

การวิเคราะห์พันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีแดงสิงขร

Genetic Analysis of *Paphiopedilum myanmaricum*

วิชรุจน์ ทองคำ ญัฐา โพธาภรณ์ จันทลักษณ์ ทิยาชน และ วีณัน บัณฑิตย์
Wicharuj Tongkham, Nuttha Potapohn, Chantalak Tiyaon and Weenun Bundithya*

ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200
Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: weenun.b@cmu.ac.th

(Received: 2 February 2020; Accepted: 24 February 2020)

Abstract: *Paphiopedilum myanmaricum* is a new species in subgenus *Brachypetalum* recently discovered in 2017. Leaf and flower characters are very similar to *Paphiopedilum josianae*. This research applied RAPD (random amplified polymorphic DNA) technique to compare *P. myanmaricum* with 10 other species in the same subgenus. Thirty RAPD primers were screened, 7 of which were able to amplify clear polymorphic bands with sizes ranging from 180 to 2000 bp. Similarity coefficients were calculated and dendrogram was constructed by UPGMA using NTSYS (version 2.2). The results showed that 11 *Paphiopedilum* species in subgenus *Brachypetalum* could be divided into 2 clusters of 4 subgroups with similarity coefficients ranging from 0.400 to 0.850. Genetic variation was in accordance with flower characteristics of each species. Some common flower characters, however, could be identified within each subgroup. Dendrogram analysis revealed close relationship between *Paphiopedilum concolor* and *P. concolor* var. *hennisianum* with the highest similarity coefficients of 0.850 and between *P. myanmaricum* and *P. josianae* with similarity coefficients of 0.663. The RAPD results enable genetic assessment of *P. myanmaricum* among other species in subgenus *Brachypetalum*. Chromosome study of *P. myanmaricum* by Feulgen squash method indicated a chromosome number $2n = 26$. This information can be applied for plant identification and breeding program.

Keywords: Subgenus *Brachypetalum*, genetic analysis, RAPD technique, chromosome number

บทคัดย่อ: กล้วยไม้รองเท้านารีแดงสิงขรจัดเป็นรองเท้านารีสายพันธุ์ใหม่ในสกุลย่อย *Brachypetalum* ที่ค้นพบในปี พ.ศ. 2560 ลักษณะใบและดอกมีความใกล้เคียงกับรองเท้านารีเหลืองสิงขร งานวิจัยนี้ใช้เทคนิคอาร์เอฟดี (random amplified polymorphic DNA) เพื่อเปรียบเทียบรองเท้านารีแดงสิงขรกับรองเท้านารีอีก 10 สายพันธุ์ในสกุลย่อยเดียวกัน เมื่อคัดกรองไพรเมอร์ 30 ไพรเมอร์ พบว่า 7 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและมีรูปแบบต่างกัน ขนาด 180 - 2000 คู่เบส การคำนวณค่าดัชนีความเหมือนด้วยโปรแกรม NTSYS (เวอร์ชัน 2.2) โดยวิธีจัดกลุ่ม UPGMA พบว่า สามารถจัดกลุ่มรองเท้านารี 11 สายพันธุ์ในสกุลย่อย *Brachypetalum* ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ 4 กลุ่มย่อย โดยมีค่าดัชนีความเหมือน 0.400 - 0.850 ความต่างทางพันธุกรรมมีความสอดคล้องกับลักษณะเฉพาะของดอกในแต่ละสายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม ดอกภายในกลุ่มย่อยมีลักษณะทั่วไปบางประการร่วมกัน จากแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่า รองเท้านารีเหลืองปราจีนและรองเท้านารีเหลืองอุดรมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.850 ส่วนรองเท้านารีแดงสิงขรและรองเท้านารีเหลืองสิงขรมีค่าดัชนีความเหมือน 0.663 ดังนั้น การใช้เทคนิคอาร์เอฟดีสามารถประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรองเท้านารีแดงสิงขรกับรองเท้านารีสายพันธุ์อื่นในสกุลย่อย *Brachypetalum* ได้ การศึกษาโครโมโซมของรองเท้านารีแดงสิงขรด้วยวิธี Feulgen squash พบว่า มีจำนวนโครโมโซม $2n = 26$ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการวางแผนการจัดจำแนกพืชและการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้

คำสำคัญ: สกุลย่อยบราคีเพทาลัม การวิเคราะห์พันธุกรรม เทคนิคอาร์เอฟดี จำนวนโครโมโซม

คำนำ

กล้วยไม้รองเท้านารีหรือ “lady slipper” เป็นกล้วยไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนและเขตหนาวของโลก จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae ปัจจุบันพบ 5 สกุล คือ *Cypripedium*, *Maxipedium*, *Paphiopedilum*, *Phragmipedium* และ *Selenipedium* (Cribb, 1998) ซึ่งกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* พบในเขตร้อนของทวีปเอเชีย ประกอบด้วย 90 สายพันธุ์และอีก 17 สายพันธุ์เป็นลูกผสมตามธรรมชาติ (Renz, 2011) รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ที่หายาก และมีความสวยงามทั้งในด้านรูปทรงและสีสันดอกที่หลากหลายและอายุการบานของดอกที่ยาวนาน 1 ถึง 2 เดือน ลักษณะเฉพาะของกล้วยไม้รองเท้านารีคือกลีบปากได้เปลี่ยนรูปเป็นถุงห้อยคล้ายหัวรองเท้า จึงทำให้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ที่ได้รับความนิยมในกลุ่มนักเลี้ยงและนักสะสมกล้วยไม้จากทั่วโลก (Koopowitz, 2008) บริเวณเทือกเขาหิมาลัยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้แถบประเทศไทย เมียนมาร์ ลาว และเวียดนาม เป็นถิ่นกำเนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีหลายสายพันธุ์ โดยเฉพาะสกุลย่อย *Brachypetalum* ซึ่งมีลักษณะหน้าใบลายแบบลายหินอ่อนสีเขียวเข้มสลับเขียวเทาและใต้ใบมีจุดสีม่วง

ขึ้นหนาแน่น ก้านช่อดอกค่อนข้างสั้น สามารถออกดอกได้ 1 - 2 ดอกในหนึ่งก้านช่อ ดอกขนาดกลาง สีขาว สีดุครีม ไปจนถึงสีเหลืองเข้ม และมักมีจุดประสีม่วงกระจายบนกลีบดอก กลีบปากรูปทรงรีขอบกลีบบนพับม้วนเข้าสตามิโนด (staminode) รูปทรงไข่ หรือรูปทรงคล้ายหัวใจขนาดเล็ก (Cribb, 1998) รองเท้านารีในสกุลย่อย *Brachypetalum* ในประเทศไทยพบได้ 9 สายพันธุ์ คือ รองเท้านารีฝ้ายหอย (*Paphiopedilum bellatulum*) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor*) รองเท้านารีเหลืองอุดร (*Paphiopedilum concolor* var. *hennisianum*) รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (*Paphiopedilum concolor* var. *striatum*) รองเท้านารีเหลืองตรัง (*Paphiopedilum leucochilum*) รองเท้านารีขาวชุมพร (*Paphiopedilum godeforyae*) รองเท้านารีช่ออ่างทอง (*Paphiopedilum x ang - thong*) รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum*) และรองเท้านารีขาวพังงา (*Paphiopedilum thaianum*)

ในปี ค.ศ. 2017 Koopowitz *et al.* ค้นพบรองเท้านารีสายพันธุ์ใหม่ในสกุลย่อย *Brachypetalum* และตั้งชื่อว่า *Paphiopedilum myanmaricum* Koopowitz, lamwir. & Laohap. 2017 ซึ่งมีชื่อไทยว่า “รองเท้านารีแดงสิงขร” โดยถิ่นกำเนิดของรองเท้านารีสายพันธุ์นี้

พบได้ที่เทือกเขาหินปูนทางตอนใต้ของเมียนมาร์ โดยจะเกาะอาศัยอยู่ตามหน้าผาหรือชอกผาหินปูน ใบมีลักษณะเป็นรูปแถบขอบขนาน หน้าใบลายแบบลายหินอ่อนสีเขียวเข้มสลับเขียวเทาและใต้ใบมีจุดสีม่วงขึ้นหนาแน่น ก้านช่อดอกสั้นโค้งอ่อนลงและมีขนสั้นสีขาวขึ้นปกคลุมโดยทั่ว ดอกมีขนาดใหญ่เมื่อบานเต็มที่ขนาด 6.8 - 8 เซนติเมตร ดอกมีสีเหลืองอ่อนถึงเหลือง และมีลายเส้นสีม่วงแดงกระจายเรียงตัวค่อนข้างเป็นแนวยาวตามกลีบดอกและกลีบเลี้ยง กลีบปากเป็นรูปไข่ ขอบกลีบปากด้านบนพับกลับเข้าและมีจุดสีม่วงแดงกระจายทั่วทั้งกลีบปาก สดามีโนดเป็นรูปทรงคล้ายหัวใจปลายแหลมมีจุดสีม่วงแดงขนาดเล็กกระจายค่อนข้างหนาแน่น ช่วงปลายล่างมีขนสีขาวบริเวณขอบด้านบนและมีจุดสีเหลืองอมเขียวอยู่ตรงกลาง (Koopowitz *et al.*, 2017) ซึ่งรองเท้านารีแดงสิงขรมีลักษณะดอกและใบค่อนข้างคล้ายกับรองเท้านารีเหลืองสิงขร (*P. josianae*) การจำแนกรองเท้านารีสองสายพันธุ์นี้ด้วยลักษณะใบเพียงอย่างเดียวไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้จึงประยุกต์เทคนิคอาร์เอฟดีเพื่อวิเคราะห์พันธุกรรมรองเท้านารีแดงสิงขร รองเท้านารีเหลืองสิงขร และรองเท้านารีอีก 9 สายพันธุ์ในสกุลย่อย *Brachypetalum* และศึกษาจำนวนโครโมโซมของรองเท้านารีแดงสิงขรซึ่งเป็นรองเท้านารีสายพันธุ์ใหม่ล่าสุดในสกุลย่อยนี้ ซึ่งข้อมูลทั้งหมดที่ได้สามารถนำไปใช้ในการวางแผนการจัดจำแนกพืชและการปรับปรุงพันธุ์ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* ที่ใช้ในการศึกษา

กล้วยไม้รองเท้านารีสกุลย่อย *Brachypetalum* 11 สายพันธุ์ได้แก่ รองเท้านารีฟลาหอย (*P. bellatulum*) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*P. concolor*) รองเท้านารีเหลืองอุดร (*P. concolor* var. *hennisianum*) รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (*P. concolor* var. *striatum*) รองเท้านารีเหลืองตรัง (*P. leucochilum*) รองเท้านารีเหลืองสิงขร (*P. josianae*) รองเท้านารีแดงสิงขร (*P. myanmaricum*) รองเท้านารีขาวทุมพร (*P. godeforyae*) รองเท้านารี

ช่องอ่างทอง (*P. x ang - thong*) รองเท้านารีขาวสตูล (*P. niveum*) และรองเท้านารีขาวพังงา (*P. thianum*) (Figure 1)

การสกัดและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ใช้ใบอ่อนของรองเท้านารีเพื่อสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ CTAB จาก Doyle and Doyle (1990) และ Duangkhet *et al.* (2014) และคัดกรองไพรเมอร์อาร์เอฟดี 30 ไพรเมอร์ คือ OPA01, OPA02, OPA03, OPA04, OPA05, OPA06, OPA07, OPA08, OPA09, OPA10, OPF01, OPF02, OPF03, OPF06, OPF07, OPF08, OPF09, OPF11, OPF12, OPF13, OPN02, OPN04, OPN05, OPN06, OPN07, OPN08, OPN10, OPN14, OPN16 และ OPN18

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 20 ng ไพรเมอร์ 100 ng PCR master mix (SOLIS BIODYNE) 4 µl และ dH₂O 14 µl ปริมาตรรวม 20 µl ปฏิกริยามี 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 4 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที 37 °C นาน 1 นาที 72 °C นาน 2 นาที รวม 44 รอบ ขั้นตอนที่ 3 บ่มที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 10 นาที โดยใช้วิธีของ Taywiya *et al.* (2008) จากนั้นตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.8 %

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

บันทึกข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรองเท้านารี ในสกุลย่อย *Brachypetalum* ทั้ง 11 สายพันธุ์ที่ได้จากเทคนิคอาร์เอฟดี คำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) และวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic average) ด้วยโปรแกรม NTSYS - pc version 2.2

การศึกษาจำนวนโครโมโซมของรองเท้านารีแดงสิงขร

การปลูกเลี้ยงรองเท้านารีแดงสิงขรในเครื่องปลูกที่มีส่วนผสมของหินภูเขาไฟ ไฮโดรตอน เปลือกสน และกาบมะพร้าวสับขนาดเล็ก อัตราส่วน 1 : 1 : 1 : 1 ให้น้ำสูตรเสมอ 20 - 20 - 20 และให้

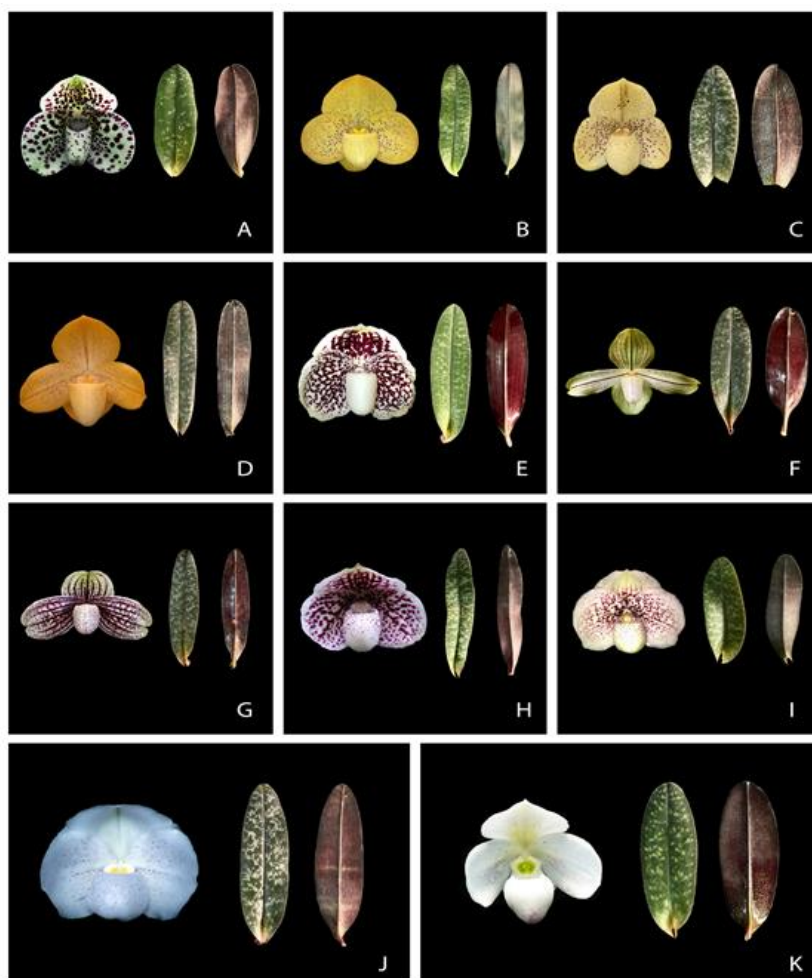


Figure 1. Flower and leaf characters of 11 *Paphiopedilum* species (subgenus *Brachypetalum*) in this study.

A) *P. bellatulum*, B) *P. concolor*, C) *P. concolor* var. *hennisianum*, D) *P. concolor* var. *striatum*, E) *P. leucochilum*, F) *P. josianae*, G) *P. myanmaricum*, H) *P. godeforyae*, I) *P. x ang - thong*, J) *P. niveum* and K) *P. thianum*

สารละลาย NAA เพื่อเร่งรากสัปดาห์ละหนึ่งครั้ง ใช้มีดผ่าตัด ตัดปลายรากใหม่ความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ในช่วงเช้าเวลา 9:00 - 10:00 น. ศึกษาจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ปลายรากโดยใช้เทคนิค Feulgen squash และตามวิธีของ Sanpote (2009) และ Gómiak *et al.* (2014) โดยนับจำนวนโครโมโซมจากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 20 เซลล์ ถ่ายภาพโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 X

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพโรเมอร์อาร์เอฟที

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีสกุลย่อย *Brachypetalum* ทั้ง 11 สายพันธุ์ ใช้ไพโรเมอร์จำนวน 30 ไพโรเมอร์ พบว่ามีไพโรเมอร์ 15 ไพโรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณจำนวนแถบดีเอ็นเอได้ คิดเป็น 50 % เมื่อคัดเลือกไพโรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและชัดเจน (Figure 2) มี 7 ไพโรเมอร์ให้

แถบรวม 80 แถบ ขนาดประมาณ 180 ถึง 2,000 คู่เบส เป็น monomorphic band 1 แถบ (1.25 %) และ polymorphic band 79 แถบ (98.75 %) โพรเมออร์ที่

ให้เฉพาะ polymorphic band จำนวน 6 โพรเมออร์ ได้แก่ OPA10, OPF06, OPN04, OPN05, OPN10 และ OPN16 (Table 1)

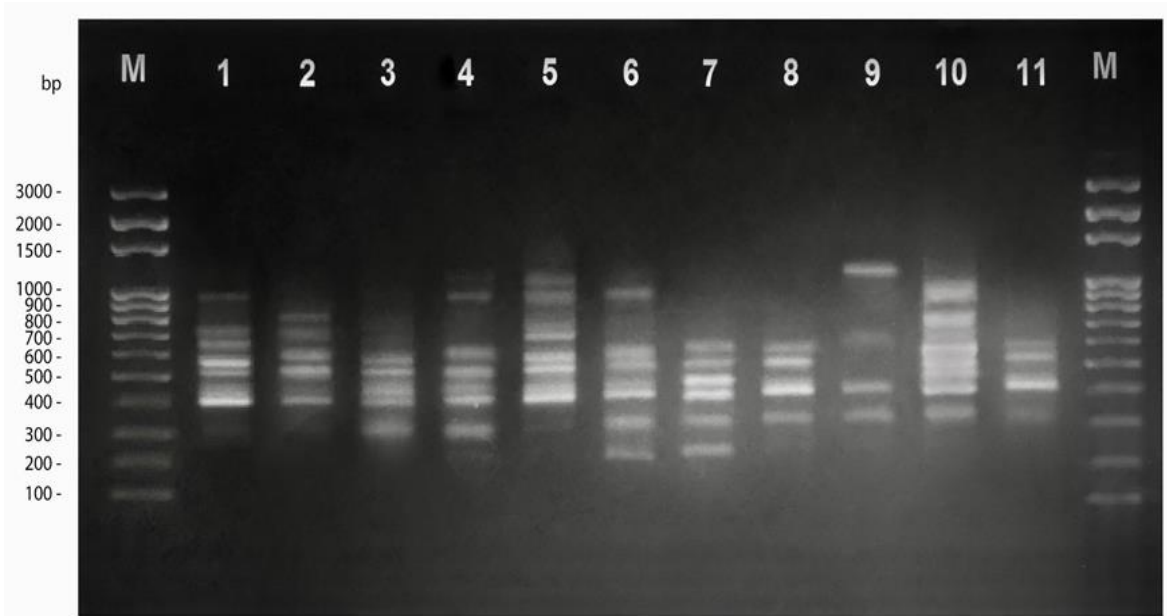


Figure 2. Genomic DNA fingerprint of 11 *Paphiopedilum* species generated by RAPD - PCR using OPN04 primer. 1) *P. bellatulum*, 2) *P. josianae*, 3) *P. myanmaricum*, 4) *P. concolor*, 5) *P. concolor* var. *striatum*, 6) *P. concolor* var. *hennisianum*, 7) *P. leucochilum*, 8) *P. godeforyae*, 9) *P. x ang - thong*, 10) *P. niveum* and 11) *P. thaianum*

Table 1. Nucleotide sequence of each primer, number of total bands, number of polymorphic bands and number of monomorphic bands of 11 *Paphiopedilum* species

Primer	Nucleotide Sequence 5' → 3'	Total bands	Polymorphic bands	Monomorphic bands	Polymorphism (%)
OPA02	TGCCGAGCTG	7	6	1	85.71
OPA10	GTGATCGCAG	13	13	0	100
OPF06	GGGAATTCGG	14	14	0	100
OPN04	GACCGACCCA	9	9	0	100
OPN05	ACTGAACGCC	13	13	0	100
OPN10	ACAACGGGG	8	8	0	100
OPN16	AAGCGACCTG	16	16	0	100
Total		80	79	1	-
Average		11.43	11.28	0.15	97.96

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีในสกุลย่อย *Brachypetalum*

เมื่อใช้ข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดี 7 ไพรเมอร์ สามารถคำนวณดัชนีความเหมือน ระหว่างตัวอย่าง โดย *P. concolor* และ *P. niveum* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมน้อยที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.400 และ *P. concolor* และ *P. concolor* var. *hennisianum* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.850 (Table 2) สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานของ *P. concolor* ที่มีลักษณะดอกสีเหลืองมีจุดสีม่วงกระจายบนกลีบดอก ก้านช่อดอกสั้น ซึ่งต่างมากกับ *P. niveum* ที่มีลักษณะดอกสีขาวมีจุดสีม่วงขนาดเล็กกระจายเล็กน้อยบนกลีบดอก ก้านช่อดอกค่อนข้างยาว ในทางกลับกัน *P. concolor* และ *P. concolor* var. *hennisianum* มีลักษณะดอกที่เหมือนกันมาก ดอกมีสีเหลืองมีจุดสีม่วงกระจายบนกลีบดอก ก้านช่อดอกสั้น แต่มีความต่างกันที่ลักษณะใบและแหล่งกำเนิด โดยที่ได้ใบของ *P. concolor* มีจุดสีม่วงกระจายไม่หนาแน่น มีแหล่งกำเนิดอยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของไทยเรื่อยเข้าไปทางภาคตะวันออก และในประเทศกัมพูชา แต่ *P. concolor* var. *hennisianum* ได้ใบมีจุดสีม่วงกระจายหนาแน่น มีแหล่งกำเนิดอยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบนของไทยเรื่อยเข้าไปจนถึงประเทศลาว (Cribb, 1998)

เมื่อวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่า รองเท้านารีในสกุลย่อย *Brachypetalum* ทั้ง 11 สายพันธุ์ สามารถจัดเป็น 2 กลุ่มใหญ่เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความเหมือนที่ 0.560 ซึ่งรองเท้านารีทุกสายพันธุ์ในสองกลุ่มใหญ่มีลักษณะหน้าใบคล้ายคลึงกัน หินอ่อนสีเขียวเข้มสลับเขียวเทาคล้ายคลึงกัน แต่ลักษณะทางสัณฐานของดอกในแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกัน กลุ่มใหญ่กลุ่มที่ 1 สามารถแบ่งออกได้เป็นอีก 2 กลุ่มย่อยเมื่อพิจารณาค่าดัชนีความเหมือนที่ 0.588 โดยสมาชิกในกลุ่ม 1.1 ประกอบด้วย *P. bellatulum* *P. niveum* และ *P. thaianum* สมาชิกในกลุ่มที่ 1.2 ประกอบด้วย *P. josianae* และ *P. concolor* var. *striatum* กลุ่มใหญ่กลุ่มที่ 2 สามารถ

แบ่งออกได้เป็นอีก 2 กลุ่มย่อยเมื่อพิจารณาค่าดัชนีความเหมือนที่ 0.634 โดยสมาชิกในกลุ่มที่ 2.1 ประกอบด้วย *P. myanmaricum* *P. leucochilum* *P. godeforyae* และ *P. x ang - thong* สมาชิกในกลุ่มที่ 2.2 ประกอบด้วย *P. concolor* และ *P. concolor* var. *hennisianum* (Figure 3)

เมื่อพิจารณาสมาชิกกลุ่ม 1.1 *P. niveum* และ *P. thaianum* ดอกมีสีขาวและมีจุดสีม่วงกระจายเล็กน้อยบนกลีบดอกเหมือนกัน ต่างกันที่ขนาดดอก โดยเฉลี่ยของ *P. thaianum* มีขนาดเล็กกว่า *P. niveum* และสัณฐานของดอกมีความต่างสำคัญที่สตามิโนด โดย *P. thaianum* มีลักษณะเป็นแผ่นแบนรูปรีคล้ายหัวใจและมีเส้นร่างแหสีเขียวอ่อนอยู่ตรงกลาง ต่างจาก *P. niveum* ที่มีลักษณะเป็นแผ่นแบนรูปรีและมีจุดสีเหลืองอยู่ตรงกลาง (Iamwiriyaikul, 2006) เมื่อพิจารณาสมาชิกกลุ่ม 1.2 *P. josianae* และ *P. concolor* var. *striatum* ลักษณะดอกของ *P. concolor* var. *striatum* ที่กลีบเลี้ยงบนและกลีบดอกค่อนข้างแคบ รูปทรงดอกกาบพุ่งออกคล้ายกับลักษณะดอกของ *P. josianae* แต่ 2 สายพันธุ์นี้มีลักษณะสตามิโนดต่างกันเล็กน้อย โดยใน *P. josianae* สตามิโนดส่วนบนค่อนข้างโค้งมน มีขนสีขาวขึ้นบริเวณขอบบนและไม่หยักเป็นร่อง ลีกรูปตัววีเหมือนที่พบใน *P. concolor* var. *striatum* (Koopowitz et al., 2018) เมื่อพิจารณาสมาชิกกลุ่ม 2.1 *P. leucochilum*, *P. godeforyae* และ *P. x ang - thong* ทั้ง 3 สายพันธุ์มีลักษณะดอกใกล้เคียงกัน และมีการกระจายพันธุ์ในเขตพื้นที่ใกล้เคียงกันทางภาคใต้ของไทย (Cribb, 1998) สำหรับสมาชิกกลุ่ม 2.2 *P. concolor* และ *P. concolor* var. *hennisianum* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.850 ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานโดยมีลักษณะดอกที่ใกล้เคียงกันมาก แตกต่างกันเฉพาะลักษณะจุดประสีม่วงที่ได้ใบ ซึ่งการจำแนกสายพันธุ์ในกลุ่ม 2.1 และ 2.2 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Thanananta et al. (2017) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุสายพันธุ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุลย่อย *Brachypetalum* ด้วยเครื่องหมาย สก็อต (SCoT)

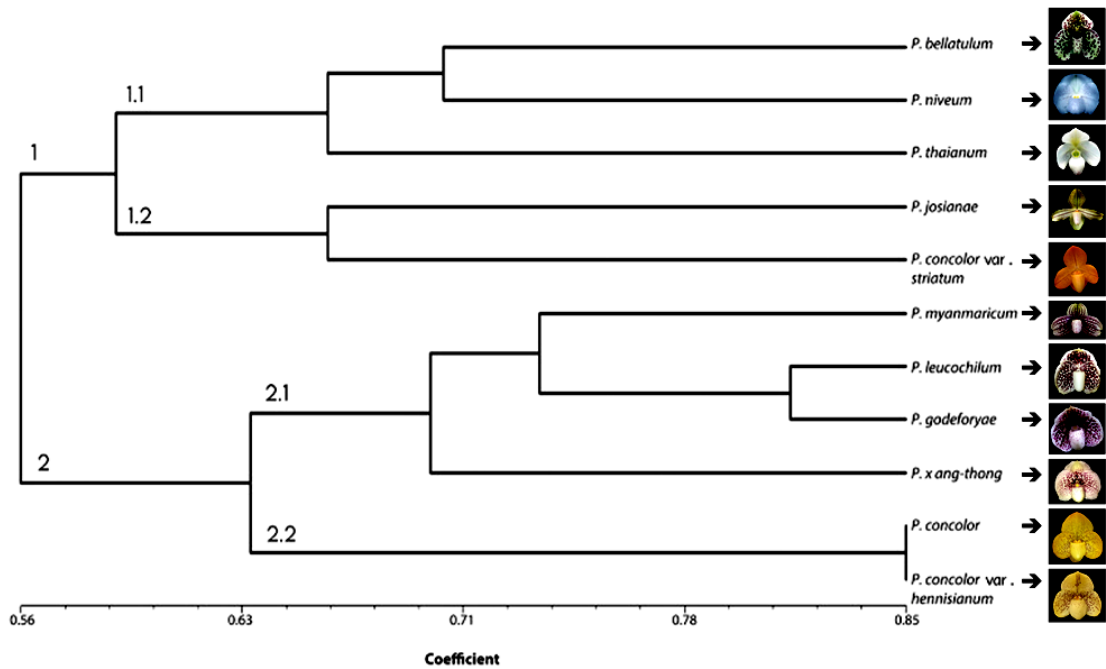


Figure 3. Dendrogram of 11 *Paphiopedilum* species in subgenus *Brachypetalum* by UPGMA

Table 2. Similarity coefficient of 11 *Paphiopedilum* species in subgenus *Brachypetalum*

Species	1)	2)	3)	4)	5)	6)	7)	8)	9)	10)	11)
1)	1.000										
2)	0.675	1.000									
3)	0.613	0.663	1.000								
4)	0.525	0.550	0.688	1.000							
5)	0.588	0.663	0.675	0.638	1.000						
6)	0.525	0.525	0.713	0.850	0.613	1.000					
7)	0.588	0.588	0.675	0.588	0.475	0.688	1.000				
8)	0.625	0.675	0.788	0.600	0.513	0.625	0.813	1.000			
9)	0.538	0.688	0.675	0.588	0.525	0.613	0.650	0.763	1.000		
10)	0.700	0.525	0.438	0.400	0.613	0.425	0.463	0.450	0.513	1.000	
11)	0.700	0.600	0.613	0.550	0.563	0.575	0.638	0.650	0.638	0.6253	1.000

1)= *P. bellatulum*, 2) = *P. josianae*, 3) = *P. myanmaricum*, 4) = *P. concolor*, 5) = *P. concolor* var. *striatum*, 6) = *P. concolor* var. *hennisianum*, 7) = *P. leucochilum*, 8) = *P. godeforyae*, 9) = *P. x ang-thong*, 10) = *P. niveum*, 11) = *P. thianum*

เมื่อพิจารณาระหว่าง *P. josianae* และ *P. myanmaricum* พบว่า มีลักษณะดอกที่ใกล้เคียงกัน ส่วนลักษณะใบเหมือนกันจนไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ เมื่อจำแนกด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี พบว่า รongเท้านารี 2 สายพันธุ์นี้มีค่าดัชนีความเหมือน 0.663 และผลจากแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่า *P. josianae* และ *P. myanmaricum* ถูกแยกต่างกลุ่มอย่างชัดเจน โดยที่ *P. josianae* ถูกจัดให้อยู่กลุ่ม 1.2 ร่วมกับ *P. concolor* var. *striatum* และ *P. myanmaricum* ถูกจัดให้อยู่กลุ่ม 2.1 ร่วมกับ *P. leucochilum*, *P. godeforyae* และ *P. x ang - thong* สอดคล้องกับการศึกษาของ Chung et al. (2006) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* และสกุล *Phragmipedium* โดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดี ซึ่งผลจากการศึกษา พบว่า กล้วยไม้รองเท้านารีทั้งสองสกุลสามารถจำแนกออกจากกันได้อย่างชัดเจนและสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐาน ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคอาร์เอฟดีซึ่งทำได้ไม่ยากมากและสามารถให้ข้อมูล

การจัดจำแนกได้ดีในการจำแนกสายพันธุ์ของรองเท้านารีทั้ง 11 สายพันธุ์ในสกุลย่อย *Brachypetalum* ได้ **จำนวนโครโมโซมของรองเท้านารีแดงสิงขร**

รองเท้านารีแดงสิงขรเป็นรองเท้านารีสายพันธุ์ใหม่ล่าสุดในสกุลย่อย *Brachypetalum* ซึ่งยังไม่มีข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับจำนวนโครโมโซมจากการศึกษาจำนวนโครโมโซมในเซลล์ระยะเมทาเฟสจากเซลล์ปลายรากโดยใช้เทคนิค Feulgen squash พบว่า *P. myanmaricum* มีจำนวนโครโมโซม $2n = 26$ (Figure 4) สอดคล้องกับการรายงานของ Cribb (1998) พบว่ารองเท้านารีทุกสายพันธุ์ในสกุลย่อย *Brachypetalum* มีจำนวนโครโมโซม $2n = 26$ เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Sanpote (2009) ได้ศึกษาจำนวนโครโมโซมของรองเท้านารี *P. bellatulum*, *P. leucochilum*, *P. godeforyae* และ *P. x ang - thong* ในสกุลย่อย *Brachypetalum* พบว่า รองเท้านารีทั้ง 4 สายพันธุ์มีจำนวนโครโมโซม $2n = 26$

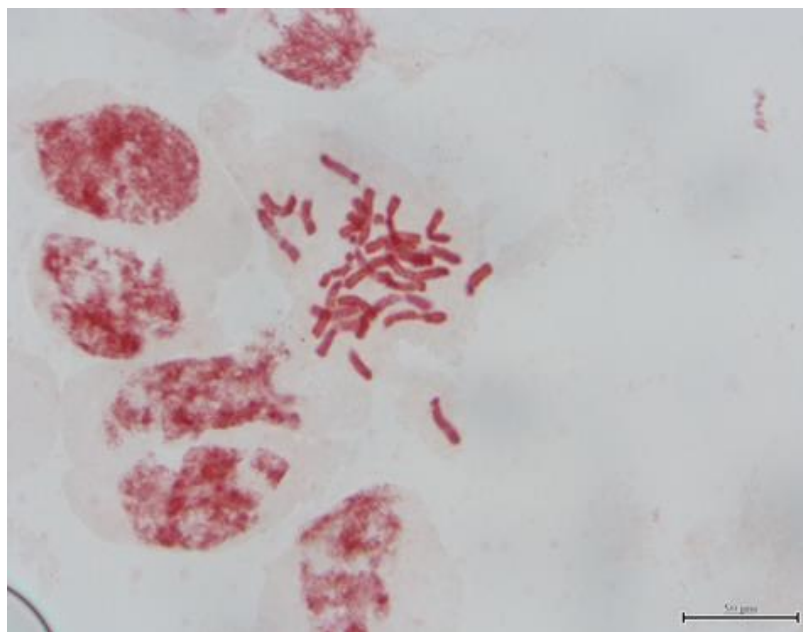


Figure 4. Chromosome number of *Paphiopedilum myanmaricum* $2n = 26$ at 1000 X magnification, scale bar 50 μm

สรุป

การจัดจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีสกุลย่อย *Brachypetalum* 11 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี โดยใช้ไพรเมอร์ 30 ไพรเมอร์ พบว่า มีไพรเมอร์ 7 ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวนมากและให้แถบที่ชัดเจน 80 แถบ มีขนาดประมาณ 180 ถึง 2,000 คู่เบส การวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือนและการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่า สามารถจัดกลุ่มรองเท้านารี 11 สายพันธุ์ ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยมีค่าดัชนีความเหมือน 0.400 - 0.850 จากแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่า การจัดกลุ่มสอดคล้องกับพื้นฐานของดอก โดย *P. concolor* และ *P. concolor* var. *hennisianum* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.850 ส่วน *P. josianae* และ *P. myanmaricum* มีค่าดัชนีความเหมือน 0.663 และถูกแยกให้อยู่ต่างกลุ่มกัน และการศึกษาจำนวนโครโมโซมระยะเมทาเฟสจากปลายรากของ *P. myanmaricum* พบว่า รองเท้านารีสายพันธุ์นี้มีจำนวนโครโมโซม $2n = 26$

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

เอกสารอ้างอิง

- Chung. S.Y., S.H. Choi, M.J. Kim, K.E. Yoon, G.P. Lee, J.S. Lee and K.H. Ryu. 2006. Genetic relationship and differentiation of *Paphiopedilum* and *Phragmipedium* based on RAPD analysis. *Scientia Horticulturae* 109(2): 153-159.
- Cribb, P.J. 1998. The Genus *Paphiopedilum*. 2nd ed. Natural History Publications (Borneo) Sdn. Bhd., Kota Kinabalu, Sabah. 427 p.
- Doyle. J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1): 13-15.
- Duangkhet. M., N. Potapohn and W. Bundithya. 2014. Genetic relationship analysis of dwarf *Doritis pulcherrima* Lindl. by RAPD and ISSR techniques. *Journal of Agriculture* 30(2): 99-109. (in Thai)
- Górniak, M., D.L. Szlachetko, A.K. Kowalkowska, J. Bohdanowicz and C.X. Canh. 2014. Taxonomic placement of *Paphiopedilum canhii* (Cypripedioideae; Orchidaceae) based on cytological, molecular and micromorphological evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 70: 429-441.
- Iamwiriyaikul, P. 2006. *Paphiopedilum thianum*, a new species of *Paphiopedilum* from Thailand. *The Orchid Review* 114(1271): 278-281.
- Koopowitz, H. 2008. Tropical Slipper Orchids: *Paphiopedilum* and *Phragmipedium* Species and Hybrids. Timber Press Ins., Portland, Oregon. 411 p.
- Koopowitz. H., P. Iamwiriyaikul and S. Laohapatcharin. 2017. *Paphiopedilum myanmaricum*, a new species of slipper orchid (Cypripedioideae, Orchidaceae). *Phytotaxa* 324(1): 97-100.
- Koopowitz. H., P. Iamwiriyaikul and S. Laohapatcharin. 2018. *Paphiopedilum myanmaricum*, a new species of slipper orchid (Cypripedioideae, Orchidaceae). *Orchid Digest* 82(1): 10-15.

- Renz, J. 2011. Renziana Vol.1: *Paphiopedilum*. Swiss Orchid Foundation. Friedrich Reinhardt Verlag, Basel. 100 p.
- Sanpote, P. 2009. Chromosome numbers and karyotypes of some Orchidaceae genus *Paphiopedilum* in Thailand. Naresuan University Science Journal 6(1): 89-100. (in Thai)
- Taywiya. P., W. Bundithya and N. Potapohn. 2008. Analysis of genetic relationship of genus *Phalaenopsis* by RAPD technique. Acta Horticulturae 788: 39-46.
- Thanananta. T., T. Meesangiem and N. Thanananta. 2017. Genetic relationship assessment and identification of *Paphiopedilum* subgenus *Brachypetalum* section *Brachypetalum* Using SCoT markers. Thai Journal of Science and Technology 6(2): 161-170. (in Thai)
-