รายงานการวิจัย

การใช้ตัวบ่งชี้ระดับโมเลกุลในการจำแนกสายพันธุ์กล้วยไม้

The use of molecular markers in orchid identification

พรรณี อัศวตรีรัตนกุล

บทคัดย่อ

ในการใช้เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารี 14 ชนิด จากใบอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารี พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำ PCR จากปริมาตร 25 ไมโครลิตรคือใช้ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 50 นาโนกรัมไพรเมอร์ 100 μM, $MgCl_2$ 6 mM เอนไซม์ Taq DNA polymerase เข้มข้น 1 ยูนิต สำหรับอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาคือ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส 15 วินาทีและอุณหภูมิ 72 องศา 2 นาที เป็นจำนวน 45 รอบโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มที่มีดีเอ็นเอขนาด 10 เบสจำนวน 11 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 5 ชนิด (OPA-07, OPA-16, OPH-04, OPU-06 และ OPU-07) สามารถให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หลากหลาย ชัดเจนและเกิดซ้ำได้ จำนวนทั้งหมด 67 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 150-2,000 คู่เบส เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยใช้สัมประ--สิทธิ์ของ Dice เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและแต่ละกลุ่ม พบว่าสามารถแบ่งกล้วยไม้รองเท้านารีที่ศึกษาออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งผลจากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของกล้วยไม้รองเท้านารี แสดงให้เห็นว่าเทคนิค RAPD-PCR สามารถใช้แถบดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายระดับโมเลกุลในการระบุชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีได้

Abstract

Molecular markers among 14 species of *Paphiopedilum* genotypes were studied based on random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis from leaf tissue samples. Conditions for PCR reaction were optimized to obtain a clear banding pattern. It was found that the following conditions are suitable for RAPD-PCR : 50 ng of genomic DNA, 100 μM of primers, 6 mM $MgCl_2$, and 1 unit of Taq DNA polymerase for a total volume of 25 ml/reaction. The PCR reaction was program for 45 cycles of 15 second at 95 °C, 15 second at 36 °C, and 2 min at 72 °C. Eleven decamer primers were screened, and five primers (OPA-07, OPA-16, OPH-04, OPU-06, OPU-07) producing clear and reproducible polymorphic DNA patterns were selected, in total 67 bands were scored. The amplified DNAs of 14 species ranged from approximately 150 to 2,000 base pairs. The data was then analyzed for the Dice similarity coefficient for pairwise comparison between individual samples and the distance matrix. The dendrograms resulting from cluster analysis showed three major clusters. The results of this study showed the genetic relationship among 14 species of Slipper orchids that correspond to the morphological taxonomic classification. These results indicate that the DNA marker at the molecular level can provide an appropriate tool for identifying Slipper orchids species.