การวิเคราะห์หาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะเจาะจงกับกล้วยไม้สกุลหวายบางชนิดในประเทศไทยที่มีสารอนุพันธ์กลุ่ม Bibenzyl โดยเทคนิค Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR)

Analysis on Specific Molecular Marker Some *Dendrobium* Sw. Species in Thailand Containing Bibenzyl Derivatives Using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Technique

อุทัยวรรณ ทรัพย์แก้ว และ เฌอมาลย์ วงศ์ชาวจันท์*

Uthaiwan Sapkaew and Shermarl Wongchaochant*

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Department of Horticulture, Faculty of Agricultural, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

**Corresponding author: Email: agrsmw@ku.ac.th*

(Received: 13 November 2017; Accepted: 15 March 2018)

Abstract: Bibenzyl derivatives in *Dendrobium* Sw. are used as medicine composition for preventing and curing several diseases. The genetic selection using specific molecular markers could reduce time and cost for *Dendrobium* Sw. identification based on their main chemical constituents. The purpose of this study was to examine the specific markers for some *Dendrobium* Sw. species in Thailand which contain bibenzyl derivatives using ISSR technique. The specific fragments of 7 *Dendrobium* species in Thailand were analyzed with 96 ISSR primers. The results revealed that 4 DNA fragments produced from 4 ISSR primers i.e. UBC-861, UBC-862, UBC-881 and UBC-895 primers from 10 ISSR primers showed polymorphic bands patterns between *Dendrobium* Sw. containing bibenzyl derivatives. Only the 350 bp DNA fragments amplified with UBC-895 primer were used for sequencing. The result of UBC-895_350 sequencing showed that DNA fragments length was 289 base pairs. The sequence was identical to *bibenzyl synthase*-like of *Dendrobium catenatum* and mRNA of *D. catenatum* in NCBI database. It was recommended that the results from this investigation could be used as basic knowledge for developing the specific molecular markers to identify *Dendrobium* Sw. for further research.

Keywords: Phytochemical, medicinal orchids, DNA marker, DNA sequences

Copyright @ Journal of Agriculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. All rights reserved.

บทคัดย่อ: สารกลุ่ม bibenzyl ในกล้วยไม้สกุลหวายได้นำมาใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพรในการป้องกัน และเป็นยารักษาโรคมากขึ้น การคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางเครื่องหมายโมเลกุลเป็นอีกวิธีการที่สามารถช่วยร่นระยะเวลา และลดต้นทุนในการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มที่มีสารสำคัญต่าง ๆ ได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะเจาะจงกับกล้วยไม้สกุลหวายบางชนิดในประเทศไทยที่พบสารกลุ่ม bibenzyl โดยใช้เทคนิค ISSR จากการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะเจาะจงกับกล้วยไม้สกุลหวาย 7 ชนิด ที่พบในประเทศไทยด้วยไพรเมอร์ ISSR จำนวน 96 ไพรเมอร์ พบว่ามีจำนวน 4 ไพรเมอร์จาก 10 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ UBC-861, UBC-862, UBC-881 และ UBC-895 ที่สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกล้วยไม้สกุลหวายที่พบและไม่พบสารกลุ่ม bibenzyl จำนวน 4 แถบ โดยแถบดีเอ็นเอขนาด 350 คู่เบส ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC-895 เป็นเพียงแถบเดียวที่สามารถวิเคราะห์ลำดับเบสได้ ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอ UBC-895_350 พบว่ามีขนาด 289 คู่เบส ลำดับเบสที่ได้มีความเหมือนกับ *bibenzyl synthase*-like ของกล้วยไม้ *Dendrobium catenatum* และ mRNA ของกล้วยไม้ *D. catenatum* ในฐานข้อมูล NCBI ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายต่อไป

คำสำคัญ: พฤกษเคมี กล้วยไม้คุณสมบัติเป็นยา เครื่องหมายดีเอ็นเอ ลำดับเบสดีเอ็นเอ

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อนชื้นมีความหลากหลายของทรัพยากรธรรมชาติเป็นอย่างมาก กล้วยไม้เป็นพืชที่มีความหลากหลายทั้งในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม ความหลากหลายในการนำไปใช้ประโยชน์ และมีความต้องการของผู้บริโภคสูง จึงทำให้เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ ปัจจุบันมีการนำกล้วยไม้มาใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพรมากขึ้น เนื่องจากกล้วยไม้มีสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่าง ๆ เช่น สารกลุ่ม alkaloids, flavonoids, carotenoid และ phytosterols (Hossain, 2011) ซึ่งกล้วยไม้สกุลหวายเป็นสกุลที่มีการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านสมุนไพรมาก เนื่องจากมีสารที่มีหมู่ phenol ในโครงสร้าง ได้แก่ สารกลุ่ม bibenzyl, phenanthrene และ fluorenone เป็นองค์ประกอบหลัก (Yang *et al*., 2006) มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาของสารกลุ่ม bibenzyl โดยเฉพาะสาร moscatilin มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง คือ ฤทธิ์ต้านการเจริญของเนื้องอกหรือมะเร็ง (antitumor) ฤทธิ์ต้านการเจริญของหลอดเลือด (anti-angiogenic) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation) ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Liu *et al*., 2010; Kowitdamrong *et al*., 2013; Tsai *et al*., 2010)

จากการศึกษาวิเคราะห์สารสำคัญในกล้วยไม้สกุลหวายของประเทศไทยพบว่ามีสารกลุ่ม bibenzyl ได้แก่ สาร moscatilin, gigantol, batatasin, dendrofalconerol (Sritularak and Likhitwitayawuid, 2009; Sritularak *et al.,* 2011a, b) ยุพิน (2558) รายงานผลการศึกษาวิเคราะห์หาปริมาณสารกลุ่ม bibenzyl 4 ชนิด ได้แก่ สาร moscatilin, gigantol, crepidatin และ chrysotoxine ในกล้วยไม้สกุลหวายจำนวน 10 ชนิด ที่พบในประเทศไทย พบว่า เอื้องดอกมะเขือ (*Dendrobium hercoglossum*) และพวงหยก (*Dendrobium findlayanum*) ไม่พบสารในกลุ่ม bibenzyl และที่พบสารกลุ่ม bibenzyl ได้แก่ เอื้องผึ้ง (*Dendrobium lindleyi*) เอื้องตะขาบ (*Dendrobium acinaciforme*) ผาเวียง (*Dendrobium albosanguineum*) เอื้องครั่งแสด (*Dendrobium unicum*) เอื้องจำปาน่าน (*Dendrobium sulcatum*) เอื้องสายสามสี (*Dendrobium crystallinum*) เอื้องสายน้ำนม (*Dendrobium cretaceum*) และเอื้องช้างน้าว (*Dendrobium pulchellum*) แต่พบว่าวิธีวิเคราะห์สารสำคัญต้องใช้เครื่องมือวิเคราะห์ที่มีราคาสูง หรือการจ้างวิเคราะห์สารสำคัญมีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างที่ค่อนข้างสูง การคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคทางเครื่องหมายโมเลกุล เป็นอีกวิธีการที่สามารถช่วยร่นระยะเวลา และลดต้นทุนในการวิเคราะห์หาสารสำคัญในกล้วยไม้สกุลหวายได้ ณัฐดนัย และคณะ

(2560) รายงานการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้างโดยเทคนิคอาร์เอพีดีที่ใช้ไพรเมอร์ OPF01 และ OPF06 สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดแบ่งกลุ่มสายพันธุ์กล้วยไม้ช้างออกเป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะสีที่ปรากฏบนกลีบดอก สารให้สีที่เป็นองค์ประกอบของสีดอก และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม Bhattacharyya *et al*. (2015a, b) ได้ตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 13 ไพรเมอร์ที่สามารถให้ความแตกต่าง และเป็นไพรเมอร์ที่มีความสัมพันธ์กับสารสำคัญใน *Dendrodium nobile* และได้ตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลด้วยเทคนิค ISSR โดยใช้ไพรเมอร์ 7 ไพรเมอร์ ที่มีความสัมพันธ์กับสาร antioxidant activity ใน *Dendrobium thyrsiflorum* แต่ข้อมูลการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในกล้วยไม้สกุลหวายที่มีศักยภาพในการใช้เป็นสมุนไพรของประเทศไทยยังไม่แพร่หลาย

งานวิจัยครั้งนี้จึงใช้เทคนิค Inter-simple sequence repeat (ISSR) เพื่อศึกษาหาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะเจาะจงกับกล้วยไม้สกุลหวายในประเทศไทย ที่พบสารกลุ่ม bibenzyl เพื่อคัดเลือกกล้วยไม้สกุลหวายชนิดที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ด้านเภสัชวิทยา และเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อเพิ่มคุณภาพกล้วยไม้เชิงเภสัชอุตสาหกรรม เป็นพืชทางเลือกใหม่แก่เกษตรกรในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

พืชที่ใช้ในการทดลอง

กล้วยไม้สกุลหวายที่พบในประเทศไทย จำนวน 7 ชนิด จากรายงานของยุพิน (2558) ที่พบสารกลุ่ม bibenzylจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ เอื้องสายสามสี (*D. crystallinum*) เอื้องสายน้ำนม (*D. cretaceum*) เอื้องช้างน้าว (*D. pulchellum*) ผาเวียง (*D. albosanguineum*) และเอื้องผึ้ง (*D. lindleyi*) และกล้วยไม้ที่ไม่พบสารกลุ่ม bibenzyl จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ เอื้องดอกมะเขือ (*D. hercoglossum*) และพวงหยก (*D. findlayanum*) และกล้วยไม้สกุลหวายในประเทศจีน จากรายงานของ Chen *et al.* (2012) ที่พบสารกลุ่ม bibenzyl จำนวน 1 ชนิด ได้แก่ *D. officinale*

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดจีโนมดีเอ็นเอจากส่วนใบอ่อนของกล้วยไม้สกุลหวายด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) ชั่งน้ำหนักใบอ่อนตัวอย่างละ 0.2 กรัม เติมไนโตรเจนเหลวและบดให้ละเอียดด้วยโกร่ง นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลาย CTAB buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (2% (w/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mMTris-HCl (pH 8.0), 0.2% (v/v) ß-mercaptoethanol) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นวางให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เติม RNase A (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร กลับหลอดขึ้นลงเบา ๆ ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วประมาณ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวใสส่วนข้างบนใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนด้วย isopropanol ที่เย็นจัดปริมาตร 600 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนทิ้งเติมสารละลาย wash buffer (70% ethanol ผสมกับ 10 mM ammonium acetate) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง และดูดของเหลวใสส่วนบนทิ้ง จากนั้นตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส (ความเข้มข้น1เปอร์เซ็นต์) จากนั้นนำมาวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 กับ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) และเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR

เตรียมสารละลายเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอปริมาตร 25 ไมโครลิตร ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบและความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ ดีเอ็นเอตั้งต้น (DNA template) 50 นาโนกรัม, 10x*Taq*15 buffer with $(NH_4)_2SO_4$ 2.5 ไมโครลิตร, 0.06 U *Taq*polymerase, 4 mM $MgCl_2$, 0.8 mM dNTP และ 100 mM ของ ISSR primer โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 96 ไพรเมอร์ ชุด UBC-801 ถึง 896 (University of British Columbia, Canada) ใช้อุณหภูมิในการสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย initiation denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน10 นาที จำนวน 1 รอบ และ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที extension ที่ 72 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากสังเคราะห์ดีเอ็นเอแล้วนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้ 1 ไมโครลิตร มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส (ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์) ในสารละลาย 1xTBE buffer ย้อมเจลแล้วตรวจสอบด้วย UV-transilluminator วิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอเพื่อหาแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างกลุ่มที่พบและไม่พบสารกลุ่ม bibenzyl

การวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงกับกล้วยไม้สกุลหวายที่พบสารกลุ่ม bibenzyl

ตัดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของกล้วยไม้สกุลหวายที่พบ และไม่พบสารกลุ่ม bibenzyl และสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลอะกาโรส นำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสเพื่อยืนยันแถบดีเอ็นเอที่แสดงความจำเพาะเจาะจง จากนั้นวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอจำเพาะด้วยวิธี Sanger *et al*. (1977) หลังจากได้ลำดับเบสแล้วจึงนำมาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสกับดีเอ็นเออื่น ๆ โดยใช้โปรแกรม Blast ในฐานข้อมูลพันธุกรรม National Center for Biotechnology Information (NCBI)

ผลการศึกษา

การตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลของกล้วยไม้สกุลหวายด้วยเทคนิค ISSR

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ เมื่อนำมาตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีการวัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 กับ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) มีค่าการดูดกลืนแสง 1.6-1.9 ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดมีคุณภาพค่อนข้างดี ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่เกิดลักษณะ smear band แต่ยังมีการปนเปื้อนของโปรตีน และสารพอลีแซคคาไรด์บ้างเล็กน้อย แต่พบว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณน้อยประมาณ 3-15 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ ISSR จำนวน 96 ไพรเมอร์ ได้ตรวจสอบเฉพาะกล้วยไม้ที่พบในประเทศไทย 7 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณ และปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจน (major band) และแถบดีเอ็นเอที่จาง (miner band) โดยเครื่องหมาย “+” หมายถึงการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และ “-” หมายถึงการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏนั้นสามารถแยกความแตกต่างจนเกิดเป็นพหุสัณฐาน (polymorphism) ในกล้วยไม้สกุลหวายได้ไพรเมอร์ ทั้งหมด 10 ไพรเมอร์ คิดเป็น 10.4 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ ได้แก่ ไพรเมอร์ UBC-830, UBC-834, UBC-861, UBC-862, UBC-865, UBC-866, UBC-867, UBC-874, UBC-881 และ UBC-895 (ตารางที่ 1) แล้วคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนและจำเพาะเจาะจงกับกล้วยไม้สกุลหวายในประเทศไทยที่พบสารกลุ่ม bibenzyl ได้แก่ เอื้องสายสามสี (*D. crystallinum*) เอื้องสายน้ำนม (*D. cretaceum*) เอื้องช้างน้าว (*D. pulchellum*) ผาเวียง (*D. albosanguineum*) และเอื้องผึ้ง (*D. lindleyi*) และไม่พบสารกลุ่ม bibenzyl ได้แก่ เอื้องดอกมะเขือ (*D. hercoglossum*) และพวงหยก (*D. findlayanum*) ทั้งหมด 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ UBC-861 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 600 คู่เบส ในกล้วยไม้สกุลหวายที่พบสารกลุ่ม bibenzyl ไพรเมอร์ UBC-862 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,500 คู่เบส ในกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่พบสารกลุ่ม bibenzyl ไพรเมอร์ UBC-881 ให้แถบดีเอ็นเอ

Table 1. Polymorphic fragment profiles of two groups of *Dendrobium* Sw. using 10 ISSR primers

Primers	Primer sequences 5'- 3'	Polymorphic fragment length (bp)	bibenzyl presence					No bibenzyl	
			(D1)	(D2)	(D3)	(D4)	(D5)	(D6)	(D7)
UBC-830	TGTGTGTGTGTGTGTGG	500	+	+	-	-	-	+	+[1]
UBC-834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	700	+	+	+	-	-	+	+
		300	+	+	+	+	-	-	-
UBC-861	ACCACCACCACCACCACC	600	+	+	+	+	+	-	-
UBC-862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	1,500	-	-	-	-	-	+	+
UBC-865	CCGCCGCCGCCGCCGCCG	900	+	+	+	+	+	+	-
UBC-866	CTCCTCCTCCTCCTCTCT	1,300	+	-	-	-	+	+	+
		600	+	-	+	+	+	-	-
UBC-867	GGCGGCGGCGGCGGCGG	1,200	+	+	-	+	-	-	-
		600	-	+	+	-	+	+	-
UBC-874	CCCTCCCTCCCTCCCT	400	-	-	-	-	-	+	-
UBC-881	GGGTGGGGTGGGGTG	400	+	+	+	+	+	-	-
UBC-895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	350	+	+	+	+	+	-	-

[1]+: Appearance of DNA bands; -: The absence of DNA bands

D1: *D. cretaceum*; D2: *D. crystallinum*; D3: *D. pulchellum*; D4: *D. albosanguineu*; D5: *D. lindleyi*; D6: *D. hercoglossum*; D7: *D. findlayanum*

ขนาด 400 คู่เบส ในกล้วยไม้สกุลหวายที่พบสารกลุ่ม bibenzyl และไพรเมอร์ UBC-895 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 350 คู่เบส ในกล้วยไม้สกุลหวายที่พบสารกลุ่ม bibenzyl (ภาพที่ 1) และคัดเลือกไพรเมอร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างชัดเจน ได้แก่ ไพรเมอร์ UBC-862 แสดงแถบดีเอ็นเอปรากฏในกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่พบสารกลุ่ม bibenzyl และไพรเมอร์UBC-895 แสดงแถบดีเอ็นเอปรากฏในกล้วยไม้สกุลหวายที่พบสารกลุ่ม bibenzyl นำมาทดสอบกับกล้วยไม้สกุลหวายที่มีถิ่นกำเนิดจากประเทศจีน *D. officinale* ซึ่งมีรายงานว่าเป็นกล้วยไม้สกุลหวายชนิดที่พบสาร bibenzyl พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับกล้วยไม้สกุลหวายที่พบสารกลุ่ม bibenzyl ที่พบในประเทศไทย (ภาพที่ 2)

การวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงกับกล้วยไม้สกุลหวายที่พบสารกลุ่ม bibenzyl

แถบดีเอ็นเอที่ขนาด 350 คู่เบส ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC-895 เป็นแถบดีเอ็นเอที่สามารถสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลอะกาโรสได้ เมื่อนำมาตรวจสอบเป็นตำแหน่งเดียวกับตำแหน่งที่ให้ความแตกต่าง และความเข้มข้นดีเอ็นเอมีปริมาณเพียงพอต่อการนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสมีขนาด 289 คู่เบส ลำดับเบสของดีเอ็นเอจากปลาย 5' ไป 3' (ภาพที่ 3) นำมาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสกับดีเอ็นเออื่น ๆ หรือมีความคล้ายกับยีนหรือโปรตีนชนิดใดในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Blast ใน NCBI พบว่าลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอ UBC895_350 ที่ได้มีความเหมือนกับลำดับเบส mRNA uncharacterized (LOC110109128) transcript variant X1 ของ *Dendrobium catenatum* มีค่า identities 75 เปอร์เซ็นต์ ที่ความยาว 76 คู่เบส จาก 101 คู่เบส (ภาพที่ 4) และมีความเหมือนกับลำดับเบส *bibenzyl synthase*-like ของ *Dendrobium catenatum* (LOC110105791) มีค่า identities 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความยาว 11 คู่เบส ซึ่งระบุว่ามีความเหมือนกับการแสดงออกของยีน *bibenzyl synthase* (ภาพที่ 5)

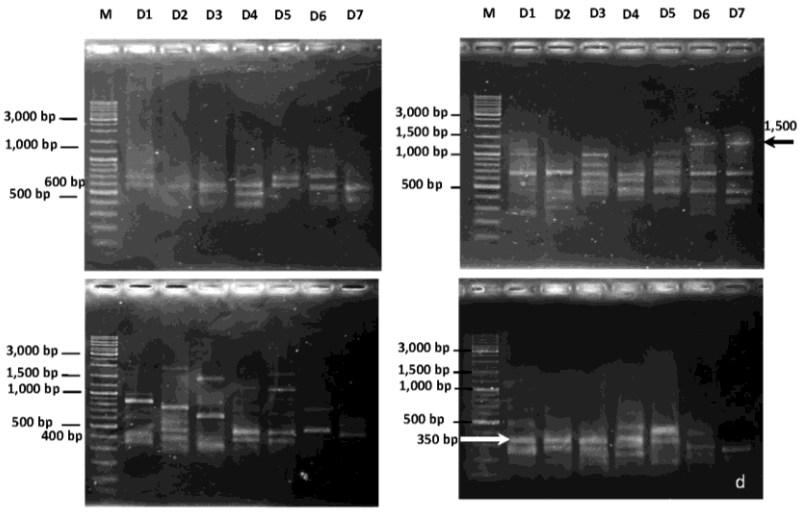

Figure 1. ISSR band profiles of *Dendrobium* Sw. obtained from using UBC-861 primer (a), UBC-862 primer (b), UBC-881 primer (c), UBC-895 primer (d), (M: GeneRuler™ DNA Ladder; D1: *D. cretaceum*; D2: *D. crystallinum*; D3: *D. pulchellum*; D4: *D. albosanguineum*; D5: *D. lindleyi*; D6: *D. Hercoglossum* and D7: *D. findlayanum*)

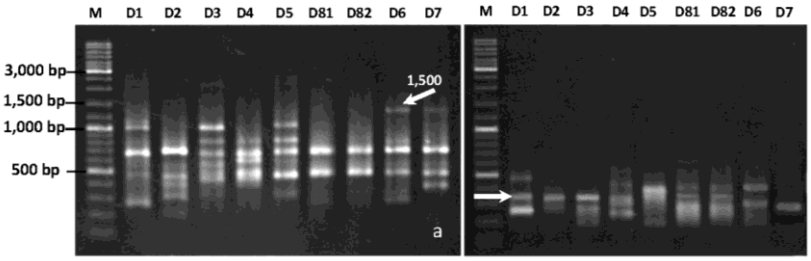

Figure 2. ISSR band profiles of *Dendrobium* Sw. obtained from using UBC-862 primer (a) and UBC-895 primer (b). (M: GeneRuler™ DNA Ladder; D1: *D. cretaceum*; D2: *D. crystallinum*; D3: *D. pulchellum*; D4: *D. albosanguineum*; D5: *D. lindleyi*; D81: *D. officinale* (tree); D82: *D. officinale* (tissue culture); D6: *D. hercoglossum* and D7: *D. findlayanum*)

```
  1 GGGGGCGATGCTACGGTCAGCAGCGGCGTTGCTGCGCGAGGAAGAGTTCC 50
 51 GCTAGGATTGTGGCCGATCACGCTGTTGCTAGGGTTGAAACAGGTGGTTG 100
101 GGAGCTTTTTTTTTAAATCCCGTGTTCTAACTCACTGCTCTATTTTTGAA 150
151 GAAACACCAAGCCACCGTTTTCAACCTGATCAAAAACCCCGACTTCAAAA 200
201 ATCCTAGCGGAACCCCCCCTCTTGCGCTGAACGCCCTCCTGATCTTATTC 250
251 CCAATCCGCTCTTGCCGGGATCAAGAATCCCCACCTCTC
```

Figure 3. DNA sequences of UBC-895_350

```
Dendrobium catenatum uncharacterized LOC110109128 (LOC110109128), transcript
variant X1, mRNA Sequence ID: XM_020840059.1 Length: 1675

Score = 66.2 bits(72), Expect = 4e-07, Identities = 76/101(75%),
Gaps = 5/101(4%), Strand = Plus/Minus

Query  5    TACGGTCAGCAGCGGCGTTGCTGCGCGAGGAAGAGTTCCGCTAGGATTGTGGCCGATCAC  64
            || |||  |||||| |  ||||||  ||||| ||||| ||     |||  ||| ||  ||
Sbjct  350  TAAGGTTGGCAGCGCCTCTGCTGCAAGAGGAGGAGTTTCGA----ATTA-GGCTGAAGAC  296

Query  65   GCTGTTGCTAGGGTTGAAACAGGTGGTTGGGAGCttttttt  105
            | | |||||||||||||| || ||||||||||||| |||||||
Sbjct  295  GTTTTTGCTAGGGTTGAGACCGGTGGTTGGGAGGTTTTTTT  255
```

Figure 4. Comparative sequencing of UBC-895_350 information to the database in genbank

```
Dendrobium catenatum bibenzyl synthase-like (LOC110105791)
Sequence ID: Query_153683 Length: 1173

Score = 21.1 bits(22), Expect = 0.95, Identities = 11/11(100%),
Gaps = 0/11(0%), Strand = Plus/Minus

Query  144  GAAACACCAAG  154
            |||||||||||
Sbjct  538  GAAACACCAAG  528
```

Figure 5. Comparative sequencing of UBC-895_350 information to the database in genbank

วิจารณ์

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณน้อย ทั้งนี้เนื่องจากกล้วยไม้มีสารโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) และโพลีฟีนอล (polyphenol) สารละลายที่ได้มีลักษณะเป็นเมือกเหนียวหนืด สีเขียวเข้ม ระหว่างสกัดดีเอ็นเอสารดังกล่าวมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ได้แก่ ligase, polymerase และ nucleases (Barra *et al*., 2012) ถึงแม้สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1987) นั้นจะสามารถช่วยตกตะกอนกำจัดสารประกอบฟีนอลได้ก็ตาม ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ยังมีปริมาณน้อย มีรายงานว่าการเติมสาร polyvinyl pyrrolidone (PVP) โดยสาร PVP จะจับกับสารโพลีแซคคาไรด์และอยู่ในสภาพไม่ละลายน้ำจนแยกชั้นออกมา ส่งผลให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น (Porebski *et al*., 1997) และถ้าต้องการให้ได้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณมากยิ่งขึ้นต้องเพิ่มปริมาณพืช และเพิ่มปริมาณบัฟเฟอร์ การเพิ่มปริมาณบัฟเฟอร์จะช่วยลดความหนืดของสารละลายในขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอได้ (Salzman *et al*., 1999)

ไพรเมอร์ ISSR ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลหวายได้นั้น เนื่องจากไพรเมอร์ดังกล่าวมีความจำเพาะกับช่วงดีเอ็นเอ หรือยีนหนึ่ง ๆ โดยไพรเมอร์จะต้องจับอยู่บนดีเอ็นเอทั้งสองเส้น ส่วนของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เป็นส่วนที่อยู่ระหว่างตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ หรือ SSR 2 บริเวณที่อยู่ใกล้กัน (สุรินทร์, 2552) การเกิดโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) เป็นผลมาจากไพรเมอร์จับกับช่วงดีเอ็นเอตำแหน่งต่างกันส่งผลทำให้จำนวนและขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไม่เท่ากัน โดยจะแสดงผลในลักษณะการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่าง ๆ มากกว่าการเปลี่ยนขนาดของแถบดีเอ็นเอ แถบดีเอ็น 4 แถบ ในการแยกความแตกต่างของกล้วยไม้ทั้ง 2 กลุ่มได้นั้น แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบางแถบไม่ชัดเจน เนื่องจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้นมีปริมาณน้อย และเมื่อต้องตัดแถบดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจลอาจมีการปนเปื้อนจากแถบดีเอ็นเออื่น หรือปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดออกจากอะกาโรสเจลมีปริมาณน้อย ยากต่อการนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 350 คู่เบส ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC-895 เป็นแถบดีเอ็นเอที่สามารถสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลอะกาโรสได้ เมื่อนำมาตรวจสอบเป็นตำแหน่งเดียวกับตำแหน่งที่ให้ความแตกต่าง ความเข้มข้นดีเอ็นเอมีปริมาณเพียงพอต่อการนำไปวิเคราะห์

ลำดับเบสและเป็นไพรเมอร์ที่นำมาตรวจสอบกับกล้วยไม้สกุลหวายที่พบในประเทศจีน ได้แก่ *D. officinale* ซึ่งมีรายงานว่าเป็นกล้วยไม้สกุลหวายชนิดที่พบสาร bibenzyl พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับกล้วยไม้สกุลหวายที่พบสารกลุ่ม bibenzyl ที่พบในประเทศไทย จึงเลือกแถบดีเอ็นเอดังกล่าวนำไปวิเคราะห์ลำดับเบส ผลการวิเคราะห์ลำดับเบส มีขนาด 289 คู่เบส เมื่อนำมาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสกับดีเอ็นเออื่น ๆ พบว่าลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอ UBC895_350 ที่ได้มีความเหมือนกับลำดับเบส mRNA ของ *D. catenatum* และลำดับเบส *bibenzyl synthase*-like ของ *D. catenatum* ซึ่งระบุว่ามีความเหมือนกับการแสดงออกของยีน *bibenzyl synthase* แต่อย่างไรก็ตามลำดับเบสดังกล่าวไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของ *bibenzyl synthase* เนื่องจากว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มาจากเทคนิค ISSR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้จีโนมดีเอ็นเอซึ่งเป็นปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด จึงมีส่วนที่ถูกแปลรหัส (translation) และไม่ถูกแปลรหัส และพบว่าลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์มีการกระจายตัวทั้งจีโนม และการกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลท์ส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณที่ไม่ใช่ยีน หรือส่วนนำรหัสของยีน (non-coding region) (สุรินทร์, 2552) แสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่ให้แถบดีเอ็นเอแสดงความแตกต่างของกล้วยไม้สกุลหวายที่พบสาร และไม่พบสารกลุ่ม bibenzyl นั้นยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าเป็นเครื่องหมายที่มีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการผลิตสารกลุ่ม bibenzyl ข้อมูลลำดับเบสที่ได้จึงใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการนำลำดับเบสที่ได้ไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายต่อไป

สรุป

การใช้เทคนิคตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะเจาะจงกับกล้วยไม้สกุลหวาย 7 ชนิด ที่พบในประเทศไทย ด้วยไพรเมอร์ ISSR จำนวน 96 ไพรเมอร์ สามารถใช้ได้ทั้งหมด 10 ไพรเมอร์ และได้แถบดีเอ็นเอที่แยกความแตกต่างจนเกิดเป็นพหุสัณฐานในกล้วยไม้สกุลหวายที่พบสาร และไม่พบสารกลุ่ม bibenzyl ได้ 4 แถบ ตัดแถบดีเอ็นเอขนาด 350 คู่เบส ที่ได้จากไพรเมอร์ UBC-895 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสมีขนาด 289 คู่เบส พบว่าลำดับเบสที่ได้มีความเหมือนกับลำดับเบส mRNA ของ *D. catenatum* และลำดับเบส *bibenzyl synthase*-like ของ *D. catenatum* ในฐานข้อมูล NCBI จึงสามารถนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้ใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ในการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ได้รับทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัย ประเภททุนบัณฑิตศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปี 2560

เอกสารอ้างอิง

ณัฐดนัย สุเมธาโชติพงศ์ กรวรรณ ศรีงาม วีณัน บัณฑิตย์ และ ณัฐา โพธาภรณ์. 2560. การวิเคราะห์องค์ประกอบของแอนโทไซยานิน และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของดอกกล้วยไม้ช้าง. วารสารเกษตร 33(3): 311-321.

ยุพิน กสินเกษมพงษ์. 2558. โครงการวิจัยและพัฒนากล้วยไม้สกุล *Dendrobium* ที่มีศักยภาพเป็นสมุนไพร. รายงานความก้าวหน้าโครงการปี 2558. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 269 หน้า.

Barra, M., E. Salazar, M. Beltrán and B. Sagredo. 2012. Simple and robust DNA extraction method for the large-scale analysis of genotypes containing high polyphenolic content, such as landraces of *Solanum tuberosum* and *Zea mays*. Ciencia e Investigación Agraria 39(3): 593-601.

Bhattacharyya, P., S. Kumaria and P. Tandon. 2015a. Applicability of ISSR and DAMD markers for phyto-molecular characterization and association with some important biochemical traits of *Dendrobium nobile*, an endangered medicinal orchid. Phytochemistry 117: 306-316.

Bhattacharyya, P., S. Kumaria and P. Tandon. 2015b. Phyto-molecular profiling and assessment of antioxidant activity within micropropagated plants of *Dendrobium thyrsiflorum*: a threatened, medicinal orchid. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 122(3): 535-550.

Chen, X.M., F.F, Wang, Y.Q. Wang, X.L. Li, A.R. Wang, C.L. Wang and S.X. Guo. 2012. Discrimination of the rare medicinal plant *Dendrobium officinale* based on naringenin, bibenzyl, and polysaccharides. Science China Life Sciences 55(12): 1092-1099.

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

Hossain, M.M. 2011. Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances-An overview. Fitoterapia 82(2): 102-140.

Kowitdamrong, A., P. Chanvorachote, B. Sritularak and V. Pongrakhananon. 2013. Moscatilin inhibits lung cancer cell motility and invasion via suppression of endogenous reactive oxygen species. BioMed Research International, doi: 10.1155/2013/765894.

Liu, Y. N., S. L. Pan, C.Y. Peng, D.Y. Huang, J. H. Guh, C.C. Chen, C.C. Shen and C.M. Teng. 2010. Moscatilin repressed lipopolysaccharide-induced HIF-1α accumulation and NF-κB activation in murine RAW264.7 cells. Shock 33(1): 70-75.

Porebski, S., L.G. Bailey and B.R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA Extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter 15 (1): 8-15.

Salzman, R.A., T. Fujita, K. Zhu-Salzman, P.M. Hasegawa and R.A. Bressan. 1999. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. Plant Molecular Biology Reporter 17(1): 11-17.

Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74(12): 5463-5467.

Sritularak, B. and K. Likhitwitayawuid. 2009. New bisbibenzyls from *Dendrobium falconeri*. Helvetica ChimicaActa 92(4): 740-744.

Sritularak, B., M. Anuwat and K. Likhitwitayawuid. 2011a. A new phenanthrenequinone from *Dendrobium draconis.* Journal of Asian Natural Products Research 13(3): 251-255.

Sritularak, B., N. Duangrak and K. Likhitwitayawuid. 2011b. A new bibenzyl from *Dendrobium secundum.* Zeitschrift für Naturforschung C 66(5-6): 205-208.

Tsai, A.C., S.L. Pan, C.H. Liao, J.H. Guh, S.W. Wang, H.L. Sun, Y.N. Liu, C.C. Chen, C.C. Shen, Y.L. Chang and C.M. Teng. 2010. Moscatilin, a bibenzyl derivative from the India orchid *Dendrobrium loddigesii*, suppresses tumor angiogenesis and growth *in vitro* and *in vivo*. Cancer Letters 292(2): 163-170.

Yang, L., Z. Wang and L. Xu. 2006. Simultaneous determination of phenols (bibenzyl, phenanthrene, and fluorenone) in *Dendrobium* species by high-performance liquid chromatography with diode array detection. Journal of Chromatography A 1104(1-2): 230-237.