

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ต่างกันในกลุ่มดอก เอื้องดินใบหมากบางชนิดโดยเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์

Detection of Differential Gene Expression in Tepal of Some *Spathoglottis* Species by DDRT-PCR Technique

จตุพร อนุชัย^{1/, 2/} ณัฐรา โพธารณ^{1/} และ วิณัน บัณฑิตย์^{1/, 2/}
Jatuporn Anuchai^{1/, 2/}, Nuttha Potapohn^{1/} and Weenun Bundithya^{1/, 2/}

Abstract: *Spathoglottis* is one of the orchid species which is popular for its color prominence in Thailand and abroad. However, knowledge and information of genetics controlling color phenotypes in orchid is still limited. Therefore, gene expression in tepals was carried out in 3 species of *Spathoglottis* which were *S. affinis*, *S. plicata* and *S. petrei*. Differential display reverse transcription-polymerase chain reaction (DDRT-PCR) technique was used to study gene expression in tepals at 3 different stages. The flower development period was divided as follows: flower bud, half opened flower and full bloom flower. Fifty-eight primers were screened and only 3 primers, OPD16, OPF14 and OPAB19, were able to amplify DNA marker associated with flower characteristics. These DDRT-PCR markers may have potentials for identification of genetic variation associated with flower characteristics of *Spathoglottis*.

Keywords: Gene expression, DDRT-PCR technique, *Spathoglottis* spp.

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

^{2/} ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานับพันศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) จ.นครปฐม 73140

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

^{2/} Center of Excellence on Agricultural Biotechnology, Science and Technology Postgraduate Education and Research Development Office, Commission on Higher Education, Ministry of Education. (AG-BIO/PERDO-CHE), Nakhon Pathom 73140, Thailand

* corresponding author

บทคัดย่อ: เอื้องดินโบหมาก (*Spathoglottis* spp.) เป็นกล้วยไม้สกุลหนึ่งที่มีจุดเด่นในเรื่องของสีดอกซึ่งเป็นที่นิยมในตลาดทั้งในและต่างประเทศ แต่ข้อมูลเกี่ยวกับพันธุกรรม ซึ่งควบคุมสีดอกกล้วยไม้ยังมีจำกัด งานวิจัยนี้จึงศึกษาการแสดงออกของยีนในเอื้องดินโบหมาก 3 ชนิด ได้แก่ *Spathoglottis plicata*, *S. affinis* และ *S. petrei* ด้วยเทคนิคดีอาร์ที - พีซีอาร์ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในกลีบดอกที่ระยะการเจริญที่แตกต่างกัน 3 ระยะคือ ระยะดอกตูม ระยะดอกตูมก่อนบาน และระยะดอกบาน ในการคัดกรองไพรเมอร์ 58 ชนิด พบว่าไพรเมอร์แสดงเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะดอกเอื้องดินโบหมากทั้ง 3 ชนิด คือ OPD16, OPF14 และ OPAB19 ซึ่งแถบเครื่องหมายเหล่านี้คาดว่าจะมีศักยภาพในการบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับสีดอกของเอื้องดินโบหมากได้

คำสำคัญ: การแสดงออกของยีน เทคนิคดีอาร์ที - พีซีอาร์ *Spathoglottis* spp.

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศเหมาะแก่การเจริญเติบโตของกล้วยไม้ นานาชนิด นอกจากนั้นยังเป็นประเทศที่มีกล้วยไม้หลากหลายชนิด จัดเป็นไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ได้รับความนิยมทั้งแบบไม้กระถางและไม้ตัดดอก (ระพี, 2516) การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เชิงการค้ามีการขยายตัวมากในช่วงหลายปีที่ผ่านมา โดยในปี พ.ศ. 2550 มีพื้นที่ปลูก 20,739 ไร่ ให้ผลผลิตทั้งหมด 47,036 ตัน มีมูลค่าการส่งออกกว่า 2,544 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551) เอื้องดินโบหมาก (*Spathoglottis* spp.) จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae เป็นกล้วยไม้สกุลหนึ่งที่มีจุดเด่นในเรื่องของสีดอก เป็นที่นิยมในตลาดทั้งในและต่างประเทศ (ระพี, 2516) ดอกมีสีส้มหลากหลายสีได้แก่ ขาว เหลือง ชมพู ม่วง เป็นต้น ดอกทยอยบาน เกือบตลอดปี จึงนิยมนำไปเป็นไม้ประดับอาคาร จัดสวน และไม้กระถาง (อบจันทร์, 2543) แต่ข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะต่างๆ ของเอื้องดินโบหมากยังมีอยู่ไม่มาก การปรับปรุงการผลิตให้มีลักษณะตามที่ต้องการจึงค่อนข้างจำกัด ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับยีนที่ควบคุมลักษณะต่างๆ จึงมีความสำคัญต่อการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ของเอื้องดินโบหมาก (สิริณี, 2547)

การปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ทางการค้าเป็นการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม ทำให้มีพันธุ์ใหม่ออกสู่ตลาดมากยิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามการปรับปรุงพันธุ์ โดยวิธีการแบบดั้งเดิมที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

ต้องอาศัยเวลานาน การนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้เป็นเครื่องมือเพื่อจำแนกหรือตรวจสอบพันธุ์ ให้ถูกต้องและแม่นยำขึ้น เครื่องหมายโมเลกุลหลายชนิด อาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) ซึ่งเป็นหลักทำได้ง่ายและรวดเร็ว (สุรินทร์, 2545) สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบและคัดเลือกพันธุ์ที่แม่นยำกว่าลักษณะทางกายภาพซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม การคัดเลือกในระดับดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพสูงทั้งในแง่ลักษณะคุณภาพและปริมาณ การตรวจสอบทำได้ทุกระยะการเจริญเติบโตและการดำเนินการแต่ละครั้งสามารถตรวจสอบหลายลักษณะพร้อมกัน ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายอีกด้วย

เทคนิคดีอาร์ที - พีซีอาร์ (DDRT-PCR, differential display reverse transcription - polymerase chain reaction) เป็นเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลซึ่งมีศักยภาพสูงในการค้นหายีนที่แสดงออกแตกต่างกัน ซึ่งสามารถใช้ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ประกอบด้วยขั้นตอนของการสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA โดยใช้ anchored primer และ เอนไซม์ reverse transcriptase ตามด้วยการคัดกรองแถบ cDNA ด้วย random arbitrary primer ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ดังกล่าวถูกนำไปแยกความแตกต่างโดย polyacrylamide gel electrophoresis และตัดแถบที่น่าสนใจเพื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป (Liang and Pardee, 1992)

เทคนิคดีอาร์ทีพีซีอาร์ สามารถใช้ในการจำแนกการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันได้ทั้งในสัตว์พืช แมลง และจุลินทรีย์ เป็นวิธีการที่นิยมใช้กันอย่าง

กว้างขวาง สามารถปฏิบัติงานนำไปสู่การจำแนกพันธุ์ จัด
กลุ่มทางวิวัฒนาการ และการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ
สายพันธุ์ เป็นต้น (Chen *et al.*, 2004) ในการวิจัยครั้งนี้จึง
ได้นำเทคนิคดีอาร์ที-พีซีอาร์ มาใช้ในการวิเคราะห์การ
แสดงออกของยีนกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก 3 ชนิด
รูปแบบเฉพาะของการแสดงออกของยีนที่ได้ มีศักยภาพ
ในงานปรับปรุงพันธุ์ โดยอาจใช้เป็นเครื่องหมายช่วยใน
การคัดเลือกพันธุ์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัดอาร์เอ็นเอ

สุ่มเก็บตัวอย่างจากเอื้องดินใบหมาก 3 ชนิด 5
ตัวอย่าง ที่มีสีดอกต่างกัน คือ *S. affinis* 1 ตัวอย่าง สี
เหลือง *S. plicata* 3 ตัวอย่าง สีม่วง สีชมพู สีขาว และ
S. petrei 1 ตัวอย่าง สีบานเย็น ตัวอย่างละ 3 ต้น โดยเก็บ
กลีบดอกในระยะต่างๆ แบ่งเป็น 3 ระยะ คือ ระยะดอกตูม
(ระยะที่ 1) ดอกตูมก่อนบาน (ระยะที่ 2) และดอกบาน
(ระยะที่ 3) นำมาสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุดสารเคมี trizol
reagent (Invitrogen, U.S.A) ดำเนินการตามวิธีการที่
แนบมากับชุดสารเคมี ([http://tools.invitrogen.com/
content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf)) จากนั้นตรวจ
สอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยวิธีอากาโรส-
เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

การกำจัดดีเอ็นเอด้วย DNaseI

กำจัด genomic DNA ที่ปนเปื้อนออกจาก
อาร์เอ็นเอทั้งหมด โดยนำตัวอย่างสารละลายอาร์เอ็นเอ
ปริมาตร 6 ไมโครลิตร มาย่อยด้วยเอนไซม์ DNaseI ที่
อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำออกมาเติม
25 mM EDTA ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และหยุดปฏิกิริยา
ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น
ตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยวิธีอากาโรส-เจลอิเล็กโตร-
โฟรีซิส

การสังเคราะห์ cDNA

นำอาร์เอ็นเอของเนื้อเยื่อพืชตัวอย่างเปลี่ยนจาก
mRNA เป็น cDNA ด้วยกระบวนการ reverse

transcription โดยใช้ชุด SuperScript™ III first-strand
synthesis for RT-PCR (Invitrogen, U.S.A) ตรวจสอบผล
การสังเคราะห์ cDNA โดยการใช้ไพรเมอร์ ndhB up
(5'-ATG GTT TCT CTT GGC TAT ATG G-3') และ
ndhB down (5'-GCA TAC GTT TCA TGC TTG TTT
GAG-3') ตามวิธีที่แนบมากับชุดสารเคมี ([http://
tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/
trizol_reagent.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/trizol_reagent.pdf)) จากนั้นตรวจสอบผลของพีซีอาร์ ด้วยวิธี
อากาโรส-เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

การคัดกรองไพรเมอร์

คัดกรองไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณ
ดีเอ็นเอของกลีบดอกเอื้องดินใบหมากใช้ dT₁₂VG ร่วมกับ
ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ 58 ชนิด (OPD, OPF และ
OPAB) ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามเงื่อนไข
ดัดแปลงจากจิรพิพรรธ (2549) ดังนี้ initial melting step 1
รอบ ที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย 38 รอบของ
denaturation ที่ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่
42°C 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1
นาที และ final extension step ที่ 72°C นาน 8 นาที ใน
หลอดที่มีปริมาตรสารรวม 12 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย
dH₂O 5.5 ไมโครลิตร, 10x buffer 1.2 ไมโครลิตร, dNTP
(10 มิลลิโมลาร์) 0.5 ไมโครลิตร, MgCl₂ (25 มิลลิโมลาร์)
0.6 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อ
ไมโครลิตร) 0.2 ไมโครลิตร, dT₁₂VG บริษัท 1st Base
ประเทศมาเลเซีย (10 pmol) 1.5 ไมโครลิตร, arbitrary
primer (10 pmol) 0.5 ไมโครลิตร และ cDNA template 2
ไมโครลิตร ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วย โพลีอะครีลา-
ไมด์-เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (6 เปอร์เซ็นต์) และย้อมด้วย
silver nitrate

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

นำคู่ไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ศึกษาความแตกต่าง
ของการแสดงออกของยีน โดยเปรียบเทียบรูปแบบและ
ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ระหว่างกลีบดอกของ
เอื้องดินใบหมาก

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสกัดอาร์เอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอ

การสกัดอาร์เอ็นเอจากเหง้าดินไพบมา 3 ชนิด 5 ตัวอย่างที่มีสีดอกต่างกันคือ *S. affinis* สีเหลือง, *S. plicata* สีม่วง สีชมพู สีขาว และ *S. petrei* สีบานเย็น โดยใช้ตัวอย่างพืช 3 ระยะ คือ ระยะดอกตูม (ระยะที่ 1) ดอกตูมก่อนบาน (ระยะที่ 2) และดอกบาน (ระยะที่ 3) (ภาพที่ 1) เมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้น 35 - 45 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เมื่อตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยอากาโรสเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอาร์เอ็นเอที่ได้ปรากฏเป็นแถบชัดเจน แต่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอในส่วนบนของเจล (ภาพที่ 2A) ซึ่งจะส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณ cDNA ในขั้นตอนต่อไป หากไพรเมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณ genomic DNA ที่ปนเปื้อนทำให้การแปลผลผิดพลาด (Maier *et al.*, 1992) เมื่อนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาทำ DNase digestion เพื่อกำจัดดีเอ็นเอ

พบว่า แถบอาร์เอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดีขึ้น โดยแถบอาร์เอ็นเอมีความคมชัด และไม่มีส่วนปนเปื้อนของดีเอ็นเอ (ภาพที่ 2B) อาร์เอ็นเอที่ได้จัดว่ามีคุณภาพดี และสามารถใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ cDNA ในขั้นตอนต่อไปได้ (Manoj *et al.*, 2008)

2. การตรวจสอบคุณภาพของ cDNA

การตรวจสอบคุณภาพของ cDNA ใช้คูไพรเมอร์ ndhB ซึ่งออกแบบเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในคลอโรพลาสต์ (Maier *et al.*, 1992) เมื่อนำมาทดสอบผลการทำ reverse transcription ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากกลีบดอกของเหง้าดินไพบมาพบแถบของ cDNA ที่ได้ มีการแสดงแถบที่ชัดเจนขนาดประมาณ 500 bp และมีเพียงแถบเดียว (ภาพที่ 3) ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์ cDNA ไม่มีการปนเปื้อนของ genomic DNA เนื่องจากถ้ามีการปนเปื้อนจะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดใหญ่กว่า cDNA ที่ได้ เช่นเดียวกับการใช้คูไพรเมอร์ ndhB ในข้าวโพดพบว่าสามารถสังเคราะห์แถบ cDNA ขนาด 500 bp เช่นกัน (Maier *et al.*, 1992)



Figure 1 Different sampling stages of *Spathoglottis* 1) flower bud 2) half-opened bud 3) full bloom flower

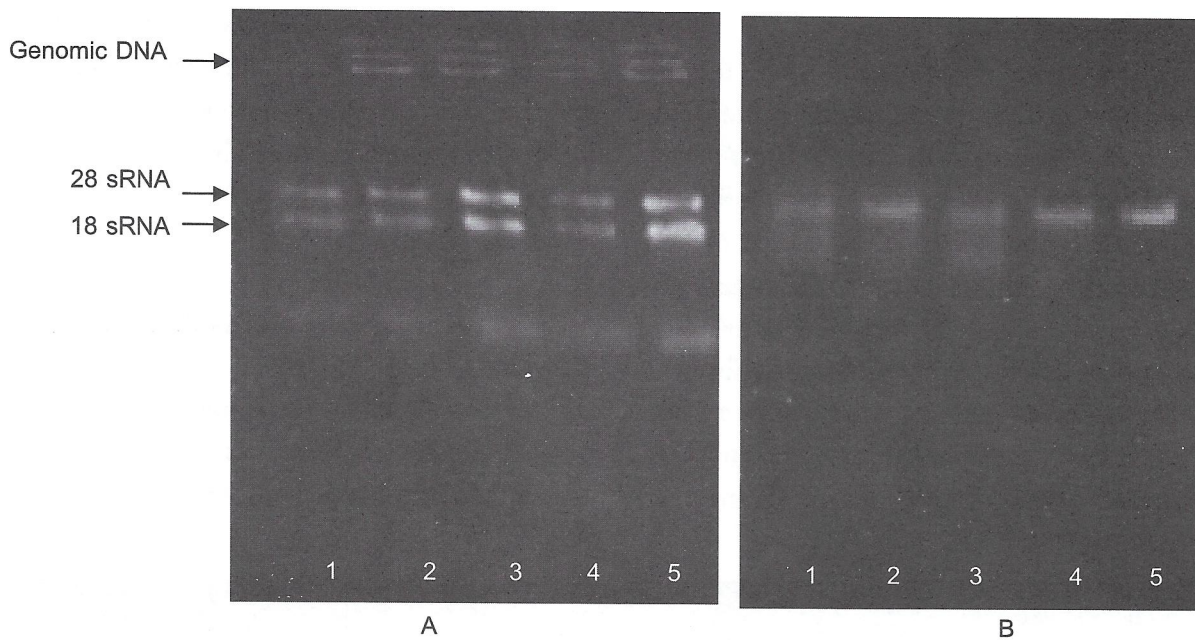


Figure 2 Total RNA of *Spathoglottis* A: prior to DNase I digestion B: with DNase I digestion 1) *S. plicata* purple color, 2) *S. plicata* pink color, 3) *S. plicata* white color, 4) *S. affinis*, 5) *S. petrei*

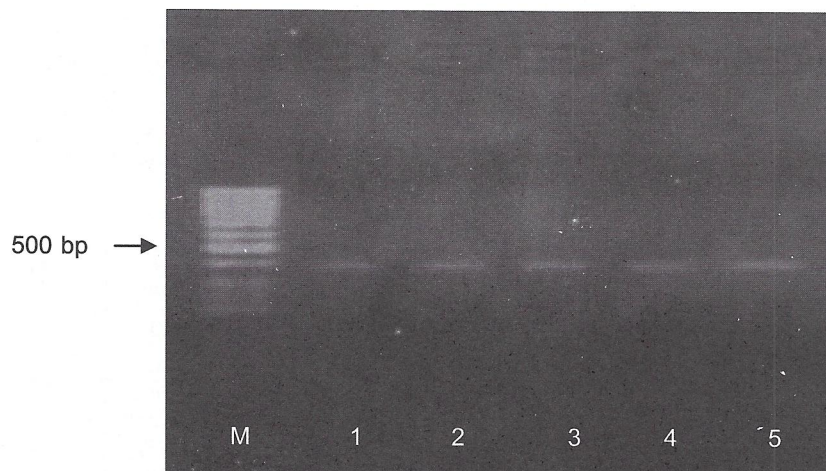


Figure 3 PCR products amplified by *ndhB* primers 1) *S. plicata* purple color, 2) *S. plicata* pink color, 3) *S. plicata* white color, 4) *S. affinis*, 5) *S. petrei*, M: 100 bp marker

3. การคัดกรองคู่ไพรเมอร์

จากการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 58 ชนิด ร่วมกับ anchored primer dT₁₂VG ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอจากกลีบดอกเอื้องดินโบหมากทั้ง 5 ตัวอย่าง พบว่าไพรเมอร์ 8 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เป้าหมายได้ โดยไพรเมอร์ 5 ชนิด ได้แก่ OPF13, OPF16, OPAB11, OPAB12 และ OPAB17 ให้ลักษณะแถบที่ แตกต่าง (polymorphic) แต่แถบที่ได้ไม่มีความจำเพาะ ต่อกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ส่วนไพรเมอร์ อีก 3 ชนิด ได้แก่ OPD16, OPF14 และ OPAB19 สามารถ สังเคราะห์ดีเอ็นเอของทุกตัวอย่าง และสามารถจำแนก ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างทั้ง 5 ตัวอย่างได้ (ภาพที่ 4)

แสดงว่าเป็นคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ศึกษาการ แสดงออกของยีนได้ในลำดับต่อไป เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ และผลผลิตที่ได้ มีปริมาณมาก (สุรินทร์, 2545) ส่วนไพรเมอร์อีก 50 ชนิด ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ครบทุก ตัวอย่าง (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค ดีดีอาร์ที – พีซีอาร์

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ต่างกัน ระหว่างกลีบดอกเอื้องดินโบหมาก ทั้ง 5 ตัวอย่าง เมื่อเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ OPD16,

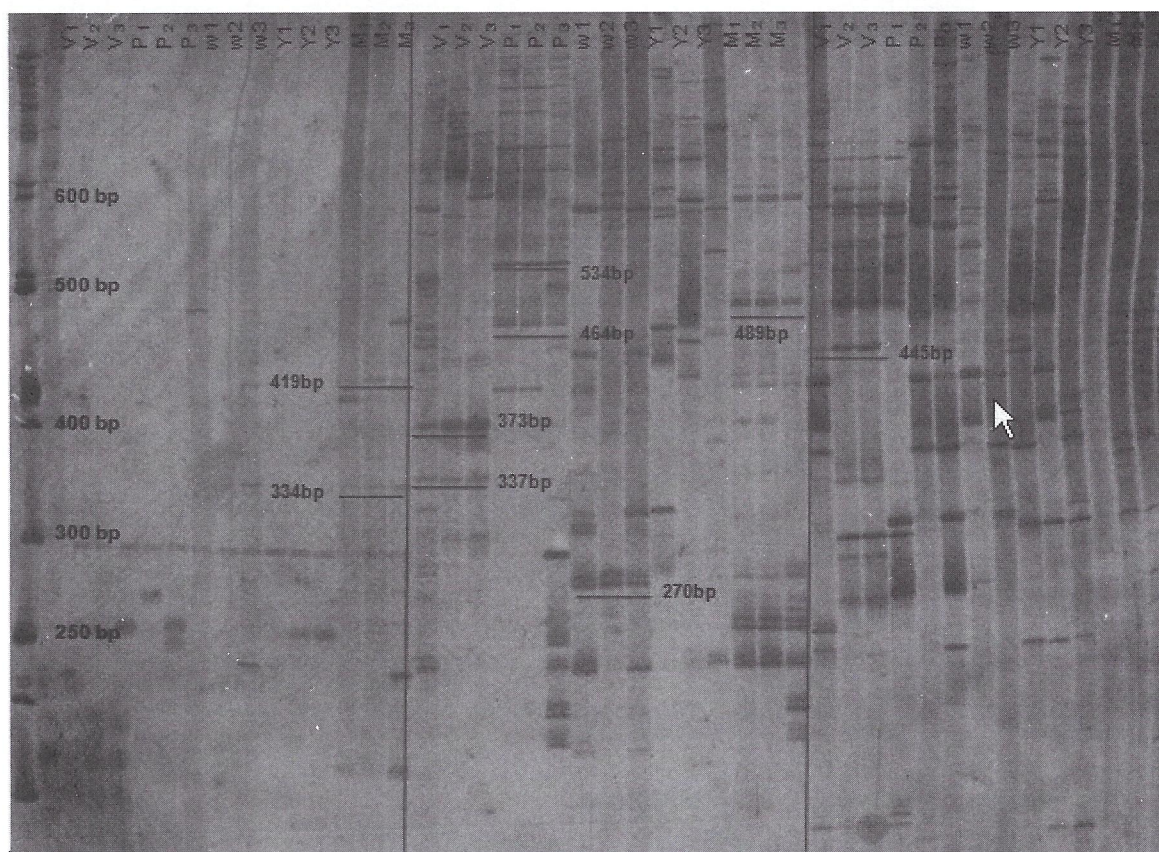


Figure 4 cDNA pattern representing gene expression in *Spathoglottis* spp. Differentially displayed bands were obtained by primer OPD16, OPF14 and OPAB19 with dT₁₂VG.

V = *S. plicata* purple color

P = *S. plicata* pink color

W = *S. plicata* white color

Y = *S. affinis*

M = *S. petrei*

1 = flower bud

2 = half-opened bud

3 = full bloom flower

OPF14 และ OPAB19 ร่วมกับ anchored primer dT₁₂VG พบแถบดีเอ็นเอที่สามารถบันทึกลงได้รวม 352 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 200 ถึง 1,000 bp ในการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มพบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันทั้งหมด 9 แถบ ขนาด 534, 489, 464, 445, 419, 373, 337, 334 และ 270 bp (ภาพที่ 4) โดย 7 แถบ ยกเว้น 445 และ 373 bp ความเข้มแถบเท่ากันในกลุ่มดอกแต่ละระยะ แสดงให้เห็นถึงระดับการแสดงออกของยีนตลอดระยะการพัฒนาดอก สำหรับการปรากฏแถบเฉพาะกลุ่มนี้แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันของเอื้องดินใบหมากแต่ละชนิด เช่นเดียวกับการใช้เทคนิคนี้ใน *Dendrobium Madame Thong-in* ที่สามารถจำแนกยีนที่แสดงออกในเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดระหว่างการเปลี่ยนแปลงระยะการเจริญเติบโตทางใบไปเป็นระยะสืบพันธุ์ (Yu and Goh, 2000) การใช้ไพรเมอร์ OPD16 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 419 bp และ 337 bp ที่มีความจำเพาะกับ *S. petrei* ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีสืบพันธุ์ทั้ง 3 ระยะ ส่วน OPF14 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 534, 489, 464, 373, 334 และ 270 bp จำนวน 6 แถบ ซึ่งมีความจำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างที่ต่างกัน โดยแถบขนาด 373 และ 334 bp พบเฉพาะใน *S. plicata* สีม่วง แถบขนาด 534 และ 464 bp พบเฉพาะใน *S. plicata* สีชมพู แถบขนาด 270 bp พบเฉพาะใน *S. plicata* สีขาว และแถบขนาด 489 bp ที่พบเฉพาะใน *S. petrei* เท่านั้น และไพรเมอร์ OPAB19 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 445 bp เฉพาะใน *S. plicata* สีม่วง นอกจากความจำเพาะต่อเอื้องดินใบหมากในแต่ละกลุ่มแล้วยังพบว่าบางแถบมีการแสดงออกที่ต่างกันในแต่ละระยะภายในกลุ่ม คือ แถบขนาด 373 bp โดยไพรเมอร์ OPF14 และขนาด 445 bp โดยไพรเมอร์ OPAB19 (ภาพที่ 4) ซึ่งมีความเข้มของแถบเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงระดับการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นเมื่อดอกมีการพัฒนามากขึ้น อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่พบแถบที่จำเพาะต่อ *S. affinis*

การนำเทคนิคดีอาร์ที - พีซีอาร์มาใช้เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนนำไปสู่ประโยชน์หลายประการ ในรายงานของ Park et al. (2009) ใช้เทคนิคดีอาร์ที - พีซีอาร์ เพื่อศึกษายีนที่แสดงออกระหว่างการ

พัฒนาของดอก และสัมพันธ์กับลักษณะของดอก *Calanthe* สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ เช่นเดียวกับ Yu and Goh (2000) ได้ใช้เทคนิคดีอาร์ที-พีซีอาร์ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในช่วงการพัฒนาดอกของลูกผสม *Dendrobium Madame Thong-in* เพื่อจำแนกยีนที่แสดงออกในเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดในระหว่างการเปลี่ยนแปลงระยะการเจริญเติบโตทางใบไปเป็นระยะสืบพันธุ์ นอกจากนั้นแล้วยังมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ดิน ตามรายงานของ สิริณี (2547) ได้ใช้เทคนิคอาร์เอพีดี - พีซีอาร์เพื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยไม้ดิน พบไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน 6 ชนิด เพื่อนำมาวิเคราะห์ความใกล้เคียงทางพันธุกรรม จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำแถบดีเอ็นเอที่พบในกลุ่มดอกของเอื้องดินใบหมากซึ่งมีความจำเพาะต่อกลุ่มที่ต่างกัน ไปวิเคราะห์ลำดับเบสและออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะมากขึ้น เพื่อใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับการจำแนกสปีดต่อไป

สรุป

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ต่างกันจากกลุ่มดอกของเอื้องดินใบหมาก 3 ชนิดที่มีสีดอกแตกต่างกันด้วยเทคนิคดีอาร์ที - พีซีอาร์ พบคู่ไพรเมอร์ระหว่าง dT₁₂VG และไพรเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ OPD16, OPF14 และ OPAB19 จากทั้งหมด 58 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะกับสปีดดอกเอื้องดินใบหมากในแต่ละชนิด รวมทั้งสิ้น 9 แถบ โดยมีระดับการแสดงออกเท่ากันในทุกระยะการพัฒนาดอก 7 แถบ และแถบที่มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นตามระยะการพัฒนาดอก 2 แถบ ซึ่งแถบดีเอ็นเอดังกล่าวอาจใช้เพื่อการบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับสีของดอกเอื้องดินใบหมากแต่ละชนิดได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนา

บัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวง
ศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE)

เอกสารอ้างอิง

- จิรพิพรรธ แพรไพศาลกุล. 2549. การจำแนกยีนที่
ต้านทานต่อเชื้อ *Escherichia coli* สาเหตุของ
โรคท้องร่วงในสุกรก่อนหย่านม. วิทยานิพนธ์
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 57 หน้า.
- ระพี สาคริก. 2516. การเพาะปลูกกล้วยไม้ในสภาพ
แวดล้อมของประเทศไทย. โรงพิมพ์ชวนพิมพ์,
กรุงเทพฯ. 840 หน้า.
- สิริณี ยอดเมือง. 2547. การศึกษาพันธุกรรมสีดอกกล้วย
ไม้ดินโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล.
วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา
พืชสวน มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 147
หน้า.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดี
เอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี.
สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ. 116 หน้า.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2551. ปริมาณและ
มูลค่าสินค้าเกษตรกรรมส่งออก พ.ศ. 2549-
2550 (ระบบออนไลน์). แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th/oae/index2.php> (21 สิงหาคม 2553).
- อบันท์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. สำนักพิมพ์
บ้านและสวน, กรุงเทพฯ. 461 หน้า.
- Chen, Y., B. Wang, S. Weining and G. Daggard.
2004. Anchor primer associated problems
in differential display reverse transcription
polymerase chain reaction. *Annal Biochem.*
329: 145-147.
- Liang, P. and A. Pardee. 1992. Differential display
of eukaryotic messenger RNA by means of
the polymerase chain reaction. *Science*
257: 967-971.
- Maier, R. M., K. Neckermann, B. Hoch, N.B.
Akhmerdov and H. Kossel. 1992.
Identification of editing positions in the *ndhB*
transcript from maize chloroplasts reveals
sequence similarities between editing sites
of chloroplasts and plant mitochondria.
Nucleic Acids Res. 20: 6189-6194.
- Manoj, P., N. S. Banerjee and P. Ravichandran.
2008. Development of sex specific
molecular marker in dioecious *Piper longum*
L. plants by differential display. *JATIT.* 4:
459-465.
- Park, M.J., S. Soo, P.O. Lim, H. Lee and J.C. Koo.
2009. Identification of differentially
expressed genes in flower buds of *Calanthe*
discolor and *C. sieboldii*. *Plant Biol.* 53: 24-
31.
- Yu, H. and C.J. Goh. 2000. Differential gene
expression during floral transition in an
orchid hybrid *Dendrobium* Madame
Thong-in. *Plant Cell Rep.* 19: 926-931.