

การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับตรวจสอบลูกผสมและจำแนกกล้วยไม้ สกุลหวายพันธุ์พื้นเมืองบางชนิด

Screening of Molecular Markers for Verification of Hybrids and Identification of Some Native *Dendrobium* Species

ชิต อินปรา วีณัน บัณฑิตย์ และณัฐา โพธาภรณ์

Chita Inpar, Weenun Bundithya and Nuttha Potapohn

ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50202

Department of Plant Science and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand 50202

Email: chita@mju.ac.th

Abstract

Screening of molecular markers for some native *Dendrobium* species, *D. anosmum*, *D. scabrilingue*, *D. parishii* and *D. peguanum*, was done by RAPD technique. DNAs of a commercial cultivar (*D. Emma White*), the four *Dendrobium* species, and parental lines and progenies from the cross between *D. Emma White* and *D. parishii* were evaluated. It was found that *D. anosmum*, *D. parishii* and *D. peguanum* could be identified by specific DNA bands as molecular markers of each species. The OPF01, OPF04, OPF07 and OPF10 primers were suitable for identifying the relationship among parental lines, *D. Emma white* and *D. parishii*, and their progenies

Keywords: native *Dendrobium* species, molecular markers, identification, RAPD technique

บทคัดย่อ

การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์พื้นเมืองบางชนิด เช่น เอื้องน้ำครั่ง สายสั้น เอื้องสายหลวง เอื้องชะห่อม และเอื้องนางลม โดยเทคนิคอาร์เอพีดี เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอของหวายเอมมาไวท์ซึ่งเป็นพันธุ์การค้า หวายพันธุ์พื้นเมืองทั้ง 4 ชนิด ข้างต้น และต้นพ่อแม่พันธุ์และลูกผสมที่เกิดจากคู่ผสมระหว่างหวายเอมมาไวท์และเอื้องน้ำครั่งสายสั้นพบว่า สามารถจำแนกเอื้องสายหลวง เอื้องน้ำครั่งสายสั้น และเอื้องนางลม โดยแถบดีเอ็นเอจำเพาะ และพบว่าไพรเมอร์ OPF01, OPF04, OPF07 และ OPF10

สามารถใช้ยืนยันความสัมพันธ์ของสายพันธุ์พ่อแม่ (หวายเอมมาไวท์ และเอื้องน้ำครั่งสายสั้น) และลูกผสมได้

คำสำคัญ: กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์พื้นเมือง เครื่องหมายโมเลกุล การจำแนก เทคนิคอาร์เอพีดี

คำนำ

ประเทศไทยมีการส่งออกกล้วยไม้เมืองร้อนมากเป็นอันดับหนึ่งของโลก ในปี พ.ศ. 2551 ประเทศ

ไทยมีรายได้จากการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกถึง 2,411,073,067 บาท จากปริมาณการส่งออก 25,152,136 กิโลกรัม ในขณะที่มูลค่าการส่งออกต้นกล้วยไม้อีก 422,721,452 บาท จากการส่งออกกล้วยไม้ 17,856,673 ต้น และลูกกล้วยไม้ 20,752,197 ต้น ในปี 2551 เพิ่มขึ้นจาก ปี พ.ศ. 2550 ซึ่งมีมูลค่าส่งออกต้นรวม 399,291,531 บาท (กรมศุลกากร, 2552) ซึ่งให้เห็นว่าแนวโน้มความต้องการกล้วยไม้ต้นและกล้วยไม้กระถางในตลาดโลกเพิ่มมากขึ้น

กล้วยไม้กระถางที่ดินนอกจากจะมีสีสันสดใสและมีขนาดต้นกะทัดรัดแล้ว หากมีกลิ่นหอมจะทำให้มีความน่าสนใจมากขึ้น (Kalina, 1992) การมีกลิ่นหอมของกล้วยไม้เป็นจุดขายที่สำคัญซึ่งสามารถเพิ่มมูลค่าของสินค้าได้ (Groom, 1995 และ Nakamura *et al.*, 1990) ประเทศไทยมีความหลากหลายทางชีวภาพมากเป็นแหล่งกำเนิดของกล้วยไม้พันธุ์แท้กว่า 1,500 ชนิด และมีกล้วยไม้สกุลหวายกว่า 150 ชนิด (Seidenfaden, 1985) ซึ่งหลายชนิดมีกลิ่นหอม การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้หวายกระถางให้มีกลิ่นหอม จึงเป็นอีกช่องทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มศักยภาพในการค้าต้นกล้วยไม้ไปสู่ตลาดโลก จึงมีแนวคิดในการนำกล้วยไม้หวายพันธุ์แท้ที่มีกลิ่นหอมมาผสมกับหวายพันธุ์การค้าเพื่อเพิ่มคุณลักษณะที่ดีแก่หวายพันธุ์การค้าและเป็นการเพิ่มลักษณะใหม่ให้แก่ลูกผสมด้วย

การใช้เทคนิค RAPD เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ได้เคยมีการศึกษามาก่อนหน้านี้แล้วในกล้วยไม้หลายชนิด เช่น กาเรการ่อน (*Cymbidium*) (Xiang *et al.*, 2003) สกุลหวาย (ศิริลักษณ์, 2550) สกุลฟาเลนอปซิส (*Phalaenopsis*) (Been *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2001, Taywiya *et al.*, 2008) และแวนดา (*Vanda*) (Lim *et al.*, 1999).

ในการศึกษานี้ได้นำเทคนิค RAPD มาใช้เพื่อยืนยันความสัมพันธ์ของพ่อแม่พันธุ์และลูกผสม และเพื่อจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์พื้นเมืองบางชนิด

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุพันธุ์พืช

ต้นพ่อแม่พันธุ์ ได้แก่ หวายเอมมาไวท์ (*D. Emma White*) ซึ่งเป็นพันธุ์การค้า (Figure 1A) และกล้วยไม้หวายพันธุ์แท้กลิ่นหอม 4 ชนิด ที่มีกลิ่นหอมแรง คือ เอื้องน้ำครั่งสายสั้น (*D. parishii* Rchb. f.) (Figure 1B) เอื้องสายหลวง (*D. anosmum* Lindl.) (Figure 1C) เอื้องชะห่อม (*D. scabrilingue* Lindl.) (Figure 1D) และเอื้องนางลม (*D. peguanum* Lindl.) (Figure 1E) และต้นลูกผสมระหว่างหวายเอมมาไวท์และเอื้องน้ำครั่งสายสั้นที่ดอกมีกลิ่นหอม จำนวน 10 ต้น



Figure 1 *Dendrobium* cultivar and the four native Thai fragrant *Dendrobium* species.

(A) *D. Emma White*, (B) *D. parishii*, (C) *D. anosmum*, (D) *D. scabrilingue* and (E) *D. peguanum*

การเตรียมดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนมา 0.1 กรัม สกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Doyle and Doyle, 1987) ตรวจสอบความเข้มข้นโดยวิธีอากาโรสเจล อิเล็กโตรโฟริซิส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 ng/μl

ปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอของหวายเอนมาไวท์และหวายพันธุ์แท่งกลิ่นหอมทั้งสี่ชนิด มาตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR: polymerase chain reaction) ใช้ไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 20 ไพรเมอร์ (OPF01-20) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ดีเอ็นเอถูกเพิ่มปริมาณใน reaction mixture ปริมาตร 20 μl ซึ่งประกอบด้วย 1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 100 μM dNTPs, 0.8 Unit *Taq* DNA polymerase, 100 ng primer, 10 ng DNA template และ sterile dH₂O ขั้นตอนปฏิกิริยาพีซีอาร์ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 36 องศาเซลเซียส 10 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 70 วินาที จำนวน 2 รอบ; 90 องศาเซลเซียส 1 นาที

42 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 70 วินาที จำนวน 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 4 นาที แล้วพักไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิสด้วยเจลอะกาโรส และวิเคราะห์โดยโปรแกรม Gene Tool ภายใต้เครื่อง Gel documentation จากการคัดกรองเบื้องต้นได้คัดเลือกไพรเมอร์ที่แสดงแถบดีเอ็นเอจำนวนมากและชัดเจน เพื่อใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ของต้นพ่อแม่และลูกผสม

ผลการศึกษา

จากการใช้ไพรเมอร์ OPF จำนวน 20 หมายเลข ตรวจสอบดีเอ็นเอของหวายเอนมาไวท์และหวายพันธุ์พื้นเมืองกลิ่นหอม 4 ชนิด พบว่า ไพรเมอร์จำนวน 4 หมายเลข คือ OPF01, OPF04, OPF07 และ OPF10 แสดงแถบดีเอ็นเอในช่วง 248-1500, 206-1425, 445-1582 และ 200-1452 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งมีความชัดเจน และมีความแตกต่างระหว่างหวายเอนมาไวท์และหวายพันธุ์พื้นเมืองกลิ่นหอมทั้งสี่ชนิด (Figure 2)

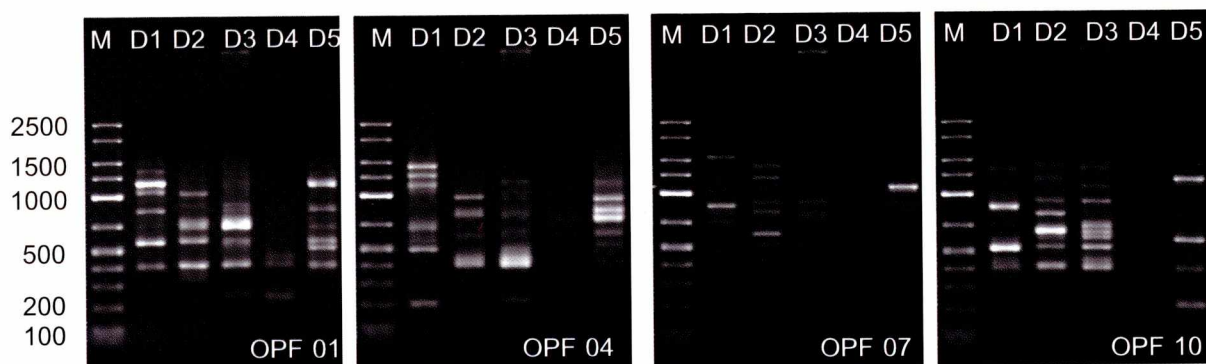


Figure 2 Polymorphic profiles obtained from *D. Emma White* (D1), *D. parishii* (D2), *D. anosmum* (D3) *D. scabrilingue* (D4) and *D. peguanum* (D5) after amplification with four primers, OPF01 OPF04, OPF07 and OPF10

จากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม (Table 1) คือ กลุ่มที่ 1 พบเฉพาะในหอยเอมมาไวท์ ที่ใช้เป็นต้นแม่แต่ไม่พบในกล้วยไม้หอยพันธุ์พื้นเมือง ทั้ง 4 ชนิด ที่ใช้เป็นต้นพ่อ ปรากฏแถบจากการใช้ไพรเมอร์ OPF01 3 แถบ OPF04 5 แถบ OPF07 2 แถบ และ OPF10 1 แถบ และกลุ่มที่ 2 พบเฉพาะในหอยพันธุ์พื้นเมืองที่ใช้เป็นต้นพ่อ ปรากฏแถบจากการใช้ไพรเมอร์ OPF01 2 แถบ OPF04 3 แถบ OPF07

5 แถบ และ OPF10 7 แถบ แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแต่ละชนิด เช่น OPF07₁₄₄₀, OPF07₁₁₂₉, OPF07₆₂₇, OPF07₅₃₈, OPF07₄₄₅ และ OPF10₇₅₀ จำเพาะกับเอื้องน้ำครึ่งสายสั้น OPF10₇₀₀ และ OPF10₆₅₀ จำเพาะกับเอื้องสายหลวง และ OPF10₂₀₀ จำเพาะกับเอื้องนางลม ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแต่ละชนิดนี้สามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการจำแนกชนิดได้

Table 1 Two groups of DNA bands obtained from *D. Emma White*, *D. parishii*, *D. anosmum*, *D. scabrilingue* and *D. peguanum* after amplification with the four primers

Marker	<i>D. Emma White</i>	<i>D. parishii</i>	<i>D. anosmum</i>	<i>D. scabrilingue</i>	<i>D. peguanum</i>
Group 1					
OPF01 ₁₅₀₀	+	-	-	-	-
OPF01 ₁₃₀₀	+	-	-	-	-
OPF01 ₈₂₁	+	-	-	-	-
OPF04 ₁₄₂₅	+	-	-	-	-
OPF04 ₁₂₈₈	+	-	-	-	-
OPF04 ₇₁₄	+	-	-	-	-
OPF04 ₅₆₈	+	-	-	-	-
OPF04 ₅₀₉	+	-	-	-	-
OPF07 ₇₁₅	+	-	-	-	-
OPF07 ₄₃₇	+	-	-	-	-
OPF10 ₈₉₁	+	-	-	-	-
Group 2					
OPF01 ₇₁₉	-	+	+	-	+
OPF01 ₂₇₁	-	+	+	+	-
OPF04 ₁₀₀₀	-	+	+	-	+
OPF04 ₆₀₇	-	+	+	+	+
OPF04 ₄₄₃	-	+	+	-	-
OPF07 ₁₄₄₀	-	+	-	-	-
OPF07 ₁₁₂₉	-	+	-	-	-
OPF07 ₆₂₇	-	+	-	-	-
OPF07 ₅₃₈	-	+	-	-	-
OPF07 ₄₄₅	-	+	-	-	-
OPF10 ₁₄₅₂	-	+	+	-	-
OPF10 ₁₂₀₀	-	+	-	-	+
OPF10 ₇₅₀	-	+	-	-	-
OPF10 ₇₀₀	-	-	+	-	-
OPF10 ₆₅₀	-	-	+	-	-
OPF10 ₆₀₀	-	+	+	-	-
OPF10 ₂₀₀	-	-	-	-	+

จากการผสมหยาวยอมมาไวท์กับหยาวยพันธุ์พื้นเมืองกลิ่นหอมทั้ง 4 ชนิด ได้ต้นลูกผสมจากคู่ผสมเพียงคู่เดียว คือ คู่ผสมระหว่างหยาวยอมมาไวท์และเอื้องน้ำครึ่งสายสั้น และเมื่อต้นลูกผสมมีดอกบานปรากฏว่า ทุกต้นมีดอกสีขาวเจือม่วงและมีกลิ่นหอม จึงสุ่มต้นลูกผสมมาจำนวน 10 ต้น เพื่อยืนยันการเป็นลูกผสมโดยใช้ไพรเมอร์ OPF01, OPF04, OPF07 และ OPF10 พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 4 หมายเลข แสดงความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอของต้นพ่อและต้นแม่อย่างชัดเจน (Figure 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ) และจากแถบดีเอ็นเอของต้นลูกที่ปรากฏทั้ง 10 ต้น (H1-H10) พบว่าต้นลูกแสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากต้นพ่อและต้น

แม่ จึงสามารถยืนยันต้นลูกทุกต้นว่าเป็นลูกผสมจากคู่ผสมเดียวกัน

แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในต้นพ่อแม่และลูกผสมจากคู่ผสมระหว่างหยาวยอมมาไวท์และเอื้องน้ำครึ่งสายสั้น จากการใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 หมายเลข เมื่อพิจารณาเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในเอื้องน้ำครึ่งสายสั้นซึ่งเป็นต้นพ่อและต้นลูก แต่ไม่ปรากฏในหยาวยอมมาไวท์ซึ่งเป็นต้นแม่ พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 6 แถบ คือ OPF01₇₁₉, OPF04₁₀₀₀, OPF04₄₄₃, OPF07₉₃₇, OPF07₅₃₈ และ OPF10₃₂₁ (Table 2) ปรากฏในต้นพ่อและต้นลูกทุกต้น ซึ่งแสดงว่าเป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างต้นพ่อ และต้นแม่

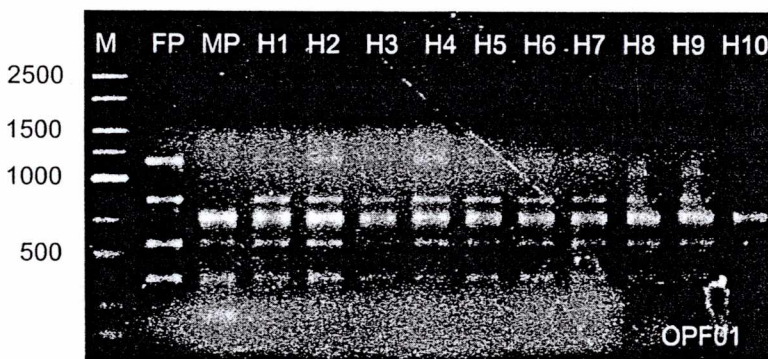


Figure 3 Polymorphic profiles obtained from *D. Emma White* (FP), *D. parishii* (MP) and their ten progenies (H1-H10) after amplification with OPF01 primer

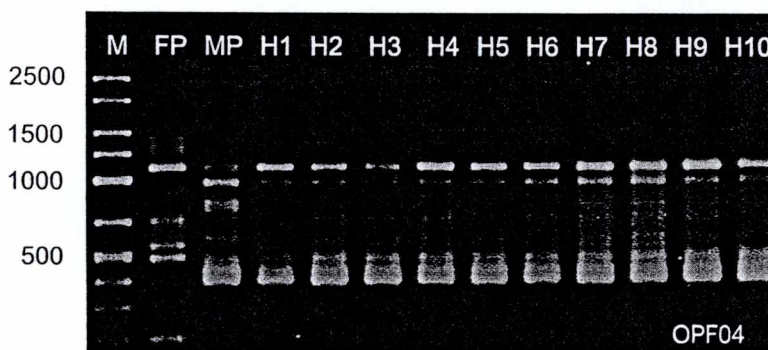


Figure 4 Polymorphic profiles obtained from *D. Emma White* (FP), *D. parishii* (MP) and their ten progenies (H1-H10) after amplification with OPF04 primer

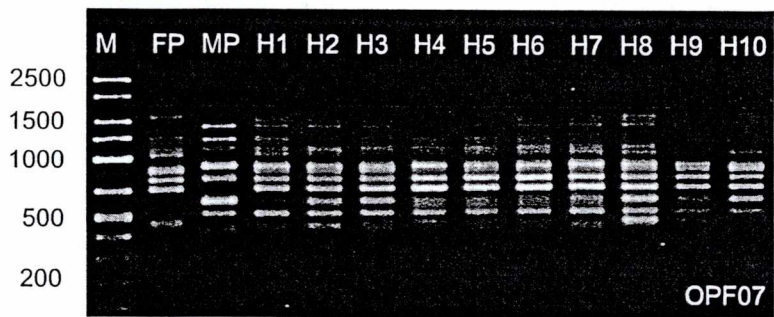


Figure 5 Polymorphic profiles obtained from *D. Emma White* (FP), *D. parishii* (MP) and their ten progenies (H1-H10) after amplification with OPF07 primer



Figure 6 Polymorphic profiles obtained from *D. Emma White* (FP), *D. parishii* (MP) and their ten progenies (H1-H10) after amplification with OPF10 primer

Table 2 The DNA bands of parental lines and their progenies those only showed in male parent (*D. parishii*) and progenies (H1-H10) after amplification with the four primers

Marker	<i>D. parishii</i>	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10
OPF01 ₇₁₉	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OPF01 ₅₅₆	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
OPF01 ₂₇₁	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
OPF04 ₁₀₀₀	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OPF04 ₄₄₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OPF07 ₁₄₄₀	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
OPF07 ₁₂₅₀	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
OPF07 ₁₁₃₉	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+
OPF07 ₉₃₇	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OPF07 ₆₂₇	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
OPF07 ₅₃₈	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OPF10 ₆₂₃	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
OPF10 ₅₆₀	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
OPF10 ₃₂₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

เอกสารอ้างอิง

จากการตรวจสอบเพื่อหาแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์พื้นเมืองแต่ละชนิด พบว่า OPF07₁₄₄₀, OPF07₁₁₂₉, OPF07₆₂₇, OPF07₅₃₈, OPF07₄₄₅ และ OPF10₇₅₀ จำเพาะกับเอื้องน้ำครึ่งสายสั้น OPF10₇₀₀ และ OPF10₆₅₀ จำเพาะกับเอื้องสายหลวง และ OPF10₂₀₀ จำเพาะกับเอื้องนางลม ซึ่งแถบดีเอ็นเอเหล่านี้สามารถใช้เป็นเครื่องหมายในการจำแนกชนิดได้ และจากการตรวจสอบความสัมพันธ์ของต้นพ่อแม่และลูกผสมพบว่า ไพรเมอร์ OPF01, OPF04, OPF07 และ OPF10 มีความเหมาะสมมากที่สุดในการใช้ยืนยันการเป็นลูกผสมจากคู่ผสมที่เกิดจากหวายเอมมาไวท์ และเอื้องน้ำครึ่งสายสั้น

ผลจากการศึกษานี้สามารถใช้สนับสนุนงานพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้เพื่อลักษณะกลิ่นหอม โดยนำเครื่องหมายที่ได้ไปยืนยันผลฟีโนไทป์ความมีกลิ่นหอมที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมี และติดตามการถ่ายทอดเครื่องหมายโมเลกุลและลักษณะกลิ่นหอมในลูกผสมรุ่นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และขอขอบคุณโครงการพัฒนาคุณภาพไม้ดอกทางเศรษฐกิจ (กล้วยไม้) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์การวิจัย

กรมศุลกากร. 2552. สถิติการส่งออก ปี 2551. จาก <http://www.customs.go.th/Statistic/StatisticResult2550.jsp?page=9&statType=export&month=12&year=2007&productCodeCheck=Y&productCode=06029020&countryCheck=null&country=> [10 ตุลาคม 2551].

ศิริลักษณ์ อินทวงค์ วีนัน บัณฑิตย์ ณัฐา ควรประเสริฐ และพิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์. 2550. การวิเคราะห์ลูกผสมข้ามหมู่ในกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดี. วารสารเกษตรศาสตร์ (วิทย์). 40: 456-461.

สุพัตรา เจริญภักดี และวีนัน บัณฑิตย์. 2548. การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับลักษณะดอกของกล้วยไม้สกุลช้าง. วารสารเกษตร. 21(2): 99-105.

Been, C.G., A.S. Na, J.B. Kim and H.Y. Kim. 2002. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for genetic analysis of *Phalaenopsis* species. *J. Korea Soc. Hort. Sci.* 43: 387-391.

Chen, W.H., Y.M. Fu, W.T. Tsai, M.S. Chyou, R.M. Hsieh, C.C. Wu and W.S. Lin. 2001. Identification and phylogenetic relationship of *Phalaenopsis* species via molecular analysis. *Rept. Taiw. Sug. Res. Inst.* 48: 23-39.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.

Grooms, L. 1995. Scent of an orchid. *Greenhouse Product News.* 5: 42-43.

- Kalina, T.F. 1992. Fragrant *Paphiopedilum* will soon be here. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 61: 232-236.
- Lim, S.H., P.C.P. Teng, Y.H. Lee and C.J. Goh. 1999. RAPD analysis of some species in the genus *Vanda* (Orchidaceae). **Ann. Bot.** 83: 193-196.
- Nakamura, S., K. Tokuda and K. Omata. 1990. Japan prize fragrance competition. **Amer. Orchid Soc. Bull.** 38: 388-393.
- Seidenfaden, G. 1985. **Orchid Genera in Thailand XII *Dendrobium* Sw.** Opera Botanica, Copenhagen. 295 pp.
- Taywiya, P., W. Bundithya and N. Potapohn. 2008. Analysis of genetic relationship of the genus *Phalaenopsis* by RAPD technique. Proceedings of the International Workshop on Ornamental Plants. **Acta Hort.** 788: 39-42.
- Xiang, N., Y. Hong and L.T. Lam-Chan. 2003. Genetic analysis of tropical orchid hybrids (*Cymbidium*) with fluorescence amplified fragment length polymorphism (AFLP). **J. Amer. Soc. Hort.Sci.** 128: 731-735.