นิพนธ์ต้นฉบับ

การเปรียบเทียบแบบแผนไอโซไซม์และเครื่องหมายอาร์เอพีดี เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเอื้องสายสามสี และเอื้องสายแข็ง

ศิริลักษณ์ อินทะวงศ์ [1] วีณัน บัณฑิตย์ [2] ณัฐา ควรประเสริฐ[3]
และ พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์ [4]

Abstract

Inthawong, S.[1], Bundithya, W.[2], Kuanprasert, N.[2] and Apavatjrut, P.[2]

Comparison of isozyme and RAPD patterns for analysis of the genetic relationship in *Dendrobium crystallinum* and *D*. sp.

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2006, 28(3) : 531-537

The genetic relationship in two *Dendrobium* species which had similar morphology was analyzed using cluster analysis by UPGMA from their isozyme and RAPD data. It was found that dendrogram of eight isozyme systems could distinguish *D. crystallinum* from *D*. sp. However, it could not distinguish a clone of *D*. sp. On the other hand, dendrogram of RAPD analysis from eight primers could identify *D. crystallinum* from *D*. sp. and a clone of *D*. sp.

Key words : *Dendrobium crystallinum*, isozyme pattern, RAPD

[1]Development of Economic Flower Crop: Orchid (DEFCO) Project, [2]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Muang, Chiang Mai, 50200 Thailand.

[1]วท.ม.(เกษตรศาสตร์) นักวิจัย โครงการการพัฒนาไม้ดอกเศรษฐกิจ (กล้วยไม้) เพื่อเพิ่มศักยภาพในการส่งออก [2]Ph.D.(Molecular Biology), [3]Ph.D.(Horticulture) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ [4]Ph.D.(Plant Science) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ 50200

Corresponding e-mail: aginknpr@chiangmai.ac.th

รับต้นฉบับ 2 มิถุนายน 2548 รับลงพิมพ์ 15 พฤศจิกายน 2548

บทคัดย่อ

ศิริลักษณ์ อินทะวงศ์ วีณัน บัณฑิตย์ ณัฐา ควรประเสริฐ และ พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์

การเปรียบเทียบแบบแผนไอโซไซม์และเครื่องหมายอาร์เอพีดี เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเอื้องสายสามสี และเอื้องสายแข็ง

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2549 28(3) : 531-537

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการจัดกลุ่มแบบ cluster analysis โดยใช้โปรแกรม UPGMA ในกล้วยไม้สกุลหวาย 2 ชนิด ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน โดยใช้ข้อมูลจากแบบแผนไอโซไซม์เปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า เดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์แบบแผนไอโซไซม์แบบรวมเอนไซม์ทั้งหมด 8 ระบบ สามารถจำแนกเอื้องสายสามสีออกจากเอื้องสายแข็งได้ แต่ไม่สามารถจำแนกเอื้องสายแข็งออกจากกันได้ ส่วนเดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้จากไพรเมอร์ 8 ชนิด สามารถจำแนกได้ทั้งระดับชนิดในเอื้องสายสามสีและเอื้องสายแข็ง และระดับสายต้นในเอื้องสายแข็งได้

เอื้องสายสามสี (*Dendrobium crystallinum*) และเอื้องสายแข็ง (*D.* sp.) เป็นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์พื้นเมืองที่จัดอยู่ในหมู่ *Dendrobium* ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลำต้น ใบ และดอก ที่คล้ายคลึงกันมาก แต่มีความแตกต่างกันในบางลักษณะคือ สีของดอก โดยเอื้องสายแข็งมีดอกสีครีม และไม่มีแต้มที่ปลายกลีบและปลายปากเหมือนเอื้องสายสามสี จึงอาจทำให้เกิดความสับสนในการบ่งบอกลักษณะและชนิดที่ถูกต้อง และการนำข้อมูลไปใช้ในงานด้านปรับปรุงพันธุ์ การจำแนก หรือบ่งชี้ชนิดหรือพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจทำได้ยากยกเว้นระยะที่มีดอก การสร้างเครื่องหมายทางพันธุกรรมจึงมีความสำคัญมากสำหรับการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ โดยเฉพาะในระยะที่มีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น

แบบแผนไอโซไซม์ (Isozyme Pattern) และเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD technique) เป็นเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืช (วีระพงศ์, 2536) โดยแบบแผนไอโซไซม์พบว่า มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดในกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* (Obara-Okeyo *et al*., 1998) และ *Dendrobium* (Kuntapanom and Smitamana, 1997) และใช้ในการจำแนกสายต้นในเอื้องช้างน้าว (*D. pulchellum* Roxb.) (ประทุมพร, 2542) ส่วนเทคนิคอาร์เอพีดีได้มีการนำมาใช้ในการจำแนกชนิดกล้วยไม้สกุล *Cattleya* (Benner *et al*., 1995) นอกจากนี้ ยังสามารถหาเครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD marker) เพื่อใช้ในการจำแนกชนิด (species) และโคลน (clone) ในกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* (Chen *et al*., 2001) และมีการทดลองเปรียบเทียบการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี และแบบแผนไอโซไซม์ในการจำแนกชนิดระหว่างเอื้องเงิน (*D. draconis*) เอื้องเงินแดง (*D. cariniferum*) และเอื้องแซะ (*D. scabrilingue*) และจำแนกโคลนในเอื้องแซะตามลักษณะดอกและแหล่งกำเนิดอีกด้วย (รัติกาล, 2543)

ในการทดลองครั้งนี้ มีเป้าหมายที่จะอธิบายถึงระดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่เกิดจากความคล้ายคลึงกันทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ไทยสกุลหวายชนิดเอื้องสายสามสี และเอื้องสายแข็ง โดยใช้แบบแผนไอโซไซม์เปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อใช้เป็นข้อมูลยืนยันในการบ่งชี้ชนิดและลักษณะที่ถูกต้อง

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ

การทดลองนี้ใช้พืชทดลองคือ เอื้องสายสามสี 1 ต้น (D044) และเอื้องสายแข็ง 3 ต้น (D186/2, D186/3 และ D186/5)

การจัดทำแบบแผนไอโซไซม์

สกัดโปรตีนจากส่วนใบของเอื้องสายสามสี และ

เอื้องสายแข็ง โดยใช้น้ำยาสกัดสูตร Tris-HCl grinding buffer pH 7.5 (Tris-HCl pH 7.5 เข้มข้น 0.1 โมลาร์, EDTA.2Na เข้มข้น 0.001 โมลาร์, $MgCl_2$.$6H_2O$ เข้มข้น 0.1 โมลาร์, PVP เข้มข้น 4% และ 2-mercapto-ethanol เข้มข้น 0.1%) ของ Gottlieb (1981) เปรียบเทียบกับสูตรของ Apavatjrut และคณะ (1999) นำสารสกัดโปรตีนผสมกับ bromophenol blue แล้วนำไปทำ polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ใน stacking gel และ separating gel ที่ความเข้มข้น 7% และ 10 % ตามลำดับ นำเจลที่ได้ไปย้อมสารละลายซับสเตรทสำหรับเอนไซม์ 8 ชนิด คือ DIA, MDH, GOT, ME, SKD, POX, EST และ SOD จากนั้น บันทึกค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของแถบสี การมีหรือไม่มีแถบสี จำนวนแถบสี และรูปแบบการเกิดแถบสี และวิเคราะห์ข้อมูลและจัดกลุ่มแบบ cluster analysis แบบรวมเอนไซม์ ด้วย UPGMA จากโปรแกรม SPSS for Windows Version 9.0 (SPSS Inc. Chicago, USA)

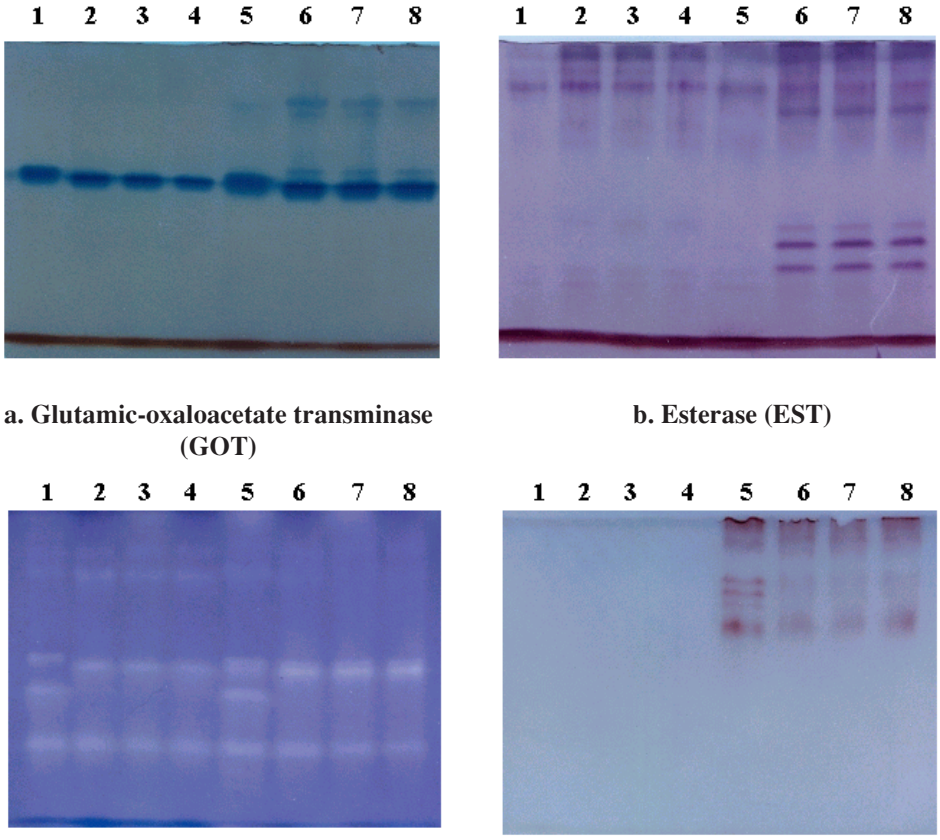
การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของเอื้องสายสามสี และเอื้องสายแข็ง โดยวิธีของ Doyle และ Doyle (1990) ตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพดีเอ็นเอแล้วปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ให้ได้ความเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปเป็นส่วนผสมของ reaction mixture ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1X PCR buffer (Tris-HCl pH 8.0 เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, EDTA เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์, DTT เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์, กลีเซอรอล เข้มข้น 50 %), $MgCl_2$ เข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs (dCTP, dGTP, dTTP, dATP) เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์, *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 0.8 ยูนิต, ไพรเมอร์เข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอต้นแบบเข้มข้น 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และน้ำกลั่น โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลิโอไทด์ จำนวน 10 ชนิด คือ OPF01-06 และ 12-15 เข้าสุ่มจับ จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Chen และคณะ (1998) ที่มีเงื่อนไขของปฏิกิริยาดังนี้ อุณหภูมิ 94ºC 60 วินาที, 36ºC 10 วินาที, 72ºC 10 วินาที จำนวน 2 รอบ และอุณหภูมิ 94ºC 60 วินาที, 42ºC 45 วินาที, 72ºC 70 วินาที จำนวน 30 รอบ ตามด้วย อุณหภูมิ 72ºC 4 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วเก็บผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4ºC

ตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟรีซีสโดยใช้อะกาโรสเจล จากนั้นย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ก่อนนำไปตรวจสอบผลโดยส่องผ่านแสงอัลตร้าไวโอเล็ต พร้อมบันทึกภาพโดยใช้ Gel Documentation โปรแกรม Gene Snap แล้ววิเคราะห์ข้อมูล โดยการตรวจดูจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ตำแหน่งการปรากฏและไม่ปรากฏแถบในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ไทยสกุลหวายแต่ละชนิดที่ได้จากแต่ละไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Gene Tools จากนั้นนำมาประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบรวมไพรเมอร์ โดยวิเคราะห์การจัดกลุ่มแบบ cluster analysis เช่นเดียวกับในแบบแผนไอโซไซม์

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเอื้องสายสามสีและเอื้องสายแข็ง โดยเปรียบเทียบน้ำยาสกัด 2 สูตร คือ สูตรของ Apavatjrut และคณะ (1999) (ช่อง 1-4) และสูตรของ Gottlieb (1981) (ช่อง 5-8) แล้วนำไปทำ PAGE โดยย้อมสารละลายซับสเตรทของเอนไซม์ 8 ระบบ พบว่าเอนไซม์ GOT, EST, SOD และ POX สามารถแสดงแบบแผนไอโซไซม์ที่แตกต่างกันระหว่างเอื้องสายสามสีและเอื้องสายแข็งได้ โดยแบบแผนไอโซไซม์ของเอนไซม์ GOT และ EST ที่ได้จากน้ำยาสกัดสูตรของ Gottlieb (1981) ให้จำนวนแถบและความเข้มของแถบมากกว่าสูตรของ Apavatjrut และคณะ (1999) ในเอนไซม์ SOD แบบแผนไอโซไซม์ที่ได้จากน้ำยาสกัดสูตรของ Gottlieb (1981) ให้ความเข้มของแถบมากกว่าสูตรของ Apavatjrut และคณะ (1999) และในเอนไซม์ POX แบบแผนไอโซไซม์ที่ได้จากน้ำยาสกัดสูตรของ Gottlieb (1981) แสดงแบบแผนไอโซไซม์ที่แตกต่างกันระหว่างเอื้องสายสามสีและเอื้องสายแข็งอย่างชัดเจนในขณะที่สูตรของ Apavatjrut และคณะ (1999) ไม่แสดงแบบแผนไอโซไซม์ (Figure 1a-d) แต่งานทดลองในกล้วยไม้ดินใบจีบบางชนิด พบว่าน้ำยาสกัดสูตรของ Apavatjrut และคณะ (1999) ให้แบบแผนไอโซไซม์ดีกว่าสูตรของ Gottlieb (1981) (สุทธินันท์



a. Glutamic-oxaloacetate transminase (GOT)

b. Esterase (EST)

c. Superoxide dismutase (SOD)

d. Peroxidase (POX)

Figure 1. Isozyme patterns of two *Dendrobium* species (1, 5:D044; 2, 6:D186/2; 3, 7:D186/3 and 4, 8:D186/5) using different enzyme systems.

และพิมพ์ใจ, 2547) เนื่องจากโปรตีนที่สกัดได้จากพืชแต่ละชนิดในน้ำยาสกัดต่างสูตรให้ผลของแบบแผนไอโซไซม์ไม่เหมือนกัน (Weeden and Wendel, 1989)

จากการใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลิโอไทด์ จำนวน 10 ชนิด เข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบของเอื้องสายสามสีและเอื้องสายแข็ง พบว่า ไพรเมอร์ 8 ชนิด ได้แก่ OPF01 (5'-ACGGATCCTG-3')(Figure 2a), 02(5'-GAGGATCCCT-3'), 03(5'-CCTGATCACC-3'), 04(5'-GGTGATCAGG-3'), 05(5'-CCGAATTCCC-3'), 13(5'-GGCTGCAGAA-3')(Figure 2b), 14(5'-TGCTGCAGGT-3')(Figure 2c) และ 15(5'-CCAGTACTCC-3')(Figure 2d) สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 2 ชนิดได้อย่างชัดเจน และในบางไพรเมอร์ คือ OPF13 สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของเอื้องสายแข็งทั้ง 3 ต้นได้ เช่นเดียวกับในงานทดลองการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับสายต้นในกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* (Chen *et al*.,1998) และกล้วยไม้สกุลหวายชนิดเอื้องแซะ (รัติกาล, 2543)

จากผลการเปรียบเทียบเดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้แบบแผนไอโซไซม์ และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ไทยสกุลหวายทั้ง 4 ต้น โดยวิเคราะห์รวมเอนไซม์ (Figure 3) และรวมไพรเมอร์ (Figure 4) พบว่า การจำแนกโดยใช้แบบแผนไอโซไซม์ให้ผลเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเอื้องสายสามสี (D044) และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย เอื้องสายแข็ง (D186/2, D186/3 และ D186/5) ส่วนการจำแนกโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี ให้ผลเป็น 2 กลุ่มใหญ่

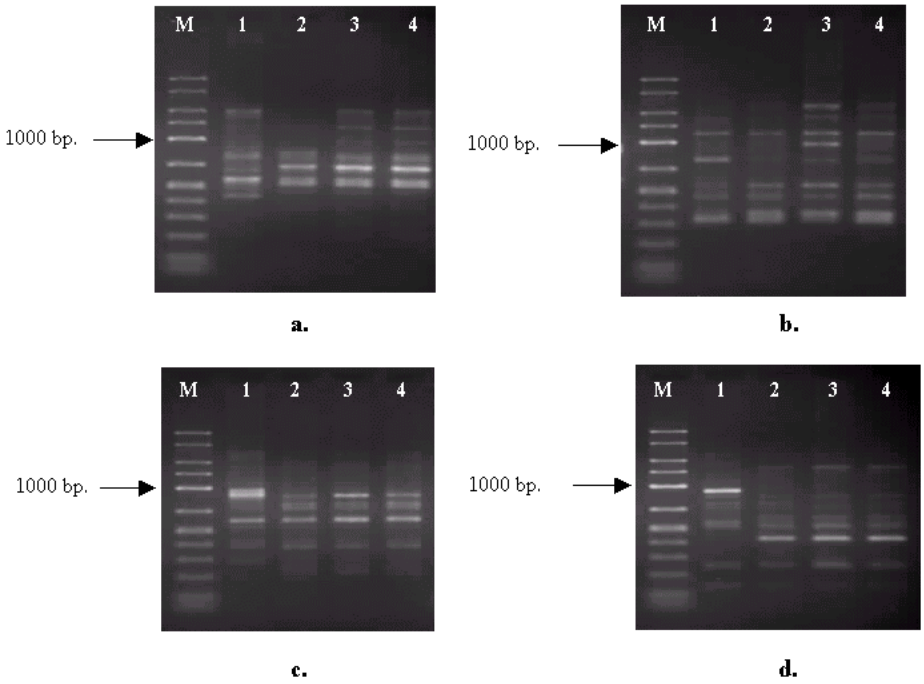


Figure 2. RAPD banding pattern of two *Dendrobium* species (1 :D044; 2 :D186/2; 3 :D186/3 and 4 :D186/5) generated by primer OPF01 (a), OPF13 (b), OPF14 (c) and OPF15 (d).

คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย เอื้องสายสามสี (D044) และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย เอื้องสายแข็ง (D186/2, D186/3 และ D186/5) โดยในกลุ่มที่ 2 สามารถแยกได้อีกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ 2.1 ประกอบด้วย D186/3 และ D186/5 และ 2.2 ประกอบด้วย D186/2 ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแบบแผนไอโซไซม์สามารถแยกได้เฉพาะในระดับชนิด ส่วนลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถจำแนกได้ดีกว่าแบบแผนไอโซไซม์ โดยสามารถจำแนกกล้วยไม้ไทยสกุลหวายทั้ง 2 ชนิด และใช้จำแนกโคลนในเอื้องสายแข็งได้ แม้ว่ารายงานการจำแนกกล้วยไม้ไทยสกุลหวายบางชนิดได้สรุปว่าเทคนิคอาร์เอพีดีและแบบแผนไอโซไซม์ สามารถใช้จำแนกพันธุกรรมทั้งในระดับชนิดและระดับโคลนได้ไม่แตกต่างกัน (รัติกาล, 2543)

สรุปผลการทดลอง

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ไทยสกุลหวายชนิดเอื้องสายสามสี 1 ต้น และเอื้องสายแข็ง 3 ต้นโดยใช้แบบแผนไอโซไซม์ที่ย้อมด้วยเอนไซม์ 8 ระบบ พบว่า เอนไซม์ 4 ระบบ คือ GOT, EST, SOD และ POX สามารถแสดงแถบสีที่แตกต่างกันระหว่างกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 2 ชนิดได้ และยังพบว่าแบบแผนไอโซไซม์ที่ได้จากน้ำยาสกัดสูตรของ Gottlieb (1981) ในเอนไซม์ GOT และ EST ให้จำนวนแถบสีที่มากกว่า และให้แถบสีที่ชัดเจนกว่าสูตรของ Apavatjrut และคณะ (1999)

เมื่อนำกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มนี้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด เข้าสุ่มจับในปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่ามีไพรเมอร์ 8 ชนิด คือ OPF01, 02, 03, 04, 05, 13, 14 และ 15 สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างเอื้องสายสามสีและเอื้องสายแข็งได้ และในไพรเมอร์ OPF13 สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างเอื้องสายแข็งทั้ง 3 ต้นได้

เมื่อนำข้อมูลการปรากฏแถบสีของรูปแบบไอโซไซม์และข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย

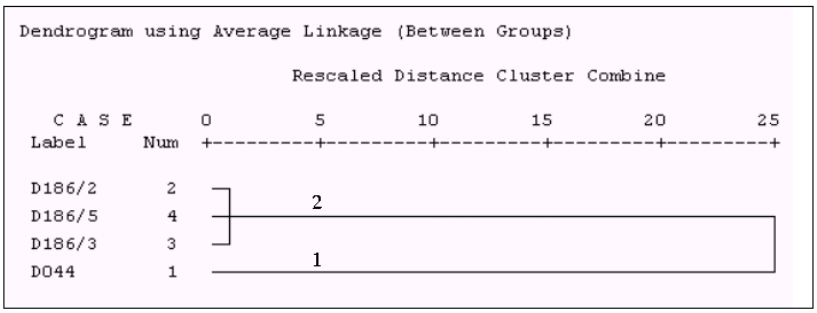


Figure 3. Dendrogram of two *Dendrobium* species (D044 and D186) resulting from a UPGMA cluster analysis based on genetic distances obtained from the combined isozyme banding data. The groups are indicated by numbers on the lines.

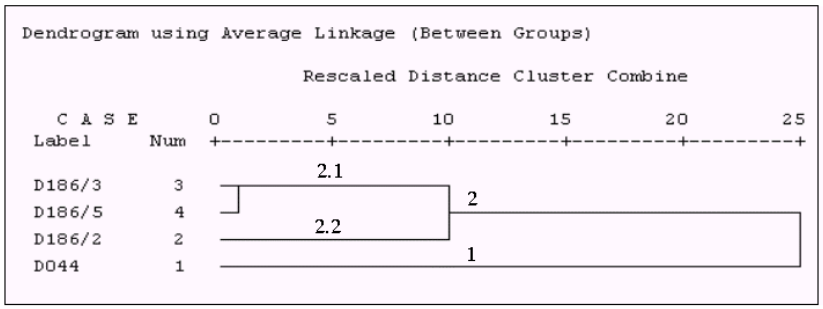


Figure 4. Dendrogram of two *Dendrobium* species (D044 and D186) resulting from a UPGMA cluster analysis based on genetic distances obtained from the combined RAPD banding data. The groups are indicated by numbers on the lines.

ทั้ง 4 ต้นมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยจัดกลุ่มแบบ cluster analysis โดยวิเคราะห์แบบรวมเอนไซม์และรวมไพรเมอร์ พบว่า เดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้ง 2 แบบ สามารถจำแนกเอื้องสายสามสีออกจากเอื้องสายแข็งได้เหมือนกัน แต่เดนโดรแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเท่านั้น ที่สามารถจำแนกเอื้องสายแข็งทั้ง 3 ต้นออกจากกันได้

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากโครงการการพัฒนาไม้ดอกเศรษฐกิจ (กล้วยไม้) เพื่อเพิ่มศักยภาพในการส่งออก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

ประทุมพร กันทพนม. 2542. การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในกล้วยไม้สกุลหวายชนิดช้างน้าว. โครงการการวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปี 2542 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 33 น.

รัติกาล ธัญหล้า. 2543. การแยกกลุ่มเอื้องแซะโดยวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 109 น.

วีระพงศ์ ลุลิตานนท์. 2536. เทคนิคการทำ Polymerase Chain Reaction **ใน** หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ "เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม" เล่ม 2 หน้า 20.1-20.12. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

สุทธินันท์ ประสาธน์สุวรรณ และพิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์. 2547. น้ำยาสกัดที่เหมาะสมสำหรับรูปแบบไอโซไซม์ของ

กล้วยไม้ดินใบจีบบางชนิด. เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 4 โรงแรมเจบี หาดใหญ่, สงขลา. 4-7 พ.ค., น. 108.

Apavatjrut, P., Anuntalabhochai, S., Sirirugsa, P. and Alisi, C. 1999. Molecular marker in the identification of some early flowering *Curcuma* L. (Zingiberaceae) species. Annals of Bot. 84: 529-534.

Benner, M.S., Braunstein, M.D. and Weisberg, M.U. 1995. Detection of DNA polymorphisms within the genus *Cattleya* (Orchidaceae). Plant Mol. Biol. Rep. 13: 147-155.

Chen, W.H., Chen, T.M., Fu, Y.M., Hsieh, R.M. and Chen, W.S. 1998. Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. Plant Cell Rep. 18: 7-13.

Chen, W.H., Fu, Y.M., Tsai, W.T., Chyou, M.S., Hsieh, R.M., Wu, C.C. and Lin, W.S. 2001. Identification and phylogenetic relationship of *Phalaenopsis* species *via* molecular analysis. Taiwan Sugar Res. 48: 23-29.

Doyle, L.J. and Doyle, J.J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-14.

Gottlieb, L.D. 1981. Electrophoretic evidence and plant populations. Prog. Phytochem. 7: 1-46.

Obara-Okeyo, P., Fujii, K. and Kako, S. 1998. Isozyme variation in *Cymbidium* species (Orchidaceae). HortScience 33(1): 133-135.

Kuntapanom, P. and Smitamana, P. 1997. Study on isozyme patterns in two *Dendrobium* species. Trends of Biotechnology for the Agricultural Improvement III, Uniserv CMU, Chiang Mai, Thailand, Mar. 20 1997, pp. 1-9.

Weeden, N.F. and Wendel, J.F. 1989. Genetics of plant Isozyme **In** Isozymes in Plant Biology. (eds. Soltis, D.E. and Soltis, P.S.). pp. 46-74. Dioscorides Press, Hong Kong.