ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น (Calanthe group) จากเครื่องหมาย SRAP และการพัฒนาเครื่องหมาย SCAR สำหรับระบุบางสกุล/ชนิด

สุรภา นัทพรนิชกุล

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น (Calanthe group) จากเครื่องหมาย SRAP และการพัฒนาเครื่องหมาย SCAR สำหรับระบุบางสกุล/ชนิด

สุรภา นัทพรนิชกุล

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น (Calanthe group) จากเครื่องหมาย SRAP และการพัฒนาเครื่องหมาย SCAR สำหรับระบุบางสกุล/ชนิด"

ของ สุรภา นัทพรนิชกุล

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ดร.พัทธมน แสงอินทร์)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล)

อนุมัติ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มุณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น (Calanthe group) จากเครื่องหมาย SRAP และการพัฒนาเครื่องหมาย SCAR สำหรับระบุบางสกุล/ชนิด

ผู้วิจัย สุรภา นัทพรนิชกุล

ประธานที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มลิวรรณ นาคขุนทด

กรรมการที่ปรึกษา ดร.พัทธมน แสงอินทร์

ประเภทสารนิพนธ์ วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2561

คำสำคัญ เอื้องน้ำต้น, กล้วยไม้, เครื่องหมาย SCAR, เครื่องหมาย SRAP

บทคัดย่อ

เอื้องน้ำต้น (Calanthe group) เป็นกลุ่มของกล้วยไม้ที่มีลักษณะดอกสวยงาม ประกอบด้วย 3 สกุล คือ เอื้องน้ำต้น (*Calanthe*) เอื้องพร้าว (*Phaius*) และเอื้องกลีบเกลียว (*Cephalantheropsis*) ซึ่งทั้ง 3 สกุล มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน ทำให้การจัดจำแนกโดยใช้สัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวนั้นทำได้ยาก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้เครื่องหมาย Sequence related amplified polymorphism (SRAP) ซึ่งพบว่า เครื่องหมาย SRAP จำนวน 18 คู่ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้กลุ่มนี้ได้ 565 แถบ ซึ่งเป็นแถบที่มีความแตกต่าง (polymorphic bands) 562 แถบ คิดเป็น 99.45% เมื่อสร้างแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA พบว่า สามารถจำแนกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มของ *Calanthe* จำนวน 3 กลุ่ม *Phaius* 1 กลุ่ม และ *Calanthe* ร่วมกับ *Cephalantheropsis* อีก 1 กลุ่ม โดยผลที่ได้สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและรายงานที่ศึกษาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ นอกจากนี้ผลการพัฒนาเครื่องหมาย SCAR สำหรับระบุสกุลหรือชนิดด้วยไพรเมอร์จำนวน 44 คู่ ประสบความสำเร็จในการระบุชนิดจำนวน 12 คู่ โดยสามารถใช้ระบุกล้วยไม้ได้ 7 ชนิด และหากใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ร่วมกัน จะสามารถระบุชนิดได้เพิ่มขึ้นอีก 4 ชนิด ซึ่งเครื่องหมาย SCAR ที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบลูกผสมระหว่างชนิด/สกุลของกล้วยไม้ในกลุ่มนี้บางคู่ได้

Title GENETIC RELATIONSHIP OF ORCHIDS IN CALANTHE GROUP BASED ON SRAP MARKERS AND DEVELOPMENT OF SCAR MARKERS FOR SOME GENUS/SPECIES IDENTIFICATION

Author SURAPA NUTTHAPORNNITCHAKUL

Advisor Assistant Professor MALIWAN NAKKUNTOD, Ph.D.

Co-Advisor PATTAMON SANGIN, Ph.D.

Academic Paper Thesis M.S. in Biotechnology, Naresuan University, 2018

Keywords Calanthe, orchid, SCAR markers, SRAP markers

ABSTRACT

Calanthe group is a group of orchid species that have gorgeous flowers. Calanthe orchid consists of 3 genera, namely *Calanthe*, *Phaius* and *Cephalantheropsis*, which share many similar characteristics, causing difficulty in identification. In this study, the genetic relationship of Calanthe group was studied by Sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers. Using 18 primer pairs, 565 fragments were generated in which 562 fragments were polymorphic (99.45%). The dendrogram was constructed using UPGMA method and these Calanthe orchids were separated into 5 clades consisted of 3 groups of genus *Calanthe*, 1 *Phaius* group and the last one included *Calanthe* and *Cephalantheropsis* species. The overall clusters were in agreement with their morphologies and other reports using DNA sequences of the chloroplast genome indicating the effectiveness of SRAP markers. In addition, 44 SCAR primers were designed for genus or species identification. The results showed that 12 primers were successfully used to identify 7 species. In addition, the combination of 2 SCAR primer could differentiate the other 4 species more. SCAR marker developed in this study can be used for detection of interspecific/intergeneric hybrids of some crosses in this group.

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.พัทธมน แสงอินทร์ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และแนวทางในการแก้ปัญหาต่างๆ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์

ขอบขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุพันธ์ กงบังเกิด และคุณทัศนัย ปัญจันทร์สิงห์ ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างกล้วยไม้ในการทำการวิจัย รวมถึงให้คำแนะนำ คำปรึกษา และช่วยเหลือแก้ไขปัญหาต่าง ๆ จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณวรุณ สุวรรณกิตติ คุณวรวิช สุขตระกูล คุณศัตวุฒิ ชุมภูอินทร์ คุณปภาวรินทร์ ภิญโญคำ สมาชิกในห้องปฏิบัติการทางชีววิทยาโมเลกุลทุกท่าน คุณจุฬาลักษณ์ ลิ้นจี่ขาว คุณชุติพร มณีพลาย และแพทย์หญิงอารีย์ หินเพชร ที่ให้การช่วยเหลือ และให้กำลังใจกันมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ คุณสุนันท์ โพธิ์น้อยยัง และคุณฉวีวรรณ เรืองจุ้ย เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ได้อำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ตลอดจนอาจารย์ในภาควิชาชีววิทยาทุกท่าน

ขอขอบคุณ โครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ที่ให้ทุนสนับสนุนแก่ผู้วิจัย ขอขอบคุณทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.: R2560B128) และมหาวิทยาลัยนเรศวร ปี 2560 ที่ให้การสนับสนุน จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ตามวัตถุประสงค์

สุดท้ายขอขอบคุณ บิดา มารดา ที่คอยให้กำลังใจ คอยช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน จนผู้วิจัยทำงานสำเร็จไปได้ด้วยดี

สุรภา นัทพรนิชกุล

สารบัญ

หน้า

..... ค

บทคัดย่อภาษาไทย..... ค

..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ง

..... จ

ประกาศคุณูปการ..... จ

..... ฉ

สารบัญ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

ความเป็นมาของปัญหา..... 1

จุดมุ่งหมายของการศึกษา..... 2

ขอบเขตของงานวิจัย..... 2

นิยามศัพท์เฉพาะ..... 3

สมมติฐานของการวิจัย..... 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

กล้วยไม้ (orchid)..... 4

ลักษณะทั่วไปของกล้วยไม้..... 4

การจัดจำแนกกล้วยไม้ 5
1. การจำแนกตามแหล่งที่พบ 5
2. การจำแนกตามลักษณะการเจริญเติบโต 6
3. การจำแนกทางอนุกรมวิธาน 6
กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น (Calanthe group) 7
1. กล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้น (Calanthe R.Br.) 8
2. กล้วยไม้สกุลเอื้องพร้าว (Phaius Lour.) 10
3. กล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียว (Cephalanteropsis Guill.) 11
เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) 12
ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ 12
เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction) 13
เครื่องหมาย SRAP (Sequence related amplified polymorphism) 14
เครื่องหมาย SCAR (Sequence characterized amplified region) 14
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 15
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 19
ตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษา 19
วิธีดำเนินการทดลอง 20
1. เตรียมตัวอย่างพืช 20
2. การสกัดดีเอ็นเอ 20
3. การตรวจสอบปริมาณและการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 21
4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP สำหรับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ 21
4.1 การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม 21
4.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP 22

5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 23
6. พัฒนาเครื่องหมาย SCAR 23
7. การทดสอบความจำเพาะของเครื่องหมาย SCAR 27
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 29
การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ 29
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ 30
การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม 30
การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP 31
การสร้าง phylogenetic tree และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 32
การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR 35
การตัดแถบดีเอ็นเอและการโคลน 35
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 37
การออกแบบไพรเมอร์ 38
การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ 45
อภิปรายผล 62
1. การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ 62
2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ 63
2.1 การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม 63
2.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP 63
3. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วย phylogenetic tree 64
4. การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR 66
4.1 การตัดแถบดีเอ็นเอและการโคลน 66
4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 67
4.3 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ 67

บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ 70
สรุปผลการวิจัย..... 70
ข้อเสนอแนะ..... 70
..... 71
บรรณานุกรม..... 71
ภาคผนวก..... 77
..... 84
ประวัติผู้วิจัย..... 84

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษา 19

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา 22

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 22

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของสารที่ใช้ในการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิด 25

ตารางที่ 5 ปริมาตรและความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 27

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 28

ตารางที่ 7 อุณหภูมิและเวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 28

ตารางที่ 8 จำนวนแถบดีเอ็นเอและเปอร์เซ็นต์พอลิมอร์ฟิซึมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ SRAP 31

ตารางที่ 9 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (Jaccard similarity coefficient) 33

ตารางที่ 10 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ตัดได้จากการทำ SRAP 35

ตารางที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank 37

ตารางที่ 12 ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดได้ 39

ตารางที่ 13 สรุปผลการทดสอบไพรเมอร์ SCAR แสดงขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ในกล้วยไม้แต่ละชนิด 61

ตารางที่ 14 การระบุชนิดกล้วยไม้จากการรวมไพรเมอร์ SCAR 68

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987) โดย M = GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); Lane 1-4 = C. densiflora; Lane 5-8 = P. flavus; Lane 9-12 = Cep. obcordata 29

ภาพที่ 2 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกคู่ไพรเมอร์คู่ที่เหมาะสม โดย M = 100 bp DNA Ladder (GeneDirex); Lane 1-3 = ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ M3E6; Lane 4-6 = ไพรเมอร์ M3E7; Lane 7-9 = ไพรเมอร์ M3E8; Lane 10-12 = ไพรเมอร์ M3E9; Lane 13-15 = ไพรเมอร์ M3E10; Lane 1,4,7,10,13 = Cep. obcordata; Lane 2,5,8,11,14 = P. flavus; Lane 3,6,9,12,15 = C. densiflora 30

ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA 34

ภาพที่ 4 ผลการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่มาจากกล้วยไม้และไพรเมอร์ต่างๆ โดย M = 1 kb DNA Ladder (GeneDirex); Lane 1-2 = C. triplicata 200 bp M2E1; Lane 3-4 = C. triplicata 200 bp M2E6; Lane 5-7 = C. succedanea 550 bp M2E9; Lane 8 = C. densiflora 700 bp M3E6; Lane 9-11 = C. lyroglossa 480 bp M3E6; Lane 12-14 = C. triplicata 550 bp M3E9; Lane 15-16 = P. indochinensis 800 bp M3E9; Lane 17-18 = C. rubens “alba” 250 bp M4E3; Lane 19 = C. masuca 800 bp M6E10 Lane 20 = Blue colony 36

ภาพที่ 5 พลาสมิดที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดย M = 1 kb DNA Ladder (GeneDirex); Lane 1-2 = C. triplicata 200 bp M2E1; Lane 3-4 = C. triplicata 200 bp M2E6; Lane 5-7 = C. succedanea 550 bp M2E9; Lane 8 = C. densiflora 700 bp M3E6; Lane 9-11 = C. lyroglossa 480 bp M3E6; Lane 12-14 = C. triplicata 550 bp M3E9; Lane 15-16 = P. indochinensis 800 bp M3E9; Lane 17-18 = C. rubens “alba” 250 bp M4E3; Lane 19 = C. masuca 800 bp M6E10; Lane 20 = Blue colony cut with restriction enzyme; Lane 21 = Blue colony uncut 36

ภาพที่ 6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. triplicata ไพรเมอร์ CTR1 (A), CTR 2 (B), CTR 3 (C) และ CTR 4 (D) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens “alba” Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P.

indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae “alba” Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes..... 46

ภาพที่ 7 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. rubens “alba” ไพรเมอร์ CRUA1 (A), CRUA2 (B), CRUA3 (C), CRUA4 (D), CRUA5 (E) และ CRUA6 (F) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens “alba” Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae “alba” Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes..... 48

ภาพที่ 8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. herbacea ไพรเมอร์ CHE1 (A) และ CHE2 (B) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens “alba” Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae “alba” Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes..... 49

ภาพที่ 9 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. clavata ไพรเมอร์ CCL1 (A), CCL2 (B), CCL3 (C), CCL4 (D), CCL5 (E) และ CCL6 (F) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens “alba” Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae “alba” Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes 51

ภาพที่ 10 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. succedanea ไพรเมอร์ CSU1 (A), CSU2 (B), CSU3 (C), CSU4 (D), CSU5 (E), CSU6 (F), CSU7

(G), และ CSU8 (H) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens "alba" Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae "alba" Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes 53

ภาพที่ 11 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. densiflora ไพรเมอร์ CDE1 (A), CDE2 (B), CDE3 (C) และ CDE4 (D) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens "alba" Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae "alba" Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes 55

ภาพที่ 12 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. lyroglossa ไพรเมอร์ CLY1 (A) และ CLY2 (B) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens "alba" Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae "alba" Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes 55

ภาพที่ 13 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. masuca ไพรเมอร์ CMA1 (A), CMA2 (B), CMA3 (C) และ CMA4 (D) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens "alba" Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P.

indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae “alba” Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes 57

ภาพที่ 14 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ P. flavus ไพรเมอร์ PFL1 (A) และ PFL2 (B) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens “alba” Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae “alba” Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes 57

ภาพที่ 15 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ P. indochinensis ไพรเมอร์ PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) และ PIN4 (D) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens “alba” Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae “alba” Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes 59

ภาพที่ 16 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Cep. longipes ไพรเมอร์ CEPL1 (A) และ CEPL2 (B) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens “alba” Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae “alba” Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes 60

บทที่ 1 บทนำ

ความเป็นมาของปัญหา

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกในกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledonous plant) จัดอยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae) เป็นพืชที่มีอายุยืนนาน จำพวกไม่มีเนื้อไม้ (perennial herb) และมีจำนวนชนิดมากที่สุดในกลุ่มพืชดอก กล้วยไม้มีถิ่นอาศัยแบบต่าง ๆ ตั้งแต่บริเวณที่มีน้ำแข็งปกคลุมเกือบตลอดปี เขตหนาว เขตอบอุ่น ไปจนถึงเขตร้อนในป่าทุกประเภท นอกจากกล้วยไม้จะสามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันแล้ว ยังมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะกลุ่ม ทำให้พืชกลุ่มนี้ได้รับความนิยมในการปลูกเลี้ยงและศึกษาเป็นอย่างมาก (อบฉันท์ ไทยทอง, 2543) สำหรับประเทศไทยกล้วยไม้เป็นพืชดอกที่ส่งออกอันดับต้นๆ และเป็นสินค้าที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ส่งผลให้กล้วยไม้ที่มีอยู่ตามธรรมชาติลดน้อยลง โดยกล้วยไม้มีสัดส่วนที่ถูกคุกคามอยู่มาก อันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม รวมไปถึงการใช้ประโยชน์ของมนุษย์เพื่อเป็นไม้ดอกไม้ประดับหรือยารักษาโรค (Qian, Wang, & Tian, 2013) นอกจากกล้วยไม้ในธรรมชาติแล้ว ปัจจุบันยังมีกล้วยไม้ลูกผสมที่เกิดขึ้นจากการปรับปรุงพันธุ์อีกมากมาย รวมไปถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้บางชนิดก็มีความคล้ายคลึงกันเป็นอย่างมาก เช่น กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นที่ประกอบด้วย 3 สกุล คือ สกุลเอื้องน้ำต้น (*Calanthe*) สกุลเอื้องพร้าว (*Phaius*) และสกุลเอื้องกลีบเกลียว (*Cephalantheropsis*) ซึ่งมีการกระจายพันธุ์ในแถบเอเชีย ออสเตรเลีย แอฟริกา และหมู่เกาะแปซิฟิก สำหรับประเทศไทยสามารถพบได้ตามป่าดิบทั่วทุกภาค ซึ่งกล้วยไม้ในกลุ่มนี้จะออกดอกเพียงปีละครั้งเท่านั้น มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลายอย่างที่คล้ายคลึงกันมาก ทำให้ยากต่อการจัดจำแนกชนิดหากไม่มีดอก

จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในนิวเคลียสและคลอโรพลาสต์ พบว่า สามารถแบ่งกล้วยไม้กลุ่มนี้ออกได้เป็น 6 กลุ่ม (section) คือ *Calanthe*, *Cephalantheropsis*, *Paraphaius*, *Phaius*, *Preptanthe* และ *Styloglossum* (Zhai et al., 2014) แต่อย่างไรก็ตามการจัดกลุ่มของกล้วยไม้กลุ่มนี้ก็ยังไม่เป็นที่ชัดเจนหากใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว เนื่องจากกล้วยไม้กลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลายอย่างที่คล้ายคลึงกัน เช่น ลักษณะใบแบบพับจีบ (plicate leaves) เกสรเพศผู้ (stamen) ประกอบด้วยกลุ่มเรณู (pollinium) 2 กลุ่ม กลุ่มละ 4 เรณู กลีบปากของดอกมีลักษณะเป็นเดือย (spurs lip) และมีลักษณะที่เป็นลำต้นเทียมเรียกว่า ลำลูกกล้วย (pseudobulb) (Zhai et al., 2014) นอกจากนี้กล้วยไม้กลุ่มนี้บางชนิดยังขาดข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่ชัดเจน เนื่องจากจะออกดอกเพียงปีละหนึ่งครั้ง ประกอบกับอาจเกิดการผสมข้ามระหว่างชนิดได้ ทำให้การจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำได้ยากยิ่งขึ้น โดยกล้วยไม้กลุ่มนี้พบทั่วโลกประมาณ 200 ชนิด ในขณะที่ประเทศไทยมีรายงานเพียง 23 ชนิด และเนื่องจากความสวยงามของดอกและระยะเวลาการบานที่ยาวนาน ทำให้กล้วยไม้กลุ่มนี้เป็นที่

สนใจของผู้ปลูกเลี้ยงและนักปรับปรุงพันธุ์เป็นอย่างมาก แต่เนื่องจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำให้ปัจจุบันจึงมีการนำความรู้ทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลเข้ามาช่วยในการศึกษาและจัดจำแนกชนิดของกล้วยไม้มากขึ้น เนื่องจากสามารถให้ข้อมูลที่ถูกต้องและแม่นยำมากกว่าการจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว โดยในปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมาพัฒนาและปรับใช้หลายเทคนิค เพื่อช่วยในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตมากขึ้น และการศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นยังมีข้อมูลอยู่น้อย การศึกษาครั้งนี้จึงใช้เทคนิค SRAP (sequence-related amplified polymorphism) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มของกล้วยไม้กลุ่มนี้ โดย SRAP เป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว ให้ผลคงเดิมเมื่อทำซ้ำ (Li & Quiros, 2001) รวมถึงการใช้เครื่องหมายชนิดนี้ในการศึกษาในพืชอื่น เช่น *Cucurbita moschata* (Ferriol, Picó, de Córdova, & Nuez, 2004) *Chrysanthemum morifolium* (Shao, Guo, Deng, & Guo, 2010) *Triticum dicoccoides* (Dong et al., 2010) ก็สามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ นอกจากนี้การพัฒนาเครื่องหมายที่เพิ่มความจำเพาะในการตรวจสอบชนิดของสิ่งมีชีวิตก็ได้รับความนิยมเช่นกัน เนื่องจากสามารถใช้ระบุและจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันได้ โดยใช้เวลาเพียงไม่นาน ไม่ต้องรอให้สิ่งมีชีวิตนั้นเจริญเติบโตหรือแสดงลักษณะที่แตกต่างออกมา ซึ่งในปัจจุบันมีงานวิจัยที่พัฒนาเครื่องหมายที่จำเพาะในการตรวจสอบพืชหลายชนิด เช่น *Ctenopharyngodon idella* (W. Ding, Cao, & Cao, 2009) *Idesia polycarpa* (Wang, Li, Li, Chang, & Li, 2015) *Hypsizigus marmoreus* (S. Sun, Feng, Chen, Hu, & Zhang, 2016) ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะ เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของกล้วยไม้ในกลุ่มเอื้องน้ำต้นอย่างแม่นยำและมีประสิทธิภาพ

จุดมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้เครื่องหมาย SRAP
2. เพื่อพัฒนาเครื่องหมาย SCAR ที่จำเพาะในการระบุชนิดของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น

ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกล้วยไม้ในกลุ่มเอื้องน้ำต้น จำนวน 3 สกุล คือ สกุลเอื้องน้ำต้น (*Calanthe*) สกุลเอื้องพร้าว (*Phaius*) และสกุลเอื้องกลีบเกลียว (*Cephalantheropsis*) โดยศึกษาตัวอย่างที่มีการเก็บรวบรวมไว้ที่สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ สวนกล้วยไม้คุณชายจาง จังหวัดเชียงใหม่ สวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้าในพระราชดำริ จังหวัดพิษณุโลก และ

ตัวอย่างจากจังหวัดเลย เพชรบูรณ์ และพิษณุโลก โดยใช้เครื่องหมาย SRAP และพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกล้วยไม้กลุ่มนี้

นิยามศัพท์เฉพาะ

กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น หมายถึง กล้วยไม้ 3 สกุล คือ เอื้องน้ำต้น เอื้องพร้าว และเอื้องกลีบเกลียว ส่วนใหญ่พบในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

สมมติฐานของการวิจัย

กล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 สกุล คือ เอื้องน้ำต้น เอื้องพร้าว และเอื้องกลีบเกลียว ซึ่งจากการพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่ามีความคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SRAP สามารถใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ทั้ง 3 กลุ่ม ได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้สามารถพัฒนาเครื่องหมาย SCAR (sequence characterized amplified region) ให้จำเพาะต่อกล้วยไม้บางชนิดได้

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กล้วยไม้ (orchid)

กล้วยไม้จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae หรือวงศ์กล้วยไม้ เป็นพืชจำพวกไม่มีเนื้อไม้ที่มีอายุยืนหลายปี ตามรายงานพบว่า วงศ์กล้วยไม้ที่มีอยู่เดิมตามธรรมชาติ มีจำนวนชนิดมากที่สุดในกลุ่มไม้ดอกทั่วโลกพบมากกว่า 796 สกุล 19,000 ชนิด สามารถพบได้ในถิ่นอาศัยแบบต่าง ๆ ตั้งแต่บริเวณที่มีน้ำแข็งปกคลุมเกือบตลอดปีไปจนถึงเขตร้อนในป่าทุกประเภท กล้วยไม้เป็นพืชที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากลักษณะของลำต้น ใบ ดอกที่สวยงามและแปลกตา ทำให้นิยมนำมาปลูกเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย โดยประเทศไทยเป็นแหล่งกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญแหล่งหนึ่งของโลก ซึ่งมีกล้วยไม้พันธุ์พื้นเมืองมากถึง 167 สกุล 1,140 ชนิด (อบฉันท์ ไทยทอง, 2543) จากลักษณะของดอกกล้วยไม้ที่มีความสวยงามและสีสันสดใส ทำให้ได้รับความนิยมในการนำไปประดับตกแต่ง ปักแจกัน ทำกระเช้าดอกไม้ หรือทำของชำร่วยในงานมงคลต่าง ๆ สำหรับประเทศไทยเป็นที่อยู่ของกล้วยไม้อยู่หลายสกุล ไม่ว่าจะเป็นกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) สกุลช้าง (*Rhynchostylis*) สกุลแวนด้า (*Vanda*) สกุลเข็ม (*Ascocentrum*) สกุลกุหลาบ (*Aerides*) สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum*) เป็นต้น (ชวลิต ดาบแก้ว, 2546)

ลักษณะทั่วไปของกล้วยไม้

1. ราก

รากของกล้วยไม้มีขนาดและจำนวนที่ต่างกัน ทำหน้าที่ช่วยในการยึดเกาะของลำต้น รวมไปถึงรากของกล้วยไม้บางชนิดยังสามารถทำหน้าที่สังเคราะห์ด้วยแสงได้ บางชนิดจะโป่งพองออกทำหน้าที่สะสมอาหาร และมีเนื้อเยื่อที่ช่วยในการเก็บกักความชื้นไว้ได้อีกด้วย (อบฉันท์ ไทยทอง, 2543)

2. ลำต้น

กล้วยไม้เป็นพืชที่มีลักษณะลำต้นหลายแบบที่แตกต่างกัน เช่น ลำต้นตรง ลำต้นอวบน้ำ เป็นเหง้า เป็นหัวอยู่ใต้ดิน บางชนิดเป็นลำลูกกล้วย

3. ใบ

กล้วยไม้มีรูปแบบใบผันแปรไปตามแต่ละชนิด ลักษณะใบทั่วไปจะมีเส้นใบขนานตามความยาวของใบ

4. ดอก

ดอกเป็นลักษณะเด่นของกล้วยไม้ สามารถใช้ตรวจหาชื่อวิทยาศาสตร์หรือใช้สำหรับการจำแนกได้ ส่วนของดอกประกอบด้วย กลีบเลี้ยงซึ่งอยู่ชั้นนอกสุด มี 3 กลีบ คือกลีบเลี้ยงบนและกลีบเลี้ยงคู่ข้าง ต่อมาคือกลีบดอกอยู่ถัดจากวงกลีบเลี้ยง มี 2 กลีบอยู่ด้านบน และกลีบล่างหรือกลีบปากที่มีลักษณะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด เส้าเกสร เป็นลักษณะที่พบเฉพาะในกล้วยไม้เท่านั้น เกิดจากการรวมกันของก้านเกสรเพศผู้และเพศเมียอยู่ตรงกลางดอก อับเรณูแต่ละสกุลจะมีจำนวนกลุ่มเรณูที่แตกต่างกันไป และรังไข่

5. ฝักและเมล็ด

ฝักของกล้วยไม้เมื่อแก่เต็มที่จะแตกออกตามแนว 3 แนว ภายในจะมีเมล็ดที่ไม่มีส่วนของเอนโดสเปิร์มและใบเลี้ยง ดังนั้นการที่เมล็ดจะสามารถเจริญเติบโตได้นั้นจะต้องอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมเท่านั้น (อาภรณ์ อุดมศิลป์, 2552)

การจัดจำแนกกล้วยไม้

นอกจากกล้วยไม้ที่พบตามธรรมชาติแล้วยังมีกล้วยไม้ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะที่สวยงามเพิ่มเติมอีกเป็นจำนวนมาก ซึ่งพืชในวงศ์กล้วยไม้มีความหลากหลายสูง รวมถึงมีจำนวนสกุลและชนิดมากมาย ทำให้การจัดจำแนกกล้วยไม้มีหลายระบบ เช่น

1. การจำแนกตามแหล่งที่พบ

(อาภรณ์ อุดมศิลป์, 2552)

การจำแนกกล้วยไม้ตามลักษณะแหล่งที่อยู่อาศัย คือ

1.1 กล้วยไม้อิงอาศัย (epiphytic orchid) พบได้มากที่สุดในป่าทุกประเภท โดยเฉพาะในป่าดิบเขาที่มักอาศัยปะปนกับเฟิร์นหรือมอส โดยการยึดเกาะกับต้นไม้แต่ไม่แย่งอาหารจากต้นไม้ใหญ่ เนื่องจากรากสามารถสังเคราะห์อาหารเองได้

1.2 กล้วยไม้ดิน (terrestrial orchid) กล้วยไม้กลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะมีหัวหรือเหง้าอยู่ที่ผิวดินหรือใต้ดิน แต่หากพบตามป่าดิบจะเป็นประเภทที่สามารถเจริญเติบโตได้ทุกฤดูกาล ส่วนที่พบตามป่าผลัดใบจะเป็นประเภทที่มีการพักตัวในฤดูกาลที่ไม่เหมาะสมเหลือเพียงหัวใต้ดินเท่านั้น

1.3 กล้วยไม้เจริญบนหิน (lithophytic orchid) มีการเจริญแบบยึดเกาะกับหินแทนการยึดเกาะกับต้นไม้

1.4 กล้วยไม้กินซาก (saprophytic orchid) เป็นกลุ่มของกล้วยไม้ที่ไม่สามารถสร้างอาหารจากการสังเคราะห์ด้วยแสงเองได้ เนื่องจากไม่มีใบหรือไม่มีคลอโรฟิลล์ แต่อาศัยอาหารจากการย่อยสลายซากพืชต่างๆ

2. การจำแนกตามลักษณะการเจริญเติบโต

(อาภรณ์ อุดมศิลป์, 2552)

การจำแนกกล้วยไม้ตามลักษณะการเจริญเติบโต สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. พวกที่มีการเจริญเติบโตทางยอด (monopodial orchid) เป็นกล้วยไม้ที่ตายอดจะแตกใบใหม่เจริญขึ้นไปเรื่อย ๆ มีการเรียงตัวของใบแบบซ้อนทับกัน จะออกดอกที่ตาตามข้อของลำต้นไม่ออกที่ยอด

2. พวกที่มีการเจริญทางด้านข้าง (sympodial orchid) เป็นกล้วยไม้ที่มีการสร้างต้นหรือหน่อใหม่จากส่วนโคนของต้นเดิม การเรียงตัวของใบจะม้วนซ้อนเวียนกันไป สามารถออกดอกได้ทั้งที่ยอดและตาข้างตามข้อของลำลูกกล้วย

3. การจำแนกทางอนุกรมวิธาน

การจำแนกกล้วยไม้ตามระบบของ Pridgeon, Cribb, Chase, and Rasmussen (1999) ตามหนังสือชุด The Genera Orchidacearum จัดแบ่งพืชในวงศ์กล้วยไม้ออกเป็น 5 วงศ์ย่อย คือ

1. Apostasioideae เป็นกล้วยไม้ดินที่มีลักษณะของกลีบเลี้ยงและกลีบดอกที่คล้ายกัน มีกลีบปากที่ไม่แตกต่างจากกลีบอื่น เกสรเพศผู้ (stamen) มีจำนวน 3 หรือ 2 อัน เรณูเป็นผง มีก้านชูยอดเกสรเพศเมีย และรังไข่แบ่งออกเป็น 3 ช่อง ซึ่งแตกต่างจากกล้วยไม้กลุ่มอื่น กล้วยไม้กลุ่มนี้มีวิวัฒนาการต่ำสุด มีลักษณะคล้ายกับพืชในวงศ์ลิลี่ (Liliaceae) จึงเป็นกลุ่มของกล้วยไม้ที่มีลักษณะโบราณที่สุด ในประเทศไทยพบ 2 สกุล คือ สกุลตานขโมย (*Apostasia*) และสกุล *Neuwiedia*

2. Cypripedioideae เป็นกล้วยไม้ดิน ที่มีกลีบเลี้ยงด้านข้างเชื่อมติดกันเป็นอันเดียว กลีบปากเป็นถุงคล้ายรองเท้า มีเกสรเพศผู้ที่สมบูรณ์เพศอยู่ทางด้านข้างของเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน ละอองเรณูเหนียวจับกลุ่มกันเป็นแผ่น เป็นกล้วยไม้ที่มีอายุยืนนานและไม่ทิ้งใบ ได้แก่ รองเท้านารี (*Paphiopedilum*) กล้วยไม้กลุ่มนี้มี 4 สกุล 115 ชนิด กระจายพันธุ์ในเขตหนาวเหนือ เขตอบอุ่นเหนือ และเขตร้อน ในประเทศไทยพบเพียงสกุลรองเท้านารีสกุลเดียวจำนวน 12 ชนิด

3. Orchidioideae เป็นกล้วยไม้ดินที่มีเหง้าทอดไปตามผิวดินหรือใต้ดิน มีรากสะสมอาหารใบบาง มีเกสรเพศผู้ 1 อัน ผนังฝาปิดอับเรณู (anther cap) ไม่หลุดร่วง แต่กลุ่มละอองเรณูมีก้านไปยึดติดกับแผ่นเยื่อบาง ๆ ส่วนปลายของจะงอยยอดเกสรเพศเมียจะยืดตัวอยู่ระหว่างอับเรณู มีลักษณะเด่นคือ กลีบเลี้ยงบนเชื่อมติดกับกลีบดอกคล้ายหมวก เช่น สกุลนางอั้ว (*Habenaria*) กล้วยไม้กลุ่มนี้

พบประมาณ 120 สกุล 2,740 ชนิด กระจายพันธุ์ในเขตหนาว เขตอบอุ่น และเขตร้อน ในประเทศไทยพบ 9 สกุล 59 ชนิด

4. Vandoideae ส่วนใหญ่เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย แต่สามารถพบได้ทั้งที่เป็นกล้วยไม้ดินและกล้วยไม้กินซาก มีลักษณะของต้นและใบหลากหลายแบบ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกแยกเป็นอิสระ กลีบปากแยกเป็นอิสระหรือโคนขอบกลีบเชื่อมกับเส้าเกสร มีเกสรเพศผู้ 1 อัน อับเรณูส่วนบนจะแยกออกเป็นฝาปิด (operculum) และหลุดร่วงไปเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ กลุ่มละอองเรณูค่อนข้างเหนียวและแข็งอยู่กันเป็นกลุ่ม มีก้านและมีแป้นยึดก้าน เช่น สกุลวานิลลา (*Vanilla*) กล้วยไม้กลุ่มนี้พบในเขตร้อนและเขตอบอุ่นประมาณ 319 สกุล 4,639 ชนิด ในประเทศไทยพบประมาณ 72 สกุล 286 ชนิด

5. Epidendroideae มีทั้งกล้วยไม้อิงอาศัยและกล้วยไม้ดิน ลักษณะของต้น ใบ และจำนวนเกสรเพศผู้คล้ายวงศ์ย่อย Vandoideae แต่ละอองเรณูจับกลุ่มเป็นก้อนแน่น แต่ไม่แข็ง ละอองเรณูไม่มีก้าน ดอกเดี่ยวหรือหลายดอก อาจมีแขนงช่อ ช่อดอกสามารถเกิดได้ทั้งปลายยอดและด้านข้างของลำต้น เช่น สกุลหวาย (*Dendrobium*) กล้วยไม้กลุ่มนี้มีการกระจายพันธุ์ในเขตร้อนเท่านั้น ทั่วโลกพบประมาณ 309 สกุล 11,007 ชนิด ในประเทศไทยมีประมาณ 32 สกุล 624 ชนิด (Pridgeon et al., 1999; ราชบัณฑิตยสถาน, 2547; อบฉันท์ ไทยทอง, 2543; อาภรณ์ อุดมศิลป์, 2552)

กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น (Calanthe group)

กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น (Calanthe group) จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae วงศ์ย่อย Epidendroideae สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 3 สกุล คือ เอื้องน้ำต้น (*Calanthe*) เอื้องพร้าว (*Phaius*) และเอื้องกลีบเกลียว (*Cephalantheropsis*) โดยทั้ง 3 สกุล มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันทำให้ยากที่จะจัดจำแนก ซึ่งลักษณะสำคัญของกล้วยไม้กลุ่มนี้คือ มีใบอ่อนแบบพับจีบ (plicate leaf) อาจมีหรือไม่มีลำลูกกล้วยหรือมีหัวอยู่ใต้ดิน ลักษณะใบเรียงเวียนสลับหรือสลับระนาบเดียว มีดอกเดี่ยวหรือหลายดอก อาจมีแขนงช่อ ช่อดอก ซึ่งสามารถเกิดได้ทั้งที่ปลายยอดและเกิดด้านข้างลำต้น มีทั้งช่อดอกตั้งตรงและห้อยลง มีเกสรเพศผู้ 1 อัน กลุ่มเรณู 2 ถึง 8 กลุ่ม กลุ่มเรณูส่วนใหญ่ไม่มีก้านกลุ่มเรณู (อาภรณ์ อุดมศิลป์, 2552) โดยมีการจัดลำดับทางอนุกรมวิธานของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นไว้ดังนี้

Kingdom พืช (Plantae)

Division พืชดอก (Magnoliophyta)

Class พืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Liliopsida)

Order แอสพารากาเลส (Asparagales)

Family กล้วยไม้ (Orchidaceae)

Subfamily Epidendroideae

Tribe Collabieae

Genus *Calanthe, Phaius, Cephalantheropsis*

(Angiosperm Phylogeny Group, 2009)

1. กล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้น (*Calanthe* R.Br.)

กล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้น หรือ *Calanthe* ตั้งขึ้นในปี ค.ศ. 1821 โดย Robert Brown นักพฤกษศาสตร์ชาวอังกฤษ โดยมีรากศัพท์มาจากภาษากรีก 2 คำ คือ kalos แปลว่า สวยงาม และ anthe หมายถึง ดอก (ชนินทร์ โถรัตน์, 2541) กล้วยไม้กลุ่มนี้เป็นกล้วยไม้ดินที่มักจะทิ้งใบก่อนจะออกดอก สำหรับประเทศไทยพบจำนวน 15 ชนิด ตามป่าสนเขาและป่าดิบแล้งที่สูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 200 เมตรขึ้นไป ในที่มีอากาศค่อนข้างเย็น และชอบขึ้นในที่ที่มีร่มเงา ลักษณะหัวอวบน้ำ บางชนิดต้นสั้น มีใบคลุม ใบยาวและมีรอยพับจีบตามยาว ช่อดอกเกิดทางด้านข้างของหัวหรือจากซอกใบยาว 20-60 เซนติเมตร ส่วนใหญ่มีขนตลอดช่อ ดอกเกิดช่วงปลายของช่อ ทยอยบานไปเป็นเวลานาน ดอกขนาดไม่โตนัก โคนกลีบปากมีเดือยยาว ส่วนที่เหลือของกลีบปากมักแยกเป็น 3 แฉก แฉกกลางปลายเว้าลึกต่างกันในแต่ละชนิด เส้าเกสรสั้นและมีส่วนหน้าของเส้าเกสรยืดตัวมาเชื่อมกับโคนกลีบดอก ทำให้ดูคล้ายเส้าเกสรติดอยู่ที่โคนของกลีบปาก กลุ่มเรณูมี 8 กลุ่ม แยกเป็นชุดละ 4 อัน ตัวอย่างกล้วยไม้ในสกุลเอื้องน้ำต้นที่พบในประเทศไทย คือ

1.1 *Calanthe cardioglossa* Schltr. มีชื่อไทยว่าเอื้องน้ำต้น เอื้องเหลี่ยม หรือเฒ่านั่งฮุ่ง พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1906 โดย Carl Curt Hosseus และตั้งชื่อโดย Friedrich Richard Rudolf Schlechter ซึ่งใช้รากศัพท์ในภาษากรีก คือ cardia แปลว่า หัวใจ และ glosso แปลว่า ลิ้น ซึ่งกล้วยไม้ชนิดนี้มีลักษณะของกลีบปากเป็นรูปหัวใจ มีลักษณะของลำลูกกล้วยเป็นรูปรีหรือคล้ายน้ำเต้า ผิวเป็นร่องตื้นตามยาว ใบรูปรีแกมรูปใบหอก ปลายแหลมมน กล้วยไม้ชนิดนี้จะทิ้งใบก่อนออกดอก ช่อดอกตรงหรือปลายโค้ง ผิวกลีบเลี้ยงมีขน มีเดือยดอกยาว ดอกมีหลายสี ตั้งแต่สีเกือบขาว ชมพูอ่อน ชมพูแก่ ชมพูอมม่วง เหลือง และเหลืองอมส้ม ออกดอกช่วงเดือนธันวาคม - มกราคม สามารถพบได้ในป่าดิบเกือบทุกภาคของประเทศไทย ยกเว้นภาคกลาง

1.2 *Calanthe clavata* Lindl. มีชื่อภาษาไทยว่าเอื้องพุ่มคทา เป็นกล้วยไม้ดิน สูงประมาณ 28 – 80 เซนติเมตร ใบแบบพับจีบรูปรี ออกดอกเป็นช่อ ดอกมีสีเหลือง กลีบปากมีหูกลีบชัดเจน โคนเป็นเดือยรูปกระบอง ออกดอกช่วงเดือนพฤศจิกายน - มกราคม พบได้ในป่าดิบทางภาคเหนือและภาคใต้

1.3 *Calanthe densiflora* Lindl. สูงประมาณ 40 – 60 เซนติเมตร ใบแบบพับจีบ ออกดอกเป็นช่อตั้งจากโคนต้นโดยตรง ดอกสีเหลือง ออกดอกช่วงเดือนตุลาคม - ธันวาคม พบได้ตามป่าผสมที่ความสูงเหนือระดับน้ำทะเลประมาณ 1,350 – 1,530 เมตร ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

1.4 *Calanthe lyroglossa* Rchb. f. มีชื่อไทยว่ากล้วยไม้ดงหรือพุ่มข้าวบิณฑ์ มีลักษณะลำต้นสั้นมีกาบใบหุ้ม ใบเป็นรูปขอบขนานแกมรูปรี ดอกจะเกิดไปทางปลายช่อ เรียงตัวเป็นพุ่ม มีใบประดับแทรก ดอกจะทยอยบานเป็นเวลานาน มักอยู่ช่วงเดือนพฤศจิกายน - กุมภาพันธ์ สามารถพบได้ในป่าดิบชื้นทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคใต้

1.5 *Calanthe masuca* (D. Don) Lindl. ชื่อไทยว่าอั้วดอกม่วง มีลักษณะลำต้นสั้นมีกาบใบหุ้ม ใบรูปรีหรือรูปใบหอกกลับ มีขนนุ่มทั้งสองด้าน ปลายใบแหลม โคนเรียว ช่อดอกสูงใกล้เคียงกับใบ ดอกทยอยบานในเดือนกรกฎาคม - พฤศจิกายน สามารถพบได้ในป่าดิบชื้นทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้

1.6 *Calanthe pulchra* (Blume) Lindl. มีชื่อไทยว่า ว่านพร้าวดอกเหลืองหรือเอื้องน้ำต้นมลายู มีลักษณะใบรูปใบหอก ปลายแหลม โคนเรียวแคบเป็นก้านใบ ทิ้งใบก่อนมีดอก ดอกสีเหลืองส้ม ออกดอกช่วงเดือนกันยายน - พฤศจิกายน สามารถพบได้ตามป่าดิบชื้นและป่าดิบเขาทางภาคใต้ของไทย เช่น จังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา ยะลา

1.7 *Calanthe rosea* (Lindl.) Benth. มีชื่อไทยว่าเอื้องข้าวเหนียวลิงหรืออั้วชมพูไพร มีลักษณะหัวรูปรี มักมีส่วนคล้ายน้ำเต้า ใบรูปขอบขนานแกมรูปรี โคนเรียวเป็นก้าน ทิ้งใบก่อนมีดอก ดอกในช่อจะทยอยบานเป็นเวลา มักออกช่วงเดือนพฤศจิกายน - ธันวาคม สามารถพบได้ในป่าดิบชื้นทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตก

1.8 *Calanthe rubens* Ridl. มีชื่อไทยว่าอั้วพวงมณี พบครั้งแรกที่เกาะลังกาวีประเทศมาเลเซีย โดย Charles Curtis และต่อมา Henry Nicholas Ridley ได้ตั้งชื่อกล้วยไม้ชนิดนี้โดยใช้ศัพท์ภาษาละตินซึ่งแปลว่าสีแดง กล้วยไม้ชนิดนี้มีลักษณะลำลูกกล้วยเป็นรูปกลมรี คล้ายน้ำเต้า ใบรูปรี ปลายใบแหลม ช่อดอกมีขนปกคลุม ทิ้งใบก่อนออกดอก โดยดอกในช่อจะทยอยบานในเดือนมกราคม - กุมภาพันธ์ สามารถพบได้ตามป่าดิบในภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงใต้ ภาคกลาง และภาคใต้

1.9 *Calanthe succedanea* Gagnep. ลำต้นสูง 30-47 เซนติเมตร ลำลูกกล้วยรูปไข่เห็นได้ชัดเจน ใบแบบพับจีบ ดอกสีชมพู ออกดอกช่วงเดือนพฤศจิกายน - ธันวาคม พบได้ตามป่าดิบแล้งในภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก

1.10 *Calanthe triplicata* (Willemet) Ames มีชื่อไทยว่าอั้วดอกขาว พุ่มข้าวตอก หรือข้าวตอกฤาษี พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1796 โดย Pierre Willemet ซึ่งตั้งชื่อว่า *Orchis triplicate* ต่อมา Oakes Ames ได้ตั้งชื่อใหม่เป็น *C. triplicata* ซึ่งมีรากศัพท์มาจากภาษาละติน คำว่า tri ซึ่งแปลว่า สาม และคำว่า plicate หมายถึงลักษณะใบแบบพับจีบ ลักษณะลำต้นสั้นมีกาบใบหุ้ม ใบรูปขอบขนานแกมรูปรี ช่อดอกตั้งตรง ออกดอกในช่วงเดือนพฤษภาคม - มิถุนายน สามารถพบได้ในป่าดิบเกือบทุกภาค ยกเว้นภาคกลาง

1.11 *Calanthe vestita* Lindl. มีชื่อไทยว่าอั้วนวลจันทร์หรือขาวมะลิลา พบครั้งแรกโดย Nattaneil Wallich ในประเทศพม่า ต่อมา Sir John Lindley ตั้งชื่อชนิด ซึ่งหมายถึงช่อดอกที่มีขนปกคลุม โดยลำลูกกล้วยมีลักษณะเป็นรูปน้ำเต้า ใบรูปรี ปลายแหลม จะทิ้งใบก่อนออกดอก มักออกดอกในช่วงเดือนพฤศจิกายน - มกราคม พบได้ในป่าดิบแล้งทางภาคใต้

1.12 *Calanthe herbacea* Lindl. กล้วยไม้ดิน สูงประมาณ 100 เซนติเมตร ใบแบบพับจีบขอบขนาน ดอกออกเป็นช่อตั้งจากโคนต้น กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีสีเขียว กลีบปากสีขาว เป็นกล้วยไม้ที่มีการรายงานใหม่ ออกดอกในช่วงเดือนมิถุนายน - สิงหาคม พบได้ตามป่าดิบเขาในภาคเหนือ (Pedersen et al., 2014; ชนินทร์ โถรัตน์, 2541; อบฉันท์ ไทยทอง, 2543)

2. กล้วยไม้สกุลเอื้องพร้าว (*Phaius* Lour.)

กล้วยไม้สกุลเอื้องพร้าวหรือ *Phaius* ตั้งขึ้นโดย Joao de Loureiro ในปี ค.ศ. 1790 ซึ่งมีรากศัพท์มาจากภาษากรีก คำว่า Phaios หมายถึง สีเทา คือลักษณะดอกมีสีเข้มหรือกลีบด้านนอกเป็นสีเทา (ชนินทร์ โถรัตน์, 2541) นิยมปลูกเป็นไม้ประดับกันอย่างแพร่หลาย แต่พบเห็นได้น้อยในธรรมชาติ ในประเทศไทยพบเพียง 5 ชนิด เจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่ค่อนข้างเย็นและในที่ที่มีร่มเงา ลักษณะของต้นและใบคล้ายกับสกุลเอื้องน้ำต้นมาก แตกต่างกันที่โคนกลีบปากของดอกสกุลเอื้องพร้าวจะมีส่วนยืดเป็นถุงหรือเดือยเพียงสั้นๆ กลีบปากเหนือจากถุงหรือเดือยจะเจริญโอบอุ้มเส้าเกสร ส่วนปลายของกลีบปากแผ่ออกคล้ายปากแตร ซึ่งมีปลายด้านหนึ่งบานและโค้งลง กลุ่มเรณูคล้ายกระบองมี 8 อัน แยกเป็น 2 ชุด (อบฉันท์ ไทยทอง, 2543) ตัวอย่างกล้วยไม้ในสกุลเอื้องพร้าวที่พบในประเทศไทย ได้แก่

2.1 *Phaius flavus* (Blume) Lindl. มีชื่อไทยว่าเอื้องพร้าวดอกเหลือง มีลักษณะหัวคล้ายรูปกรวยคว่ำ โคนใบมีกาบใบซ้อนกันคล้ายต้น แผ่นใบเป็นรูปรีหรือรูปแกมใบหอกกลับ ช่อดอกเกิดจากโคนต้น ดอกในช่อแน่นช่วงปลายช่อ ดอกจะทยอยบานในเดือนเมษายน - มิถุนายน พบได้ตามป่าดิบทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

2.2 *Phaius indochinensis* Seidenf. & Ormerod. มีชื่อไทยว่า น้ำค้างกลางเที่ยงหรือเอื้องพร้าวดง สูงประมาณ 60 – 94 เซนติเมตร สีของดอกด้านนอกเป็นสีน้ำตาลเหลือง ด้านในเป็นสีน้ำตาลม่วงกับสีเหลือง ออกดอกช่วงเดือนพฤศจิกายน - มกราคม สามารถพบได้ตามป่าดิบแล้งที่ความสูง 500 – 1,300 เมตร เหนือระดับน้ำทะเลทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคใต้

2.3 *Phaius mishmensis* (Lindl. & Paxton) Rchb.f. มีชื่อไทยว่า กล้วยไม้ดง ค้นพบครั้งแรกในประเทศอินเดีย โดย William Griffith ในครั้งแรก Sir John Lindley และ Joseph Paxton ได้ตั้งชื่อว่า *Limatodis mishmensis* แต่ Heinrich Gustav Reichenbach ได้ย้ายมาไว้ในสกุล *Phaius* สำหรับคำว่า *mishmensis* นั้นตั้งชื่อตามเทือกเขาทางตอนเหนือของอินเดียที่พบกล้วยไม้ชนิดนี้เป็นครั้งแรก กล้วยไม้ชนิดนี้มีลักษณะของลำต้นทรงกระบอกชิด ขึ้นเป็นกอ ใบรูปรีแกมรูปหอกหรือหอกกลับ ปลายใบแหลม โคนใบเป็นกาบ ใบประดับดอกรูปใบหอก กลีบเลี้ยงบนรูปขอบขนานแกมรูปไข่กลับ ปลายกลีบมน กลีบปากรูปรี กลีบกลางมีขนปกคลุม มักออกดอกในช่วงเดือนกันยายน – ตุลาคม ช่วงออกดอกไม่ทิ้งใบ สามารถพบได้ในป่าดิบเขา ตามที่ร่มที่มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 1,000 – 1,400 เมตร

2.4 *Phaius tankervilleae* (Banks ex L'Her.) Blume มีชื่อไทยว่าเอื้องพร้าวหรือฉัตรพระอินทร์ ในครั้งแรก Joseph Banks และ Charles Louis L'Heritier de Brutelle ตั้งชื่อว่า *Limodorum tankervilleae* เพื่อเป็นเกียรติแด่ Countess of Tankerville แต่ต่อมา Carl Ludwig von Blume ได้ย้ายมาอยู่ในสกุล *Phaius* แทน กล้วยไม้ชนิดนี้มีลักษณะลำต้นเป็นหัวรูปไข่เกือบกลม แผ่นใบมีแนวพับจีบ ปลายใบแหลม โคนหุ้มซ้อนกันคล้ายต้น ช่อดอกเกิดจากโคนต้น กลีบเลี้ยงและกลีบดอกรูปใบหอก ปลายกลีบแหลม ด้านในกลีบสีน้ำตาลแดงจนถึงสีน้ำตาลอมม่วง ด้านนอกสีขาวหม่นแกมสีเทา ดอกอยู่ค่อนไปทางปลายช่อ ทยอยออกดอกเป็นเวลานานในช่วงเดือนพฤศจิกายน - ธันวาคม ช่วงออกดอกจะไม่ทิ้งใบ สามารถพบได้ในป่าดิบเขา ป่าดิบแล้งทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Pedersen et al., 2014; ชนินทร์ โถรัตน์, 2541; อบฉันท์ ไทยทอง, 2543)

3. กล้วยไม้สกุลเอื้องกลีบเกลียว (*Cephalanteropsis* Guill.)

สกุลเอื้องกลีบเกลียวหรือ *Cephalantheropsis* ตั้งขึ้นในปี ค.ศ. 1960 โดย Jean Baptiste Antoine Guillemin ซึ่งมาจากคำว่า *Cephalanthera* และคำว่า *opsis* หมายถึงคล้าย ชื่อสกุลนี้จึงหมายถึงสกุลที่คล้ายกับสกุล *Cephalanthera* (ชนินทร์ โถรัตน์, 2541) ประเทศไทยพบ 2 ชนิด พบตามป่าดิบเขา ตามที่โล่งแจ้งแสงแดดจัดและแสงแดดรำไร กลีบเลี้ยงมีลักษณะรูปใบหอกจนถึงรูปแถบ กลีบดอกรูปแถบ เส้าเกสรสั้น สีเหลือง ที่ปลายมีฝาครอบกลุ่มเรณูสีขาว (อาภรณ์ อุดมศิลป์, 2552) กล้วยไม้ในสกุลเอื้องกลีบเกลียวที่พบในประเทศไทย คือ

3.1 *Cephalanteropsis obcordata* (Lindl.) Ormerod มีชื่อไทยว่าเอื้องกลีบเกลียว พบครั้งแรกในประเทศอินเดีย โดยชื่อชนิดนี้มาจากภาษาละตินที่แปลว่า รูปหัวใจกลับ ซึ่งหมายถึงกลีบปากที่มีลักษณะเป็นรูปหัวใจกลับ โดยกล้วยไม้ชนิดนี้มีลักษณะลำต้นค่อนข้างยาว ใบรูปรี ปลายใบแหลม กลีบดอกรูปแถบสีเหลือง ปลายกลีบแหลมม้วนบิดเมื่อบานเต็มที่ ออกดอกช่วงเดือนพฤศจิกายน - มกราคม เมื่อออกดอกจะไม่ทิ้งใบ สามารถพบได้ตามป่าดิบเขา หรือที่โล่งแจ้งทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคใต้ (ชนินทร์ โถรัตน์, 2541)

3.2 *Cephalantheropsis longipes* (Hook.f.) Ormerod. ลำต้นสูงประมาณ 30 – 50 เซนติเมตร ช่อดอกยาว แผ่นใบพับ ดอกมีขนาดใหญ่สีเหลืองหรือสีเหลืองส้ม ออกดอกช่วงเดือนกรกฎาคม พบได้ตามป่าเขาที่อยู่สูงเหนือระดับน้ำทะเล 1,200 เมตร ทางภาคเหนือและภาคใต้ เป็นกล้วยไม้รายงานใหม่ในปี 2010 (Pedersen et al., 2014)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ใช้เป็นเครื่องหมายในการระบุความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่อยู่ที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) โดยการเกิดพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสหรือความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นนั้นสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552) ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ดีควรมีคุณสมบัติที่ประกอบไปด้วยการมีพอลิมอฟิซึมของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้เกิดเอกลักษณ์เฉพาะตัว สามารถตรวจสอบได้ทั้งจีโนม ไม่ใช่แค่บริเวณใดบริเวณหนึ่ง ทำได้ง่าย รวดเร็ว มีความถูกต้องเที่ยงตรงสูง แต่ใช้ต้นทุนต่ำ (สุชาดา สุขหร่อง, 2553)

ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบไฮบริไดเซชัน (Hybridization-based marker) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอซึ่งเริ่มต้นทำในมนุษย์ โดยการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วถ่ายดีเอ็นเอลงสู่แผ่นเมมเบรน จากนั้นไฮบริไดซ์ โดยอาศัยหลักการการเข้าคู่กันของลำดับเบสที่เป็นคู่สมระหว่างดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวติดตามหรือโพรบ (probe) ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารปลอดรังสี เรียกว่าเครื่องหมายไฮบริไดเซชัน (Hybridization) เช่น เครื่องหมาย Restriction fragment length polymorphism (RFLP marker) เป็นต้น (สุชาดา สุขหร่อง, 2553; สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

2. เครื่องหมายดีเอ็นเอแบบพีซีอาร์ (PCR-based marker) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction) โดยจะใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับช่วงของดีเอ็นเอหรือยีนหนึ่งๆ หรือใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่

ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เนื่องจากใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว เช่น เครื่องหมาย Random amplified polymorphic DNA (RAPD marker) เครื่องหมาย Amplified fragment length polymorphism (AFLP marker) เครื่องหมาย Sequence related amplified polymorphism (SRAP marker) เครื่องหมาย Sequence characterized amplified regions (SCAR marker) เป็นต้น (สุชาดา สุขหร่อง, 2553; สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

3. เครื่องหมายดีเอ็นเอจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence-based marker) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการระบุลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอบางส่วนจากสายดีเอ็นเอทั้งหมดที่ไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่เครื่องหมายชนิดนี้มีข้อเสียคือ ต้องใช้ต้นทุนสูงเมื่อเทียบกับวิธีอื่น และการที่จะหาลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ครบทั้งจีโนมนั้นทำได้ยาก จึงต้องเลือกศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอเฉพาะบางบริเวณที่เหมาะสมเท่านั้น (Nadeem et al., 2018) ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ได้แก่ เครื่องหมาย SNP (Single nucleotide polymorphism) หรือการทำบาร์โค้ด (DNA barcoding)

เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction)

เทคนิคพีซีอาร์หรือปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสพัฒนาโดย Mullis และคณะ ในปี ค.ศ. 1985 เป็นเทคนิคพื้นฐานทางชีววิทยาระดับโมเลกุลในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นเพียงเล็กน้อย รวมไปถึงไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นบริสุทธิ์ก่อนก็สามารถเพิ่มปริมาณได้ การทำพีซีอาร์คือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสซ้ำกันหลายรอบ เพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจำเป็นต้องมีไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นสายสั้นๆ ที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ forward และไพรเมอร์ reverse จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสาย โดยปลาย 3′ อยู่ในทิศทางเข้าหากัน ดังนั้นการทำพีซีอาร์จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มเพื่อให้สามารถออกแบบไพรเมอร์มาทำการเพิ่มปริมาณได้ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส และจากการค้นพบเอนไซม์พอลิเมอเรสจากแบคทีเรียในน้ำพุร้อน *Thermus aquaticus* ซึ่งสามารถทนความร้อนได้สูง ทำให้การทำพีซีอาร์ทำได้สะดวก (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

เครื่องหมาย SRAP (Sequence related amplified polymorphism)

เครื่องหมาย SRAP พัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 2001 โดย Li และ Quiros เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในจีโนมทั้งหมด โดยเน้นบริเวณ open reading frame (ORF) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งใช้สำหรับการทำแผนที่ยีนและการตามหายีน *GLS-ALK* ในพืชกลุ่มผักกาด โดยออกแบบไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ โดยมีไพรเมอร์ชนิด forward และ reverse ยาว 17 และ 18 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ ประกอบด้วย core sequence ยาว 13-14 เบส โดย 10-11 เบสแรกเริ่มต้นด้านปลาย 5′ เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่จำเพาะ (filler sequence) ตามด้วย CCGG ในไพรเมอร์ชนิด forward และ AATT ในไพรเมอร์ชนิด reverse และตามด้วยเบสคัดเลือกด้านปลาย 3′ อีก 3 เบส โดยเพิ่มปริมาณด้วยวิธี step up PCR โดยการใช้อุณหภูมิต่ำในขั้นตอน annealing ที่ 35°C ใน 5 รอบแรก หลังจากนั้นอีก 35 รอบ เพิ่มอุณหภูมิเป็น 50°C และตรวจสอบผลด้วยเจลพอลิอะครีลาไมด์ที่มีสารที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (denaturing polyacrylamide gel) นอกจากนี้ Li และ Quiros ยังใช้เครื่องหมาย SRAP ในพืชอีกหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง ข้าว ผักกาดหอม กะหล่ำปลีจีน (*Brassica rapa* L.) ผักกาดก้านขาว (*Brassica napus* L.) กระเทียม แอปเปิล พืชตระกูลส้ม และเซเลอรี ซึ่งก็สามารถใช้ในการจำแนกและทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชในกลุ่มต่าง ๆ ได้ (Li & Quiros, 2001) ซึ่งข้อดีของเครื่องหมาย SRAP คือ สามารถทำได้ง่าย มีความน่าเชื่อถือ มีแนวโน้มที่สามารถเพิ่มปริมาณบริเวณ ORF ได้ ไม่จำกัดเฉพาะในพืชชนิดใดชนิดหนึ่งแต่สามารถใช้ได้กับพืชหลาย ๆ ชนิด ใช้ต้นทุนในการศึกษาน้อย และสามารถใช้ในการศึกษาได้หลายวัตถุประสงค์ เช่น ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ใช้ในการติดตามยีน การตรวจสอบลูกผสม การสร้างแผนที่ยีน รวมไปถึงการระบุเพศในพืชบางชนิด (Aneja, Yadav, Chawla, & Yadav, 2012)

เครื่องหมาย SCAR (Sequence characterized amplified region)

เครื่องหมาย SCAR พัฒนาโดย Paran and Michelmore (1993) เพื่อศึกษายีนต้านทานโรคราน้ำค้าง (downy mildew resistance gene) ในผักกาด โดย SCAR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะที่พัฒนามาจากเครื่องหมายพีซีอาร์แบบสุ่ม เช่น RAPD SRAP เป็นต้น โดยการตัดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมาโคลน หาลำดับเบส แล้วออกแบบไพรเมอร์คู่ใหม่จากลำดับเบสที่ได้ เพื่อให้สามารถตรวจสอบโดยวิธีพีซีอาร์แบบจำเพาะเพียงหนึ่งตำแหน่ง (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552) โดยเครื่องหมาย SCAR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นแบบจำเพาะกับตำแหน่งของจีโนมหรือกับชนิดของสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งไพรเมอร์ใหม่ที่ได้สามารถใช้ตรวจสอบโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างเดิม โดยพิจารณาจากการเกิดหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ (สุชาดา สุขหร่อง, 2553)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย SRAP เริ่มต้นจากการพัฒนาของ Li และ Quiros ในปี ค.ศ. 2001 ซึ่งได้พัฒนาเครื่องหมาย SRAP เพื่อศึกษาพืชกลุ่มผักกาด (*Brassica oleracea* L.) โดยการเปรียบเทียบกับเครื่องหมาย AFLP เพื่อติดตามยีน *BoGLS-ALK* และหาลำดับเบสในสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ที่เป็นดับเบิลแฮพลอยด์ (double haploid) ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสใน GenBank ถึง 45% และแถบ SRAP ที่เกิดขึ้นเป็นแบบ Co-dominant ถึง 20% ดังนั้นเครื่องหมาย SRAP จึงเป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากสามารถทำได้ง่าย และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับพืชหลายชนิด (Li & Quiros, 2001)

เครื่องหมาย SRAP สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิด เช่น พืชตระกูลอ้อย (*Saccharum* spp.) จำนวน 30 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่าสามารถแยกออกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก คือกลุ่มที่เป็นพันธุ์ป่า และอ้อยปลูก (Suman, Kimbeng, Edmé, & Veremis, 2008) การศึกษาในกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium officinale*) ที่เก็บมาจากเมืองต่าง ๆ ในประเทศจีน ซึ่งพบว่ากล้วยไม้ชนิดนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับชนิดค่อนข้างสูง ในขณะที่ความหลากหลายระดับประชากรเมื่อเทียบกับกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ แล้วอยู่ในระดับต่ำ (G. Ding et al., 2008) รวมไปถึงยังมีการศึกษาความหลากหลายในกล้วยไม้ชนิด *Dendrobium loddigesii* ที่เก็บมาจากเมืองต่าง ๆ ของประเทศจีนพบว่า สามารถจำแนกกล้วยไม้ชนิดนี้ได้ออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับสถานที่เก็บตัวอย่าง (Cai et al., 2011) นอกจากการศึกษาในกล้วยไม้แล้วยังมีการนำไปใช้ศึกษาในหม่อน (*Morus* spp.) ซึ่งพบว่าเครื่องหมาย SRAP สามารถจัดจำแนกหม่อนออกได้เป็น 3 กลุ่ม สอดคล้องกับการจัดจำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Zhao et al., 2009) การศึกษาความหลากหลายของข้าวสาลีชนิด *Triticum dicoccoides* ในประเทศอิสราเอลพบว่า แบ่งกลุ่มข้าวสาลีได้เป็น 3 กลุ่มหลัก ซึ่งสอดคล้องกับถิ่นที่อยู่ของตัวอย่างที่นำมาศึกษา (Dong et al., 2010) และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในหญ้าฝรั่นที่เก็บมาจากสถานที่ต่างกันในประเทศอิหร่านก็พบว่าเครื่องหมาย SRAP สามารถให้ผลที่แตกต่างกันในแต่ละจีโนไทป์ได้ ซึ่งเครื่องหมายชนิดอื่น ๆ ที่เคยศึกษาก่อนหน้านี้ไม่สามารถตรวจสอบได้ (Babaei, Talebi, Bahar, & Zeinali, 2014)

นอกจากการศึกษาโดยใช้เครื่องหมาย SRAP เพียงอย่างเดียวแล้วยังมีการศึกษาร่วมกับเครื่องหมายอื่น ๆ เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย SRAP ในพืชกลุ่มฟักทองอเมริกัน (*Cucurbita pepo*) ซึ่งพบว่าสามารถจัดจำแนกฟักทองอเมริกันจำนวน 69 ตัวอย่างที่มีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยา แบ่งออกเป็น 2 ชนิดย่อยที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนคือ ชนิดย่อย *pepo* และชนิดย่อย *ovifera* ซึ่งสอดคล้องกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย AFLP นอกจากนี้ยังพบว่าผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย SRAP ยังสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยามากกว่าการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย AFLP อีกด้วย (Ferriol, Pico, & Nuez, 2003) รวมถึงมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในฟักทองอเมริกัน

ชนิด *Cucurbita moschata* จำนวน 47 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย SRAP ร่วมกับเครื่องหมาย AFLP พบว่าเครื่องหมายทั้ง 2 ชนิดให้ผลสอดคล้องกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา รวมไปถึงสอดคล้องกับแหล่งที่อยู่ของฟักทองอเมริกันที่นำมาศึกษาอีกด้วย (Ferriol et al., 2004) ต่อมามีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในกล้วย (*Musa* spp.) ที่เป็นกล้วยพันธุ์ป่า และกล้วยที่ปลูกทั่วไป เปรียบเทียบกับเครื่องหมาย AFLP พบว่าทั้ง 2 เครื่องหมายสามารถจำแนกตัวอย่างกล้วยสอดคล้องกับการจัดจำแนกเป็น section ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเครื่องหมาย SRAP ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะมากกว่าเครื่องหมาย AFLP รวมไปถึงแถบที่จำเพาะที่ได้จากเครื่องหมาย SRAP ยังสามารถนำไปใช้ศึกษาต่อได้ เนื่องจากเป็นแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณบริเวณยีน (Youssef, James, Rivera-Madrid, Ortiz, & Escobedo-GraciaMedrano, 2011)

นอกจากการใช้เครื่องหมาย SRAP ร่วมกับเครื่องหมาย AFLP แล้วยังมีการศึกษาร่วมกับเครื่องหมาย ISSR (Inter simple sequence repeats) เช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในเบญจมาศ (*Chrysanthemum morifolium*) โดยใช้เครื่องหมาย SRAP เปรียบเทียบกับเครื่องหมาย ISSR ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า สามารถจำแนกเบญจมาศออกได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางภูมิศาสตร์ของแหล่งที่เก็บตัวอย่าง และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากเครื่องหมาย SRAP ร่วมกับข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าให้ค่าความสัมพันธ์ที่สูงกว่าข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย ISSR (Shao et al., 2010) รวมไปถึงยังมีการศึกษาความหลากหลายของ *Toona sinensis* ซึ่งเป็นไม้ยืนต้นในประเทศจีน โดยใช้เครื่องหมาย SRAP เปรียบเทียบกับเครื่องหมาย ISSR ซึ่งก็พบว่าเครื่องหมายทั้ง 2 สามารถจำแนกตัวอย่างที่นำมาศึกษาได้เป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะถิ่นที่อยู่ คือ กลุ่มที่มาจากภาคเหนือและภาคใต้ของจีน และยังมีรายงานด้วยว่าเครื่องหมาย SRAP สามารถใช้แยกพืชชนิดนี้ได้ดีกว่าเครื่องหมาย ISSR (Xing, Liu, Song, & Li, 2016)

นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้เครื่องหมาย SRAP ในการตรวจสอบลูกผสมในพืชสกุล *Stylosanthes guianensis* เพื่อคัดเลือกลูกผสมไปใช้ในการศึกษาต่อไป โดยจากการศึกษาพบว่าเครื่องหมาย SRAP สามารถระบุลูกผสมที่แท้จริงได้ โดยการหาแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะของพ่อ ซึ่งสามารถใช้ในการคัดเลือกลูกผสมที่เกิดจากการผสมตัวเองออกจากลูกผสมที่แท้จริงได้ (Huang, Liu, Bai, Wang, & Tang, 2014)

นอกจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมาย SRAP ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นแบบไม่จำเพาะแล้วยังมีการศึกษาเพื่อพัฒนาให้เป็นเครื่องหมายที่สามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นแบบจำเพาะได้ โดยการพัฒนาให้เป็นเครื่องหมาย SCAR (Sequence characterized amplified region) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่พัฒนาให้มีความจำเพาะในการตรวจสอบชนิดของพืชที่จะศึกษา ซึ่งสามารถพัฒนาจากเครื่องหมายที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์หลายชนิด เช่น เครื่องหมาย RAPD เครื่องหมาย SRAP

เครื่องหมาย ISSR เป็นต้น ปัจจุบันมีการศึกษาเพื่อพัฒนาเครื่องหมาย SCAR ในพืชหลายชนิด เช่น การพัฒนาเครื่องหมายที่จำเพาะจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (Nuclear ribosomal internal transcribed spacer region) ในการตรวจสอบกล้วยไม้ในกลุ่มรองเท้านารี 3 ชนิด คือ *Paphiopedilum armeniacum, P. micranthum และ P. delenatii* ซึ่งเป็นกล้วยไม้หายากและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ รวมไปถึงตรวจสอบลูกผสมที่ได้จากกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิดด้วย พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความคล้ายคลึงกันมาก ทำให้ต้องพัฒนาเครื่องหมายที่สามารถใช้ในการจัดจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีแต่ละชนิด โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะจำนวน 3 คู่ สำหรับตรวจสอบกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด คือ *P. armeniacum* ขนาด 600 คู่เบส, *P. micranthum* ขนาด 700 คู่เบส และ *P. delenatii* ขนาด 300 คู่เบส รวมไปถึงการพัฒนาให้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีจากไพรเมอร์หลายคู่ที่ออกแบบขึ้นพร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกันหรือ multiplex PCR อีกด้วย (Y. W. Sun, Liao, Hung, Chang, & Sung, 2011)

นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเครื่องหมาย SCAR จากเครื่องหมาย RAPD เพื่อตรวจสอบการเจือปนของขมิ้นชนิดอื่น ๆ ในผงขมิ้นชัน ซึ่งพบว่าสามารถนำไปใช้ตรวจสอบตัวอย่างผงขมิ้นชันตามท้องตลาดได้ (Dhanya, Syamkumar, Siju, & Sasikumar, 2011) และยังมีการศึกษาเพื่อพัฒนาเครื่องหมาย SCAR ในการตรวจสอบพืชอีกหลายชนิด เช่น การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR ในถั่ว *Cyamopsis tetragonoloba* จากเครื่องหมาย RAPD และ ISSR จำนวน 20 คู่ไพรเมอร์ พบว่า มีเพียง 1 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถตรวจสอบได้ ในขณะที่ไพรเมอร์คู่อื่น ๆ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในหลายตัวอย่าง แสดงถึงความใกล้ชิดกันของตัวอย่างที่นำมาศึกษา (P. Sharma, Kumar, Raman, & Tiwari, 2014) และการพัฒนาเครื่องหมาย SCAR จากเครื่องหมาย RAPD เพื่อใช้แยกลิ้นจี่ (*Litchi chinensis*) ออกจากพืชชนิดอื่น (Cheng et al., 2015) นอกจากนี้ Wang et al. (2015) ประสบความสำเร็จในการพัฒนาเครื่องหมาย SCAR จากเครื่องหมาย SRAP สำหรับใช้ระบุเพศในต้น *Idesia polycarpa* ซึ่งไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถเพิ่มปริมาณในต้นเพศเมียเท่านั้น

ส่วนการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นในปัจจุบันยังมีไม่มากนัก โดยมีการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ (*trnL-F*, *atpI-atpH*, *matK*) ในกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นจำนวน 50 ชนิด ในประเทศจีน พบว่า สามารถจำแนกความสัมพันธ์กล้วยไม้กลุ่มนี้ได้ 6 สกุล คือ *Cephalantheropsis*, *Paraphaius*, *Phaius*, *Preptanthe*, *Styloglossum* และ *Calanthe* โดยภายในสกุล *Calanthe* สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 5 กลุ่มย่อย (section) คือ *Tricarinata*, *Calanthe*, *Puberula*, *Ghiebreghtia* และ *Alpinocalanthe* (Zhai et al., 2014) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้น (*Calanthe*) ในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมาย RAPD โดยการคัดเลือกไพรเมอร์ RAPD จำนวน 20 ไพรเมอร์ ซึ่งสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้นได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้นที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ 1 ตัวอย่าง (*calanthe* sp.6) กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของ *C. cardioglossa* และลูกผสม (*Calanthe* hybrid) และ

กลุ่มที่ 3 แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย *C. vestita* และ *C. rubens* และกลุ่มย่อยที่ 2 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้สกุลเอื้องน้ำต้นที่ไม่สามารถระบุชนิดได้จำนวน 5 ตัวอย่าง (*Calanthe* sp.1-5) ซึ่งทั้ง 5 ตัวอย่าง มีลักษณะของรูปทรงกลีบดอกและกลีบเลี้ยงที่คล้ายคลึงกัน แตกต่างกันเพียงลักษณะสีของกลีบปาก (Punjansing, Chaichanachap, Sanitchon, Pinta, & Nakkuntod, 2017) เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้เครื่องหมายระดับโมเลกุลอื่น ๆ

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษา

เก็บตัวอย่างพืชกลุ่มเอื้องน้ำต้น (Calanthe group) ทั้ง 3 สกุล จากที่เก็บรวบรวมไว้ในสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่ สวนกล้วยไม้คุณชายจาง จังหวัดเชียงใหม่ และสวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้า ในพระราชดำริ จังหวัดพิษณุโลก รวมไปถึงแหล่งที่มีการกระจายพันธุ์ในจังหวัดต่าง ๆ รวมตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 20 ชนิด 45 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการศึกษา

ลำดับที่	ตัวอย่างพืช	แหล่งที่มา
1	*Calanthe cardioglossa* Schltr.	MR และ RK
2	*Calanthe clavata* Lindl.	PR
3	*Calanthe densiflora* Lindl.	RK และ PH
4	*Calanthe lyroglossa* Rchb.f.	RK
5	*Calanthe masuca* (D. Don) Lindl.	MR และ RK
6	*Calanthe pulchra* (Blume) Lindl.	MR
7	*Calanthe rosea* (Lindl.) Benth.	MR
8	*Calanthe rubens* Ridl.	MR, RK และ PR
9	*Calanthe succedanea* Gagnep.	MR
10	*Calanthe triplicata* (Willemet) Ames	MR, RK, PR และ NN
11	*Calanthe vestita* Wall. Ex Lindl.	MR
12	*Calanthe herbacea* Lindl.	PH
13	*Calanthe rubens* Ridl. “alba”	RK
14	*Phaius flavus* (Blume) Lindl.	RK
15	*Phaius indochinesis* Seidenf. & Ormerod	RK
16	*Phaius mishmensis* (Lindl. & Paxton) Rchb.f.	RK
17	*Phaius tankervilleae* (Banks) Blume	MR, RK และ PR
18	*Phaius tankervilleae* (Banks) Blume “alba”	RK และ CM
19	*Cephalantheropsis obcordata* (Lindl.) Ormerod	RK
20	*Cephalantheropsis longipes* (Hook.f.) Ormerod	RK และ PH

* MR = สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่
RK = สวนพฤกษศาสตร์บ้านร่มเกล้า พิษณุโลก ในพระราชดำริ จังหวัดพิษณุโลก
PH = จังหวัดพิษณุโลก NN = จังหวัดเพชรบูรณ์
PR = จังหวัดเลย CM = สวนกล้วยไม้คุณชายจาง จังหวัดเชียงใหม่

วิธีดำเนินการทดลอง

1. เตรียมตัวอย่างพืช

นำใบของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นมาล้างทำความสะอาดแล้วเช็ดให้แห้ง จากนั้นนำไปสกัดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอ

2.1 ชั่งใบกล้วยไม้ประมาณ 0.5 กรัม บดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว แล้วถ่ายใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เติม 2X CTAB buffer 600 ไมโครลิตร และ β-mercaptoethanol 10 ไมโครลิตร (ก่อนใช้อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ผสมโดยการกลับหลอดไปมาทุก 10 นาที

2.2 เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.3 ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ เติม RNaseA ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.4 เติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

2.5 เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

2.6 เติม 3M Sodium acetate pH 5.5 ปริมาตร 1/10 เท่า และเติม Absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารที่มีในหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อีกครั้ง เป็นเวลา 5 นาที

2.7 ตากตะกอนให้แห้งในอากาศที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

3. การตรวจสอบปริมาณและการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล

3.1 เตรียมถาดสำหรับเทเจลและหวีให้เรียบร้อย

3.2 ชั่งผงอะกาโรส 0.8 กรัม ในขวดรูปชมพู่แล้วเติม 1X TAE buffer 100 มิลลิลิตร ละลายอะกาโรสโดยใช้ไมโครเวฟเขย่าเป็นครั้งคราวให้อะกาโรสละลาย วางทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้

3.3 เมื่ออะกาโรสแข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึงหวีออก จะได้หลุมสำหรับใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอ แล้วนำไปวางในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เท 1X TAE buffer ลงไป ให้สูงกว่าผิวอะกาโรสเล็กน้อย ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ 6X loading dye แล้วหยอดลงในหลุม (well)

3.4 เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟ (power supply) ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกว่าสี bromophenol blue จะเคลื่อนไปเป็นระยะ 2 ใน 3 ของแผ่นเจล จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตแล้วบันทึกภาพ

***ในกรณีที่ใช้ TBE buffer สามารถทำได้เช่นกันโดยเปลี่ยนจาก TAE buffer เป็น TBE buffer แทน

3.5 ตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้วิธี spectrophotometry

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP สำหรับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

4.1 การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย SRAP โดยการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์จาก 100 คู่ไพรเมอร์ จากการจับคู่ไพรเมอร์ forward และไพรเมอร์ reverse ตามตารางที่ 2 โดยทำการเพิ่มปริมาณ 3 ตัวอย่างจาก 3 สกุล คือ *C. densiflora*, *P. flavus* และ *Cep. obcordata*

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อ	Forward primer (5′-3′)	ชื่อ	Reverse primer (5′-3′)
M1	TGAGTCCAAACCGGAAA	E1	GACTGCGTACGAATTAAC
M2	TGAGTCCAAACCGGAAG	E2	GACTGCGTACGAATTAAT
M3	TGAGTCCAAACCGGAAC	E3	GACTGCGTACGAATTGAC
M4	TGAGTCCAAACCGGAAT	E4	GACTGCGTACGAATTGCA
M5	TGAGTCCAAACCGGAGC	E5	GACTGCGTACGAATTCAA
M6	TGAGTCCAAACCGGACA	E6	GACTGCGTACGAATTCAG
M7	TGAGTCCAAACCGGACC	E7	GACTGCGTACGAATTCAC
M8	TGAGTCCAAACCGGATA	E8	GACTGCGTACGAATTCTG
M9	TGAGTCCAAACCGGTAG	E9	GACTGCGTACGAATTTGA
M10	TGAGTCCAAACCGGTCA	E10	GACTGCGTACGAATTTGC

ที่มา : Li and Quiros (2001)

4.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

เมื่อคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่าง ชัดเจน และจำนวนมากได้แล้ว นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกับตัวอย่างทั้งหมด โดยรวมตัวอย่างที่มาจากชนิดเดียวกันเข้าด้วยกันเป็น 20 ตัวอย่าง ซึ่งมีองค์ประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาดังตารางที่ 3 โดยอุณหภูมิและเวลาในแต่ละขั้นตอน คือ denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ใน 5 รอบแรก หลังจากนั้นอีก 35 รอบ เพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอน annealing เป็น 52 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Distilled water	-	10.8
10X *i*-Taq™ plus buffer + $MgCl_2$	1X	1.5
10 mM dNTPs	0.2 mM	0.3
10 µM Forward Primer (M)	0.4 µM	0.6
10 µM Reverse Primer (R)	0.4 µM	0.6
5U/µl *Taq* DNA Polymerase (*i*- Taq™ plus)	1 U	0.2
DNA template	100 ng	1
ปริมาตรรวม		**15**

จากนั้นตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอิเล็กโทร-โฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ใน 1X TBE buffer โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าความต่างศักย์ 80 โวลต์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตแล้วถ่ายภาพ

5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

วิเคราะห์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด โดยแปลงข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นสัญลักษณ์ คือ ให้สัญลักษณ์เป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอ และให้สัญลักษณ์เป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ จากนั้นคำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ตามวิธีของ Jaccard (1908) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.20e (Rohlf, 1988) สร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973) และวิเคราะห์ค่า PIC (Polymorphic information content) ตามหลักการของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium) โดยคำนวณจาก PICi = $2fi(1-fi)$ โดยที่ fi คือความถี่ของแอลลีลที่เพิ่มปริมาณได้ (ปรากฏแถบดีเอ็นเอ) และ $1-fi$ คือ ความถี่ของแอลลีลที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ (ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ) (Roldán-Ruiz, Dendauw, Van Bockstaele, Depicker, & De Loose, 2000)

6. พัฒนาเครื่องหมาย SCAR

6.1 การทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ให้บริสุทธิ์

จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SRAP เลือกแถบดีเอ็นเอที่ขึ้นเฉพาะกล้วยไม้ชนิดที่ต้องการ ตัดแถบดีเอ็นเอ แล้วนำมาทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จ PureDirex PCR Clean-up & Gel Extraction Kit (GeneDirex) โดยมีขั้นตอนตามวิธีมาตรฐานของบริษัท GeneDirex ดังนี้

6.1.1 นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์มาแยกขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ 1X TAE buffer ที่เตรียมใหม่ จากนั้นนำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ แล้วตัดแถบดีเอ็นเอใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ชั่งน้ำหนักของหลอดเปล่าไว้แล้ว

6.1.2 นำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ที่มีชิ้นส่วนเจลไปชั่งน้ำหนักอีกครั้งเพื่อหาน้ำหนักของเจล จากนั้นเติม buffer B 500 ไมโครลิตร ต่อเจลที่ตัดได้ 300 มิลลิกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายจนหมด โดยระหว่างการบ่มผสมโดยใช้เครื่องผสมสารทุก ๆ 2-3 นาที จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้สารละลายเย็นลง

6.1.3 นำ PG Column ใส่ใน collection tube แล้วเติมสารละลายเจลที่ได้ลงไปใน PG Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทของเหลวใน collection tube ทิ้ง วาง PG Column ใน collection tube ตามเดิม

6.1.4 เติม buffer w1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวใน collection tube ทิ้ง วาง PG Column ใน collection tube ตามเดิม

6.1.5 เติม buffer w2 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวใน collection tube ทิ้ง วาง PG Column ใน collection tube ตามเดิม แล้วนำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

6.1.6 ย้าย PG Column ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม buffer E ปริมาตร 50-200 ไมโครลิตร ลงตรงกลาง column บนแผ่นเมมเบรนเพื่อละลายดีเอ็นเอ แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดและความเข้มข้นด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทร-โฟรีซิส

6.2 การโคลนชิ้นดีเอ็นเอ

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาต่อเชื่อมกับพลาสมิด pTZ57R/T Cloning vector (Thermo Scientific, USA) จากนั้นถ่ายดีเอ็นเอสายผสมที่ได้เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α เพื่อให้พลาสมิดเพิ่มปริมาณไปพร้อมกับการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียเจ้าบ้าน คัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมโดยวิธี blue-white colony selection บนอาหารแข็ง LB ที่มี X-gal, IPTG และ ampicillin เมื่อได้โคโลนีที่ต้องการแล้วจึงสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์เจ้าบ้าน และนำพลาสมิดที่ได้มาตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลีใต้

6.2.1 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิด

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pTZ57R/T Cloning vector โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังตารางที่ 4 จากนั้นเมื่อผสมสารทั้งหมดแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของสารที่ใช้ในการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิด

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5X ligation buffer	1X	2
pTZ57R/T Cloning Vector (55ng/µl)	55 ng	1
T4 DNA ligase (5 units/ µl)	5 units	1
PCR product		5
Water, nuclease-free		1.7
Total		10

6.2.2 การเตรียม competent cell

1) streak เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α บนอาหารแข็ง LB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นย้ายโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว SOB ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

2) ดูดเชื้อจากอาหารเหลวในข้อ 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมลงไปในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจากอาหารเหลวลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลว (supernatant) ทิ้ง

3) เติม 100 mM $CaCl_2$ ที่เย็น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์กระจายด้วยไมโครปิเปตโดยการดูดขึ้นลงหลายๆ ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้ง และทำซ้ำอีกครั้ง จากนั้นเติม 100 mM $CaCl_2$ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำให้เซลล์กระจายด้วยไมโครปิเปตโดยการดูดขึ้นลงหลายๆ ครั้ง แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร จะได้ competent cell สำหรับการใช้งานต่อไป

6.2.3 นำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี Heat shock

1) เติมพลาสมิดที่เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (ligation mix) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปในหลอด competent cell ผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปตเบาๆ จากนั้นแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

2) นำหลอด competent cell ที่เติมพลาสมิดแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที นำไปแช่น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที

3) เติมอาหารเหลว SOC ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

4) ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 700 ไมโครลิตร ทิ้งไป จากนั้นทำให้เซลล์กระจายด้วยไมโครปิเปตโดยการดูดขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง แล้วนำไป spread ลงบนอาหารแข็ง LB ที่มี X-gal, IPTG และ ampicillin แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

5) คัดเลือกโคโลนีที่มี recombinant plasmid ด้วยวิธี blue-white colony selection

6.2.4 การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรีย

1) เขี่ยโคโลนีที่ต้องการใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มี ampicillin (100 μg/ml) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2) ย้ายเชื้อลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทอาหารเหนือตะกอนทิ้ง ทำซ้ำจนอาหารที่เลี้ยงเชื้อไว้หมด

3) สกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป PureDirex Plasmid miniPREP Kit (Bio-Helix) โดยเติม buffer s1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเขย่าให้เซลล์กระจายโดยใช้ vortex แล้วเติม buffer s2 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมทันทีโดยการกลับหลอดไปมา วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม buffer s3 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมทันทีโดยการกลับหลอดไปมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

4) นำ PM Column ใส่ใน collection tube ดูดของเหลวด้านบนลงใน PM Column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวด้านล่างทิ้ง วาง PM ใน collection tube ตามเดิม จากนั้นเติม buffer w1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวด้านล่างทิ้ง วาง PM ใน collection tube ตามเดิม

5) เติม buffer w2 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทของเหลวด้านล่างทิ้ง วาง PM ใน collection tube ตามเดิม นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นย้าย PM Column ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติม buffer E เพื่อละลายตะกอน ปริมาตร 50-200 ไมโครลิตร ลงตรงกลาง column บนแผ่นเมมเบรนเพื่อละลายดีเอ็นเอ โดยวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

6.2.5 การตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เมื่อสกัดพลาสมิดได้แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hind*III โดยการเติมสารละลายดีเอ็นเอในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วผสมสารเคมีต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยาดังตารางที่ 5 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ 1X TAE เป็นบัฟเฟอร์ ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ จนกว่าสี bromophenol blue จะเคลื่อนไปเป็นระยะทาง 2 ใน 3 ของแผ่นเจล ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เพื่อตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ หลังจากนั้นนำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลีใต้ โดยใช้ Universal Primers M13F และ M13R

ตารางที่ 5 ปริมาตรและความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)
10X Buffer R	1X	2
10 U/µl Restriction enzyme (*Eco*RI)	10U	1
10 U/µl Restriction enzyme (*Hind*III)	10U	1
Plasmid	-	5
Distilled water	-	11
Total		20

6.2.6 การสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมาย SCAR

เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำมาจัดเรียง (alignment) โดยใช้โปรแกรม GeneDoc Version 2.6.2 (Nicholas & Nicholas, 1997) และตรวจสอบการจัดเรียงด้วยโปรแกรม ClustralX (Thompson, Gibson, & Higgins, 2002) เปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) จากนั้นออกแบบไพรเมอร์และตรวจสอบค่าต่าง ๆ โดยใช้เว็บไซต์ IDTDNA (https://sg.idtdna.com/site) และสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่ออกแบบกับบริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลีใต้

7. การทดสอบความจำเพาะของเครื่องหมาย SCAR

นำไพรเมอร์ SCAR ที่สังเคราะห์มาตรวจสอบความจำเพาะต่อชนิดของกล้วยไม้ในกลุ่ม Calanthe โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งเป็นตัวอย่างเดียวกับที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จำนวน 20 ตัวอย่าง และตัวอย่างอื่น ๆ ซึ่งประกอบไปด้วย *Epipactis flava*, *Triticum aestivum* และ *Dendrobium* species โดยใช้ความเข้มข้นและปริมาตรของสารดังตารางที่ 6 ใช้เวลาและอุณหภูมิในการทำพีซีอาร์ดังตารางที่ 7 แล้วตรวจสอบผลโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ความเข้มข้นของสาร	**ความเข้มข้นสุดท้าย**	**ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)**
Distilled water	-	7.3
10X *i*-Taq™ plus buffer + $MgCl_2$	1X	1
10 mM dNTPs	0.2 mM	0.2
10 µM Forward Primer	0.2 µM	0.2
10 mM Reverse Primer	0.2 µM	0.2
5U/µl *Taq* DNA Polymerase (*i*- Taq™ plus)	0.5 U	0.1
DNA template	100 ng	1
รวม		10

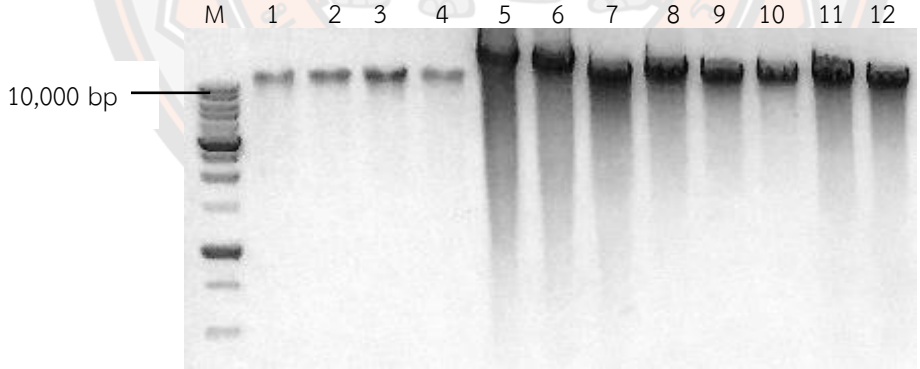
ตารางที่ 7 อุณหภูมิและเวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ขั้นตอน	**อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)**	**เวลา**	**จำนวนรอบ**
Initial denaturation	94	2 นาที	1
Denaturation	94	30 วินาที	35
Annealing	54-70	45 วินาที	
Extension	72	30 วินาที	
Final extension	72	7 นาที	1

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้วิธี CTAB ที่ดัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (1987) พบว่าสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ส่วนใหญ่มีลักษณะใสไม่มีสี แต่ก็มีบางตัวอย่างที่สารละลายเป็นสีน้ำตาล เมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอมาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดมากกว่า 10 กิโลเบส เมื่อเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific)) และสังเกตได้ว่าในบางตัวอย่างมีลักษณะเป็นปื้น (smear) แสดงว่ามีการแตกหักของชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งอาจเกิดจากการมีสารประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ในตัวอย่างจำนวนมาก ซึ่งมีผลทำให้สายดีเอ็นเอขาดหรือเสียหายได้ (A. D. Sharma, Gill, & Singh, 2002) และเนื่องจากตัวอย่างมีจำนวนมาก (45 ตัวอย่าง) ต้องใช้เวลานานในการสกัด ทำให้บางตัวอย่างเกิดการเน่าเสียก่อนที่จะสกัดได้ทัน ซึ่งมีผลทำให้คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ไม่ดีเท่าที่ควร แต่เมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดไปตรวจสอบค่าความบริสุทธิ์ก็พบว่ามีค่าต่ำสุดอยู่ที่ 1.649 (*C. lyroglossa* RK) และสูงสุดที่ 1.9505 (*C. masuca* RK) ซึ่งสามารถนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปใช้ในการศึกษาต่อไปได้ ดังนั้นวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (1987) นั้นเหมาะสมที่จะใช้กับตัวอย่างใบสดของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น (ภาพที่ 1)

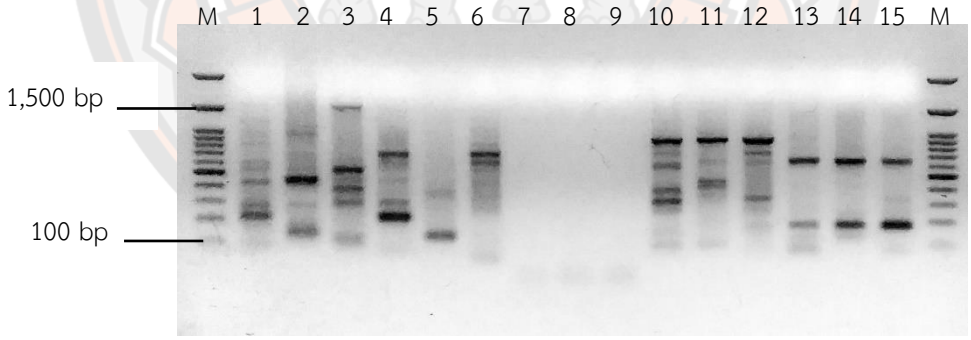


ภาพที่ 1 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987) โดย M = GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); Lane 1-4 = C. densiflora; Lane 5-8 = P. flavus; Lane 9-12 = Cep. obcordata

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987) สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณได้เนื่องจากมีความบริสุทธิ์ที่เหมาะสม โดยนำมาทำพีซีอาร์เพื่อคัดเลือกคู่ไพรเมอร์จากไพรเมอร์ SRAP จำนวน 100 คู่พบว่า ไพรเมอร์ 18 คู่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (Polymorphic band) คือ M1E7, M2E1, M2E2, M2E4, M2E5, M2E6, M2E7, M2E9, M2E10, M3E6, M3E9, M4E3, M5E2, M6E10, M9E2, M9E4, M9E5 และ M10E1 (ภาพที่ 2) ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไปได้ ส่วนไพรเมอร์อีก 82 คู่ แบ่งออกเป็นไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นได้ 14 คู่ คือ M1E3, M1E8, M3E8, M4E8, M5E8, M6E1, M6E2, M6E8, M7E6, M7E7, M7E8, M8E8, M9E8 และ M10E8 และไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในบางตัวอย่าง 17 คู่ คือ M1E2, M1E4, M1E5, M3E3, M2E3, M6E3, M6E4, M6E5, M6E9, M7E9, M7E10, M8E2, M8E7, M9E3, M9E10, M10E3, M10E9 และไพรเมอร์ 51 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณได้ในทุกตัวอย่าง แต่มีไพรเมอร์ 9 คู่ คือ M1E1, M3E1, M3E10, M5E4, M7E2, M7E4, M7E5, M8E5 และ M10E4 ให้ผลที่เป็นแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (monomorphic band) และไพรเมอร์ 42 คู่ ที่เหลือให้ผลการเพิ่มปริมาณที่ไม่ชัดเจน จึงไม่ได้นำไปใช้ในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 2 ผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อคัดเลือกคู่ไพรเมอร์คู่ที่เหมาะสม โดย M = 100 bp DNA Ladder (GeneDirex); Lane 1-3 = ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ M3E6; Lane 4-6 = ไพรเมอร์ M3E7; Lane 7-9 = ไพรเมอร์ M3E8; Lane 10-12 = ไพรเมอร์ M3E9; Lane 13-15 = ไพรเมอร์ M3E10; Lane 1,4,7,10,13 = Cep. obcordata; Lane 2,5,8,11,14 = P. flavus; Lane 3,6,9,12,15 = C. densiflora

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

เมื่อได้คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 18 คู่แล้ว นำมาเพิ่มปริมาณกับตัวอย่างกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นทั้ง 20 ชนิด เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 18 คู่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 100 – 1,500 คู่เบส (ภาคผนวก ข) โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จำนวน 565 แถบ เฉลี่ยเป็น 31.39 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจำนวน 562 แถบ คิดเป็น 99.45 % และจากการพิจารณาความหลากหลายจากค่า PIC (Polymorphic information content) พบว่า มีค่าอยู่ในช่วง 0.00 – 0.50 โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.15 (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 จำนวนแถบดีเอ็นเอและเปอร์เซ็นต์พอลิมอร์ฟิซึมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ SRAP

คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบที่แตกต่าง	เปอร์เซ็นต์จำนวนแถบที่แตกต่าง	ช่วงของค่า polymorphic information content (PIC) และค่าเฉลี่ย
M1E7	33	33	100	0.05-0.50 (0.18)
M2E1	44	44	100	0.05-0.50 (0.12)
M2E2	25	25	100	0.05-0.35 (0.15)
M2E4	24	24	100	0.05-0.27 (0.13)
M2E5	36	36	100	0.05-0.41 (0.16)
M2E6	35	35	100	0.05-0.46 (0.16)
M2E7	32	30	93.75	0.00-0.38 (0.13)
M2E9	39	39	100	0.05-0.44 (0.14)
M2E10	28	28	100	0.05-0.38 (0.17)
M3E6	28	28	100	0.05-0.31 (0.14)
M3E9	29	29	100	0.05-0.35 (0.15)
M4E3	32	32	100	0.05-0.41 (0.16)
M5E2	27	26	96.30	0.00-0.27 (0.16)
M6E10	35	35	100	0.05-0.47 (0.16)
M9E2	40	40	100	0.05-0.46 (0.16)
M9E4	23	23	100	0.05-0.50 (0.18)
M9E5	26	26	100	0.05-0.44 (0.20)
M10E1	29	29	100	0.05-0.44 (0.15)
Total	**565**	**562**	**-**	**-**

คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวนแถบที่แตกต่าง	เปอร์เซ็นต์จำนวนแถบที่แตกต่าง	ช่วงของค่า polymorphic information content (PIC) และค่าเฉลี่ย
Average	31.39	31.22	99.45	0.15

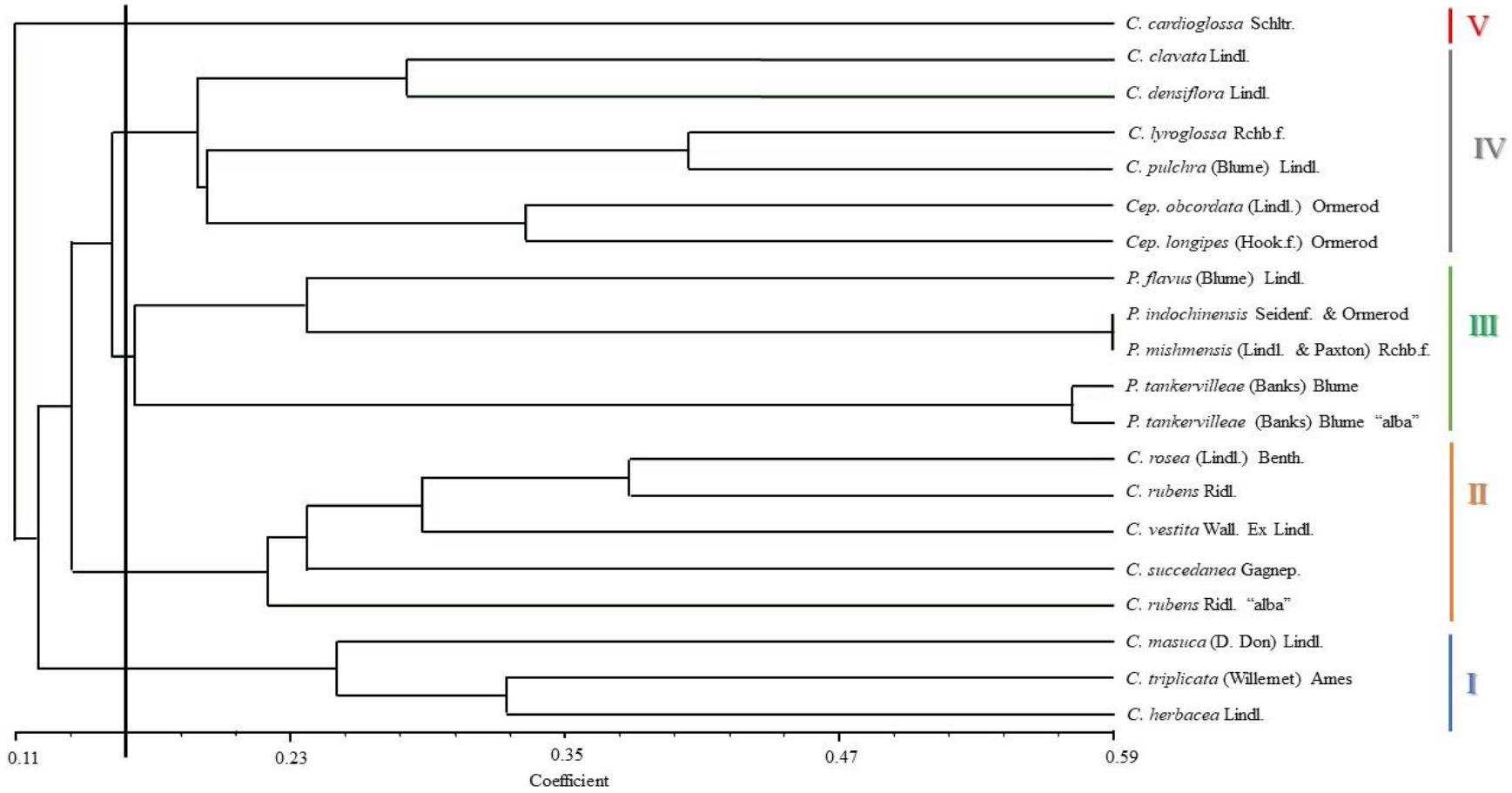
การสร้าง phylogenetic tree และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ภายหลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP แล้ว นำแถบดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์พบว่ามีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 565 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (monomorphic band) จำนวน 3 แถบ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) จำนวน 562 แถบ เมื่อนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) ตามวิธีของ Jaccard (1908) พบว่าอยู่ในช่วง 0.06 – 0.59 เฉลี่ย 0.149 ซึ่งเมื่อพิจารณาแยกทีละสกุลพบว่า สกุล *Calanthe* มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.06 (ระหว่าง *C. masuca* กับ *C. cardioglossa*) ถึง 0.40 (ระหว่าง *C. pulchra* กับ *C. lyroglossa*) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมภายในสกุลเฉลี่ยอยู่ที่ 0.148 ในขณะที่สกุล *Phaius* มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม อยู่ในช่วง 0.12 (ระหว่าง *P. flavus* กับ *P. tankervilleae* “alba”) ถึง 0.59 (ระหว่าง *P. mishmensis* กับ *P. indochinensis*) โดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.259 และสกุล *Cephalantheropsis* มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.33 (ตารางที่ 9)

จากนั้นนำข้อมูลค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มกล้วยไม้เอื้องน้ำต้นทั้ง 20 ชนิดออกได้เป็น 5 กลุ่ม ที่ coefficient 0.158 โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยกล้วยไม้ 3 ชนิดในสกุล *Calanthe* คือ *C. masuca* *C. triplicata* และ *C. herbacea* ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *C. rosea*, *C. rubens*, *C. vestita*, *C. succedanea* และ *C. rubens* “alba” กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้สกุล *Phaius* ประกอบด้วย *P. flavus*, *P. indochinensis*, *P. mishmensis*, *P. tankervilleae* และ *P. tankervilleae* “alba” กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยกล้วยไม้ 2 สกุลคือ *Calanthe* ประกอบด้วย *C. clavata*, *C. densiflora*, *C. lyroglossa*, *C. pulchra* และ *Cephalantheropsis* คือ *Cep. obcordata* และ *Cep. longipes* และกลุ่มสุดท้าย คือ *C. cardioglossa* (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 9 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (Jaccard similarity coefficient)

	C. cardioglossa	*C. clavata*	*C. densiflora*	*C. lyroglossa*	*C. masuca*	*C. pulchra*	*C. rosea*	*C. rubens*	*C. succedanea*	*C. triplicata*	*C. vestita*	*C. herbacea*	*C. rubens* "alba"	*P. flavus*	*P. indochinensis*	*P. mishmensis*	*P. tankervilleae*	*P. tankervilleae* "alba"	*Cep. obcordata*	*Cep. longipes*
C. cardioglossa	1.00																			
C. clavata	0.12	1.00																		
C. densiflora	0.11	0.28	1.00																	
C. lyroglossa	0.09	0.18	0.21	1.00																
C. masuca	0.06	0.10	0.09	0.13	1.00															
C. pulchra	0.07	0.14	0.21	0.40	0.10	1.00														
C. rosea	0.11	0.13	0.16	0.11	0.12	0.09	1.00													
C. rubens	0.15	0.15	0.12	0.14	0.10	0.09	0.37	1.00												
C. succedanea	0.16	0.13	0.12	0.13	0.10	0.09	0.20	0.26	1.00											
C. triplicata	0.08	0.12	0.14	0.10	0.24	0.09	0.16	0.15	0.16	1.00										
C. vestita	0.11	0.10	0.08	0.14	0.13	0.10	0.22	0.35	0.23	0.14	1.00									
C. herbacea	0.11	0.09	0.11	0.08	0.26	0.08	0.13	0.12	0.11	0.32	0.13	1.00								
C. rubens "alba"	0.10	0.15	0.14	0.11	0.10	0.13	0.34	0.20	0.17	0.16	0.16	0.10	1.00							
P. flavus	0.10	0.11	0.15	0.13	0.11	0.11	0.18	0.12	0.16	0.14	0.10	0.10	0.19	1.00						
P. indochinensis	0.10	0.15	0.18	0.16	0.11	0.16	0.17	0.13	0.13	0.12	0.11	0.12	0.13	0.23	1.00					
P. mishmensis	0.13	0.15	0.17	0.19	0.10	0.16	0.18	0.11	0.14	0.14	0.11	0.12	0.15	0.24	0.59	1.00				
P. tankervilleae	0.08	0.19	0.15	0.14	0.10	0.11	0.16	0.10	0.11	0.13	0.13	0.12	0.19	0.13	0.18	0.18	1.00			
P. tankervilleae "alba"	0.09	0.17	0.19	0.16	0.08	0.13	0.15	0.11	0.13	0.15	0.13	0.11	0.16	0.12	0.17	0.18	0.57	1.00		
Cep. obcordata	0.12	0.20	0.25	0.30	0.09	0.15	0.18	0.12	0.15	0.14	0.09	0.14	0.17	0.15	0.17	0.18	0.17	0.17	1.00	
Cep. longipes	0.13	0.15	0.14	0.20	0.11	0.11	0.13	0.13	0.13	0.11	0.09	0.13	0.12	0.10	0.12	0.14	0.11	0.10	0.33	1.00



ภาพที่ 3 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA

การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR

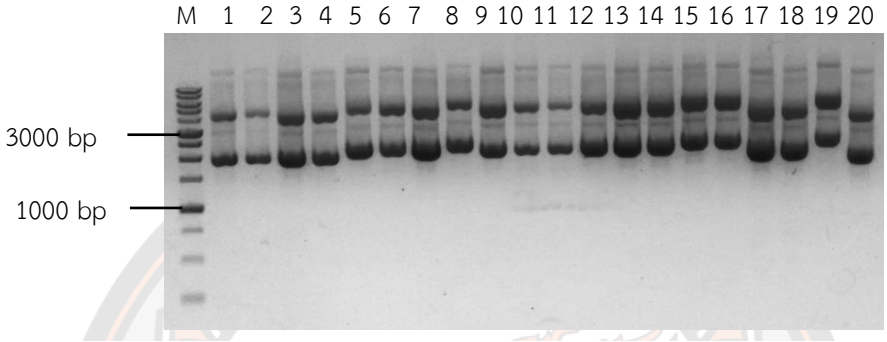
การตัดแถบดีเอ็นเอและการโคลน

จากการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ทั้งหมดด้วยเครื่องหมาย SRAP 18 คู่ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะจึงตัดแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะจากการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจำนวน 77 แถบ (ตารางที่ 10) จากนั้นนำแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป PureDireX PCR Clean-up & Gel Extraction Kit แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pTZ57R/T ส่งถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α คัดเลือกโคโลนีบนอาหารแข็ง ตัวอย่างละ 2-3 โคโลนี โดยเลือกโคโลนีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT นำไปสกัดด้วยชุดสำเร็จรูป Plasmid miniprep Kit (PureDirex) สามารถสกัดพลาสมิดได้ทุกโคโลนีที่นำมาเลี้ยง (ภาพที่ 4) และตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* และ *EcoRI* พบว่า มี 17 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากกล้วยไม้ 11 ชนิดเท่านั้น (ภาพที่ 5)

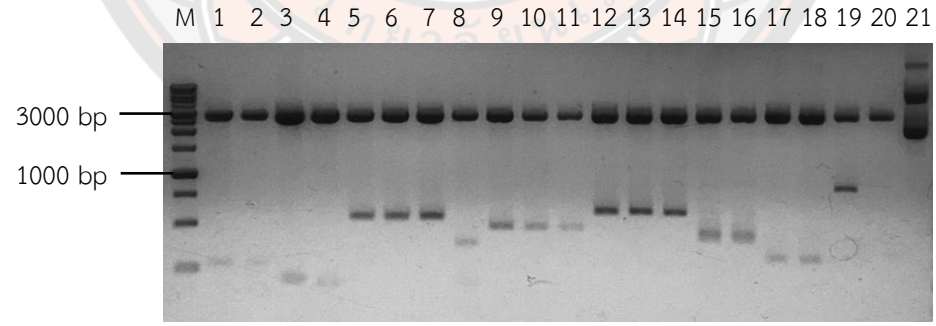
ตารางที่ 10 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ตัดได้จากการทำ SRAP

ไพรเมอร์ SRAP	จำนวนแถบที่ตัดได้	จำนวนแถบที่โคลนได้	ขนาดที่โคลนได้ (คู่เบส)	จากกล้วยไม้ชนิด
M1E7	8	-	-	-
M2E1	5	1	200	*C. triplicata*
M2E2	5	-	-	-
M2E4	2	-	-	-
M2E5	5	-	-	-
M2E6	3	1	200	*C. triplicata*
M2E7	5	-	-	
M2E9	4	2	500-550	*C. triplicata* และ *C. succedanea*
M2E10	6	-	-	-
M3E6	6	3	480-700	*C. rubens* “alba”, *C. densiflora* และ *C. lyroglossa*
M3E9	5	3	540-800	*C. herbacea, P. flavus* และ *P. indochinensis*
M4E3	5	1	250	*C. rubens* “alba”
M5E2	3	1	400	*P. flavus*
M6E10	4	1	800	*C. masuca*
M9E2	3	2	800	*C. clavata* และ *C. rubens* “alba”

ไพรเมอร์ SRAP	จำนวนแถบที่ตัดได้	จำนวนแถบที่โคลนได้	ขนาดที่โคลนได้ (คู่เบส)	จากกล้วยไม้ชนิด
M9E4	2	1	900	*C. succedanea*
M9E5	1	1	550	*Cep. longipes*
M10E1	5	-		-
รวม	**77**	**17**	**-**	



ภาพที่ 4 ผลการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่มาจากกล้วยไม้และไพรเมอร์ต่างๆ โดย M = 1 kb DNA Ladder (GeneDirex); Lane 1-2 = C. triplicata 200 bp M2E1; Lane 3-4 = C. triplicata 200 bp M2E6; Lane 5-7 = C. succedanea 550 bp M2E9; Lane 8 = C. densiflora 700 bp M3E6; Lane 9-11 = C. lyroglossa 480 bp M3E6; Lane 12-14 = C. triplicata 550 bp M3E9; Lane 15-16 = P. indochinensis 800 bp M3E9; Lane 17-18 = C. rubens "alba" 250 bp M4E3; Lane 19 = C. masuca 800 bp M6E10 Lane 20 = Blue colony



ภาพที่ 5 พลาสมิดที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดย M = 1 kb DNA Ladder (GeneDirex); Lane 1-2 = C. triplicata 200 bp M2E1; Lane 3-4 = C. triplicata 200 bp M2E6; Lane 5-7 = C. succedanea 550 bp M2E9; Lane 8 = C. densiflora 700 bp M3E6; Lane 9-11 = C. lyroglossa 480 bp M3E6; Lane 12-14 = C. triplicata 550 bp M3E9; Lane 15-16 = P. indochinensis 800 bp M3E9; Lane 17-18 = C. rubens "alba" 250 bp M4E3; Lane 19 = C. masuca 800 bp M6E10; Lane 20 = Blue colony cut with restriction enzyme; Lane 21 = Blue colony uncut

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

หลังจากทดสอบตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว พบว่ามีเพียง 17 โคลน ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกอยู่ นำพลาสมิดเหล่านี้ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยบริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลีใต้ และนำข้อมูลที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มาทำการเปรียบเทียบ (blast) กับฐานข้อมูล Genbank พบว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค SRAP ส่วนใหญ่เป็นชิ้นส่วนที่เพิ่มปริมาณมาจากส่วนของยีน (ตารางที่ 11) ซึ่งสอดคล้องกับวัตถุประสงค์การออกแบบไพรเมอร์ของ Li and Quiros (2001) ที่ออกแบบไพรเมอร์ SRAP ให้จับได้กับส่วนของ ORFs

ตารางที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank

ที่	ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ	ข้อมูลจาก Genbank	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน
1	*C. triplicata* 164 bp M2E1	PREDICTED: *Dendrobium catenatum* condensin complex subunit 2 (LOC110105888), mRNA	92
2	*C. triplicata* 141 bp M2E6	PREDICTED: *Phalaenopsis equestris* uncharacterized LOC110037469 (LOC110037469), mRNA	81
3	*C. triplicata* 498 bp M3E9	PREDICTED: *Dendrobium catenatum* uncharacterized LOC110112721 (LOC110112721), mRNA	93
4	*C. rubens* “alba” 384 bp M3E6	*Larimichthys crocea* genome assembly, chromosome: X	94
5	*C. rubens* “alba” 210 bp M4E3	*Plasmodium malariae* genome assembly, chromosome: 13	84
6	*C. rubens* “alba” 775 bp M9E2	PREDICTED: *Dendrobium catenatum* probable protein S-acyltransferase 1 (LOC110091874), transcript variant X3, mRNA	94
7	*C. herbacea* 486 bp M3E9	*Erycina pusilla* clone BAC clone 012N23 mitochondrion sequence	97
8	*C. clavata* 851 bp M9E2	*Oryza sativa Indica* Group cultivar Shuhui498 chromosome 10 sequence	97

ที่	ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ	ข้อมูลจาก Genbank	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน
9	*C. succadenea* 683 bp M9E4	PREDICTED: *Carlito syrichta* DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C21 (DNAJC21), mRNA	83
10	*C. succedanea* 450 bp M2E9	PREDICTED: *Dendrobium catenatum* 5'-3' exoribonuclease 3 (LOC110098478), mRNA	95
11	*C. densiflora* 672 bp M3E6	PREDICTED: *Tetranychus urticae* uncharacterized LOC107362182 (LOC107362182), mRNA	85
12	*C. lyroglossa* 433 bp M3E6	*Oryzias latipes* strain Hd-rR chromosome 4 sequence	100
13	*C. masuca* 757 bp M6E10	*Vitis vinifera* contig VV78X194680.77, whole genome shotgun sequence	80
14	*P. flavus* 395 bp M3E9	PREDICTED: *Arachis duranensis* uncharacterized LOC107466426 (LOC107466426), mRNA	83
15	*P. flavus* 341 bp M5E2	PREDICTED: *Dendrobium catenatum* uncharacterized LOC110111351 (LOC110111351), mRNA	80
16	*P. indochinensis* 775 bp M3E9	PREDICTED: *Cucurbita moschata* uncharacterized LOC111449572 (LOC111449572), mRNA	79
17	*Cep. longipes* 507 bp M9E5	*Eutrema salsugineum* hypothetical protein (EUTSA_v10018221mg) mRNA, complete cds	100

การออกแบบไพรเมอร์

เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จำเพาะแล้วนำมาออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 44 คู่ไพรเมอร์ โดยออกแบบจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำนวน 17 แถบที่โคลนสำเร็จ (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดได้

ไพรเมอร์ SRAP	ไพรเมอร์ SCAR	ตำแหน่ง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′)	ขนาดที่คาดหมาย (คู่เบส)	สำหรับชนิด	อุณหภูมิ annealing (°C)
M2E1	CTR1	CTR1_F	GCTGAAACCAATTTCTAGAAGG	140	*C. triplicata*	55
		CTR1_R	GCAAGTATATCTTCACGCC			
M2E6	CTR2	CTR2_F	GGTGAAATTGAACTTTGATGGG	120		67
		CTR2_R	GGAATAGCAGCTACCATAGG			
M3E9	CTR3	CTR3_F	CGAGTCGTAGTTCTTCCTTCCC	400		60
		CTR3_R	CGGATTCTTATCTGATGCCG			
M3E9	CTR4	CTR4_F	GCTTATACGCCTCTGACCG	300		60
		CTR4_R	CGGATTCTTATCTGATGCCG			
M3E6	CRUA1	CRUA1_F	GAGAATAGGCACTGGACGG	350	*C. rubens* “alba”	57
		CRUA1_R	GCGTACGAATTCAGCAAGGG			
M9E2	CRUA2	CRUA2_F	GTCCAATGCATTGACCAACCC	470		55
		CRUA2_R	GACCATCACTATGTACTTGGC			
M9E2	CRUA3	CRUA3_F	GTCCAATGCATTGACCAACCC	600		54
		CRUA3_R	GGAAGACTTATATTTGGCCCGG			

ไพรเมอร์ SRAP	ไพรเมอร์ SCAR	ตำแหน่ง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′)	ขนาดที่คาดหมาย (คู่เบส)	สำหรับชนิด	อุณหภูมิ annealing (°C)
M9E2	CRUA4	CRUA4_F	GGGCTTCTTCCATTGACCC	300	*C. rubens* “alba”	54
		CRUA4_R	GACCATCACTATGTACTTGGC			
M9E2	CRUA5	CRUA5_F	GGGCTTCTTCCATTGACCC	440		54
		CRUA5_R	GGAAGACTTATATTTGGCCCGG			
M4E3	CRUA6	CRUA6_F	GATGAAGTAGCGAGGAGC	170		62
		CRUA6_R	CGTGAAATGGACTTTGCG			
M3E9	CHE1	CHE1_F	CCAATTCACACAAATCGAGTCG	440	*C. herbacea*	54
		CHE1_R	GAAGGTGTTTGTCCTTAACGG			
M3E9	CHE2	CHE2_F	GATTCTCGCTCTTATTCTCGGC	270		54
		CHE2_R	GAAGGTGTTTGTCCTTAACGG			
M9E2	CCL1	CCL1_F	GCGGAATCCGCTAACTCCC	580	*C. clavata*	50
		CCL1_R	GGGTCGACTTAAGGCGCC			
M9E2	CCL2	CCL2_F	GCGGAATCCGCTAACTCCC	650		55
		CCL2_R	GAAACCTGAATCCTTCGGGC			
M9E2	CCL3	CCL3_F	GAGTTGGTACATTGGATTCCCC	540		55
		CCL3_R	GGGTCGACTTAAGGCGCC			

ไพรเมอร์ SRAP	ไพรเมอร์ SCAR	ตำแหน่ง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′)	ขนาดที่คาดหมาย (คู่เบส)	สำหรับชนิด	อุณหภูมิ annealing (°C)
M9E2	CCL4	CCL4_F	GAGTTGGTACATTGGATTCCCC	600	*C. clavata*	57
		CCL4_R	GAAACCTGAATCCTTCGGGC			
M9E2	CCL5	CCL5_F	GGCATACTAATGGCTTTTCCCC	440		55
		CCL5_R	GGGTCGACTTAAGGCGCC			
M9E2	CCL6	CCL6_F	GGCATACTAATGGCTTTTCCCC	500		55
		CCL6_R	GAAACCTGAATCCTTCGGGC			
M9E4	CSU1	CSU1_F	CCTAATTAGCCTTATTAAGGGC	400	*C. succedanea*	62
		CSU1_R	CCTCTCTAGAGATTAAAACCGC			
M9E4	CSU2	CSU2_F	CCTAATTAGCCTTATTAAGGGC	450		54
		CSU2_R	GAAACTTCCCAACTAGGGC			
M9E4	CSU3	CSU3_F	GTAGTTTCTCATCTCCTCGG	230		54
		CSU3_R	CCTCTCTAGAGATTAAAACCGC			
M9E4	CSU4	CSU4_F	GTAGTTTCTCATCTCCTCGG	280		54
		CSU4_R	GAAACTTCCCAACTAGGGC			
M2E9	CSU5	CSU5_F	GCACTATTAAACTTGGCCC	250		68.5
		CSU5_R	CGCTATCTATAAAGATGCACACGC			

ไพรเมอร์ SRAP	ไพรเมอร์ SCAR	ตำแหน่ง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′)	ขนาดที่คาดหมาย (คู่เบส)	สำหรับชนิด	อุณหภูมิ annealing (°C)
M2E9	CSU6	CSU6_F	GCACTATTAAACTTGGCCC	430	*C. succedanea*	50
		CSU6_R	GCATTTTATTCAGGCAGTTGGG			
M2E9	CSU7	CSU7_F	CCAGCAAGGCAACAAACCG	100		65
		CSU7_R	CGCTATCTATAAAGATGCACACGC			
M2E9	CSU8	CSU8_F	CCAGCAAGGCAACAAACCG	250		65
		CSU8_R	GCATTTTATTCAGGCAGTTGGG			
M3E6	CDE1	CDE1_F	GGTGAAAAAGTTCAGAACCAACGG	300	*C. densiflora*	60
		CDE1_R	GCTTACAAATGCTAAGGCGG			
M3E6	CDE2	CDE2_F	GGTGAAAAAGTTCAGAACCAACGG	600		60
		CDE2_R	GCTGATCAATACCTGTAATTACGG			
M3E6	CDE3	CDE3_F	GCACCAGAATTCTACAAACCGG	200		65
		CDE3_R	GCTTACAAATGCTAAGGCGG			
M3E6	CDE4	CDE4_F	GCACCAGAATTCTACAAACCGG	450		55
		CDE4_R	GCTGATCAATACCTGTAATTACGG			

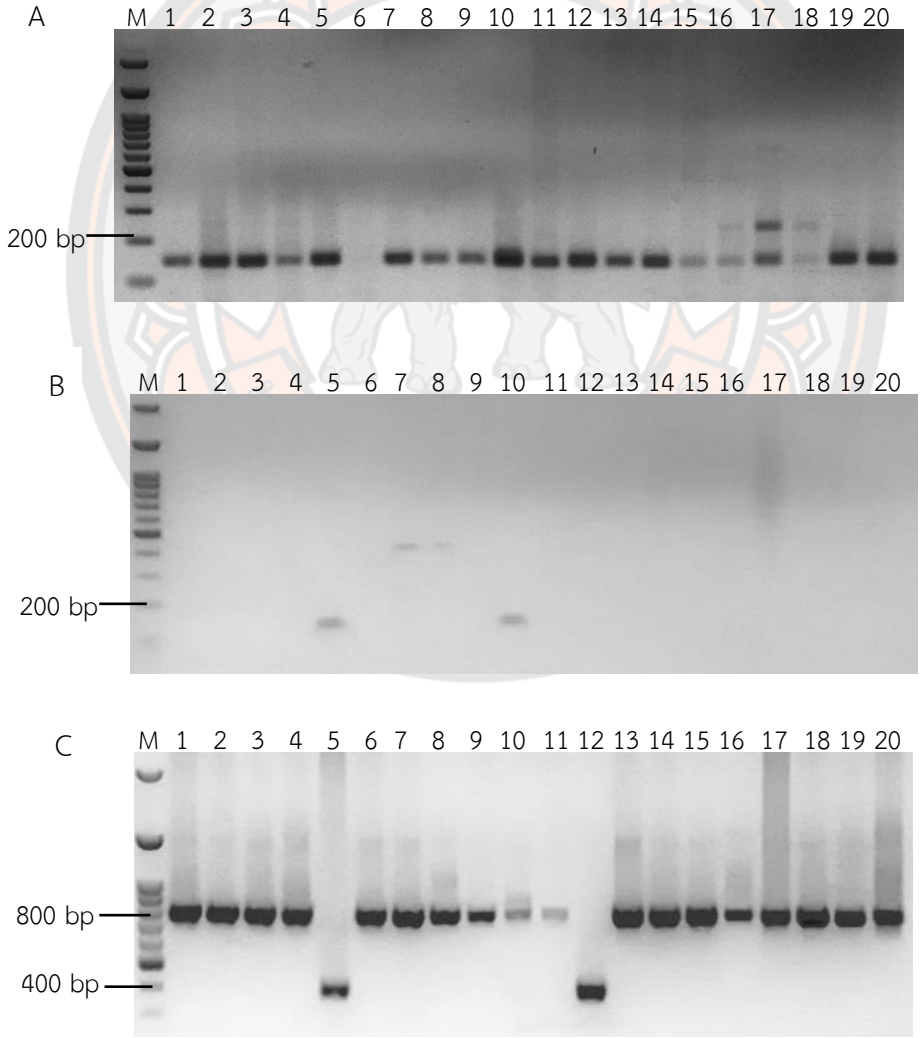
ไพรเมอร์ SRAP	ไพรเมอร์ SCAR	ตำแหน่ง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′)	ขนาดที่คาดหมาย (คู่เบส)	สำหรับชนิด	อุณหภูมิ annealing (°C)
M3E6	CLY1	CLY1_F	CGGTCGACTAGAATTTTATGGC	400	*C. lyrogloss a*	65
		CLY1_R	CGAACCTATTGTAAACTCAGAGGC			
M3E6	CLY2	CLY2_F	CCATAAATGCGCACACTGCC	270		70
		CLY2_R	CGAACCTATTGTAAACTCAGAGGC			
M6E10	CMA1	CMA1_F	GGATGTAAGTGGAAAACCC	550	*C. masuca*	57
		CMA1_R	GCAAGATGCGGAAGATTCGGG			
M6E10	CMA2	CMA2_F	GGATGTAAGTGGAAAACCC	650		68
		CMA2_R	GGTATAGAATCAATCGGGCGG			
M6E10	CMA3	CMA3_F	CGACAAGAAACCCTTGGCG	330		70
		CMA3_R	GCAAGATGCGGAAGATTCGGG			
M6E10	CMA4	CMA4_F	CGACAAGAAACCCTTGGCG	420		60
		CMA4_R	GGTATAGAATCAATCGGGCGG			
M3E9	PFL1	PFL1_F	GTTAATGGTTCATGTGGCGAGC	320	*P. flavus*	57
		PFL1_R	GAGTTGATTCTGCTCGCG			
M5E2	PFL2	PFL2_F	GAGACCATTTGTCAAGGCC	240		64
		PFL2_R	CAGAATATTGGAAGACTCAGGC			

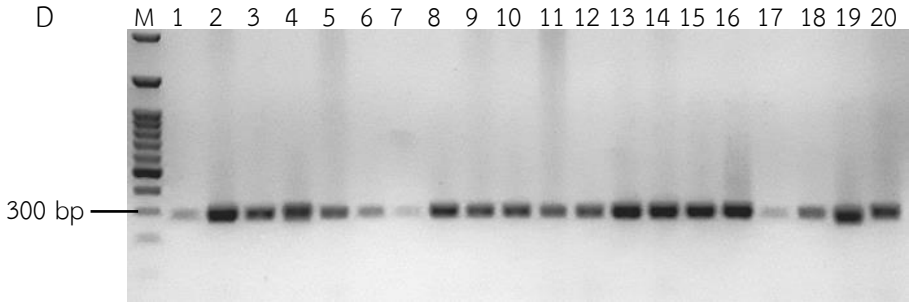
ไพรเมอร์ SRAP	ไพรเมอร์ SCAR	ตำแหน่ง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5′-3′)	ขนาดที่คาดหมาย (คู่เบส)	สำหรับชนิด	อุณหภูมิ annealing (°C)
M3E9	PIN1	PIN1_F	CGAATTAACCTTCGATTGCG	500	*P. indochinensis*	65
		PIN1_R	GGTGGAAGTTAGGCTAGGGC			
M3E9	PIN2	PIN2_F	CGAATTAACCTTCGATTGCG	700		60
		PIN2_R	CGATAGAGACGTTACTGGTGGC			
M3E9	PIN3	PIN3_F	CCTCTCTTCCTTAAGCTTCCC	160		57
		PIN3_R	GGTGGAAGTTAGGCTAGGGC			
M3E9	PIN4	PIN4_F	CCTCTCTTCCTTAAGCTTCCC	360		57
		PIN4_R	CGATAGAGACGTTACTGGTGGC			
M9E5	CEPL1	CEPL1_F	CATCATCATCATGTCGACCCC	400	*Cep. longipes*	60
		CEPL1_R	CATTTAGACTCCTTGTGGAGGC			
M9E5	CEPL2	CEPL2_F	GCAGCTTGATCTTTGTTAAGGC	270		70
		CEPL2_R	CATTTAGACTCCTTGTGGAGGC			

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์จำนวน 44 คู่ กับตัวอย่างทั้งหมด 20 ตัวอย่าง คือ

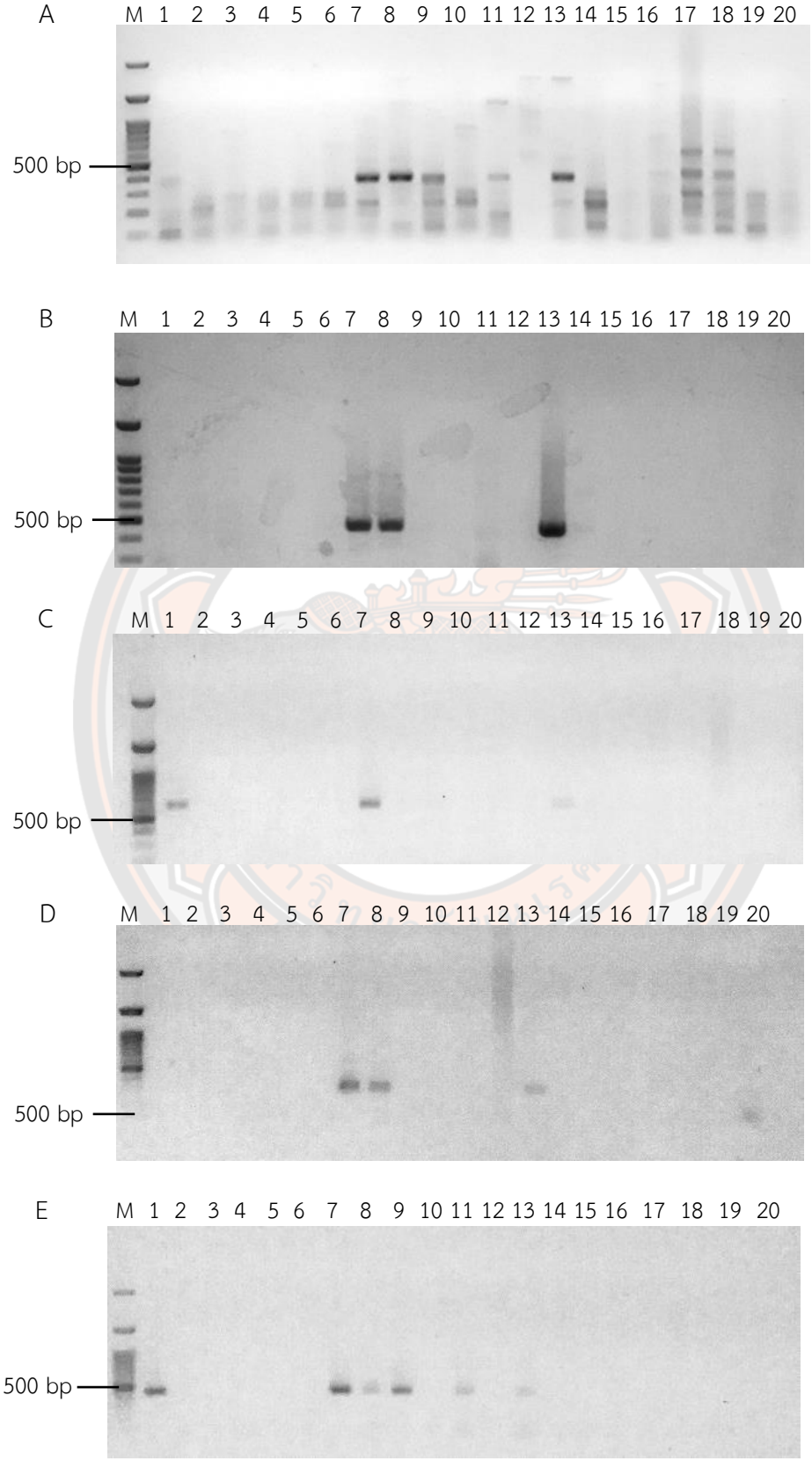
1. ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. triplicata* จำนวน 4 คู่ คือ CTR1, CTR2, CTR3 และ CTR4 ไม่สามารถใช้ระบุกล้วยไม้ชนิดนี้ได้ โดยไพรเมอร์ CTR1 สามารถเพิ่มปริมาณได้ในเกือบทุกตัวอย่าง ขนาด 140 คู่เบส ยกเว้น *C pulchra* (ภาพที่ 6A) ในขณะที่ไพรเมอร์ CTR2 สามารถเพิ่มปริมาณได้ในตัวอย่าง *C. masuca* และ *C. triplicata* ขนาด 120 คู่เบส (ภาพที่ 6B) ไพรเมอร์ CTR3 สามารถเพิ่มปริมาณได้ในทุกตัวอย่าง แต่มีขนาดแตกต่างกันคือ *C. masuca* และ *C. herbacea* มีขนาด 400 คู่เบส ในขณะที่ตัวอย่างอื่น ๆ มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส (ภาพที่ 6C) และไพรเมอร์ CTR4 สามารถเพิ่มปริมาณได้ในทุกตัวอย่าง ขนาด 300 คู่เบส เท่ากัน (ภาพที่ 6D)

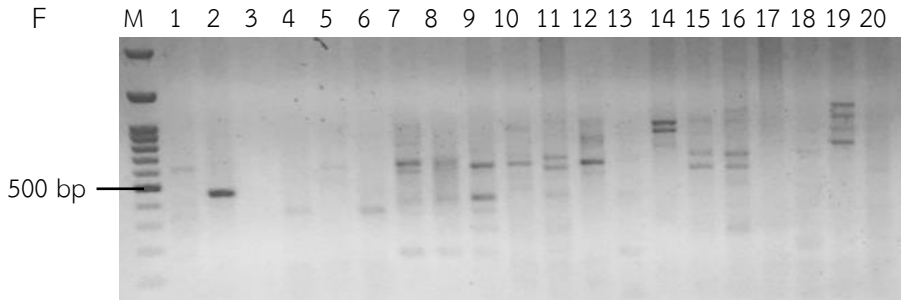




ภาพที่ 6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. triplicata ไพรเมอร์ CTR1 (A), CTR 2 (B), CTR 3 (C) และ CTR 4 (D) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens "alba" Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae "alba" Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes

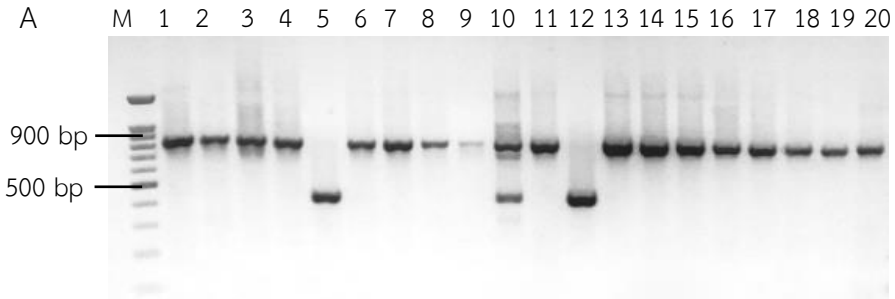
2. ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. rubens* "alba" จำนวน 6 คู่ คือ CRUA1, CRUA2, CRUA3, CRUA4, CRUA5 และ CRUA6 ผลการทดสอบปรากฏว่า ไพรเมอร์ทั้ง 6 คู่ ไม่สามารถใช้ระบุชนิด *C. rubens* "alba" ได้อย่างจำเพาะ โดยไพรเมอร์ CRUA1 เพิ่มปริมาณอย่างไม่จำเพาะในหลายตัวอย่างและหลายขนาด ทั้งใน *C. rosea*, *C. rubens*, *C. succedanea*, *C. vestita*, *C. rubens* "alba", *P. tankervilleae* และ *P. tankervilleae* "alba" ขนาด 350 คู่เบส ซึ่งเมื่อพิจารณาจากแผนภาพทางพันธุกรรมพบว่า ตัวอย่าง *Calanthe* ที่เพิ่มปริมาณได้ทั้ง 5 ตัวอย่าง ถูกจัดไว้ในกลุ่ม 2 (ภาพที่ 7A) ส่วน *P. tankervilleae* และ *P. tankervilleae* "alba" ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสกุล *Phaius* ในขณะที่ไพรเมอร์ CRUA2 สามารถเพิ่มปริมาณได้ใน 3 ตัวอย่าง คือ *C. rosea*, *C. rubens* และ *C. rubens* "alba" ขนาด 470 คู่เบส (ภาพที่ 7B) ส่วนไพรเมอร์ CRUA3 สามารถเพิ่มปริมาณได้ขนาด 600 คู่เบส ใน 3 ตัวอย่าง คือ *C. cardioglossa*, *C. rosea* และ *C. rubens* "alba" สอดคล้องกับค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมที่ระบุว่า *C. rubens* "alba" มีความคล้ายคลึงกับ *C. rosea* มากกว่า *C. rubens* (ภาพที่ 7C) ไพรเมอร์ CRUA4 เพิ่มปริมาณได้ใน 3 ตัวอย่าง คือ *C. rosea*, *C. rubens* และ *C. rubens* "alba" ขนาด 300 คู่เบส (ภาพที่ 7D) ไพรเมอร์ CRUA5 เพิ่มปริมาณได้ใน 6 ตัวอย่าง คือ *C. cardioglossa*, *C. rosea*, *C. rubens*, *C. succedanea*, *C. vestita* และ *C. rubens* "alba" ขนาด 440 คู่เบส (ภาพที่ 7E) และไพรเมอร์ CRUA6 สามารถเพิ่มปริมาณได้ในเกือบทุกตัวอย่างและมีจำนวนแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก แสดงว่าไพรเมอร์ไม่จำเพาะและไม่สามารถใช้ระบุชนิดของ *C. rubens* "alba" ได้ (ภาพที่ 7F)

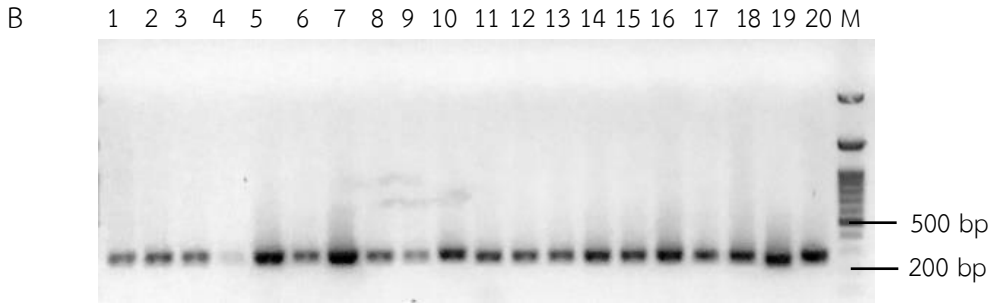

A
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
500 bp
B
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
500 bp
C
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
500 bp
D
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
500 bp
E
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
500 bp



ภาพที่ 7 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. rubens "alba" ไพรเมอร์ CRUA1 (A), CRUA2 (B), CRUA3 (C), CRUA4 (D), CRUA5 (E) และ CRUA6 (F) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens "alba" Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae "alba" Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes

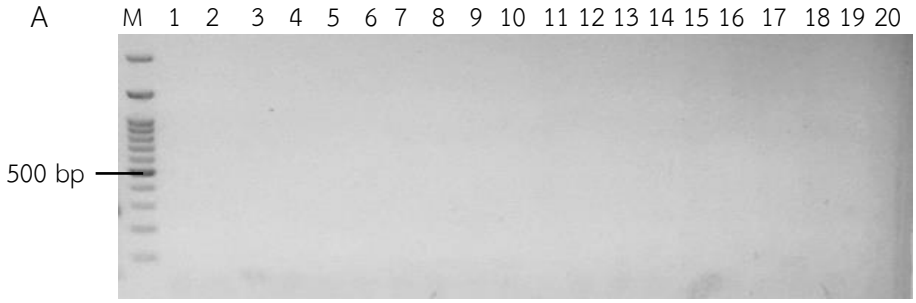
3. ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. herbacea* จำนวน 2 คู่ คือ CHE1 และ CHE2 ผลการทดสอบปรากฏว่า ไพรเมอร์ CHE1 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในทุกตัวอย่างขนาด 850 คู่เบส ยกเว้นในชนิด *C. masuca* และ *C. herbacea* มีขนาด 400 คู่เบส ในขณะที่ *C. triplicata* ปรากฏทั้ง 2 ขนาด โดยจากแผนภาพทางพันธุกรรมพบว่ากล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ด้วยกัน ดังนั้นไพรเมอร์ CHE1 อาจใช้ในการระบุชนิดในกลุ่มที่ 1 ได้ และใช้แยกชนิด *C. triplicata* ได้ด้วย เนื่องจากเป็นชนิดเดียวที่มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ทั้ง 850 และ 400 คู่เบส (ภาพที่ 8A) ส่วนไพรเมอร์ CHE2 ไม่สามารถใช้ระบุชนิดใดได้ เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณได้ในทุกตัวอย่างขนาด 270 คู่เบส (ภาพที่ 8B)



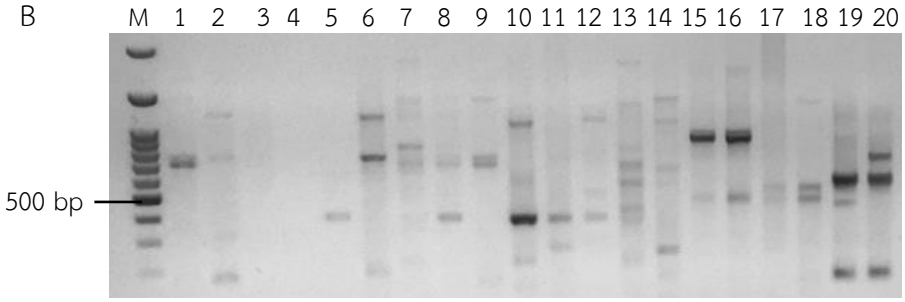


ภาพที่ 8 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. herbacea ไพรเมอร์ CHE1 (A) และ CHE2 (B) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens "alba" Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae "alba" Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes

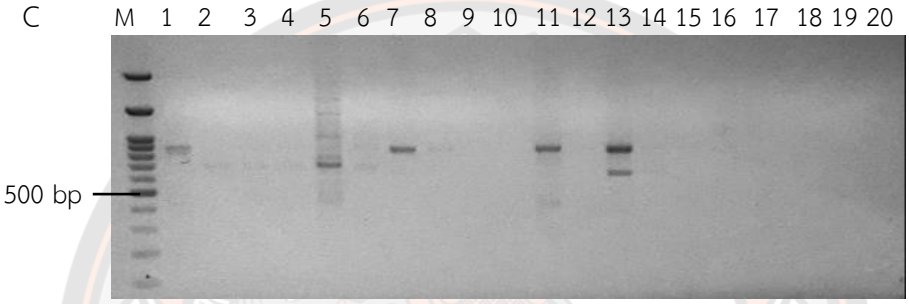
4. ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. clavata* จำนวน 6 คู่ คือ CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 และ CCL6 ผลการทดสอบปรากฏว่า ไพรเมอร์ CCL1 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในตัวอย่างใดเลย (ภาพที่ 9A) ไพรเมอร์ CCL2 เพิ่มปริมาณได้ในหลายตัวอย่าง (ภาพที่ 9B) ไพรเมอร์ CCL3 สามารถเพิ่มปริมาณใน *C. cardioglossa*, *C. rosea* และ *C. vestita* ขนาด 900 คู่เบส ในขณะที่ *C. masuca* ขนาด 700 คู่เบส และ *C. rubens* "alba" ปรากฏทั้ง 2 แถบ (ภาพที่ 9C) ไพรเมอร์ CCL4 เพิ่มปริมาณได้ในหลายตัวอย่าง โดยมี *C. lyroglossa* และ *Cep. obcordata* ขนาด 600 คู่เบส ส่วน *Cep. longipes* ปรากฏ 2 แถบ ขนาด 600 และ 700 คู่เบส (ภาพที่ 9D) ไพรเมอร์ CCL5 เพิ่มปริมาณได้ใน *C. densiflora* ขนาด 750 คู่เบส (ภาพที่ 9E) และไพรเมอร์ CCL6 เพิ่มปริมาณได้แบบไม่จำเพาะเจาะจง (ภาพที่ 9F)



B


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
500 bp

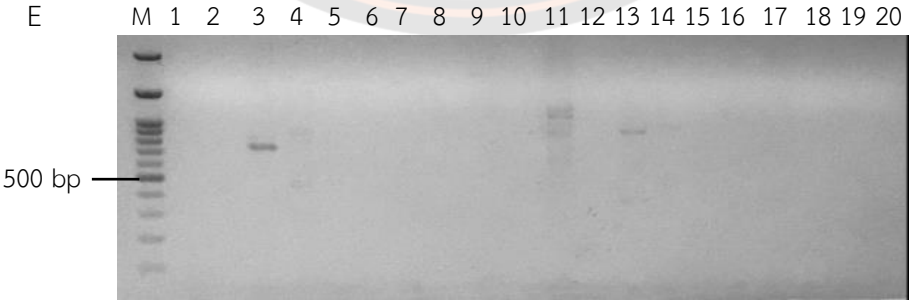
C

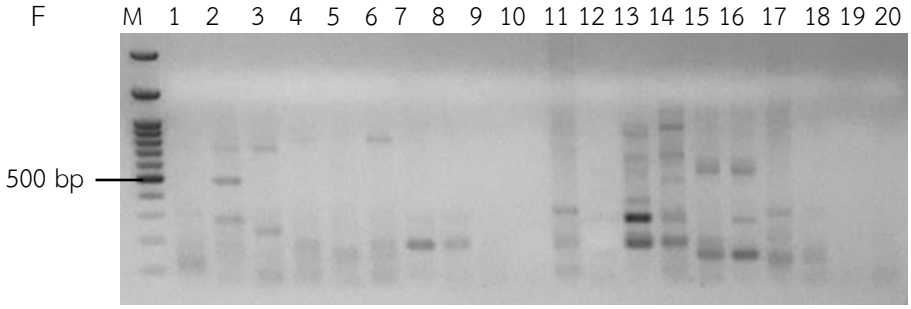

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
500 bp

D

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M
500 bp

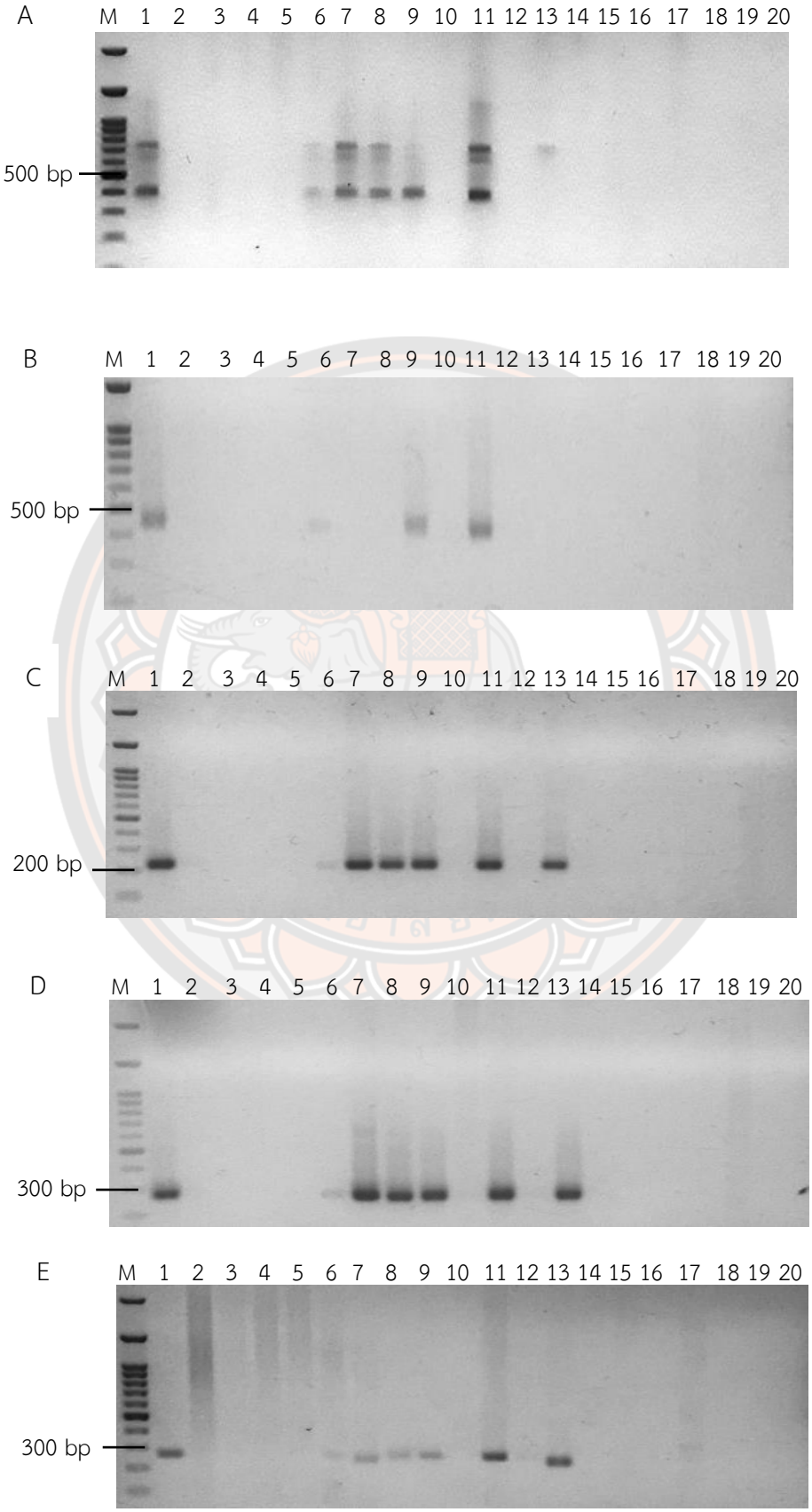
E

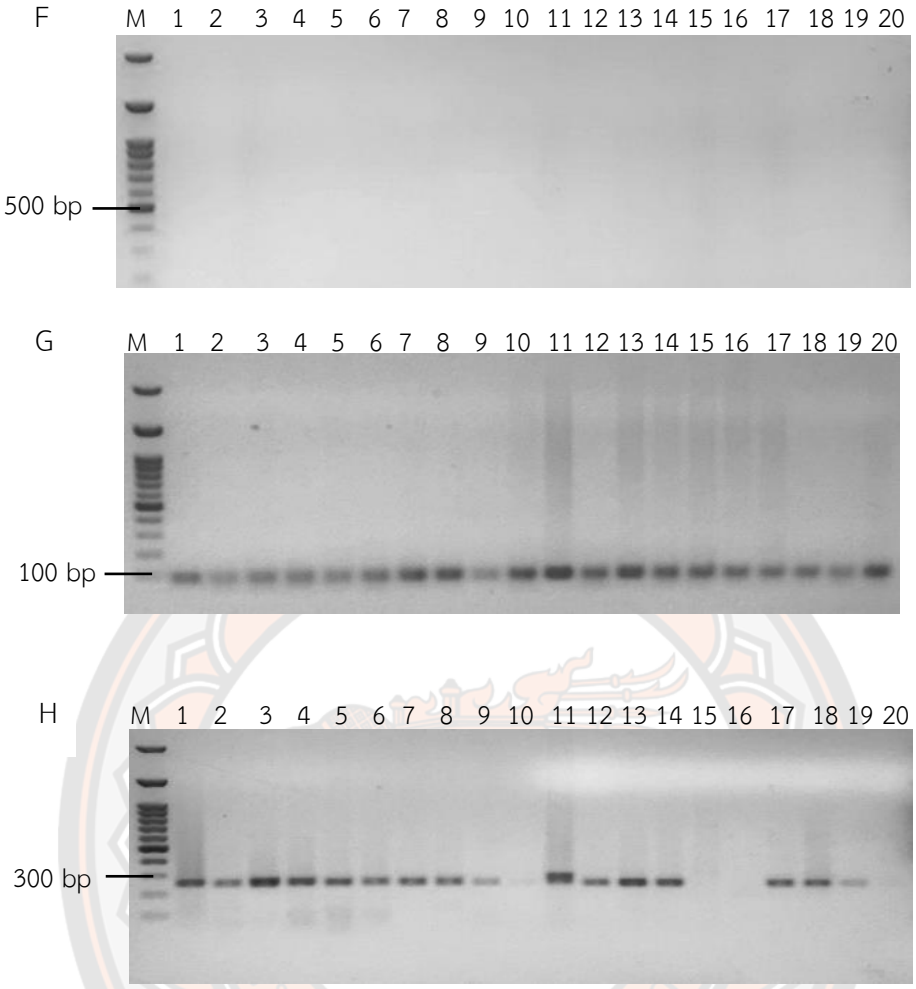

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
500 bp



ภาพที่ 9 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. clavata ไพรเมอร์ CCL1 (A), CCL2 (B), CCL3 (C), CCL4 (D), CCL5 (E) และ CCL6 (F) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens "alba" Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae "alba" Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes

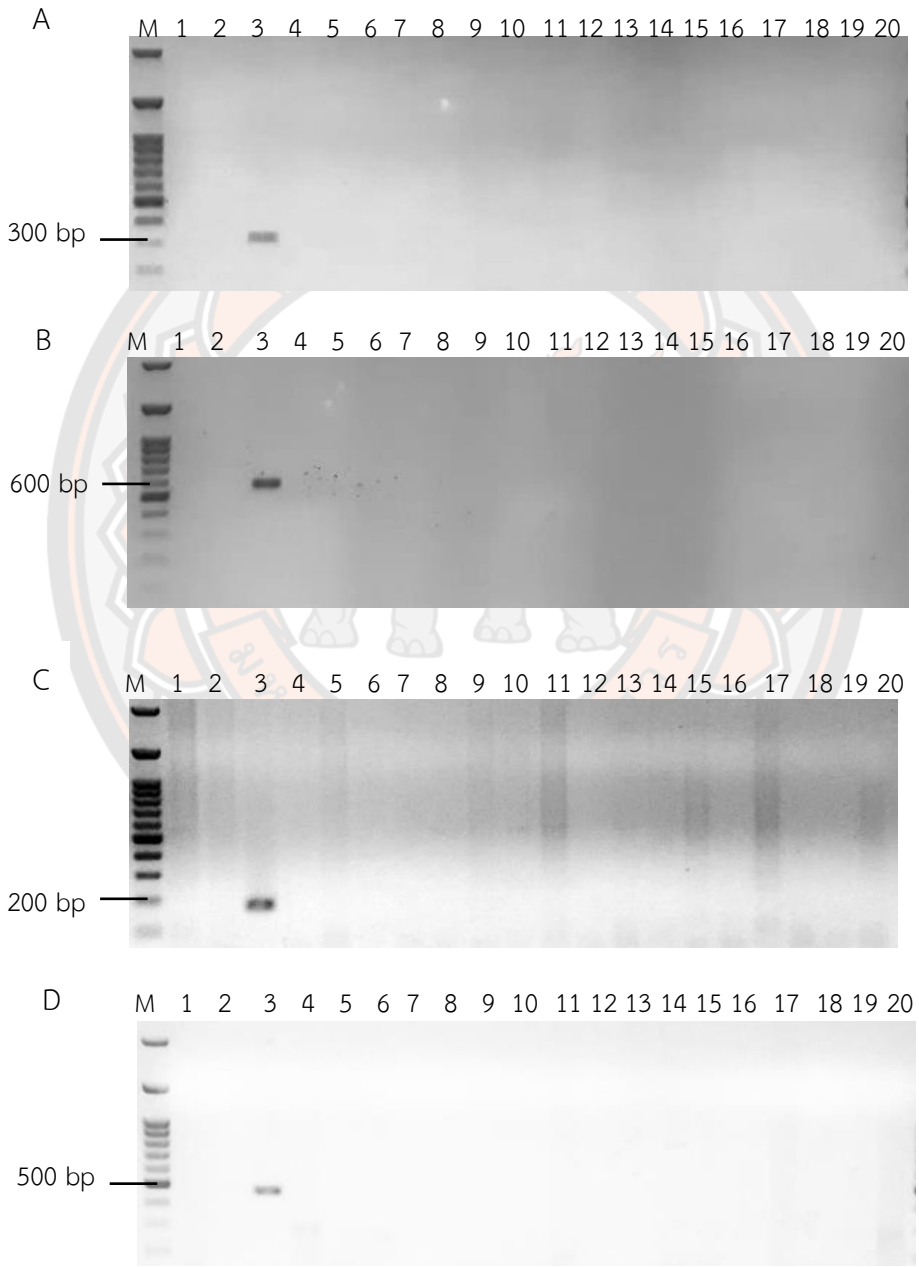
5. ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. succedanea* จำนวน 8 คู่ คือ CSU1, CSU2, CSU3, CSU4, CSU5, CSU6, CSU7 และ CSU8 ผลการทดสอบปรากฏว่าไพรเมอร์ CSU1 สามารถเพิ่มปริมาณได้ใน 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 2 แถบ คือ *C. cardioglossa*, *C. pulchra*, *C. rosea*, *C. rubens*, *C. succedanea* และ *C. vestita* ขนาด 750 และ 400 คู่เบส (ภาพที่ 10A) ส่วนไพรเมอร์ CSU2 สามารถเพิ่มปริมาณได้ใน 4 ตัวอย่าง คือ *C. cardioglossa*, *C. pulchra*, *C. succedanea* และ *C. vestita* ขนาด 450 คู่เบส (ภาพที่ 10B) ไพรเมอร์ CSU3, CSU4 และ CSU5 สามารถเพิ่มปริมาณได้ใน 7 ตัวอย่าง คือ *C. cardioglossa*, *C. pulchra*, *C. rosea*, *C. rubens*, *C. succedanea*, *C. vestita* และ *C. rubens* "alba" ขนาด 230, 280 และ 250 คู่เบส (ภาพที่ 10C-E) ตามลำดับ ส่วนไพรเมอร์ CSU6 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในตัวอย่างใดเลย (ภาพที่ 10F) ในขณะที่ไพรเมอร์ CSU7 เพิ่มปริมาณได้ในทุกตัวอย่างขนาด 100 คู่เบส (ภาพที่ 10G) และไพรเมอร์ CSU8 สามารถเพิ่มปริมาณได้ในเกือบทุกตัวอย่าง ขนาด 250 คู่เบส ยกเว้น *P. indochinensis, P. mishmensis* และ *Cep. longipes* (ภาพที่ 10H)


A
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
500 bp
B
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
500 bp
C
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
200 bp
D
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
300 bp
E
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
300 bp



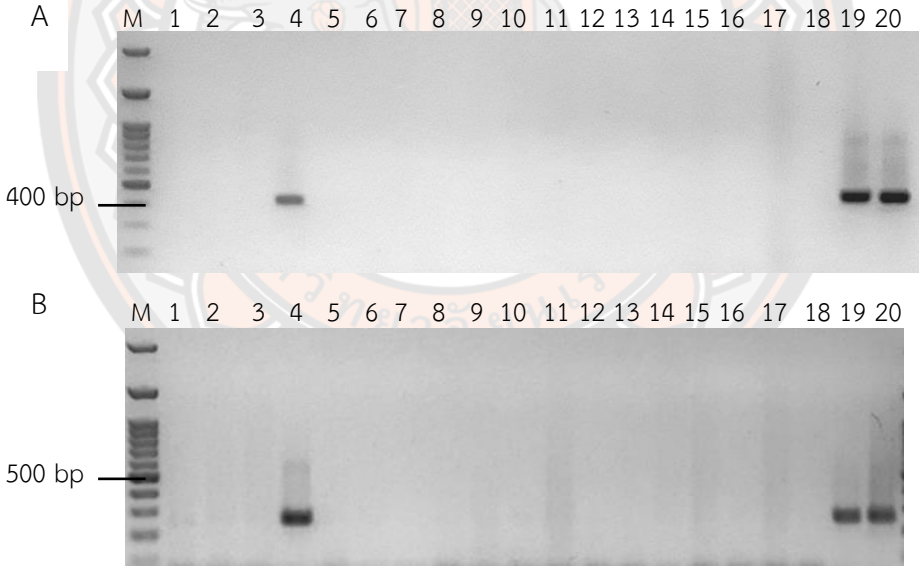
ภาพที่ 10 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. succedanea ไพรเมอร์ CSU1 (A), CSU2 (B), CSU3 (C), CSU4 (D), CSU5 (E), CSU6 (F), CSU7 (G), และ CSU8 (H) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens "alba" Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae "alba" Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes

6. ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. densiflora* จำนวน 4 คู่ คือ CDE1, CDE2, CDE3 และ CDE4 ผลการทดสอบปรากฏว่า ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่มีความจำเพาะกับกล้วยไม้ชนิด *C. densiflora* เนื่องจากสามารถเพิ่มได้ในกล้วยไม้ชนิดนี้เพียงชนิดเดียว ซึ่งมีขนาดแตกต่างกันตามขนาดของไพรเมอร์ที่ออกแบบคือ CDE1 ขนาด 300 คู่เบส (ภาพที่ 11A) CDE2 ขนาด 600 คู่เบส (ภาพที่ 11B) CDE3 ขนาด 200 คู่เบส (ภาพที่ 11C) และ CDE4 ขนาด 450 คู่เบส (ภาพที่ 11D)



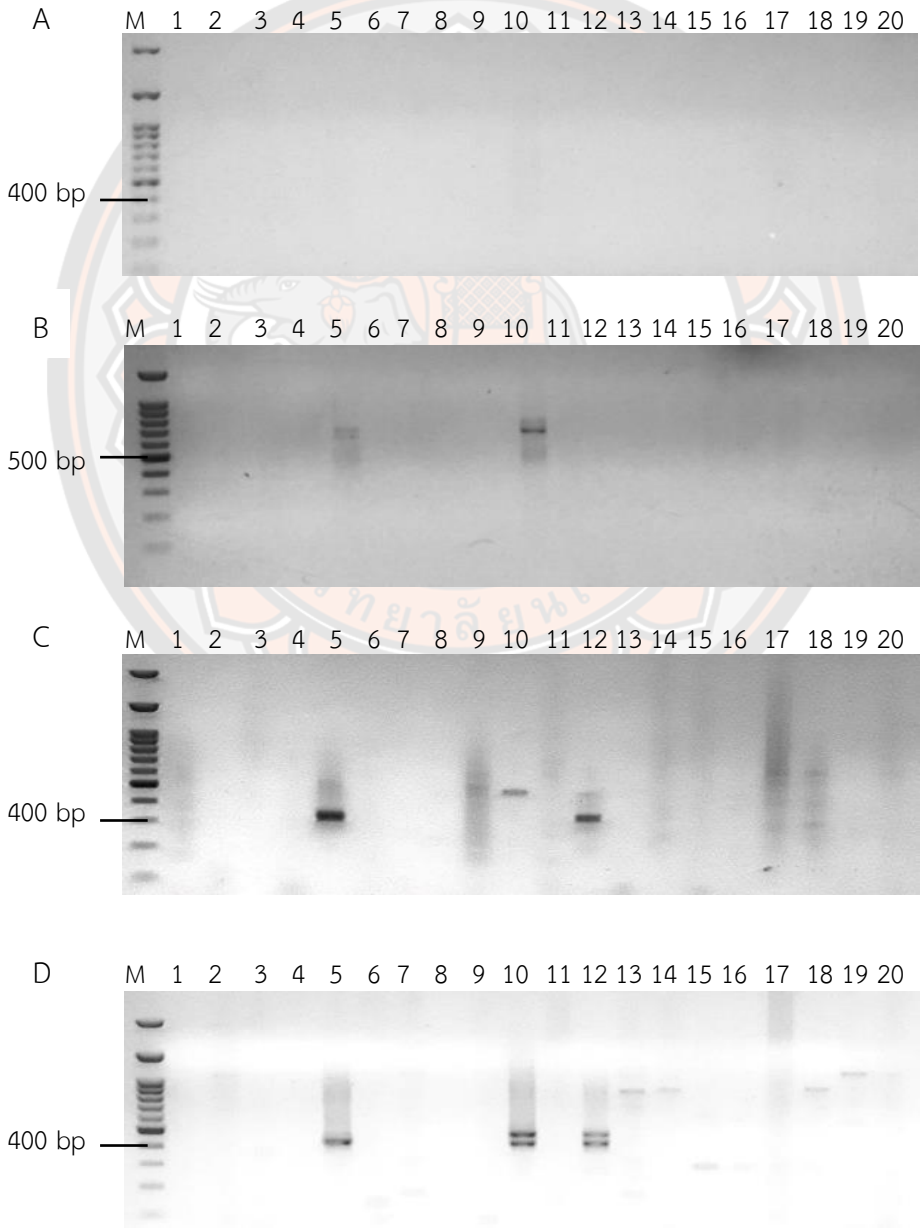
ภาพที่ 11 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. densiflora ไพรเมอร์ CDE1 (A), CDE2 (B), CDE3 (C) และ CDE4 (D) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens "alba" Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae "alba" Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes

7. ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. lyroglossa* จำนวน 2 คู่ คือ CLY1 และ CLY2 ผลการทดสอบปรากฏว่า ไพรเมอร์ CLY1 และ CLY2 สามารถเพิ่มปริมาณได้ใน 3 ชนิด คือ *C. lyroglossa*, *Cep. obcordata* และ *Cep. longipes* ขนาด 400 คู่เบส (ภาพที่ 12A) และ 270 คู่เบส (ภาพที่ 12B) ตามลำดับ



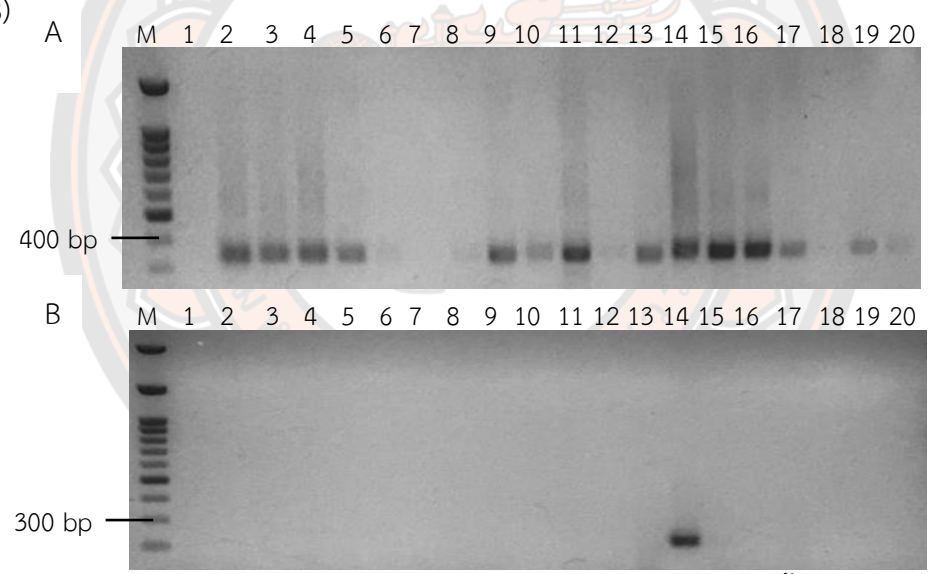
ภาพที่ 12 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. lyroglossa ไพรเมอร์ CLY1 (A) และ CLY2 (B) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens "alba" Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae "alba" Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes

8. ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. masuca* จำนวน 4 คู่ คือ CMA1, CMA2, CMA3 และ CMA4 ผลการทดสอบปรากฏว่า ไพรเมอร์ CMA1 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในตัวอย่างใดเลย (ภาพที่ 13A) ไพรเมอร์ CMA2 สามารถเพิ่มปริมาณใน 2 ชนิด คือ *C. masuca* และ *C. triplicata* ขนาด 700 คู่เบส (ภาพที่ 13B) ไพรเมอร์ CMA3 สามารถเพิ่มปริมาณได้ใน 3 ชนิด คือ *C. masuca* และ *C. herbacea* ขนาด 330 คู่เบส และสามารถเพิ่มปริมาณได้ใน *C. triplicata* ขนาด 400 คู่เบสอีกด้วย (ภาพที่ 13C) ไพรเมอร์ CMA4 เพิ่มปริมาณได้ใน 3 ชนิดคือ *C. masuca* ขนาด 420 คู่เบส ในขณะที่ *C. triplicata* และ *C. herbacea* นั้นสามารถเพิ่มปริมาณได้ 2 แถบ ขนาด 420 และ 470 คู่เบส (ภาพที่ 13D)



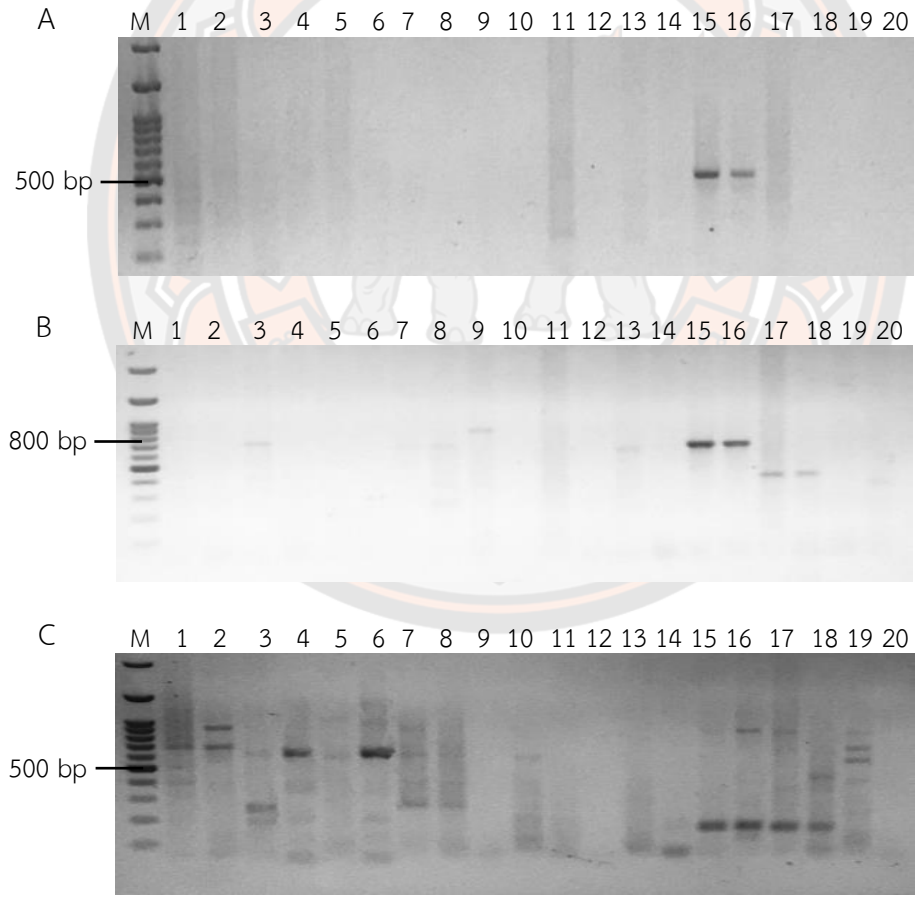
ภาพที่ 13 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ C. masuca ไพรเมอร์ CMA1 (A), CMA2 (B), CMA3 (C) และ CMA4 (D) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens "alba" Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae "alba" Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes

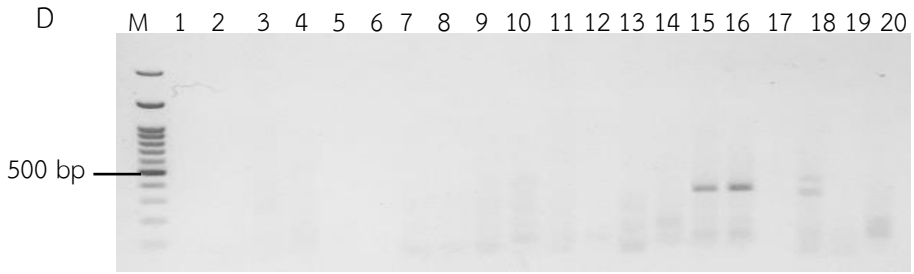
9. ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. flavus* จำนวน 2 คู่ คือ PFL1 และ PFL2 ผลการทดสอบปรากฏว่า ไพรเมอร์ PFL1 สามารถเพิ่มปริมาณได้เกือบทุกตัวอย่าง ขนาด 320 คู่เบส ยกเว้น *C. cardiglossa*, *C. rosea* และ *P. tankrvilleae* "alba" (ภาพที่ 14A) ในขณะที่ไพรเมอร์ PFL2 สามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างจำเพาะกับ *P. flavus* เท่านั้น ขนาด 240 คู่เบส (ภาพที่ 14B)



ภาพที่ 14 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ P. flavus ไพรเมอร์ PFL1 (A) และ PFL2 (B) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens "alba" Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae "alba" Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes

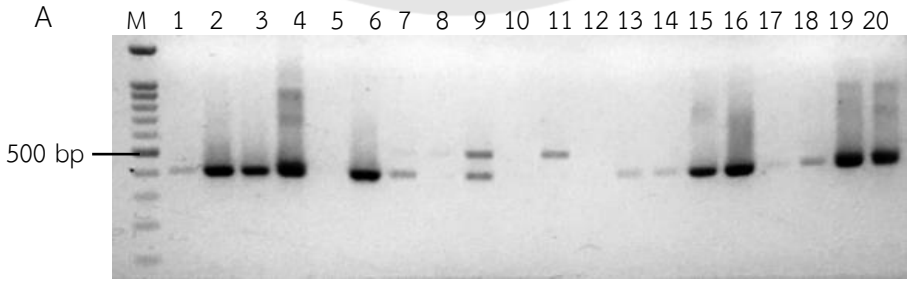
10. ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *P. indochinensis* จำนวน 4 คู่ คือ PIN1, PIN2, PIN3 และ PIN4 ผลการทดสอบปรากฏว่า ไพรเมอร์ PIN1 สามารถเพิ่มปริมาณได้ใน 2 ชนิด คือ *P. indochinensis* และ *P. mishmensis* ขนาด 500 คู่เบส (ภาพที่ 15A) ในขณะที่ไพรเมอร์ PIN2 สามารถเพิ่มปริมาณได้ใน *P. indochinensis* และ *P. mishmensis* ขนาด 700 คู่เบส และสามารถเพิ่มปริมาณใน *P. tankervilleae* และ *P. tankervilleae* “alba” ขนาด 500 คู่เบส ได้เช่นกัน (ภาพที่ 15B) ส่วนไพรเมอร์ PIN3 สามารถเพิ่มปริมาณได้ใน 4 ชนิด เช่นเดียวกับไพรเมอร์ PIN2 ขนาด 160 คู่เบส และเพิ่มปริมาณได้ในชนิดอื่น ๆ อย่างไม่จำเพาะเจาะจงด้วย (ภาพที่ 15C) ไพรเมอร์ PIN4 สามารถเพิ่มปริมาณได้ใน *P. indochinensis* และ *P. mishmensis* ขนาด 360 คู่เบส (ภาพที่ 15D) ซึ่งเมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่าง *P. indochinensis* และ *P. mishmensis* พบว่า มีค่าสูงถึง 0.59 ทำให้ไพรเมอร์ SCAR จึงไม่สามารถใช้จำแนกทั้ง 2 ชนิดนี้ออกจากกันได้

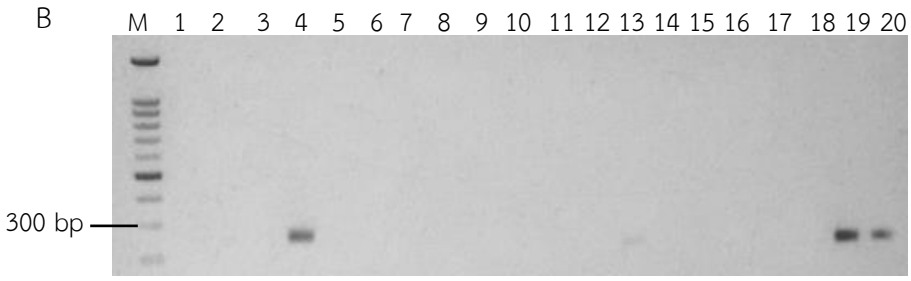




ภาพที่ 15 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ P. indochinensis ไพรเมอร์ PIN1 (A), PIN2 (B), PIN3 (C) และ PIN4 (D) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens "alba" Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae "alba" Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes

11. ไพรเมอร์ที่มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Cep. longipes* จำนวน 2 คู่ คือ CEPL1 และ CEPL2 ผลการทดสอบปรากฏว่า ไพรเมอร์ CEPL1 สามารถเพิ่มปริมาณได้ในเกือบทุกชนิด ขนาด 400-500 คู่เบส ยกเว้น *C. masuca*, *C. rubens*, *C. triplicata* และ *C. herbacea* (ภาพที่ 16A) ส่วนไพรเมอร์ CEPL2 สามารถเพิ่มปริมาณได้ใน 3 ชนิดคือ *C. lyroglossa*, *Cep. obcordata* และ *Cep. longipes* ขนาด 270 คู่เบส (ภาพที่ 16B)





ภาพที่ 16 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ SCAR ที่ออกแบบมาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ Cep. longipes ไพรเมอร์ CEPL1 (A) และ CEPL2 (B) โดย M = 100 bp DNA ladder (GeneDirex) Lane 1 = C. cardioglossa Lane 2 = C. clavata Lane 3 = C. densiflora Lane 4 = C. lyroglossa Lane 5 = C. masuca Lane 6 = C. pulchra Lane7 = C. rosea Lane 8 = C. rubens Lane 9 = C. succedanea Lane 10 = C. triplicata Lane 11= C. vestita Lane 12 = C. herbacea Lane 13 = C. rubens "alba" Lane 14 = P. flavus Lane 15 = P. indochinensis Lane 16 = P. mishmensis Lane 17 = P. tankervilleae Lane 18 = P. tankervilleae "alba" Lane 19 = Cep. obcordata Lane 20 = Cep. longipes

ดังนั้นจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ 17 แถบ นำมาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะได้ 44 คู่ โดยผลการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ SCAR ทั้ง 44 คู่ พบว่า ประสบความสำเร็จในการระบุชนิดจำนวน 12 คู่ คือ CHE1, CCL3, CCL4, CCL5, CDE1, CDE2, CDE3, CDE4, CMA3, CMA4, PFL2 และ CEPL1 สามารถใช้แยกกล้วยไม้ได้ 7 ชนิด คือ *C. densiflora*, *C. masuca*, *C. succedanea*, *C. triplicata*, *C. rubens* "alba", *P. flavus* และ *Cep. longipes* และมีไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ คือ PIN1 และ PIN4 ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ใน 2 ชนิด คือ *P. mishmensis* และ *P. indochinensis* เท่านั้น และไพรเมอร์อีก 20 คู่ คือ CTR1, CTR2, CTR3, CRUA1, CRUA2, CRUA3, CRUA4, CRUA5, CSU1, CSU2, CSU3, CSU4, CSU5, CSU8, CLY1, CLY2, CMA2, PFL1, PIN2 และ CEPL2 สามารถเพิ่มปริมาณได้ในหลายชนิด (ตารางที่ 13) นอกจากนี้ยังมีไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในตัวอย่างใดเลยจำนวน 3 คู่ คือ CCL1, CSU6 และ CMA1 และไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในทุกชนิดจำนวน 4 คู่ คือ CTR3, CTR4, CHE2 และ CSU7

ตารางที่ 13 สรุปผลการทดสอบไพรเมอร์ SCAR แสดงขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ในกล้วยไม้แต่ละชนิด

species \ Primer	CTR1	CTR2	CTR3	CRUA1	CRUA2	CRUA3	CRUA4	CRUA5	CHE1	CCL3	CCL4	CCL5	CSU1	CSU2	CSU3	CSU4	CSU5	CSU8	CDE1	CDE2	CDE3	CDE4	CLY1	CLY2	CMA2	CMA3	CMA4	PFL1	PFL2	PIN1	PIN2	PIN4	CEPL1	CEPL2
C. cardioglossa	140	-	800	-	-	600	-	440	850	900	-	-	400 750	450	230	280	250	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400	-
C. clavata	140	-	800	-	-	-	-	-	850	-	-	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	-	-	-	400	-
C. densiflora	140	-	800	-	-	-	-	-	850	-	-	750	-	-	-	-	-	250	300	600	200	450	-	-	-	-	-	320	-	-	-	-	400	-
C. lyroglossa	140	-	800	-	-	-	-	-	850	-	600	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-	400	270	-	-	-	320	-	-	-	-	400	270
C. masuca	140	120	400	-	-	-	-	-	400	700	-	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-	-	-	700	330	420	320	-	-	-	-	-	-
C. pulchar	-	-	800	-	-	-	-	-	850	-	-	-	400 750	450	230	280	250	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	-	-	-	400	-
C. rosea	140	-	800	350	470	600	300	440	850	900	-	-	400 750	-	230	280	250	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400	-
C. rubens	140	-	800	350	470	-	300	440	850	-	-	-	400 750	-	230	280	250	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	-	-	-	-	-
C. succedanea	140	-	800	350	-	-	-	440	850	-	-	-	400 750	450	230	280	250	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	-	-	-	400 500	-
C. triplicata	140	120	800	-	-	-	-	-	400 850	-	-	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-	-	-	700	400	420 470	320	-	-	-	-	-	-
C. vestita	140	-	800	350	-	-	-	440	850	900	-	-	400 750	450	230	280	250	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	-	-	-	400	-
C. herbacea	140	-	400	-	-	-	-	-	400	-	-	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-	-	-	-	330	420 470	320	-	-	-	-	-	-
C. rubens "alba"	140	-	800	350	470	600	300	440	850	700 900	-	-	-	-	230	280	250	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	-	-	-	400	-
P. flavus	140	-	800	-	-	-	-	-	850	-	-	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	240	-	-	-	400	-
P. indochinensis	140	-	800	-	-	-	-	-	850	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	500	700	360	400	-
P. mishmensis	140	-	800	-	-	-	-	-	850	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	500	700	360	400	-
P. tankervilleae	140	-	800	350	-	-	-	-	850	-	-	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	320	-	-	500	-	400	-
P. tankervilleae "alba"	140	-	800	350	-	-	-	-	850	-	-	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	500	-	400	-
Cep. obcordata	140	-	800	-	-	-	-	-	850	-	600	-	-	-	-	-	-	250	-	-	-	-	400	270	-	-	-	320	-	-	-	-	400	270
Cep. longipes	140	-	800	-	-	-	-	-	850	-	600 700	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	400	270	-	-	-	320	-	-	-	-	400	270

หมายเหตุ – หมายถึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ ส่วนกรอบสี่เหลี่ยมสองเส้นแสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะกล้วยไม้เพียงชนิดเดียว

จากตารางที่ 13 จะเห็นได้ว่ามีบางไพรเมอร์ที่สามารถใช้ระบุชนิดได้ ถึงแม้จะสามารถเพิ่มปริมาณได้หลายชนิดก็ตาม เนื่องจากบางชนิดสามารถเพิ่มปริมาณได้ขนาดที่แตกต่างกัน เช่น

- ไพรเมอร์ CHE1 สามารถเพิ่มปริมาณใน *C. masuca* และ *C. herbacea* ขนาด 400 คู่เบส ในขณะที่ชนิดอื่นเพิ่มปริมาณได้ขนาด 850 คู่เบส ยกเว้น *C. triplicata* ที่เพิ่มปริมาณได้ทั้ง 2 ขนาด จึงสามารถใช้แยก *C. triplicata* ได้

- ไพรเมอร์ CCL3 เพิ่มปริมาณใน *C. rubens* “alba” 2 แถบ ขนาด 700 และ 900 คู่เบส ในขณะที่ *C. cardioglossa, C. rosea, C. vestita* มีขนาด 900 คู่เบส และ *C. masuca* ขนาด 700 คู่เบส จึงสามารถใช้แยก *C. rubens* “alba” และ *C. masuca* ได้

- ไพรเมอร์ CCL4 เพิ่มปริมาณได้ใน 3 ชนิด คือ *C. lyroglossa* และ *Cep. obcordata* ขนาด 600 คู่เบส ในขณะที่ *Cep. longipes* เพิ่มปริมาณได้ 2 แถบ ขนาด 600 และ 700 คู่เบส จึงใช้แยก *Cep. longipes* ได้

- ไพรเมอร์ CCL5 สามารถใช้ระบุ *C. densiflora* ได้ เนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณได้เพียงชนิดเดียวขนาด 750 คู่เบส

- ไพรเมอร์ CMA3 เพิ่มปริมาณได้ใน *C. masuca* และ *C. herbacea* ขนาด 330 คู่เบส ในขณะที่ใน *C. triplicata* มีขนาด 400 คู่เบส จึงสามารถใช้ระบุ *C. triplicata* ได้

- ไพรเมอร์ CMA4 เพิ่มปริมาณได้ใน *C. triplicata* และ *C. herbacea* จำนวน 2 แถบ ขนาด 420 และ 470 คู่เบส ในขณะที่ใน *C. masuca* ปรากฏเพียง 1 แถบ ขนาด 420 คู่เบส ดังนั้นจึงสามารถใช้ระบุ *C. masuca* ได้

- ไพรเมอร์ CEPL1 เพิ่มปริมาณใน *C. succedanea* 2 แถบ ขนาด 400 และ 500 คู่เบส ในขณะที่ชนิดอื่น ๆ บางชนิดมีขนาดเพียง 400 คู่เบสเท่านั้น จึงสามารถใช้ระบุ *C. succedanea* ได้

อภิปรายผล

1. การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

ผลการสกัดดีเอ็นเอกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้วิธี CTAB ที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987) พบว่า สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มีลักษณะใสไม่มีสี และเมื่อนำมาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณมากและมีขนาดมากกว่า 10,000 คู่เบส ยกเว้นบางตัวอย่างที่ได้สารละลายดีเอ็นเอสีน้ำตาลและมีลักษณะเป็นปื้น ซึ่งเป็นผลมาจากการแตกหักของดีเอ็นเอเป็นชิ้นเล็ก ๆ จำนวนมากในขั้นตอนการดึงโปรตีน นอกจากนี้ในขั้นตอนการบดตัวอย่างใบนั้นทำได้ยากมาก เนื่องจากใบกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นมีขนาดใหญ่ และมีเส้นใบที่แข็งและหนา ทำให้ต้องใช้ไนโตรเจนเหลวจำนวนมากเพื่อป้องกัน

การเกิดสารประกอบประเภทฟีนอล ซึ่งกระบวนการออกซิเดชันของสารประเภทนี้จะทำให้ดีเอ็นเอที่ได้มีสีน้ำตาล (สุชาดา สุขหร่อง, 2553) รวมถึงหากมีการสร้างสารประกอบฟีนอล พอลิแซ็กคาไรด์ และสารทุติยภูมิอื่น ๆ จะทำให้ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งส่งผลต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอนต่อไปได้ (Azmat et al., 2012)

รายงานการศึกษาการสกัดดีเอ็นเอในใบพืชที่แข็งและมีเส้นใยมาก เช่น อินทผาลัม ก็มีรายงานการใช้ไนโตรเจนเหลวในระหว่างการบดตัวอย่างใบ ซึ่งจะช่วยให้สามารถบดใบอินทผาลัมได้ง่าย รวมถึงสามารถป้องกันการเกิดสารประกอบต่าง ๆ เช่น สารประกอบประเภทพอลิฟีนอลได้ (Mirbahar, Khan, Saeed, Kauser, & Jahan, 2014) นอกจากนี้อาจเติมสารช่วยดูดซับ เช่น polyvinylpyrrolidon (PVP) หรือ bovine serum albumin (BSA) เพิ่มเติม เพื่อลดปริมาณสารกลุ่มพอลิฟีนอลและเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอมากและมีคุณภาพดี (สุชาดา สุขหร่อง, 2553) โดยวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ CTAB ซึ่งดัดแปลงมาจาก Doyle และ Doyle (1987) เป็นวิธีที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากใบของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นเนื่องจากวิธีการนี้มีการดัดแปลงให้สามารถกำจัดสารประกอบพวกพอลิฟีนอล พอลิแซ็กคาไรด์ รวมไปถึงสารทุติยภูมิต่าง ๆ ได้ (Azmat et al., 2012)

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

2.1 การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ SRAP ที่เหมาะสมจาก 100 คู่ โดยการเลือกตัวแทนมาจากสกุลละ 1 ตัวอย่างคือ *C. densiflora*, *P. flavus* และ *Cep. obcordata* เพื่อคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในกล้วยไม้ทั้ง 3 สกุล พบว่า มีเพียง 18 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณและให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic band) โดยไพรเมอร์ forward M2 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น TGA GTC CAA ACC GGA AG สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น อีกทั้งยังสามารถเพิ่มปริมาณได้ในกล้วยไม้สกุลหวายชนิด *Dendrobium officinale* (G. Ding et al., 2008) และชนิด *Dendrobium loddigesii* (Cai et al., 2011) อีกด้วย แสดงว่าไพรเมอร์นี้มีความเหมาะสมต่อการใช้ศึกษาในกล้วยไม้

2.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SRAP

ผลการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ SRAP 18 คู่ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นทั้ง 20 ตัวอย่าง โดยมีขนาดประมาณ 100-1,500 คู่เบส จำนวน 565 แถบ เป็นแถบที่แตกต่างจำนวน 562 แถบ คิดเป็น 99.45% เนื่องจากเป็นการศึกษาในกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นในระดับสกุลถึง 3 สกุล จึงทำให้เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการศึกษาในพืชอื่น ๆ เช่น พืชสกุลหวาย (*Dendrobium*) ที่มีเปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง 97% (Ferriol et al., 2003) พืชสกุลสนเขา (*Pinus*) 94.8% (Xie, Liu, Wang, & Li, 2015) ซึ่งเป็นการศึกษาในระดับชนิด หรือแม้แต่การศึกษาในระดับภายในชนิดเดียวกัน เช่น กล้วยไม้สกุลหวายชนิด *Dendrobium officinale* ที่มีเปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง

เพียง 51.68% (G. Ding et al., 2008) หญ้าฝรั่น (*Crocus sativus*) 43.88% (Babaei et al., 2014) ยี่หร่า (*Cuminum cyminum*) 92.3% (Bhatt, Kumar, Patel, & Solanki, 2017) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความหลากหลายในระดับสกุลและชนิดแล้ว พบว่ากล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมาก ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาโดยใช้เครื่องหมาย SRAP ในระดับที่สูงกว่าระดับสกุลเป็นครั้งแรก และผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย SRAP มีความเหมาะสมสำหรับใช้ศึกษาความสัมพันธ์ในกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น นอกจากนี้ การพิจารณาค่า PIC เป็นอีกวิธีการหนึ่งสำหรับการตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากค่า PIC สามารถใช้ในการระบุหรือบ่งบอกถึงความสามารถของไพรเมอร์ในการสร้างพอลิมอฟิซึมในประชากรโดยขึ้นกับจำนวนของแอลลีลและการกระจายความถี่ของแอลลีล โดยค่า PIC ของเครื่องหมายแบบข่มสมบูรณ์ (dominant markers) จะมีค่าสูงสุดเพียง 0.5 เท่านั้น (Chesnokov & Artemyeva, 2015)

3. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วย phylogenetic tree

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ (Genetic relationship) จากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) ตามวิธีของ Jaccard (1908) พบว่า กล้วยไม้ทั้ง 3 สกุลมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.06 - 0.59 เฉลี่ย 0.149 ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับการศึกษาโดยใช้เครื่องหมาย SRAP ในพืชอื่นๆ (Jehan, Vashishtha, Yadav, & Lakhanpaul, 2014) เนื่องจากกล้วยไม้ในกลุ่มเอื้องน้ำต้นประกอบไปด้วย 3 สกุล ทำให้มีความหลากหลายที่มากกว่าการศึกษาภายในสกุลหรือชนิดเดียวกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมภายในแต่ละสกุล พบว่า สกุล *Calanthe* มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมเฉลี่ยเท่ากับ 0.148 มีค่าน้อยที่สุดที่ 0.06 ระหว่าง *C. cardioglossa* และ *C. masuca* เนื่องจากทั้ง 2 ชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ต่างกัน คือ *C. cardioglossa* กลีบปากแยกกับเส้าเกสร และลำลูกกล้วย (pseudobulb) มีลักษณะคล้ายรูปไข่ สามารถมองเห็นได้ชัดเจน ในขณะที่ใน *C. masuca* นั้นกลีบปากเชื่อมติดเส้าเกสร ลำลูกกล้วยซ่อนอยู่ใต้ใบประดับ ทำให้มองเห็นได้ไม่ชัดเจน (Pedersen et al., 2014) และจากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนิวเคลียสและคลอโรพลาสต์ก็จัดอยู่ในกลุ่มที่ต่างกัน (Zhai et al., 2014) ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมสูงสุดภายในกลุ่มคือ 0.40 ระหว่าง *C. rubens* และ *C. rosea* เนื่องจากทั้ง 2 ชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันหลายอย่าง เช่น ลำลูกกล้วยรูปไข่ มองเห็นได้ชัดเจน ช่อดอกมีขนปกคลุมตลอดช่อ floral bract ติดทนนาน และดอกมีสีชมพูคล้ายกัน (Pedersen et al., 2014) และที่น่าสนใจคือ ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่าง 2 ชนิดนี้มีค่ามากกว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง *C. rubens* กับ *C. rubens* “alba” จึงอาจเป็นไปได้ที่ *C. rubens* “alba” อาจเป็นชนิดอื่นที่เกิดจากการจำแนกในขณะการเก็บตัวอย่างที่ผิดพลาด เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับ *C. rubens* เป็นอย่างมาก แตกต่างกันเพียงแค่สีดอกที่เป็นสีขาวเท่านั้น ซึ่งในปัจจุบันมีการใช้ลักษณะของสีดอกในการจัดจำแนกมากขึ้น มีการทำแผนภูมิแท่งระบุสีดอก (color

histogram) แต่อย่างไรก็ตามการใช้สีดอกในการจัดจำแนกเพียงอย่างเดียวยังไม่ได้รับการยอมรับ จะต้องใช้ลักษณะอื่น ๆ ประกอบการจัดจำแนกด้วย (Wäldchen, Rzanny, Seeland, & Mäder, 2018) ดังนั้นจึงอาจจะระบุ *C. rubens* “alba” เป็น *Calanthe* sp. ไปก่อนจนกว่าจะมีข้อมูลที่แน่ชัดจากการศึกษาด้านอื่น ๆ เช่น การทำบาร์โค้ด หรือเครื่องหมายโมเลกุลอื่น ๆ

ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมภายในสกุล *Phaius* มีค่าเฉลี่ย 0.259 ต่ำสุดอยู่ที่ 0.12 ระหว่าง *P. flavus* และ *P. tankervilleae* ซึ่งทั้งสองชนิดนี้จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์และนิวเคลียสถูกจัดให้อยู่คนละกลุ่ม และเมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาก็พบว่า *P. flavus* จะมี floral bract แบบติดทนนาน ในขณะที่ *P. tankervilleae* จะมี floral bract ที่หลุดร่วงได้ง่าย (Zhai et al., 2014) และค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมสูงสุดในสกุล *Phaius* อยู่ที่ 0.59 ระหว่าง *P. indochinensis* และ *P. mishmensis* ซึ่งทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก เช่น floral bract หลุดร่วงได้ง่าย ช่อดอกเจริญทางด้านข้างของลำต้น ยกเว้นความยาวของเดือย โดย *P. indochinensis* จะมีเดือยยาวน้อยกว่า 6 มิลลิเมตร ในขณะที่ *P. mishmemsis* เดือยจะยาวมากกว่า 10 มิลลิเมตร (Pedersen et al., 2014) ในขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่าง *P. tankervilleae* และ *P. tankervilleae* “alba” มีค่าไม่สูงมากนักแต่ยังคงอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ดังนั้นในอนาคตหากมีข้อมูลเกี่ยวกับ *P. tankervilleae* และ *P. tankervilleae* “alba” มากขึ้น อาจจะจำแนกกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิดนี้ให้เป็นคนละชนิดกันได้ ส่วนสกุล *Cephalantheropsis* ทั้ง 2 ชนิด มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ที่ 0.33 ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมสอดคล้องกับจำนวนชนิดที่นำมาใช้ศึกษาในแต่ละสกุล

เมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้วิธี UPGMA พบว่า สามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมออกได้เป็น 5 กลุ่ม (clade) ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม 0.158 โดยกลุ่มแรกที่แยกออกมาประกอบด้วย 3 ชนิดในสกุล *Calanthe* คือ *C. masuca*, *C. triplicata* และ *C. herbacea* ซึ่งทั้ง 3 ชนิดนี้มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันเช่น floral bract ติดทนนาน กลีบปากเชื่อมติดกับเส้าเกสร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในนิวเคลียสและคลอโรพลาสต์ของ Zhai et al. (2014) ซึ่งได้จัดกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิดนี้ไว้ในกลุ่มเดียวกัน (*Calanthe* section. *Calanthe*)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยกล้วยไม้ในสกุล *Calanthe* จำนวน 5 ชนิด คือ *C. rosea*, *C. rubens*, *C. vestita*, *C. succedanea* และ *C. rubens* “alba” โดยกล้วยไม้ในกลุ่มนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันหลายอย่าง เช่น ลำลูกกล้วยรูปไข่ มองเห็นได้ชัดเจน floral bract ติดทนนาน เดือยดอกชี้ไปด้านหน้า และมีขนปกคลุม (Pedersen et al., 2014)

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มของกล้วยไม้สกุล *Phaius* ทั้ง 5 ตัวอย่าง คือ *P. flavus*, *P. indochinensis*, *P. mishmensis*, *P. tankervilleae* และ *P. tankervilleae* “alba” ซึ่งกล้วยไม้ในกลุ่มนี้เป็นกล้วยไม้ในสกุลเดียวกัน มีลักษณะถิ่นที่อยู่ที่คล้ายคลึงกัน รวมไปถึงการที่โคนกลีบปากยืดออกเป็นถุงหรือเป็นเดือยสั้น ๆ กลีบปากแผ่ออกคล้ายปากแตรที่เหมือนกัน (อบฉันท์ ไทยทอง, 2543)

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ประกอบด้วยกล้วยไม้จาก 2 สกุลคือ สกุล *Calanthe* และสกุล *Cephalantheropsis* โดยสกุล *Calanthe* ประกอบด้วย *C. clavata*, *C. densiflora*, *C. lyroglossa* และ *C. pulchra* โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน คือ กลีบปากเชื่อมติดกับเส้าเกสร มีเดือย และดอกมีสีเหลืองขนาดเล็ก ในขณะที่สกุล *Cephalantheropsis* คือ *Cep. obcordata* และ *Cep. longipes* กลีบปากไม่มีเดือย แต่ 2 สกุลนี้เป็นกลุ่มที่มี floral bract หลุดร่วงได้ง่ายเหมือนกัน ผลการจัดกลุ่มนี้สอดคล้องกับรายงานของ Zhai et al. (2014) ที่พบว่า *Cephalantheropsis* เป็น sister group ของ *Calanthe* section. *Syloglossum* (*C. clavata*, *C. densiflora* และ *C. lyroglossa*) และรายงานของ Chase et al. (2015) ซึ่งจัดให้ *Cephalantheropsis* เป็น sister clade ของ *C. clavata* และ *C. densiflora* ด้วย

กลุ่มที่ 5 มีเพียง *C. cardioglossa* เพียงชนิดเดียว ซึ่งแยกออกมาจากกลุ่มของ *Calanthe* ชนิดอื่น ๆ โดย *C. cardioglossa* มีลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์คือ มีเส้น (strong vein) อยู่ตรงปลายกลีบปาก (Kurzweil, 2010) แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลการศึกษาในกล้วยไม้ชนิดนี้ยังมีอยู่น้อย จึงต้องมีการใช้เทคนิคอื่น ๆ ศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้สามารถจำแนกกล้วยไม้ชนิดนี้ได้อย่างแม่นยำมากขึ้น

4. การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR

4.1 การตัดแถบดีเอ็นเอและการโคลน

จากการตัดแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อกล้วยไม้แต่ละชนิดพบว่าแถบดีเอ็นเอ 77 แถบที่ตัดได้เมื่อนำมาโคลน ประสบความสำเร็จเพียงแค่ 17 แถบ คิดเป็น 22.07% โดยการโคลนประสบผลสำเร็จน้อยอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอที่ตัดมาจากอะกาโรสเจลมีน้อย เนื่องจากในขั้นตอนการตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสไม่สามารถตรวจสอบได้ ทำให้การคำนวณอัตราส่วนระหว่างเวคเตอร์ต่อผลผลิตพีซีอาร์นั้นทำได้ยาก โอกาสที่พลาสมิดจะได้รับชิ้นส่วนดีเอ็นเอในขั้นตอนการทำดีเอ็นเอสายผสมก็น้อยลงตามไปด้วย นอกจากนี้ในขั้นตอนการถ่ายดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งใช้วิธีการ heat shock นั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นรูปร่างและขนาดของพลาสมิด ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ หรือวิธีที่ทำให้เซลล์เป็น competent (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552) ดังนั้นจึงยังไม่สามารถโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมดที่ตัดมาได้

4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลีใต้ โดย 1 แถบดีเอ็นเอเลือกส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 2-3 โคลน แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล Genbank พบว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค SRAP เป็นส่วนของยีน ซึ่งสอดคล้องกับการพัฒนาเครื่องหมาย SRAP ของ Li and Quiros (2001) ที่ออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้จับได้กับส่วนของยีน โดยจากการเปรียบเทียบข้อมูลพบว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ SRAP ทั้ง 17 แถบ มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ mRNA ของกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium catenatum*), ถั่วลิสงป่า (*Arachis duranensis*), กล้วยไม้ *Erycina pusilla*, ผักวอเตอร์เครส (*Eutrema salsugineum*), กล้วยไม้ *Phalaenopsis equestris*, ข้าว (*Oryza sativa indica*), ฟักทองอเมริกัน (*Cucurbita moschata*), องุ่น (*Vitis vinifera*), ไรสองจุด (*Tetranychus urticae*), ปลาซิวข้าวสารญี่ปุ่น (*Oryzias latipes*), เชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium malariae*) และทาร์เซียร์ฟิลิปปินส์ (*Carlito syrichta*) ซึ่งการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (Blast: Basic local alignment search tool) เป็นการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันในช่วงสั้นๆ (McGinnis & Madden, 2004) ดังนั้นหากเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์จากสิ่งมีชีวิตชนิดใหม่ที่ยังไม่มีข้อมูลอยู่ในฐานข้อมูล โปรแกรมจะพยายามหาลำดับนิวคลีโอด์ที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด ซึ่งจะแสดงผลออกเป็นชนิดอื่นที่มีอยู่ในฐานข้อมูลแทน

4.3 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

จากการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะจำนวน 44 คู่ พบว่าประสบความสำเร็จในการระบุชนิดจำนวน 12 คู่ คือ CHE1, CCL3, CCL4, CCL5, CDE1, CDE2, CDE3, CDE4, CMA3, CMA4, PFL2 และ CEPL1 โดยสามารถใช้ตรวจสอบกล้วยไม้ 7 ชนิด คือ *C. densiflora*, *C. masuca*, *C. succedanea*, *C. triplicata*, *C. rubens* “alba”, *P. flavus* และ *Cep. longipes* และไพรเมอร์ที่สามารถใช้ระบุ *P. mishmensis* และ *P. indochinensis* ได้ คือ PIN1 และ PIN4 และไพรเมอร์อีก 20 คู่ คือ CTR1, CTR2, CTR3, CRUA1, CRUA2, CRUA3, CRUA4, CRUA5, CSU1, CSU2, CSU3, CSU4, CSU5, CSU8, CLY1, CLY2, CMA2, PFL1, PIN2 และ CEPL2 สามารถเพิ่มปริมาณได้ในหลายชนิด แต่มีขนาดที่แตกต่างกัน ซึ่งการที่ไพรเมอร์ SCAR สามารถเพิ่มปริมาณได้ในหลายตัวอย่างอาจเกิดจากความแตกต่างของลำดับเบสเกิดขึ้นที่บริเวณที่ไพรเมอร์เดิมจับทำให้เมื่อออกแบบไพรเมอร์ SCAR จึงไม่ให้ผลที่แตกต่าง (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552) นอกจากนี้ในพืชที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก เครื่องหมาย SCAR ก็อาจจะไม่สามารถใช้ระบุชนิดได้ แต่ใช้ระบุเป็นกลุ่มตามกลุ่มของความสัมพันธ์แทนได้ ซึ่งจากรายงานการพัฒนาเครื่องหมาย SCAR ในพืชหลายชนิด เช่น แตงกวา พบว่าเมื่อทดสอบไพรเมอร์ SCAR แล้วให้ผลเป็น 1 แถบดีเอ็นเอเพียง 52% (Horejsi, Box, & Staub, 1999) หรือรายงานการพัฒนาในถั่ว (*Cyamopsis tetragonoloba*) พบว่า จากไพรเมอร์จำนวน 20 คู่ ประสบความสำเร็จหรือจำเพาะกับชนิดและถิ่นที่อยู่เพียง 2 คู่ แสดงให้เห็นว่า การพัฒนา

เครื่องหมาย SCAR จากแถบที่แตกต่างจากเครื่องหมายชนิดอื่น เช่น RAPD หรือ SRAP อาจให้ผลที่ไม่จำเพาะเจาะจง เนื่องจากตำแหน่งการจับของไพรเมอร์อาจไม่ใช่ตำแหน่งที่ทำให้เกิดความแตกต่าง หรืออาจเป็นผลมาจากความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ในจีโนมที่ใกล้เคียงกันมาก (P. Sharma et al., 2014)

จากตารางที่ 13 จะพบว่าถ้าตรวจสอบกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ SCAR ร่วมกัน 2 คู่ จะสามารถระบุชนิดของกล้วยไม้ได้เพิ่มขึ้น เช่น ไพรเมอร์ CRUA3 ร่วมกับ CSU2 จะสามารถใช้ระบุ *C. cardioglossa* ได้ ไพรเมอร์ CRUA3 ร่วมกับ CRUA4 สามารถใช้ระบุ *C. cardioglossa* และ *C. rubens* ได้ ไพรเมอร์ CRUA4 ร่วมกับ CCL3 สามารถใช้ระบุ *C. rosea* และ *C. rubens* “alba” ไพรเมอร์ CTR2 ร่วมกับ CTR3 สามารถใช้ระบุ *C. masuca* และ *C. triplicata* ได้ ไพรเมอร์ CCL3 ร่วมกับ CRUA2 สามารถใช้ระบุ *C. rosea* และ *C. rubens* “alba” นอกจากนี้ยังสามารถใช้ระบุกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด คือ *C. masuca*, *C. triplicata* และ *C. herbacea* ได้ โดยการใช้ไพรเมอร์ CHE1 ร่วมกับ CMA2 และ CMA4 ไพรเมอร์ CTR2 ร่วมกับ CHE1 และไพรเมอร์ CMA3 ร่วมกับ CMA4 (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 การระบุชนิดกล้วยไม้จากการรวมไพรเมอร์ SCAR

ไพรเมอร์	**ชนิดของกล้วยไม้ที่ระบุได้**	**ขนาด (คู่เบส)**
CRUA3+CSU2	*C. cardioglossa*	600 และ 450
CTR2+CHE1	*C. masuca*	120 และ 400
	C. herbacea	400
	C. triplicata	120, 400 และ 850
CRUA3+CRUA4	*C. cardioglossa*	600
	C. rubens	300
CRUA4+CCL3	*C. rosea*	300 และ 900
	C. rubens “alba”	300, 700 และ 900
CHE1+CMA2	*C. masuca*	400 และ 700
	C. triplicata	400, 700 และ 850
	C. herbacea	400
CHE1+CMA4	*C. masuca*	400 และ 420
	C. triplicata	400, 420, 470 และ 850
	C. herbacea	400, 420 และ 470
CTR2+CTR3	*C. masuca*	120 และ 400
	C. triplicata	120 และ 800
CCL3+CRUA2	*C. rosea*	470 และ 900
	C. rubens “alba”	470, 700 และ 900

ไพรเมอร์	ชนิดของกล้วยไม้ที่ระบุได้	ขนาด (คู่เบส)
CMA3+CMA4	*C. masuca*	330 และ 420
	C. triplicata	400, 420 และ 470
	C. herbacea	330, 420 และ 470

บทที่ 5 บทสรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบของกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้วิธี CTAB ที่ดัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (1987) สามารถใช้ในการสกัดกล้วยไม้กลุ่มนี้ได้ทุกตัวอย่าง ซึ่งให้ปริมาณมากและดีเอ็นเอมีคุณภาพดีเพียงพอสำหรับการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

2. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค SRAP

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นโดยใช้เทคนิค SRAP สามารถแบ่งกล้วยไม้กลุ่มนี้ออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มของสกุล *Calanthe* 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม *Phaius* 1 กลุ่ม *Calanthe* ร่วมกับ *Cephalantheropsis* 1 กลุ่ม กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้นทั้ง 3 สกุล เป็นแบบ monophyletic group ในขณะที่เมื่อพิจารณาภายในแต่ละสกุลพบว่า สกุล *Calanthe* เป็น polyphyletic group ที่มีสกุล *Cephalantheropsis* เป็น sister taxa

3. การพัฒนาและทดสอบเครื่องหมาย SCAR

การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR ที่จำเพาะต่อกล้วยไม้กลุ่มนี้จำนวน 44 คู่ไพรเมอร์ ประสบความสำเร็จในการระบุชนิดจำนวน 12 คู่ สำหรับระบุกล้วยไม้ 7 ชนิด คือ *C. densiflora*, *C. masuca*, *C. succedanea*, *C. triplicata*, *C. rubens* “alba”, *P. flavus* และ *Cep. longipes* ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ 2 ชนิด (*P. indochinensis* และ *P. mishmensis*) จำนวน 2 คู่ และไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณได้ในหลายชนิด แต่มีขนาดที่แตกต่างกันจำนวน 20 คู่ โดยหากใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ร่วมกันจะสามารถใช้ระบุชนิดของกล้วยไม้ได้เพิ่มขึ้นอีกจำนวน 4 ชนิด คือ *C. cardioglossa*, *C. rosea*, *C. rubens*, และ *C. herbacea*

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อมูลสำหรับ *C. rubens* “alba” ที่ได้จากเครื่องหมาย SRAP ยังไม่สอดคล้องกับการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยา ควรศึกษาโดยการใช้วิธีอื่น ๆ เพิ่มเติม
2. การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR จากเครื่องหมาย SRAP ยังไม่สามารถพัฒนาเครื่องหมายที่มีความจำเพาะได้ในทุกชนิด ควรใช้การศึกษาจากเครื่องหมายชนิดอื่น ๆ หรือโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพิ่มเติม เพื่อให้สามารถพัฒนาเครื่องหมาย SCAR ที่ใช้แยกกล้วยไม้ได้ครบทุกชนิด
3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์มากกว่า 1 คู่ ซึ่งอาจทำปฏิกิริยาแยกกันหรือทำพร้อมกันแบบ multiplex PCR จะช่วยในการระบุกล้วยไม้บางชนิดได้เพิ่มขึ้น

บรรณานุกรม

ชนินทร์ โถรัตน์. (2541). บันทึกธรรมชาติกล้วยไม้ไทย = *Wild orchids of Thailand*. กรุงเทพฯ: อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.

ชวลิต ดาบแก้ว. (2546). การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สำหรับผู้แรกเริ่ม (พิมพ์ครั้งที่ 3. ed.). กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ราชบัณฑิตยสถาน. (2547). อนุกรมวิธานพืช อักษร ก ฉบับราชบัณฑิตยสถาน (พิมพ์ครั้งที่ 2. ed.). กรุงเทพฯ: ราชบัณฑิตยสถาน.

สุชาดา สุขหร่อง. (2553). ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร : วิธีวิเคราะห์ การใช้ประโยชน์ ตัวอย่างจากงานวิจัย และเทคนิคพื้นฐานทางชีววิทยาโมเลกุล. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพ ฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อบฉันท์ ไทยทอง. (2543). กล้วยไม้เมืองไทย. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน.

อาภรณ์ อุดมศิลป์. (2552). กล้วยไม้ป่า เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง. กรุงเทพฯ: สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.

Aneja, B., Yadav, N. R., Chawla, V., & Yadav, R. C. (2012). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular marker system and its applications in crop improvement. *Molecular Breeding, 30*(4), 1635-1648. doi: 10.1007/s11032-012-9747-2

Angiosperm Phylogeny Group. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society, 161*(2), 105-121.

Azmat, M. A., Khan, I. A., Cheema, H. M. N., Rajwana, I. A., Khan, A. S., & Khan, A. A. (2012). Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of Mangifera indica L. *Journal of Zhejiang University. Science. B, 13*(4), 239-243. doi: 10.1631/jzus.B1100194

Babaei, S., Talebi, M., Bahar, M., & Zeinali, H. (2014). Analysis of genetic diversity among saffron (Crocus sativus) accessions from different regions of Iran as revealed by SRAP markers. *Scientia Horticulturae, 171*, 27-31. doi: 10.1016/j.scienta.2014.03.033

Bhatt, J., Kumar, S., Patel, S., & Solanki, R. (2017). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers based genetic diversity analysis of cumin

genotypes. *Annals of Agrarian Science, 15*(4), 434-438. doi: 10.1016/j.aasci.2017.09.001

Cai, X., Feng, Z., Zhang, X., Xu, W., Hou, B., & Ding, X. (2011). Genetic diversity and population structure of an endangered Orchid (Dendrobium loddigesii Rolfe) from China revealed by SRAP markers. *Scientia Horticulturae, 129*(4), 877-881. doi: 10.1016/j.scienta.2011.06.001

Chase, W. M., Cameron, M. K., Freudenstein, V. J., Pridgeon, M. A., Salazar, G., Berg, C., & Schuiteman, A. (2015). An updated classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society, 177*(2), 151-174. doi: doi:10.1111/boj.12234

Cheng, J., Long, Y., Khan, M. A., Wei, C., Fu, S., & Fu, J. (2015). Development and significance of RAPD-SCAR markers for the identification of Litchi chinensis Sonn. by improved RAPD amplification and molecular cloning. *Electronic Journal of Biotechnology, 18*(1), 35-39. doi: 10.1016/j.ejbt.2014.11.004

Chesnokov, Y. V., & Artemyeva, A. M. (2015). Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agricultural Biology, 50*(5), 571-578. doi: 10.15389/agrobiology.2015.5.571rus 10.15389/agrobiology.2015.5.571eng

Dhanya, K., Syamkumar, S., Siju, S., & Sasikumar, B. (2011). Sequence characterized amplified region markers: A reliable tool for adulterant detection in turmeric powder. *Food Research International, 44*(9), 2889-2895. doi: 10.1016/j.foodres.2011.06.040

Ding, G., Zhang, D., Ding, X., Zhou, Q., Zhang, W., & Li, X. (2008). Genetic variation and conservation of the endangered Chinese endemic herb Dendrobium officinale based on SRAP analysis. *Plant Systematics and Evolution, 276*(3-4), 149-156. doi: 10.1007/s00606-008-0068-1

Ding, W., Cao, Z., & Cao, L. (2009). Molecular analysis of grass carp (Ctenopharyngodon idella) by SRAP and SCAR molecular markers. *Aquaculture International, 18*(4), 575-587. doi: 10.1007/s10499-009-9277-z

Dong, P., Wei, Y.-M., Chen, G.-Y., Li, W., Wang, J.-R., Nevo, E., & Zheng, Y.-L. (2010). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) of wild emmer wheat (Triticum dicoccoides) in Israel and its ecological association. *Biochemical Systematics and Ecology, 38*(1), 1-11. doi: https://doi.org/10.1016/j.bse.2009.12.015

Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A Rapid Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemistry Bulletin, 19*(11-15).

Ferriol, M., Picó, B., de Córdova, P. F., & Nuez, F. (2004). Molecular Diversity of a Germplasm Collection of Squash (Cucurbita moschata) Determined by SRAP and AFLP Markers. *Crop Science, 44*, 653-664. doi: 10.2135/cropsci2004.6530

Ferriol, M., Pico, B., & Nuez, F. (2003). Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers. *Theor Appl Genet, 107*(2), 271-282. doi: 10.1007/s00122-003-1242-z

Horejsi, T., Box, M. J., & Staub, E. J. (1999). Efficiency of randomly amplified polymorphic DNA to sequence characterized amplified region marker conversion and their comparative polymerase chain reaction sensitivity in cucumber. *Journal of American Society of Horticulture Science, 124*(2), 128-135.

Huang, C. Q., Liu, G. D., Bai, C. J., Wang, W. Q., & Tang, J. (2014). Application of SRAP markers in the identification of Stylosanthes guianensis hybrids. *Mol Biol Rep, 41*(9), 5923-5929. doi: 10.1007/s11033-014-3467-0

Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles, 44*, 223-270.

Jehan, T., Vashishtha, A., Yadav, S. R., & Lakhanpaul, S. (2014). Genetic diversity and genetic relationships in Hyacinthaceae in India using RAPD and SRAP markers. *Physiol Mol Biol Plants, 20*(1), 103-114. doi: 10.1007/s12298-013-0206-2

Kurzweil, H. (2010). A precursory study of the Calanthe group (Orchidaceae) in Thailand. *Adansonia, 32*(1), 57-107.

Li, G., & Quiros, C. F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical and Applied Genetics, 103*, 455-461.

McGinnis, S., & Madden, T. L. (2004). BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res, 32*(Web Server issue), W20-25. doi: 10.1093/nar/gkh435

Mirbahar, D. A., Khan, S., Saeed, R., Kauser, N., & Jahan, B. (2014). *DNA EXTRACTION AND OPTIMIZATION FROM FIBROUS LEAVES OF SOME DATE PALM CULTIVARS FROM PAKISTAN* (Vol. 4).

Nadeem, M. A., Nawaz, M., A.,, Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., . . . Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment, 32*(2), 261-285. doi: 10.1080/13102818.2017.1400401

Nicholas, K. B., & Nicholas, H. B. J. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. *Distributed by the author. http://www.psc.edu/biomed/genedoc*. doi: citeulike-article-id:6113940

Paran, I., & Michelmore, R. W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet, 85*(8), 985-993. doi: 10.1007/bf00215038

Pedersen, Æ. H., Kurzweil, H., Suddee, S., Vogel, E. F. d., Cribb, J. P., Chantanaorrapint, S., . . . Suwanphakdee, C. (2014). *Flora of Thailand, Volume 12, Part 2: Orchidaceae 2 (Epidendroideae P.P.: Neottieae, Tropideae, Nervilieae, Gastrodieae, Thaieae, Calypsoeae, Arethuseae, Collabieae, Cymbidieae)* (H. B. Thawatchai Santisuk Ed. 2 ed. Vol. 12): Forest Herbarium, Royal Forest Department.

Pridgeon, M. A., Cribb, J. P., Chase, W. M., & Rasmussen, F. (1999). *Genera Orchidacearum Volume 1: Apostasioideae and Cypripedioideae* (Vol. 1): Oxford University Press Inc.

Punjansing, T., Chaichanachap, N., Sanitchon, J., Pinta, W., & Nakkuntod, M. (2017). *Genetic diversity of some species in the genus Calanthe analyzed by RAPD markers*.

Qian, X., Wang, C. X., & Tian, M. (2013). Genetic diversity and population differentiation of Calanthe tsoongiana, a rare and endemic orchid in China. *Int J Mol Sci, 14*(10), 20399-20413. doi: 10.3390/ijms141020399

Rohlf, F. (1988). *NTSYS-pc - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* (Vol. 2.1).

Roldán-Ruiz, I., Dendauw, J., Van Bockstaele, E., Depicker, A., & De Loose, M. (2000). AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (Lolium spp.). *Molecular Breeding, 6*(2), 125-134. doi: 10.1023/A:1009680614564

Shao, Q. S., Guo, Q. S., Deng, Y. M., & Guo, H. P. (2010). A comparative analysis of genetic diversity in medicinal Chrysanthemum morifolium based on morphology, ISSR and SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology, 38*(6), 1160-1169. doi: https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.11.002

Sharma, A. D., Gill, P. K., & Singh, P. (2002). DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Molecular Biology Reporter, 20*(4), 415-415. doi: 10.1007/BF02772129

Sharma, P., Kumar, V., Raman, K. V., & Tiwari, K. (2014). A set of SCAR markers in cluster bean (<i>Cyamopsis tetragonoloba</i> L. Taub) genotypes. *Advances in Bioscience and Biotechnology, 05*(02), 131-141. doi: 10.4236/abb.2014.52017

Sneath, P. H., & Sokal, R. R. (1973). *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco: W. H. Freeman.

Suman, A., Kimbeng, C. A., Edmé, S. J., & Veremis, J. (2008). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers for assessing genetic relationships and diversity in sugarcane germplasm collections. *Plant Genetic Resources, 6*(3), 222-231. doi: 10.1017/S147926210899420X

Sun, S., Feng, H., Chen, Z., Hu, K., & Zhang, L. (2016). The first genetic linkage map of Hypsizigus marmoreus based on SCAR marker. *Chiang Mai Journal of Science, 43*, 503-510.

Sun, Y. W., Liao, Y. J., Hung, Y. S., Chang, J. C., & Sung, J. M. (2011). Development of ITS sequence based SCAR markers for discrimination of Paphiopedilum armeniacum, Paphiopedilum micranthum, Paphiopedilum delenatii and their hybrids. *Scientia Horticulturae, 127*(3), 405-410. doi: https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.10.009

Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2002). Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics, Chapter 2*, Unit 2.3. doi: 10.1002/0471250953.bi0203s00

Wäldchen, J., Rzanny, M., Seeland, M., & Mäder, P. (2018). Automated plant species identification—Trends and future directions. *PLOS Computational Biology, 14*(4), e1005993. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005993

Wang, S. H., Li, Y., Li, Z. Q., Chang, L., & Li, L. (2015). Identification of an SCAR marker related to female phenotype in Idesia polycarpa Maxim. *Genet Mol Res, 14*(1), 2015-2022. doi: 10.4238/2015.March.20.11

Xie, Q., Liu, Z., Wang, S., & Li, Z. (2015). Genetic diversity and phylogenetic relationships among five endemic Pinus taxa (Pinaceae) of China as revealed by SRAP markers. *Biochemical Systematics and Ecology, 62*, 115-120. doi: https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.08.005

Xing, P. Y., Liu, T., Song, Z. Q., & Li, X. F. (2016). Genetic diversity of Toona sinensis Roem in China revealed by ISSR and SRAP markers. *Genet Mol Res, 15*(3). doi: 10.4238/gmr.15038387

Youssef, M., James, A. C., Rivera-Madrid, R., Ortiz, R., & Escobedo-GraciaMedrano, R. M. (2011). Musa genetic diversity revealed by SRAP and AFLP. *Mol Biotechnol, 47*(3), 189-199. doi: 10.1007/s12033-010-9328-8

Zhai, J. W., Zhang, G. Q., Li, L., Wang, M., Chen, L. J., Chung, S. W., . . . Liu, Z. J. (2014). A new phylogenetic analysis sheds new light on the relationships in the Calanthe alliance (Orchidaceae) in China. *Mol Phylogenet Evol, 77*, 216-222. doi: 10.1016/j.ympev.2014.04.005

Zhao, W., Fang, R., Pan, Y., Yang, Y., Chung, J., Chung, I., & Park, Y. (2009). Analysis of genetic relationships of mulberry (Morus L.) germplasm using sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. *African Journal of Biotechnology, 8*(11), 2604-2610.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก ตัวอย่างกล้วยไม้ที่ใช้ในงานวิจัย

Calanthe cardioglossa Schltr.

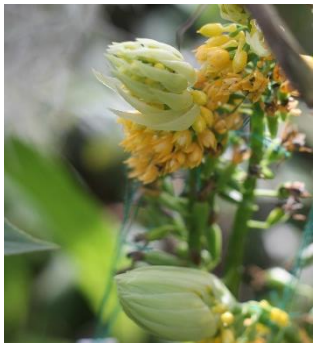
Calanthe clavata Lindl.

ที่มา : http://siamensis.org/node/34817

Calanthe densiflora Lindl.

ที่มา : http://www.biora.ru/modules.

php?name=invitro&file=spec1&sid=11379&gid=869&fid=493



Calanthe. lyroglossa Rchb. f.

Calanthe masuca (D. Don) Lindl.

Calanthe pulchra (Blume) Lindl.

ที่มา : http://www.dnp.go.th/botany/detail.aspx?

wordsnamesci=Calanthe0pulchra0(Blume)0Lindl.

ภาพที่ 17 กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น

Calanthe. rosea (Lindl.) Benth.

Calanthe. rubens Ridl.

Calanthe succedanea Gagnep.

ที่มา : http://www.orchidspecies.com/calsuccedeana.htm

Calanthe triplicata (Willemet) Ames.

ที่มา : http://www.plantsrescue.com/calanthe-triplicata/

Calanthe vestita Lindl.

ที่มา : http://global.orquivalle.com/product/calanthe-vestita/

Calanthe herbacea Lindl.

ที่มา : http://orchids.wikia.com/wiki/Calanthe_herbacea?file=Calanthe_herbacea.jpg

ภาพที่ 17 กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น (ต่อ)

Phaius flavus (Blume) Lindl.

ที่มา : http://www.qsbg.org/Database/Botanic_Book%20full%20option/search_detail.asp?botanic_id=2008

Phaius indochinensis Seidenf. & Ormerod.

Phaius mishmensis (Lindl. & Paxton) Rchb.f.

Phaius tankervilleae (Banks ex L'Her.) Blume

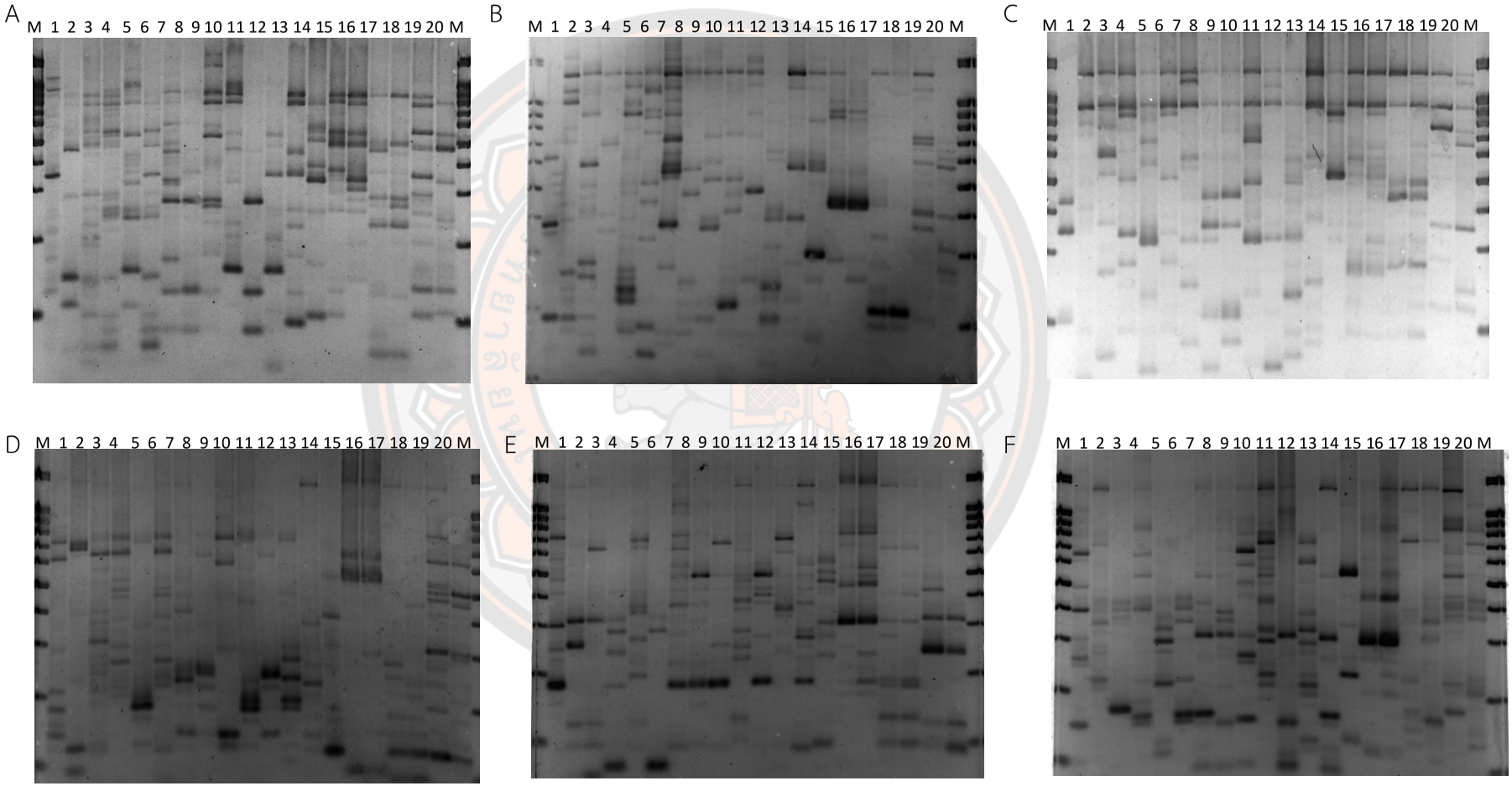
Phaius tankervilleae (Banks ex L'Her.)

Cephalanteropsis obcordata (Lindl.) Ormerod

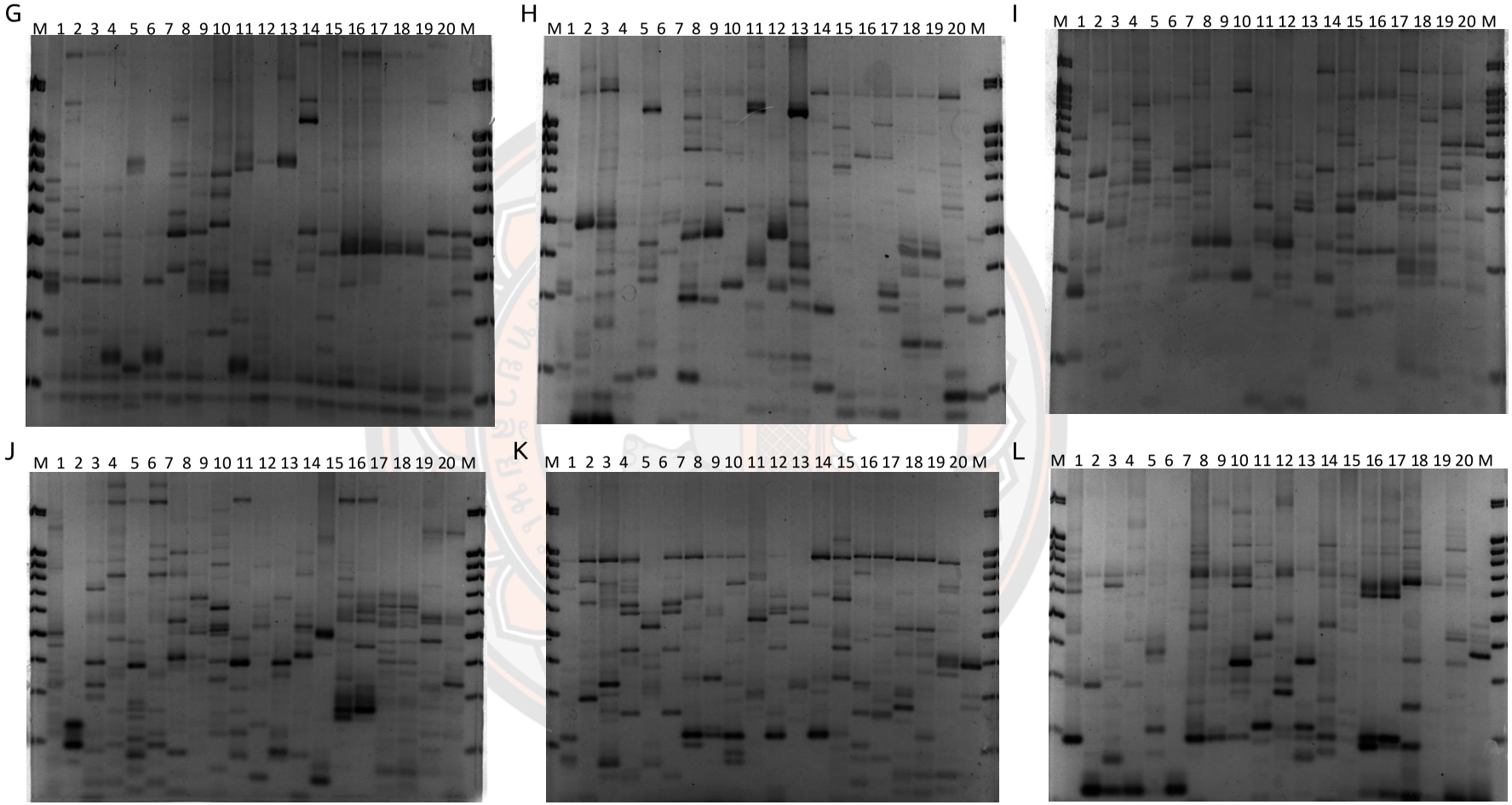
Cephalantheropsis longipes (Hook.f.) Ormerod.

ภาพที่ 17 กล้วยไม้กลุ่มเอื้องน้ำต้น (ต่อ)

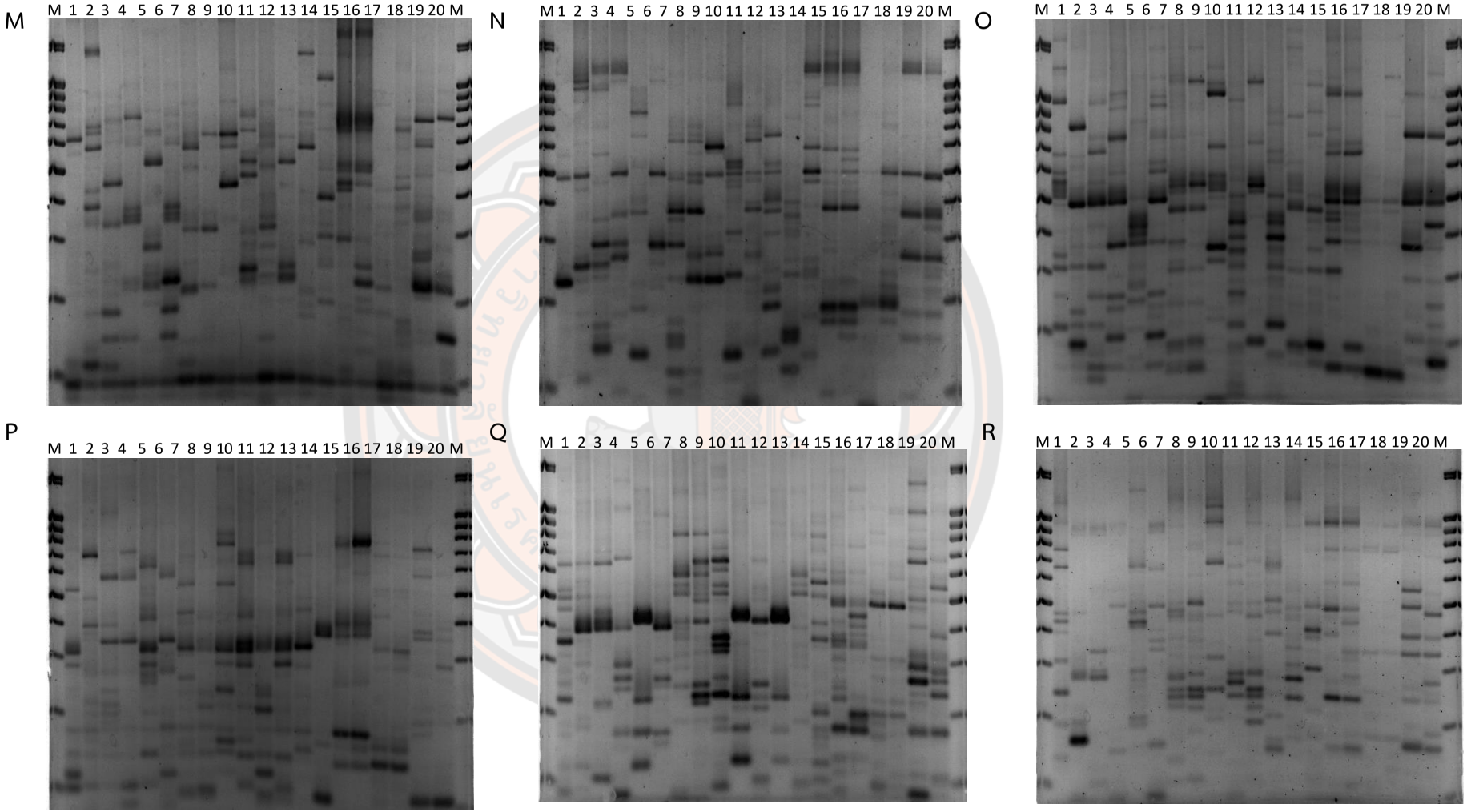
ภาคผนวก ข ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค SRAP



ภาพที่ 18 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค SRAP ไพรเมอร์ M1E7 (A), M2E1 (B), M2E2 (C), M2E4 (D), M2E5 (E) และ M2E6 (F)



ภาพที่ 18 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค SRAP (ต่อ) ไพรเมอร์ M2E7 (G), M2E9 (H), M2E10 (I), M3E6 (J), M3E9 (K) และ M4E5 (L)



ภาพที่ 18 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค SRAP (ต่อ) ไพรเมอร์ M5E2 (M), M6E10 (N), M9E2 (O), M9E4 (P), M9E5 (Q) และ M10E1 (R)