

การประยุกต์เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้า ใช้กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี

Application of SSR Markers Developed from *Vanda* for *Paphiopedilum* Orchids

อรุณทัย ซาววา¹, บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ¹ และหทัยรัตน์ อุไรรงค์¹

Aroonothai Sawwa¹, Boonruanrat Ruangwised¹ and Hathairat Uairong¹

บทคัดย่อ: การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SSR (Simple Sequence Repeat) ในพืช มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก มีค่าใช้จ่ายสูง และใช้ระยะเวลานาน นอกจากนี้ยังไม่มีรายงานการพัฒนาในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum*) วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้จึงได้นำเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้า (*Vanda*) โดยสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร มาประยุกต์ใช้กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี เพื่อลดค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการพัฒนาไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 101 คู่สาย ถูกนำมาทดสอบกับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 25 ตัวอย่าง จาก 12 สายพันธุ์ ได้แก่ รองเท้านารีขาวชุมพร รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะหน้าแดง รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะพนัง รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะไก่อ รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะนกยูง รองเท้านารีช่องอ่างทอง รองเท้านารีเหลืองปราจีนอุตรดิตถ์ รองเท้านารีเหลืองประจวบ รองเท้านารีเหลืองสิงขร รองเท้านารีเหลืองปราจีนสระบุรี รองเท้านารีเหลืองอุดร และรองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียงนาม พบว่ามี 61 คู่สายไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 10 คู่สายไพรเมอร์ที่ให้ลักษณะแถบดีเอ็นเอต่าง (polymorphic) เพื่อนำไปศึกษาขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และนำไปศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีต่อไป

คำสำคัญ: เครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลต์, กล้วยไม้รองเท้านารี

ABSTRACT: The development of Simple Sequence Repeat (SSR) markers in plants is complicated, high cost and time consuming. Moreover, there's no report about the SSR development in Lady's slipper orchid (*Paphiopedilum* orchid). The aim of this study was to use the Vanda's developed SSR markers from Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, for characterization of *Paphiopedilum* in a cost and time effective way. The initial screenings of 101 primer pairs from *Vanda* were amplified to 25 samples from 12 varieties of *Paphiopedilum* (*Paph. godefroyae* from Chumporn, Koh Nah-Dang, Koh Pa-Nak, Koh Kai, Koh Nok-Yoong and ang-thong; *Paph. concolor* from Uttaradit, Prachuap Khiri Khan, Singkon, Saraburi, Udon Thani and Vietnam). The results showed that 61 primer pairs gave positive amplified to *Paphiopedilum* DNA by PCR technique. Then, 10 polymorphic primer pairs were selected and the product sizes of the result fragments were analyzed. Furthermore, the selected primers were being used for studying the genetic diversity of *Paphiopedilum* orchid.

Keywords: Microsatellite markers, Lady's slipper orchid

¹ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 85 ม.1 ต.รังสิต อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, 85 Moo 1, Thanyaburi, Rangsit, Pathumthani. 12110.

บทนำ

เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite) หรือ SSR (Simple Sequence Repeat) หมายถึง ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ (repetitive DNA) เรียงอยู่ต่อเนื่องกันบนจีโนม แต่ละชุดประกอบด้วยเบสซ้ำตั้งแต่ 1-6 เบส กระจายตัวทั้งจีโนมแต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ ทำให้เกิดความหลากหลาย จึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์พืช ในการเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การวางตำแหน่งยีน (QTL mapping) การสร้างแผนที่ยีน (gene mapping) การทำแผนที่โครโมโซม การศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอ (อรรถรัตน์, 2548) SSR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะ ตรวจสอบได้ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single-locus marker) โดยลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วนไมโครแซทเทลไลต์ มักเป็นลำดับเบสจำเพาะ มีเพียงชุดเดียว (unique sequence) ดังนั้นถ้าหาลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วนไมโครแซทเทลไลต์ได้ แล้วนำมาออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว และเนื่องจากส่วนไมโครแซทเทลไลต์มีการกลายพันธุ์โดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย การตรวจสอบดีเอ็นเอตำแหน่งที่รวมเอาส่วนไมโครแซทเทลไลต์ไว้ภายใน จึงมีโอกาสได้ขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic) เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ไม่เท่ากัน จึงพบพอลิมอร์ฟิซึมค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (codominance) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทโรไซโกตได้ (สุรินทร์, 2552)

กล้วยไม้รองเท้านารีที่ค้นพบแล้วทั่วโลกมีอยู่ประมาณ 70 ชนิด สำหรับประเทศไทยพบเพียงสกุลเดียว คือ *Paphiopedilum* โดยพบแล้ว 17 ชนิด ปัจจุบันกล้วยไม้รองเท้านารีในธรรมชาติลดลงอย่าง

รวดเร็ว เนื่องจากมีความสวยงามและบางชนิดมีราคาสูง จึงจัดเป็นพืชที่มีสถานภาพใกล้สูญพันธุ์อีกชนิดของโลก บางชนิดยังไม่มีผู้ศึกษา พบได้เฉพาะถิ่นและบางพันธุ์สามารถเจริญเติบโตในหลายภาคของประเทศไทย ในขณะที่ข้อมูลทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ชนิดนี้ยังมีอยู่น้อย (เศรษฐมนตร์, 2551) อย่างไรก็ตามนักปรับปรุงพันธุ์ยังต้องปรับปรุงพันธุ์ คัดเลือกพันธุ์ และขยายพันธุ์เพื่อการค้ากันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศและต่างประเทศ จึงต้องการข้อมูลทางด้านความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมาสนับสนุนสมมุติฐานทางวิวัฒนาการอีกมาก รวมถึงการที่จะรักษาผลประโยชน์ของชาติ และการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืชเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างจริงจัง (อบจันท์, 2543) ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคอาร์เอฟพีดี (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) ระหว่างกล้วยไม้รองเท้านารี 6 ชนิด พบว่ารองเท้านารีเหลืองปราจีนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับรองเท้านารีเผือกมากที่สุด และเมื่อตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีเพื่อเป็นตัวแทนในการจำแนกปรากฏว่าไม่พบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์จากการใช้ไพรเมอร์อาร์เอฟพีดี (ประเดิม, 2543) สำหรับใน *Paphiopedilum micranthum* ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ พบว่า ค่า genetic differentiation ระหว่างประชากรมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ในประชากรสูงถึง 79.69 % ในขณะที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรมีค่าเท่ากับ 20.13 % (Li *et al.*, 2002) และระหว่าง *Paphiopedilum* และ *Phragmipedium* พบว่า สามารถแยกความแตกต่างทั้ง 2 สกุลได้อย่างชัดเจน และผลการวิเคราะห์ยังสอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Chung *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตามเทคนิคอาร์เอฟพีดียังมีความเสถียรต่ำในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง อาจทำให้เกิดคลาดเคลื่อนได้ง่าย เมื่อเทียบกับการใช้เทคนิค SSR ซึ่งถูกนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์มากขึ้น เนื่องจาก SSR เป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบ codominant ให้ลักษณะ

พอลิเมอร์พีซีเอ็มสูง มีความเสถียรและขั้นตอนที่ง่ายกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP) หรือเอเอฟแอลพี (AFLP) นอกจากนี้ SSR สามารถตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์และเครื่องรันดีเอ็นเออัตโนมัติ (automated DNA sequencer) จึงง่ายและรวดเร็วต่อการวิเคราะห์หับตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีจำนวนมากในการคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช (Yu *et al.*, 2000; Sajib *et al.*, 2012) แต่เครื่องหมาย SSR มีข้อจำกัด คือ การพัฒนาเครื่องหมายมีความยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูงเนื่องจากต้องทราบลำดับเบสที่อยู่ข้างเคียงของตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา เพื่อให้ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ จึงจะสามารถนำมาใช้ได้ (Hayden and Sharp, 2001) ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ นำเครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้า โดยสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร มาประยุกต์ใช้กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี เพื่อลดค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการพัฒนา

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมตัวอย่างกล้วยไม้และการสกัดดีเอ็นเอ

นำใบกล้วยไม้รองเท้านารี จำนวน 25 ตัวอย่างจาก 12 สายพันธุ์ ได้แก่ รองเท้านารีขาวชุมพร รองเท้านารีเหลืองตรังเกาเหลาหน้าแดง รองเท้านารีเหลืองตรังเกาเหลาพนัง รองเท้านารีเหลืองตรังเกาเหลาไก่ รองเท้านารีเหลืองตรังเกาเหลาญอง รองเท้านารีอ่างทอง รองเท้านารีเหลืองปราจีนอุตรดิตถ์ รองเท้านารีเหลืองสิงขร รองเท้านารีเหลืองประจวบ รองเท้านารีเหลืองปราจีนสระบุรี รองเท้านารีเหลืองอุดร และรองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียงดาม มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Lodhi *et al.*, (1994)

2. การคัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้ามาใช้กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี

นำไพรเมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้งหมดจำนวน 101 คู่สาย มาทดสอบกับดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารี โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl_2 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (5 uM) อย่างละ 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 52-57 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส (electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIO-RAD) และนำผลผลิตพีซีอาร์อีก 4 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบและบันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System

3. การติดฉลากสีและการวิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้มาเพิ่มลำดับเบสของ senseM13 จำนวน 18 เบส ทางด้านปลาย 5' Forward ดังนี้ 5'-TGTAACGACGCGCCAGT-3' เพื่อจับกับ antisenseM13 ที่ติดด้วยฉลากสีฟลูออโรเรสเซนต์ ด้วยวิธีพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl_2 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2.0 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (5uM) อย่างละ 2.0

ไมโครลิตร, antisenseM13 ที่ติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ (5uM) 1 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 เช่นเดียวกับข้อที่ 2 แล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเครื่อง ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer ซึ่งขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ได้จากเครื่องจะถูกนำมาลบส่วนของ M13 ออกจำนวน 18 เบส

สถานที่และระยะเวลาดำเนินการทดลอง

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร (ธันวาคม 2556 - มีนาคม 2557)

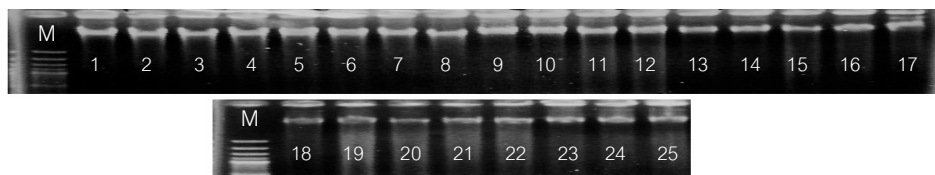


Figure 1. DNA samples of *Paphiopedilum* in 1% agarose gel. (lane M is DNA ladder 1kb)

- | | | |
|---|--|--|
| 1. <i>Paph. godefroyae</i> from Chumporn No.1 | 10. <i>Paph. godefroyae</i> , Ang-thong No.1 | 19. <i>Paph. concolor</i> from Saraburi No.1 |
| 2. <i>Paph. godefroyae</i> from Chumporn No.2 | 11. <i>Paph. godefroyae</i> , Ang-thong No.2 | 20. <i>Paph. concolor</i> from Saraburi No.2 |
| 3. <i>Paph. godefroyae</i> from Chumporn No.3 | 12. <i>Paph. godefroyae</i> , Ang-thong No.3 | 21. <i>Paph. concolor</i> from Saraburi No.3 |
| 4. <i>Paph. godefroyae</i> from Koh Nah-Dang | 13. <i>Paph. concolor</i> from Uttaradit No.1 | 22. <i>Paph. concolor</i> from Udon Thani No.1 |
| 5. <i>Paph. godefroyae</i> from Koh Pa-Nak No.1 | 14. <i>Paph. concolor</i> from Uttaradit No.2 | 23. <i>Paph. concolor</i> from Udon Thani No.2 |
| 6. <i>Paph. godefroyae</i> from Koh Pa-Nak No.2 | 15. <i>Paph. concolor</i> from Uttaradit No.3 | 24. <i>Paph. concolor</i> from Udon Thani No.3 |
| 7. <i>Paph. godefroyae</i> from Koh Kai No.1 | 16. <i>Paph. concolor</i> from Singkon No.1 | 25. <i>Paph. concolor</i> from Vietnam |
| 8. <i>Paph. godefroyae</i> from Koh Kai No.2 | 17. <i>Paph. concolor</i> from Singkon No.2 | |
| 9. <i>Paph. godefroyae</i> from Koh Nok-Yoong | 18. <i>Paph. concolor</i> from Prachuap Khiri Khan | |

2. การคัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนดามาใช้กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี

การทดสอบไพรเมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนดามีทั้งหมดจำนวน 101 คู่สาย กับดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารี พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 61 คู่สายไพรเมอร์

ผลและวิจารณ์การศึกษา

1. การสกัดดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารี

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Lodhi *et al.*, (1994) พบว่า การวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 จะอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ซึ่งจัดอยู่ในช่วงมาตรฐาน จึงนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เมื่อนำไปตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยหยดดีเอ็นเอ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ จะได้ดีเอ็นเอ Figure 1 เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไป

ให้แถบดีเอ็นเอที่ตั้งแต่ 1-6 แถบ ซึ่งการเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นหลายแถบอาจเนื่องมาจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ขณะนั้นยังไม่เหมาะสมกับคู่ไพรเมอร์นั้นๆ แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมาย SSR ที่ดีต้องมีเพียง 1 ตำแหน่ง ดังนั้น จึงได้คัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 10 คู่สาย ได้แก่ Vandbirdo_003, Vandbirdo_018, Vandbirdo_040, Vandbirdo_042, Vandbirdo_068,

Vandbirdo_080, Vandbirdo_084, Vandbirdo_094, Vandbirdo_097 และ Vandbirdo_098 ตามลำดับ (Table 1) ที่แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ บนอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ Figure 2 การวิเคราะห์ แถบดีเอ็นเอต่างของเครื่องหมาย SSR บนแผ่นเจลอะกาโรสนั้นทำได้ยาก หากมีลำดับเบสซ้ำอยู่ในช่วง 3 – 10 เบส จะไม่สามารถมองเห็นความแตกต่าง แต่การ

บันทึกผลด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System แสดงให้เห็นลักษณะแถบดีเอ็นเอต่างได้ในทุกไพรเมอร์โดยลักษณะแถบดีเอ็นเอต่างของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้แสดงเช่นเดียวกันกับไพรเมอร์ Vandbirdo_097 Figure 3 ทั้งนี้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมด จะถูกนำไปตัดคลากส์ฟลูออโรเรสเซนต์เพื่อศึกษาขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอต่อไป

Table 1 Sequence of 10 SSR primer pairs selected from 101 primer pairs which developed from *Vanda*.

No.	Primer Name	Sequence of Forward 5'-3'	Sequence of Reverse 5'-3'	Tm (°C)	Allele size of Vanda (bp)
1.	Vandbirdo_003	TGCACTCCCTTAGGTGAT	CGAGGCATTTTGTCTGGC	57	378
2.	Vandbirdo_018	CGAGGTAGATGTGACGCAAA	GCCTTAATCGACAGCTCCAG	55	217
3.	Vandbirdo_040	CGGAGACCTGTGTTTTGGT	TCGAACGACCTTCAACAAGA	52	213
4.	Vandbirdo_042	CGTGACGCTTACACACCT	TTACAACCTTCGCCCTCGAC	53	206
5.	Vandbirdo_068	TTGGATCCTCCTTCGTAGA	CTCGCACACAGAAGCTTGA	53	203
6.	Vandbirdo_080	GTGCCACCCTCTTTGTTGT	ATCCCACGCAGAATCATTTT	52	197
7.	Vandbirdo_084	AGGGCGTGCTGTAGGAGTAA	CCCAAGCTTCGAATACCAAA	53	201
8.	Vandbirdo_094	TCGAACCGTAGACCTTCTCG	CCAAGCTTCGGATCAGGATA	53	221
9.	Vandbirdo_097	GGCGCTTTCTCATAGCTCAC	GCCTACATACCTCGCTCTGC	55	207
10.	Vandbirdo_098	GGCGCTTTCTCATAGCTCAC	GCTACATACCTCGCTCTGC	53	205

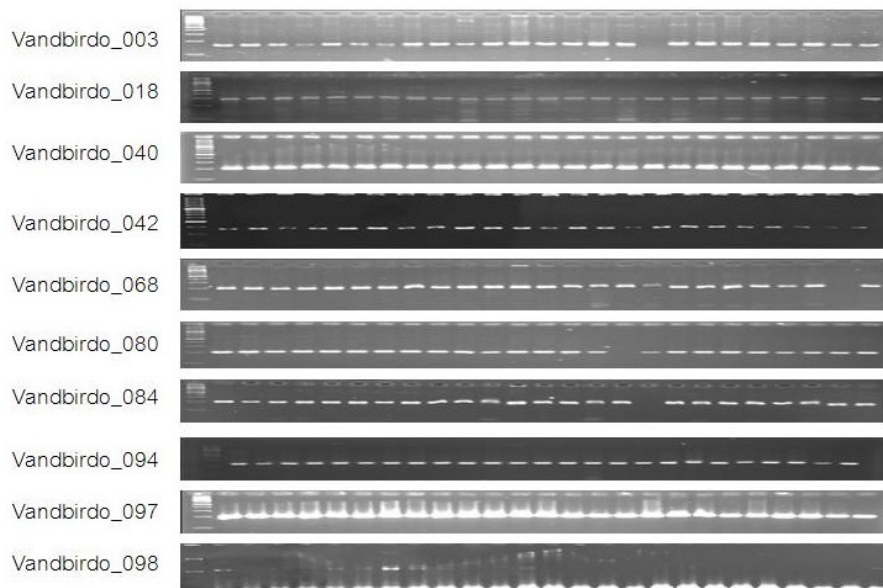


Figure 2 PCR products of 25 samples amplified with 10 SSR primer pairs (Table.1) in 2% agarose gel.



Figure 3 PCR products amplified with Vandbirdo_097 primer analyzed by QIAxcel Advanced System.

3. การวิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากผลผลิตพืชข้าว

การบันทึกผลจากเครื่อง QIAxcel Advanced System ของไพรเมอร์ทั้ง 10 คู่ แสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอต่างได้แต่ไม่สามารถบอกขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ จึงได้คัดเลือกคู่ไพรเมอร์มาติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ จำนวน 4 คู่ ได้แก่ Vandbirdo_018, Vandbirdo_040, Vandbirdo_084 และ Vandbirdo_097 เพื่อวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer พบว่า ทั้ง 4 คู่ไพรเมอร์แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอต่างแบบไฮโมไซโกตและ

เฮเทอโรไซโกต (Figure 4) ที่น่าสนใจ คือ ไพรเมอร์ Vandbirdo_018 แสดงขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันแบบไฮโมไซโกตใน *Paph. godefroyae*, Ang-thong และ *Paph. concolor* from Prachuap Khiri Khan คือ 252 และ 222 เบส ตามลำดับ และแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอต่างแบบเฮเทอโรไซโกตใน *Paph. concolor* from Uttaradit คือ 241/278 เบส (Table 2) สำหรับไพรเมอร์ Vandbirdo_040, Vandbirdo_084, และ Vandbirdo_097 แสดงชิ้นส่วนแบบไฮโมไซโกต 202, 202 และ 209 เบส และแบบเฮเทอโรไซโกต 194/202, 198/202 และ 206/209 เบส ตามลำดับ

Table 2 The Size of target SSR fragments in *Paphiopedilum*.

No.	Varieties of <i>Paphiopedilum</i>	Alleles size (bp)			
		M13Vandbirdo_018	M13Vandbirdo_040	M13Vandbirdo_084	M13Vandbirdo_097
1.	<i>Paph. godefroyae</i> from Chumpon	278	194/202	202	206/209
2.	<i>Paph. godefroyae</i> from Koh Nah-Dang	278	194/202	202	206/209
3.	<i>Paph. godefroyae</i> from Koh Pa-Nak	278	194/202	202	206/209
4.	<i>Paph. godefroyae</i> from Koh Kai	278	194/202	202	209
5.	<i>Paph. godefroyae</i> from Koh Nok-Yoong	*	202	198/202	209
6.	<i>Paph. godefroyae</i> , Ang-thong	252	194/202	202	209
7.	<i>Paph. concolor</i> from Uttaradit	241/278	202	202	206/209
8.	<i>Paph. concolor</i> from Singkon	278	202	202	209
9.	<i>Paph. concolor</i> from Prachuap Khiri Khan	222	*	198/202	209
10.	<i>Paph. concolor</i> from Saraburi	278	202	198/202	209
11.	<i>Paph. concolor</i> from Udon Thani	278	202	202	209
12.	<i>Paph. concolor</i> from Vietnam	278	202	198/202	206/209

Remark: * is missing data.

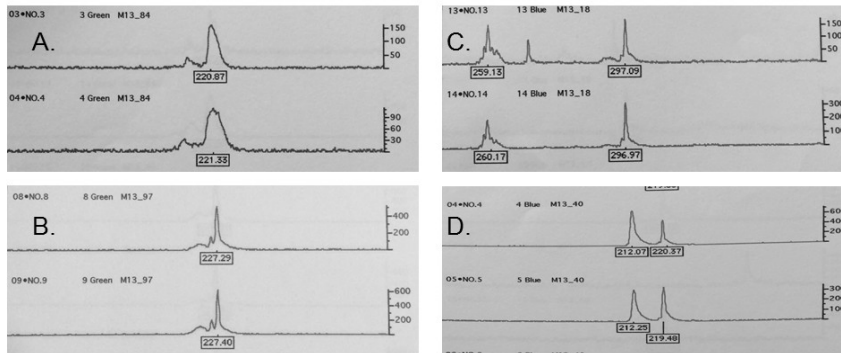


Figure 4 The picture of DNA fragments from ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer, A. and B. showed homozygote fragment of Vandbirdo_084 and Vandbirdo_097, C. and D. showed heterozygote fragments of Vandbirdo_018 and Vandbirdo_040.

สรุป

การประยุกต์เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้า ใช้กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 25 ตัวอย่าง จาก 12 สายพันธุ์ พบว่า จากไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 101 คู่สาย สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ 61 คู่สาย สามารถคัดเลือกไพรเมอร์จากผลการแสดงแถบดีเอ็นเอแถบเดียวหรือ 1 ตำแหน่ง บนเจลอะกาโรสได้ จำนวน 10 คู่สาย ได้แก่ ได้แก่ Vandbirdo_003, Vandbirdo_018, Vandbirdo_040, Vandbirdo_042, Vandbirdo_068, Vandbirdo_080, Vandbirdo_084, Vandbirdo_094, Vandbirdo_097 และ Vandbirdo_098 ตามลำดับ เมื่อบันทึกผลด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System แสดงให้เห็นลักษณะแถบดีเอ็นเอต่าง (polymorphic) ได้ในทุกไพรเมอร์ จากนั้นไพรเมอร์ Vandbirdo_018, Vandbirdo_040, Vandbirdo_084, และ Vandbirdo_097 ถูกนำไปติดฉลากสฟลูออโรเรสเซนต์ เพื่อนำไปศึกษาขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่า แสดงผลชิ้นส่วนดีเอ็นเอต่างแบบโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตที่น่าสนใจคือไพรเมอร์ Vandbirdo_018 แสดงขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างแบบโฮโมไซโกตในกล้วยไม้รองเท้านารี *Paph. godefroyae*, Ang-thong และ *Paph. concolor*

from Prachuap Khiri Khan คือ 252 และ 222 เบสตามลำดับ และแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอต่างแบบเฮเทอโรไซโกตใน *Paph. concolor* from Uttaradit คือ 241/278 เบส จากการศึกษาไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 10 คู่สาย จะถูกนำไปศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ประเดิม วณิชชนานันท์. 2543. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีหมวด *Brachypetalum* ด้วยเทคนิค RAPD. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เศรษฐมนันตร์ กาญจนกุล. 2551. กล้วยไม้รองเท้านารี. สำนักพิมพ์เศรษฐศิลป์. กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชติณกุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ถนนพหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพฯ.
- อบจันทร์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้ไทย. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. กรุงเทพฯ.
- อรรถน์ มงคลพร. 2548. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.
- Chung, S.Y., S. H. Choi, M. J. Kim, K. E. Yoon, G. P. Lee, J. S. Lee and K. H. Rye. 2006. Genetic relationship and differentiation of *Paphiopedilum* and *Phragmepedium* based on RAPD analysis. Sci. Hort. 130: 117-123.

- Hayden M.J. and P.J. Sharp. 2001. Targeted development of informative microsatellite (SSR) markers. *Nucleic Acids Research*, 29(8) e44 : 1-6.
- 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*. 17: 360-366.
- Lodhi, Muhammad A., Guang-NingYe, Norman F.Weeden and Bruce I.Reisch.1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine Cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. *Plant Molecular Biology Reporter* 12(1) : 6-13.
- Sajib A.M., Md.M. Hossain, A.T.M.J Mosnaz, H. Hossain, Md.M. Islam, Md.S. Ali and S.H. Prodhan. 2012. SSR marker-based molecular characterization and genetic diversity analysis of aromatic landraces of rice (*Oryza sativa* L.). *J.BioSci. Biotech*, 1(2) : 107-116.
- Yu K., S.J. Park, V. Poysa and P.Gepts. 2000. Integration of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Into a Molecular Linkage Map of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *The American Genetic Association* 91: 429-434.