

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ
Doritis pulcherrima Lindl. ต้นแคระ โดยเทคนิคอาร์เอพีดี
และ ไอเอสเอสอาร์

Genetic Relationship Analysis of Dwarf *Doritis pulcherrima*
Lindl. by RAPD and ISSR Techniques

มัลลิกา ดวงเขตต์^{1/} ณัฐา โพธาภรณ์^{1/} และวีณัน บัณฑิตย์^{1/}
Mallika Duangkhet^{1/}, Nuttha Potapohn^{1/} and Weenun Bundithya^{1/}

Abstract: *Doritis pulcherrima* Lindl. belongs to Orchidaceae family. Phenotypic variation within species is great making it difficult to identify plant using morphological characteristics. In this study, RAPD and ISSR were used to determine genetic relationship of Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. with similar leaf shape and spot. Twelve of the 80 RAPD and 13 of the 115 ISSR screened primers yielded 98 (87.5%) and 160 (85.1%) polymorphic bands, respectively. The genetic similarity coefficients ranged from 0.44 to 0.96 by RAPD and 0.46 to 0.93 by ISSR. Cluster analysis based on UPGMA clearly resulted in grouping of Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. globose leaf with spot, and the dendrogram generated with ISSR markers clearly separated *D. pulcherrima* Lindl. from Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. and could group Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. globose leaf with spot. The molecular classification based on RAPD and ISSR technique agree with morphological identification of Dwarf *D. pulcherrima* Lindl.

Keywords: Dwarf *Doritis pulcherrima* Lindl., RAPD Technique, ISSR Technique

^{1/} ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Plant Science and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

บทคัดย่อ: *Doritis pulcherrima* Lindl. อยู่ในวงศ์ Orchidaceae มีความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐาน ทำให้ยากต่อการจำแนกสายพันธุ์ ดังนั้นจึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ *D. pulcherrima* Lindl. ต้นแคระที่มีความคล้ายคลึงของรูปทรงใบ และลายที่ปรากฏบนใบ ด้วยเทคนิค RAPD และ ISSR จากการคัดกรองไพรเมอร์ RAPD 80 ชนิด และไพรเมอร์ ISSR 115 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ RAPD 12 ชนิด และไพรเมอร์ ISSR 13 ชนิด สามารถสังเคราะห์แถบ ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 98 แถบ (87.5%) และ 160 แถบ (85.1%) ตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมโดยไพรเมอร์ RAPD และ ISSR อยู่ในช่วง 0.44 ถึง 0.96 และ 0.46 ถึง 0.93 ตามลำดับ การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยวิธี UPGMA พบว่าไพรเมอร์ RAPD สามารถจัดกลุ่มต้นแคระใบกลมมีลายได้ และไพรเมอร์ ISSR จำแนก *D. pulcherrima* Lindl. ออกจากกลุ่มต้นแคระ และสามารถจัดกลุ่มต้นแคระใบกลมมีลายได้ การจัดกลุ่มด้วยเทคนิค RAPD และ ISSR สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานของกล้วยไม้ *D. pulcherrima* Lindl. ต้นแคระ

คำสำคัญ: *Doritis pulcherrima* Lindl. ต้นแคระ เทคนิคอาร์เอฟดี เทคนิคไอเอสเอสอาร์

คำนำ

Doritis pulcherrima Lindl. อยู่ในวงศ์ Orchidaceae ซึ่งเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดในบรรดากลุ่มไม้ดอกด้วยกัน พบครั้งแรกในประเทศเวียดนาม มีชื่อไทยว่า ม้าวัวง เรียกตามลักษณะกลีบเลี้ยงกลีบดอกที่แผ่บานแผ่เมื่อดอกบานเต็มที่ จะดูไปทางด้านหลังเหมือนกับลักษณะม้าวที่กำลังวิ่งควมเต็มที่จะขนลุ่ไปด้านหลัง (ณรงค์, 2519) เป็นกล้วยไม้ที่มีดอกขนาดเล็ก แต่มีก้านช่อดอกยาวตั้งขึ้นทรงต้นเดี่ยว ใบซ้อนเรียงชิดกัน ใบหนาและค่อนข้างอวบนำ ม้าวัวงมีสีดอกที่ผันแปรมากตั้งแต่สีขาวเกือบบริสุทธิ์ และมีหูกลิบบากสีเหลือง ซึ่งพบที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ถึงสีแดงม่วง และม่วงแดง หรือบางครั้งพบดอกสีฟ้าครามหรือม่วงอมฟ้า แต่ที่พบบากคือสีระหว่างชมพูอ่อนถึงชมพูเข้ม (สุรางค์รัตน์, 2551) กล้วยไม้สกุล *Doritis* เป็นหนึ่งในบรรดาสกุลกล้วยไม้ที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายทั้งภายในและต่างประเทศ (ระพี, 2544) อีกทั้งมีการนำพืชสกุลนี้ไปผสมกับพืชสกุลอื่น อาทิเช่น สกุลฟาแลนนอปซิส เกิดเป็นลูกผสมมีชื่อสกุลว่า *Doritaenopsis* ซึ่งมีลักษณะดอกที่สวยงาม ให้ลักษณะสีดอกที่เน้นไปทางสีชมพู (ระพี, 2544) โดยลักษณะของดอกที่แปลกตานั่น สามารถพัฒนาเป็นไม้ดอกส่งออกได้ สำหรับ *D. pulcherrima* Lindl. ต้นแคระนั้น Taywiya *et al.* (2008) รายงานว่า พบแพร่กระจายในประเทศไทย เป็นกล้วยไม้ขนาดเล็ก (miniature plant) ดอกมีสีชมพูเข้ม มีกลุ่มเรณู 4 กลุ่ม อยู่ติดกัน จากการสังเกตโดย ญัฐดนัย (ติดต่อส่วนตัว) พบว่า

ลักษณะใบของ *D. pulcherrima* Lindl. ต้นแคระมีลักษณะค่อนข้างหลากหลาย ทำให้การจำแนกโดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์อย่างเดียวไม่เพียงพอ การนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาเข้ามาช่วยตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม (สุรินทร์, 2545) มีส่วนช่วยเสริมให้การจำแนกถูกต้องยิ่งขึ้น

เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมมีอยู่หลายวิธี เช่น เทคนิค RAPD (random amplified polymorphic DNA) เป็นการใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย ไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาดสั้นประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ โดยสุ่มจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีลำดับเบสคู่สมกัน (William *et al.*, 1990) นิยมนำมาใช้จำแนกลักษณะทางพันธุกรรม ความแตกต่างทางด้านชนิด และประชากร (สุรินทร์, 2545) เนื่องจากทำได้ง่าย และค่าใช้จ่ายไม่สูง (Lee *et al.*, 2003) แต่มีข้อจำกัดคือ เมื่อทำซ้ำมักให้ผลที่ไม่เหมือนเดิม อย่างไรก็ตาม เทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพเพียงพอสำหรับการจำแนกกระหว่างชนิดได้ เช่นในการทดลองของ Lim *et al.* (1999) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าจำนวน 10 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD 8 ชนิด สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 158 แถบ และสามารถแบ่งกลุ่มพืชตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม ที่สอดคล้องกับลักษณะใบ Oliveira *et al.* (2010) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Catasetum* ซึ่งอยู่ในวงศ์

Orchidaceae โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD จำนวน 15 ชนิด สามารถแบ่งพืชเป็น 11 กลุ่ม ตามลักษณะทางสัณฐาน และสภาพภูมิศาสตร์การเจริญที่ใกล้เคียงกัน ศิริลักษณ์ และคณะ (2547) จำแนกกล้วยไม้สกุลหวายจำนวน 12 ชนิด โดยใช้เทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ OPAK04 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *Dendrobium infundibulum* และ *Dendrobium crystallinum* แตกต่างออกไปจากกล้วยไม้ชนิดอื่น นอกจากนี้ยังมีเทคนิค ISSR (inter simple sequence repeats) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างชนิด จนถึงภายในชนิดของสิ่งมีชีวิต และลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคนี้สามารถทำซ้ำได้ มีค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก ไม่ยุ่งยากซับซ้อน Wang *et al.* (2009) ได้ศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Cymbidium goeringii* โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR พบว่า ไพรเมอร์ 25 ชนิด สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้จำนวน 4,405 แถบ สามารถแบ่งพืชออกเป็น 2 กลุ่ม และสอดคล้องกับแหล่งกำเนิด Verma *et al.* (2009) รายงานการประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD และ ISSR ร่วมกันในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Vanilla* โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR จำนวน 10 ชนิด และไพรเมอร์ RAPD จำนวน 30 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ RAPD เพียง 20 ชนิดเท่านั้นที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ ทุกตัวอย่าง โดยทั้งสองเทคนิคสามารถแยก *Vanilla andamanica* ออกจาก *Vanilla* ชนิดอื่น แสดงให้เห็นว่า *V. andamanica* มีพันธุกรรมที่แตกต่างจาก *Vanilla* ชนิดอื่น ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ *D. pulcherrima* Lindl. ต้นแคระที่มีความแตกต่างของรูปทรงใบ และลายที่ปรากฏบนใบ ด้วยเทคนิค RAPD และ ISSR

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์พืช

พันธุ์พืชที่ใช้คือ *D. pulcherrima* Lindl. ต้นแคระ หรือเอื้องม้าวิ่งแคระ ได้มาจากสภาพธรรมชาติจากจังหวัด ชุมพร และนำมาปลูกเลี้ยงที่เรือนเพาะชำกล้วยไม้ ศูนย์วิจัย สาธิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ คณะ

เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตัวอย่างที่ศึกษามีรูปทรงใบและลายที่ปรากฏบนใบต่างกัน 3 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ต้น โดย กลุ่มที่ 1 มีลักษณะต้นแคระใบกลมมีลาย กลุ่มที่ 2 ต้นแคระใบรีมีลาย และกลุ่มที่ 3 ต้นแคระใบรีไม่มีลาย และใช้ *D. pulcherrima* Lindl. ต้นปกติ 1 ต้น เป็นพืชนอกกลุ่ม (ภาพที่ 1a-d)

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB ที่ดัดแปลงจาก Taywiya *et al.* (2008) ตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี 1.8% agarose gel electrophoresis และเครื่อง Nanodrop เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค RAPD

องค์ประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ อ้างอิงจาก Kate-ngam and Lakote (2008) โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD 80 ชนิด คือ OPA01-20, OPD01-20, OPF01-20 และ OPG01-20 (Bio Basic, Canada) สังเคราะห์ดีเอ็นเอตามขั้นตอนดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 43.6 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 8 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer จากนั้นย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกภาพภายใต้แสง UV โดยใช้ gel documentation (Syngene gene genius bio imaging system, U. S. A.)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค ISSR

องค์ประกอบปฏิกิริยาพีซีอาร์ อ้างอิงจาก Taywiya *et al.* (2008) โดยใช้ไพรเมอร์ ISSR 118 ชนิด คือ ISSR1-ISSR98 (วิถัน และดำเนิน, 2554) UBC811, UBC812, UBC818, UBC827, UBC834, UBC835, UBC840, I2, I4, I25, I34, I44 (Wang *et al.*, 2009) UBC809, UBC826, UBC836, UBC866 (Wang *et al.*, 2011) A37, B1, B7 และ B10 (Haider *et al.*, 2012) สังเคราะห์ดีเอ็นเอตามขั้นตอนดังนี้ 94 องศาเซลเซียส

3 นาที่ จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 58 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 8 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบ เช่นเดียวกับเทคนิค RAPD

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ตรวจดูความคมชัด และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ตรวจสอบตำแหน่งที่ปรากฏ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ คำนวณขนาดโมเลกุลด้วยโปรแกรม Excel 2010 บันทึกผลโดยให้การปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเป็น 1 และการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันมีค่าเป็น 0 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.01e (Rohlf, 2000) สร้างแผนภาพเดนโดรแกรมด้วยวิธี

UPGMA คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธี Jaccard's similarity coefficients ประเมินความเชื่อมั่นของแผนภาพเดนโดรแกรมโดยการทำ bootstrap ด้วยโปรแกรม freetree (Hapl et al., 2001)

ผลและวิจารณ์

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบของ *D. pulcherrima* Lindl. ด้วยวิธีการของ Taywiya et al. (2008) พบว่าได้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่มีความเข้มข้น 100-200 ng/μl โดยดีเอ็นเอส่วนใหญ่มีคุณภาพดี ไม่มีการแตกหัก เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว และคมชัด ไม่มีแถบปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ และโปรตีน (ภาพที่ 2)

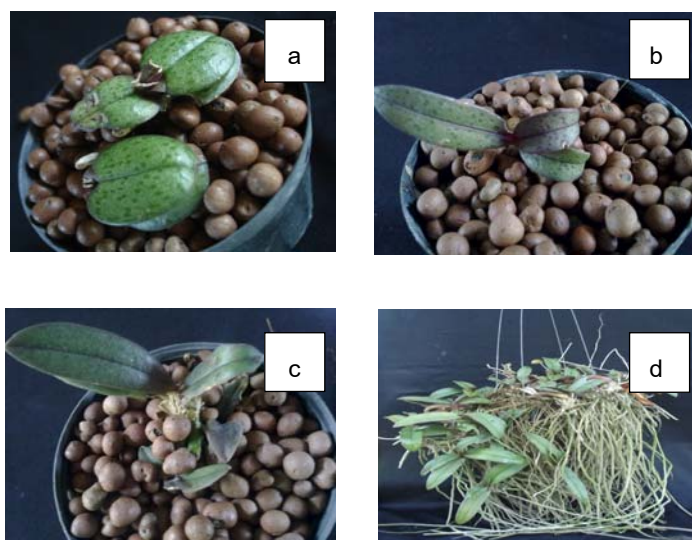


Figure 1 Characteristics of *D. pulcherrima* Lindl. (a = globose leaf with spot dwarf, b = oblong leaf with spot dwarf, c = oblong leaf without spot dwarf and d = *D. pulcherrima* Lindl. of normal size)

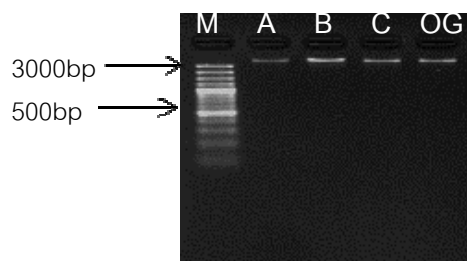


Figure 2 Genomic DNA extracted from leaf samples (M: molecular ladder; A: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. globose leaf with spot; B: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf with spot; C: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf without spot; OG: *D. pulcherrima* Lindl.)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และ ISSR

การทดสอบไพรเมอร์ RAPD เบื้องต้น จำนวน 80 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ 12 ชนิด คือ OPA01, OPA02, OPA03, OPA05, OPA08, OPA09, OPA10, OPA11, OPA18, OPA19, OPA20 และ OPC19 ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง แถบคมชัด และเกิดแถบจำเพาะในการจำแนกกลุ่มตัวอย่างได้ หรือ

เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic bands) สูงสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 112 แถบ มีขนาดประมาณ 73 -2109 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 98 แถบ คิดเป็น 87.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไพรเมอร์ OPA02 และ OPA11 เป็นไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอสูงสุด คือ 15 แถบ ในขณะที่ไพรเมอร์ OPA10, OPA11 และ OPA19 มีเปอร์เซ็นต์การให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน สูงสุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

Table 1 Polymorphism of RAPD and ISSR markers in Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. and *D. pulcherrima* Lindl.

Primer	Primer sequence	Total no. of band	No. of polymorphic bands	% Polymorphism
OPA01	5'-CAG GCC CTT C-3'	5	4	80
OPA02	5'-TGC CGA GCT G-3'	15	14	93.33
OPA03	5'-AGT CAG CCA C-3'	10	8	80
OPA05	5'-AGG GGT CTT G-3'	3	2	66.67
OPA08	5'-GTG ACG TAG G-3'	6	5	83.33
OPA09	5'-GTG ATC GCA G-3'	12	10	83.33
OPA10	5'-CAA TCG CCG T-3'	10	10	100
OPA11	5'-CAG CAC CCA C-3'	15	15	100
OPA18	5'-GGG TAA CGC C-3'	12	11	91.67
OPA19	5'-CAA ACG TCG G-3'	7	7	100
OPA20	5'-GTT GCG ATC C-3'	11	9	81.82
OPC19	5'-GTT GCC AGC C-3'	6	3	50
ISSR16	5'-(CGC) ₅ A-3'	10	4	40
ISSR18	5'-(CGC) ₅ T-3'	13	11	84.62
ISSR19	5'-(CGG) ₅ A-3'	6	5	84.62
ISSR25	5'-(GAG) ₇ A-3'	10	5	50
ISSR30	5'-(GCC) ₅ T-3'	10	8	80
ISSR67	5'-(ACA) ₉ A-3'	15	15	100
ISSR68	5'-(ACA) ₉ T-3'	14	11	78.57
ISSR69	5'-(ACA) ₉ G-3'	16	13	81.25
ISSR83	5'-(CAC) ₆ A-3'	9	8	88.89
ISSR84	5'-(CAC) ₆ T-3'	25	25	100
I2	5'-(ACA) ₈ T-3'	18	17	94.44
UBC866	5'-(GCC) ₆ A-3'	13	9	69.23
B10	5'-(CAG) ₅ -3'	29	29	100

การทดสอบไพรเมอร์ ISSR จำนวน 118 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 13 ชนิด คือ ISSR16, ISSR18, ISSR19, ISSR25, ISSR30, ISSR67, ISSR68, ISSR69, ISSR83, ISSR84, I2, UBC866 และ B10 ที่สามารถสังเคราะห์แถบ ดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่าง แถบคมชัด และเกิดแถบที่จำแนก กลุ่มตัวอย่างได้ หรือเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันสูง สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 188 แถบ ขนาด ประมาณ 318-2758 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง จำนวน 160 แถบ คิดเป็น 85.1 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ B10 เป็นไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุดคือ 29 แถบ และเปอร์เซ็นต์การให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน สูงสุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

การที่ไพรเมอร์ RAPD ให้เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอ ที่แตกต่างใกล้เคียงกับไพรเมอร์ ISSR อาจเนื่องมาจากทั้ง ไพรเมอร์ RAPD และไพรเมอร์ ISSR เป็นไพรเมอร์แบบสุ่ม ซึ่งไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด ทำให้มีโอกาส เข้าจับกับดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง Kumar *et al.* (2009) รายงานว่า ไพรเมอร์ RAPD มีประสิทธิภาพในการ สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกับไพรเมอร์ ISSR ใน แอพริคอต โดยพบว่าไพรเมอร์ RAPD ให้เปอร์เซ็นต์แถบดี เอ็นเอที่แตกต่างกันสูงถึง 97.84 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไพรเมอร์ ISSR ให้เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง 96.5 เปอร์เซ็นต์ และในการศึกษาพืชสกุล *Houttuynia* โดย Wu *et al.* (2005) พบว่าทั้งไพรเมอร์ RAPD และ ISSR ให้ เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างใกล้เคียงกันคือ 92.9 และ 92.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะใบ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพบการปรากฏแถบ จำเพาะที่สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างได้ ดังนี้ การใช้ไพร เมอร์ OPA02, OPA18, ISSR83 และ I2 พบแถบจำเพาะ สำหรับกลุ่มต้นแคระใบกลมหลาย ขนาดประมาณ 771, 340, 639 และ 421 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 3-6) ส่วน การใช้ไพรเมอร์ ISSR19 พบแถบขนาดประมาณ 473 คู่ เบส สำหรับการจำแนกต้นแคระใบรีมีลาย และใบรีไม่มี ลาย ออกจากต้นแคระใบกลมมีลาย และ *D. pulcherrima* Lindl. (ภาพที่ 7)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *D. pulcherrima* Lindl. ต้นแคระ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี Jaccard's similarity coefficients พบว่า ไพรเมอร์ RAPD ทั้ง 12 ไพรเมอร์ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ในช่วง 0.44-0.96 และเมื่อนำข้อมูลมาสร้างแผนภาพเดนโดร แกรมด้วยวิธี UPGMA พบว่า สามารถจัดกลุ่ม *D. pulcherrima* Lindl. ต้นแคระ และ *D. pulcherrima* Lindl. ทั้ง 16 ตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มต้นแคระใบกลม มีลาย (ต้นที่ 1-5) ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.86 และ กลุ่มที่สอง คือ ต้นแคระใบรีมีลาย (ต้นที่ 1-5) ต้นแคระใบ รีไม่มีลาย (ต้นที่ 1-5 ยกเว้นต้นที่ 3) และ *D. pulcherrima* Lindl. ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.54 (ภาพที่ 8) และ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไพรเมอร์ ISSR ทั้ง 13 ชนิด พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่

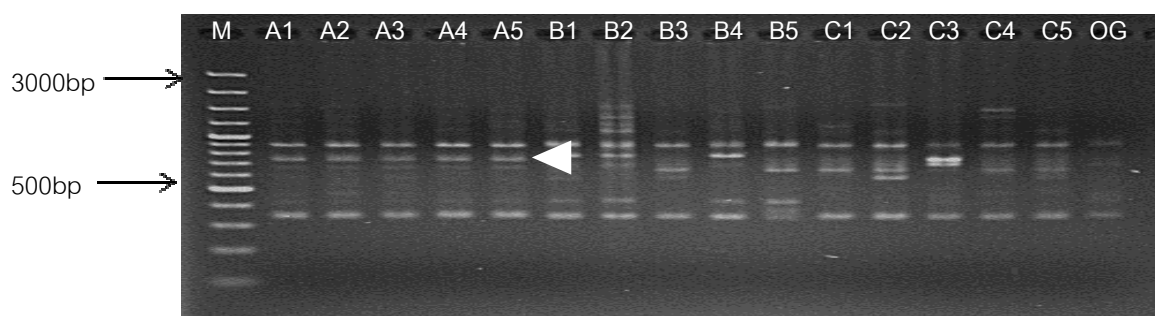


Figure 3 DNA banding patterns amplified by OPA02. (arrow: 771 bp fragments; M: molecular ladder; A1-A-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. globose leaf with spot; B1-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf with spot; C1-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf without spot; OG: *D. pulcherrima* Lindl.)

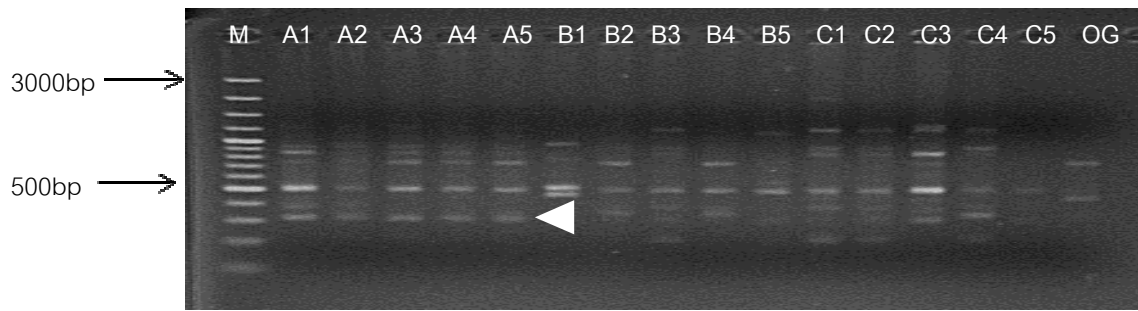


Figure 4 DNA banding patterns amplified by OPA18 (arrow: 340 bp fragments; M: molecular ladder; A1-A-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. globose leaf with spot; B1-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf with spot; C1-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf without spot; OG: *D. pulcherrima* Lindl.)

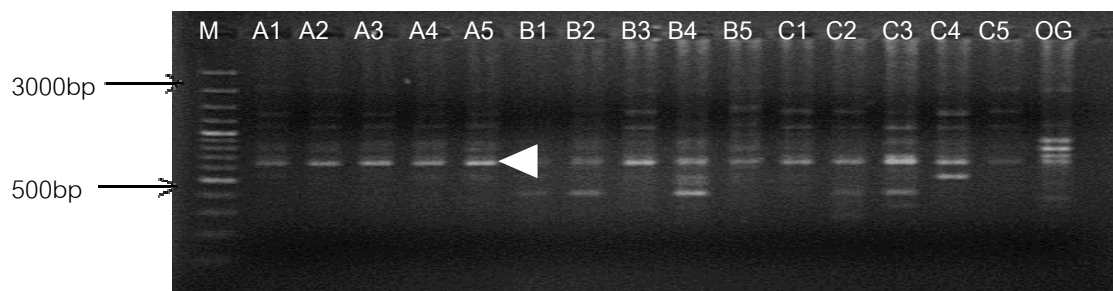


Figure 5 DNA banding patterns amplified by ISSR83. (arrow: 639 bp fragments; M: molecular ladder; A1-A5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. globose leaf with spot; B1-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf with spot; C1-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf without spot; OG: *D. pulcherrima* Lindl.)

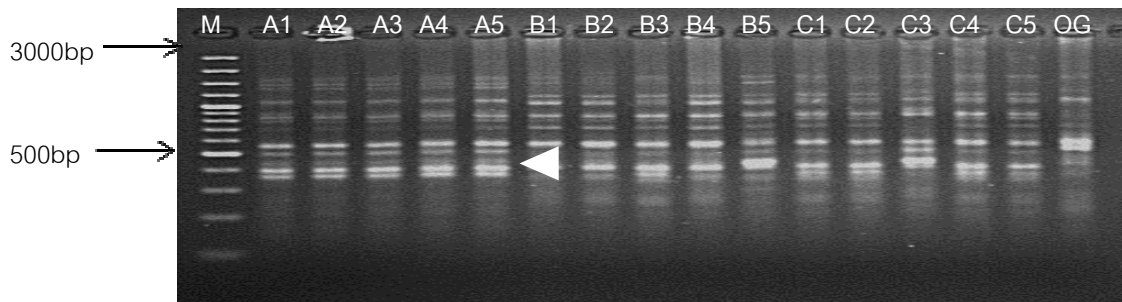


Figure 6 DNA banding patterns amplified by I2. (arrow: 421 bp fragments; M: molecular ladder; A1-A-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. globose leaf with spot; B1-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf with spot; C1-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf without spot; OG: *D. pulcherrima* Lindl.)

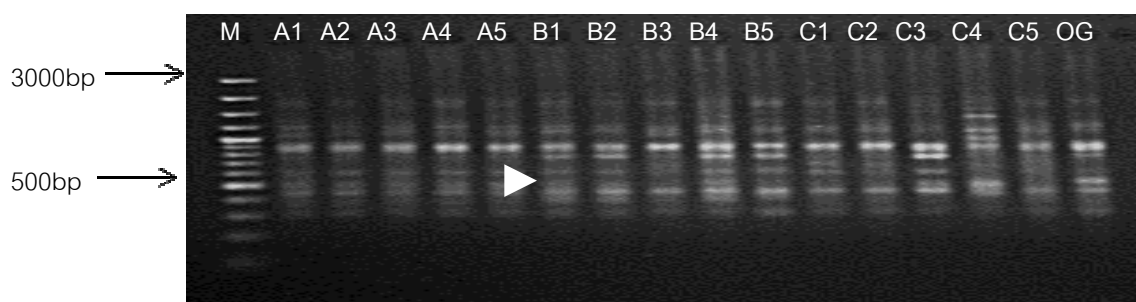


Figure 7 DNA banding patterns amplified by ISSR19. (arrow: 473 bp fragments; M: molecular ladder; A1-A-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. globose leaf with spot; B1-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf with spot; C1-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf without spot; OG: *D. pulcherrima* Lindl.)

ในช่วง 0.46-0.93 สามารถจำแนก *D. pulcherrima* Lindl. ออกจากพืชต้นแคระได้ ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.46 และสามารถจัดกลุ่มต้นแคระใบกลมมีลายต้นที่ 1-5 ได้ ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน 0.80 (ภาพที่ 9)

การจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ของทั้งสองเทคนิค ให้ผลสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา เมื่อพิจารณาเทคนิค RAPD พบว่าสามารถ จัดกลุ่มกล้วยไม้ตามลักษณะสัณฐานทางใบ คือใบกลม (*D. pulcherrima* Lindl.ต้นแคระใบกลมลายต้นที่ 1-5) (ภาพที่ 1a) และใบรี (*D. pulcherrima* Lindl. ต้นแคระ ใบรีมีลายต้นที่ 1-5 ต้นแคระใบรีไม่มีลายต้นที่ 1-2 และ 4-5 และ *D. pulcherrima* Lindl.) (ภาพที่ 1b-d) ส่วนเทคนิค

ISSR สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้สอดคล้องกับลักษณะ สัณฐานมากกว่า โดยจัดกลุ่มตามลักษณะสัณฐานทางลำ ต้น และใบ คือ จำแนก *D. pulcherrima* Lindl. ออกจาก กลุ่มต้นแคระ โดย *D. pulcherrima* Lindl. มีลักษณะต้นที่ สูง ใหญ่กว่า ใบยาว และเรียวมากกว่า *D. pulcherrima* Lindl. ต้นแคระ และจัดกลุ่มต้นแคระใบกลม (*D. pulcherrima* Lindl. ต้นแคระใบกลมลายต้นที่ 1-5) ไว้ ด้วยกัน (ภาพที่ 1a) เทคนิค RAPD และ ISSR สามารถจัด กลุ่ม *D. pulcherrima* Lindl. ต้นแคระใบกลมมีลายทั้ง 5 ต้น ได้ ซึ่งลักษณะใบของกลุ่มนี้ค่อนข้างแตกต่างจากกลุ่ม ที่เหลือได้แก่ *D. pulcherrima* Lindl. ต้นแคระใบรีมีลาย ใบรีไม่มีลาย และ *D. pulcherrima* Lindl. (ใบรี) การที่

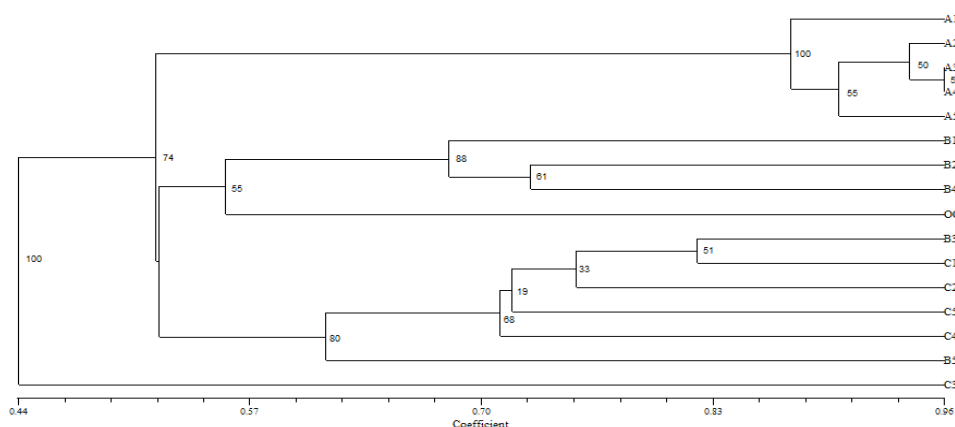


Figure 8 Dendrogram obtained with Jaccard's coefficients using RAPD data of *D. pulcherrima* Lindl. Node support was estimated with 1,000 bootstrap replicates. (A1-A-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. globose leaf with spot; B1-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf with spot; C1-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf without spot; OG: *D. pulcherrima* Lindl.)

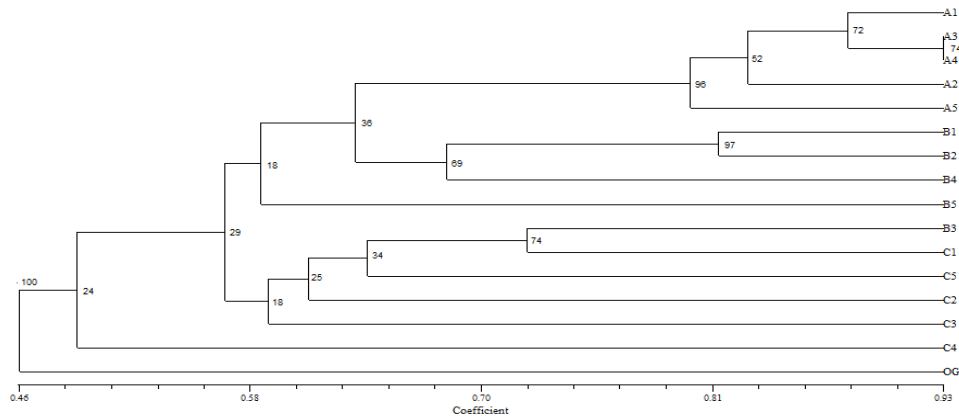


Figure 9 Dendrogram obtained with Jaccard's coefficients using ISSR data of *D. pulcherrima* Lindl. Node support was estimated with 1,000 bootstrap replicates. (A1-A-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. globose leaf with spot; B1-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf with spot; C1-5: Dwarf *D. pulcherrima* Lindl. oblong leaf without spot; OG: *D. pulcherrima* Lindl.)

ไพรมเมอร์ ISSR สามารถจัดกลุ่มพืชได้ละเอียด และสอดคล้องกับลักษณะพื้นฐานของกล้วยไม้มากกว่าไพรมเมอร์ RAPD สอดคล้องกับ Medraoui *et al.* (2007) ที่รายงานว่าการจัดกลุ่มพืชด้วย ISSR สามารถจัดกลุ่มข้าวฟ่าง ได้ชัดเจน และสอดคล้องกับลักษณะทางภูมิศาสตร์แหล่งที่มาของข้าวฟ่างมากกว่าเทคนิค RAPD อย่างไรก็ตาม ทั้ง 2 เทคนิคมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน เนื่องจากให้ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน ความสอดคล้องในการจัดกลุ่มเพียงบางส่วนระหว่างเทคนิค RAPD และ ISSR เป็นไปในทางเดียวกับรายงานของ Verma *et al.* (2009) ที่ศึกษาความหลากหลายของพืชสกุล *Vanilla* พบว่าการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของทั้งเทคนิค RAPD และ ISSR ไม่เหมือนกัน แต่มีความคล้ายคลึงกันโดยทั้งสองเทคนิคจัดกลุ่ม *V. planifolia* และ *V. tahitensis* ไว้ด้วยกันได้ อีกทั้งสามารถแยก *V. andamanica* ออกมาได้ เมื่อนำพืชตัวอย่างที่จัดเป็นกลุ่มเดียวกันด้วยลักษณะทางสัณฐานมาวิเคราะห์ พบว่ามีลักษณะแถบดีเอ็นเอต่างกัน และมีระยะห่างทางพันธุกรรม แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *D. pulcherrima* Lindl. ต้นแคระที่ศึกษาอยู่

สรุป

เทคนิค RAPD สามารถจัดกลุ่มต้นแคระใบกลมมีลายได้ ส่วนเทคนิค ISSR สามารถจำแนก *D. pulcherrima* Lindl. ออกจากต้นแคระ และสามารถจัดกลุ่มใบกลมมีลาย ภายในกลุ่มต้นแคระได้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์พันธุ์พืชสารเคมี และอุปกรณ์ จากโครงการพัฒนาคุณภาพไม้ดอกทางเศรษฐกิจ (กล้วยไม้) และโครงการวิจัยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (CMU Ag-biotech) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

- ณรงค์ โฉมเฉลา. 2519. Tetraploidy ในกล้วยไม้ไทย. วิทยาศาสตร์โมสรกล้วยไม้บางเขน 4: 213-218.
ระพี สาคริก. 2554. กล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มต้น. วชิรฯ บจก. กรุงเทพฯ. 222 หน้า.
วิวัฒน์ บัณฑิตย และ ดำเนิน กาละดี. 2554. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับสารต้านอนุมูล

- อิสระในข้าวเก่า. รายงานประจำปี 2554 งานบริหารงานวิจัย และวิเทศสัมพันธ์ คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 91 หน้า.
- ศิริลักษณ์ อินทวงค์ วิวัฒน์ บัณฑิตย์ และ ณัฐา ควร-ประเสริฐ. 2547. การจำแนกกล้วยไม้ไทยสกุลหวายโดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดี. วารสารเกษตร 20(2): 152-158
- สุรางค์รัตน์ อินทมุสิก. 2551. การแปรผันทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* Lindl. Sensulato) ในเขตพรรณพฤษชาติภาคใต้ของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาพฤกษศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 105 หน้า.
- สุนทร ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 115 หน้า.
- Haider, N., I. Nabulsi and Y. Kamary. 2012. Phylogeny of Orchidaceae species in northwest Syria based on ISSRs. Journal of Plant Biology Research 1: 36-50.
- Hapl, V., A. Pavlicek and J. Flegr. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with a freeware program free tree: Application to trichomonad parasites. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51: 731-735.
- Kate-ngam, S. and P. Lakote. 2008. A comparative study of different RAPD-PCR protocols for genetic diversity analysis of *Doritis* germplasm. Agricultural Science Journal 39: 203-206.
- Kumar, M., G. P. Mishra, R. Singh, J. Kumar, P. K. Naik and S. B. Singh. 2009. Correspondence of ISSR and RAPD markers for comparative analysis of genetic diversity among different apricot genotypes from cold arid deserts of trans-Himalayas. Physiology and Molecular Biology Plants 15: 225-36.
- Lee, I. S., D. S. Kim, S. J. Lee, H. S. Song and Y. I. Lee. 2003. Selection and characterizations of radiation-induced salinity-tolerant lines in rice. Breeding Science 53: 313-318.
- Lim, S. H., P. C. P. Teng, Y. H. Lee and C. J. Goh. 1999. RAPD analysis of some species in the genus *Vanda*. Annals of Botany 83: 193-196.
- Medraoui, L., A. Mohammed, B. Ouafae, M. Driss and F. M. Abdelkarim. 2007. Evaluation of genetic variability of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) in northwestern Morocco by ISSR and RAPD markers. Comptes Rendus Biologies 330: 789-797.
- Oliveira, L. D. V. R., R. T. D. Faria, C. D. F. Ruas, P. M. Ruas, M. D. O. Santos and V. P. Carvalho. 2010. Genetic analysis of species in the genus *Catasetum* (Orchidaceae) using RAPD markers. Brazilian Archives of Biology and Technology 53: 375-387.
- Rohlf, F. 2000. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.01e. Exeter Ltd., Setauket, NY, U. S. A.
- Taywiya, P., W. Bundithya and N. Potapohn. 2008 . Analysis of genetic relationship of the genus *Phalaenopsis* by RAPD technique. Acta Horticulture 788: 39-45.
- Verma, P., C. Debasis, N. J. Satya, K. M. Devesh, K. S. Pradhyumna, V. S. Samir and T. Rakesh. 2009. The extent of genetic diversity among Vanilla species: comparative results for RAPD and ISSR. Industrial Crops and Products 29: 581-589.

- Wang, H. Z., J. J. Lu, X. Hu and J. J. Liu. 2011. Genetic variation and cultivar identification in *Cymbidium ensifolium*. Plant System 293: 101-110.
- Wang, H. Z., Z. X. Wu, J. J. Lu, N. N. Shi, Z. Yan, Y. Zhao, Z. T. Zhang and J. J. Liu. 2009. Molecular diversity and relationship among *Cymbidium goeringii* cultivars based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Genetica 136: 391-399.
- William, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6,531-6,535.
- Wu, W., Y. L. Zheng, L. Chen, Y. M. Wei, R. W. Yang and Z. H. Yan. 2005. Evaluation of genetic relationships in the genus *Houttuynia* Thunb. In China based on RAPD and ISSR markers. Biochemical Systematic and Ecology 33: 1141-1157.
-