

การจำแนกกล้วยไม้ไทยสกุลหวายโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

Identification of Thai *Dendrobium* Orchid Species

by RAPD Technique

ศิริลักษณ์ อินทวงค์^{1/} เวณัน บัณฑิตย์^{1/} และ ณัฐา ควรประเสริฐ^{1/}

Sirilak Inthawong^{1/} Weenun Bundithya^{1/} and Nuttha Kuanprasert^{1/}

Abstract : DNA of twelve Thai *Dendrobium* orchid species from three sections, Section *Callista*; *Den. chrysotoxum* (D026) and *Den. lindleyi* (D122), Section *Dendrobium*; *Den. crystallinum* (D044), *Den. findlayanum* (D030), *Den. nobile* (D031), *Den. parishii* (D040) and *Den. unicum* (D015) and Section *Formosae*; *Den. cruentum* (D121), *Den. draconis* (D022), *Den. formosum* (D074), *Den. infundibulum* (D034) and *Den. scabrilingue* (D012), were identified using RAPD with 10-nucleotide primers, OPAK04 and OPD01-09. Primer OPD03 showed polymorphic banding pattern of all twelve *Dendrobium* species. However, dendrogram from cluster analysis could not divide these *Dendrobium* into three sections. DNA fingerprint pattern were derived from random primer OPAK04 were able to distinguish of D034 and D044 from other species.

บทคัดย่อ: ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ไทยสกุลหวายจำนวน 12 ชนิด จาก 3 หมู่ (sections) คือ หมู่ *Callista*; *Den. chrysotoxum* (D026) and *Den. lindleyi* (D122), หมู่ *Dendrobium*; *Den. crystallinum* (D044), *Den. findlayanum* (D030), *Den. nobile* (D031), *Den. parishii* (D040) และ *Den. unicum* (D015) และ หมู่ *Formosae*; *Den. cruentum* (D121), *Den. draconis* (D022), *Den. formosum* (D074), *Den. infundibulum* (D034) และ *Den. scabrilingue* (D012) ไปเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ คือ OPAK04 และ OPD01-09 พบว่า มีไพรเมอร์ OPD03 เท่านั้นที่สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันในกล้วยไม้ทั้ง 12 ชนิดได้ แต่เมื่อนำข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์ด้วยวิธี cluster analysis พบว่า ไม่สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้ได้ตามหมู่ได้ ส่วนไพรเมอร์ OPAK04 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ D034 และ D044 แตกต่างออกไปจากกล้วยไม้ชนิดอื่น

^{1/} ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50200

^{1/} Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

Index words: กล้วยไม้สกุลหวาย เทคนิคอาร์เอฟดี พีซีอาร์ อิเล็กโตรโฟรีซิส

Dendrobium, RAPD technique, PCR, electrophoresis

คำนำ

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae มีมากกว่า 1,000 ชนิด นักพฤกษศาสตร์จึงได้จำแนกกล้วยไม้สกุลหวายออกเป็นหมู่ (section) ได้อีก 41 หมู่ (Baker *et al.*, 1996) ซึ่งในประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลนี้ตามธรรมชาติมากกว่า 150 ชนิด ส่วนใหญ่จัดอยู่ในหมู่ *Callista*, *Dendrobium* และ *Formosae* โดยทุกชนิดเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย มีการเจริญเติบโตแบบซิมโพเชียลหรือเจริญทางด้านข้าง และมีความแตกต่างกันทั้งในด้านรูปร่างลักษณะของทรงต้น ลำลูกกล้วย ใบ ดอก ตลอดจนสีของดอก (อบพันธ์, 2543)

เนื่องจากกล้วยไม้ไทยสกุลหวายที่พบในปัจจุบันมีความหลากหลายในลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งระหว่างหมู่และภายในหมู่เดียวกัน เทคนิค RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏ (นพพร, 2543) จึงถูกนำมาใช้เพื่อหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรม และแสดงระดับความสัมพันธ์หรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายแต่ละชนิด ซึ่งข้อมูลการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอนี้ สามารถนำไปวิเคราะห์เพื่อหาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย เพื่อนำไปสนับสนุนงานด้านอนุกรมวิธานในการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายได้ (จุลภาค, 2543)

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเตรียมดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้วยไม้สกุลหวายของไทย 12 ชนิด จาก 3 หมู่ ได้แก่ หมู่ *Callista*; *Den. chrysotoxum* (D026) และ *Den. lindleyi* (D122), หมู่ *Dendrobium*; *Den. crystallinum* (D044), *Den. findlayanum* (D030), *Den. nobile* (D031), *Den. parishii* (D040) และ *Den. unicum* (D015) และ หมู่ *Formosae*; *Den. cruentum* (D121), *Den. draconis* (D022), *Den. formosum* (D074), *Den. infundibulum* (D034) และ *Den. scabrilingue* (D012) โดยวิธีของ Doyle and Doyle (1990) ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของเจล 1.0 % ใน 1x TBE buffer และเปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยนำมาเจือจางใน TE buffer ให้ได้ความเข้มข้น 5 ng/μl ซึ่งเป็นปริมาณที่เหมาะสมกับการทำปฏิกิริยา PCR

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR

เตรียม reaction mixture ปริมาตร 20 μl ซึ่งประกอบด้วย 1x PCR buffer (20mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 50% Glycerol), 1.5 mM MgCl₂, 100 μM dNTPs (dCTP, dGTP, dTTP, dATP), 0.8 unit *Taq* DNA polymerase, 100 ng primer, 5 ng DNA template และน้ำกลั่น โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์

10 หมายเลข คือ OPD01-09 และ OPAK04 เข้าสู่ จับ จากนั้น นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Chen *et al.* (1998) ที่มีเงื่อนไขของปฏิกิริยา ดังนี้ อุณหภูมิ 94 °C 60 วินาที, 36 °C 10 วินาที, 72 °C 10 วินาที จำนวน 2 รอบ และ อุณหภูมิ 94 °C 60 วินาที, 42 °C 45 วินาที, 72 °C 70 วินาที จำนวน 30 รอบ แล้วเก็บผลผลิต PCR ไว้ที่ อุณหภูมิ 4 °C

3. การตรวจสอบผลผลิต PCR

ตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของเจล 1.8 % ใน 1x TBE buffer ผสมผลผลิต PCR กับ 1x loading buffer แล้วบรรจุลงในช่องเจล ก่อนนำไปเคลื่อนที่ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ จากนั้นย้อมเจลด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.1 µg/ml นาน 20 นาที ก่อนนำไปตรวจสอบผลบน UV Transilluminator พร้อมบันทึกภาพโดยใช้ Gel Documentation โปรแกรม Gene Snap

4. การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการตรวจดูจำนวน แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ตำแหน่งการปรากฏและไม่ปรากฏแถบในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ไทย สกุลหวายแต่ละชนิดที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Gene Tools จากนั้น นำมาประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในหมู่เดียวกันและข้ามหมู่ โดยวิเคราะห์การจัดกลุ่มแบบ cluster analysis ด้วย UPGMA (Unweighted Pair - Group

Method Using Arithmetic Average) ของ Dice จาก โปรแกรม Gene Directory

ผลการทดลอง

จากการใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 10 หมายเลข เข้าสู่จับกับดีเอ็นเอต้นแบบของกล้วยไม้สกุลหวายของไทย 12 ชนิด จาก 3 หมู่ พบว่า มีไพรเมอร์ 2 หมายเลข ได้แก่ OPAK04 และ OPD03 ที่สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ทั้ง 12 ชนิดได้ ส่วนไพรเมอร์อีก 8 หมายเลข คือ OPD01, 02 และ 04-09 ไม่สามารถสังเคราะห์ แถบดีเอ็นเอในกล้วยไม้ที่ใช้ในการศึกษาได้

ไพรเมอร์ OPAK04 สามารถสังเคราะห์ แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 5 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความแตกต่างกัน (monomorphic band) จำนวน 2 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic band) จำนวน 3 แถบ คือ แถบ a และ b ที่พบในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ D044 และ แถบ c ที่พบในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ D034 สำหรับในกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ พบว่า มีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 1)

สำหรับไพรเมอร์ OPD03 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 59 แถบ ที่เป็น polymorphic band ทั้งหมด (ภาพที่ 2) เมื่อนำข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ทั้ง 12 ชนิดที่ได้จากไพรเมอร์หมายเลขนี้ มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยวิธี cluster analysis พบว่า ไม่สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้ไทยสกุลหวายทั้ง 12 ชนิดออกตามหมู่ที่จัดไว้ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ (ภาพที่ 3)

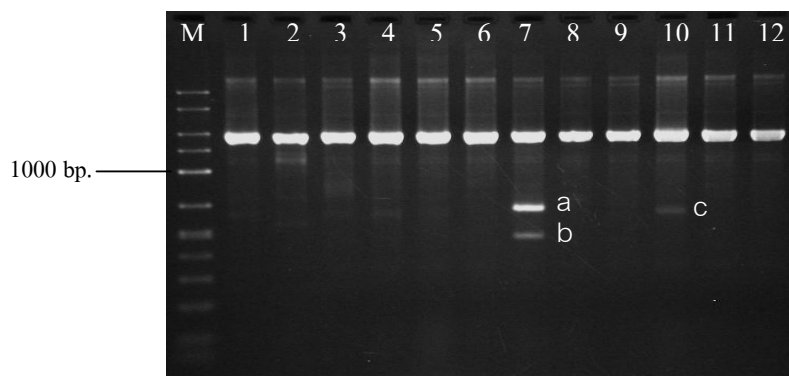


Figure 1 DNA fingerprinting generated by arbitrary primer OPAK04 of 12

Dendrobium species :

1 = *Den. chrysotoxum*, 2 = *Den. lindleyi*, 3 = *Den. unicum*, 4 = *Den. findlayanum*, 5 = *Den. nobile*, 6 = *Den. parishii*, 7 = *Den. crystallinum*, 8 = *Den. scabrilingue*, 9 = *Den. draconis*, 10 = *Den. infundibulum*, 11 = *Den. formosum*, 12 = *Den. cruentum* and M = marker. Polymorphic bands, a, b and c, indicated difference of genetic variation of *Den. infundibulum* (lane 10) and *Den. crystallinum* (lane 7) from other species.

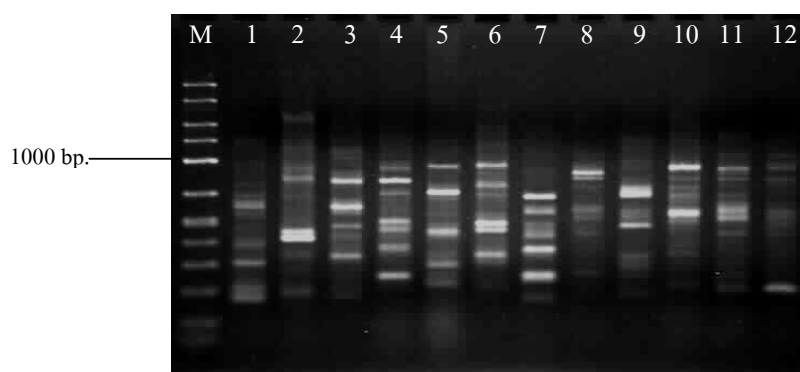


Figure 2 DNA fingerprinting generated by arbitrary primer OPD03 of 12

Dendrobium species :

1 = *Den. chrysotoxum*, 2 = *Den. lindleyi*, 3 = *Den. unicum*, 4 = *Den. findlayanum*, 5 = *Den. nobile*, 6 = *Den. parishii*, 7 = *Den. crystallinum*, 8 = *Den. scabrilingue*, 9 = *Den. draconis*, 10 = *Den. infundibulum*, 11 = *Den. formosum*, 12 = *Den. cruentum* and M; marker. Numerous polymorphic bands indicated genetic variation among *Dendrobium* species.

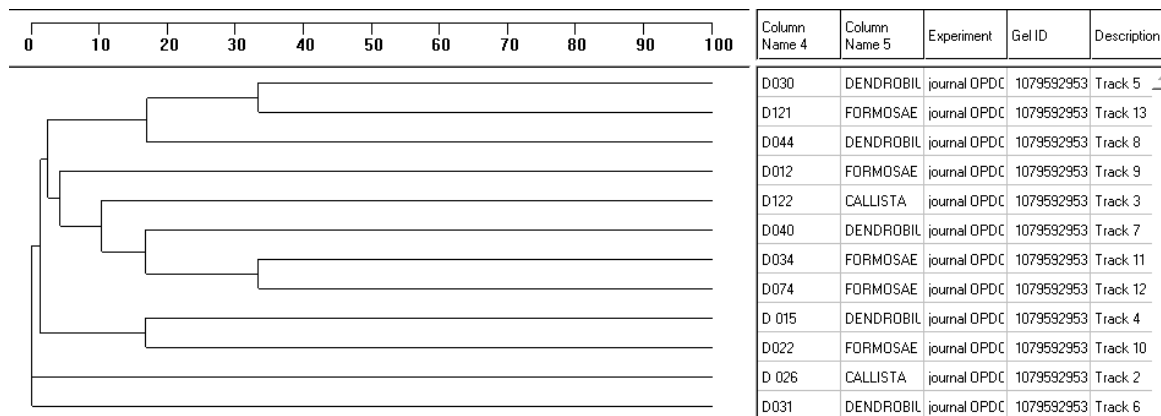


Figure 3 Dendrogram of 12 Thai *Dendrobium* orchid species resulting from a UPGMA cluster analysis based on genetic distances obtained from the arbitrary primer OPD03.

วิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลหวายของไทย 12 ชนิด จาก 3 หมู่ จากการใช้ไพรเมอร์ 10 หมายเลข พบว่ามีไพรเมอร์ 2 หมายเลข ได้แก่ OPAK04 และ OPD03 ที่สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ทั้ง 12 ชนิดได้ ส่วนไพรเมอร์อีก 8 หมายเลข คือ OPD01, 02 และ 04-09 ไม่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอในกล้วยไม้ที่ใช้ในการศึกษาได้ ซึ่งให้ผลแตกต่างไปจากการศึกษาของ Sharifani and Jackson (2000) ที่พบว่า ไพรเมอร์ OPD01 และ 02 สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันในสาย 7 สายพันธุ์ได้ แต่ไม่ปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอเมื่อใช้ไพรเมอร์ OPD03 เข้าสู่จิบ ในไพรเมอร์ OPAK04 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 5 แถบ เป็น monomorphic band จำนวน 2 แถบ และเป็น polymorphic band จำนวน 3 แถบ ซึ่งแถบ a และ b ที่พบใน ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ D044 และแถบ c ที่พบในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ D034 เป็น

polymorphic band ที่แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด ในขณะที่กล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ ไม่ปรากฏความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งผลดังกล่าวไม่สอดคล้องกับงานทดลองของ Ranamukhaarachchi *et al.* (2001) ที่พบว่า ไพรเมอร์ OPAK04 นี้ สามารถสังเคราะห์ polymorphic band ได้จำนวน 9 แถบ ที่แสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมในหน้าวัวลูกผสม 9 สายพันธุ์ได้

สำหรับไพรเมอร์ OPD03 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 59 แถบ ที่เป็น polymorphic band ทั้งหมดแสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายของไทยทั้ง 12 ชนิดตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้แต่ละต้นที่มีความแตกต่างกัน (พรพันธุ์, 2538) แต่จากการนำข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ที่ได้จากไพรเมอร์หมายเลขนี้ มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยวิธี cluster analysis พบว่า ที่ระดับความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรม 90 % สามารถจัดกลุ่ม

กล้วยไม้ไทยสกุลหวายออกได้ 7 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *Den. findlayanum*, *Den. cruentum* และ *Den. crystallinum* กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *Den. scabrilingue* กลุ่มที่ 3 ได้แก่ *Den. lindleyi* กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย *Den. parishii*, *Den. infundibulum* และ *Den. formosum* กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย *Den. unicum* และ *Den. draconis* กลุ่มที่ 6 ได้แก่ *Den. chrysotoxum* และ กลุ่มที่ 7 ได้แก่ *Den. nobile* ซึ่งการจัดกลุ่มที่ได้นี้ไม่เป็นไปตามที่ Seidenfaden and Smitinand (1960) ได้จำแนกกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 12 ชนิดนี้ออกเป็น 3 หมู่ ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้จำนวนกลุ่มและหมายเลขของไพรเมอร์น้อย ซึ่งอาจไม่ใช่กลุ่มของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย ข้อมูลที่ได้จากการปรากฏของแถบดีเอ็นเอจึงยังไม่เพียงพอในการจำแนกและจัดกลุ่มกล้วยไม้สกุลหวายของไทยให้สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ จึงควรทดลองใช้ไพรเมอร์ในกลุ่มอื่นในการศึกษาจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอในครั้งต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การจำแนกพันธุกรรมกล้วยไม้ไทยสกุลหวาย 12 ชนิด จาก 3 หมู่ โดยเทคนิค RAPD จากการใช้ไพรเมอร์ 10 หมายเลข เข้าสู่ัมกับดีเอ็นเอต้นแบบ พบว่า มีไพรเมอร์ 2 หมายเลข คือ OPAK04 และ OPD03 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอในกล้วยไม้ไทยสกุลหวายทั้ง 12 ชนิดได้ โดยไพรเมอร์ OPAK04 แสดง polymorphic band จำนวน 3 แถบที่บ่งชี้ถึงลักษณะทางพันธุกรรมของ D034 และ D044 ที่แตกต่างไปจากกล้วยไม้สกุลหวายอีก 10 ชนิด ส่วนไพรเมอร์ OPD03 แสดง polymorphic band

จำนวน 59 แถบ และเมื่อนำข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPD03 ไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกล้วยไม้ไทยสกุลหวายทั้ง 12 ชนิด ด้วยวิธี cluster analysis พบว่าไม่สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้เหล่านี้ออกตามหมู่ที่จัดแบ่งโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้

เอกสารอ้างอิง

- จุลภาค คูนวงศ์. 2543. ความจำเป็นของลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับการจดทะเบียนพันธุ์พืช. วารสารเคหการเกษตร 24(5) : 174-176.
- นพพร สายัมพล. 2543. เทคนิคการปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชไร่ นา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 261 น.
- พรพันธ์ ภู่อ้อมพันธุ์. 2538. เทคนิคการจำแนกพันธุ์พืชด้วยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). เอกสารประกอบการอบรมทางวิชาการ เรื่อง การตรวจแยกพันธุ์พืชด้วยการใช้เทคนิค Isozyme Pattern และ RAPD ณ ฝ่ายปฏิบัติงานวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งชาติ มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 10 น.
- สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง. 2543. การประยุกต์ใช้ DNA เทคโนโลยีในประเทศไทย ใน เอกสารประกอบสัมมนาวิชาการปรับปรุงพันธุ์ และขยายพันธุ์พืช ครั้งที่ 13 : เทคโนโลยีใหม่-พันธุ์พืชใหม่ น. 90-93. สมาคมปรับปรุงพันธุ์ และขยายพันธุ์พืชแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ.

- อบจันท์ ไทยทอง. 2543. *กล้วยไม้เมืองไทย*. หน่วยปฏิบัติการวิจัยพรรณไม้ประเทศไทย ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 166 น.
- Baker, L. M. and C. O. Baker. 1996. *Orchid Species Culture Dendrobium*. Timber Press, Portland, Oregon. 852 p.
- Chen, W. H., T. M. Chen., Y. M. Fu, R. M. Hsieh and W. S. Chen. 1998. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. Plant Cell Reports 18: 7-13.
- Doyle, L. J. and J. J. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-14.
- Ranamukhaarachchi, D. G., R. J. Henny, C. L. Guy and Q. B. Li. 2001. DNA fingerprinting to identify nine *Anthurium* pot plant cultivars and examine their relationship. HortScience 36: 758-760.
- Seidenfaden, G. and T. Smitinand. 1960. *The Orchids of Thailand. Part 2*. The Siam Society, Bangkok. 184 p.
- Sharifani, M. M. and J. F. Jackson. 2000. Characterization of pear species and cultivars using RAPD primers. Acta Horticulturae 538: 499-504.
-