

Thesis Title	Analysis of Genetic Relationship and Marker of Genus <i>Phalaenopsis</i> and Hybrids by Molecular Techniques	
Author	Mr. Pratchya Taywiya	
Degree	Doctor of Philosophy (Horticulture)	
Thesis Advisory Committee		
	Assoc. Prof. Dr. Nuttha Potapohn	Chairperson
	Assoc. Prof. Dr. Soraya Ruamrungsri	Member
	Lect. Dr. Weenun Bundithya	Member

ABSTRACT

Crossability is usually correlated to the genetic relationship. Understanding of crossability of interspecific, intersectional and intergeneric hybridization becomes a useful reference for selecting parental lines in orchid breeding program. Thus, genetic relationship and crossability of genus *Phalaenopsis* and related genera, *Doritis* and *Kingidium*, and segregation of hybrid phenotypes were evaluated. There were four experiments conducted in this study. Firstly, genetic relationship of 36 samples from 30 species of the genus *Phalaenopsis* and related genera was evaluated based on RAPD technique using 20 decamer primers. Six primers, OPAK10, OPD03, OPF01, OPF02, OPF09 and OPF14 showed polymorphic DNA bands with high resolution and produced 82 DNA bands ranging in size from 223 to 2,300 bp. Genetic relationship

was determined by UPGMA cluster analysis, using the POPGENE version 1.32 program. The results of 6 primer combinations analysis among 36 samples showed genetic distance values in the range of 0.14 between *P. violacea* and *P. violacea* var. *sumatra*, and *P. violacea* and *P. bellina*, to 0.79 between *P. corningiana* and *P. lowii*. Cluster analysis could distinguish and divide the 36 samples of *Phalaenopsis* and related genera into 9 major groups. The results showed that 2 related genera, *Doritis* and *Kingidium*, should be treated as genus *Phalaenopsis*.

Secondly, crossabilities among intersectional, intrasectional and intergeneric hybridizations of genus *Phalaenopsis* and 2 related genera, *Doritis* and *Kingidium*, were tested. From a total of 264 pollinations between 44 crosses, 24 crosses yielded fruit set. It was found that only 7 crosses could yield viable seeds. Genetic distance values ranged from 0.15 to 0.67 among 44 crosses, whereas the 24 crosses that yielded fruit set had genetic distance values ranging from 0.15 to 0.58. The results showed close relationship between the parents of 7 crosses as follows: 4 intersectional hybridizations, 1) section *Phalaenopsis*: *P. amabilis* x section *Polychilos*: *P. cornu-cervi*, 2) section *Phalaenopsis*: *P. schilleriana* x section *Polychilos*: *P. cornu-cervi*, 3) section *Zebrinae*: *P. violacea* x section *Polychilos*: *P. cornu-cervi* and 4) section *Zebrinae*: *P. violacea* x section *Amboinenses*: *P. javanica*; 1 intrasectional hybridization, section *Parishianae*: *P. gibbosa* 1 x *P. parishii*, and 2 intergeneric hybridizations, genus *Doritis*: *D. pulcherrima* ‘dwarf’ x genus *Phalaenopsis*: *P. equestris* and 2) genus *Doritis*: *D. pulcherrima* ‘dwarf’ x genus *Kingidium*: *K. minus*. Seeds of each fruit were sown under aseptic condition. It was found that the greatest amount of seedlings, 1,000 plantlets, was obtained from cross *P. schilleriana* x *P. cornu-cervi*, whereas the least number, 40 plantlets, was from cross *P. violacea* x

P. javanica. The highest survival rate of cross *P. schilleriana* x *P. cornu-cervi* was 81.25 %, whereas cross *P. gibbosa* 1 x *P. parishii* was the lowest at 43.33 % after transplanting for 6 months.

Thirdly, the segregations of hybrid phenotypes of 3 crosses were compared with their parents. The results showed that most progenies from cross *P. schilleriana* x *P. cornu-cervi* had dark green leaves which were similar to female parent, star-shaped flowers which were similar to male parent and the flower colors showed transgressive segregation of the two parents. Most progenies from crosses *D. pulcherrima* ‘dwarf’ x *P. equestris* and *D. pulcherrima* ‘dwarf’ x *K. minus* had dark green leaves and dark pink flowers which were similar to female parent while the flower size and shape were similar to male parent. RAPD technique was used to examine the genetic similarity between parental lines and their 10 progenies. The number of primers giving polymorphic DNA bands varied among crosses. Suitable primers for each cross could be described as follows: 6 primers, OPAK10, OPD03, OPF01, OPF02, OPF09 and OPF14, for cross *P. schilleriana* x *P. cornu-cervi*; 4 primers, OPAK10, OPF01, OPF02 and OPF09, for cross *D. pulcherrima* ‘dwarf’ x *P. equestris* and 5 primers, OPAK10, OPD03, OPF02, OPF09 and OPF14 for cross *D. pulcherrima* ‘dwarf’ x *K. minus*. Clustering of genetic similarity between parental lines and their 10 progenies using principle component analysis (PCA) was performed with the NTSYS-pc version 2.01 program. The results showed that the varied distribution among crosses and their 10 progenies. Some progenies were clustered along with female or male parents while others were widely distributed between female and male parents.

Lastly, AFLP technique was employed to find specific marker that linked to the flower color pattern of *P. cornu-cervi*. Sixty-four primer combinations of 8 *EcoRI* primers and 8 *MseI* primers were used in the study. Two specific DNA bands were generated by *EcoRI*+AG/*MseI*+CAG primer combination. These specific bands were found only in reddish brown flower and yellow flower with reddish brown bar and spot groups. DNA sequencing of two DNA fragments showed 229 and 278 bases. DNA sequences were analyzed and compared with DNA sequences database in NCBI GenBank. After BLAST searches of the sequences, both 229- and 278-base sequences showed 78.7 % DNA sequences homology to the *Citrus reticulata* AFLP marker AFLP-4 genomic sequence which linked to the seedless trait. Though, these two markers were not specific to flower color pattern gene in database, the marker could distinguish reddish brown flower and yellow flower with reddish brown bar and spot groups from pure yellow flower (no spot or bar) group.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์และเครื่องหมายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิสและลูกผสมด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

ผู้เขียน นายปรัชญา เติวิยะ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (พืชสวน)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. ณัฐา โปธาภรณ์

ประธานกรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร. โสระยา ร่วมรังษี

กรรมการ

อาจารย์ ดร. วิวัฒน์ บัณฑิตย์

กรรมการ

บทคัดย่อ

ความสามารถในการผสมข้ามพันธุ์ของพืชจะขึ้นกับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์พืชนั้น การเข้าใจความสามารถในการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างชนิด หมู่และสกุล จะช่วยเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ในงานปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ ดังนั้นจึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ความสามารถในการผสมข้ามของกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส รวมทั้งสกุลใกล้เคียง คือ *Doritis* และ *Kingidium* และศึกษาลักษณะการกระจายตัวของลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่ แบ่งการศึกษาออกเป็น 4 ส่วน ส่วนแรกได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซิส และสกุลใกล้เคียง 36 ตัวอย่าง จาก 30 ชนิด ซึ่งเป็นตัวแทนของ 8 หมู่ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 20 ไพรเมอร์ พบว่ามี 6 ไพรเมอร์ คือ OPAK10 OPD03 OPF01 OPF02 OPF09 และ OPF14 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และมีความแตกต่างกันทั้งหมด 82 แถบ โดยมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 223 - 2,300 คู่เบส เมื่อจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA โดยใช้ค่าความห่างทางพันธุกรรม

(genetic distance) จากโปรแกรม POPGENE version 1.32 พบว่า *P. violacea* กับ *P. violacea* var. *sumatra* และ *P. violacea* กับ *P. bellina* มีค่าความห่างทางพันธุกรรมต่ำสุดที่ 0.14 และ *P. corningiana* กับ *P. lowii* มีค่าความห่างทางพันธุกรรมสูงสุดที่ 0.79 โดยสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลฟาเลนอปซิส สกุลใกล้เคียง 36 ตัวอย่างได้เป็น 9 กลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสกุล *Doritis* และ *Kingidium* ควรจัดให้อยู่ในสกุลฟาเลนอปซิส

ส่วนที่ 2 ได้ทดสอบความสามารถในการผสมข้ามหมู่ ภายในหมู่ และสกุลใกล้เคียง จากการผสมข้ามจำนวน 264 ดอก จาก 44 คู่ผสม พบว่ามี 24 คู่ผสมที่ติดผล โดยมีเพียง 7 คู่ผสมที่ได้ลูกผสม ค่าความห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของทั้ง 44 คู่ผสม มีค่าอยู่ในช่วง 0.15 ถึง 0.67 แต่ในคู่ผสมที่ติดผล มีค่าอยู่ในช่วง 0.15 ถึง 0.58 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่ของ 7 คู่ผสมที่ได้ลูกผสม ได้แก่ คู่ผสมข้ามหมู่ 4 คู่ คือ 1) หมู่ *Phalaenopsis*: *P. amabilis* x หมู่ *Polychilos*: *P. cornu-cervi* 2) หมู่ *Phalaenopsis*: *P. schilleriana* x หมู่ *Polychilos*: *P. cornu-cervi* 3) หมู่ *Zebrinae*: *P. violacea* x หมู่ *Polychilos*: *P. cornu-cervi* และ 4) หมู่ *Zebrinae*: *P. violacea* x หมู่ *Amboinenses*: *P. javanica* และมีคู่ผสมที่เกิดจากการผสมภายในหมู่เดียวกัน 1 คู่ คือ หมู่ *Parishianae*: *P. gibbosa* 1 x *P. parishii* และคู่ผสมที่เกิดจากการผสมข้ามกับสกุลใกล้เคียง 2 คู่ คือ 1) สกุล *Doritis*: *D. pulcherrima* 'dwarf' x *P. equestris* และ 2) สกุล *Doritis*: *D. pulcherrima* 'dwarf' x สกุล *Kingidium*: *K. minus* จากการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าคู่ผสม *P. schilleriana* x *P. cornu-cervi* มีจำนวนลูกผสมมากที่สุด คือ 1,000 ต้น ส่วนคู่ผสม *P. violacea* x *P. javanica* มีจำนวนลูกผสมน้อยสุด คือ 40 ต้น และเมื่อย้ายลูกผสมออกปลูกเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าลูกผสมของ *P. schilleriana* x *P. cornu-cervi* มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด คือ 81.25 % และลูกผสมของ *P. gibbosa* 1 x *P. parishii* มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตน้อยสุด คือ 43.33 %

การศึกษาส่วนที่ 3 ได้ประเมินลักษณะการกระจายตัวของลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่ พบว่าลูกผสมของ *P. schilleriana* x *P. cornu-cervi* มีใบสีเขียวเข้มคล้ายกับต้นแม่ ดอกเป็นรูปดาวคล้ายต้นพ่อ และมีการกระจายตัวของสีดอกต่างจากต้นพ่อแม่ ลูกผสมของ *D. pulcherrima* 'dwarf' x *P. equestris* และ *D. pulcherrima* 'dwarf' x *K. minus* มีใบสีเขียวเข้ม และดอกสีชมพูเข้มคล้ายกับต้นแม่ แต่มีขนาดและรูปร่างดอกคล้ายกับต้นพ่อ และได้เปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมกับพ่อแม่โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี พบว่าจำนวนไพรเมอร์ที่สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ที่บ่งบอก

ความใกล้ชิดระหว่างพ่อแม่และลูกผสม มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มผสม โดยกลุ่มผสม *P. schilleriana* x *P. cornu-cervi* มี 6 ไพรเมอร์ คือ OPAK10 OPD03 OPF01 OPF02 OPF09 และ OPF14 กลุ่มผสม *D. pulcherrima* 'dwarf' x *P. equestris* มี 4 ไพรเมอร์ คือ OPAK10 OPF01 OPF02 และ OPF09 และกลุ่มผสม *D. pulcherrima* 'dwarf' x *K. minus* มี 5 ไพรเมอร์ คือ OPAK10 OPD03 OPF02 OPF09 และ OPF14 การจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่และลูกผสมด้วยวิธี PCA โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.01 พบว่าลูกผสมมีการกระจายตัวที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มผสม โดยมีทั้งลูกผสมที่จัดอยู่ในกลุ่มแม่ จัดอยู่ในกลุ่มพ่อ และกระจายตัวอยู่ระหว่างพ่อแม่

การศึกษาส่วนสุดท้าย ได้ตรวจสอบลำดับเบสของเครื่องหมายจำเพาะที่สัมพันธ์กับลายสีดอกเอื้องเขากวางอ่อน ที่ได้จากเทคนิคเอฟแอลพี โดยใช้คู่ไพรเมอร์จาก *EcoRI* 8 ไพรเมอร์ และ *MseI* 8 ไพรเมอร์ ทั้งหมด 64 คู่ไพรเมอร์ พบว่า คู่ไพรเมอร์ *EcoRI*+*AG/MseI*+*CAG* แสดงแถบดีเอ็นเอจำเพาะจำนวน 2 แถบ ซึ่งพบเฉพาะในกลุ่มที่ดอกมีสีน้ำตาลแดงทั้งดอก และต้นที่มีดอกสีเหลืองลายขีดและจุดน้ำตาลแดง การตรวจสอบลำดับเบส พบว่ามีขนาด 229 และ 278 เบส และเปรียบเทียบทั้ง 2 ลำดับเบสกับ database ใน NCBI GenBank พบว่าทั้ง 2 แถบ มีลำดับเบส 78.7 % ที่เหมือนกับ *Citrus reticulata* AFLP marker AFLP-4 genomic sequence ซึ่งเกี่ยวข้องกับลักษณะผลไร้เมล็ด แม้ว่าเครื่องหมายจำเพาะที่ได้จากเทคนิคเอฟแอลพีในการศึกษารุ่นนี้ไม่เกี่ยวข้องกับยีนที่ควบคุมลักษณะลายสีดอกใน database แต่สามารถแยกความแตกต่างของกลุ่มที่ดอกมีสีน้ำตาลแดงทั้งดอกและกลุ่มที่มีดอกสีเหลืองลายขีดและจุดน้ำตาลแดงกับต้นที่ไม่มีลายบนดอกได้