บทคัดย่อ

กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ อีกทั้งยังเป็นพืชที่ถูกคุกคามจนทำให้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ ในขณะที่การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ชนิดนี้ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลยังมีน้อยมาก ทั้งนี้ส่วนหนึ่งเนื่องมาจากการเตรียมดีเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์เหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ค่อนข้างยาก การศึกษานี้เปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอจากใบสดของรองเท้านารีเหลืองปราจีน 3 วิธี ได้แก่ การใช้ชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction Kit (Vivantis Technologies) วิธี sodium dodecyl sulfate (SDS)-potassium acetate และวิธี cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) พบว่า วิธี SDS-potassium acetate ให้ปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุดและดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงสุด รองลงมาคือวิธี CTAB ให้ปริมาณดีเอ็นเอรองลงมาแต่มีการปนเปื้อนของสารที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 230 นาโนเมตร (A230) ค่อนข้างสูง และชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction ให้ปริมาณดีเอ็นเอต่ำที่สุดและดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนของสารที่มี A230 ค่อนข้างสูง การทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า ดีเอ็นเอที่เตรียมโดยวิธี SDS-potassium acetate และวิธี CTAB สามารถเพิ่มปริมาณด้วยพีซีอาร์ได้ดีใกล้เคียงกัน และดีกว่าดีเอ็นเอที่เตรียมโดยชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction ดังนั้นวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากใบสดของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน คือวิธี SDS-potassium acetate ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ดที่ออกแบบเพื่อให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribe Spacer (ITS) ถูกให้ชื่อว่า ITSP-F การทดสอบไพรเมอร์นี้ร่วมกับไพรเมอร์รีเวิร์ด ITS4 โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส พบว่า ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เพียงชนิดเดียวในปริมาณมาก จึงเหมาะสมสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิธีสกัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพและไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อบริเวณ ITS จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ศึกษาข้อมูลทางด้านพันธุกรรม อันจะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์และการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนและกล้วยไม้ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันต่อไป

Abstract

Paphiopedilum concolor (Lindl.) Pfitzer is economically important. Moreover, wild populations of this orchid are threatened with extinction. However, there have been very few studies on genetic diversity of this orchid species using molecular tools, partly due to difficulties in obtaining good quality of DNA suitable for polymerase chain reactions (PCRs). This study tested three DNA extraction methods for purification of genomic DNA from *P. concolor* leaves, i.e., GF-1 Plant DNA Extraction Kit (Vivantis Technologies), sodium dodecyl sulfate (SDS)-potassium acetate method, and cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method. It was found that the SDS-potassium acetate method produced the highest yield of DNA with the best quality. The CTAB method produced considerably less yield with greater co-purified contaminants that absorbed strongly at 230 nm. The GF-1 Plant DNA Extraction Kit produced the lowest yield of DNA that contained high proportion of contaminants with absorption at 230 nm. Quality of the DNA was also tested by PCRs. The DNA samples suitable for the PCRs were those prepared by the SDS-potassium acetate and the CTAB methods, but not the samples prepared by the GF-1 Plant DNA Extraction Kit. According to this study, the SDS-potassium acetate method was the best method for purification of DNA from fresh leaves of *P. concolor*. The forward primer designed for amplification of the Internal Transcribe Spacer (ITS) region of *P. concolor* was named ITSP-F. Test of this primer and the reverse primer, ITS4 at annealing temperature 55°C, resulted in high quantity of single product suitable for DNA sequencing. Efficient DNA extraction method and ITS-specific primer would be vital to the development of molecular markers in the study of genetic diversity which would be beneficial to the conservation and varietal improvement programs of *P. concolor* and closely-related orchids.