จำนวน 2 ตัวอย่าง ทั้งตัวอย่างในรูปแบบที่ 3 และ 4 นี้ ไม่มีโอกาสที่จะเป็นลูกผสมโดยสิ้นเชิง เนื่องจากไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดหนาขนาดประมาณ 450 คู่เบส จากเอื้องดินใบไผ่



ภาพ 14 รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI* (A) ภาพจากเจลจริง (B) ภาพไดอะแกรม 1-4 คือรูปแบบที่1-4 5-7 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 8-9 คือเอื้องดินใบไผ่ รูปแบบที่ 1-2 ตามลำดับและ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

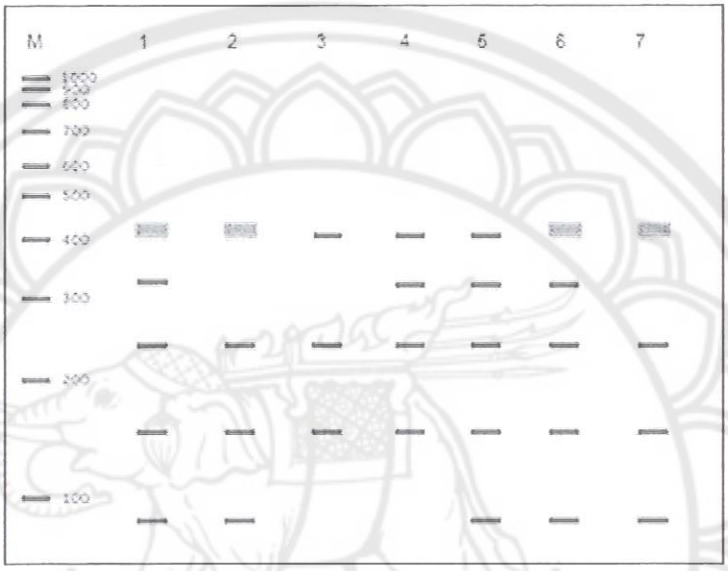
10. การตัดดีเอ็นเอลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *TaqI*

เมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *TaqI*จำนวน 48 ตัวอย่าง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ (ภาพ 15) รูปแบบที่ 1 พบ 9 ตัวอย่าง โดยพบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 450, 350, 250, 170, 80 คู่เบส รูปแบบที่ 2 จำนวน 39 ตัวอย่าง พบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 450, 250, 170, 80คู่เบส ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบสหรือไม่ เนื่องจากความหนาของแถบดีเอ็นเอขนาด 450 คู่เบส ซึ่งพบในเอื้องดินใบไผ่อยู่แล้ว รูปแบบที่ได้ทั้งสองรูปแบบอาจเกิดจากการผสมข้ามสกุลหรือการผสมตัวเองของเอื้องดินใบไผ่จึงไม่สามารถระบุความเป็นลูกผสมข้ามสกุลของลูกที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *TaqI* ได้



ภาพ 15 รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI* (A) ภาพจากเจลจริง (B) ภาพไดอะแกรม 1-2 คือรูปแบบที่ 1-2 3-5 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 6-7 คือเอื้องดินใบไผ่รูปแบบที่ 1-2 ตามลำดับ และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ *TaqI* นั้น สามารถตัดดีเอ็นเอของลูกผสมที่ได้จากการถ่ายฝากแล้วให้รูปแบบของดีเอ็นเอต่างๆ (ภาพ 16) ที่สามารถบอกถึงโอกาสที่ตัวอย่างนั้นๆ จะเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริงโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ทั้งสิ้น 17 ตัวอย่าง (ตัวอย่างที่ 20, 21, 22, 23, 28, 29, 30, 31, 38, 52, 53, 54, 58, 60, 74, 75, 91)



ภาพ16 รูปแบบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยการตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI* ของลูกผสมข้ามสกุลที่ได้จากการถ่ายฝากโดย 1-2 คือลูกผสมข้ามสกุลที่ได้จากการถ่ายฝากที่มีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่3-5คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 6-7 คือเอื้องดินใบไผ่และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

1. อภิปรายผลการทดลอง

การสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ดินที่เป็นพ่อแม่พันธุ์จากในธรรมชาติและลูกผสมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และสุ่มตัวอย่างมา โดยใช้วิธี CTAB ที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987) สารละลายดีเอ็นเอที่ได้ใสไม่มีสี เมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 0.8% อะกาโรสเจล พบว่าบางตัวอย่างเกิดรอย smear อาจเป็นที่ขั้นตอนการใส่สารคลอโรฟอร์มมีการกลับหลอดไปมาหลายรอบและรุนแรง จึงทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีการแตกหักมาก หรือระหว่างขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอเกิดสารประกอบฟีนอลทำให้ดีเอ็นเอมีการปนเปื้อน

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์นั้นควรใช้ความเข้มข้นของสารเคมีต่างๆ อย่างเหมาะสม สารละลายดีเอ็นเอที่เกิดรอย smear สามารถนำมาเพิ่มปริมาณได้เนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณมีขนาดสั้นเพียง 950 คู่เบสเท่านั้น แต่พบว่าบางตัวอย่างไม่ทำให้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ เนื่องจากมีการปนเปื้อนสารจำพวกโปรตีนหรืออาร์เอ็นเอมากเกินไป จึงต้องทำการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ก่อนนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และบางตัวอย่างมีแถบดีเอ็นเอที่ไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific band)และรอย smear เกิดขึ้น จึงทำการเพิ่มอุณหภูมิในขั้น Annealing ให้สูงขึ้น ปรากฏว่าได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีแถบชัดเจนเพียงแถบเดียว และเมื่อทำให้สารละลายดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยการตัดเจลสามารถให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนเพียงแถบเดียว และมีปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้ในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีต่อไปได้

ผลการตรวจสอบลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากที่พบว่ามีโอกาสเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริงนั้น จากทั้งการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *AluI* และ *TaqI*โดยให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นต้นแม่ ทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง แต่เมื่อใช้เอื้องดินใบไผ่เป็นต้นแม่นั้นไม่สามารถระบุความเป็นลูกผสมได้เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *TaqI*ดังนั้นจาก 24 ตัวอย่างจึงมีเพียง 4 ตัวอย่างที่ตรวจสอบได้ว่าเป็นลูกผสมข้ามสกุล เนื่องจากมีแถบดีเอ็นเอของต้นพ่อที่ชัดเจนและเห็นง่ายกว่ารวมถึงแตกต่างจากต้นแม่ชัดเจน เพราะสามารถระบุได้ว่าเกิดจากการผสมข้ามสกุลจริงระหว่างต้นพ่อแม่ต้นใด ดังนั้นจึงพบว่ามีลูกผสมข้ามสกุลที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่เป็นต้นแม่ทั้งสิ้น 5 (ตัวอย่างที่ 20, 21, 28, 29, 74) และ 4 (ตัวอย่างที่ 15, 25, 26, 27) ตัวอย่าง ตามลำดับ

จากการรายงานของ Mao *et al.* (2004) ศึกษาการงอกของเมล็ดและการพัฒนาเป็นต้นกล้าโดยเปรียบระหว่างการผสมตัวเองและการผสมข้ามชนิดของกล้วยไม้สกุล *Spathoglottis* Bl. พบว่ามีอัตราการงอกของเมล็ดและการพัฒนาเป็นต้นกล้าที่ต่างกัน ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่าลูกผสมทั้ง 5 ตัวอย่างที่เกิดจากการถ่ายฝากเมื่อมีเอื้องดินใบหมากเป็นต้นแม่นั้น น่าจะไม่ใช่ลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริง เนื่องจากมีระยะเวลาในการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้าที่เท่ากับต้นที่เกิดจากการ

ผสมตัวเองของเอื้องดินใบหมากแต่แตกต่างจากลูกผสมข้ามสกุลที่เกิดจากการผสมข้ามด้วยมือที่ใช้เอื้องดินใบหมากเป็นต้นแม่ กล่าวคือลูกผสมข้ามสกุลจะงอกและพัฒนาช้ากว่าต้นที่เกิดจากการผสมตัวเอง (ตาราง 8) ในขณะที่ลูกผสมข้ามสกุลอีก 4 ตัวอย่างที่เกิดจากเอื้องดินใบไผ่เป็นต้นแม่นั้นมีระยะเวลาในการงอกของเมล็ดที่ช้ากว่าต้นที่เกิดจากการผสมตัวเองของเอื้องดินใบไผ่ (ตาราง 9)จึงอาจจะเป็นไปได้อย่างมากที่จะเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริง ซึ่งการตรวจสอบลูกผสมที่ได้จากการถ่ายฝากในครั้งนี้จึงพบว่ามีโอกาสที่จะได้ลูกผสมข้ามสกุลจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นต้นแม่ 4 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 48 หรือคิดเป็น 8.33%

ตาราง 8 เปรียบเทียบระยะเวลาในการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นอ่อนของลูกผสมตัวเองของเอื้องดินใบหมากลูกผสมข้ามสกุล และลูกผสมจากการถ่ายฝากเมื่อมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่

ระยะเวลา / ตัวอย่าง	ลูกผสมตัวเอง	ลูกผสมข้ามสกุล	ลูกผสมข้ามสกุลจากการถ่ายฝากตัวอย่างที่ 20, 21, 28, 29, 74
ระยะเวลาการงอกของเมล็ด	14 วัน	35 วัน	14 วัน
ระยะเวลาการเจริญของต้นอ่อน	16 สัปดาห์	24 สัปดาห์	16 สัปดาห์

ตาราง 9 เปรียบเทียบระยะเวลาในการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นอ่อนของลูกผสมตัวเองของเอื้องดินใบไผ่และลูกผสมจากการถ่ายฝากเมื่อมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่

ตัวอย่าง / ระยะเวลา	ลูกผสมตัวเอง	ลูกผสมข้ามสกุลจากการถ่ายฝากตัวอย่างที่ 15, 25, 26, 27
ระยะเวลาการงอกของเมล็ด	14 วัน	21 วัน
ระยะเวลาการเจริญของต้นอ่อน	16 สัปดาห์	16 สัปดาห์

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการผสมข้ามที่เกิดจากการผสมแบบปกติเมื่อใช้เอื้องดินใบหมากเป็นต้นแม่สามารถทำให้เกิดการติดฝักให้ลูกผสมได้ นั่นหมายความว่าเอื้องดินใบหมากมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแม่พันธุ์ในการสร้างลูกผสมข้ามสกุล แต่เมื่อใช้การผสมข้ามโดยใช้เทคนิคการถ่ายฝากนั้นไม่สามารถให้ลูกผสมข้ามสกุลได้ อาจเนื่องจากเอื้องดินใบหมากมีสามารถที่จะรับละอองเรณูของชนิดเดียวกันได้ดีกว่านั่นเอง ดังนั้นจึงพบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอื้องดินใบหมากในธรรมชาติ

ได้มาก ขณะที่การผสมข้ามที่เกิดจากการผสมแบบปกติเมื่อใช้เอื้องดินใบไผ่เป็นต้นแม่นั้นไม่ทำให้เกิดการติดฝักได้เลย จึงเห็นได้ว่าเอื้องดินใบไผ่นั้นไม่เหมาะที่จะนำมาเป็นแม่พันธุ์ในการผสมข้ามสกุลแบบปกติแต่เมื่อใช้เทคนิคการถ่ายฝากเข้ามาช่วยนั้นสามารถให้ลูกผสมข้ามสกุลได้ แม้มีโอกาสเพียงเล็กน้อยก็ตาม แต่ก็สามารถนำไปขยายเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ได้ปริมาณมากได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเอื้องดินใบไผ่สามารถรับละอองเรณูของกล้วยไม้ชนิดอื่นได้เมื่อมีละอองเรณูของตนเองร่วมอยู่ด้วยโดยวิธีการถ่ายฝาก แต่ถ้าวิธีการผสมปกติจะไม่สามารถผสมได้เลย แสดงถึงว่าเอื้องดินใบไผ่ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือมีน้อยมากในธรรมชาติ ซึ่งถือว่าการผสมข้ามสกุลของกล้วยไม้ดินสองสกุลนี้ประสบความสำเร็จในระดับหนึ่ง

จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของพ่อแม่พันธุ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *TaqI*พบความหลากหลายของรูปแบบที่เกิดขึ้นโดยเอื้องดินใบหมากมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าเอื้องดินใบไผ่ โดยความแตกต่างที่เกิดขึ้นนั้นอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ใน rDNA ที่มีทั้งแบบการแทนที่ การเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายไปของลำดับเบส (Venkateswarlu and Nazar, 1991)

ดังนั้นในการตรวจสอบลูกผสมในบริเวณ ITS จึงอาจไม่เหมาะสมกับพืชที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของบริเวณ ITS สูง อย่างเช่นเอื้องดินใบหมากซึ่งพบว่าภายในต้นเดียวกันก็มีความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้เช่นกัน ซึ่งพบรายงานว่าพืชบางชนิดนั้นมีชุดยีน rDNA หลายซ้ำ ซึ่งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์อาจทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS จากคนละชุดยีนกัน (Bailey, et al., 2003) ดังนั้นจึงควรใช้การตรวจสอบโดยนำส่วนของยีนซึ่งเป็นบริเวณที่ความความจำเพาะสูง (specific gene) มาใช้ โดยในรายงานของ กนกวรรณแดงสวัสดิ์ ในปี 2551 ได้ทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวหลวงโดยใช้ชิ้นส่วนของยีนที่มีความจำเพาะ คือ chalcone synthase, storage protein และ fruit full protein ร่วมกับบริเวณ ITS พบว่าสามารถตรวจสอบลูกผสมบัลหลวงที่เกิดขึ้นได้ และการนำเทคนิคที่สามารถใช้ในการตรวจสอบได้อย่างแม่นยำสูง เช่น เทคนิค SSCP (Single Strand Conformational Polymorphisms) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถเห็นความแตกต่างแม้มีความแตกต่างในลำดับเบสของดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อยก็ตามซึ่งในรายงานของ จีรภา ดาทอง และ วิภา หงษ์ตระกูล (2555) ได้ศึกษาการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมในบัวประดับและบัวหลวง โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีนที่จำเพาะร่วมกับบริเวณ ITS พบว่าเมื่อตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ใน 1% agarose gel พบรูปแบบแถบดีเอ็นเอเพียงรูปแบบเดียวในทุกตัวอย่างที่ศึกษาแต่เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอบน non-denaturing polyacrylamide gel พบความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นและสามารถระบุลูกผสมได้

2. สรุปผลการทดลอง

2.1การสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ดินที่ได้จากในธรรมชาติและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ดินที่ได้จากธรรมชาติทั้งหมด 6 ตัวอย่าง และตัวอย่างใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งหมด 120 ตัวอย่าง ด้วยวิธีดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987) สรุปได้ว่าวิธีการดังกล่าวสามารถใช้สกัดดีเอ็นเอจากใบของกล้วยไม้ดินทั้งในธรรมชาติและที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้คุณภาพดีและปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้ต่อไป

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์และการทำให้บริสุทธิ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากสารละลายดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ขนาดประมาณ 950 คู่เบส เมื่อทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่สว่างชัดเจนและได้แถบเดียว

2.3 การตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

สามารถตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี บริเวณ ITS ของกล้วยไม้ดินนี้ได้ด้วยเอนไซม์ *Taq*I และ *Alu*Iซึ่งสามารถให้รูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ และผลที่ได้จากทั้งสองเอนไซม์นี้สามารถบอกความเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่เกิดจากการถ่ายฝากได้อีกทั้งยังสามารถคาดคะเนได้ว่าเป็นลูกผสมที่เกิดจากพ่อและแม่ต้นใดได้อีกด้วย

แต่พบว่าเอนไซม์ 5 ชนิด ได้แก่ *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Msp*I และ *Rsa*I ไม่สามารถใช้ในการตรวจสอบลูกผสมข้ามสกุลที่เกิดขึ้นนี้ได้ เนื่องจากไม่สามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบของดีเอ็นเอได้นอกจากนี้ยังพบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่ไม่ถูกตัดอีกด้วย

โอกาสที่จะเกิดลูกผสมข้ามสกุลจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ คือ 8.33%

นอกจากนี้ยังสรุปได้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของบริเวณ ITS ของเอื้องดินใบหมากมากกว่าเอื้องดินใบไผ่จากจำนวนรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นนั่นเอง

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ แดงสวัสดิ์. (2551). **การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวหลวง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จิตติมา เจริญพานิช.(2553). **เอนไซม์วิทยา.** กรุงเทพฯ. โอ. เอส.พริ้นติ้ง เฮาส์.

จีรภา ดาทอง และ วิภา หงษ์ตระกูล. (2555). **การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมในบัวประดับและบัวหลวง.** เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.50, 48-56.

ธนากร วงษา. (2552). **ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดจำแนกกล้วยไม้สกุลช้าง (Rhynchostylis Bl.) โดยวิธี Amplified Fragment Length Polymorphism.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

มาลินี อินทร์วงศ์ และ ณัฐา โพธาภรณ์. (2553). **ความสามารถในการผสมข้ามหมู่ของกล้วยไม้สกุลหวายของไทยและหวายพันธุ์การค้า.** การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุชาดา สุขหร่อง. (2553). **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร.**กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุภาพร หนูชนะภัย และ บุญจิต ฐิตาภิวัฒนกุล. (2553). **การวิเคราะห์ศักยภาพตลาดกล้วยไม้ส่งออกที่สำคัญของไทย.**วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรีพร เกตุงาม. (2546). **เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช.**วารสารวิชาการ ม.อบ., 5(2), 37-59.

Arpita, B., Subhendu, B. and Sarmistha, SR. (2012). In vitro regeneration of *Hypericum perforatum* L. using thidiazuron and analysis of genetic stability of regerants. **Indian Journal of Biotechnology**, 11, 92-98.

Bailey, C.D., Carr, T.G., Harris, S.A. & Hughes, C.E. (2003).Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 29, 435–455.

Doyle J. J. and Doyle J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19, 11–15.

Kishor, R. and Sharma, GJ., (2008). Intergeneric hybrid of two rare and endangered orchids, *Renanthera imschootiana* Rolfe. And *Vanda coerulea* Griff. ex L. (Orchidaceae): Synthesis and characterization. **Euphytica**, 165, 247–256.

Kishor, R. and Sharma, GJ. (2008). Multiple shoot induction in *Ascocenda* Kangla—a monopodial hybrid orchid. **Lindleyana**, 21(1), 6–9.

Kishor, R., Devi, HS.,Jeyaram, K. and Singh, MRK. (2008). Molecular characterization of reciprocal crosses of *Aerides vandarum* and *Vanda stangeana* (Orchidaceae) at the protocorm stage. **Plant Biotechnology Report**, 2(2), 145–152.

Kishor, R., Devi, HS. andJeyaram, K. (2009). Induction of multiple shoots in a Monopodial orchid hybrid (*Aerides vandarum* Reichb.f. *x Vanda stangeana* Reichb.f.) using thidiazuron and analysis of their genetic stability. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, 97, 121–129.

Moa, M., Chitrapan, P., Alisara, M. (2004). A study on seed germination and seelind development of *Spathoglottis* Bl. Orchids. **Kasetsart Journal (NaturalScience)**, 38, 141–156.

Songpanich, P. and V. Hongtrakul.(2010). Intersubgeneric cross in *Nymphaea* spp. L. to develop a blue hardy waterlily. **Scientia Horticulturae**, 124, 475–481.

Venkateswarlu, K. and Nazar, R. (1991). A conserved core structure in the 18–25S rRNA intergenic region from tobacco, *Nicotiana rustica*. **Plant Molecular Biology**, 17, 189–194.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. มีการเผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 6 ปี 2557 ที่มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี ในรูปแบบ Oral Presentation และมีการลงบทความใน Proceeding และบทคัดย่อครั้งนี้
2. มีการตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ฉบับพิเศษ การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 6 20-21 มีนาคม 2557 มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

ภาคผนวก

รูปแบบการรายงานตัวชี้วัด

กรณีตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

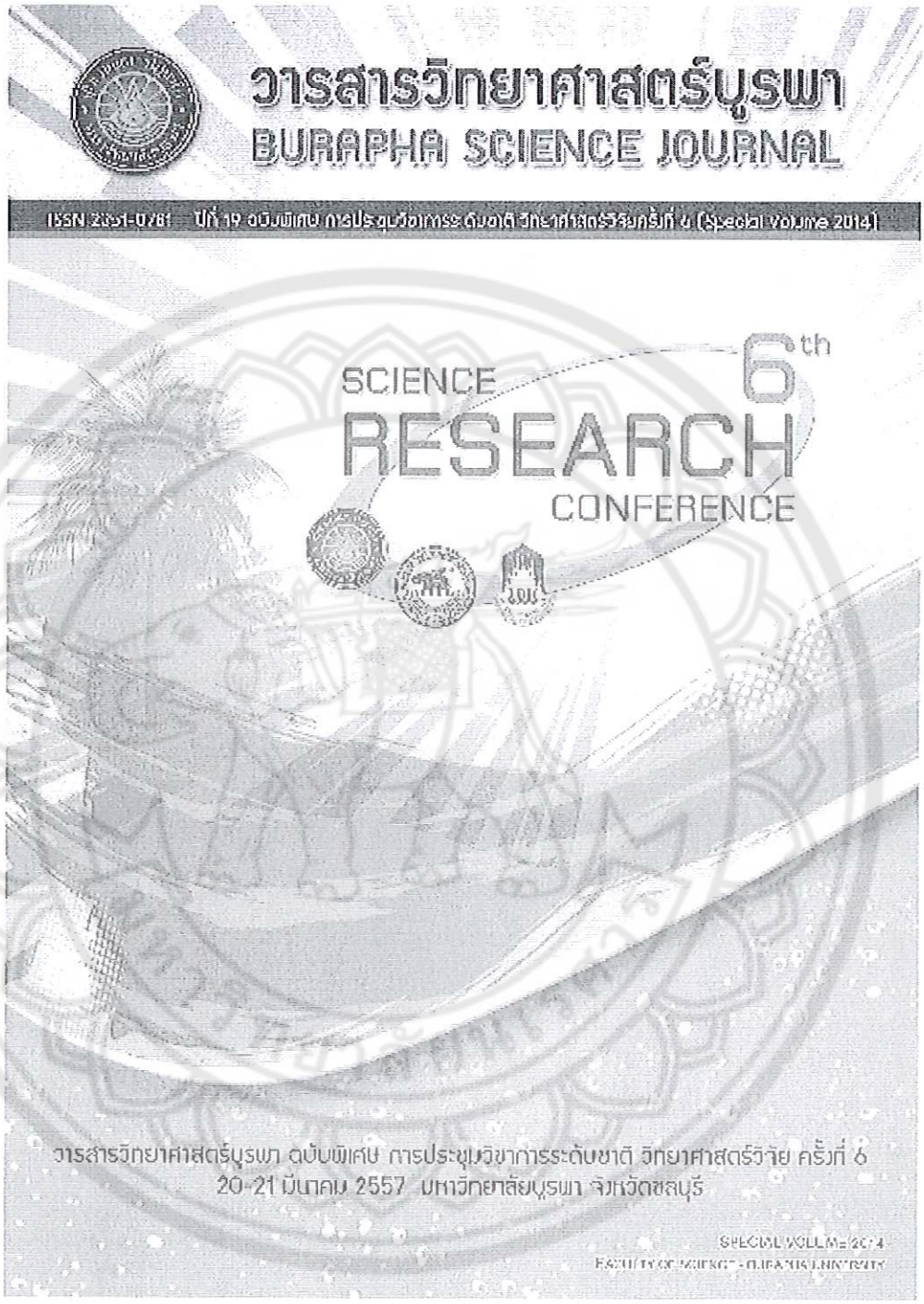
ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด และ ผศ.ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด. (มกราคม-มิถุนายน 2557). คุณลักษณะเชิงโมเลกุลของลูกผสมข้ามสกุลระหว่างเอื้องดินใบหมากกับเอื้องดินใบไผ่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี (Molecular Characterization of Intergeneric hybrids between *Spathoglottis plicata* Bl. and *Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr. by PCR-RFLP). มกราคม-มิถุนายน 2557 วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา (1) : 104-115 (Impact Factor : 0.100)

ลำดับที่	ชื่อนักวิจัยและชื่อผลงาน	เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยเรื่อง	ปีงบประมาณที่ได้รับการสนับสนุน	แหล่งทุน	อยู่ในฐานข้อมูล	ค่า IF
1	ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด ผศ.ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด คุณลักษณะเชิงโมเลกุลของลูกผสมข้ามสกุลระหว่างเอื้องดินใบหมากกับเอื้องดินใบไผ่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี	การตรวจสอบกล้วยไม้ดิน ลูกผสมข้ามสกุลระหว่างเอื้องดินใบหมากกับเอื้องดินใบไผ่ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี	2557	งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร	TCI	0.100

กรณีที่นำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติ

ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด และ ผศ.ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด นำเสนอในวันที่ 20-21 มีนาคม 2557 เรื่อง คุณลักษณะเชิงโมเลกุลของลูกผสมข้ามสกุลระหว่างเอื้องดินใบหมากกับเอื้องดินใบไผ่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี (Molecular Characterization of Intergeneric hybrids between *Spathoglottis plicata* Bl. and *Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr. by PCR-RFLP). นำเสนอรูปแบบ Oral Presentation และลงตีพิมพ์ผลงานวิจัยในรูปแบบบทคัดย่อ ในการประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 6" ณ มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย

ลำดับที่	ชื่อนักวิจัยและชื่อผลงาน	เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยเรื่อง	ปีงบประมาณที่ได้รับการสนับสนุน	แหล่งทุน	อยู่ในฐานข้อมูล	ตีพิมพ์เป็น proceeding		ตีพิมพ์เป็นบทคัดย่อ	
						Oral (เรื่อง)	Poster (เรื่อง)	Oral (เรื่อง)	Poster (เรื่อง)
1	ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด ผศ.ดร. อนุพันธ์ กงบังเกิด นำเสนอในวันที่ 20-21 มีนาคม 2557 เรื่อง คุณลักษณะเชิงโมเลกุลของลูกผสมข้ามสกุลระหว่างเอื้องดินใบหมากกับเอื้องดินใบไผ่ด้วย **เทคนิคพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี**	การตรวจสอบกล้วยไม้ดินลูกผสมข้ามสกุลระหว่างเอื้องดินใบหมากกับเอื้องดินใบไผ่ ด้วย	2557	งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร	TCI			1	


วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา
BURAPHA SCIENCE JOURNAL
ISSN 2651-0781 ปีที่ 19 ฉบับพิเศษ การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 6 (Special Volume 2014)
SCIENCE
6th
RESEARCH
CONFERENCE
วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ฉบับพิเศษ การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 6
20-21 มีนาคม 2557 มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี
SPECIAL VOLUME 2014

คุณลักษณะเชิงโมเลกุลของลูกผสมข้ามสกุลระหว่างเอื้องดินใบหมากกับเอื้องดินใบไผ่ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี

Molecular Characterization of Intergeneric hybrids between *Spathoglottis plicata* Bl. and *Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr. by PCR-RFLP

อรวรรณ ไทยเจริญ, วิชาญ แฟงเมือง, อนุพันธ์ กงบังเกิด และ มลิวรรณ นาคขุนทด*

Orawan Thaijalern, Wichan Faengmuang, Anupan Kongbangkerd and Maliwan Nakkuntod*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

การศึกษาคุณลักษณะเชิงโมเลกุลของลูกผสมข้ามสกุลของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก และเอื้องดินใบไผ่ที่ได้จากการถ่ายฝาก และนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ nrITS (nuclear ribosomal internal transcribed spacer) และตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิดให้รูปแบบที่เหมือนกัน ขณะที่ 2 ชนิดจะให้รูปแบบที่แตกต่างกัน คือ *Alu*I และ *Taq*I ซึ่งจากการสุ่มตัวอย่างต้นที่เกิดจากการถ่ายฝากทั้งหมด 100 ต้น ความน่าจะเป็นที่จะได้ลูกผสมจากการถ่ายฝากเมื่อใช้เอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ คิดเป็น 9.62% และ 8.33% ตามลำดับ

คำสำคัญ: ลูกผสมข้ามสกุล/ เอื้องดินใบหมาก/ เอื้องดินใบไผ่/ พีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี

Abstract

Molecular characterization by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in nrITS (nuclear ribosomal internal transcribed sequence) of intergeneric hybrids between *Spathoglottis plicata* Bl. and *Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr. was investigated. The intergeneric seeding originated from deposit pollination together with tissue culture technique. PCR-RFLP profiles were generated using seven restriction enzymes (REs). Two REs, *Alu*I and *Taq*I, were restricted polymorphic bands profiling whereas the others five gave monomorphic. The studies showed that probability analysis of the hybrids on maternal *S. plicata* and *A. graminifolia* was 9.62% and 8.33%, respectively.

Keywords : Intergeneric hybrids / *Spathoglottis plicata* / *Arundina graminifolia* / PCR-RFLP

***Corresponding author. E-mail:** lotharmali@yahoo.com

1. บทนำ

กล้วยไม้เป็นพืชดอกที่มีความหลากหลายมากและมีความสำคัญในเชิงเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก อีกทั้งยังเป็นประเทศที่ส่งออกกล้วยไม้มากที่สุดของโลก (สุภาพร หนูชนะภัย และ บุญจิต ฐิตาภิวัฒนกุล, 2553) ด้วยความต้องการกล้วยไม้ในปริมาณมาก ในปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยในการเพิ่มปริมาณให้เพียงต่อความต้องการ และยังมีการผสมพันธุ์เกิดขึ้นเพื่อพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะเด่นตามที่ต้องการ โดยส่วนใหญ่เป็นการผสมข้ามชนิดในสกุลเดียวกันซึ่งประสบความสำเร็จเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ยังมีการผสมข้ามสกุลเกิดขึ้น เช่น ลูกผสมข้ามสกุลระหว่าง *Aerides vandarum* Reichb.f และ *Vanda stangeana* Reichb.f (Kishor et al., 2008) เป็นต้น ซึ่งจะทำให้ได้ลักษณะที่เด่นที่ต้องการแตกต่างกันออกไป ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นที่การผสมข้ามสกุลของเอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis plicata* Bl.) และเอื้องดินใบไผ่ (*Arundina graminifolia* (D.Don) Hochr.) โดยเอื้องดินใบหมากเป็นกล้วยไม้ดินพันธุ์แท้ของไทยที่พบตามชายป่า หรือหุ่งโล่งที่ชื้นแฉะทางภาคตะวันออกและภาคใต้ ดอกออกเป็นช่อตั้ง สีชมพูอมม่วง และสามารถออกดอกได้ตลอดปี ในปัจจุบันพบว่าสามารถปลูกได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย ปัจจุบันเอื้องดินใบหมากนี้ได้มีการนำมาพัฒนาสายพันธุ์เพื่อผลิตเป็นไม้กระถางเชิงการค้าอย่างต่อเนื่อง ขณะที่เอื้องดินใบไผ่ เป็นกล้วยไม้ดินที่พบได้ทั่วประเทศ ตามชายป่าและหุ่งโล่ง สามารถทนต่อสภาพภูมิอากาศที่แห้งแล้งและร้อนได้ดี ออกดอกได้เกือบตลอดทั้งปี ดอกเป็นช่อ ทยอยบานทีละดอก มีกลิ่นหอม กลีบดอกสีชมพูอ่อน แต่กลีบปากมีสีชมพูเข้ม ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เหมาะสมในการนำมาพัฒนาและสร้างกล้วยไม้ดินลูกผสม

ซึ่งในการผสมข้ามสกุลไม่ได้ประสบความสำเร็จเสมอไป จึงนำเทคนิคการถ่ายฝากเข้ามาช่วย ทำให้สามารถติดฝักและมีเมล็ด ได้ แต่ถ้าจะรอการตรวจสอบลูกผสมที่เกิดขึ้นอาจจะต้องรอจนกระทั่งกล้วยไม้เจริญเติบโตและออกดอกซึ่งจะใช้เวลานาน ดังนั้นในการตรวจสอบด้านดีเอ็นเอทำให้สามารถวิเคราะห์ผลได้รวดเร็วขึ้น ซึ่งในรายงานของ กนกวรรณ แดงสวัสดิ์ (2551) ได้ทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวหลวงโดยใช้ชิ้นส่วนบริเวณ nrITS ร่วมกับบริเวณยีนที่มีความจำเพาะ พบว่าสามารถตรวจสอบลูกผสมบัวหลวงที่เกิดขึ้นได้ และมีการนำเทคนิคที่สามารถใช้ในการตรวจสอบได้อย่างแม่นยำสูงอย่างเช่น เทคนิค SSCP (single strand conformational polymorphisms) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถแยกความแตกต่างแม้มีลำดับเบสของดีเอ็นเอต่างเพียงเล็กน้อยก็ตาม จีรภา ดาทอง และ วิภา หงษ์ตระกูล (2555) ศึกษาการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมในบัวประดับและบัวหลวง โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีนที่จำเพาะร่วมกับบริเวณ nrITS พบรูปแบบแถบดีเอ็นเอเพียงรูปแบบเดียวในทุกตัวอย่างที่ศึกษาบน 1% agarose gel แต่เมื่อวิเคราะห์บน non-denaturing polyacrylamide gel พบความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นและสามารถระบุลูกผสมได้ ดังนั้นในการศึกษากล้วยไม้ครั้งนี้จึงได้นำบริเวณ nrITS มาใช้ ซึ่งจากผลการทดลองของ Kishor et al. (2009) ก็ได้รายงานความมีเสถียรภาพทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ดินลูกผสมระหว่าง *Vanda stangeana* กับ *Aerides vandarum* เมื่อมีการเพิ่มปริมาณอย่างมากและรวดเร็วด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยตรวจสอบจากดีเอ็นเอในนิวเคลียสบริเวณ nrITS ด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิด พบว่าลูกผสมที่เกิดขึ้นมีรูปแบบของดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมด นั่นหมายความว่าลูกผสมที่เกิดขึ้นมีเสถียรภาพทางพันธุกรรมในบริเวณ nrITS สูงเมื่อเทียบกับต้นพ่อแม่ ดังนั้นดีเอ็นเอบริเวณนี้จึงน่าที่จะเหมาะที่จะนำมาทำการทดสอบกล้วยไม้ลูกผสมในครั้งนี้เช่นกัน

2. วิธีการ

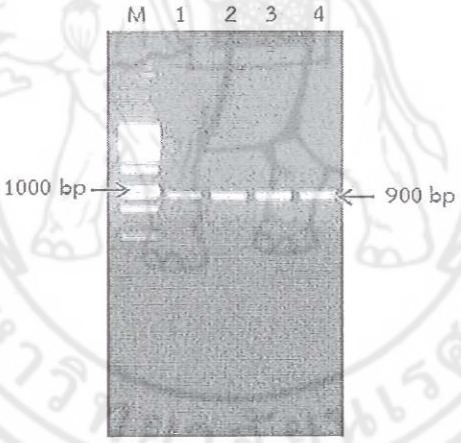
สุ่มตัวอย่างจากกล้วยไม้ดิน 5 กลุ่ม คือ 1) เอื้องดินใบหมากพันธุ์แท้จากธรรมชาติ 2) เอื้องดินใบไผ่พันธุ์แท้จากธรรมชาติเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์อย่างละ 3 ต้น 3) ลูกผสมระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ด้วยเทคนิคการถ่ายฝากโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่จำนวน 52 ตัวอย่าง 4) ลูกผสมระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ด้วยเทคนิคการถ่ายฝากโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่จำนวน 48 ตัวอย่าง และ 5) ลูกผสมจริงระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่โดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่จำนวน 20 ตัวอย่าง จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากนิวเคลียส คลอโรพลาสต์ และไมโทคอนเดรียรวมกันทั้งหมด (Total DNA) ด้วยวิธีดัดแปลงของ Doyle and Doyle (1987) โดยใช้ 1X CTAB buffer (2% Cetyl trimethylammonium bromide, 1.4 M

NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris pH 8.0) ที่เติม β- mercaptoethanol แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 °C จากนั้นเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) แล้วย่อยอาร์เอ็นเอด้วย RNase A จากนั้นทำลายโปรตีนด้วย phenol:chloroform (1:1) แล้วทำซ้ำด้วย chloroform: isoamyl alcohol (24:1) จากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 3 M sodium acetate และ absolute ethanol และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย Ethanol 70% และสุดท้ายละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer (0.01 M Tris pH 8.0, 0.001 M EDTA pH 8.0) แล้วนำไปตรวจสอบขนาดและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิสที่ความเข้มข้นเจล 0.8% จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ nrITS โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ 17SE (5' ATG GTC CGG TGA AGT GTT CG 3') และ 26SE (5' CCC GGT TCG CTC GCC GTT AC 3') (Kishor et al., 2009) แล้วทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย HiYieldTM Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience)

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มาทำการตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด คือ *Alu*I, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Msp*I, *Rsa*I และ *Taq*I ในปฏิกิริยาทั้งหมด 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ 2-3 ไมโครกรัม 1X บัฟเฟอร์ เอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด 3 U และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแต่ละเอนไซม์ แล้ววิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 2% อะกาโรสเจลโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่แรงดัน 50 โวลต์ จากนั้นนำไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในเครื่อง Gel documentation (Bio-rad)

3. ผลและอภิปราย

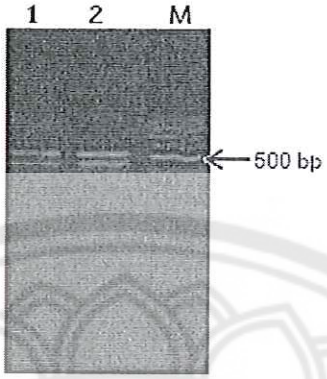
เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งหมดพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณมาก จากนั้นเมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ nrITS พบว่าได้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวมีขนาดประมาณ 900 คู่เบส (ภาพ 1)



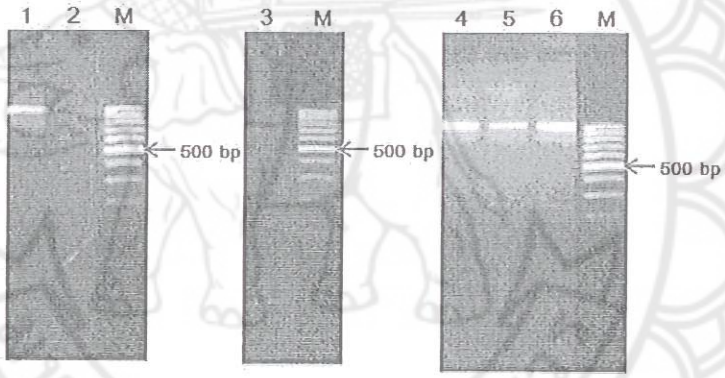
ภาพ 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดย 1 คือเอื้องดินใบหมาก 2 คือเอื้องดินใบไผ่ และ 3-4 คือลูกผสมที่ได้จากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ตามลำดับ และ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder (Fermentas)

จากนั้นเมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ nrITS ของต้นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมด 7 ชนิด ที่ได้จากข้อมูลใน Genebank ได้แก่ *Alu*I, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Msp*I, *Rsa*I และ *Taq*I เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (Fermentas) พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Msp*I และ *Rsa*I ทำให้เกิดรูปแบบของดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (monomorphic banding pattern) (ภาพ 2) จึงไม่สามารถนำเอนไซม์ 5 ชนิดนี้มาใช้ในการตรวจสอบลูกผสมได้ ในขณะที่เอนไซม์ตัดจำเพาะอีก 2 ชนิด คือ *Alu*I และ *Taq*I นั้นทำให้เกิดรูปแบบของดีเอ็นเอที่ต่างกัน (polymorphic banding pattern) ของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์แต่ละต้น จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบลูกผสมในครั้งนี้ได้ โดยเมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากต้นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์บริเวณ nrITS ด้วยเอนไซม์ *Alu*I (AG^CT) และ *Taq*I (T^CGA) จำนวนอย่างละ 3 ต้น พบว่าเมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ด้วยเอนไซม์ *Alu*I จะให้รูปแบบของดีเอ็นเอของเอื้องดินใบหมากที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ โดยทั้ง 3 ตัวอย่างก็ได้รูปแบบที่แตกต่างกัน

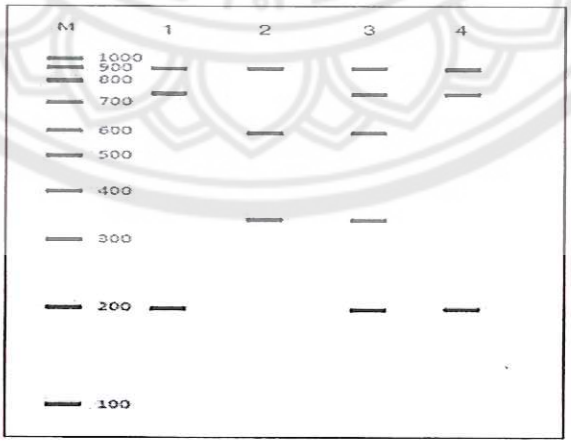
ขณะที่ต้นที่ 3 จะให้ผลรวมของขนาดของแถบดีเอ็นเอเกิน 900 คู่เบส อาจจะเนื่องมาจากความแตกต่างของชุดดีเอ็นเอทั้ง 2 ชุด ที่เป็นเฮทเทอโรไซกัส ขณะที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเอื้องดินใบไผ่จะให้เพียง 1 รูปแบบเท่านั้น ดังภาพ 3-4 (ตาราง1)



ภาพ 2 รูปแบบ monomorphic ของเอื้องดินใบหมาก (1) เอื้องดินใบไผ่ (2) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRV* และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)



ภาพ 3 รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *AluI* โดยที่ 1-3 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 4-6 คือเอื้องดินใบไผ่ต้นที่ 1-3 และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

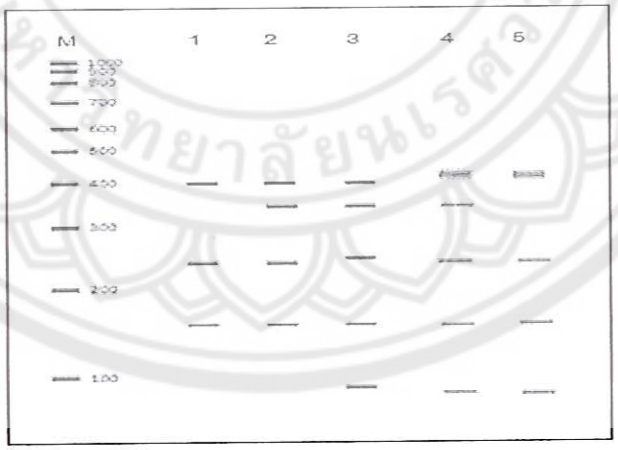


ภาพ 4 ไดอะแกรมรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I โดยที่ 1-3 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 4 คือเอื้องดินใบไผ่ต้นที่ 1-3 และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

ตาราง 1 ขนาดของแถบดีเอ็นเอพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์

ต้นที่	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเอื้องดินใบหมาก(คู่เบส)	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเอื้องดินใบไผ่ (คู่เบส)
1	900, 750, 200	900, 750, 200
2	900, 600, 350	900, 750, 200
3	900, 750, 600, 350, 200 (1) 900, 750, 200 (2) 900, 600, 350	900, 750, 200

และเมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตัดด้วย *Taq*I จะให้รูปแบบดีเอ็นเอจากเอื้องดินใบหมาก 3 รูปแบบ โดยพบว่าเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1 นั้นมีขนาดของแถบดีเอ็นเอรวมกันน้อยกว่า 900 คู่เบส ซึ่งเป็นไปได้ว่ามีดีเอ็นเอสายสั้นๆ อยู่ นั่นคือ ประมาณ 60 คู่เบส และ 20 คู่เบส ที่ไม่สามารถปรากฏอยู่ในการทำเจลอิเล็กโตรโฟริซิสได้ เช่นเดียวกับในเอื้องดินใบหมากต้นที่ 2 และ 3 จะพบว่ามีขนาดของแถบดีเอ็นเอรวมกันทั้งหมดมากกว่า 900 คู่เบส เนื่องจากความแตกต่างของชุดดีเอ็นเอทั้ง 2 ชุดที่เป็นเฮทเทอโรไซกัส ขณะที่เอื้องดินใบไผ่จะให้ 2 รูปแบบ โดยมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 คู่เบส ที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ โดยต้นที่ 1 และ 2 จะมีรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน และจะพบว่ามีขนาดของแถบดีเอ็นเอรวมกันทั้งหมดมากกว่า 900 คู่เบส เนื่องจากความแตกต่างของชุดดีเอ็นเอทั้ง 2 ชุดที่เป็นเฮทเทอโรไซกัส ดังภาพ 5 (ตาราง 2) นอกจากนี้จากทุกรูปแบบยังพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบสที่เกิดจากการตัดไม่หมดของเอนไซม์เนื่องจากความเข้มข้นของปฏิกิริยาอาจไม่เหมาะสม และขณะที่ในบางตัวอย่างอาจไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นมากปรากฏอยู่ในการทำเจลอิเล็กโตรโฟริซิส



ภาพ 5 ไดอะแกรมรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I โดยที่ 1-3 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 4 คือเอื้องดินใบไผ่ต้นที่ 1 และ 2 ในขณะที่ 5 คือเอื้องดินใบไผ่ต้นที่ 3 และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

ตาราง 2 ขนาดของแถบดีเอ็นเอพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I

ต้นที่	ขนาดขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเอื้องดินใบหมาก (คู่เบส)	ขนาดขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเอื้องดินใบไผ่ (คู่เบส)
1	400, 250, 170, (60, 20)*	450, 350, 250, 170, 80, (20)* (1) 450, 350, 80, (20)* (2) 450, 250, 170, 80
2	400, 350, 250, 170, (60, 20)* (1) 400, 250, 170, (60, 20)* (2) 400, 350, 170	450, 350, 250, 170, 80, (20)* (1) 450, 350, 80, (20)* (2) 450, 250, 170, 80
3	400, 350, 250, 170,80 (1) 400, 250, 170, 80 (2) 400, 350, 170	450, 250, 170, 80

หมายเหตุ: ไม่พบในการทำ gel electrophoresis

การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมด้วยเอนไซม์ *Alu*I

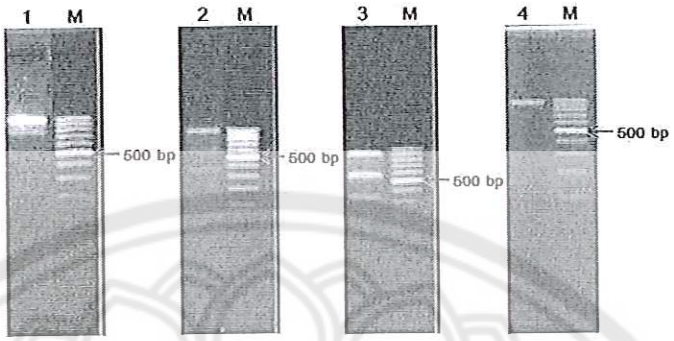
การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่บริเวณ nrITS ด้วยเอนไซม์ *Alu*I จำนวน 20 ตัวอย่าง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ ดังภาพ 8 (ตาราง 3) โดยพบรูปแบบที่ 1 จำนวน 13 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900, 750, 200 คู่เบสซึ่งสามารถระบุได้ว่ารูปแบบนี้น่าจะเป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่ต้นที่ 1 กับพ่อ ลูกผสมในรูปแบบที่ 2 พบจำนวน 2 ตัวอย่างซึ่งน่าจะเป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่ต้นที่ 1 มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900, 750, 600, 350, 200 คู่เบส และรูปแบบที่ 3 จำนวน 5 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบสเพียงแถบเดียวซึ่งไม่สามารถระบุได้ว่าเกิดจากแม่ต้นใด เนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวไม่สามารถตัดได้

ตาราง 3 ขนาดของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I

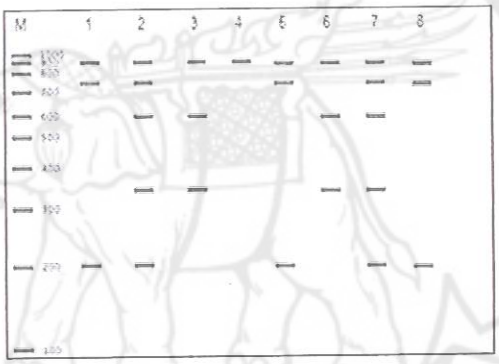
รูปแบบที่	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่(คู่เบส)	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ (คู่เบส)	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ (คู่เบส)
1	900, 750, 200	900, 750, 200	900, 750, 200
2	900, 750, 600, 350, 200	900, 750, 600, 350, 200	900, 750, 600, 350, 200
3	900	900, 600, 350	900
4	-	900	-

เมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Alu*I จำนวน 52 ตัวอย่าง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ ดังภาพ 6-7 (ตาราง3) โดยรูปแบบที่ 1 พบจำนวน 1 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900, 750, 200 คู่เบสซึ่งน่าจะเป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างแม่ต้นที่ 1 กับพ่อ หรือเกิดจากการผสมตัวเองของแม่ในต้นที่ 1 ก็เป็นได้ รูปแบบที่ 2 พบจำนวน 6 ตัวอย่างซึ่งน่าจะเป็นลูกผสมที่เกิดแม่ต้นที่ 1 กับพ่อ มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 และ 350 คู่เบส จากต้นแม่ และขนาด 750 และ 200 คู่เบส จากต้นพ่อ ในรูปแบบที่ 3 พบจำนวน 36 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900, 600,

350 คู่เบส จะเห็นได้ว่าไม่พบแถบดีเอ็นเอของเอื้องดินใบไผ่ที่มีขนาด 750 และ 200 คู่เบสเลย ดังนั้นจึงไม่น่าจะเป็นลูกผสมข้ามที่แท้จริง และรูปแบบที่ 4 จำนวน 9 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบสเพียงแถบเดียว จึงไม่สามารถระบุความเป็นลูกผสมได้

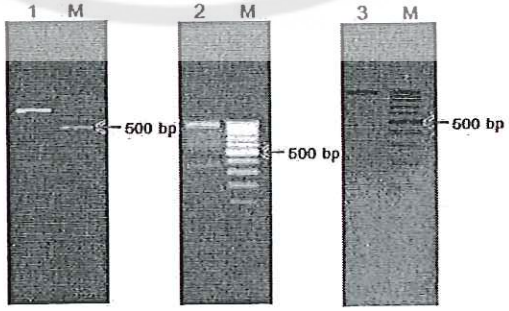


ภาพ 6 รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I โดย 1-4 คือรูปแบบที่ 1-4 และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

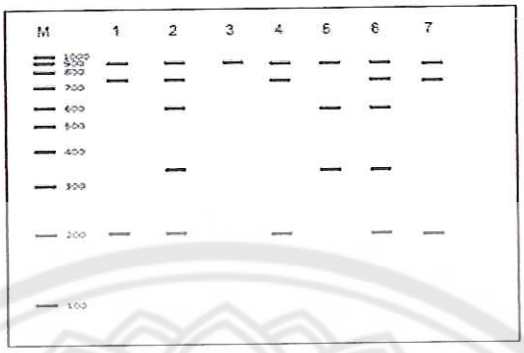


ภาพ 7 ไดอะแกรมรูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I โดย 1-4 คือรูปแบบที่ 1-4 ขณะที่ 5-7 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 8 คือเอื้องดินใบไผ่ และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

เมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Alu*I จำนวน 48 ตัวอย่าง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ ดังภาพ 8-9 (ตาราง 3) โดยรูปแบบที่ 1 พบจำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งมีโอกาสที่จะเป็นลูกผสมระหว่างแม่และพ่อต้นที่ 1 หรือเป็นการผสมตัวเองของเอื้องดินใบไผ่ นอกจากนี้ในรูปแบบที่ 2 พบจำนวน 4 ตัวอย่างก็มีโอกาสเป็นลูกผสมที่ เกิดจากแม่และพ่อต้นที่ 2 และในรูปแบบที่ 3 จำนวน 24 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบสเพียงแถบเดียว ซึ่งไม่สามารถใช้ในการระบุความเป็นลูกผสมได้



ภาพ 8 **รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *AluI* โดย 1-3 คือ รูปแบบที่ 1-3 และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)**

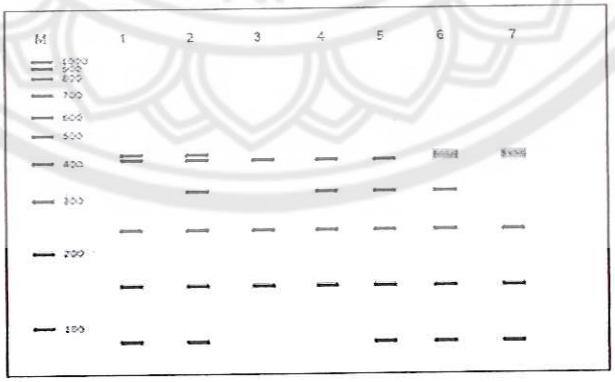


ภาพ 9 ไดอะแกรมรูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *AluI* โดย 1-3 คือรูปแบบที่ 1-3 ขณะที่ 4-6 คือเอื้องดินใบหมาก ต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 7 คือเอื้องดินใบไผ่ และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ *AluI* นั้น สามารถตัดดีเอ็นเอของลูกผสมที่ได้จากการถ่ายฝากแล้วให้รูปแบบของดีเอ็นเอต่างๆ ที่สามารถบอกถึงโอกาสที่ตัวอย่างนั้นๆ จะเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริงโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ทั้งสิ้น 7 ตัวอย่าง ในขณะที่เมื่อมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่พบ 24 ตัวอย่าง

การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมด้วยเอนไซม์ *TaqI*

การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *TaqI* จำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นลูกที่เกิดจากการผสมข้ามที่แท้จริง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ ดังภาพ 10 (ตาราง4) โดยรูปแบบที่ 1 พบ 19 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450, 400, 250, 170, 80 คู่เบส สามารถบอกได้ว่าเป็นลูกผสมที่น่าจะเกิดจากการผสมระหว่างต้นแม่ต้นที่ 1 และต้นพ่อต้นที่ 3 และรูปแบบที่ 2 จำนวน 1 ตัวอย่าง พบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450, 400, 350, 250, 170, 80 คู่เบสซึ่งไม่สามารถระบุต้นพ่อแม่ได้ จะเห็นได้ว่าลูกผสมจริงนั้นจะมีแถบของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400-450 คู่เบสที่มีความหนามากทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 และ 400 คู่เบสออกจากกันได้อย่างชัดเจนโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิส

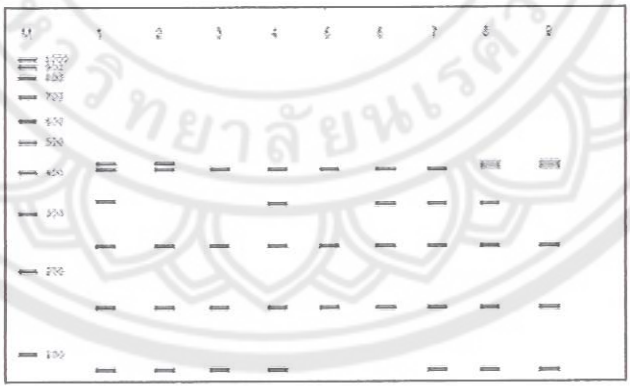


ภาพ 10 ภาพไดอะแกรมรูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI* โดย 1-2 คือรูปแบบที่ 1-2 ขณะที่ 3-5 คือเอื้องดิน ใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 6-7 คือเอื้องดินใบไผ่รูปแบบที่ 1-2 ตามลำดับ และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

ตาราง 4 ขนาดของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI*

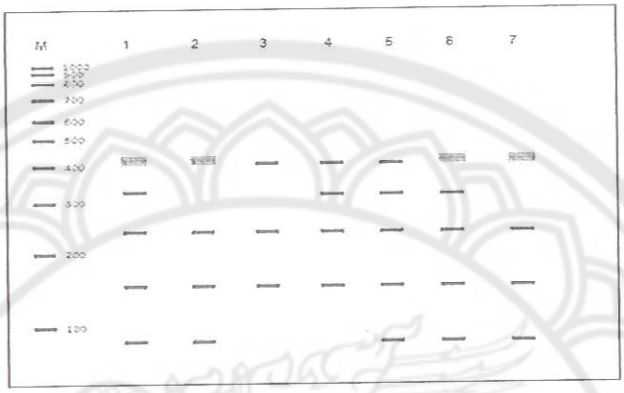
รูปแบบที่	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่(คู่เบส)	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ (คู่เบส)	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ (คู่เบส)
1	450, 400, 250, 170, 80	450, 400, 350, 250, 170, 80	450, 350, 250, 170, 80
2	450, 350, 250, 170, 80	450, 400, 250, 170, 80	450, 250, 170, 80
3	-	400, 250, 170, 80	-
4	-	400, 350, 250, 170, 80	-

เมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *TaqI* จำนวน 52 ตัวอย่าง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ ดังภาพ 11 (ตาราง4) โดยรูปแบบที่ 1 พบจำนวน 15 ตัวอย่าง และในรูปแบบที่ 2 พบ 2 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถบอกได้ว่าน่าจะเป็นลูกผสมระหว่างต้นแม่ต้นที่ 1 และต้นพ่อต้นที่ 3 ดังนั้นตัวอย่างทั้งสองรูปแบบนี้พบว่าน่าจะเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริง เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอหนาขนาดประมาณ 450 คู่เบสที่ได้จากต้นพ่อ ขณะที่รูปแบบที่ 3 จำนวน 3 ตัวอย่าง และรูปแบบที่ 4 จำนวน 32 ตัวอย่าง ซึ่งทั้งตัวอย่างในรูปแบบที่ 3 และ 4 นี้ ไม่มีโอกาสที่จะเป็นลูกผสมทั้งสิ้น เนื่องจากไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 คู่เบส จากเอื้องดินใบไผ่เลย



ภาพ 11 ภาพไดอะแกรมรูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI* โดย 1-4 คือรูปแบบที่ 1-4 ขณะที่ 5-7 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 8-9 คือเอื้องดินใบไผ่รูปแบบที่ 1-2 ตามลำดับ และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

เมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Taq*I จำนวน 48 ตัวอย่าง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ ดังภาพ 12 (ตาราง4) โดยรูปแบบที่ 1 พบ 9 ตัวอย่าง และรูปแบบที่ 2 จำนวน 39 ตัวอย่าง ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบสหรือไม่ เนื่องจากความหนาของแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 คู่เบส ซึ่งพบในเอื้องดินใบไผ่ต้นพ่ออยู่แล้ว รูปแบบที่ได้ทั้งสองรูปแบบอาจเกิดจากการผสมข้ามสกุลหรือการผสมตัวเองของเอื้องดินใบไผ่จึงไม่สามารถระบุความเป็นลูกผสมข้ามสกุลของลูกที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Taq*I ได้



ภาพ 12 ภาพไดอะแกรมรูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I โดย 1-2 คือรูปแบบที่ 1-2 ขณะที่ 3-5 คือเอื้องดิน ใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 6-7 คือเอื้องดินใบไผ่รูปแบบที่ 1-2 ตามลำดับ และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ *Taq*I นั้น สามารถตัดดีเอ็นเอของลูกผสมที่ได้จากการถ่ายฝากแล้วให้รูปแบบของดีเอ็นเอต่างๆ ที่สามารถบอกถึงโอกาสที่ตัวอย่างนั้นๆ จะเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริงโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ทั้งสิ้น 17 ตัวอย่าง (32.69%)

จากการตรวจสอบลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากที่พบว่ามีโอกาสเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริงนั้น จากทั้งการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Alu*I และ *Taq*I ให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นต้นแม่ ทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง (9.62%) แต่เมื่อใช้เอื้องดินใบไผ่เป็นต้นแม่นั้นไม่สามารถระบุความเป็นลูกผสมได้เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Taq*I ดังนั้นจาก 24 ตัวอย่างจึงมีเพียง 4 ตัวอย่าง (8.33%) ที่ตรวจสอบได้ว่าเป็นลูกผสมข้ามสกุล เนื่องจากมีแถบดีเอ็นเอของต้นพ่อที่ชัดเจนและเห็นง่ายกว่ารวมถึงแตกต่างจากต้นแม่อย่างชัดเจน เพราะสามารถระบุได้ว่าเกิดจากการผสมข้ามสกุลจริงระหว่างต้นพ่อแม่ต้นใด ส่วนตัวอย่างที่เหลืออาจจะต้องใช้เทคนิคอื่นเข้ามาช่วยระบุเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงพบว่ามีลูกผสมข้ามสกุลที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบเป็นต้นแม่ทั้งสิ้น 5 และ 4 ตัวอย่าง ตามลำดับ แต่จากการรายงานของ Mao et al. (2004) ศึกษาการงอกของเมล็ดและการพัฒนาเป็นต้นกล้าโดยเปรียบเทียบระหว่างการผสมตัวเองและการผสมข้ามชนิดของกล้วยไม้สกุล *Spathoglottis* Bl. พบว่ามีอัตราการงอกของเมล็ดและการพัฒนาเป็นต้นกล้าที่ต่างกัน ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่าลูกผสมทั้ง 5 ตัวอย่างที่เกิดจากการถ่ายฝากเมื่อมีเอื้องดินใบหมากเป็นต้นแม่นั้น น่าจะไม่ใช่ลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริง เนื่องจากมีระยะเวลาในการงอกของเมล็ดและการเจริญของต้นกล้าที่เท่ากับต้นที่เกิดจากการผสมตัวเองของเอื้องดินใบหมากแต่จะมีการเจริญของต้นกล้าที่ช้ากว่าลูกผสมข้ามที่ใช้เอื้องดินใบหมากเป็นต้นแม่โดยการผสมแบบปกติ กล่าวคือลูกผสมข้ามสกุลจะงอกและพัฒนาช้ากว่าต้นที่เกิดจากการผสมตัวเอง ในขณะที่ลูกผสมข้ามสกุลอีก 4 ตัวอย่างที่เกิดจากเอื้องดินใบไผ่เป็นต้นแม่นั้น มีระยะเวลาในการงอกของเมล็ดที่สั้นกว่าต้นที่เกิดจากการผสมตัวเองของเอื้องดินใบไผ่ จึงอาจจะเป็นไปได้อย่างมากที่จะเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริง ในการตรวจสอบลูกผสมที่ได้จากการถ่ายฝากในครั้งนี้จึงพบว่ามีโอกาสที่จะได้ลูกผสมข้ามสกุลจากการถ่ายฝากโดยมี เอื้องดินใบไผ่เป็นต้นแม่ 4 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 48 ตัวอย่าง คิดเป็น 8.33% แสดงถึงว่าเอื้องดินใบไผ่ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือมีน้อยมากในธรรมชาติ ซึ่งถือว่าการผสมข้ามสกุลของกล้วยไม้ดินสองสกุลนี้ประสบความสำเร็จในระดับหนึ่ง และเทคนิคการถ่ายฝากก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถเกิดลูกผสมได้ในกล้วยไม้ที่ไม่สามารถผสมข้ามสกุลโดยวิธีปกติได้

จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ nrITS ของพ่อแม่พันธุ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I และ *Taq*I พบความหลากหลายของรูปแบบที่เกิดขึ้น โดยพบว่าเอื้องดินใบหมากจะเกิดรูปแบบดีเอ็นเอที่หลากหลายกว่าเอื้องดินใบไผ่ โดยความหลากหลายที่เกิดขึ้นนั้นอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nrITS ใน rDNA ซึ่งเป็นบริเวณระหว่างยีน โดยเกิดจากการแทนที่ การแทรกเข้ามาหรือการขาดหายไปของลำดับดีเอ็นเอ (Venkateswarlu and Nazar, 1991) ซึ่งเอื้องดินใบหมากนั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าเอื้องดินใบไผ่ ดังนั้นในการตรวจสอบลูกผสมโดยใช้บริเวณ nrITS จึงอาจไม่เหมาะสมกับพืชที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของบริเวณ nrITS สูง อย่างเช่นเอื้องดินใบหมากซึ่งพบว่าภายในต้นเดียวกันก็มีความหลากหลายของลำดับดีเอ็นเอบริเวณนี้เช่นกัน ซึ่งพบรายงานว่าพืชบางชนิดนั้นมีชุดยีน rDNA หลายชั้ำ ซึ่งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์อาจทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณบริเวณ nrITS จากคนละชุดยีนกัน (Bailey et al., 2003) นอกจากนี้อาจใช้ชิ้นส่วนของยีนซึ่งเป็นบริเวณที่ความจำเพาะสูง (specific gene) เช่น 18S rRNA มาช่วยหรือการนำเทคนิค SSCP มาใช้ในการตรวจสอบร่วมก็ได้ ซึ่งก็อาจจะให้ผลชัดเจนขึ้นเมื่อใช้หลายๆ บริเวณและหลายๆ เทคนิคร่วมกัน

4. บทสรุป

จากการตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี บริเวณ nrITS ของกล้วยไม้ดินทั้งสองชนิด แต่คนละสกุลนี้สามารถทำได้ โดยใช้เอนไซม์ *Taq*I และ *Alu*I ซึ่งสามารถให้รูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ และผลที่ได้จากทั้งสองเอนไซม์นี้สามารถบอกความเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่เกิดจากการถ่ายฝากได้ อีกทั้งยังสามารถคาดคะเนได้ว่าเป็นลูกผสมที่เกิดขึ้นนี้ เกิดจากพ่อและแม่ต้นใดได้อีกด้วย แต่พบว่าเอนไซม์ 5 ชนิด ได้แก่ *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Msp*I และ *Rsa*I ไม่สามารถใช้ในการตรวจสอบลูกผสมข้ามสกุลที่เกิดขึ้นนี้ได้ เนื่องจากไม่สามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอต้นพ่อแม่พันธุ์ได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้พบโอกาสที่จะเกิดลูกผสมข้ามสกุลจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ คือ 8.33% นอกจากนี้ยังสรุปได้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของบริเวณ nrITS ของเอื้องดินใบหมากมากกว่าเอื้องดินใบไผ่จากจำนวนรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นนั่นเอง

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2557 และความอนุเคราะห์สถานที่ รวมถึงอุปกรณ์ในการทำวิจัยจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

6. เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ แดงสวัสดิ์. (2551). การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวหลวง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จีรภา ดาทอง และ วิภา หงษ์ตระกูล. (2555). การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมในบัวประดับและบัวหลวง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50. 48-56.

สุภาพร หนูชนะภัย และ บุญจิต ฐิตาภิวัฒนกุล. (2010). การวิเคราะห์ศักยภาพตลาดกล้วยไม้ส่งออกที่สำคัญของไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Bailey, C.D., Carr, T.G., Harris, S.A., and Hughes, C.E. (2003). Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 435–455.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11–15.

Kishor, R. and Sharma, GJ. (2008). Multiple shoot induction in *Ascocenda*Kangla—a monopodial hybrid orchid. *Lindleyana*, 21(1): 6-9.

Kishor, R., Devi, HS., and Jeyaram, K. (2009). Induction of multiple shoots in a monopodial orchid hybrid (*Aerides vandarum* Reichb. f *x Vanda stangeana* Reichb. f) using thidiazuron and analysis of their genetic stability. *Plant Cell Tissues Organ Culture*. 97:121-129.

Moa, M., Chitrapan, P., and Alisara, M. (2004). A study on seed germination and seedling development of *Spathoglottis* Bl. Orchids. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 38:141–156.

Venkateswarlu, K., and Nazar, R. (1991). A conserved core structure in the 18–25S rRNA intergenic region from tobacco, *Nicotiana rustica*. *Plant Molecular Biology*, 17: 189–194.