เอกสารอ้างอิง

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ ศรีประไพ ธรรมแสง และแสงเดือน พลเยี่ยม. 2551. การศึกษาโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 39 (3) (พิเศษ): 191-194.

กาญจนา รุ่งรัชกานนท์. 2552. การศึกษาจำนวนโครโมโซมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจากดอกอ่อน และปลายราก. ในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 9. 6-9 พฤษภาคม 2552 โรงแรมดิ เอ็มเพรส อ. เมือง จ. เชียงใหม่. หน้า 238.

จักรพันธ์ วนิชกุล. 2549. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี และการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิดในประเทศไทยโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งไอทีเอส. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ .

ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. 2543. เทคนิคอาร์เอพีดีกับการจำแนกพันธุ์พริก ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 1: 6-10.

นฤมล ธนานันต์ ธีระชัย ธนานันต์. 2008. การจำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังด้วยเครื่องหมายแอฟแอลพีและสการ์. Thai Journal of Genetic 1(2): 122-127.

พรรณี อัศวตรีรัตนกุล และเกษม อัศวตรีรัตนกุล. 2548. การใช้ RAPD เพื่อศึกษาพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีในภาคใต้. ใน เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ "The 31st Congress on Science and Technology of Thailand" 18-20 October 2005, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima.

รัฐพล ฉัตรบรรยงค์ สุรศักดิ์ นิลนนท์ อุณารุจ บุญประกอบ และ ประศาสตร์ เกื้อมณี. 2549. การตรวจสอบพันธุ์ขององุ่นไม่มีเมล็ดบางพันธุ์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี. ว.วิทยาศาสตร์เกษตร 37(6): 25-28.

ระพี สาคริก. 2530. กล้วยไม้. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 140 หน้า.

ศิริลัษณ์ อินทะวงศ์ วีณัน บัณฑิต ณัฐา ควรประเสริฐ และพิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์. 2548. การเปรียบเทียบแบบแผนไอโซไซม์และเครื่องหมายอาร์เอพีดีเพื่อการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเอื้องสายสามสีและเอื้องสายแข็ง. ว.สงขลานครินทร์ วทท. 28(3): 531-537.

ศรีประไพ ธรรมแสง กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ วรงค์ นัยวินิจ ภาคภูมิ สืบนุการณ์ และอุทัย อันพิมพ์. 2543. รายงานการวิจัยเรื่อง การเก็บรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้แดงอุบลและศึกษาการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิยาลัยอุบลราชธานี.

เสริมสกุล พจนการุณ เรือนแก้ว ประพฤติ เชวง แก้วรักษ์ และ อัมพร ยอดดี. 2549. การศึกษาลักษณะพันธุ์กระชายดำโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี. แก่นเกษตร 34(4) : 274-258.

สุมนทิพย์ บุญนาค. 2550. การชักนำให้เกิดโพลิพลอยด์และการส่งถ่ายยีน antisense ACC oxidass สู่กล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherima*): ที่มา www.orchidcenter.org/.../research.php.

สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2540. การกลายพันธุ์ของพืช. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 262 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ. 116 หน้า.

สุรีพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช วารสารวิชาการ ม.อบ. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 5 (2): 37-58.

สุรีพร เกตุงาม และ ดรุณี โชติษฐยางกูร. 2545. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์: เทคนิคการผลิตเมล็ดพันธุ์คุณภาพดี. แก่นเกษตร 30 (3):137-147.

อบฉันท์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์บ้านและสวน กรุงเทพฯ. 461 หน้า.

Arcade, A., F. Anselin, P.F. Rampant, M.C. Lesage, L.E. Paques and D. Prat. 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. Theoretical Applied Genetic 100: 299–307.

Ashraf, M. El-Assar., R.R. Krueger, P. S. Devanand and C-C.T. Chao. 2005. Genetic analysis of Egyptian date (*Phoenix dactylifera* L.) accessions using AFLP markers. Genetic Resources and Crop Evolution 52: 601–607

Chang, S.Y., M.J. Choi, K.E. Yoon, G.P. Lee, J.S. Lee, and K.H. Ryu. 2006. Genetic relationship and differentiation of *Paphiopedilum* and *Phragmepedium* based on RAPD analysis. Scientia Horticulturae 109:153-159.

Chen, X., S. H. Lim, S. M. Wong, Y. H. Lee, J. Kuo, T. W. Yam, and J. J. Lin, 1999. Amplified fragment length polymorphism analysis of vandaceous orchids. Plant Science 141: 183-189.

Choi, S.H., M.J. Kim, J.S. Lee, and K.H. Ryu. 2006. Genetic diversity and phylogenetic relationships and within species of oriental cymbidium based on RAPD analysis. Scientia Horticulturae 108: 79-85.

Christenson, E.A. 2001. *Phalaenopsis* a monograph. Oregon, Timber Press. 260 page.

Dong-mei, L., Y. Qing-sheng, and Z. Gen-fa. 2007. Analysis of the germplasm resources and genetic relationships among hybrid *Cymbidium* cultivars and native species with RAPD markers. Agricultural Sciences in China 6(8): 922-929.

Divakaran, M., K.N. Babu, P.N. Ravindran and K.V. Peter. 2006. Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed proenies using RAPD and AFLP markers. Scientia Horticulturae 108: 414-422.

Dice, L. R. 1945. Measurement of the amount of ecological association between species. Ecology 26: 297-302.

Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter 1: 19-21.

Goh, M.W.K., P.P. Kumar, S.H. Lim, and H.T.W. Tan. 2005. Random amplified polymorphic DNA analysis of the moth orchids, *Phalaenopsis* (Epidendroideae: Orchidaceae). Euphytica 141: 11-22.

Goulao, L., L. Cabrita, C.M. Oliveira and J. M. Leitao. 2001. Comparing RAPD and AFLPTM analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. Euphytica 119: 259–270.

Kapp, J.E. and J.M. Chandlee. 1996. RNA/DNA mini-prep from single sample of orchid tissue. Bio. Techniques 21, 54-56.

Li, A., Y. Luo and S. Ge. 2002. A preliminary study on conservation genetics of an endangered orchid (*Paphiopedilum micranthum*) from southwestern China. Biochemical Genetics 40:195-201.

Lodhi, M.A., Y. Guang-ning, N.F. Weeden and I.R. Bruce.1994. Simple and efficient method for DNA extraction from grapevine, *Vitis* species and Ampelosis . Plant Molecular Biology Reporter 12 (1):6-13.

Moyano, C., C. Alfonso, J. Gallego, R. Raposo and P. Melgarejo. 2003. Comparison of RAPD and AFLP marker analysis as a means to study the genetic structure of *Botrytis cinerea* population. European Journal of Plant Pathology 109: 515-522.

Obara-Okeyo, P. and S. Kako. 1998. Genetic diversity and identification of cymbidium cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 99: 95-101.

Ott, J. 1991. Analysis of human genetic linkage. John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.

Puecher, D., A. Katsiotis, J.M. Leggett, M. Loukas, and S. Tsakas. 2001. Genetic variability measures among *Bromus catharticus* Vahl. Populations and cultivars with RAPD and AFLP markers. Euphytica 121: 229–236.

Rohlf, F.J. 2004. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system.Version 2.2. Exster Software, Setauket, New York.

Sue, P., L.G. Bailey and B.R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol component. Plant Molecular Reporter 15 (1): 8-15.

Semagn, K., Å. Bjørnstad and M. N. Ndjiondjop. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology 5 (25): 2540-2568.

Tanaka, R. and H. Kamemoto. 1984. Chromosomes in orchids: counting and number *In* J.Arditi (Editor). Orchid biology reviews and perspectives, III. Cornell University Press, London. 323-410.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zebeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23(21):4407-4414

Welsh, J. and M. McClellan. 1990. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primer. Nucleic Acids Research 18: 7213-7218.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.U. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 8 (22): 6531-6535.

ภาคผนวก

บทความวิจัยและการนำเสนอผลงานวิจัย

1. ตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารระดับประเทศ จำนวน 2 เรื่อง

1.1 Sureeporn Kate-ngam and Patcharee Lakote. 2008. A comparative study of different RAPD-PCR protocols for genetic diversity analysis of *Doritis* germplasm. Agricultural Sci. 39(3): 203- 206.

1.2 สุรีพร เกตุงาม และพัชรี ลาโคตร. 2552. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้แดงอุบลโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 40 (3) (พิเศษ): 119-122.

1.3 สุรีพร เกตุงาม 2553. การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่งโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 41 (2) (พิเศษ): 397-400.

2. การนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการจำนวน 3 เรื่อง

2.1 การนำเสนอผลงานวิชาการในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 ภาคโปสเตอร์ เรื่อง "A comparative study of different RAPD-PCR protocols for genetic diversity analysis of *Doritis* germplasm" วันที่ 26-30 พฤษภาคม 2551 ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน อ. เมือง จ. พิษณุโลก

2.2 การนำเสนอผลงานวิชาการ ในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 8 ภาคบรรยาย เรื่อง "การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้แดงอุบลโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี" วันที่ 6-9 พฤษภาคม 2552 ณ โรงแรมดิ เอ็ม เพรส อ. เมือง จ. เชียงใหม่

2.3 การนำเสนอผลงานวิชาการในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 9 ภาคโปสเตอร์ เรื่อง "การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่งโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี" วันที่ 11-14 พฤษภาคม 2553 ณ โรงแรมกรุงศรีริเวอร์ อ. พระนครศรีอยุธยา จ. พระนครศรีอยุธยา

3. รางวัล

3.1 รางวัลดีเด่นในการนำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ สาขาไม้ดอกไม้ประดับ ในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 7 เรื่อง "A comparative study of different RAPD-PCR protocols for genetic diversity analysis of *Doritis* germplasm"

3.2 รางวัลชมเชยในการนำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ สาขาไม้ดอกไม้ประดับ ในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 9 เรื่อง "การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่งโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี"

A comparative study of different RAPD-PCR protocols for genetic diversity analysis of *Doritis* germplasm

Sureeporn Kate-ngam[1*] and Padcharee Lakote[1]

Abstract

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) is a simple, fast and cost effective method for assessing genetic diversity of plant varieties. The reproducibility of the RAPD amplification was affected by several factors, therefore causing misinterpretation. In this study, we analyzed the effect of changing the concentration of magnesium chloride, template genomic DNA and *Taq* DNA polymerase with the objective of determining the optimum concentration for standardization of RAPD technique for assessing genetic diversity of *Doritis* germplasm in the North-east of Thailand. The optimized RAPD reaction was performed by varying the concentration of $MgCl_2$ (2.0, 2.5 and 3.0 mM), DNA template (10 and 20 ng) and *Taq* DNA polymerase (0.5, and 1.0 U) while fixing the concentration of RAPD primer and dNTPs at the concentration of 0.6 uM and 200 uM respectively. Reproducible amplification patterns with OPA02 primer were obtained using 2.5 mM of $MgCl_2$, 10 ng of template DNA and 1 U of *Taq* DNA polymerase in 20 ul of the reaction. The optimized RAPD protocol was employed to select the suitable RAPD primers for fingerprinting of *Doritis* germplasm. Out of 98 RAPD primers screening, 32 primers revealed clear patterns of DNA amplifications and could be utilized as RAPD markers. These chosen primers will be useful for determining genetic diversity of these *Doritis* germplasm.

Key words : RAPD, PCR optimization, *Doritis* orchid

Introduction

Random amplified polymorphic DNAs (RAPD) have been widely employed for DNA fingerprinting of crop plants since it offers advantages in speed, technical simplicity and identification of polymorphisms. This technique involves the amplification of random segments of genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR), using short single primers of arbitrary sequence (William *et al.*, 1990). RAPD requires very small quantities of DNA, and no cloning, sequencing or hybridization is necessary. For theses reasons, it has a distinct advantage over other molecular techniques generally used for genomic characterization. However a common experienced with RAPD analysis, is its poor reproducibility. Since the final product is derived from exponential amplification of the template DNA, minor differences in amplification efficiencies can result in large differences in the overall product patterns and yield. It is therefore essential to optimize the PCR to obtain reproducible and interpretable results.

The PCR condition for RAPD analysis can be optimized by varying the components in PCR reaction such as concentrations of DNA template, Mg^{2+} ions, deoxynucleotide triphosphates, primers and thermostable DNA polymerase. All these factors can influence PCR amplifications. In this study we aimed to develop a reliable RAPD fingerprinting method for genetic diversity assessment of *Doritis* (*Doritis pulcherrima*) germplasm. The concentrations of critical components in PCR reaction including DNA templates, $MgCl_2$ and *Taq* DNA polymerase were optimized to obtain reproducible DNA amplification. The optimized RAPD-PCR was performed to select RAPD primers suitable for *Doritis* fingerprinting in order to evaluate genetic diversity of *Doritis* germplasm.

[1] Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Warinchamrap, Ubon Ratchathani. 34190

* Corresponding author. E-mail: sureeporn.k@ubu.ac.th

Materials and Methods

Plant materials

Doritis germplasm used in this study were collected from different natural habitats in Mukdahan and Ubon Ratchathani provinces. Plants were raised in greenhouse at Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University.

DNA extraction and RAPD-PCR optimization

Total genomic DNA was extracted from young actively growing leaves of *Doritis* genotypes using the modified protocol of Dellaporta method (Dellaporta *et.al.*,1983), which is described by Ziegenhagen *et. al.* (1993). The procedure was also modified by adding high concentration of NaCl to remove polysaccharides. The phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation of DNA were also included to ensure the purity of DNA.

The primer OPA02 was used to optimize the RAPD-PCR of *Doritis* germplasm. The amplification was performed in a final volume of 20 µl containing 1X PCR buffer (Promega), 200 mM of each dNTPs (Promega), and 0.6 µM of primer with different concentrations of DNA templates (10 and 20 ng), $MgCl_2$ (2.0, 2.5, and 3.0 mM) and *Taq* DNA polymerase (0.5 and 1.0 U) (Fermentus) in order to determine the optimal concentration for PCR reaction. The reactions were carried out in a thermal cycler (Perkin Elmer 9700) according to following amplification profile of initial denaturation at 94°C for five min, followed by 40 cycles of one min at 94°C, one min at 36°C and two min of 72°C. The reaction was further extended at 72°C for 10 min.

Amplification products were separated in 1.2 % agarose gel stained with ethidium bromide in TBE buffer for 2 hours at 80 Volts. Subsequently, gels were visualized on UV light in Gel documentation. DNA fragment sizes were estimated by comparison with standard DNA marker, 1 kb DNA ladder (Promega).

RAPD analysis and primer selection

The optimized RAPD-PCR reaction was used for RAPD primer screening. Four *Doritis* genotypes belonging to *D. pulcherrima* (MDM no.5 and MDM no.14) and *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* (MDD no.3 and MDD no.13) collected from Mukdahan province were randomly selected for primer screening using 98 primers from the Operon kit series (Operon Technologies, Germany). The primers that gave reproducible and scorable amplifications and generated polymorphic patterns were selected and preliminary validated for RAPD fingerprinting of 15 *Doritis* germplasm.

Results and Discussion

Optimization of RAPD-PCR reaction

The alterations in different parameters tested had varied degrees of influence on the RAPD amplification patterns and its reproducibility. The concentration of the tested parameters including of template DNA (10 and 20 ng), MgCl2 (2.0, 2.5, 3.0 mM), and *Taq* DNA polymerase (0.5 and 1.0 U) were selected based on clear and scorable DNA bands produced. The optimum reaction mixture which gave best amplification pattern was obtained using 10 ng of DNA template, 2.5 mM of $MgCl_2$ and 1.0 U of *Taq* DNA polymerase. A higher or lower concentration resulted in either sub-optimal or complete lack of PCR amplifications.

An efficient and robust protocol for RAPD analysis should be reasonably resistant to variations in template concentrations. For most species of plants, good results have been achieved using 10 to 100 ng of template DNA. High amount of DNA usually inhibit amplification due to competition of the primers for the template DNA (Micheli *et.al.*, 1994). Consequently, several quantities of DNA template should be tested not only to ensure a large number of bands but also to verify the optimized conditions for PCR.

Magnesium is an essential component of PCR reactions and affects the quality of RAPD profiles obtained (Munthaly *et al.*, 1992). It is served as co-factor of the *Taq* polymerase enzyme and known to affect primer

annealing and template denaturation, enzyme activity and fidelity and the formation of primer-dimer artefacts (Saiki, 1988). Generally, increasing amounts of Mg^{2+} will result in the accumulation of non-specific amplification products, although insufficient Mg^{2+} will reduce the yield (Williams *et al.*, 1993). The use of > I mM $MgCl_2$ has been reported to be generally necessary for good levels of DNA amplification in bacterial and plant DNAs (Bassam *et al.*, 1992). Typically $MgCl_2$ concentrations range from 1-8 mM in most RAPD analyses reported in the literature. In the present study we have found that the 3.0 mM of $MgCl_2$ was suitable to amplify *Doritis* DNA.

Taq is the most frequently used polymerase in RAPD-PCR. In the present study, *Taq* polymerase performed satisfactorily in shorter amplicon formation, but produced very few bands over 5,000 bp fragments. This is in agreement with previous reports pointing that *Taq* polymerase rapidly becomes inefficient as the length of the target exceeds 5-6 kb (Barnes, 1994). Moreover, the quantity of *Taq* DNA polymerase also affects reproducibility of RAPD pattern. The intensity of bands increases correspondingly with increasing *Taq* DNA polymerase up to 2 U. After this concentration, the amplification profile is not affected by the enzyme concentration. In the present study, 1 U of *Taq* DNA polymerase is sufficient to generate clear and reproducible DNA amplification profile.

Primer selection and survey

The suitability of the RAPD technique to detect DNA polymorphisms among *Doritis* germplasm was determined using the optimized RAPD-PCR. Ninety-eight 10-base oligonucleotide primers from Operon kits were initially screened against four *Doritis* genotypes. The RAPD primers yielding distinctive DNA patterns were selected and could be used as RAPD markers to fingerprints the *Doritis* germplasm. Out of ninety-eight Operon primers checked, 66 did not produce polymorphic bands or did not amplify clear products. The 32 primers which revealed good and reproducible polymorphic bands were chosen and used to further identify and detect genetic variation of *Doritis* germplasm in the Northeast of Thailand.

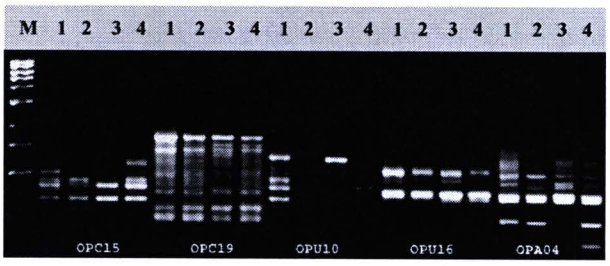
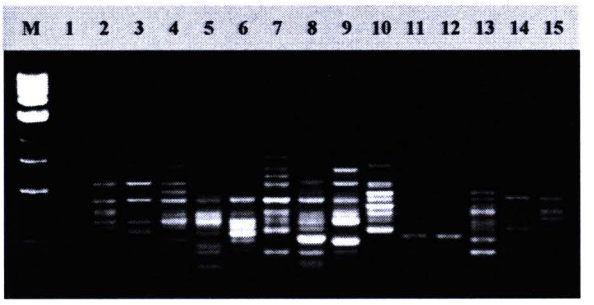


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments obtained from RAPD primer screening of four *Doritis* genotypes using RAPD primers: OPC15, OPC19, OPU10, OPU16 and OPA04. (M = 1kb DNA ladder, 1 = MDD no.3, 2 = MDD no.13, 3 = MDM no.5, 4 = MDM no.14).

Preliminary RAPD fingerprint of Doritis germplasm

We have shown here preliminary RAPD fingerprint of 15 *Doritis* germplasm collected from the natural habitats in Mukdahan and Ubon Ratchathani provinces OPA02 (Figure 2). This primer showed distinctive and satisfactory amplification patterns. The polymorphic DNA fragments among these genotypes were scored as RAPD markers. Therefore, the 32 selected RAPD primers from this study will be useful to produce RAPD markers for further genetic diversity assessment in *Doritis* germplasm from the Northeast of Thailand.



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

Figure 2 RAPD fingerprints of 15 *Doritis* germplasm from the Northeast of Thailand using primer OPA 02. M = 1 kb DNA ladder, 1 = MDD no.3, 2 = MDD no.13, 3 = MDM no.5, 4 = MDM no.14, 5 = NK no.3, 6 = NK no.4, 7 = PR no.15, 8 = PAA no.6, 9 = PT no.1, 10 = MVP no.39, 11 = PR no.8, 12 = PA no.11, 13 = MVP no.27, 14 = NK no.1, 15 = MDD no.7

Summary

The reproducibility of RAPD amplification is known to be highly influenced by experimental conditions (Wolff *et al.*, 1993), but there is usually a "window" through which reproducible results can be obtained. Here we have identified such a "window" for reproducible RAPD amplifications for *Doritis* sp. The standard reaction developed included 10 ng of DNA extracted using a SDS-based protocol, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.6 µM primer, 200 mM of each dNTPs and 1.0 U of *Taq* DNA polymerase per 20 µl of PCR reaction. This powerful approach to detect polymorphism will provide a rapid molecular tool for various applications related to the molecular genetics studies of *Doritis* germplasm.

Acknowledgements

This research was financially supported by a grant from Ubon Ratchathani University.

References

Barnes, W. B. 1994. PCR amplification of up to 35-kb with high fidelity and high yield from bateriophage templates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2216–2220.

Bassam, B. J, G. Caetano-Anolles, and P. M. Gresshoff. 1992. .Amplification fingerprinting of bacteria. Applied Microbiology 38:70-76

Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Mol. Biol. Rep.1: 19-21.

Micheli, M. R., R. Bova, E. Pascale, and E. D'Ambrosio. 1994. Reproducible DNA fingerprint with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. Nucleic Acids Res. 22:1921-1922

Munthaly, M., R. V. Ford-Lloyd, and H. J. Newbury. 1992. The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. PCR Methods Appl.1:274-276

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Sharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S. U. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 8 (22): 6531-6535.

Williams, J. G. K., M. K. Hanafey, Kubelik, J. A. Rafalski, and S. U. Tingey. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods in Enzymology. 218: 704-741.

Wolff, K., E. D. Schoen, and J. Peters-Van Rijn. 1993. Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in Chrysanthemum. Theor. Appl. Genet. 86: 1033-1037.

Ziegenhagen, B., P. Guillemaut, and F. Scholz. 1993. A procedure for mini-preparations of genomic DNA from needles of silver fir (*Abies alba* Mill.) Plant Mol. Biol. Rep. 11: 117-121.

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้แดงอุบลโดยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

Analysis of Genetic Diversity of Daeng Ubon Orchids (*Doritis pulcherrima* var. *Buyssoniana*) using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers

สุรีพร เกตุงาม[1*] และพัชรี ลาโคตร[1]
Sureeporn Kate-ngam[1*] and Padcharee Lakote[1]

Abstract

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to estimate genetic diversity among 14 Daeng Ubon orchids (*Doritis pulcherrima* var. *Buyssoniana*), collected from different growing regions in Ubon Ratchathani Province. Out of 110 RAPD primers screened, 26 primers revealing clear patterns of DNA amplification were selected for further analysis, which yielded a total of 199 polymorphic RAPD markers. Dice's similarity coefficients for pair-wise comparisons ranged from 0.55 to 0.82, with the average of 0.76. A dendrogram constructed on the basis of the unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) clearly grouped 12 of 14 Daeng Ubon germplasm into two clusters. The major cluster consisted of nine Daeng Ubon genotypes which can be classified into four sub-clusters whereas the other comprised of three Daeng Ubon genotypes. The first three principal component analysis (PCA) accounted for 56 % of the total variation of the estimated genetic similarity. A high cophenetic values (r= 0.84) was found between the RAPD data matrix and cophenetic matrix, indicating a good fit of this performed cluster analysis. Our results suggested that genetic diversity patterns of Daeng Ubon germplasm in this study was less diverse.

Keywords: *Doritis pulcherrima* var. *Buyssoniana*, genetic diversity, RAPD markers

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *Buyssoniana*) ที่ปลูกในพื้นที่ต่างๆ ในจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 14 สายต้น โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี จากการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดี จำนวน 110 ไพรเมอร์ พบว่า มีเพียง 26 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างชัดเจนและสามารถใช้เป็นเครื่องหมายอาร์เอพีดีในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้มีจำนวน 199 เครื่องหมาย นำข้อมูลมาประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของ Dice (Dice's similarity coefficients) พบว่ามีค่าตั้งแต่ 0.55 ถึง 0.82 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.76 จากนั้นนำมาจัดกลุ่มโดยใช้ unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้แดงอุบล 12 สายต้น จาก 14 สายต้น ได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มใหญ่มีสมาชิก 9 สายต้น และแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ส่วนกลุ่มเล็กมีสมาชิก 3 สายต้น ค่าผลรวมที่ได้จากการวิเคราะห์ principal component analysis (PCA) สาม PCA แรกสามารถอธิบายความผันแปรทั้งหมดของการประเมินความเหมือนทางพันธุกรรมได้ 56 เปอร์เซ็นต์ การจัดกลุ่มโดยใช้ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมนี้มีค่า cophenetic สูง (r = 0.84) แสดงว่าการจัดกลุ่มนี้มีความเหมาะสม ผลจากการวิจัยพบว่ากล้วยไม้แดงอุบลที่นำมาศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ

คำสำคัญ: กล้วยไม้แดงอุบล ความหลากหลายทางพันธุกรรม เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

[1] คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190
[1] Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand 34190
* Corresponding author: sureeporn.k@ubu.ac.th

คำนำ

กล้วยไม้แดงอุบล (*Dontis pulcherrima* var. *Buyssonana*) เป็นกล้วยไม้ในสกุลม้าวิ่ง (*Dontis*) มีความโดดเด่นด้านขนาดดอกที่ใหญ่กว่าสายพันธุ์อื่นๆ ในสกุลเดียวกัน กลีบดอกตั้ง ฟอร์มดอกกลม พบตามธรรมชาติ มีโครโมโซมเป็น 4n ลักษณะที่น่าสนใจของกล้วยไม้ชนิดนี้คือ มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี ก้านดอกยาวแข็งแรง มีปริมาณดอกมาก (ระพี, 2517) แดงอุบลจัดเป็นไม้ประจำถิ่นของจังหวัดอุบลราชธานี เนื่องจากพบความหลากหลายของสีดอก ฟอร์มดอก ลักษณะต้นและปริมาณต้นมากที่สุดในจังหวัดอุบลราชธานี แดงอุบลมีกระจายพันธุ์เฉพาะบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยจะพบปริมาณมากทางตอนใต้ของภาค เช่น จังหวัดอุบลราชธานี และอีกบางจังหวัดแถบเทือกเขาภูพาน โดยพบตามพื้นดิน โขดหินในป่าโปร่ง (ระพี, 2517) แดงอุบลเป็นกล้วยไม้พื้นเมืองที่มีศักยภาพในการเป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อผลิตกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ หรือปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะที่ดีขึ้นสามารถผลิตเพื่อเป็นการค้าได้ อย่างไรก็ตามข้อมูลด้านพันธุกรรมของกล้วยไม้แดงอุบลยังไม่มีการศึกษาวิจัยมาก่อน ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้แดงอุบลที่เก็บรวบรวมเชื้อพันธุกรรมจากจังหวัดอุบลราชธานีโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

อุปกรณ์และวิธีการ

กล้วยไม้แดงอุบลที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 14 สายต้น เก็บรวบรวมจากสถานที่ต่างๆ ในจังหวัดอุบลราชธานี คือ สายต้น NK รวบรวมจากภูพลาญใหญ่ อ.บุณฑริก สายต้น CM ซื้อจากชาวบ้านที่ ต. ช่องเม็ก อ.สิรินธร (อาจเป็นไปได้ว่ามาจากแคว้นจำปาสัก ประเทศลาว) สายต้น PK เก็บรวบรวมจาก อ.กุดข้าวปุ้น และสายต้น DB เก็บรวบรวมจาก ต.ช่องเม็ก อ.สิรินธร

การสกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้แดงอุบลใช้วิธี 2% CTAB with phenol-chloroform (Sue et.al., 1997) จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ 10 ng, $MgCl_2$ 3 mM, *Taq* DNA polymerase 1U, 1x PCR buffer dNTPs 200 µM และ ไพรเมอร์ 0.6 µM ในปริมาตร 20 µl โดยใช้ PCR profile ดังนี้ คือ 94°C นาน 4 นาที ตามด้วยโปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 45 รอบ ที่ 94°C นาน 1 นาที 36°C นาน 1 นาที และ 72°C นาน 2 นาที สุดท้ายปรับอุณหภูมิ 72°C นาน 10 นาที โดยใช้อาร์เอพีดีไพรเมอร์ จำนวน 110 ไพรเมอร์ จากนั้นเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน จำนวน 26 ไพรเมอร์ มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้แดงอุบล

บันทึกข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่แยกความแตกต่าง (Polymorphic bands) ของกล้วยไม้แดงอุบลจำนวน 14 สายต้น แบบ binary data โดยกำหนดสัญลักษณ์ "1" คือ การปรากฏแถบดีเอ็นเอ และ "0" คือ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS version 2.2 (Rohlf, 2004) โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice (Dice's Similarity coefficient) (Dice, 1945) จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (Cluster analysis) ด้วยวิธี Unweighted pair group method based on arithmetic average (UPGMA) เพื่อสร้าง Dendrogram จากนั้นวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (Principal component analysis) เพื่อตรวจสอบรูปแบบความผันแปรของจีโนไทป์ และตรวจสอบความแม่นยำของการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation (r) โดยการเปรียบเทียบระหว่าง genetic similarity matrix ที่ใช้ในการจัดกลุ่มและค่า cophenetic value matrix

ผลและวิจารณ์

การคัดเลือกไพรเมอร์และการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (Primer screening and RAPD fingerprinting)

จากการคัดกรองอาร์เอพีดีไพรเมอร์จำนวน 110 ไพรเมอร์ พบว่า มีเพียง 26 ไพรเมอร์ ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน ไพรเมอร์เหล่านี้มีเปอร์เซ็นต์ GC content 60-70 % นำไพรเมอร์ดังกล่าวมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้แดงอุบลที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ จำนวน 14 สายต้น ได้ RAPD marker จำนวน 199 markers

ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Genetic similarity)

จากการวิเคราะห์ความใกล้ชิดหรือความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้แดงอุบลจาก RAPD markers จำนวน 199 markers โดยวิธีของ Dice พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม มีค่าตั้งแต่ 0.55 - 0.82 (ตารางที่ 1) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.76 โดยสายต้น CM11 และสายต้น CM13 ที่ซื้อจากชาวบ้านที่ ต.ช่องเม็ก อ.สิรินธร มีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด (0.82) ซึ่งทั้งสองสายต้นนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกันคือ ใบเรียวยาว มีจุดสีน้ำตาล รองลงมาคือ สายต้น NK7 ที่รวบรวมมาจาก ภูพลาญใหญ่ อ.บุณฑริก กับสายต้น CM12 (0.77) ส่วนสายต้น NK9 และ CM8 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมต่ำที่สุด (0.55) รองลงมาคือ สายต้น CM17 และ DB6 ที่รวบรวมจาก ต.ช่องเม็ก (0.58)

Table 1 Similarity matrix from 14 Daeng Ubon germplasm generated from Dice's estimate of similarity

	NK6	NK7	NK9	CM3	CM8	CM11	CM12	CM13	CM16	CM17	PK4	PK8	DB6	DB8
NK6	1.00													
NK7	0.75	1.00												
NK9	0.59	0.60	1.00											
CM3	0.73	0.72	0.59	1.00										
CM8	0.62	0.65	0.55	0.67	1.00									
CM11	0.70	0.69	0.63	0.76	0.62	1.00								
CM12	0.73	0.77	0.57	0.70	0.65	0.77	1.00							
CM13	0.74	0.68	0.63	0.71	0.61	0.82	0.71	1.00						
CM16	0.70	0.70	0.63	0.73	0.63	0.76	0.70	0.74	1.00					
CM17	0.68	0.68	0.61	0.69	0.62	0.70	0.70	0.69	0.75	1.00				
PK4	0.69	0.72	0.59	0.74	0.62	0.73	0.73	0.69	0.74	0.68	1.00			
PK8	0.75	0.75	0.61	0.71	0.72	0.72	0.72	0.67	0.73	0.65	0.68	1.00		
DB6	0.70	0.63	0.60	0.67	0.65	0.69	0.69	0.69	0.64	0.58	0.67	0.75	1.00	
DB8	0.68	0.71	0.62	0.67	0.60	0.68	0.70	0.70	0.71	0.64	0.74	0.75	0.68	1.00

การจัดกลุ่มทางพันธุกรรม (Cluster and principal component analyses)

การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA (UPGMA cluster analysis) ของกล้วยไม้แดงอุบลจากค่า Dice's similarity index สามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมได้ 2 กลุ่ม (cluster) ดังแสดงใน Figure 1 กลุ่มที่ 1 (Cluster I) มีสมาชิก จำนวน 9 สายต้น แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย 3 สายต้น ได้แก่ NK6, NK7 และ CM12 โดยสายต้น NK6 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับสายต้น NK7 และ CM12 เท่ากับ 0.75 และ 0.73 ตามลำดับ กลุ่มย่อยที่ 2 มี 2 สายต้น ประกอบด้วยสายต้น CM3 และ PK4 โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.74 กลุ่มย่อยที่ 3 มี 2 สายต้น ประกอบด้วยสายต้น CM11 และ CM13 ทั้งสองสายต้นนี้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด (0.82) และ กลุ่มย่อยที่ 4 มี 2 สายต้น ประกอบด้วยสายต้น CM16 และ CM17 โดยมีความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.75 ส่วนกลุ่มที่ 2 (Cluster II) มีสมาชิก 3 สายต้น ได้แก่ สายต้น PK8, DB6 และ DB8 โดยสายต้น PK8 มีความเหมือนทางพันธุกรรมกับ DB6 และ DB8 เท่ากัน คือ 0.75 จากการวิเคราะห์ พบว่ากล้วยไม้แดงอุบลสายต้น NK9 และ CM8 ไม่สามารถจัดเข้ากลุ่มใดได้ ซึ่งทั้งสองสายต้นนี้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด (0.55)

การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยใช้ RAPD markers นี้ให้ผลสอดคล้องกับการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น รูปร่างใบ สีดอก และสีของปากดอก เป็นต้น จากการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (Principal component analysis: PCA) พบว่าค่าผลรวมของสาม PCA แรกสามารถอธิบายความผันแปรทั้งหมดของการประเมินความเหมือนทางพันธุกรรมได้ 56 เปอร์เซ็นต์ การจัดกลุ่มโดยใช้ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมนี้มีค่า cophenetic correlation สูง (r = 0.84) แสดงว่าการจัดกลุ่มนี้มีความเหมาะสมและเชื่อถือได้ ผลจากการวิจัยครั้งนี้แสดงให้ทราบว่ากล้วยไม้แดงอุบลที่นำมาศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับปานกลางถึงค่อนข้างต่ำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wong and Sun (1999) ที่ศึกษาความหลากหลายของประชากรของ *Goodyera procera* (Orchidaceae) และ Li *et al.* (2002) ที่ศึกษาใน *Paphiopedium micranthum* โดยใช้ allozyme และ RAPD markers โดยความหลากหลายของประชากรกล้วยไม้ที่ปรากฏค่อนข้างต่ำนั้นอาจเป็นผลเนื่องมาจากการผสมภายในประชากร (inbreeding) และ/หรือ การแบ่งแยกของสภาพพื้นที่ปลูก (habitat fragmentation) ซึ่งปรากฏการณ์นี้อาจเกิดขึ้นกับกล้วยไม้ในสปีชีส์อื่นๆได้ เป็นผลกล้วยไม้ดังกล่าวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ

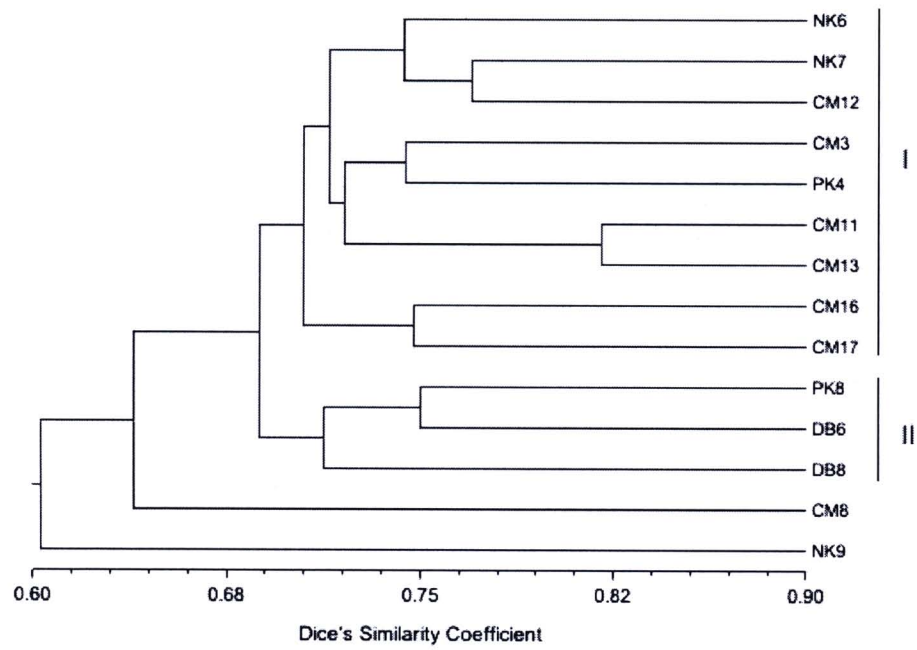


Figure 1 Dendrogram of Daeng Ubon (*D. pulcherrima* var. *Buyssonana*) germplasm in Unon Ratchathani province based on Dice's similarity index

สรุป

ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นชัดเจนว่า RAPD markers สามารถนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์และจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกล้วยไม้แดงอุบลได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพบว่า กล้วยไม้แดงอุบลที่นำมาศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมปานกลางถึงค่อนข้างต่ำ ข้อมูลพันธุกรรมนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการเลือกคู่ผสมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้แดงอุบลต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปี 2551 รหัสโครงการวิจัย 2822

เอกสารอ้างอิง

ระพี สาคริก. 2517. การเพาะปลูกกล้วยไม้ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย. โรงพิมพ์ชวนการพิมพ์. กรุงเทพฯ. 866 หน้า

Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology. 26: 297-302

Li, A., Y.B. Luo and S. Ge. 2002. A preliminary study on conservation genetics of endangered orchid (*Phphiopedium micranthum*) from southwestern China. Biochem Genet. 40: 195-201.

Rohlf, F.J.2004. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.2. Exster Software, Setauket, New York.

Sue, P., L.G.Bailey and B.R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol component. Plant Mol. Biol. Rept. 15(1): 8-15.

Wong, K.C. and M. Sun. 1999. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae) Am. J. Bot.. 86: 1406-1413.

Agricultural Sci.J. 41(2) (Suppl.) : 397-400 (2010) *ว.วิทย์.กษ. 41(2) (พิเศษ) : 397-400 (2553)*

การประเมินความความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่งโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

Assessment of genetic relationships of *Doritis pulcherrima* germplasm using AFLP technique

สุรีพร เกตุงาม[1*]
Sureeporn Kate-ngam[1*]

Abstract

The aim of this study was to determine genetic relationships of 13 *Doritis pulcherrima* germplasm collected from Sirindhorn (Chong Mek) and Pho Sai districts, Ubon Ratchathani province using amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique. A total of 121 AFLP markers were generated from 6 primers pairs of *EcoR*I+3 and *Mse*I+3 selective nucleotides and scored as binary data. Genetic similarity between genotypes based on Dice's coefficient was in the range of 0.37 to 0.96 with an average of 0.54. These similarity coefficients were utilized to construct a dendrogram using the unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA). The *D. pulcherrima* genotypes were clearly separated into two clusters. The major cluster comprised of 8 *Doritis* genotypes from Pho Sai district whereas the other consisted of 5 *Doritis* genotypes from Chong Mek, Sirindhorn district. The UPGMA clustering pattern corresponded well with geographical origin of these genotypes. The first three principal component analysis (PCA) accounted for 55.43% of the total variation of the estimated genetic similarity. Cophenetic correlation coefficient between similarity matrix and cophenetic matrix was relatively high (r= 0.92), indicating a goodness of fit of this dendrogram. Our results indicated that genetic relationship pattern of *Doritis pulcherrima* germplasm in the present study was moderately low.

Key words: *Doritis pulcherrima*, genetic relationships, AFLP markers

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima*) ที่เก็บรวบรวมจากอำเภอสิรินธร (ช่องเม็ก) และอำเภอโพธิ์ไทร จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 13 สายต้น โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี จากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ม้าวิ่งโดยใช้ไพรเมอร์ *EcoR*I+3 and *Mse*I+3 จำนวน 6 คู่ พบว่าสามารถสร้างเครื่องหมายเอเอฟแอลพีได้ทั้งสิ้น 121 เครื่องหมาย โดยบันทึกข้อมูลแบบไบนารี (1= ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และ 0 = ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ) นำข้อมูลเอเอฟแอลพีของกล้วยไม้ม้าวิ่งมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Dice พบว่า มีค่าตั้งแต่ 0.37 ถึง 0.96 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.54 จากนั้นนำค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนมาจัดกลุ่มโดยใช้วิธี unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ศึกษาได้สองกลุ่ม โดยกลุ่มใหญ่ประกอบด้วยกล้วยไม้ม้าวิ่งจำนวน 8 สายต้น จากอำเภอโพธิ์ไทร ส่วนกลุ่มเล็กประกอบด้วยกล้วยไม้ม้าวิ่งจำนวน 5 สายต้น จากช่องเม็ก อำเภอสิรินธร การจัดกลุ่มโดย UPGMA ให้ผลสอดคล้องกับกลุ่มประชากรของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มาจากแหล่งอาศัยต่างกัน ค่าผลรวมที่ได้จากการวิเคราะห์ปัจจัยหลักสามพารามิเตอร์แรกสามารถอธิบายความผันแปรทั้งหมดของการประเมินความเหมือนทางพันธุกรรมได้ 55.43 เปอร์เซ็นต์ ค่าสัมประสิทธิ์ของ cophenetic correlation ระหว่าง similarity matrix และ cophenetic matrix มีค่าสูง (r = 0.92) แสดงว่าการจัดกลุ่มนี้มีความเหมาะสมดีมาก ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดอุบลราชธานีมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ

คำสำคัญ: กล้วยไม้ม้าวิ่ง, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม, เครื่องหมายเอเอฟแอลพี

[1] คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี 34190
[1] Faculty of Agriculture, UbonRatchathani University, Warinchamrap, UbonRatchathani. 34190
* Corresponding author: sureeporn.k@ubu.ac.th

คำนำ

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) หรือ หญ้าดอกหิน เป็นกล้วยไม้ที่พบตามพื้นดิน หรือแอ่งหินที่มีอินทรีย์วัตถุดิบถมกันหนาๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยพบกล้วยไม้ในสกุลนี้แพร่กระจายอยู่ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima*) และ แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) (สมศักดิ์, 2535) โดยสายพันธุ์ม้าวิ่งจะมีขนาดดอกเล็ก กลีบเลี้ยงและกลีบดอกลู่ไปด้านหลัง มีความหลากหลายของสีดอกและสีปากมากที่สุด แต่ลำต้นมีขนาดเล็กเจริญเติบโตช้า มีจำนวนโครโมโซม 2n = 38 ม้าวิ่งเป็นกล้วยไม้พื้นเมืองที่มีศักยภาพในการเป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อผลิตกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ หรือปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะที่ดีขึ้น โดยสามารถผลิตเป็นไม้ประดับกระถางที่มีขนาดกะทัดรัด ช่อดอกสั้น ดอกขนาดใหญ่ โดยอาศัยการสร้างประชากรใหม่ด้วยวิธีการชักนำให้มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นและ/หรือการสร้างลูกผสมภายในและต่างสกุล อย่างไรก็ตามข้อมูลด้านพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่งยังไม่มีการศึกษาวิจัยมาก่อน ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เก็บรวบรวมพันธุกรรมจากจังหวัดอุบลราชธานีโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

อุปกรณ์และวิธีการ

กล้วยไม้ม้าวิ่ง ที่ใช้ในการศึกษาจำนวน 13 สายต้น เก็บรวบรวมจากสองอำเภอในจังหวัดอุบลราชธานี คือ สายต้น MV และสายต้น CM9 (ซื้อจากชาวบ้าน) จาก ต.ช่องเม็ก อ.สิรินธร จำนวน 5 สายต้น และ สายต้น MVP จาก อ.โพธิ์ไทร จำนวน 8 ต้น

การสกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ม้าวิ่งใช้วิธี 2%CTAB with phenol-chloroform (Sue et al., 1997) และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพีตามวิธีของ Vos et al. (1995) โดยตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I และเชื่อมต่อด้วย *Eco*RI และ *Mse*I adapters โดยใช้ T4 ligase จากนั้นนำ DNA fragments มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ Cascade amplification โดย preselective และ selective amplification ใช้ไพรเมอร์ *Eco*RI+A/*Mse*I+C และ *Eco*RI+3/*Mse*I+3 ตามลำดับ จากนั้นนำ PCR product ไปแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค denaturing polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมแผ่นกระจกด้วยวิธี silver staining

บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างแบบ binary data (1= ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และ 0 =ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.2 (Rohlf, 2004) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice (Dice, 1945) จากนั้นนำข้อมูลมาการจัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted pair group method based on arithmetic average เพื่อสร้าง dendrogram วิเคราะห์ปัจจัยหลัก (principal component analysis) เพื่อตรวจสอบรูปแบบความผันแปรของจีโนไทป์ และวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation coefficient (r) เพื่อตรวจสอบความแม่นยำของการจัดกลุ่ม

ผลและวิจารณ์

ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้ม้าวิ่ง (AFLP fingerprinting of D. purcherrima)

จากการสร้างลายพิมพ์เอเอฟแอลพีในกล้วยไม้ม้าวิ่งจำนวน 13 สายต้น โดยใช้ไพรเมอร์ *Eco*RI+3 and *Mse*I+3 จำนวน 6 คู่ พบว่า ได้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีทั้งสิ้น 121 เครื่องหมาย (ตารางที่ 1) โดยไพรเมอร์ E-AAG/M-CAG มีค่า polymorphic rate สูงสุด (40%) และ ไพรเมอร์ E-AAG/M-CTT มีค่า polymorphic rate ต่ำสุด (23.8 %)

Table 1 List of AFLP primers used to access genetic relationships of *D. purcherrima*

Primer combinations	Total no. of amplification products	No. of polymorphic bands	Polymorphic rate
E-AAG / M-CAG	70	28	40
E-AAG / M-CTC	80	22	27.50
E-ACC / M-CAG	70	17	24.29
E-AAG / M-CTT	67	16	23.80
E-AAC / M-CTA	67	22	32.84
E-ACG / M-CTG	60	16	26.67
Total	414	121	35.02

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง (Genetic relationships among D. purcherrima)

จากการประเมินความความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่งด้วยวิธีของ Dice พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม มีค่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.37 – 0.96 (ตารางที่ 2) และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.54 โดยสายต้น MVP19 และ MVP24 จาก อ. โพธิ์ไทร มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมากที่สุด (0.96) รองลงมาคือ สายต้น MVP2 และสายต้น MVP43 (0.70) จาก อ.โพธิ์ไทรเช่นเดียวกัน ส่วนสายต้น MV1 จาก ต. ช่องเม็ก อ. สิรินธร และ MVP2 จาก อ. โพธิ์ไทร มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมน้อยที่สุด (0.37) รองลงมาคือ สายต้น MV3 และ MVP2 (0.40) ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจาก ต.ช่องเม็กและ อ. โพธิ์ไทร ตามลำดับ

Table 2 Similarity matrix from 13 *D. pulcherrima* germplasm generated from Dice's estimate of similarity.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. MV1	1												
2. MV3	0.63	1											
3. MV4	0.62	0.66	1										
4. MV6	0.56	0.54	0.67	1									
5. CM9	0.46	0.51	0.53	0.53	1								
6. MVP2	0.37	0.40	0.45	0.41	0.43	1							
7.MVP17	0.54	0.56	0.54	0.47	0.56	0.61	1						
8.MVP19	0.51	0.50	0.50	0.54	0.45	0.64	0.64	1					
9.MVP24	0.55	0.52	0.54	0.55	0.48	0.66	0.66	0.96	1				
10.MVP26	0.47	0.47	0.46	0.48	0.46	0.69	0.60	0.61	0.63	1			
11.MVP27	0.44	0.43	0.40	0.52	0.50	0.61	0.65	0.61	0.63	0.64	1		
12.MVP42	0.46	0.49	0.46	0.48	0.53	0.68	0.65	0.58	0.60	0.57	0.59	1	
13.MVP43	0.45	0.50	0.46	0.48	0.46	0.70	0.63	0.62	0.64	0.66	0.63	0.67	1

การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง (Cluster and principal component analyses among D. purcherrima)

การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่งจากค่า Dice's similarity index ด้วยวิธี UPGMA (UPGMA cluster analysis) สามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมได้ 2 กลุ่ม (Figure 1) กลุ่มใหญ่ (Cluster I) มีสมาชิก 8 สายต้น เป็นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เก็บรวบรวมมาจาก อ. โพธิ์ไทรทั้งหมด ส่วนกลุ่มเล็ก (Cluster II) มีสมาชิก จำนวน 5 สายต้น ประกอบด้วยกล้วยไม้ม้าวิ่งจาก ต.ช่องเม็ก อ.สิรินธร โดยสายต้น CM9 ที่ซื้อมาจากชาวบ้านไม่สามารถรวมกลุ่มกับกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เก็บรวบรวมเองจากพื้นที่ดังกล่าว โดยอาจเป็นไปได้ว่าสายต้น CM9 นั้นเป็นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มาจากประเทศลาวซึ่งชาวบ้านเก็บมาขาย การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี ให้ผลสอดคล้องกับกลุ่มประชากรของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มาจากแหล่งอาศัยต่างกัน (geographical origin)

จากการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (principal component analysis) พบว่า ค่าผลรวมของปัจจัยหลักสามพารามิเตอร์แรกสามารถอธิบายความผันแปรทั้งหมดของการประเมินความเหมือนทางพันธุกรรมได้สูงถึง 55.43 เปอร์เซ็นต์ โดยปัจจัยหลักที่หนึ่ง สอง และสาม สามารถอธิบายความผันแปรของการประเมินความเหมือนทางพันธุกรรมได้ 31.41 14.43 และ 9.59 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ การจัดกลุ่มโดยใช้ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมนี้มีค่าสัมประสิทธิ์ cophenetic correlation สูง (r = 0.92) แสดงว่าการจัดกลุ่มนี้มีความเหมาะสมดีมากและเชื่อถือได้ ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งที่เก็บรวบรวมจาก อ. สิรินธร (ช่องเม็ก) และ อ. โพธิ์ไทร จังหวัดอุบลราชธานี มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอยู่ในระดับปานกลางถึงค่อนข้างต่ำ โดยความผันแปรทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่ปรากฏนี้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากการผสมภายในประชากร (inbreeding) และ/หรือ การแบ่งแยกของสภาพพื้นที่ปลูก (habitat fragmentation) (Aizen and Feinsinger 1994; Li et al., 2002; Wong and Sun,1999) ซึ่งปัจจัยดังกล่าวมีบทบาทสำคัญทำให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมและส่งผลกระทบต่อโครงสร้างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย

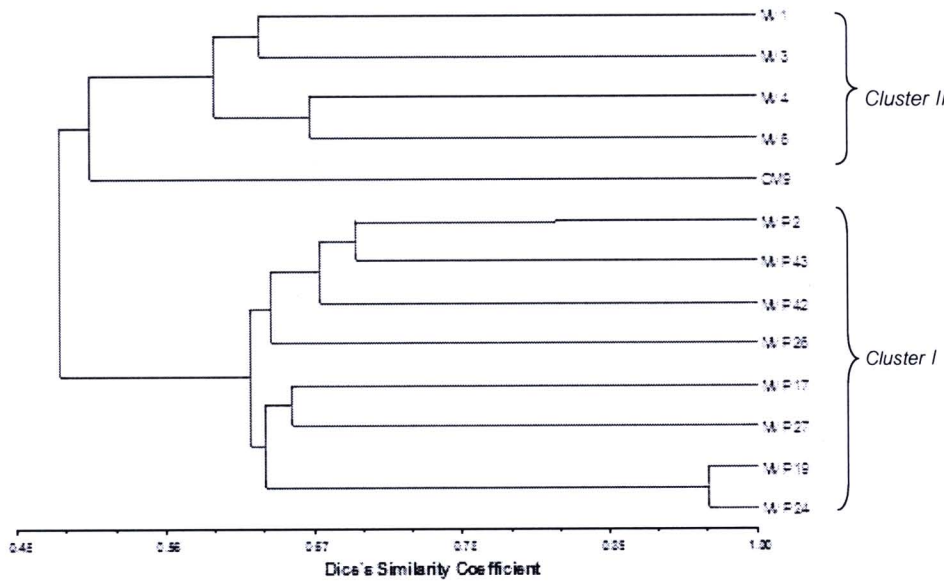


Figure 1 Dendrogram of *D. pulcherrima* germplasm, collected from Sirindhorn (Chong Mek) and Pho Sai districts in Ubon Ratchathani Province, based on Dice's similarity index

สรุป

จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายเอเอฟแอลพีในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่งได้อย่างชัดเจน กล้วยไม้ม้าวิ่งจาก อ.สิรินธร และ อ.โพธิ์ไทร จ. อุบลราชธานี มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับปานกลางถึงค่อนข้างต่ำ ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกคู่ผสมของกล้วยไม้ม้าวิ่งเพื่อการปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปี 2552

เอกสารอ้างอิง

สมศักดิ์ รักไพบูลย์สมบัติ 2535. ทำเนียบกล้วยไม้ไทย สุริวงศ์ บุ๊ค เซนเตอร์ เชียงใหม่

Aizen M.A. and P. Feinsinger. 1994. Forest fragmentation, pollination and plant reproduction in a Chaco dry forest, Argentina. Ecol. 75: 330–351.

Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26: 297-302.

Li, A., Y.B. Luo and S. Ge. 2002. A preliminary study on conservation genetics of endangered orchid (*Phphiopedium micranthum*) from southwestern China. Biochem Genet. 40: 195-201.

Rohlf, F.J. 2004. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.2. Exeter Software, Setauket, New York.

Sue, P., L.G. Bailey and B.R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol component. Plant Mol. Biol. Rept.15 (1): 8-15.

Wong, K.C. and M. Sun. 1999. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae) Am. J. Bot. 86: 1406-14.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407–4414.

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

A comparative study of different RAPD-PCR protocols for genetic diversity analysis of *Doritis* germplasm

สุรีพร เกตุงาม[1] และ พัชรี ลาโคตร[1]

Sureeporn Kate-ngam[1] and Padcharee Lakote[1]

Abstract

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) is a simple, fast and cost effective method for assessing genetic diversity of plant varieties. The reproducibility of the RAPD amplification was affected by several factors, therefore causing misinterpretation. In this study, we analyzed the effect of changing the concentration of magnesium chloride, template genomic DNA and *Taq* DNA polymerase with the objective of determining the optimum concentration for standardization of RAPD technique for assessing genetic diversity of *Doritis* germplasm in the North-east of Thailand. The optimized RAPD reaction was performed by varying the concentration of $MgCl_2$ (2.0, 2.5 and 3.0 mM), DNA template (10 and 20 ng) and *Taq* DNA polymerase (0.5, and 1.0 U) while fixing the concentration of RAPD primer and dNTPs at the concentration of 0.6 uM and 200 uM respectively. Reproducible amplification patterns with OPA02 primer were obtained using 2.5 mM of $MgCl_2$, 10 ng of template DNA and 1 U of *Taq* DNA polymerase in 20 ul of the reaction. The optimized RAPD protocol was employed to select the suitable RAPD primers for fingerprinting of *Doritis* germplasm. Out of 98 RAPD primers screening, 32 primers revealed clear patterns of DNA amplifications and could be utilized as RAPD markers. These chosen primers will be useful for determining genetic diversity of these exotic *Doritis* germplasm.

Keywords: RAPD, PCR optimization, *Doritis* orchid

บทคัดย่อ

อาร์เอพีดีเป็นเทคนิคหนึ่งที่นิยมใช้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ง่ายต่อการปฏิบัติ รวดเร็ว และมีค่าใช้จ่ายน้อย ในปฏิกิริยาอาร์เอพีดีนั้นพบว่ามีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งทำให้การวิเคราะห์ผลคลาดเคลื่อนไป วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อหา RAPD protocol ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยกำหนดตัวแปรที่ศึกษา 3 ตัวแปร ได้แก่ ปริมาณความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ (2.0 2.5 และ 3.0 มิลลิโมลาร์) ดีเอ็นเอต้นแบบ (10 และ 20 นาโนกรัม) และ *Taq* DNA polymerase (0.5 และ 1.0 ยูนิต) และกำหนดให้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ และ dNTPs คงที่ คือ 0.6 และ 200 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งโดยใช้ไพรเมอร์ OPA02 ที่เหมาะสมนั้นได้จากระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ 2.5 มิลลิโมลาร์ ดีเอ็นเอต้นแบบ 10 นาโนกรัม และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นดำเนินการคัดเลือกไพรเมอร์เพื่อใช้ในปฏิกิริยาอาร์เอพีดีที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนในกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบล จากการทดสอบไพรเมอร์ทั้งหมด 98 ไพรเมอร์ พบว่า 32 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีได้ เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีเหล่านี้ สามารถนำไปสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อใช้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยได้ต่อไป

คำสำคัญ: อาร์เอพีดี การปรับระดับความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์ กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

[1] คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

[1] Faculty of Agriculture, UbonRatchathani University, Warinchamrap, UbonRatchathani, 34190

OF-16

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้แดงอุบลโดยเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

Analysis of Genetic Diversity of Daeng Ubon Orchids (*Doritis pulcherrima* Var. *Buyssoniana*) using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers

สุรีพร เกตุงาม[1*] **และพัชรี ลาโคตร**[1]

Sureeporn Kate-ngam[1*] and Padcharee Lakote[1]

Abstract

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to estimate genetic diversity among 14 Daeng Ubon orchids (*Doritis pulcherrima* var. *Buyssoniana*), collected from different growing regions in Ubon Ratchathani Province. Out of 110 RAPD primers screened, 26 primers revealing clear patterns of DNA amplification were selected for further analysis, which yielded a total of 199 polymorphic RAPD markers. Dice's similarity coefficients for pair-wise comparisons ranged from 0.55 to 0.82, with the average of 0.76. A dendrogram constructed on the basis of the unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) clearly grouped 12 of 14 Daeng Ubon germplasm into two clusters. The major cluster consisted of nine Daeng Ubon genotypes which can be classified into four sub-clusters whereas the other comprised of three Daeng Ubon genotypes. The first three principal component analysis (PCA) accounted for 56 % of the total variation of the estimated genetic similarity. A high cophenetic values (r= 0.84) was found between the RAPD data matrix and cophenetic matrix, indicating a good fit of this performed cluster analysis. Our results suggested that genetic diversity patterns of Daeng Ubon germplasm in this study was less diverse.

Key words: *Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*, genetic diversity, RAPD markers

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var. Buyssoniana) ที่ปลูกในพื้นที่ต่างๆ ในจังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 14 สายต้น โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี จากการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดี จำนวน 110 ไพรเมอร์ พบว่า มีเพียง 26 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างชัดเจนและสามารถใช้เป็นเครื่องหมายอาร์เอพีดีในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้มีจำนวน 199 เครื่องหมาย นำข้อมูลมาประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของ Dice (Dice's similarity coefficients) พบว่ามีค่าตั้งแต่ 0.55 ถึง 0.82 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.76 จากนั้นนำมาจัดกลุ่มโดยใช้ unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้แดงอุบล 12 สายต้นจาก 14 สายต้น ได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มใหญ่มีสมาชิก 9 สายต้น และแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ส่วนกลุ่มเล็กมีสมาชิก 3 สายต้น ค่าผลรวมที่ได้จากการวิเคราะห์ principal component analysis (PCA) สาม PCA แรกสามารถอธิบายความผันแปรทั้งหมดของการประเมินความเหมือนทางพันธุกรรมได้ 56 เปอร์เซ็นต์ การจัดกลุ่มโดยใช้ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมนี้มีค่า cophenetic สูง (r = 0.84) แสดงว่าการจัดกลุ่มนี้มีความเหมาะสม ผลจากการวิจัยพบว่ากล้วยไม้แดงอุบลที่นำมาศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ

คำสำคัญ: กล้วยไม้แดงอุบล ความหลากหลายทางพันธุกรรม เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี

[1] คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190

[1] Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, Thailand 34190

[*] Corresponding author: sureeporn.k@ubu.ac.th

การประเมินความความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่งโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

Assessment of genetic relationships of *Doritis pulcherrima* germplasm using AFLP technique

สุรีพร เกตุงาม[1]
Sureeporn Kate-ngam[1]

Abstract

The aim of this study was to determine genetic relationships of 13 *Doritis pulcherrima* germplasm collected from Sirindhorn (Chong Mek) and Pho Sai districts, Ubon Ratchathani province using amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique. A total of 121 AFLP markers were generated from 6 primers pairs of *EcoR*I+3 and *Mse*I+3 selective nucleotides and scored as binary data. Genetic similarity between genotypes based on Dice's coefficient was in the range of 0.37 to 0.96 with an average of 0.54. These similarity coefficients were utilized to construct a dendrogram using the unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA). The *D. pulcherima* genotypes were clearly separated into two clusters. The major cluster comprised of 8 *Doritis* genotypes from Pho Sai district whereas the other consisted of 5 *Doritis* genotypes from Chong Mek, Sirindhorn district. The UPGMA clustering pattern corresponded well with geographical origin of these genotypes. The first three principal component analysis (PCA) accounted for 55% of the total variation of the estimated genetic similarity. Cophenetic correlation coefficient between similarity matrix and cophenetic matrix was relatively high (r= 0.92), indicating a goodness of fit of this dendrogram. Our results indicated that genetic relationship pattern of *Doritis pulcherrima* germplasm in the present study was moderately low.

Key words: *Doritis pulcherrima*, genetic relationships, AFLP markers

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritispulcherrima*) ที่เก็บรวบรวมจากอำเภอสิรินธร (ช่องเม็ก) และอำเภอโพธิ์ไทร จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 13 สายต้น โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี จากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ม้าวิ่งโดยใช้ไพรเมอร์ *EcoR*I+3 and *Mse*I+3 จำนวน 6 คู่ พบว่าสามารถสร้างเครื่องหมายเอเอฟแอลพีได้ทั้งสิ้น 121 เครื่องหมาย โดยบันทึกข้อมูลแบบไบนารี (1= ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และ 0 = ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ) นำข้อมูลเอเอฟแอลพีของกล้วยไม้ม้าวิ่งมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมโดย Dice's coefficient พบว่ามีค่าตั้งแต่ 0.37 ถึง 0.96 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.54 จากนั้นนำค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนมาจัดกลุ่มโดยใช้วิธี unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ศึกษาได้สองกลุ่ม โดยกลุ่มใหญ่ประกอบด้วยกล้วยไม้ม้าวิ่งจำนวน 8 สายต้น จากอำเภอโพธิ์ไทร ส่วนกลุ่มเล็กประกอบด้วยกล้วยไม้ม้าวิ่งจำนวน 5 สายต้น จากช่องเม็ก อำเภอสิรินธร การจัดกลุ่มโดย UPGMA ให้ผลสอดคล้องกับกลุ่มประชากรของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่มาจากแหล่งอาศัยต่างกัน ค่าผลรวมที่ได้จากการวิเคราะห์ปัจจัยหลักสามพารามิเตอร์แรกสามารถอธิบายความผันแปรทั้งหมดของการประเมินความเหมือนทางพันธุกรรมได้ 55 เปอร์เซ็นต์ ค่าสัมประสิทธิ์ของ cophenetic correlation ระหว่าง similarity matrix และ cophenetic matrix มีค่าสูง (r = 0.92) แสดงว่าการจัดกลุ่มนี้มีความเหมาะสมดีมาก ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดอุบลราชธานีมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ

คำสำคัญ: กล้วยไม้ม้าวิ่ง ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เครื่องหมายเอเอฟแอลพี

[1] คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี 34190
[1] Faculty of Agriculture, UbonRatchathani University, Warinchamrap, UbonRatchathani, 34190
Corresponding author: sureeporn.k@ubu.ac.th

การประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 7
THE 7th NATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS 2008

ขอมอบใบประกาศเกียรติคุณรางวัลดีเด่น
ในการนำเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ สาขาไม้ดอกไม้ประดับ
ประเภทนักวิจัย

ให้แก่

คุณสุรีพร เกตุงาม

มอบให้ไว้ ณ วันที่ 29 พฤษภาคม พ.ศ. 2551

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาท)
คณบดีคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

A Comparative Study of Different RAPD-PCR Protocols for Genetic Diversity Analysis of *Doritis* Germplasm

Sureeporn Kate-ngam and Padcharee Lakote*

Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Warinchamrap, Ubon Ratchathani 34190

*Corresponding author (E-mail: sureeporn.k@ubu.ac.th)

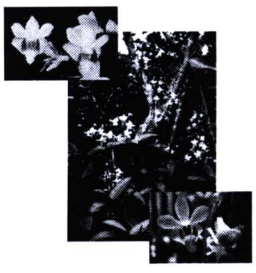
Abstract

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) is a simple, fast and cost effective method for assessing genetic diversity of plant varieties. The reproducibility of the RAPD amplification was affected by several factors, therefore causing misinterpretation. In this study, we analyzed the effect of changing the concentration of magnesium chloride, template genomic DNA and *Taq* DNA polymerase with the objective of determining the optimum concentration for standardization of RAPD technique for assessing genetic diversity of *Doritis* germplasm in the North-east of Thailand. The optimized RAPD reaction was performed by varying the concentration of $MgCl_2$ (2.0, 2.5 and 3.0 mM), DNA template (10 and 20 ng) and *Taq* DNA polymerase (0.5, and 1.0 U) while fixing the concentration of RAPD primer and dNTPs at the concentration of 0.6 uM and 200 uM respectively. Reproducible amplification patterns with OPA02 primer were obtained using 2.5 mM of $MgCl_2$, 10 ng of template DNA and 1 U of *Taq* DNA polymerase in 20 ul of the reaction. The optimized RAPD protocol was employed to select the suitable RAPD primers for fingerprinting of *Doritis* germplasm. Out of 98 RAPD primers screening, 32 primers revealed clear patterns of DNA amplifications and could be utilized as RAPD markers. These chosen primers will be useful for determining genetic diversity of the *Doritis* germplasm.

Key words: RAPD, PCR optimization, *Doritis* orchid

Introduction

Random amplified polymorphic DNAs (RAPD) have been widely employed for DNA fingerprinting of crop plants since it offers advantages in speed, technical simplicity and identification of polymorphisms. This technique involves the amplification of random segments of genomic DNA by PCR, using short single primers of arbitrary sequence (William *et al.*, 1990). RAPD requires very small quantities of DNA, and no cloning, sequencing or hybridization is necessary. For these reasons, it has a distinct advantages over other molecular techniques generally used for genomic characterization.



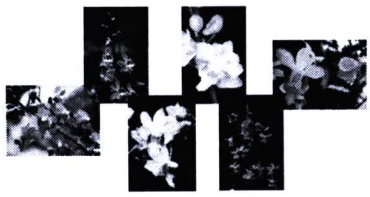
However a common experienced with RAPD analysis is its poor reproducibility. It is therefore essential to optimize the PCR to obtain reproducible and interpretable results.

In this study we aimed to develop a reliable RAPD fingerprinting method for genetic diversity assessment of *Doritis (Doritis pulcherrima)* germplasm. The concentration of critical components in PCR reaction was optimized to obtain reproducible DNA amplification. Screening of RAPD primers suitable for *Doritis* fingerprinting was performed using the optimized RAPD-PCR.

Materials and Methods

Plant materials

Doritis (*Doritis pulcherrima*) germplasm used in this study were collected from different natural habitats in Mukdahan and Ubon Ratchathani provinces. Plants were raised in the greenhouse at Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University.



DNA extraction and RAPD-PCR optimization

Total genomic DNA was extracted from young actively growing leaves of *Doritis* genotypes using the protocol, originated from Dellaporta *et.al.* (1993), which is described by Ziegenhagen *et. al.* (1993). The procedure was also modified by adding high concentration of NaCl to remove polysaccharides. The phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation of DNA were also included to ensure the purity of DNA.

The primer OPA02 was used to optimize the RAPD-PCR of *Doritis* germplasm. The amplification was performed in a final volume of 20 µl containing 1X PCR buffer (Promega), 200 mM of each dNTPs (Promega), and 0.6 µM of primer with different concentrations of DNA templates (10 and 20 ng), $MgCl_2$ (2.0, 2.5, and 3.0 mM) and *Taq* DNA polymerase (0.5 and 1.0 U) (Fermentus) in order to determine the optimal concentration for PCR reaction. The reactions were carried out in a thermal cycler (Perkin Elmer 9700) according to following amplification profile of initial denaturation at 94°C for five min, followed by 40 cycles of one min at 94°C, one min at 36°C and two min of 72°C. The reaction was further extended at 72°C for 10 min.

Amplification products were separated in 1.2 % agarose gel stained with ethidium bromide in TBE buffer for 2 hours at 80 Volts. Subsequently, gels were visualized on UV light in Gel documentation. DNA fragment sizes were estimated by comparison with standard DNA marker, 1 kb DNA ladder.

RAPD analysis and primer selection

The optimized RAPD-PCR reaction was used for RAPD primer screening. Four *Doritis* genotypes belonging to *D. pulcherrima* (MDM no.5 and MDM no.14) and *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* (MDD no.3 and MDD no.13) collected from Mukdahan province were randomly selected for primer screening using 98 primers from the Operon kit series (Operon Technologies, Germany). The primers that gave reproducible and scorable amplifications and generated the most polymorphic patterns were selected and preliminary validated for RAPD fingerprinting of 15 *Doritis* germplasm.

Results and Discussion

Optimization of RAPD-PCR reaction

The alterations in different parameters tested had vary degrees of influence on the RAPD amplification patterns and its reproducibility. The concentration of the tested parameters including of template DNA (10 and 20 ng), $MgCl_2$ (2.0, 2.5, 3.0 mM), and *Taq* DNA polymerase (0.5 and 1.0 U) were selected based on clear and scorable DNA bands produced. The optimum reaction mixture which gave best amplification pattern was obtained using 10 ng of DNA template, 2.5 mM of $MgCl_2$ and 1.0 U of *Taq* DNA polymerase. A higher or lower concentration of those parameters resulted in either sub-optimal or complete lack of PCR amplifications.

An efficient and robust protocol for RAPD analysis should be reasonably resistant to variations in template concentrations. High amount of DNA usually inhibit amplification due to competition of the primers for the template DNA (Micheli *et.al.*, 1994). Consequently, several quantities of DNA template should be tested not only to ensure a large number of bands but also to verify the optimized conditions for PCR.

Magnesium is an essential component of PCR reactions and affects the quality of RAPD profiles obtained. Generally, increasing amounts of Mg^{2+} will result in the accumulation of non-specific amplification products, although insufficient Mg^{2+} will reduce the yield. Typically $MgCl_2$ concentrations range from 1-8 mM in most RAPD analyses reported in the literature.

Taq is the most frequently used polymerase in RAPD-PCR. The quantity of *Taq* DNA polymerase also affects reproducibility of RAPD pattern. The intensity of bands increases correspondingly with increasing *Taq* DNA polymerase up to 2 U. After this concentration, the amplification profile is not affected by the enzyme concentration.

Primer selection and survey

The suitability of the RAPD technique to detect DNA polymorphisms among *Doritis* germplasm was determined using the optimized RAPD-PCR. Ninety-eight 10-base oligonucleotide primers from Operon kits were initially screened against four *Doritis* genotypes. The RAPD primers yielding distinctive DNA patterns were selected and could be used as RAPD markers to fingerprints the *Doritis* germplasm (Figure 1).

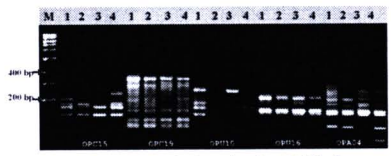


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments obtained from RAPD primer screening of four *Doritis* genotypes using five RAPD primers, OPC15, OPC19, OPU10, OPU16 and OPA04. (M = 1kb DNA ladder, 1 = MDD3, 2 = MDD13, 3 = MDM5, 4 = MDM14)

Out of ninety-eight Operon primers checked, 66 did not produce polymorphic bands or did not amplify clear products. Therefore, the 32 primers which produced good and reproducible polymorphic bands were chosen and used to further identify and detect genetic variation of *Doritis* germplasm in the Northeast of Thailand.

Preliminary RAPD fingerprint of Doritis germplasm

We have shown here preliminary RAPD fingerprint of 15 *Doritis* germplasm collected from the natural habitats in Mukdahan and Ubon Ratchathani provinces using primer OPA02 (Figure 2). This primer showed distinctive and satisfactory amplification patterns. The polymorphic DNA fragments among these genotypes were scored as RAPD markers. Therefore, the 32 selected RAPD primers from this study will be useful to produce RAPD markers for further determining genetic diversity in *Doritis* germplasm from the Northeast of Thailand.

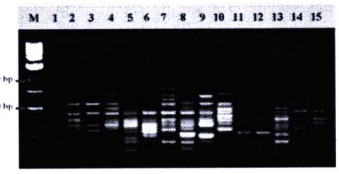


Figure 2 RAPD fingerprints of 15 *Doritis* (*D. pulcherrima*) germplasm from Mukdahan and UbonRatchathani Provinces using primer OPA02 (5'-TGCCGAGCTG-3'). M = 1 kb DNA ladder, 1 = MDD no.3, 2 = MDD no.13, 3 = MDM no.5, 4 = MDM no.14, 5 = NK no.3, 6 = NK no.4, 7 = PR no.15, 8 = PAA no.6, 9 = PT no.1, 10 = MVP no.39, 11 = PR no.8, 12 = PA no.11, 13 = MVP no.27, 14 = NK no.1, 15 = MDD no.7

Summary

The reproducibility of RAPD amplification is known to be highly influenced by experimental conditions (Wolff *et al.*, 1993), but there is usually a "window" through which reproducible results can be obtained (Williams *et al.*, 1993). Here we have identified such a "window" for reproducible RAPD amplifications for *Doritis pulcherrima*. The standard reaction developed included 10 ng of DNA extracted using a SDS-based protocol, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.6 µM primer, 200 mM of each dNTPs and 1.0 U of *Taq* DNA polymerase per 20 µl of PCR reaction. This powerful approach to detect polymorphism will provide a rapid molecular tool for various applications related to the molecular genetics studies of *Doritis* germplasm.

Acknowledgement

This research was financially supported by a grant from Ubon Ratchathani University.

References

Dellaporta *et. al.*, 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Mol. Rep. 1: 19-21.
Micheli *et. al.* 1994. Reproducible DNA fingerprint with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. Nucleic Acids Res. 22:1921-1922.
Williams *et. al.* 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 8 (22): 6531-6535.
Williams *et. al.* 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods in Enzymology. 218: 704-741.
Wolff *et. al.* 1993. Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in Chrysanthemum. Theor. Appl. Genet. 86: 1033-1037.
Ziegenhagen *et. al.* 1993. A procedure for mini-preparations of genomic DNA from needles of silver fir (*Abies alba*) plant. Mol Biol Rep. 11: 117-121.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

ขอมอบใบประกาศเกียรติคุณระดับ ดี

ในการนำเสนอผลงาน ภาคโปสเตอร์ สาขาไม้ดอก/ไม้ประดับ

เรื่อง การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่งโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

ให้แก่

สุรีพร เกตุงาม

เนื่องในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 9

THE 9th NATIONAL HORTICULTURAL CONGRESS 2010

วันที่ 11-14 พฤษภาคม พ.ศ. 2553

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จริยา หาสิตพานิชกุล)

อธิการบดีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

การประเมินความความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

สุรีพร เกตุงาม[1*]

[1] คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี 34190

*Corresponding author (✉): sureeporn.k@ubu.ac.th

คำนำ

กล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima*) เป็นกล้วยไม้ที่พบตามพื้นดินหรือแก่งหินที่มีอินทรีย์วัตถุคลุมกันหนาๆ พบกระจายอยู่ทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

ลักษณะของม้าวิ่ง: ดอกมีขนาดเล็ก กลีบเลี้ยงและกลีบดอกคู่ไปด้านหลัง มีความหลากหลายของสีดอกและสีปากมากที่สุด ลำต้นมีขนาดเล็ก เจริญเติบโตช้า

จำนวนโครโมโซม 2n = 38

ม้าวิ่งเป็นกล้วยไม้พื้นเมืองที่มีศักยภาพในการเป็นพ่อแม่พันธุ์พันธุ์เพื่อผลิตกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ หรือปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะที่ดีขึ้น

ข้อมูลด้านพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่งยังไม่มีการศึกษาวิจัยมาก่อน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เก็บรวบรวมพันธุกรรมจากจังหวัดอุบลราชธานีโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

อุปกรณ์และวิธีการ

การรวบรวมสายพันธุ์

การสร้างลายพิมพ์เอเอฟแอลพี

- การสกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ม้าวิ่งใช้วิธี 2%CTAB with phenol-chloroform (Sue et al., 1997)
- สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพีตามวิธีของ Vos et al. (1995)
  - ใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I และเชื่อมต่อด้วย *Eco*RI และ *Mse*I adapters โดยใช้ T4 ligase
  - นำ ligated DNA fragments มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ Cascade amplification
    - Preselective amplification ใช้ไพรเมอร์ *Eco*RI+A/ *Mse*I+C
    - Selective amplification ใช้ไพรเมอร์และ *Eco*RI+3/*Mse*I+3
  - นำ PCR product ไปแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค denaturing polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมแผ่นกระจกด้วยวิธี silver staining

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

- บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic bands) แบบ binary data
- วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYS version 2.2 (Rohlf, 2004)
  - คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice (Dice, 1945)
  - นำข้อมูลความเหมือนทางพันธุกรรมมาการจัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted pair group method based on arithmetic average (UPGMA) เพื่อสร้าง dendrogram
  - วิเคราะห์ปัจจัยหลัก (principal component analysis) เพื่อตรวจสอบรูปแบบความผันแปรของจีโนไทป์
  - วิเคราะห์ค่า cophenetic correlation coefficient (r) เพื่อตรวจสอบความแม่นยำของการจัดกลุ่ม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปี 2552

เอกสารอ้างอิง

Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26: 297-302.

Rohlf, F.J. 2004. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.2. Exeter Software. Setauket, New York.

Sue, P., L.G.Bailey and B.R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol component. Plant Mol. Biol. Rept.15 (1): 8-15.

Vos P, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 23:4407–4414.

ผลการวิจัย

ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้ม้าวิ่ง

ไพรเมอร์ *Eco*RI+3 and *Mse*I+3 จำนวน 6 คู่ สร้างลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ศึกษาจำนวน 13 สายต้น ได้AFLP marker จำนวน 121 markers (ตารางที่ 1) โดยไพรเมอร์ E-AAG/M-CAG ให้ค่า polymorphic rate สูงสุด (40%) และ ไพรเมอร์ E-AAG/M-CTT ค่า polymorphic rate ต่ำสุด (23.8 %)

Table 1 List of AFLP primers used to access genetic relationships of *D. pulcherrima*

Primer combinations	Total no. of amplification products	No. of polymorphic bands	Polymorphic rate
E-AAG / M-CAG	70	28	40
E-AAG / M-CTC	80	22	27.50
E-ACC / M-CAG	70	17	24.29
E-AAG / M-CTT	67	16	23.80
E-AAC / M-CTA	67	22	32.84
E-ACG / M-CTG	60	16	26.67
Total	414	121	35.02

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง

ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของ Dice มีค่าตั้งแต่ 0.37 – 0.96 (ตารางที่ 2) มีค่าเฉลี่ย = 0.54 สายต้น MVP19 และ MVP24 จาก อ.โพธิ์ไทร มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมากที่สุด (0.96) และสายต้น MV1 จาก ต.ช่องเม็ก อ.สิรินธร และ MVP2 จาก อ.โพธิ์ไทร มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมน้อยที่สุด (0.37)

Table 2 Similarity matrix from 13 *D. pulcherrima* germplasm generated from Dice's estimate of similarity.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 MV1	1												
2 MV3	0.63	1											
3 MV4	0.62	0.66	1										
4 MV6	0.56	0.54	0.67	1									
5 CM9	0.46	0.51	0.52	0.53	1								
6 MVP2	0.37	0.40	0.45	0.41	0.43	1							
7 MVP17	0.64	0.56	0.54	0.47	0.56	0.61	1						
8 MVP19	0.61	0.60	0.60	0.54	0.45	0.64	0.64	1					
9 MVP24	0.55	0.52	0.54	0.55	0.48	0.66	0.66	0.96	1				
10 MVP26	0.47	0.47	0.46	0.48	0.46	0.69	0.60	0.61	0.63	1			
11 MVP27	0.44	0.43	0.40	0.52	0.50	0.61	0.65	0.61	0.63	0.64	1		
12 MVP42	0.46	0.49	0.46	0.48	0.53	0.68	0.65	0.56	0.60	0.57	0.69	1	
13 MVP43	0.45	0.50	0.46	0.48	0.46	0.70	0.63	0.62	0.64	0.66	0.63	0.67	1

การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่ง

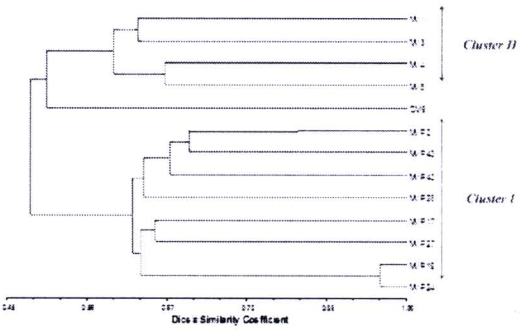


Figure 1 Dendrogram of *D. pulcherrima* germplasm collected from Srimdhorn (Chong Mek) and Phu Sai districts in Ubon Ratchathani Province, based on Dice's similarity index

การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่งจากค่า Dice's similarity index โดยใช้วิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมได้ 2 กลุ่ม (Figure 1) กลุ่มที่ 1 มีสมาชิก 8 สายต้น เป็นกล้วยไม้ม้าวิ่งที่เก็บรวบรวมมาจาก อ. โพธิ์ไทร ส่วนกลุ่มที่ 2 มีสมาชิก 5 สายต้น เป็นกล้วยไม้ม้าวิ่งจาก ต.ช่องเม็ก อ.สิรินธร การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี ให้ผลสอดคล้องกับกลุ่มประชากรของกล้วยไม้ ม้าวิ่งที่มาจากแหล่งอาศัยต่างกัน (geographical origin)

ค่าผลรวมของปัจจัยหลัก (principal component analysis) สามพารามิเตอร์แรกสามารถอธิบายความผันแปรทั้งหมดของการประเมินความเหมือนทางพันธุกรรมได้สูงถึง 55.43 %

การจัดกลุ่มมีค่า cophenetic correlation coefficient (r) = 0.92 แสดงว่าการจัดกลุ่มนี้มีความเหมาะสมดีมากและมีความน่าเชื่อถือสูง

สรุปผลการวิจัย

ผลการศึกษาแสดงถึงประสิทธิภาพของ AFLP marker ในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ม้าวิ่งได้อย่างชัดเจน กล้วยไม้ม้าวิ่งที่รวบรวมจาก อ.สิรินธร (ช่องเม็ก) และ อ.โพธิ์ไทร จังหวัดอุบลราชธานี มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับปานกลางถึงค่อนข้างต่ำ ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเลือกคู่ผสมของกล้วยไม้ม้าวิ่งเพื่อการปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์กล้วยไม้ม้าวิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยต่อไป