ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกุหลาบตัดดอก โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD

Genetic Relationship of Cut-rose Cultivars Using HAT-RAPD Technique

วชิระ เกตุเพชร[1] อดิศร กระแสชัย[1] และ พีระวุฒิ วงศ์สวัสดิ์[2]

Wachira Ketpet[1] Adisorn Krasaechai and Pheravut Wongsawad[2]

Abstract

The genetic relationships of 28 cut-rose cultivars were studied using High Annealing Temperature Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique. DNA of young leaves were extracted using CTAB method modified from Doyle and Doyle (1990). DNA samples were amplified using 28 random decamer primers (Operon Technologies Inc., California). Only 27 primers were amplified. A total of 2,325 bands was produced ranging from 27-145 bands. The amplified DNA fragments were ranging in size from 150-2,500 bp. Only 7 primers OPB-8, OPB-9, OPB-10, OPF-11, OPJ-4, OPAD-01 and OPAU-08, could yield polymorphic bands between 90-100% and more than 100 bands were used for statistical analyses. Dendrogram analysis; morphology, DNA profiles and combination data were performed (PAUP ver. 4.0 b10). The combination data's dendrogram revealed three main clades. The first clade comprised 16 cultivars showed very high coefficient (0.92-0.98) in generic materials among this group, the second clade comprised 11 cultivars showed high coefficient (0.75-0.98) in generic materials among this group, and the third clade comprised 1 cultivars showed 0.72. HAT-RAPD analysis was useful for breeder to find the relationship of those collected cultivars and accountable for breeding program in the future.

Keyword: Cut-rose cultivars, HAT-RAPD, Genetic relationship, breeding program

[1]ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

Department of Plant Science and Natural Resources, Faculty of Agriculture, Chiang Mai, 50200

[2]ศูนย์วิจัยและบริการจีโนมพืชเศรษฐกิจ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50200

Economic Plants Genome Research and Service Center, Faculty of Science, Department of Biology, Chiang Mai University, 50200

รับเรื่อง : กรกฎาคม 2554

*Corresponding author:wachiraketpet@hotmail.co.th, adiskra@gmail.com and pheravut@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกุหลาบตัดดอก 28 พันธุ์ ด้วยเทคนิค High Annealing Temperature Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) โดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนด้วย CTAB ดัดแปลงวิธีของ Doyle and Doyle (1990) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 10 เบส จำนวน 28 ไพรเมอร์ เพียง 27 ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 2,325 แถบ ในช่วง 27-145 แถบ และขนาดของแถบอยู่ระหว่าง 150-2500 คู่เบส และคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยใช้เกณฑ์เปอร์เซ็นต์การเกิดโพลีมอร์ฟิค ระหว่าง 90-100 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนแถบดีเอ็นเอปรากฏมากกว่า 100 แถบ สามารถคัดเลือกได้ 7 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPB-8, OPB-9, OPB-10, OPF-11, OPJ-4, OPAD-01 และ OPAU-08 นำข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ข้อมูลแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และข้อมูลแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ที่คัดเลือก มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม PAUP (version 4.0b10) สร้างเป็นเดนโดรแกรมที่แตกต่างกัน 5 แบบ พบว่าเดนโดรแกรมจากไพรเมอร์ที่คัดเลือก 7 ไพรเมอร์ร่วมกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยาดีที่สุด สามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 3 กลุ่ม ตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรม คือ กลุ่มที่ 1 จำนวน 16 พันธุ์ (0.92-0.98) กลุ่มที่ 2 จำนวน 11 พันธุ์ (0.75-0.98) และกลุ่มที่ 3 มี 1 พันธุ์ (0.72) กลุ่มที่ 1 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่ากลุ่มที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค HAT-RAPD เป็นประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์กุหลาบในการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตได้ต่อไป

คำนำ

การปรับปรุงพันธุ์กุหลาบตัดดอก ในประเทศไทย สิ่งแรกที่ต้องทำคือการเก็บรวบรวมพันธุ์ โดยเฉพาะการจัดกลุ่มเชื้อพันธุกรรม เพื่อใช้ประโยชน์จะมีส่วนช่วยทำให้ประหยัดระยะเวลา และงบประมาณที่ใช้ อย่างไรก็ตาม การเก็บรวบรวมพันธุ์นี้ อาจเกิดข้อผิดพลาดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การถูกตั้งชื่อใหม่ที่ต่างจากเดิมของชาวสวนหรือพ่อค้า กุหลาบบางพันธุ์ใช้ชื่อเดียวกันทำให้เกิดความสับสน หรือ บางพันธุ์อาจกลายพันธุ์ที่มีลักษณะแตกต่างจากต้นเดิม แต่ยังคงใช้ชื่อเดิมอยู่ เป็นต้น สำหรับการจัดกลุ่มเชื้อพันธุกรรม โดยทั่วไปสามารถทำได้ ทั้งโดยวิธีการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และใช้เครื่องหมายโมเลกุล สำหรับการจัดกลุ่มตามลักษณะสัณฐานวิทยา มีข้อจำกัดที่ใช้พื้นที่มาก ใช้ระยะเวลานาน และบางลักษณะมีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม ในปัจจุบันจึงนิยมวิธีใช้เครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มมากขึ้น เพราะสามารถจัดจำแนกได้ดีไม่แปรผันกับสภาพแวดล้อม ใช้ปริมาณตัวอย่างพืชน้อย รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ ทำให้ประหยัดเวลา พื้นที่และงบประมาณกว่า เทคนิค High Annealing Temperature Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) เป็นเทคนิคที่ให้ความแม่นยำมากกว่าการทำ RAPD แบบอื่น ๆ เนื่องจากมีการเพิ่มอุณหภูมิในระยะ annealing ให้สูงขึ้นจากปกติ เพื่อทำให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนมากขึ้น เสถียรสูง ไม่ยุ่งยาก มีราคาไม่สูงมากนัก และใช้ได้ผลดีในการจำแนกในพืชหลายชนิด (Anuntalabhochai *et al*., 2000) เช่น มะเดื่อ (Promtap and Anuntalabhochai, 2005) และลิ้นจี่ (Chundet *et al*., 2007) จึงได้นำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกุหลาบตัดดอก เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์กุหลาบในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างพืช

การศึกษาครั้งนี้ใช้พันธุ์กุหลาบตัดดอก 28 พันธุ์ โดยรวบรวมพันธุ์จากสวนเอกชน ในจังหวัดเชียงใหม่ จากนั้นจึงทำการสืบค้นพันธุ์ประวัติ และการจดทะเบียนพันธุ์ โดยสืบค้นชื่อที่จดทะเบียนและลักษณะทางพืชสวนจาก Rose varieties data base (Pertwee, 2000; 2003)

หรือ จาก www.helpmefind.com/roses เพื่อค้นหาหมายเลขสิทธิบัตร จากนั้นจึงค้นหาประวัติและปีที่จดทะเบียนด้วย www.google.com/patents ปลูกทดสอบเพื่อศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ ที่สถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ ตำบลบ้านหลวง อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้เกณฑ์ตารางที่ 1 ในการจัดจำแนก

การสกัดและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกุหลาบ

นำใบอ่อนของกุหลาบแต่ละสายพันธุ์มาสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลาย CTAB ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1990) นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์จาก primers Kit (Operon Technologies Inc., California) จำนวน 28 ไพรเมอร์ คือ OPA-04, OPA-09, OPA-11,OPB-6, OPB-7, OPB-8, OPB-9, OPB-10, OPE-4, OPF-11, OPH-15, OPH-17, OPJ-4,OPN-02, OPN-03, OPN-09, OPN-12, OPO-14, OPP-11, OPR-15, OPT-19, OPW-09, OPX-13, OPAD-01, OPH-01, OPH03, OPAU-08 และ OPR-20 เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยดัดแปลงวิธีของ Anuntalabhochai *et al*. (2000) โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 20 ng template DNA, 1X PCR buffer, 100 mM dNTP mix,10 ng primer, 0.5 unit *Taq*-DNA polymerase ปรับปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR mycycler™ (Bio-Rad) โดยกำหนดเงื่อนไข คือ ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นต่อด้วยวงรอบของอุณหภูมิ 3 ช่วง จำนวน 35 รอบ ดังนี้ ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 45 วินาที ที่อุณหภูมิ 48 °C เป็นเวลา 45 วินาที ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที และต่อด้วยที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 7 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบผล ด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้วุ้นอะกาโรสที่มีความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลท์ เป็นเวลา 45 นาที ในบัฟเฟอร์ชนิด TAE แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder) บันทึกการเกิดแถบดีเอ็นเอ ในแต่ละตัวอย่าง วิเคราะห์และจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม PAUP เวอร์ชั่น 4.0b10 ทำการสุ่มคำนวณซ้ำ 1,000 ครั้ง โดยวิเคราะห์ด้วยวิธี unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) Cluster analysis และหาค่า genetic distance (GD) เพื่อคำนวณค่าจากสูตร GD = 1-similarity coefficient (S) ของ Nei and Li (Swofford, 1993) สร้างแผนผังเดนโดรแกรมระหว่างสายพันธุ์ ด้วยข้อมูลที่แตกต่างกัน 5 แบบ ได้แก่ 1) ข้อมูลจากลักษณะสัณฐานวิทยาจากเกณฑ์ที่ตั้งไว้ 2) ข้อมูลจากไพรเมอร์ทั้งหมดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 3) ข้อมูลจากไพรเมอร์ทั้งหมดที่เพิ่มปริมาณได้ร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยา 4) ข้อมูลจากไพรเมอร์ที่คัดเลือก 5) ข้อมูลจากไพรเมอร์ที่คัดเลือกร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยา ทำการเปรียบเทียบเดนโดรแกรมที่ได้

ตารางที่ 1 เกณฑ์ในการจัดกลุ่มลักษณะประจำพันธุ์กุหลาบ

คะแนน	ขนาดดอกตูม (ซม.)	ขนาดดอกบาน (ซม.)	จำนวนกลีบดอก (กลีบ)	ความยาวก้าน (ซม.)	ความถี่หนามเฉลี่ย (จน.หนาม/10 ซม.)	ความหนากลีบ	ผลผลิต (ดอก/ตรม.)
1	<2.0	<4	<15	<50	>20	บาง	<150
2	2.1-2.5	5-6	16-25	51-70	15-20	ค่อนข้างบาง	151-160
3	2.6-3.0	7-8	26-35	71-90	10-15	ปานกลาง	161-170
4	3.1-3.5	9-10	36-45	91-100	5-10	หนา	171-180
5	3.6-4.0	>10	>45	>100	<5	หนามาก	<180

ผลการทดลอง

1.การรวบรวม สืบประวัติ และศึกษาลักษณะประจำพันธุ์

จากการจัดแบ่งกุหลาบออกตามเกณฑ์ ในตารางที่ 2 ทำให้สามารถจัดแบ่งกุหลาบได้ ดังนี้ (1.)จัดตามสีดอกได้ 7 กลุ่ม (2.) จัดตามขนาดดอกตูมได้ 3 กลุ่ม (3.)จัดตามขนาดดอกบานได้ 3 กลุ่ม (4.) จัดตามจำนวนกลีบได้ 4 กลุ่ม (5.) จัดตามความยาวก้านได้ 3 กลุ่ม (6.) จัดตามความถี่หนามได้ 3 กลุ่ม (7.) จัดตามความหนากลีบได้ 4 กลุ่ม (8.) จัดตามการให้ผลผลิตได้ 5 กลุ่ม (ตารางที่ 2) นำคะแนนที่บันทึกได้มาสร้างเป็นเดนโดรแกรมต่อไป

จากการสืบประวัติพันธุ์ ในตารางที่ 3 พบว่ามีพันธุ์ที่จดทะเบียน 20 พันธุ์ และไม่ได้จดทะเบียน 6 พันธุ์ ได้แก่ Dallas, Emeraude d'Or, Jade, Pink Noblesse, Sundance และ White Noblesse ส่วนพันธุ์ที่ไม่มีข้อมูล 2 พันธุ์ ได้แก่ Josephine Charlotte และ Naomi ส่วนใหญ่ได้จากการผสมเกสร 22 พันธุ์ และกลาย พันธุ์ 2 พันธุ์

2.การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมและการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 28 ไพรเมอร์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 27 ไพรเมอร์ยกเว้น ไพรเมอร์ OPR-20 ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ (ตารางที่ 4) โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 2,325 แถบ เฉลี่ย 83 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่เกิดโพลีมอร์ฟิค จำนวน 2,281 คิดเป็น 98.1 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ยเกิด 81.5 แถบ/ไพรเมอร์ โดยที่ไพรเมอร์ที่เกิดโพลีมอร์ฟิคมากที่สุด คือ OPJ-4 จำนวน 138 แถบ (ภาพที่ 1) พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดโมโนมอร์ฟิค จำนวน 44 แถบ ไพรเมอร์ที่เกิดโมโนมอร์ฟิคมากที่สุด คือ OPJ-4 เช่นกัน สำหรับการคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม เนื่องจากมีการเกิดโพลีมอร์ฟิคค่อนข้างสูง ในที่นี้ได้คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้เกณฑ์คัดเฉพาะไพรเมอร์ที่มีจำนวนโพลีมอร์ฟิค 90-100% และดีเอ็นเอมากกว่า 100 แถบขึ้นไป เพราะทั้งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มาก และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโพลีมอร์ฟิคที่สูง สามารถคัดเลือกได้ 7 ไพรเมอร์ ดังนี้ คือ OPB-8, OPB-9, OPB-10, OPF-11,OPJ-4,OPN-03, OPAD-01และ OPAU-08(ตารางที่ 4)

3.ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม

จากการวิเคราะห์ค่า Similarity coefficient และสร้างเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ของกุหลาบตัดดอก 28 สายพันธุ์ ได้ดังนี้ (1.) เดนโดรแกรมจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 จำนวน 21 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 จำนวน 7 สายพันธุ์ มีค่า Similarity coefficient อยู่ในช่วง 0.73-0.95 (ภาพที่ 2A) (2.) เดนโดรแกรมจากไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ 27 ไพรเมอร์ พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 จำนวน 16 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 จำนวน 11 พันธุ์ กลุ่มที่ 3 จำนวน 1 สายพันธุ์ มีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.63-0.99 (ภาพที่ 2B) (3.) เดนโดรแกรมจากข้อมูล 27 ไพรเมอร์ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่มใหญ่เช่นกัน โดยมีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.64-0.99 (ภาพที่ 2C) (4.) เดนโดรแกรมจากไพรเมอร์ที่คัดเลือก 7 ไพร์เมอร์ พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่มเช่นกันแต่มีสมาชิกภายในกลุ่มต่างกัน คือ กลุ่มที่ 1 จำนวน 17 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 จำนวน 10 สายพันธุ์ และ กลุ่มที่ 3 จำนวน 1 พันธุ์ มีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.73-0.98 (ภาพที่ 2D) (5.) เดนโดรแกรมจากข้อมูล 7 ไพรเมอร์ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่มใหญ่เช่นเดียวกับวิธีที่ 2 และ 3 แต่มีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.72-0.98 (ภาพที่ 2E) ซึ่งมีความเหมาะสมที่สุดในการนำมาใช้จัดกลุ่ม เพราะใช้จำนวนไพรเมอร์น้อยกว่า ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและระยะเวลาในการตรวจสอบมากกว่า รวมทั้งเป็นการใช้ข้อมูลทั้งทางพันธุกรรมและลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งจะเห็นได้มีการจัดกลุ่มภายในได้ชัดเจนกว่า โดยพันธุ์ Persia จากกลุ่มที่ 1 เดิม ในภาพที่ 2D จะถูกจัดกลุ่มใหม่ให้สอดคล้องกับภาพที่ 2B และ 2C โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ชัดเจนตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรม กลุ่มที่ 1 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก (0.92-0.98) กลุ่มที่ 2 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมปานกลาง (0.73-0.98) ส่วนในกลุ่มที่ 3 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด (0.72)

ตารางที่ 2 ลักษณะประจำพันธุ์ของกุหลาบตัดดอก 28 พันธุ์

พันธุ์	ชื่อย่อ	สี	สีตาเห็น	กระดาษเทียบสี (RHS)	ขนาดดอกตูม	ขนาดดอกบาน	จำนวนกลีบ	ความยาวก้าน	หนาม	ความหนากลีบ	ผลผลิต (ดอก/ตรม.)
Azure Sea	AZ	2	ม่วง	P75C	5	5	3	4	3	1	3
Black Magic®	BM	4	แดง	R46A	4	4	3	4	3	2	3
Bridal Pink	BDP	6	ส้ม	R48B	4	4	3	4	2	2	3
Dallas	DL	4	แดง	R46A	5	5	2	4	3	3	4
Diplomat	DPM	5	ชมพู	RP62B	4	4	3	4	3	1	5
Emblem	EMB	3	เหลือง	Y5A	4	4	3	4	3	1	3
Emeraude d'Or	EMR	6	ส้ม	YO20C	4	4	3	3	3	2	2
First red	FR	4	แดง	R46A	5	5	2	3	3	2	3
Fragrant Cloud	FC	6	ส้ม	R48C	5	5	3	3	3	1	3
Frisco	FSC	3	เหลือง	Y8A	3	3	3	2	4	2	5
Jade	JADE	3	เหลือง	Y4C	4	4	5	3	3	2	3
Josephine Charlotte	JSP	1	ขาว	W155C	4	4	5	2	3	2	3
Kardinal	KDN	4	แดง	R45C	4	4	3	3	2	2	3
Naomi	NOM	5	ชมพู	R48C	5	5	3	3	3	2	2
Osiana™	OSN	6	ส้ม	R36C	5	5	3	5	4	1	4
Paris de Yves St. Laurent ™	PR	5	ชมพู	R56A	4	4	2	3	3	1	3
Noblesse	PNB	5	ชมพู	R49A	5	4	3	3	4	1	5
Raphaela	RPL	7	สองสี	R41A/W155C	5	5	2	3	3	2	1
Ravel	RV	5	ชมพู	RPN57D	4	4	5	3	4	2	3

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Saphir®	SP	5	ชมพู	R49A	4	4	2	4	3	2	5
Sundance	SD	3	เหลือง	ON159C	4	4	2	4	4	2	3
Texas ®	TX	3	เหลือง	Y12B	4	4	3	2	2	1	2
Tineke	TNK	1	ขาว	W155C	5	4	5	3	4	2	5
Top Secret	TS	4	แดง	R46B	4	4	3	3	4	1	3
Vendela™	VDL	1	ขาวครีม	ON159D	4	4	3	3	4	2	3
Vivaldi	VVD	5	ชมพู	R38D	4	4	3	4	4	2	2
White Noblesse	WNB	1	ขาว	W155A	5	4	4	3	4	1	4
Eliza/Persia	PS	5	ชมพู	R56A	3	4	4	4	2	4	5

ตารางที่ 3 ประวัติพันธุ์และการขึ้นทะเบียนของพันธุ์กุหลาบตัดดอก 28 พันธุ์

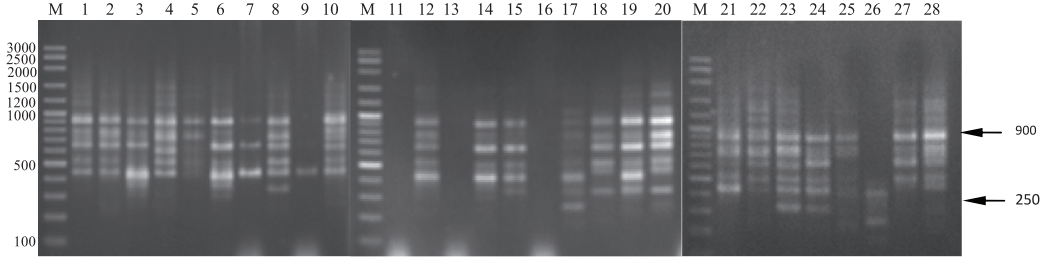
ชื่อการค้า	ชื่อจด ทะเบียน	สิทธิบัตร	ประ เภท	ปี	นักปรับ ปรุงพันธุ์	บริษัท	พันธุ์ประวัติ
Azure Sea	AROlala	PP5,693	HT	1986	Jack E. Christensen	Armstrong Nursery	[(First Prize X Angel Face)x LadyX]
Black Magic®	TANkalcig	PP10,650	HT	1995	Hans Jürgen Evers	Rosen-Tantau	TANorelev x KORlimit
Bridal Pink	JACbri	PP 2,851	HT	1967	Eugene S. Boerner	Jackson &Perkins	Seedling of Summertime x seedling of Spartan
Dallas	KORlimit	unpatented	HT	1987	Wilhelm Kordes III	Kordes	Aragelique® x seedling
Diplomat	De Vine	PP6,031	HT	1987	Stanley G. Marciel	DeVor Nursery.	Carinella x seedling no. G64022-39
Emblem	JACblem	PP 4,847	HT	1981	William A. Warriner	Jackson &Perkins	Seedling x Sunshine
Emeraude d'Or	-	unpatented	HT	-	G. Delbard	Delbard	Sultane x Queen Elizabeth
First Red	PEKcoujenny	PP 7,749	HT	1991	Paul Pekmez	NIRP International	Unnamed seedling x KORpek
Fragrant Cloud	TANellis	PP 2,574	HT	1967	Mathias Tantau, Jr	Rosen-Tantau	Prima Ballerina® x Montezuma
Frisco	KORflapei	PP 6,695	FL	1989	Reimer Kordes	Kordes	Seeding x Champagne
Jade	TANedaj	unpatented	HT	2000	Mathias Tantau, Jr	Rosen-Tantau	Absence of parentage records

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Josephine Charlotte	MELlux	-	HT	1994	Gjisbert de Ruiter	De Ruiter	Absence of parentage records
Kardinal	KORlingo	PP 5,846	HT	1986	Reimer Kordes	Jackson & Perkins	Unnamed seedling x Flamingo
Naomi	-	-	HT	1998	Lionel Poole	Schreurs	Red Lion x Seedling
Osiana™	Osiana	PP7,660	HT	1991	Hans Jürgen Evers	Rosen-Tantau	Unnamed seedling x Unnamed seedling
Paris de Yves St. Laurent ™	MEIvamo	PP 8,619	HT	1994	Disc.by Alain Meilland	Conard-Pyle	Sport of Silva ®
Pink Noblesse	TANeselbon	unpatented	HT	1989	Hans Jürgen Evers	Rosen-Tantau	Absence of parentage records
Raphaela	TANalephar	PP 9,064	HT	1994	Hans Jürgen Evers	Rosen-Tantau	Seedling × TANettelur
Ravel	RUIsteenka	PP 8,632	HT	1994	Disc. by J.E. Steenks	De Ruiter	Mutation of Vivaldi (RUIdriko)
Saphir®	TANrikas	PP 8,618	HT	1994	Hans Jürgen Evers	Rosen-Tantau	Unnamed Seedling × Unnamed Seedling
Sundance	JACnel	unpatented	HT	1992	William A. Warriner.	Bear Creek	[Unnamed seedling X Emblem]
Texas ®	KORbacol	PP 8,617	HT	1993	Wilhelm Kordes III	Kordes' Söhne	Unnamed Seedling x 'Cocktail 80'
Tineke	Ines	PP 8,055	HT	1992	Herman H. Boerlage	Terra Nigra B.V.	Nursery Stock Plant No. K70 x Unnamed Seedling.
Top Secret	MEIbolnay	PP 9,636	HT	1996	Alain Meilland	Conard-Pyle	[(DELadel ×Kardinal (KORlingo)x MEIbuito]
Vendela™	TANaledev	PP 10,999	HT	1999	Hans Jürgen Evers	Bear Creek	Unname white seedling x TANweisa
Vivaldi	RUIdriko	PP 7,362	HT	1990	Gjisbert de Ruiter	De Ruiter	KORflug x RUImeva
White Noblesse	TANequa	unpatented	HT	-	Mathias Tantau, Jr.	Rosen-Tantau	Absence of parentage records
Eliza/Persia	KORlis	PP 9,752	HT	1996	Wilhelm Kordes III	Bear Creek	TANrikas (Saphir®) x Unname seedling

หมายเหตุ: HT=Hybrid tea; FL=Floribunda

ที่มา: ดัดแปลงจาก Pertwee, (2000; 2003), http://helpmefind.come/Roses, http://google.com/patents



ภาพที่ 1 ไพรเมอร์ OPA 04 ที่ให้จำนวนแถบโพลีมอร์ฟิคมากที่สุด

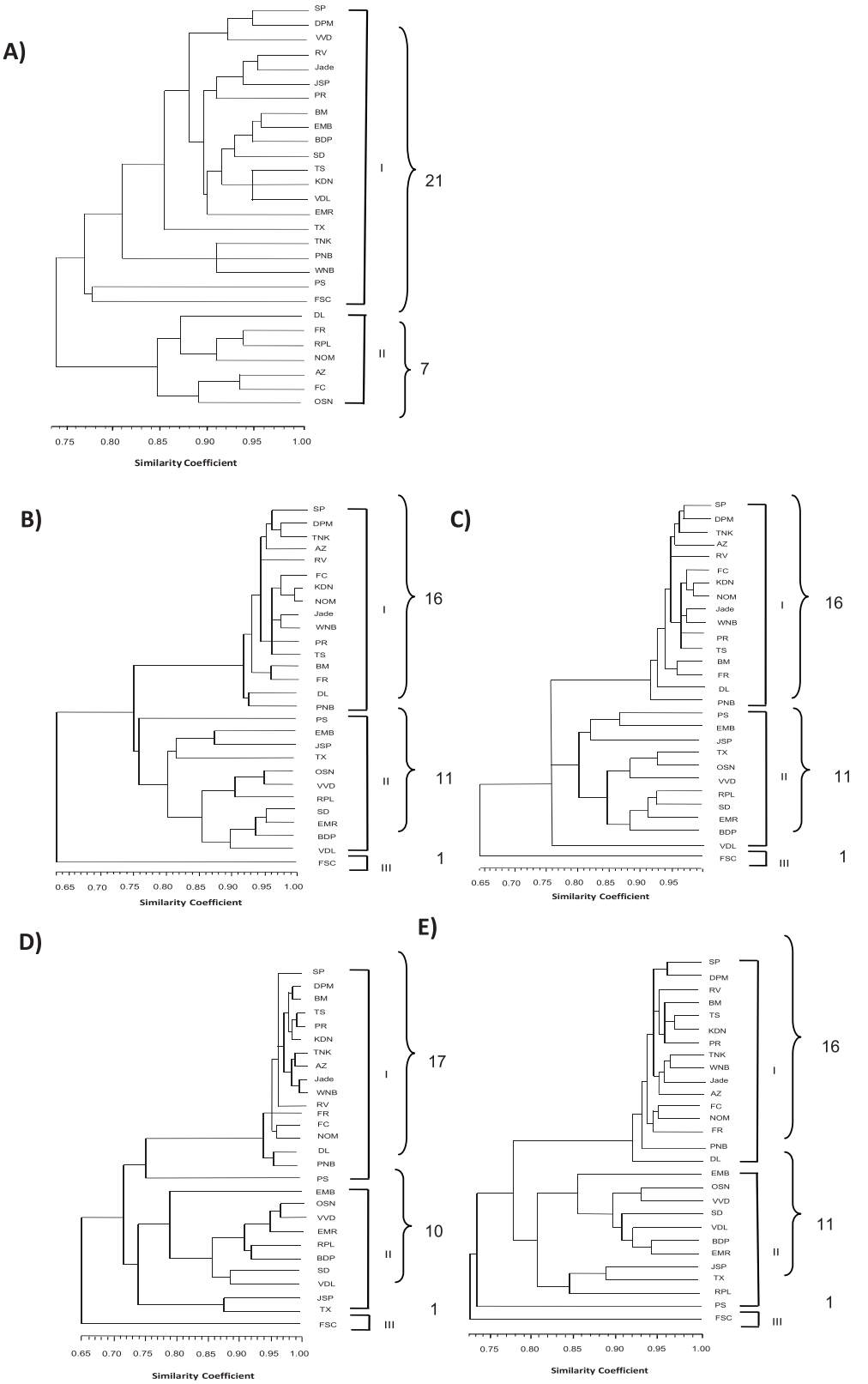
1=SP, 2=DL,3=DPM, 4=TNK,5=AZ, 6=RV,7=BM,8=FC,9=FR, 10=PS, 11=EMB, 12=OSN, 13=PNB, 14=VVD, 15=NOM, 16=JSP, 17=TX, 18=RPL, 19=KDN, 20=WNB, 21=BDP, 22=TS, 23=JADE, 24=SD, 25=VDL, 26=FSC, 27=PR, 28=EMR

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกุหลาบ 28 พันธุ์ที่ใช้ในการศึกษา

รายชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	ขนาดแถบดีเอ็นเอ(คู่เบส)	จำนวนโพลีมอร์ฟิค	เปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิค	จำนวนโมโนมอร์ฟิค
OPA-04	5`-AATCGGGCTG-3`	61	250-900	61	100	0
OPA-09	5`-GGTTACTGCC-3`	84	300-2000	83	98.8	1
OPA-11	5`-CAATCGCCGT-3`	86	450-1800	83	96.5	3
OPB-6	5`-TGCTCTGCCC-3`	83	300-1500	82	98.8	1
OPB-7	5`-GGTGACGCCC-3`	97	200-1500	94	96.9	3
OPB-8	5`-GGTGACGCAG-3`	121	180-2400	118	97.5	3
OPB-9	5`-TGGGGGACTC-3`	122	200-1500	119	97.5	3
OPB-10	5`-GTGACATGCC-3`	130	250-1000	129	99.2	1
OPE-4	5`-ACGGATGCC-3`	90	400-1500	90	100	0

ตารางที่ 4 (ต่อ)

OPF-11	5`-ACGGATCCTG-3`	112	250-1500	105	93.8	7
OPH-15	5`-AATGGCGCAG-3`	50	500-1500	50	100	0
OPH-17	5`-CACTCTCCTC-3`	69	400-1200	69	100	0
OPJ-4	5`-CCGAACACGG-3`	145	150-1800	138	95.2	7
OPN-02	5`-ACCAGGGGCA-3`	86	350-2500	86	100	0
OPN-03	5`-GGTACTCCCC-3`	103	200-1700	99	96.1	4
OPN-09	5`-TGCCGGCTTG-3`	54	220-1500	54	100	0
OPN-12	5`-CACAGACACC-3`	38	300-1000	38	100	0
OPO-14	5`-AGCATGGCTC-3`	77	200-1300	77	100	0
OPP-11	5`-AACGCGTCGG-3`	98	300-1200	94	95.9	4
OPR-15	5`-GGACAACGAG-3`	90	200-1300	87	96.7	3
OPT-19	5`-GTCCGTATGG-3`	27	900-1300	27	100	0
OPW-09	5`-GTGACCGAGT-3`	51	400-1800	51	100	0
OPX-13	5`-ACGGGAGCAA-3`	79	350-1200	76	96.2	3
OPAD-01	5`-CAAAGGGCGC-3`	111	200-1100	110	99.1	1
OPH-01	5`-TCCGCAACCA-3`	60	300-1000	60	100	0
OPH-03	5`-GGGTAACGCC-3`	90	300-1500	90	100	0
OPAU-08	5`-CACCGATCCA-3`	111	200-1600	111	100	0
OPR-20	5`-ACGGCAAGGA-3`	-	-	-	-	-
รวม		2325		2281		44
เปอร์เซ็นต์				98.1		1.9
เฉลี่ย		83.0		81.5	94.9	1.6



ภาพที่ 2 เดนโดรแกรมของกุหลาบตัดดอก 28 พันธุ์ จากข้อมูลดังนี้

A) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา B) ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ C) ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และลักษณะทางสัณฐาน D) ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ E) ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้และลักษณะทางสัณฐาน

วิจารณ์

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ของกุหลาบโดยใช้เทคนิค HAT-RAPD พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของพันธุกรรมได้ ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน 28 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 27 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 2,325 แถบ เป็นแถบที่เกิดโพลีมอร์ฟิค จำนวน 2,281 แถบ ส่วนใหญ่เกิดโพลีมอร์ฟิคค่อนข้างสูง ระหว่าง 93.8-100% ในที่นี้จึงคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้เกณฑ์จำนวนแถบดีเอ็นเอมากกว่า 100 แถบ เพราะทั้งมีจำนวนแถบปรากฏมากและมีเปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิคสูง สามารถคัดได้ 7 ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มาก และเกิดโพลีมอร์ฟิคได้มากที่สุด คือ OPJ-4 การสร้างเดนโดรแกรมจากไพรเมอร์ที่มีเปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิคน้อย หรือไม่ได้คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมก่อน อาจทำให้การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมไม่ถูกต้องได้ ดังเช่น ÇaliŞkan and Ağaoğlu (2009) ได้ศึกษาความหลากหลายของกุหลาบ 47 พันธุ์ ได้แก่ กุหลาบประดับสวนใหม่ 27 พันธุ์ กุหลาบประดับสวนเก่า 5 พันธุ์ และกุหลาบตัดดอก 15 พันธุ์ โดยใช้ 19 ไพรเมอร์ มีเปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิค ระหว่าง 40.0-87.5 % สร้างเป็นเดนโดรแกรม พบว่าสามารถจัดได้ 3 กลุ่ม ตามประเภทของกุหลาบ แต่มีการจัดสมาชิกในบางกลุ่มไม่เหมาะสมอยู่ ในขณะที่ Mohapatra and Rout (2006) ได้คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมก่อน โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 20 ไพรเมอร์ สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมได้ 10 ไพรเมอร์ ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุหลาบประดับสวน 34 พันธุ์ สามารถจำแนกกุหลาบได้ 9 กลุ่มใหญ่ ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ตั้งแต่ 0.37-0.81 สามารถลดจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ลงได้ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายและให้ผลการวิเคราะห์ที่ดีเช่นเดียวกัน เมื่อเปรียบเทียบจากเดนโดรแกรมที่สร้าง 5 แบบ พบว่าส่วนใหญ่จำแนกได้ 3 กลุ่ม ยกเว้นเดนโดรแกรมจากลักษณะทางสัณฐานที่จัดกลุ่มได้ 2 กลุ่ม เดนโดรแกรมจากไพรเมอร์ที่เหมาะสม สามารถจัดกลุ่มได้ใกล้เคียงกับไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณได้ 27 ไพรเมอร์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไป จึงควรใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสม 7 ไพรเมอร์นี้ในการตรวจสอบพันธุกรรมอย่างไรก็ตามการจัดจำแนกโดยอาศัยข้อมูลทางดีเอ็นเอเพียงอย่างเดียว อาจไม่สอดคล้องกับลักษณะฟีโนไทป์ที่แสดงออก จึงควรนำลักษณะทางสัณฐานวิทยามาวิเคราะห์ผลร่วมด้วย ซึ่งพบว่าสามารถจัดกลุ่มได้ใกล้เคียงกับเดนโดรแกรมที่ได้จาก 27 ไพรเมอร์ ดังนั้นจึงเป็นเดนโดรแกรมที่เหมาะสมที่สุด ที่สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกุหลาบตัดดอกประเภทไฮบริดที ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด (0.92-0.98) ซึ่งอาจมาจากบรรพบุรุษร่วมกัน หรือผสมภายในเครือญาติ กลุ่มที่ 2 เป็นกุหลาบประเภทไฮบริดที มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมปานกลางที่ค่อนข้างมีความหลากหลายมาก (0.75-0.98) ส่วนกลุ่มที่ 3 เป็นกุหลาบประเภทฟลอริบันด้า จึงมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับวิวัฒนาการของกุหลาบตัดดอก โดยกุหลาบไฮบริดทีเกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างกุหลาบไฮบริด เพอเพทชวล กับกุหลาบทีโรส สำเร็จในปี ค.ศ. 1830 ส่วนกุหลาบพวงเกิดจากการนำกุหลาบโพลีแอนท่าพุ่มเตี้ย และกุหลาบมัลติฟลอร่า ผสมกับกุหลาบไฮบริดที สำเร็จในปี ค.ศ. 1930 (Marriott, 2003) ดังนั้นกุหลาบไฮบริดที จึงมีวิวัฒนาการมาก่อนกุหลาบฟลอริบันด้า ซึ่งมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อย และการนำลักษณะทางสัณฐานวิทยามาร่วมวิเคราะห์ด้วยข้อมูลดีเอ็นเอสอดคล้องกับ Cortese *et al.* (2010) รายงานว่าทำให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่ดีกว่าเดนโดรแกรม จากข้อมูลสัณฐานวิทยาหรือเครื่องหมายโมเลกุลอย่างใดอย่างหนึ่ง โดยได้ศึกษาการจัดกลุ่มประชากรของหญ้า switchgrass 12 ประชากร โดยนำข้อมูลสัณฐานวิทยา 7 ลักษณะ และใช้เครื่องหมายโมเลกุล EST-SSRs จาก 7 ไพรเมอร์ มาสร้างเป็นเดนโดรแกรม สามารถจัดกลุ่มตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้สอดคล้องกับถิ่นกำเนิดของหญ้าในแต่ละภาคของสหรัฐอเมริกา

เนื่องจากกุหลาบ เป็นพืชที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง (Highly heterozygous) (Samphraya, 1975) และกุหลาบไฮบริดที และฟลอริบันด้ามีโครโมโซม 4 ชุดเท่ากัน (Krasaechai, 1997) จึงมีโอกาสให้ลูกผสมที่มีกระจายตัวค่อนข้างสูง ทั้งที่เหมือนกันและแตกต่างจากพ่อแม่ (Samphraya, 1975) ดังจะเห็นได้ว่า กุหลาบบางพันธุ์

ที่ความสัมพันธ์ในเชิงเครือญาติถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เช่น Dallas เป็นรุ่นพ่อของ Black Magic และ Kardinal เป็นรุ่นตาของ Top Secret ต่างถูกจัดในกลุ่มที่ 1 เหมือนกัน ส่วน Emblem เป็นรุ่นพ่อของ Sundance ก็ถูกจัดในกลุ่มที่ 2 เช่นกัน ในขณะที่บางพันธุ์มีความสัมพันธ์กันแต่ถูกจัดจำแนกต่างกลุ่ม เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างแตกต่างกัน เช่น Saphir เป็นแม่ของ Persia แม่ถูกจัดในกลุ่มที่ 1 ในขณะที่ลูกอยู่ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งจะเห็นได้ว่าเกือบทุกเดนโดรแกรม (2B-2E) ต่างแสดงว่ามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยกับ Saphir ส่วนพันธุ์ Ravel ซึ่งกลายพันธุ์มาจาก Vivaldi ถูกจัดในกลุ่มที่ 1 ในขณะที่ต้นเดิมถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Debener *et al.* (1996) ที่พบว่าจากการจัดจำแนกกุหลาบปลูก 8 สายพันธุ์ และลูกผสมที่ปรับปรุงพันธุ์ขึ้น 3 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับกุหลาบป่า 9 สปีชีส์ พบว่าสามารถจัดจำแนกได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ กุหลาบป่า และกุหลาบปลูก แต่พบว่าในการจำแนกสายพันธุ์พ่อแม่ที่รู้พันธุ์ประวัติกับลูกผสม ยังไม่สอดคล้องกับข้อมูลจากเดนโดรแกรมที่ได้ ดังนั้น นักปรับปรุงพันธุ์กุหลาบ ควรศึกษาทั้งข้อมูลทางประวัติพันธุ์ ข้อมูลทางพันธุกรรม และลักษณะสัณฐานวิทยา ประกอบกันจึงจะให้ผลดีที่สุด เนื่องจากพืชในตระกูลกุหลาบ มีกลไกการควบคุมการผสมเกสรแบบ Gametophytic self –incompatibility การมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก อาจทำให้เกิดปัญหาผสมติดลดลงหรือให้เมล็ดน้อยได้ (Sassa *et al.,* 1992, 1994, 1996; Ueda and Akimoto, 2001) ดังนั้นการจัดกลุ่มของเชื้อพันธุกรรมก่อน จึงมีประโยชน์ในการวางแผนผสมเกสร เพราะนอกจากหลีกเลี่ยงการผสมไม่ติดแล้ว ยังทำให้ทราบความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ระหว่างต้นพ่อแม่พันธุ์ว่ามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากน้อยเพียงไร ซึ่งมีประโยชน์ทั้งการผสมเกสรเพื่อคงลักษณะที่ดีไว้จากการผสมเกสรระหว่างพันธุ์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน หรือ การผสมเกสรเพื่อเพิ่มความหลากหลายโดยเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีลักษณะหลากหลายขึ้นหรือมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมน้อยมาผสม ดังนั้นขั้นตอนในการดำเนินการจัดการเชื้อพันธุกรรมกุหลาบเพื่อปรับปรุงพันธุ์ จึงควรดำเนินการดังนี้ 1.) เก็บรวบรวมเชื้อพันธุกรรมจากแหล่งพันธุกรรมที่เชื่อถือได้ 2.) ตรวจสอบเอกลักษณ์พันธุ์กับสิทธิบัตรพันธุ์เพื่อบันทึกรายละเอียดของพันธุ์(เช่น ชื่อ แหล่งที่มา ปีที่จดทะเบียน และพันธุ์ประวัติ) 3.) ปลูกทดสอบเพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้ 4.)ตรวจสอบความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยวิธี HAT-RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสม 5.)จัดกลุ่มเชื้อพันธุกรรมตามเดนโดรแกรมที่เหมาะสม จากทั้งข้อมูลเครื่องหมายโมเลกุล ลักษณะทางสัณฐาน และพันธุ์ประวัติ 6.) ผสมเกสรตามกลุ่มที่ได้กำหนดไว้ ด้วยวิธีดังกล่าวนี้ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์กุหลาบ สามารถจัดกลุ่มและวางแผนใช้ประโยชน์จากเชื้อพันธุกรรมของตนเองได้ดียิ่งขึ้น

สรุป

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเทคนิค HAT-RAPD สามารถนำมาใช้ในการจำแนกความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์กุหลาบตัดดอกได้ในระดับหนึ่ง แต่ต้องเลือกใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสม และต้องพิจารณาลักษณะของข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และพันธุ์ประวัติ ประกอบด้วย จึงให้ผลถูกต้องมากที่สุด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ฝ่ายวิจัย มูลนิธิโครงการหลวงที่ให้ทุนวิจัย และขอขอบคุณนายแพทย์ธีระ อั่มสวัสดิ์ และคุณพจนา นาควัชระที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการดำเนินงานตลอดงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Anuntalabhochai S., J.Chiangda, R. Chundet and P. Apavatjrut. 2000. Genetic diversity within Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis. *International Symposium on Tropical and Subtropical Fruit.* 26th Nov-1st Dec. Canns. Australia. p. 45.

Çalişkan, M. and Y.S. Ağaoğlu. 2009. Molecular Characterization of Rose Genotype(Rosa sp.) based on RAPD-PCR. *Tarla Bitkileri Merkez Araştirma Enstitüsü Dergisi.* 18(1-2): 36-42

Chundet, R., Cutler, R.W., Tasanon, M., and Anuntalabhochai, S. 2007. Hybrid detection in Lychee (*Litchee chinensis* Sonn.) cultivars using HAT-RAPD markers. *Scienceasia.* 33: 307-311.

Cortese, L. M., J. Honig, C. Miller and S.A. Bonos. 2010. Genetic diversity of twelve switchgrass populations using molecular and morphological markers. *Bioenergy Reserch*. 3 (3): 262-271.

Debener, T., C. Bartels and L. Mattiesch. 1996. RAPD analysis of genetic variation between a group of rose cultivars and selected wild rose species. *Molecular Breeding*. 2: 321-327

Doyle, J. J. and J. L. Doyle. *1990*. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus.* 12:13-15.

http://helpmefind.come/Roses

http://google.com/patents

Krasaechai, A. 1997. Rose. Department of Horticulture. Ming mueang printing.119 p. (in Thai)

Marriott, M. 2003. History of roses in cultivation/ Modern (post-1800). *In* A.V. Roberts, T. Debener, and S. Gudin (Eds.). Encyclopedia of rose science. no. 1. Elsevier, Oxford. p. 402-409

Mohapatra, A., and G.R. Rout. 2006. Optimization of primer screening for evaluation of genetic relationship in rose cultivars. *Biologia Plantarum* 50(2): 295-299.

Pertwee, J. 2000. Production and marketing of roses/Rose Varieties data Base. Elsevier international, Reed business information international Agri-and Horticulture, the Netherlands. p. 71-110 .

Pertwee, J. 2003. Production and marketing of roses II /Rose Varieties data Base. Elsevier international, Reed business information international Agri-and Horticulture, the Netherlands. p. 52-90.

Promtap, W. and S. Anuntalabhochai, 2005. Genetic variation of *Ficus spp*. using HAT-Random Ampllified Polymorphic DNA. *Journal of Science Center of Sakon Nakhon Rajabhat University*. 2(1):39-52.

Samphraya, N. 1975. A study of various characteristics of *Rosa hybrida* 'Baccara' x 'Norita' Progeny. M.S.Thesis, Kasetsart University, Bang kok. 58 p. (in Thai)

Sassa, H., H. Hirano, and H. Ikehashi. 1992. Self-incompatibillity-related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *Plant and Cell Physiology*. 33. 811-814.

Sassa, H., N., Mase, H. Horano, and H. Ikehashi. 1994. Identification of self-incompability–related glycoproteins in style of apple *(Malus x domestica) Theoretical and Applied Genetics.* 89: 201 – 205.

Sassa, H., T. Nishio, Y. Kowyama, H. Hirano, T. Koba, and H. Ikehashi. 1996. Self-incompatibility (S) alleles of the *Rosaceae* encode member of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Molecular and Genetics*. 250: 547– 557.

Swofford, D.L. 1993. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony: version 3.1. Il-linois Natural History Survey. 302 p.

Ueda, Y., and S. Akimoto. 2001. Cross-and self-compatibility in various species of the genus *Rosa*. J*ournal of Horticulture Science and Biology.* 76:392 – 395.