



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)  
ปริญญา

..... พี่ช้วน ..... พี่ช้วน .....  
สาขา ..... ภาควิชา .....

เรื่อง ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ที่ใช้ในการจำแนกพันธุ์  
และตรวจสอบพันธุ์ประวัติกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า

Microsatellite DNA Markers for *Dendrobium* Orchid Cultivars  
and Pedigree Identification

นามผู้วิจัย นางสาวทิพวัลย์ อยู่ชา

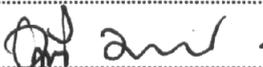
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ ..... 

( ..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์จตุภาค กิ่งวงศ์, Ph.D. .... )

กรรมการ ..... 

( ..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์จิตราพรรณ พิสิฏ์, วท.ม. .... )

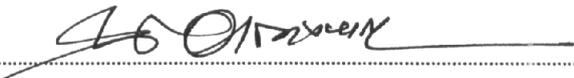
กรรมการ ..... 

( ..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรรรัตน์ มงคลพร, Ph.D. .... )

หัวหน้าภาควิชา ..... 

( ..... รองศาสตราจารย์จรัสแท้ ศิริพานิช, Ph.D. .... )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....   
( ..... รองศาสตราจารย์วินัย อ่างกงหาญ, M.A. .... )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 30 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2549

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ที่ใช้ในการจำแนกพันธุ์  
และตรวจสอบพันธุ์ประวัติกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า

Microsatellite DNA Markers for *Dendrobium* Orchid Cultivars  
and Pedigree Identification

โดย

นางสาวทิพย์ อยุธยา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2549

ISBN 974-16-1180-3

ทิพวัลย์ อยู่ชา 2549: ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด Microsatellite ที่ใช้ในการจำแนกพันธุ์  
และตรวจสอบพันธุประวัติกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า ปรินญาวิทยาศาสตร์  
มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาพืชสวน ภาควิชาพืชสวน ประชานกรรมการที่ปรึกษา:  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์จุฑาภาค กุ๋นวงศ์, Ph.D. 109 หน้า  
ISBN 974-16-1180-3

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า 19 พันธุ์ 24  
accessions โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 40 ตำแหน่ง พบว่า ดีเอ็นเอ  
เครื่องหมาย 15 ตำแหน่ง สามารถอ่านผลได้ชัดเจน และบอกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ได้ดี  
มีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งตั้งแต่ 3 ถึง 12 อัลลีล โดยเฉลี่ย 6.67 อัลลีล มีค่า Expected  
Heterozygosity (He) และค่า Polymorphism Information Content (PIC) โดยเฉลี่ย 0.74 และ  
0.7172 ตามลำดับ และค่า Probability of Identity (PI) ร่วมกัน 15 ตำแหน่งดีเอ็นเอเครื่องหมาย  
เท่ากับ  $8.66 \times 10^{-17}$  แสดงว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้ สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์  
และความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ดี เมื่อนำมาวิเคราะห์จัดกลุ่มและสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดง  
ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ในช่วง 0.16 ถึง 1.00 นอกจากนี้ยัง  
สามารถบอกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของกล้วยไม้พันธุ์ *D. Burana Jade* และพันธุ์ (*D. Sri-  
Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum* โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย 5 ตำแหน่ง คือ  
ORCA40, ORCA63, ORCA165, ORCT33 และ ORCT40 และเมื่อนำมาตรวจประวัติทาง  
พันธุกรรมของกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสมที่เกิดจากพันธุ์ *D. Burana Jade* x (*D. Sri-Racha* x  
*D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum* สามารถบอกความน่าจะเป็นในการคัดค้นพ่อที่เป็น  
เท็จออกได้มากที่สุด 99.99% ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ของกล้วยไม้สกุลหวาย  
นี้ สามารถนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ ตรวจประวัติทางพันธุกรรม ศึกษาความสัมพันธ์ทาง  
พันธุกรรมได้ และจะเป็นประโยชน์ในการจัดทำฐานข้อมูลทางพันธุกรรมสำหรับงานปรับปรุง  
พันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายต่อไป

ทิพวัลย์ อยู่ชา  
ลายมือชื่อนิติกร

  
ลายมือชื่อประธานกรรมการ

๒ / ๒๕ / ๒๕๔๙

Thippawan Yoocha 2006: Microsatellite DNA Markers for *Dendrobium* Orchid  
Cultivars and Pedigree Identification. Master of Science (Agriculture), Major Field:  
Horticulture, Department of Horticulture. Thesis Advisor: Assistant Professor  
Julapark Chunwongse, Ph.D. 109 pages.  
ISBN 974-16-1180-3

The genetic relationship among 19 *Dendrobium* orchid cultivars of 24 accessions using 40 microsatellite markers was studied. There were 15 polymorphic microsatellite markers, that showed allele numbers per locus ranging from 3 to 12, with average of 6.67 alleles. The expected heterozygosity ( $H_e$ ) and polymorphism information content (PIC) value averages were 0.74 and 0.7172 respectively, and combined probability of identity value of 15 microsatellite markers was  $8.66 \times 10^{-17}$ , demonstrating the high polymorphism and genetic diversity in *Dendrobium* orchid cultivars. The similarity index of 24 orchid accessions ranged from 0.16 to 1.00. There were five microsatellite markers; ORCA40, ORCA63, ORCA165, ORCT33 and ORCT40, that were polymorphic between *D. Burana Jade* and (*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum*. These markers can be used for parentage testing. The highest probability of exclusion was 99.99%. This suggests that microsatellite markers can be used for identification, parentage analysis, genetic relationship and also for genetic databases useful for future breeding programs of *Dendrobium* orchid cultivars.

Thippawan Yoocha

Student's signature

J. Chaya

Thesis Advisor's signature

21 May 2006

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จุลภาค คุ่นวงศ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ จิตราพรรณ พิลัง กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรรถนัย มงคลพร กรรมการที่ปรึกษาวิชาการ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จุรีรัตน์ ลิสมิทธิ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติที่สนับสนุนทุนวิจัย และ ทุนการศึกษา ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ สวนกล้วยไม้ใจรัก บริษัทบางกอกกรีน และ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม ที่ได้อนุเคราะห์กล้วยไม้พันธุ์ต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณฉัฐพร คุ่นวงศ์ ที่ได้ให้โอกาสในการเรียนรู้ประสบการณ์ต่าง ๆ ในด้านการทำงานวิจัย ตลอดจนความรู้และคำแนะนำต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการเรียน การทำงานวิจัย และการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบคุณ คุณศิริพร เชื้อจีน คุณพนิดา ฐาตุจิรังค์กุล คุณเพ็ญศรี เจียมผักแว่น คุณกาญจนา จ้อยเอี่ยม คุณเย็นจิต เรือง คุณณัญญา ศรีสวัสดิ์ คุณราตรี บุญเรืองรอด คุณกมลศิริ เพชรบุรณ์ คุณวรงค์ บุญอารีย์ คุณเจตนา กิตติเสนีย์ คุณภูมิพัฒน์ ทองอยู่ คุณจรัล เครือชะเอม และพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่ได้เป็นกำลังใจและช่วยเหลือข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

และสุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่ได้ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดมา

ประโยชน์อันใดเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแต่คุณพ่อ คุณแม่ และคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน ให้ความรู้มาโดยตลอด

ทิพัลย์ อยู่ซา

มีนาคม 2549

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	5
กล้วยไม้	5
ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์	8
การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายทางชีวโมเลกุล	12
อุปกรณ์และวิธีการ	17
อุปกรณ์	17
วิธีการ	19
ผลการทดลอง	24
วิจารณ์	42
สรุป	50
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	52
ภาคผนวก	59

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าที่ทำการศึกษา	17
2	โปรแกรมที่ใช้ในการศึกษา	19
3	ขนาดของอัลลีล, จำนวนอัลลีล, ค่า Heterozygosity (He), ค่า Probability of Identity (PI) และค่า Polymorphism Information Content (PIC) ของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง	25
4	ค่า Probability of Identity (PI) และค่า PI ร่วมกัน โดยเพิ่มจำนวนที่ละ 1 ตำแหน่ง เรียงลำดับจากค่า PI น้อยไปหามาก	26
5	ค่า Exclusion probability (PE) ของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง และค่า PE ร่วมกัน โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ORCA40, ORCA63, ORCA165, ORCT33 และ ORCT40 เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ไปสู่ลูก ในกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสม <i>D. Burana</i> x {( <i>D. Sri-Racha</i> x <i>D. Snowfire</i> ) x <i>D. bigibbum</i> var <i>compactum</i> } จำนวน 7 ต้น	38
<b>ตารางผนวกที่</b>		
1	จำนวนอัลลีลของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 15 ตำแหน่งในกล้วยไม้พันธุ์การค้า 24 accessions	65
2	ขนาดของอัลลีล และความถี่อัลลีลของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าทั้งหมด 19 พันธุ์ 24 accessions โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 15 ตำแหน่ง	73
3	ค่า similarity index ของกล้วยไม้ 24 accessions โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ Jaccard (Jaccard's coefficient) (Nei and Li, 1979)	75
4	การวิเคราะห์ชนิดแท้ (species) ของกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์การค้าที่ได้ รับการจดทะเบียนพันธุ์ ณ สมาคมพืชสวน ประเทศไทย	96

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แถบดีเอ็นเอแสดงความแตกต่างที่ระดับจีโนไทป์แต่ละตำแหน่ง โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ในการตรวจสอบ	27
2	ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 3 ตำแหน่งที่ไม่พบความแตกต่างในระดับจีโนไทป์ได้แก่ ORCA13, ORCT2 และORCT5	28
3	ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่ไม่สามารถอ่านผลได้ชัดเจน	29
4	แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าทั้ง 19 พันธุ์ 24 accessions ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 15 ตำแหน่ง จากการสุ่มค่า Bootstrap Value 1,000 replicates โดยมีค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.92	32
5	ภาพ 3 มิติ (3 dimension) แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าทั้ง 19 พันธุ์ 24 accessions ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 15 ตำแหน่ง	33
6	ความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของพันธุ์ <i>D. Burana Jade</i> และพันธุ์ $\{(D. Sri-Racha \times D. Snowfire) \times D. bigibbum \text{ var } compactum\}$ และการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ไปสู่ลูก ในกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสม <i>D. Burana Jade</i> x $(D. Sri-Racha \times D. Snowfire)$ x <i>D. bigibbum</i> var <i>compactum</i> จำนวน 7 ต้น โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ORCA40, ORCA63, ORCA165, ORCT33 และORCT40	36
7	ลักษณะทางฟีโนไทป์ของกล้วยไม้พันธุ์ผสม <i>D. Burana Jade</i> x $(D. Sri-Racha \times D. Snowfire)$ x <i>D. bigibbum</i> var <i>compactum</i> (BJxSSB) จำนวน 7 โคลน	41

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด **Microsatellite** ที่ใช้ในการจำแนกพันธุ์ และตรวจสอบ  
พันธุ์ประวัติกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า

**Microsatellite DNA Markers for *Dendrobium* Orchid Cultivars  
and Pedigree Identification**

คำนำ

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกที่สร้างรายได้สูงในหลาย ๆ ประเทศ โดยเฉพาะประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศที่ส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกรายใหญ่รายหนึ่งของโลก ในปี พ.ศ. 2547 มีพื้นที่ปลูกประมาณ 19,784 ไร่ ผลผลิตรวม 43,932 ตัน โดยมีผลผลิตเฉลี่ย 2,221 กิโลกรัมต่อไร่ มูลค่าการส่งออกดอกกล้วยไม้สดในปี พ.ศ. 2546 มีมูลค่า 1,985.43 ล้านบาท ปี พ.ศ. 2547 ส่งออก 2,136.06 ล้านบาท มีอัตราเพิ่มขึ้นร้อยละ 7.59 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2548) ประเทศผู้นำเข้ากล้วยไม้ ได้แก่ ญี่ปุ่น อิตาลี ฝรั่งเศส เยอรมันนี สหรัฐอเมริกา (กรรชิต, 2547) ในปัจจุบันปริมาณการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกและไม้กระถางมีเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากความต้องการของผู้บริโภคเพิ่มสูงขึ้น ผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้จึงได้พัฒนากล้วยไม้พันธุ์ใหม่ๆ ให้มีความหลากหลายทั้งในด้านรูปร่างของดอก ขนาดลำต้น ใบ สีสัน จำนวนดอก การจัดเรียงกลีบดอกภายในช่อ และกลิ่นหอมของดอก เพื่อสนองความต้องการของตลาดมากขึ้น

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) พันธุ์ลูกผสมต่าง ๆ ได้รับการพัฒนาขึ้นจากการผสมพันธุ์ข้ามชนิด หรือภายในชนิดเดียวกัน เพื่อสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรม และให้มีลักษณะตรงตามความต้องการของตลาด สำหรับใช้ประโยชน์ทางการค้าเป็นไม้กระถางและไม้ตัดดอก จึงได้มีการนำพ่อแม่พันธุ์มาจากต่างประเทศ เพื่อปลูกเลี้ยง และทำการคัดเลือกต้นพ่อแม่พันธุ์มาผสมพันธุ์ เพื่อคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะดีเด่น ทำการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเกิดการกลายพันธุ์ได้พันธุ์ใหม่เกิดขึ้นอีกมากมาย (กรรชิต, 2547)

กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ผสมบางพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันมาก และไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยผู้ที่มีความรู้และประสบการณ์มาช่วยในการจำแนกพันธุ์ เนื่องจากยังไม่มีระบบบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะทางพันธุกรรมของ

กล้วยไม้สกุลหวายแต่ละพันธุ์ และจัดทำฐานข้อมูลอย่างมีระบบ ทำให้ข้อมูลบางส่วนที่เป็นประโยชน์ต่อการจำแนกพันธุ์ และงานปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สูญหายไป

กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าส่วนใหญ่เกิดจากการผสมข้าม ซึ่งบางพันธุ์ได้รับการผสมกลับไปยังพ่อแม่พันธุ์เดิม หรือเกิดการกลายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ ออกมา (สุภาพ, 2547) กล้วยไม้ลูกผสมบางพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมาก ทำให้เกิดความสับสนเกี่ยวกับลักษณะประจำพันธุ์ และความถูกต้องตรงตามพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวายแต่ละพันธุ์ได้ บางพันธุ์มีชื่อพันธุ์เหมือนกัน แต่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างกัน ไม่สามารถทราบได้ว่าเป็นพันธุ์เดียวกันหรือไม่ มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม หรือบรรพบุรุษร่วมกันทางสายเลือดหรือไม่ ดังนั้นการพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว อาจมีข้อมูลไม่เพียงพอต่อการจำแนกพันธุ์ จึงจำเป็นต้องพิจารณาลักษณะทางพันธุกรรมในระดับจีโนมไทป์ ด้วยเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลร่วมด้วย

การนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้เปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เป็นการเปรียบเทียบโดยสุ่มหรือจำเพาะเจาะจงจากโครโมโซม ซึ่งดีเอ็นเอมีคุณสมบัติเป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่มีความจำเพาะสำหรับแต่ละสิ่งมีชีวิต (Morris, 1994) และไม่ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม จึงสามารถใช้ลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำแนกความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อจำแนกพันธุ์ได้ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น

เทคโนโลยีดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สามารถนำมาใช้หาเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของพืชมีอยู่มากมายหลายวิธี ได้แก่ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) และ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อจำกัดในด้านการใช้เทคนิคซึ่งมีขั้นตอนที่ซับซ้อน ใช้เวลาในการดำเนินการนาน ค่าใช้จ่ายสูง เพราะอาจมีปัญหาด้านการทำซ้ำได้ (reproducibility) แต่เทคนิค Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) หรือ Microsatellite ซึ่งอาศัยวิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) สามารถให้ข้อมูลเอกลักษณ์พันธุกรรมพืชได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว

ดังนั้นการนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์มาใช้เป็นเครื่องมือ เพื่อตรวจสอบความแตกต่างในระดับจีโนมไทป์ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าที่มีอยู่ในประเทศไทย สามารถจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เพื่อใช้เป็น

ฐานข้อมูลทางพันธุกรรมสำหรับงานปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ และนำดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้ไปใช้ในการจำแนกพันธุ์ ตรวจสอบประวัติทางพันธุกรรม และสร้างแผนที่โครโมโซมของกล้วยไม้ต่อไปได้

### วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 19 พันธุ์ 24 accessions ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์ เพื่อใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ และสร้างฐานข้อมูลทางพันธุกรรมสำหรับงานปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ต่อไป

2. ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมในระดับจีโนมไทป์ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ลูกผสมที่เกิดจาก *D. Burana Jade* x  $\{(D. Sri-Racha \times D. Snowfire) \times D. bigibbum \text{ var } compactum\}$  จำนวน 7 โคลน ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์ เพื่อสืบประวัติทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ผสม และนำดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้ไปใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์อื่น ๆ ได้

## การตรวจเอกสาร

### กล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Subclass Monocotyledoneae) อยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Family Orchidaceae) นับเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดวงศ์หนึ่งของพืชมีดอก (Class Angiospermae) มีอยู่ประมาณ 17,000-35,000 ชนิด (species) (Dressler, 1993) มีอยู่ด้วยกันมากมายหลายสกุล (genus) แต่ละสกุลมีลักษณะรูปร่าง สี สัน ที่แตกต่างกันออกไป ในขณะที่สามารถจำแนกชนิดได้ชัดเจนเกือบ 19,000 ชนิด และมีการสร้างกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ๆ เกิดขึ้นมากมาย บางชนิดมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันมาก ไม่สามารถจำแนกชนิดของกล้วยไม้นั้น ๆ ได้ (Dressler, 1993) เจริญเติบโตได้ในทุกทวีปยกเว้นทวีปแอนตาร์กติกา รูปแบบการเจริญเติบโตมีหลายแบบ เช่น เจริญเติบโตบนกิ่งไม้ พื้นหิน พื้นดิน และที่ชื้นแฉะ ความแตกต่างของชนิดกล้วยไม้ที่พบในเขตร้อน (tropic) มักเป็นกล้วยไม้ประเภทอิงอาศัย (epiphyte) ส่วนกล้วยไม้ที่อยู่ในเขตอบอุ่น (temperate) มักเป็นพวกกล้วยไม้ดิน (terrestrial) (ครรรชิต, 2547)

กล้วยไม้สกุลหวายเป็นสกุลที่ใหญ่สกุลหนึ่งในวงศ์กล้วยไม้ มีจำนวนมากกว่า 1,400 ชนิด จากประเทศอินเดียไปจนถึงประเทศญี่ปุ่น และทางตอนใต้ของออสเตรเลีย, นิวซีแลนด์ และเกาะฟิจิ ส่วนใหญ่เป็นกล้วยไม้ประเภทอิงอาศัย บางชนิดสามารถพบตามโขดหิน (Schelpe and Steward, 1990) ลักษณะลำต้นมีทั้งแบบที่เป็นลำกลมยาวคล้ายหวายย่อส่วน ลำต้นรูปลูกกล้วย รูปกระสวย รูปเหลี่ยม ลักษณะการเจริญเติบโตส่วนใหญ่เป็นแบบเจริญทางด้านข้าง (อบฉันท, 2546) มีอยู่ประมาณ 41 หมวด (section) หมวดที่มีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า สำหรับไม้กระถางและไม้ตัดดอก คือ หมวด *Phalaenanth*, *Spatulata* (*Ceratobium*), *Eleutheroglossum* (*Spatulata*) และ *Latouria* (Kamemoto, 1999) ซึ่งส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ สำหรับสร้างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ลูกผสมต่างๆ

## กล้วยไม้สกุลหวายที่นิยมใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์

### 1. หมวด *Phalaenathe*

หมวด *Phalaenathe* ประกอบด้วยกล้วยไม้ 2-3 ชนิดเท่านั้น พบอยู่ในแถบประเทศอินโดนีเซีย ปาปัวนิวกินี และทางตอนเหนือของประเทศออสเตรเลีย ได้แก่ *D. phalaenopsis*, *D. bigibbum* และ *D. affine* (Schelpe and Steward, 1990)

ลักษณะลำต้นเทียม (pseudobulbous stem) พองตัวเล็กน้อย มีรูปร่างเป็นรูปกระสวย (spindle shape) ข้อปล้อง (node) สั้นถูกห่อหุ้มด้วยกาบใบ (sheath) ใบมีสีเขียวเข้ม ออกดอกบริเวณใกล้ปลายยอดของลำต้น ช่อดอกยาวแคบ ตั้งตรงและโค้งงอ มีดอกอยู่บริเวณปลายช่อดอกประมาณครึ่งหนึ่งหรือ 2 ใน 3 ของความยาวก้านช่อดอก ดอกมีขนาดใหญ่สีม่วงหรือสีขาว กลีบดอกมี 3 กลีบขนาดกว้างกว่ากลีบเลี้ยง ขนาดของปาก (lip) เล็กกว่ากลีบดอก (Schelpe and Steward, 1990)

พันธุ์ที่มีบทบาทสำคัญในงานปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายตัดดอกและไม้กระถาง คือ *D. phalaenopsis* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดอยู่ในรัฐควีนส์แลนด์ ประเทศออสเตรเลีย ข้อดีของลูกผสม *Phalaenathe* ใช้สัญลักษณ์ของจีโนมแทนด้วย 'P' สามารถพิจารณาได้จากความสามารถในการผสมข้ามชนิดได้หลายชนิด เช่น *D. phalaenopsis* ผสมข้ามชนิดกับหมวด *Ceratobium* ได้พันธุ์ลูกผสมข้ามระหว่างหมวด ซึ่งปลูกกันอย่างแพร่หลายในฮาวาย (Kamemoto, 1990) พันธุ์ลูกผสมที่มีความสวยงามและมีชื่อเสียง ได้แก่ พันธุ์ปอมปาดัวร์ ซึ่งเป็นพันธุ์ไม้ตัดดอกที่สำคัญของประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และฮาวาย (Schelpe and Steward, 1990)

### 2. หมวด *Spatulata (Ceratobium)*

หมวดนี้เรียกกันว่า 'antelope dendrobium' กลีบดอก (petal) ยาวและแคบ กลีบเลี้ยง (sepal) ด้านหลังของดอกสั้นกว่ากลีบดอก ซึ่งตั้งตรงขึ้นเป็นเกลียววน ลำต้น (stem) ขึ้นอยู่เป็นกลุ่มรวมกันหนาแน่น บางครั้งสูงยาวขึ้นถึง 2 เมตร ถูกปกคลุมด้วยขนเล็กน้อย มีกาบใบห่อหุ้ม ใบมีสีเขียวอ่อนเป็นรูปไข่ (ovate-elliptic) อยู่ตามยาวของลำต้นทั้งสองข้าง ออกดอกบริเวณใกล้ปลายยอดของลำต้น ก้านช่อดอกตั้งตรงขึ้นหรือโค้งงอ กลีบปากมีสีแตกต่างไปจากสีกลีบดอกเป็นลายเส้นบริเวณสันตามยาวของปากลงมา (Schelpe and Steward, 1990)

หมวด *Spatulata* เป็นที่รู้จักกันมานานหลายปีในชื่อหมวด *Ceratobium* มีอยู่ทั้งหมดประมาณ 46 ชนิด อยู่ทางด้านตะวันออกของจาวาถึงปาปัวนิวกินีและฟิลิปปินส์ หลายชนิดเจริญเติบโตในเขตร้อนชื้นบริเวณต่ำกว่าละติจูด (Schelpe, 1990) บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ในบริเวณที่มีแดดจัด สามารถผสมพันธุ์กับ *D. phalaenopsis* ในหมวด *Phalaenanth* ใช้สัญลักษณ์ของจีโนมแทนด้วย 'C' ในขบวนการปรับปรุงพันธุ์ มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนากล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า ได้ถูกนำมาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างพันธุ์ลูกผสมใหม่ๆ ขึ้นมากมาย โดยเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ซึ่งบางชนิดของกล้วยไม้หมวดนี้ได้ถูกเปลี่ยนชื่อ เช่น *D. undulatum* เปลี่ยนเป็น *D. discolor*, *D. d'albertisii* เปลี่ยนเป็น *D. antennatum* และ *D. ostrinoglossum* เปลี่ยนเป็น *D. lasianthera* ส่วนชนิดอื่นๆ ที่นิยมนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ได้แก่ *D. gouldii*, *D. helix*, *D. taurinum* และ *D. stratiotes* (Kamemoto *et al.*, 1990)

### 3. หมวด *Eleutheroglossum* (*Spatulata*)

กล้วยไม้ในหมวดนี้มีขนาดดอกและทรงต้นขนาดเล็ก จึงนิยมใช้เพื่อสร้างพันธุ์ลูกผสมแคระ โดยใช้สัญลักษณ์ของจีโนมแทนด้วย 'E' มีพ่อแม่พันธุ์ได้แก่ *D. canaliculatum* และ *D. carronii* ซึ่งถูกจัดอยู่ในหมวด *Eleutheroglossum* โดย Dockrill (1969) หลังจากนั้น Cribb (1986) จึงได้จัดให้ *D. canaliculatum* และ *D. carronii* อยู่ในหมวด *Spatulata* (*Ceratobium*) และ Dockrill จึงได้ปรับปรุงแก้ไขใหม่ไว้ในหนังสือ *Australian Indigenous Orchids* (1992) (Kamemoto *et al.*, 1990)

### 4. หมวด *Latouria*

กล้วยไม้หมวด *Latouria* เป็นกล้วยไม้สกุลหวายที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงจากประเทศปาปัวนิวกินี มีลักษณะพิเศษที่จดจำได้ง่ายคือ มีขนอ่อนหรือขนแข็งปกคลุมบริเวณผิวหน้าของกลีบดอก ในปี 1983 Phillip Cribb ได้รวบรวมรายละเอียด และรูปภาพประกอบของกล้วยไม้หมวดนี้ไว้ทั้งหมด 48 ชนิด มีอยู่ประมาณ 2-3 ชนิดที่ปลูกเลี้ยงในแถบทวีปยุโรปและอเมริกา ลำต้นอาจมีขนาดเล็กหรือใหญ่ ความสูงจากโคนต้นประมาณ 60 เซนติเมตร ขึ้นอยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรือกระจัดกระจายออกจากกัน บริเวณฐานของลำต้นเทียมจะแคบและพองออก ใบบอกใกล้บริเวณปลายยอดของลำต้น และไม่มีกาบใบ ออกดอกบริเวณระหว่างใบ เมื่อออกดอกหลายดอก ช่อดอกจะห้อยลงมา โดยปกติดอกจะมีขนาดใหญ่ สีขาว, สีเหลือง, สีเขียว และสีม่วงเข้ม กลีบเลี้ยง และกลีบดอก มีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่กลีบเลี้ยงและรังไข่ (ovary) จะถูกปกคลุมด้วยขนแข็ง กลีบปากมี

ขนาดใหญ่กว่าส่วนอื่นๆของดอก ด้านในกลีบดอก 3 กลีบมีขนขนปกคลุมเล็กน้อย (Schelpe and Stewart, 1990)

ส่วนใหญ่กล้วยไม้ในหมวดนี้พบอยู่ในแถบป่าดิบชื้น มีจำนวนมากกว่า 40 ชนิด มีอยู่ประมาณ 2-3 ชนิดที่พบในเขตทวีปเอเชีย ตั้งแต่ทางตอนเหนือของประเทศฟิลิปปินส์และทางตะวันตกของจาวา จนถึงทางตอนเหนือของออสเตรเลีย (Schelpe and Stewart, 1990) โดยทั่วไป ดอกสีม่วงได้แก่ *D. macrophyllum* พบในแถบอินโดนีเซียจนถึงซามัว เป็นชนิดที่มีขนาดและสีสันหลากหลาย กลีบเลี้ยง (sepal) เป็นจุดหรือขีดสีเหลืองหรือสีเขียว ใช้ผสมข้ามชนิดกับ *D. bigibbum* (หมวด *Phalaenanth*) ได้ลูกผสมที่มีจีโนมคนละชนิด (amphidiploid) เพื่อใช้ผลิตกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าต่อไป (Kamemoto *et al.*, 1990)

ส่วนดอกที่มีสีน้ำตาลได้แก่ *D. spectabile* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบป่าดิบชื้น และเกาะโซโลมอน เป็นชนิดที่มีดอกขนาดใหญ่ กลีบเลี้ยง และกลีบดอกมีสีเหลือง และจุดดำหรือลวดลายเป็นสีแดงเข้ม กลีบปากมีขนาดยาวกว่ากลีบดอกด้านข้าง (Kamemoto *et al.*, 1990)

### ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์

Microsatellite หรือ Simple Sequence Repeat (SSR) เป็นดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำสายสั้นๆ เรียงต่อกัน (tandem repeat) พบว่ามีการกระจายอยู่ทั่วไปในทุกจีโนมของยูคาริโอต พบได้ทั้งบริเวณที่เป็น coding region และ non-coding region ไมโครแซทเทลไลท์ในบริเวณ coding region ของแบคทีเรียพบว่า เมื่อเกิดความแปรปรวนขึ้นบริเวณนี้ สามารถทำให้แบคทีเรียปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี แต่ในมนุษย์ส่วนใหญ่ก่อให้เกิดโรค เช่น โรคมะเร็งในลำไส้ใหญ่ (Machado and Menck, 1997) โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (Collins *et al.*, 2003) ส่วนบริเวณ non-coding region โดยทั่วไปของสิ่งมีชีวิตมีไมโครแซทเทลไลท์ที่อยู่ประมาณ 90% ของจีโนม ซึ่งยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอน อาจเกิดมาจากสาเหตุ 1.) การอ่านเบสเลื่อนไป (slippage) ระหว่างขบวนการจำลองตัวเอง (DNA replication) ทำให้เกิดการขาดหาย (deletion) หรือการแทรกเข้า (insertion) ของชิ้นดีเอ็นเอ (Brown, 1999) 2.) เกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอไม่เท่ากันระหว่างการเกิด crossing over ในขบวนการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ (meiosis) เรียกว่า “unequal crossing over” ทำให้บริเวณที่เป็น โฮโมโลกัสกันมีจำนวนซ้ำไม่เท่ากัน จึงมีขนาดของอัลลีลต่างกัน 3.) เกิดจากการกลายพันธุ์มาจากสาเหตุอื่น เช่น แสง อุณหภูมิ ความร้อน สารเคมี ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส (base mutation) และก่อให้เกิดความแตกต่างระหว่างอัลลีล (Flanagan, 2004) จากความ

แปรปรวนทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น จึงสามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ (Poncet *et al.*, 2004) โดยออกแบบไพรเมอร์ขนาดข้างบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำ แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เป้าหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) หลังจากนั้นนำมา แยกความแตกต่างของขนาดอัลลีลแต่ละตำแหน่งด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบผล

Microsatellite เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด codominant สามารถตรวจสอบความแตกต่าง ระหว่างเฮเทอโรไซกัส และโฮโมไซกัสได้ มีความเสถียรภาพ (stability) สูง และทำซ้ำ (reproducibility) ได้ (Heyden and Sharp, 2001) สามารถถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ ไปสู่ลูกได้ และนำมาใช้ในการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ทำแผนที่ โครโมโซม (James *et al.*, 2003) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และพันธุศาสตร์ประชากร

อย่างไรก็ตามหากยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของพืชที่จะทำการศึกษา หรือพืชที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน จำเป็นต้องเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง เนื่องจากต้องการ การโคลนนิ่ง และหาลำดับเบสของดีเอ็นเอก่อนทำการออกแบบไพรเมอร์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้อง กำหนดขอบเขตของกลุ่มไพรเมอร์ที่สามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ (Poncet *et al.*, 2004) ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้นำดีเอ็นเอเครื่องหมายบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำชนิด CA และ CT ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูก ด้วยนมส่วนใหญ่จะพบลำดับเบสซ้ำชนิด CA และในพืชพบลำดับเบสซ้ำชนิด CT (Kyle, 2001)

### การสร้างดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์

จุลภาค กุ๊นวงศ์ และคณะ (ผลงานยังไม่ได้ตีพิมพ์) สร้างดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด ไมโครแซทเทลไลท์ด้วยวิธี Enrichment (Glenn, 2001) มาจากจีโนมดีเอ็นเอไลบรารีของกล้วยไม้ สกุลหวายพันธุ์ *Dendrobium Sonia* โดยตัดจีโนมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tru 9I* แล้ว เชื่อมต่อกับ *Mse I* adapter (  $5'$ -GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT- $3'$  ) ด้วยเอนไซม์ T4 ligase หลังจากนั้น นำมาเพิ่มปริมาณ โดยวิธี Polymerase Chain Reaction PCR (Mullis, 1990) แล้วทำการแยกสาย ดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยวด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (PTC-100™ Programmable Thermal Controller, MJ Research) ดักจับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบส CA และ CT ซ้ำ ด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้น 2 ชนิด คือ (GA)<sub>15</sub> และ (GT)<sub>15</sub> ซึ่งติดฉลากด้วย biotin หรือ Biotinylated repeat oligo ทางด้านปลาย 5' หลังจากนั้นเติม streptavidin beads (Dynabeads® M-280 Streptavidin, DYNAL) หรืออนุภาคเหล็กที่ถูกเคลือบด้วย streptavidin (Dynabeads® M-280 Streptavidin, DYNAL) ซึ่ง

เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่สามารถเข้ายึดเกาะจำเพาะกับ biotin ได้ แล้วจึงใช้แท่งแม่เหล็กดึงอนุภาคเหล็กที่มีซิงค์ดีเอ็นเอเป้าหมายเกาะติดอยู่ออกมา แล้วล้างส่วนประกอบอื่นๆ ออก นำซิงค์ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำเชื่อมต่อกับกับเวกเตอร์ชนิดพลาสมิด (pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems, Promega) ถ่ายเข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* แล้วเพิ่มปริมาณ และสกัดพลาสมิด (Wizard<sup>™</sup> Minipreps DNA Purification Systems, Promega) และคัดเลือกรหัสพันธุกรรมที่มีลำดับเบสซ้ำด้วยวิธี Dot Blot Hybridization (DIG System, Boehringer Mannheim) โดยเลือกพลาสมิดที่มีลำดับเบสซ้ำ เพื่อนำมาหาลำดับเบส (ABI PRISM<sup>™</sup> BigDye<sup>™</sup> Primer Sequencing Kit, PE Applied Biosystems) แล้วจึงออกแบบไพรเมอร์ขนาดช่วงบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำ สำหรับใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนมไทป์โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Sequi-Gen<sup>®</sup> GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell, BIO-RAD) ต่อไป

### ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้มีปริมาณสูงขึ้นเป็นทวีคูณ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีเบสคู่สมกับสายดีเอ็นเอต้นแบบ ขนาดช่วงบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ รวมทั้งสารตัวกลาง (PCR Buffer) คือออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด และแมกนีเซียมคลอไรด์ ในหลอดทดลอง เทคนิคนี้ถูกค้นพบโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ. 1983 ซึ่งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะทำเป็นรอบ ๆ แต่ละรอบมีขั้นตอนดังนี้

#### 1. Denaturation

ทำการแยกสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ (Double Stranded DNA) เป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

#### 2. Annealing

ไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับเบสคู่สมของสายดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่อุณหภูมิในช่วง 40-60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วงนี้ขึ้นอยู่กับลำดับเบสของไพรเมอร์

### 3. Extension

เป็นการเติมเบสสังเคราะห์ต่อจากตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาในการเชื่อมต่อดำดับเบสเป็นสายยาวต่อไป

ดังนั้นเทคนิค PCR จึงถูกนำมาใช้วิเคราะห์ชีวโมเลกุลอย่างกว้างขวาง นอกจากนั้นยังได้รับการพัฒนาเครื่องมือและเทคนิคให้มีศักยภาพสูงขึ้นกว่าเดิม สามารถตรวจสอบความแตกต่างของผลการทดลองได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

#### การตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

วิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นวิธีการแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอหรือโปรตีน โดยเคลื่อนที่ผ่านสารละลายตัวกลางในสนามไฟฟ้า โมเลกุลที่มีประจุเหมือนกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม ซึ่งโมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก จึงมีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก โดยโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก นอกจากขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอแล้ว อัตราการเคลื่อนที่ก็ยังขึ้นอยู่กับรูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้า และสารตัวกลางที่ใช้ (สุรินทร์, 2545)

สารตัวกลางที่ใช้ในการแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่นิยมใช้กันคือ อะกาโรสเจล (agarose gel) และ โพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) ขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ โดยอะกาโรสเจลใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 100-50,000 คู่เบส ส่วนโพลีอะคริลาไมด์เจลใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 6-1,000 คู่เบส (สุรินทร์, 2545) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเจลที่ใช้ โดยเจลที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น สามารถแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอขนาดเล็กได้

### การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายทางชีวโมเลกุล

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิต โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายทางชีวโมเลกุล สามารถจำแนกพันธุ์ ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ โดยประเมินค่าความถี่ของอัลลีล และองค์ประกอบของความแปรปรวนทางพันธุกรรม เพื่อบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรหรือระหว่างประชากรที่ทำการศึกษา ซึ่งดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมมี 2 ชนิด คือ 1.) ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด dominant ได้แก่ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) และ ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตชนิดแฮพลอยด์ได้ 2.) ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด codominant ได้แก่ allozyme, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) และ SSR (Simple Sequence Repeats) ซึ่งสามารถใช้กับสิ่งมีชีวิตชนิดแฮพลอยด์หรือดิพลอยด์ก็ได้ ภายใต้สมมติฐานการกระจายตัวอย่างอิสระของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง (no linkage) และความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่งอยู่ในสภาพสมดุลประชากรของ Hardy-Weinberg สามารถนำดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละชนิดมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างในระดับชีวโมเลกุล เพื่อจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ (Kosman and Leonard, 2005)

### การประเมินค่าดัชนีความเหมือนเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เพื่อศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรม จากการประเมินค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ (coefficient) แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละชนิด และระดับชุดโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษา (Kosman and Leonard, 2005)

การประเมินค่าดัชนีความเหมือนจากการแปลงข้อมูลแบบไบนารี โดยตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าเป็น 1 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าเป็น 0 หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแถบดีเอ็นเอในรูปของค่าดัชนีความเหมือน โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์แต่ละชนิดซึ่งมีวิธีการคำนวณที่แตกต่างกันดังนี้

### 1. Simple matching coefficient

นับแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏในตำแหน่งที่เป็นโฮโมโลกัส ซึ่งสามารถใช้กับดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด dominant (RAPD และ AFLP) เพราะลักษณะการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งดีเอ็นเอเครื่องหมายนั้นๆ เป็นลักษณะจีโนไทป์แบบ homologous recessive

### 2. Jaccard coefficient

นับเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ส่วนที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอไม่นับ ให้เป็นข้อมูลสูญหาย เพราะถ้าข้อมูลของแถบดีเอ็นเอเกิด false-positive หรือ false-negative จะทำให้ประเมินค่าดัชนีความเหมือนคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด codominant (allozyme, RFLP และ microsatellite)

### 3. Nei-Li หรือ Dice coefficient

นับแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ โดยให้น้ำหนักของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมากกว่าแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏ สามารถใช้กับข้อมูลดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด codominant (RFLP และ microsatellite) (Anonymous, 2003)

การวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือนโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ Dice สามารถใช้ได้ทั้งข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด dominant (RAPD, AFLP และ ISSR) และดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด codominant (allozyme, RFLP และ microsatellite) ในสิ่งมีชีวิตชนิดแฮพลอยด์ ดิพลอยด์ หรือ โพลีพลอยด์ ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ Jaccard สามารถใช้กับข้อมูลดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SSR ในสิ่งมีชีวิตชนิดโพลีพลอยด์ และค่าสัมประสิทธิ์ simple matching ใช้กับข้อมูลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตชนิดแฮพลอยด์ เมื่อข้อมูลที่นำมาใช้ในการประเมินผลมีความสมบูรณ์ แม้ว่าจะใช้ค่าสัมประสิทธิ์ต่างชนิดกัน ก็จะได้รูปแบบแสดงความความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิตออกมาเหมือนกัน แต่ถ้าใช้ค่าสัมประสิทธิ์ต่างชนิดกัน ได้รูปแบบแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมออกมาต่างกันนั้น อาจเกิดขึ้นมาจากสาเหตุอื่นซึ่งไม่ค่อยมีปรากฏ (Kosman and Leonard, 2005)

### การจำแนกพันธุ์ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์

Ghislain *et al.* (1999) จำแนกพันธุ์มันฝรั่ง (*Solanum spp.*) จากศูนย์รวบรวมพันธุ์มันฝรั่ง International Potato Center (CIP) ซึ่งรวบรวมพันธุ์ไว้ทั้งหมด 5,094 accessions มีพันธุ์ปลูกอยู่ประมาณ 70% ของจำนวนพันธุ์ทั้งหมด นำมาตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม 73 accessions ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 70 ตำแหน่ง สามารถจำแนกความแตกต่างในระดับจีโนมได้ ช่วยลดปัญหาการจำแนกความแตกต่างด้วยลักษณะทางฟีโนไทป์ไม่ชัดเจน ทำให้จัดจำแนกพันธุ์ได้ละเอียดแม่นยำ และจัดระบบข้อมูลของพันธุ์ให้เป็นหมวดหมู่ได้ดีขึ้น สามารถนำดีเอ็นเอเครื่องหมายมาช่วยในการคัดเลือกลักษณะที่มีความสำคัญในงานปรับปรุงพันธุ์ เพื่อย่นระยะเวลา และเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานให้ดีขึ้น

Wei *et al.* (2005) ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมในข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) ระหว่างพันธุ์ต้านทานโรค Fusarium head blight (FHB) และพันธุ์อ่อนแอต่อโรค FHB โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 40 ตำแหน่ง คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสม เพื่อศึกษาการทำแผนที่ยีนต้านทานโรค FHB

### การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ เหมาะสำหรับการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด codominant จึงสามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างโฮโมโลกัส และเฮเทอโรไซกัสได้ จากข้อมูลความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่ง นำมาวิเคราะห์ค่า Heterozygosity (He) (Nei, 1978) เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม และความแปรปรวนทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งจากค่า Polymorphism Information Content (PIC) (Botstein *et al.*, 1980) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เช่น มันฝรั่ง (Chauhan *et al.*, 2004), กาแฟ (Poncet *et al.*, 2004), อ้อย (Selvi *et al.*, 2003), สตรอเบอร์รี่ (James *et al.*, 2003), ปลายี่ม (Zehdi *et al.*, 2004) และมันเทศ (Zhang *et al.*, 1999) เป็นต้น

### ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ในกล้วยไม้สกุลต่างๆ

Soliva *et al.* (2000) สร้างดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์จากจีโนมดีเอ็นเอไลบรารีของกล้วยไม้สกุล *Ophrys araneola* (Orchidaceae) 672 โคลน ที่มีลำดับเบสซ้ำชนิด GA/CT สามารถพบโคลนที่มีลำดับเบสซ้ำทั้งหมด 51 โคลน นำมาออกแบบไพรเมอร์ข้างบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำได้ 21 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ 7 คู่ โดยมีจำนวนอัลลีลแต่ละตำแหน่ง 7-22 อัลลีล และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีประมาณ 0.37-0.94 สามารถนำดีเอ็นเอเครื่องหมายมาใช้ในการศึกษาโครงสร้างประชากร และประเมินการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมที่เกิดจากการผสมพันธุ์ข้ามชนิดของกล้วยไม้โดยแมลงเป็นพาหะได้

Pellegrino *et al.* (2001) สร้างดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์จากจีโนมดีเอ็นเอไลบรารีของกล้วยไม้ *Serapias vomeracea* ทั้งหมด 576 โคลน พบดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ 54 โคลน นำมาออกแบบไพรเมอร์ได้ 18 คู่ สามารถนำมาใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ได้ 6 คู่ โดยมีจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งอยู่ในช่วง 3-6 อัลลีล และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีประมาณ 0.61-0.81 สามารถนำดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้ มาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และพันธุศาสตร์ประชากรของกล้วยไม้สกุล *Serapias* ได้

Campbell *et al.* (2002) สร้างดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์จากจีโนมดีเอ็นเอไลบรารีของกล้วยไม้ *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Brown บริเวณดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำชนิด CA/TG และ CT/AG สามารถนำดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้ มาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *G. conopsea* ได้

### การสืบประวัติทางพันธุกรรมโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ เป็นบริเวณดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ ซึ่งสามารถตรวจสอบความแปรปรวนของจำนวนซ้ำด้วยเทคนิค PCR โดยการออกแบบไพรเมอร์ข้างบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำ หลังจากนั้นนำมาแยกความแตกต่างของขนาดโมเลกุลดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส สามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ ทำแผนที่โครโมโซมวิเคราะห์จีโนม ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ เพื่อช่วยในการจัดการแหล่งข้อมูลทางพันธุกรรม (germplasm) ได้ (Li *et al.*, 2001)

นอกจากนี้ยังสามารถนำดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้มาใช้ในการตรวจประวัติทางพันธุกรรม และศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ไปสู่ลูกได้ โดยการประเมินค่าความน่าจะเป็นของลักษณะทางจีโนไทป์ที่ถูกถ่ายทอดจากพ่อโดยสุ่มไปยังลูก เพื่อบอกโอกาสความเป็นพ่อที่แท้จริง โดยคัดพ่อที่เป็นเท็จออกไป (exclusion probability) (Weir, 1996) สามารถตรวจประวัติทางพันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้ เช่น วิว (Curi *et al.*, 2002), สุนัข (Zajc and Sampson, 1999), ม้า (Jakabova *et al.*, 2002), แกะ (Tomasco *et al.*, 2002), ปลา (Bessert and Orti, 2003) และนก (Van Dongen and Mulder, 2005) เป็นต้น

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า

1.1 กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 19 พันธุ์ 24 accessions โดยทำการคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะของรูปทรงต้น ดอก สีเส้นที่แตกต่างกัน จากสวนกล้วยไม้ ‘ใจรัก’ อ.โพธาราม จ.ราชบุรี บริษัททางกอกกรีน และภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม

ตารางที่ 1 กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าที่ใช้ในการศึกษา

พันธุ์	แหล่งที่มา	อักษรย่อ
( <i>D. Sri-Racha</i> x <i>D. Snowfire</i> ) x <i>D. bigibbum</i> <i>var compactum</i>	สวนใจรัก	SSB
<i>Dendrobium</i> Burana Jade	บริษัททางกอกกรีน	BJ
<i>Dendrobium</i> Caesar (2N)	บริษัททางกอกกรีน	CS2N
<i>Dendrobium</i> Caesar (4N)	บริษัททางกอกกรีน	CS4N
<i>Dendrobium</i> hybrid ‘Cholticha White’	สวนใจรัก	CW
<i>Dendrobium</i> Dang Sa-Ard	บริษัททางกอกกรีน	DS
<i>Dendrobium</i> Ekapol ‘Anna’	สวนใจรัก	AN-1
<i>Dendrobium</i> Ekapol ‘Anna’	บริษัททางกอกกรีน	AN-2
<i>Dendrobium</i> hybrid ‘Emma White’	สวนใจรัก	EW
<i>Dendrobium</i> hybrid ‘Honey’	บริษัททางกอกกรีน	HN
<i>Dendrobium</i> Intuwong	บริษัททางกอกกรีน	IW
<i>Dendrobium</i> Jaquelyn Thomas	บริษัททางกอกกรีน	JT
<i>Dendrobium</i> hybrid ‘Mayuree White’	บริษัททางกอกกรีน	MW
<i>Dendrobium</i> hybrid ‘Sakura’	สวนใจรัก	NB

ตารางที่ 1 (ต่อ)

พันธุ์	แหล่งที่มา	อักษรย่อ
<i>Dendrobium</i> hybrid ‘Sanan White’	สวนใจรัก	SW
<i>Dendrobium</i> Sonia ‘Daeng Vasana’	ภาควิชาพืชสวน	DV
<i>Dendrobium</i> Sonia ‘Earsakul’-1	สวนใจรัก	BES-1
<i>Dendrobium</i> Sonia ‘Earsakul’-2	บริษัทบางกอกกรีน	BES-2
<i>Dendrobium</i> Sonia ‘Red Joe’ -1	สวนใจรัก	BJR-1
<i>Dendrobium</i> Sonia ‘Red Joe’ -2	สวนใจรัก	BJR-2
<i>Dendrobium</i> Sonia ‘Red Joe’-3	บริษัทบางกอกกรีน	BJR-3
<i>Dendrobium</i> Sonia ‘No.17’-1	สวนใจรัก	B17-1
<i>Dendrobium</i> Sonia ‘No.17’-2	สวนใจรัก	B17-2
<i>Dendrobium</i> Walter Oumae	ภาควิชาพืชสวน	WO

1.2 กกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ *D. Burana Jade*, (*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum* และกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสมที่เกิดจาก *D. Burana Jade* x {(*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum*} จำนวน 7 โคลน ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์พันธุ์มาจากสวนกล้วยไม้ ‘ใจรัก’ อ.โพธาราม จ.ราชบุรี

**2. ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์**

คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction) ได้รับการพัฒนาจากการสร้างจีโนมคไลบรารีของกล้วยไม้สกุลหวาย *Dendrobium* Sonia โดยวิธีการ Enrichment (จุดภาค คูนวงส์ และคณะ, ผลงานยังไม่ได้ตีพิมพ์)

ตารางที่ 2 โพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา และ Annealing temperature ในปฏิกิริยา PCR  
(จุลภาค คู้นวนงศ์, ผลงานยังไม่ได้ดีพิมพ์)

Annealing Temperature (°C)	คู่โพรเมอร์
50	ORCA2, ORCA4, ORCA9, ORCA10, ORCA11, ORCA12, ORCA13, ORCA63, ORCA84, ORCA88, ORCA122, ORCA165, ORCA172, ORCA194, ORCA206 ORCT2, ORCT5, ORCT6, ORCT8, ORCT11, ORCT13, ORCT15, ORCT31, ORCT33, ORCT40, ORCT72 ORCT82, ORCT85, ORCT93, ORCT99
55	ORCA40 ORCT35, ORCT36, ORCT52, ORCT58, ORCT59, ORCT67, ORCT69, ORCT75, ORCT83

### วิธีการ

#### 1. การสกัดดีเอ็นเอกล้วยไม้

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากรากกล้วยไม้ดัดแปลงวิธีการมาจาก Doyle และ Doyle (1991) โดยมีวิธีการดังนี้

1.1 นำรากกล้วยไม้ส่วนที่มีเนื้อเยื่อเจริญหรือรากที่งอกใหม่ประมาณ 0.2-0.5 กรัม มาบดด้วยโกร่งในไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผงแป้ง จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่บดได้ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Extraction Buffer [4% CTAB, 2.5M NaCl, 4% PVP, 20mM EDTA (pH8), 100 mM Tris-HCl (pH8), 0.1% sodium metabisulfite] 600 ไมโครลิตร และ 20% sodium dodecyl sulfate (SDS) 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 45-60 นาที

1.2 นำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 1 เท่าของสารละลายที่มีอยู่ เขย่าขึ้นลงเบาๆ ประมาณ 3 นาที

1.3 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

1.4 ดูดส่วนใสที่เหลือ 1.5 มิลลิลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาณ 1 เท่า ของสารละลายที่มีอยู่ นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 5 นาที

1.5 เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างก้อนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 600 ไมโครลิตรประมาณ 3 ครั้ง

1.6 นำไปผึ่งจนแห้ง

1.7 เติม 1XTE Buffer {10mM Tris-HCl (pH8), 1mM EDTA (pH8)} 25 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอ

1.8 เก็บรักษาสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

## 2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำ (SSR) จำนวน 40 ตำแหน่ง (ตารางที่ 2) ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอปริมาณ 25 นาโนกรัม, 0.1mM dNTP, 1X PCR Buffer {10mM Tris-HCl (pH 8.8), 50mM KCl, 0.08% Nonidet P40}, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 μM forward Primer, 0.25 μM reverse Primer และ 0.5u Taq DNA polymerase ในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร

2.2 ตั้งเครื่องดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละรอบดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที (denaturation) อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของไพรเมอร์แต่ละคู่เป็นเวลา 1 นาที (annealing) และที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที (extension) จำนวนทั้งหมด 35 รอบ

### 3. การตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำผลิตภัณฑ์จาก PCR ปริมาณ 3 ไมโครลิตร และเติม sequencing dye {98% Formamide, 0.025% bromphenol blue, 0.025% xylenecyanol, 10mM EDTA} 17 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาแยกแถบดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ในเจลอะคริลลาไมด์ 4.5% {4.5% acrylamide gel (acrylamide:bis-acrylamide=19:1), 7.5M Urea, 1XTBE buffer [0.045M Tris-Borate, 0.001M EDTA (pH8)] } ผ่านสารละลายตัวกลาง 1XTBE buffer จากนั้นจึงนำมาย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีซิลเวอร์ไนเตรท โดยนำแผ่นเจลมาแช่และเขย่าเบาๆ ใน 10% acetic acid ปริมาตร 2 ลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างเจลด้วยน้ำสะอาดประมาณ 2 นาที จำนวน 3 ครั้ง แล้วจึงนำมาย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (0.1% silver nitrate, 0.05% formaldehyde) จำนวน 2 ลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาผ่านน้ำสะอาดอย่างรวดเร็ว แล้วทำให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอด้วย Developer solution (3% sodium carbonate, 0.05% formaldehyde, 0.01% thiosulfate) จำนวน 2 ลิตรที่แช่เย็น เขย่าจนปรากฏแถบดีเอ็นเอ จึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% acetic acid จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดประมาณ 5 นาที แล้วจึงผึ่งให้แห้งตรวจสอบผล

### 4. การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า 19 พันธุ์ 24 accessions โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์

4.1.1 อ่านขนาดอัลลีลของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งเปรียบเทียบกับขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยใช้โปรแกรม PhotoCapt version 99.01 (Vilber Lourmat, 1999) แล้วประเมินความถูกต้องของขนาดอัลลีลแต่ละตำแหน่งด้วยโปรแกรม AlleloBin (Idury and Cardon, 1997)

4.1.2 แปลงข้อมูลให้เป็นแบบไบนารี ในตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าเป็น 1 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจะให้ค่าเป็น 0 คำนวณหาขนาดของอัลลีล, จำนวนของอัลลีล, ความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่ง จากนั้นนำข้อมูลมาประเมินค่า Expected Heterozygosity ( $H_e$ ) (Nei, 1978), Polymorphism Information Content (PIC) (Botstein *et al.*, 1980) และค่า Probability of Identity (PI) (Kaul *et al.*, 2001)

4.1.3 นำข้อมูลแบบไบนารีประเมินค่าดัชนีความเหมือน (Similarity Index, SI) โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ Jaccard (Jaccard's coefficient) (Nei and Li, 1979) ทำการวิเคราะห์จัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA (Unweighed pair-group method using arithmetic average) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.01 (Rohlf, 1997) โดยการใช้ค่า Cophenetic correlation ซึ่งเป็นค่าที่สามารถบ่งบอกว่าการจัดกลุ่มที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ดีหรือไม่ (Rohlf, 1997) หลังจากนั้นทดสอบความเชื่อมั่นด้วยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996)

4.1.4 นำข้อมูลแบบไบนารีที่อยู่ในรูปเมตริกซ์มาใช้ในการจัดกลุ่มจีโนไทป์ของกล้วยไม้ โดยการวิเคราะห์ Principal coordinate analysis (PCoA) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.01 (Rohlf, 1997)

4.2 การตรวจประวัติทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ลูกผสมที่เกิดจาก *D. Burana Jade* x {(*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum*} จำนวน 7 โคลน

4.2.1 ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของกล้วยไม้พันธุ์ *D. Burana Jade* และพันธุ์ (*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum* ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 15 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3)

4.2.2 หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่พบความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ มาใช้ในการตรวจสอบการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ไปสู่ลูก

4.2.3 อ่านผลจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในรุ่นลูก จากการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของพ่อและแม่ แล้วนำข้อมูลความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่งจากประชากรในข้อ 4.1 มาประเมินค่า Probability of Exclusion (PE) (Weir, 1996)

## 5. สถานที่ทำการทดลอง

ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม

## 6. ระยะเวลาในการทดลอง

ระยะเวลาทำการทดลองเริ่มตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2546 ถึง เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2548

## ผลการทดลอง

### 1. การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนมไทป์

จากการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนมไทป์ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า 19 พันธุ์ 24 accessions ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด ไมโครแซทเทลไลต์ทั้งหมด 40 ตำแหน่ง พบ ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สามารถอ่านผลได้ชัดเจน และบอกความแตกต่างระหว่างจีโนมไทป์ได้ ดังภาพที่ 1 จำนวน 15 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3) มีดีเอ็นเอเครื่องหมาย 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ORCA13, ORCT2 และ ORCT5 ที่ไม่พบความแตกต่างระหว่างจีโนมไทป์ (ภาพที่ 2) ส่วนที่เหลือให้ผลไม่ชัดเจน (ภาพที่ 3)

ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สามารถอ่านผลได้ มีขนาดของอัลลีลอยู่ในช่วงประมาณ 158-402 คู่เบส และมีจำนวนของอัลลีลต่อตำแหน่งโดยเฉลี่ย 6.67 อัลลีล ซึ่งดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีจำนวนของอัลลีลสูงสุด คือ ORCA40 (12 อัลลีล) และจำนวนของอัลลีลต่ำสุดคือ ORCT35 และ ORCT69 (3 อัลลีล) (ตารางที่ 3) แล้วนำจำนวนอัลลีลที่ได้มาคำนวณค่าความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่ง (ตารางผนวกที่ 2)

#### 1.1 การประเมินค่า Expected Heterozygosity ( $H_e$ ) (Nei, 1978)

ประเมินค่า  $H_e$  จากข้อมูลความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่ง พบว่ามีค่า  $H_e$  อยู่ระหว่าง 0.35 ที่ตำแหน่ง ORCT69 ถึง 0.89 ที่ตำแหน่ง ORCA40 และ ORCT58 โดยมีค่า  $H_e$  เฉลี่ยประมาณ 0.74 (ตารางที่ 3)

#### 1.2 การประเมินค่า Polymorphism Information Content (PIC) (Botstein *et al.*, 1980)

ประเมินค่า PIC จากข้อมูลความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่ง พบว่ามีค่า PIC อยู่ในช่วงประมาณ 0.3206-0.8845 ตำแหน่งที่มีค่า PIC สูงสุดเท่ากับ 0.8845 คือ ORCT58 และต่ำสุดเท่ากับ 0.3206 คือ ORCT69 โดยเฉลี่ยมีค่า PIC ประมาณ 0.7172 (ตารางที่ 3)

### 1.3 การประเมินค่า Probability of Identity (PI) (Kaul *et al.*, 2001)

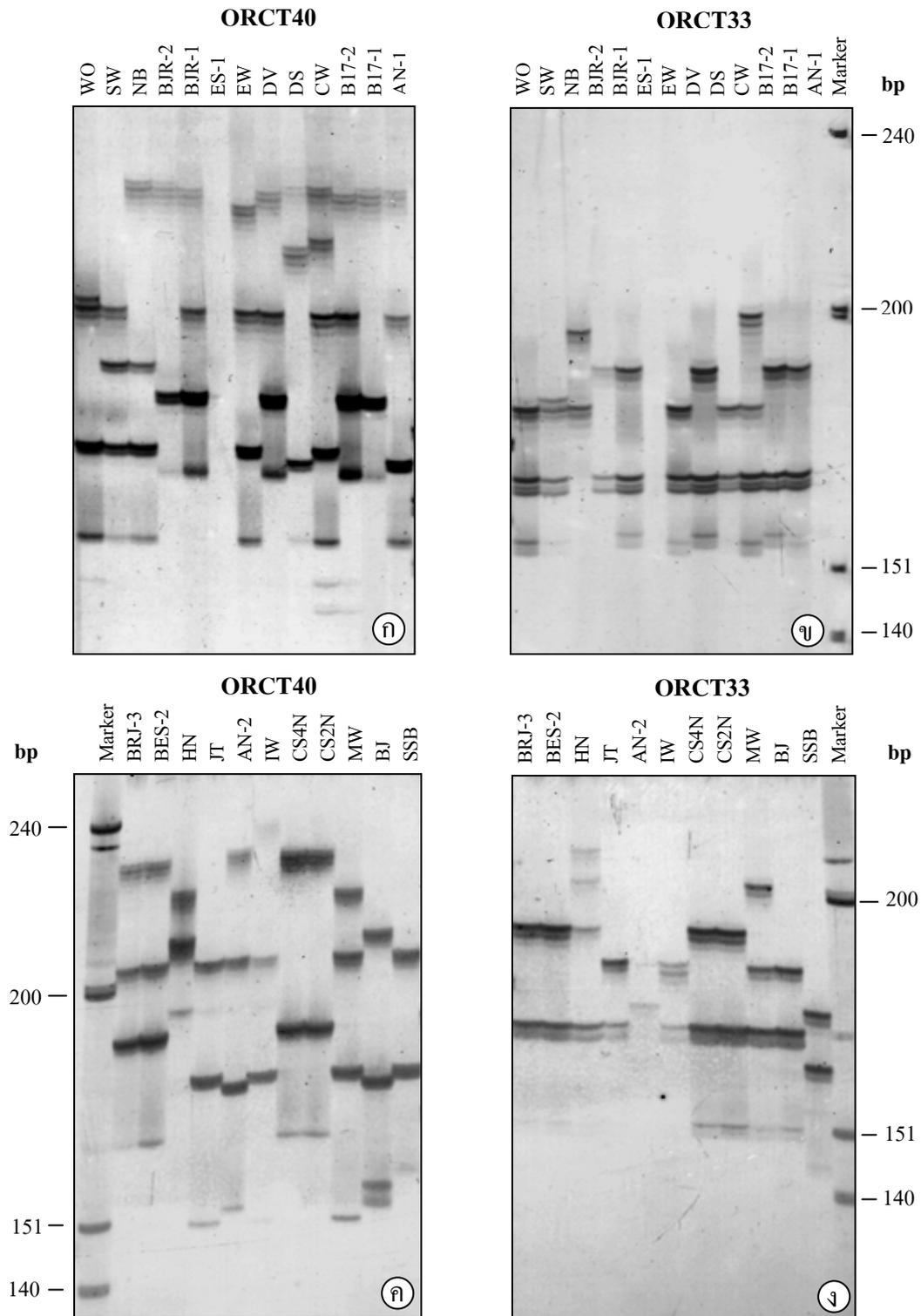
ประเมินค่า PI จากข้อมูลความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่ง พบว่าค่า PI มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.0227 ที่ตำแหน่ง ORCT58 และสูงสุดเท่ากับ 0.4642 ที่ตำแหน่ง ORCT 69 (ตารางที่ 3) แสดงว่ามีโอกาสที่จะพบกล้วยไม้ที่มีจีโนไทป์เหมือนกันที่ตำแหน่ง ORCT58 เป็น 1 ใน 44 และตำแหน่ง ORCT 69 เป็น 1 ใน 2 (ตารางที่ 3) เมื่อทำการตรวจสอบความแตกต่าง โดยใช้จำนวนตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมายเพิ่มขึ้นเป็น 15 ตำแหน่ง จะมีโอกาสพบกล้วยไม้ที่มีจีโนไทป์เหมือนกันเท่ากับ 1 ใน  $10^{16}$  (ตารางที่ 4)

**ตารางที่ 3** ขนาดของอัลลีล, จำนวนอัลลีล, ค่า Heterozygosity (He), ค่า Probability of Identity (PI) และค่า Polymorphism Information Content (PIC) ของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์แต่ละตำแหน่ง

ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย	ขนาดของอัลลีล (คู่เบส)	จำนวน ของอัลลีล	Expected	Polymorphism		1 ใน...(โคลน)
			Heterozygosity (He)	Information Content (PIC)	Probability of Identity (PI)	
ORCA40	200-268	12	0.89	0.8780	0.0231	43
ORCA63	264-290	7	0.77	0.7409	0.0903	11
ORCA84	317-331	4	0.68	0.6441	0.1635	6
ORCA165	282-402	8	0.85	0.8369	0.0425	24
ORCT6	285-309	4	0.72	0.7018	0.1292	8
ORCT8	260-288	5	0.71	0.6818	0.1300	8
ORCT11	314-326	6	0.80	0.7812	0.0719	14
ORCT33	158-198	7	0.70	0.6831	0.1349	7
ORCT35	246-254	3	0.52	0.4614	0.3457	3
ORCT40	160-204	8	0.84	0.8343	0.0448	22
ORCT52	235-291	10	0.88	0.8735	0.0265	38
ORCT58	223-329	11	0.89	0.8845	0.0227	44
ORCT59	290-324	4	0.63	0.5975	0.2008	5
ORCT69	196-212	3	0.35	0.3206	0.4642	2
ORCT72	174-232	8	0.85	0.8386	0.0421	24
ค่าเฉลี่ย		6.67	0.74	0.7172	0.1288	17
ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน		2.87	0.15	0.16	0.13	14.53
ผลคูณรวม					8.65869E-17	1.15491E+16

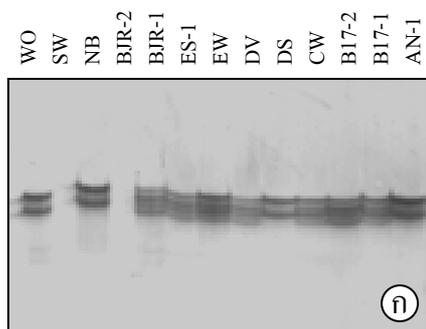
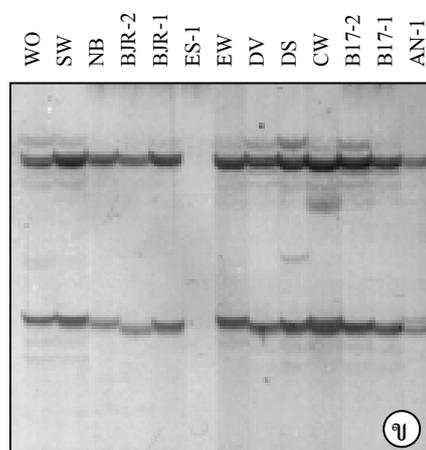
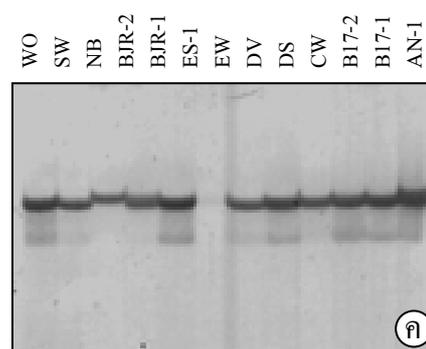
ตารางที่ 4 ค่า Probability of Identity (PI) และค่า PI ร่วมกัน โดยเพิ่มจำนวนทีละ 1 ตำแหน่ง  
เรียงลำดับจากค่า PI น้อยไปหามาก

จำนวนดีเอ็นเอ				
เครื่องหมาย (ตำแหน่ง)	ชนิดของดีเอ็นเอ เครื่องหมาย	ค่า PI	ค่า PI ร่วม	1 ใน ... (โคลน)
1	ORCT58	0.0227	0.0227	44
2	ORCA40	0.0231	0.000525441	1,903
3	ORCT52	0.0265	1.3918E-05	71,849
4	ORCT72	0.0421	5.86121E-07	1,706,134
5	ORCA165	0.0425	2.48926E-08	40,172,536
6	ORCT40	0.0448	1.11616E-09	895,929,093
7	ORCT11	0.0719	8.03068E-11	12,452,247,481
8	ORCA63	0.0903	7.2542E-12	137,851,109,320
9	ORCT6	0.1292	9.36947E-13	1,067,296,532,177
10	ORCT8	0.1300	1.21827E-13	8,208,378,872,250
11	ORCT33	0.1349	1.64371E-14	60,837,888,642,147
12	ORCA84	0.1635	2.68774E-15	372,060,058,285,451
13	ORCT59	0.2008	5.39658E-16	1,853,025,450,768,680
14	ORCT35	0.3457	1.86533E-16	5,360,987,823,155,240
15	ORCT69	0.4642	8.65869E-17	11,549,090,248,176,800

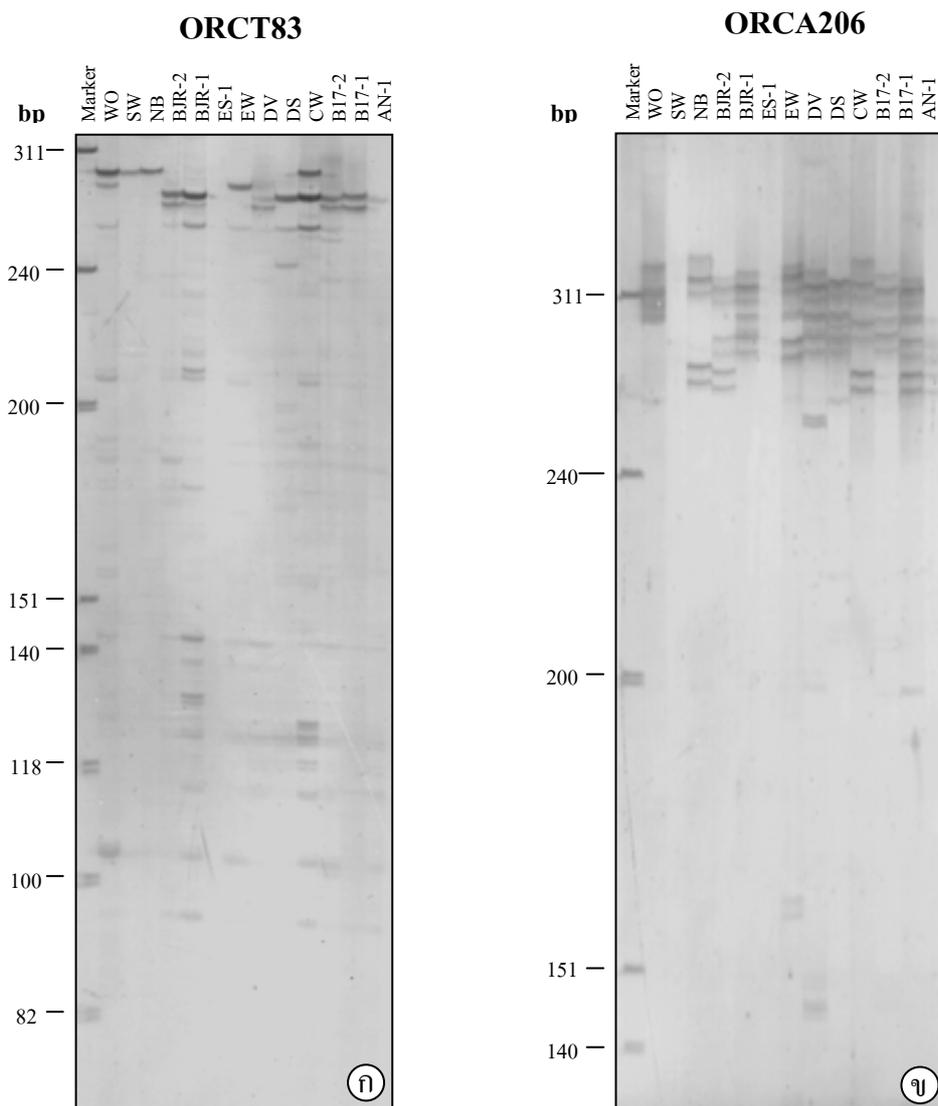


ภาพที่ 1 แถบดีเอ็นเอแสดงความแตกต่างที่ระดับจีโนไทป์แต่ละตำแหน่งโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ในการตรวจสอบ

Marker = ดีเอ็นเอเครื่องหมายมาตรฐาน  $\Phi$ X174DNA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I ซึ่งทราบขนาดของโมเลกุลมีหน่วยเป็น เบสแพร์ (bp)

**ORCA13****ORCT2****ORCT5**

ภาพที่ 2 ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 3 ตำแหน่งที่ไม่พบความแตกต่างในระดับจีโนมไทป์ได้แก่ ORCA13 (ก) ORCT2 (ข) และORCT5 (ค)



**ภาพที่ 3** ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่ไม่สามารถอ่านผลได้ชัดเจน  
 Marker = ดีเอ็นเอเครื่องหมายมาตรฐาน  $\phi$ X174DNA ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf* I  
 ซึ่งทราบขนาดของโมเลกุลมีหน่วยเป็น เบสแพร์ (bp)

## 2. การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า 19 พันธุ์ 24 accessions ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ทั้งหมด 15 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3) พบว่า สามารถจัดกลุ่มแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ดังภาพที่ 4

2.1 ประเมินค่าดัชนีความเหมือน (Similarity Index, SI) โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ Jaccard (Jaccard's coefficient) (Nei and Li, 1979)

พบว่า ค่า SI อยู่ในช่วง 0.16 ถึง 1.00 แสดงภาพแผนภูมิต้นไม้บอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้พันธุ์ต่าง ๆ ได้ โดยพันธุ์ *Dendrobium* Sonia 'Daeng Vasana', *Dendrobium* Sonia 'Earsakul'-1, *Dendrobium* Sonia 'Earsakul'-2, *Dendrobium* Sonia 'Red Joe' -1, *Dendrobium* Sonia 'Red Joe' -2, *Dendrobium* Sonia 'Red Joe' -3, *Dendrobium* Sonia 'No.17'-1 และพันธุ์ *Dendrobium* Sonia 'No.17'-2 มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม แสดงค่า SI อยู่ระหว่าง 0.60-1.00 พันธุ์ *Dendrobium* Caesar (2N) และ *Dendrobium* Caesar (4N) มีค่า SI เท่ากับ 1.00 ส่วนพันธุ์อื่น ๆ ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันออกไป มีค่า SI ระหว่างกันลดลง โดยพบว่า พันธุ์ (*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum* มีลักษณะทางพันธุกรรมต่างไปจากพันธุ์อื่น ๆ มากที่สุด โดยมีค่า SI เท่ากับ 0.16 (ภาพที่ 4)

2.2 วิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA (Unweighed pair-group method using arithmetic average) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.01 (Rohlf, 1997) โดยการใช้ค่า cophenetic correlation (r) เพื่อพิจารณาว่าการจัดกลุ่มที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ดีหรือไม่ (Rohlf, 1997)

จากการวิเคราะห์การจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายของประชากรนี้ ในรูปของแผนภูมิต้นไม้ พบว่ามีค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.92 ซึ่งแสดงว่าการจัดกลุ่มอยู่ในเกณฑ์ที่ดี (Rohlf, 1997)

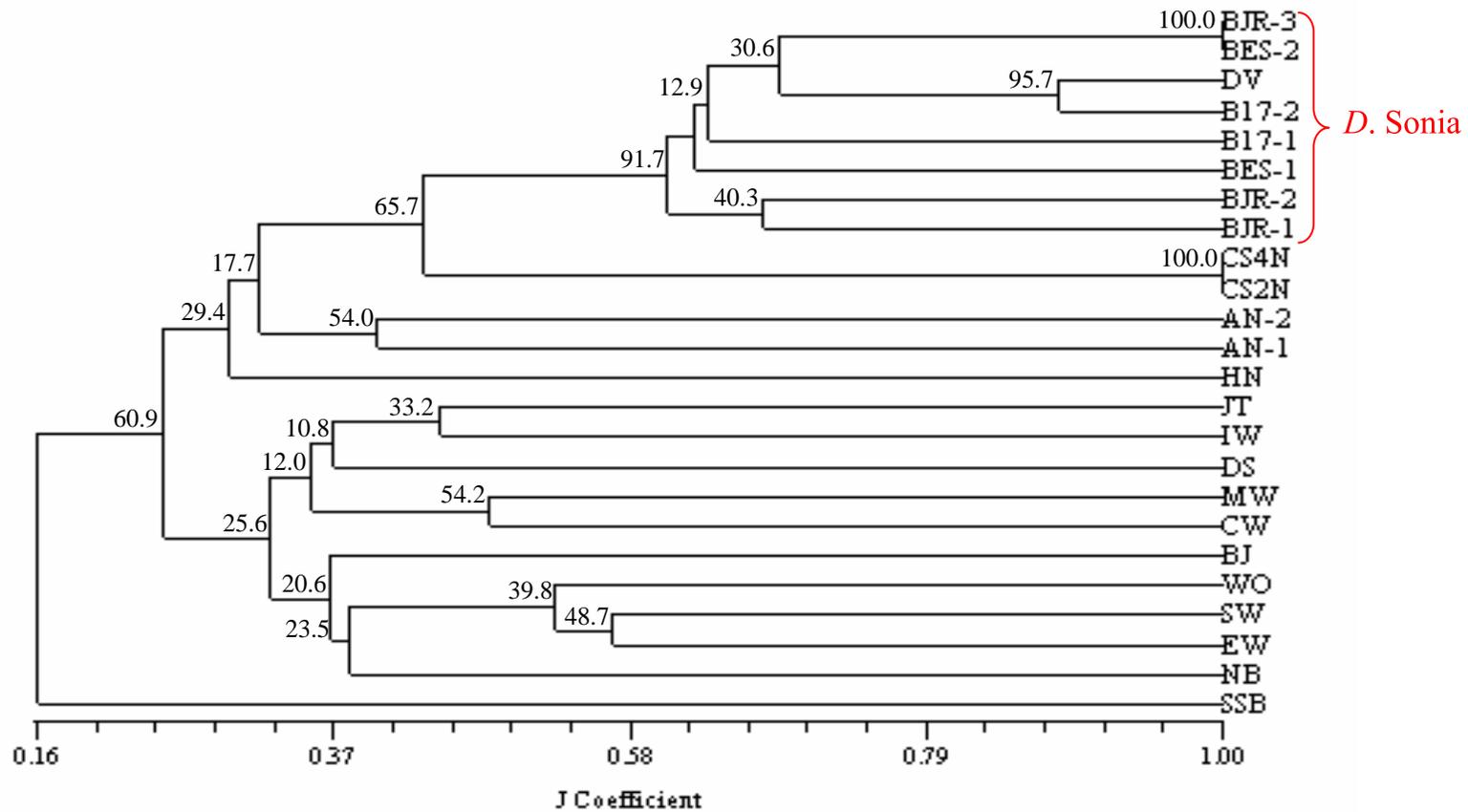
2.3 วิเคราะห์ค่า Bootstrap value เพื่อทดสอบความเชื่อมั่นด้วยโปรแกรม Winboot (Yap and Nelson, 1996)

จากการประเมินค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ โดยวิธี Bootstrap testing พบว่า ระหว่าง พันธุ์ *Dendrobium* Sonia ‘Red Joe’-3 กับพันธุ์ *Dendrobium* Sonia ‘Red Joe’-2 และพันธุ์ *Dendrobium* Caesar (2N) กับพันธุ์ *Dendrobium* Caesar (4N) มีค่า Bootstrap value เท่ากับ 100 จากการสุ่มข้อมูล 1,000 ครั้ง (replicates) แสดงให้เห็นว่า ไม่มีการกระจายตัวของข้อมูล จึงไม่เกิดความแปรปรวนในการจัดกลุ่ม หากทำการสุ่มจัดกลุ่มใหม่ 1,000 ครั้ง จะมีโอกาสพบกิ่งสาขาย่อยรูปแบบนี้เกิดขึ้น 100% ของจำนวนครั้งที่สุ่ม ส่วนความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้พันธุ์อื่น ๆ มีโอกาสที่จะแสดงรูปแบบของกิ่งสาขาในรูปแบบอื่น ๆ ได้ โดยบอกเป็นเปอร์เซ็นต์ของโอกาสที่จะได้รูปแบบของกิ่งสาขานั้น จากจำนวนครั้งของการสุ่มจัดกลุ่มใหม่ทั้งหมด

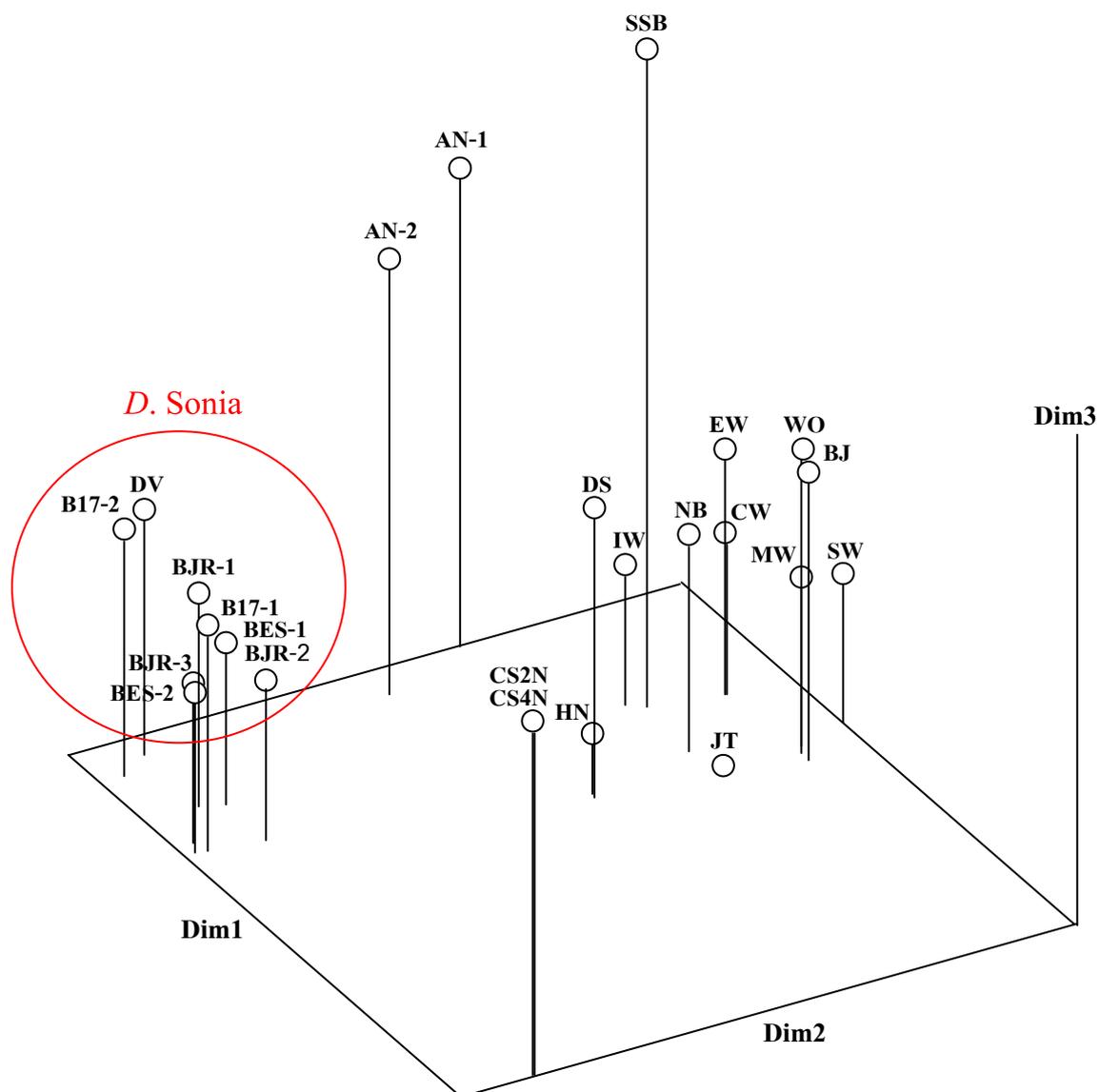
2.4 วิเคราะห์ Principal coordinate analysis (PCoA) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.01 (Rohlf, 1997) เพื่อจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างจีโนไทป์ในรูป 3 มิติ (3 dimension)

จากข้อมูลทางจีโนไทป์นำมาประเมินความใกล้ชิดทางพันธุกรรม แล้วจัดกลุ่มให้อยู่ในรูป 3 มิติ แสดงการกระจายของข้อมูล ให้อยู่ในรูปสมการเชิงเส้น (linear combination) ซึ่งสามารถเพิ่มมิติของภาพ จากข้อมูลที่มีความซับซ้อน หรือข้อมูลที่มีปริมาณมาก สามารถจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยกลุ่มที่มีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกันมาก จะมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก และสามารถจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้

จากการจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายในประชากรนี้ โดยวิเคราะห์ PCoA ในรูปของกราฟสมการเชิงเส้นแบบ 3 มิติ (3 dimension) เพื่อลดความซับซ้อนของข้อมูล พบว่าพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม ได้แก่ พันธุ์ *Dendrobium* Sonia ‘Daeng Vasana’, *Dendrobium* Sonia ‘Earsakul’-1, *Dendrobium* Sonia ‘Earsakul’-2, *Dendrobium* Sonia ‘Red Joe’ -1, *Dendrobium* Sonia ‘Red Joe’ -2, *Dendrobium* Sonia ‘Red Joe’-3, *Dendrobium* Sonia ‘No.17’-1 และพันธุ์ *Dendrobium* Sonia ‘No.17’-2 สามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ ส่วนพันธุ์ *Dendrobium* Caesar (2N) และ *Dendrobium* Caesar (4N) มีตำแหน่งของพิกัดอยู่บนแกนของกราฟที่ระดับเดียวกัน ส่วนพันธุ์อื่น ๆ มีระยะห่างระหว่างพิกัดแตกต่างกันออกไป (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าทั้ง 19 พันธุ์ 24 accessions ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด ไมโครแซทเทลไลท์ 15 ตำแหน่ง จากการสุ่มค่า Bootstrap value 1,000 replicates โดยมีค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.92



ภาพที่ 5 การวิเคราะห์ Principal coordinate analysis (PCoA) แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าทั้ง 19 พันธุ์ 24 accessions ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 15 ตำแหน่ง

### 3. การตรวจประวัติทางพันธุกรรม

วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่และลูกในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ลูกผสมที่เกิดจากพันธุ์ *D. Burana Jade* x {(*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum*} จำนวน 7 โคลน โดยมีพันธุ์ *D. Burana Jade* เป็นแม่พันธุ์ และพันธุ์ {(*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum*} เป็นพ่อพันธุ์

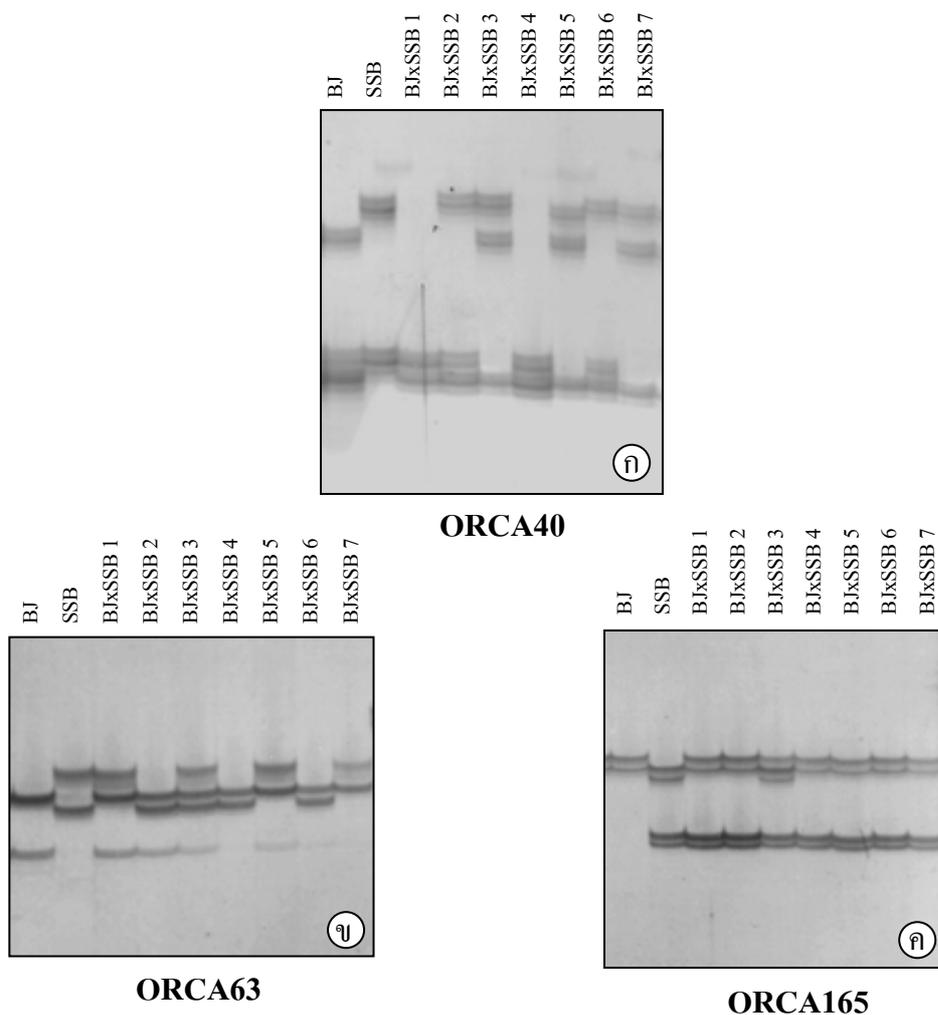
3.1 ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อในกล้วยไม้พันธุ์ *D. Burana Jade* และพันธุ์ (*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum* ด้วยดีเอ็นเอ เครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 15 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3) พบความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ที่ตำแหน่ง ORCA40, ORCA63, ORCA165, ORCT33 และ ORCT40 สามารถนำดีเอ็นเอเครื่องหมายดังกล่าวมาตรวจสอบการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ไปสู่ลูกได้

3.2 เมื่อตรวจสอบการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมในกล้วยไม้พันธุ์ผสม *D. Burana Jade* x {(*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum*} จำนวน 7 โคลน พบว่ากล้วยไม้ทั้งหมด 7 โคลนเป็นลูกผสมที่เกิดจากพันธุ์ *D. Burana Jade* x {(*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum*} เนื่องจากมีแถบดีเอ็นเอของพ่อและแม่ปรากฏอยู่ในโคลนลูกผสมทั้งหมด (ภาพที่ 6)

3.3 ประเมินค่า Probability of Exclusion (PE) (Weir, 1996) อ่านผลจากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในรุ่นลูก จากการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของพ่อและแม่ แล้วนำข้อมูลความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่งจากประชากรที่ทำการศึกษา (ตารางผนวกที่ 2) มาประเมินความสัมพันธ์ทางสายเลือด โดยวิเคราะห์หาค่า Probability of Exclusion (PE) (Weir, 1996) พบว่าค่า PE มีค่าสูงสุดที่ตำแหน่ง ORCT33 (0.9604) ในกล้วยไม้ลูกผสมโคลนที่ 1 ถึง โคลนที่ 7 (ตารางที่ 5) สามารถบอกความน่าจะเป็นในการคัดต้นพ่อที่เป็นเท็จออกได้มากที่สุด คือ 96.04% ส่วนดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีค่า PE ต่ำสุด คือ ตำแหน่ง ORCT40 ในกล้วยไม้ลูกผสมโคลนที่ 1, 2 และ 3 (0.6084, 0.6084 และ 0.4624) สามารถบอกความน่าจะเป็นในการคัดต้นพ่อที่เป็นเท็จออกได้ 60.84%, 60.84% และ 46.24% และตำแหน่ง ORCA165 ในกล้วยไม้ลูกผสมโคลนที่ 4, 5, 6 และ 7 (0.7056, 0.7056, 0.7056 และ 0.7056) (ตารางที่ 5) สามารถบอกความน่าจะเป็นในการคัดต้นพ่อที่เป็นเท็จออกได้ 70.56% เมื่อเพิ่มจำนวนตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบมากขึ้น

ค่า PE ที่ประเมินได้ก็มีค่าเพิ่มขึ้นด้วย สามารถบอกความน่าจะเป็นในการคัดต้นพ่อที่เป็นที่จออก  
ได้สูงขึ้นดังตารางที่ 5

เมื่อพิจารณาลักษณะทางฟีโนไทป์ พบว่ากล้วยไม้ลูกผสมที่เกิดจากพันธุ์ *D. Burana Jade* x  
{*(D. Sri-Racha* x *D. Snowfire)* x *D. bigibbum var compactum*} ทั้ง 7 โคลน มีลักษณะทาง  
ฟีโนไทป์ ได้แก่ รูปทรงของลำต้น ใบ ดอก และลักษณะการเจริญเติบโตทางด้านข้าง ที่แตกต่างกัน  
โดยพบว่าโคลนที่ 1, 3, 4 และ 5 มีลักษณะทรงต้นสูงยาว ส่วนในโคลนที่ 2, 6 และ 7 มีลักษณะทรง  
ต้นเตี้ย ในโคลนที่ 1, 3, 4, 5 และ 6 มีลักษณะของใบเรียวยาว ส่วนโคลนที่ 7 มีลักษณะของใบกว้าง  
และสั้น ส่วนดอกพบว่ามีเพียง 2 โคลนเท่านั้น ที่สามารถออกดอกได้หลังทำการย้ายปลูก คือ โคลน  
ที่ 1 และ 7 โดยดอกตูมจะมีกลีบดอกเป็นสีขาวอมเขียว เมื่อดอกเริ่มบานสีเขียวยจะค่อย ๆ จางลง  
ปรากฏให้เห็นสีของกลีบดอกมีสีขาวอมชมพู ลักษณะรูปทรงของดอก สีของกลีบดอก และกลีบ  
ปากของทั้ง 2 โคลน มีความแตกต่างกัน โดยโคลนที่ 1 จะมีกลีบดอกสีขาวอมชมพู กลีบปากสีม่วง  
แดง และ โคลนที่ 7 กลีบดอกมีสีขาว กลีบปากมีสีม่วงแดงเข้มกว่าโคลนที่ 1 ทั้งสองโคลนมีการหลุด  
ร่วงของดอกง่ายหลังจากดอกบาน การเจริญเติบโตทางด้านข้างพบว่า โคลนที่ 6 มีการแตกกอของ  
ลำลูกกล้วยมากกว่าโคลนอื่น ๆ ส่วนโคลนที่ 2 พบว่า อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของโรคที่เกิดจาก  
เชื้อรา เช่น โรคเน่าดำ ใบจุด จึงเกิดการชะงักการเจริญเติบโต (ภาพที่ 7)

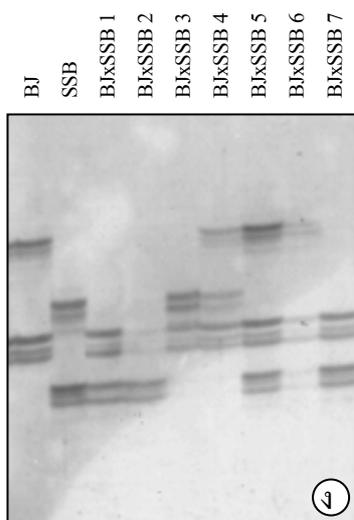


ภาพที่ 6 ความแตกต่างระหว่างจีโนมไทป์ของพันธุ์ *D. Burana Jade* และพันธุ์ (*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum* และการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ไปสู่ลูกในกล้วยไม้พันธุ์ผสม *D. Burana Jade* x (*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum* จำนวน 7 โคลน โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ORCA40 (ก), ORCA63 (ข), ORCA165 (ค), ORCT33 (ง) และ ORCT40 (จ)

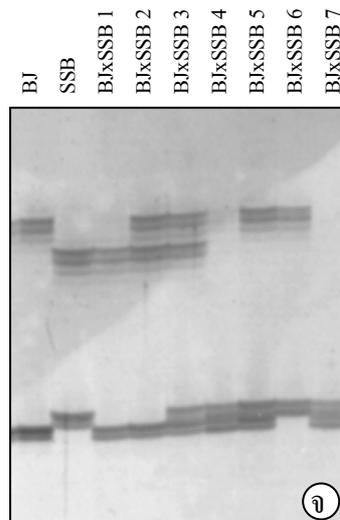
BJ = *D. Burana Jade* เป็นแม่พันธุ์

SSB = (*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum* เป็นพ่อพันธุ์

BJ x SSB 1-7 = ลูกผสมระหว่างพันธุ์ *D. Burana Jade* x (*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum* โคลนที่ 1 ถึงโคลนที่ 7



**ORCT33**



**ORCT40**

ภาพที่ 6 (ต่อ)

ตารางที่ 5 ค่า Probability of Exclusion (PE) ของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง และค่า PE ร่วมกัน โดยเพิ่มจำนวนที่ละ 1 ตำแหน่ง เรียงลำดับจากค่า PE มากไปหาน้อย เมื่อใช้ ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ORCA40, ORCA63, ORCA165, ORCT33 และ ORCT40 เพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจาก พ่อแม่ไปสู่ลูก ในกล้วยไม้พันธุ์ผสม *D. Burana Jade* x (*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum* จำนวน 7 โคลน

ลำดับที่	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	BJ x SSB โคลนที่ 1				
		1 ตำแหน่ง	2 ตำแหน่ง	3 ตำแหน่ง	4 ตำแหน่ง	5 ตำแหน่ง
1	ORCT33	0.9604	0.9604	0.9604	0.9604	0.9604
2	ORCA63		0.9604	0.9604	0.9604	0.9604
3	ORCA40			0.8836	0.8836	0.8836
4	ORCA165				0.7056	0.7056
5	ORCT40					0.6084
ค่า PE ร่วม		0.9604	0.9984	0.9998	0.9999	0.9999

ลำดับที่	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	BJ x SSB โคลนที่ 2				
		1 ตำแหน่ง	2 ตำแหน่ง	3 ตำแหน่ง	4 ตำแหน่ง	5 ตำแหน่ง
1	ORCT33	0.9604	0.9604	0.9604	0.9604	0.9604
2	ORCA63		0.8649	0.8649	0.8649	0.8649
3	ORCA40			0.8281	0.8281	0.8281
4	ORCA165				0.7056	0.7056
5	ORCT40					0.6084
ค่า PE ร่วม		0.9604	0.9946	0.9991	0.9997	0.9999

## ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับที่	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	BJ x SSB โคลนที่ 3				
		1 ตำแหน่ง	2 ตำแหน่ง	3 ตำแหน่ง	4 ตำแหน่ง	5 ตำแหน่ง
1	ORCT33	0.9604	0.9604	0.9604	0.9604	0.9604
2	ORCA40		0.9409	0.9409	0.9409	0.9409
3	ORCA63			0.8281	0.8281	0.8281
4	ORCA165				0.4900	0.4900
5	ORCT40					0.4624
ค่า PE รวม		0.9604	0.9976	0.9996	0.9998	0.9999

ลำดับที่	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	BJ x SSB โคลนที่ 4				
		1 ตำแหน่ง	2 ตำแหน่ง	3 ตำแหน่ง	4 ตำแหน่ง	5 ตำแหน่ง
1	ORCT33	0.9604	0.9604	0.9604	0.9604	0.9604
2	ORCA40		0.8836	0.8836	0.8836	0.8836
3	ORCA63			0.8649	0.8649	0.8649
4	ORCT40				0.8100	0.8100
5	ORCA165					0.7056
ค่า PE รวม		0.9604	0.9954	0.9994	0.9999	0.9999

ลำดับที่	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	BJ x SSB โคลนที่ 5				
		1 ตำแหน่ง	2 ตำแหน่ง	3 ตำแหน่ง	4 ตำแหน่ง	5 ตำแหน่ง
1	ORCT33	0.9604	0.9604	0.9604	0.9604	0.9604
2	ORCA63		0.9604	0.9604	0.9604	0.9604
3	ORCA40			0.9409	0.9409	0.9409
4	ORCT40				0.8100	0.8100
5	ORCA165					0.7056
ค่า PE รวม		0.9604	0.9984	0.9999	0.9999	0.9999

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับที่	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	BJ x SSB โคลนที่ 6				
		1 ตำแหน่ง	2 ตำแหน่ง	3 ตำแหน่ง	4 ตำแหน่ง	5 ตำแหน่ง
1	ORCT33	0.9604	0.9604	0.9604	0.9604	0.9604
2	ORCA63		0.8649	0.8649	0.8649	0.8649
3	ORCA40			0.8281	0.8281	0.8281
4	ORCT40				0.8100	0.8100
5	ORCA165					0.7056
ค่า PE รวม		0.9604	0.9946	0.9991	0.9998	0.9999

ลำดับที่	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย	BJ x SSB โคลนที่ 7				
		1 ตำแหน่ง	2 ตำแหน่ง	3 ตำแหน่ง	4 ตำแหน่ง	5 ตำแหน่ง
1	ORCT33	0.9604	0.9604	0.9604	0.9604	0.9604
2	ORCA63		0.9604	0.9604	0.9604	0.9604
3	ORCA40			0.9409	0.9409	0.9409
4	ORCT40				0.8100	0.8100
5	ORCA165					0.7056
ค่า PE รวม		0.9604	0.9984	0.9999	0.9999	0.9999



ภาพที่ 7 ลักษณะทางฟีโนไทป์ของกล้วยไม้พันธุ์ผสม *D. Burana Jade* x (*D. Sri-Racha* x *D.*

*Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum* (BJ x SSB) จำนวน 7 โคลน;

ก: BJ x SSB โคลนที่ 1

ข: BJ x SSB โคลนที่ 6

ข: BJ x SSB โคลนที่ 2

ช: BJ x SSB โคลนที่ 7

ค: BJ x SSB โคลนที่ 3

ซ: BJ x SSB โคลนที่ 1 (ดอก)

ง: BJ x SSB โคลนที่ 4

ฌ: BJ x SSB โคลนที่ 7 (ดอก)

จ: BJ x SSB โคลนที่ 5

## วิจารณ์

### การตรวจสอบความแตกต่างในระดับจีโนไทป์ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์

เมื่อตรวจสอบความแตกต่างของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าทั้งหมด 19 พันธุ์ จำนวน 24 accessions ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์จำนวนทั้งหมด 40 ตำแหน่ง ไม่พบความแตกต่างในระดับจีโนไทป์ 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ORCA13, ORCT2 และ ORCT5 (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่า ดีเอ็นเอเครื่องหมายบริเวณนี้ไม่เกิดความแปรปรวนของลำดับเบสซ้ำ จึงไม่สามารถนำดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่งนี้มาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ได้

ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สามารถบอกความแตกต่าง และอ่านผลได้ผลชัดเจนทั้งหมด 15 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3) สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ได้ ส่วนที่เหลือให้ผลไม่ชัดเจน จำเป็นต้องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิหรือองค์ประกอบอื่น ๆ ในขั้นตอนการทำ PCR ให้เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไป

จากการประเมินค่า Expected Heterozygosity (He) โดยเฉลี่ยของประชากรนี้ มีค่าเท่ากับ 0.74 (ตารางที่ 3) ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง แสดงให้เห็นว่า กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าในประชากรนี้ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากเป็นกล้วยไม้พันธุ์ผสมที่ได้รับการผสมข้ามระหว่างชนิด (species) หรือระหว่างหมวด (section) เพื่อลดความอ่อนแอในรุ่นลูกที่เกิดจากการผสมเลือดชิด (inbreeding) (Kamemoto *et al.*, 1999)

ส่วนค่า Polymorphism Information Content (PIC) เป็นค่าที่ใช้วัดความแตกต่างทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง (Shet *et al.*, 2000) พบว่า มีค่า PIC อยู่ในช่วงประมาณ 0.3206-0.8845 โดยเฉลี่ยมีค่า PIC ประมาณ 0.7172 (ตารางที่ 3) แสดงว่า ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์นี้ สามารถบอกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ได้ดี โดยตำแหน่งที่มีค่า PIC ค่อนข้างสูง แสดงว่ามีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง สามารถบอกความแตกต่างได้ดี จึงควรเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่งนั้น ๆ มาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม และจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายต่อไป

การประเมินค่าความน่าจะเป็นในการจำแนกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์โดยสุ่ม (Probability of Identity, PI) เพื่อให้ทราบโอกาสที่จะพบสิ่งมีชีวิต 2 ชนิดที่มีจีโนไทป์เหมือนกัน ณ ดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่งนั้น ๆ (Kaul *et al.*, 2001) พบว่า ค่า PI มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.0227 ที่ตำแหน่ง ORCT58 และสูงสุดเท่ากับ 0.4642 ที่ตำแหน่ง ORCT 69 (ตารางที่ 3) แสดงว่า มีโอกาสที่จะพบกล้วยไม้ที่มีจีโนไทป์เหมือนกันที่ตำแหน่ง ORCT58 เป็น 1 ใน 44 และตำแหน่ง ORCT 69 เป็น 1 ใน 2 ซึ่งค่า PI ยิ่งต่ำ โอกาสที่จะพบจีโนไทป์เหมือนกันก็ยิ่งน้อยลง จากความถี่ของอัลลีลภายในประชากร เมื่อทำการตรวจสอบความแตกต่าง โดยใช้จำนวนตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบเพิ่มมากขึ้น และดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งมีการกระจายตัวอย่างอิสระ ค่า PI ก็จะลดลง และมีโอกาสพบกล้วยไม้ที่มีจีโนไทป์เหมือนกันน้อยลง โดยถ้าทำการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ทั้งหมด 15 ตำแหน่ง จะมีโอกาสพบกล้วยไม้ที่มีจีโนไทป์เหมือนกันเท่ากับ 1 ใน  $10^{16}$  (ตารางที่ 4)

แม้ว่าการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม โดยใช้จำนวนตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมายเพิ่มมากขึ้น จะมีความละเอียดแม่นยำสูงขึ้น แต่ก็จำเป็นต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นจึงควรพิจารณาเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีค่า PIC สูง เพราะสามารถบอกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ดี และค่า PI ต่ำ เพื่อสามารถบอกความน่าจะเป็นที่จะพบกล้วยไม้ที่มีจีโนไทป์เหมือนกันทุกตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมาย จากข้อมูลของประชากรกล้วยไม้ที่ทำการศึกษา พบว่า ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีค่า PIC สูงสุด และค่า PI ต่ำสุด 6 ตำแหน่ง คือ ORCT58, ORCA40, ORCT52, ORCT72, ORCA165 และ ORCT40 เมื่อประเมินค่า PI รวมกันทั้ง 6 ตำแหน่ง พบว่ามีค่าเท่ากับ  $1.11 \times 10^{-9}$  คือ มีโอกาสที่จะพบกล้วยไม้ที่มีจีโนไทป์เหมือนกัน 6 ตำแหน่งนั้น 1 ใน  $8.96 \times 10^8$  (ตารางที่ 4) จากฐานข้อมูลกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ผสมที่ได้รับการจดทะเบียนพันธุ์ ณ สมาคมพืชสวน ประเทศอังกฤษ (The Royal Horticultural Society, London) โดยคนไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2502-2541 มีอยู่ประมาณ 251 พันธุ์ (มานิตย์, 2547) และกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ผสมที่ได้รับการจดทะเบียนพันธุ์ทั่วโลกในปี 2545 จากฐานข้อมูล Wildcatt Orchids Database (1994-2002) มีอยู่ประมาณ 9,900 กว่าพันธุ์ ดังนั้นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีอยู่เพียง 6 ตำแหน่ง ก็สามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์แต่ละพันธุ์ได้เป็นอย่างดี

เมื่อประเมินค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ของค่า PIC และค่า PI ซึ่งเป็นค่าที่บอกความสัมพันธ์ของทั้งสองข้อมูลว่ามีความสัมพันธ์กันหรือไม่ และมีความสัมพันธ์กันในทิศทางใด (สุรพล, 2548) พบว่า มีค่า r เท่ากับ  $-0.9885$  ซึ่งแสดงว่า ค่า PIC และค่า PI มี

ความสัมพันธ์กันค่อนข้างสูง ในทิศทางตรงกันข้าม ดังนั้นจึงสามารถพิจารณาเลือกดีเอ็นเอ เครื่องหมายจากค่า PIC หรือค่า PI เพียงอย่างเดียวมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างได้ โดย ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีค่า PIC สูงหรือค่า PI ต่ำ สามารถนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่าง ระหว่างจีโนไทป์ได้ดี

### การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า 19 พันธุ์ 24 accessions (ตารางที่ 1) โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 15 ตำแหน่ง (ตารางที่ 3) พบว่า สามารถจัดกลุ่มแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในรูปแบบภูมิต้นไม้ (ภาพที่ 4) บอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้พันธุ์ต่าง ๆ ได้ โดยพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Daeng Vasana', *Dendrobium Sonia* 'Earsakul'-1, *Dendrobium Sonia* 'Earsakul'-2, *Dendrobium Sonia* 'Red Joe' -1, *Dendrobium Sonia* 'Red Joe' -2, *Dendrobium Sonia* 'Red Joe'-3, *Dendrobium Sonia* 'No.17'-1 และพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'No.17'-2 มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมแสดงค่า SI อยู่ระหว่าง 0.60-1.00 พันธุ์ *Dendrobium Caesar* (2N) และ *Dendrobium Caesar* (4N) มีค่า SI เท่ากับ 1.00 ส่วนพันธุ์อื่นๆ ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันออกไป มีค่า SI ระหว่างกันลดลง โดยพบว่าพันธุ์ (*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum* มีลักษณะทางพันธุกรรมต่างไปจากพันธุ์อื่นๆ มากที่สุด โดยมีค่า SI เท่ากับ 0.16

กล้วยไม้ในกลุ่มพันธุ์ *Dendrobium Sonia* ซึ่งมีพ่อแม่พันธุ์มาจากพันธุ์เดียวกัน สามารถแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยมีความแตกต่างกันในระดับจีโนไทป์ ในกรณีที่เป็นพันธุ์ลูกผสมเดียวกัน แต่เกิดการกลายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม (somaclonal variation) ได้พันธุ์ใหม่ขึ้นมา จึงตั้งชื่อพันธุ์ใหม่อยู่ระหว่างเครื่องหมายฝันทอง ขึ้นต้นด้วยตัวอักษรตัวใหญ่ (กรรชิต, 2547) ได้แก่ พันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'No.17', *Dendrobium Sonia* 'Red Joe', *Dendrobium Sonia* 'Earsakul' และพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Daeng Vasana' ซึ่งกลายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาจากพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'No.17' (นิรนาม, 2548)

จากการศึกษาพบว่าพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Earsakul' (BES-1) มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Red Joe' (BJR-1 และ BJR-2) และ BES-2 มีความใกล้ชิด

กันกับ BJR-3 (ภาพที่ 4) ซึ่งแสดงว่า กล้ายไม้พันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Earsakul' มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Red Joe' ซึ่งมีพ่อแม่พันธุ์มาจากพันธุ์เดียวกัน โดยพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Earsakul' ได้รับการพัฒนาพันธุ์มาจากพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Red Joe' ส่วนพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Red Joe' นั้นได้รับการพัฒนาพันธุ์มาจากพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'No.17' ซึ่งเป็นกล้ายไม้ลูกผสมที่มีพ่อแม่พันธุ์มาจากพันธุ์เดียวกันเช่นกัน เมื่อทำการขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จึงเกิดการกลายพันธุ์ได้โคลนใหม่ที่มีลักษณะดีเด่นกว่าพันธุ์เดิม จึงคัดเลือกพันธุ์ และตั้งชื่อพันธุ์ใหม่ขึ้นมา

ส่วนพันธุ์ที่มีชื่อเดียวกัน แต่มาจากแหล่งปลูกต่างกัน หรือคนละโคลนกัน ได้แก่ พันธุ์ *Dendrobium* Ekapol 'Anna', *Dendrobium Sonia* 'No.17', *Dendrobium Sonia* 'Red Joe' และ *Dendrobium Sonia* 'Earsakul' (ตารางที่ 1) มีความแตกต่างกันในระดับจีโนมไทป์ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก 1.) การกลายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณ ในพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้ จะมีความแปรปรวนภายในประชากรสูงขึ้น เมื่อจำนวนรอบในการสร้างกลับเป็นต้นใหม่เพิ่มขึ้น (Cote *et al.*, 2001) 2.) อาจมาจากพ่อแม่พันธุ์เดียวกัน แต่ต่างโคลนกัน นำมาผสมพันธุ์กัน แล้วตั้งชื่อพันธุ์ผสมเหมือนกัน จึงต้องดูลักษณะทางฟีโนไทป์ประกอบกันด้วยว่า มีลักษณะเหมือนกันหรือไม่ เพราะบางพันธุ์มีชื่อพันธุ์เหมือนกัน แต่มาจากพ่อแม่พันธุ์ต่างโคลนกัน และ 3.) ลักษณะทางฟีโนไทป์เหมือนกัน และมีชื่อเรียกเป็นพันธุ์เดียวกัน แต่เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่ามีความแตกต่างกันในระดับจีโนมไทป์ อาจเกิดจากความแปรปรวนทางพันธุกรรมบริเวณ non-coding จึงไม่มีผลต่อการแสดงออกของลักษณะทางฟีโนไทป์ (Anonymous, 2006)

ในกรณีที่พันธุ์เดียวกันมาจากแหล่งปลูกต่างกันในกลุ่มพันธุ์ *Dendrobium Sonia* สามารถจัดแบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1.) พันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'No.17' (B17-1) มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Earsakul' (BES-1) และพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Red Joe' (BJR-1 และ BJR-2) และ 2.) พันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'No.17' (B17-2) มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมกับพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Daeng Vasana', พันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Earsakul' (BES-2) และพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Red Joe' (BJR-3) (ภาพที่ 4) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'No.17' อาจเป็นคนละโคลนกัน จึงมีลักษณะทางจีโนมไทป์ต่างกัน สามารถจัดกลุ่มย่อยแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ออกเป็น 2 กลุ่ม แต่ยังคงมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ทั้งนี้จึงควรดูลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แสดงออกประกอบการพิจารณาด้วย จะทำให้ได้รับข้อมูลที่มีความละเอียดแม่นยำเพิ่มขึ้น

เมื่อตรวจสอบความแตกต่างของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ *Dendrobium Caesar* (2N) และพันธุ์ *Dendrobium Caesar* (4N) ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์ทั้งหมด 15 ตำแหน่ง พบว่า ทุกตำแหน่งมีขนาดอัลลีลเท่ากัน (ภาพที่ 1) แสดงให้เห็นว่า กล้วยไม้พันธุ์ *Dendrobium Caesar* (4N) เป็นกล้วยไม้ที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของ *Dendrobium Caesar* (2N) ซึ่งเป็นลูกผสมข้ามชนิด (species) ที่มีจีโนมต่างชนิดกัน (diploid hybrid) ทำให้กล้วยไม้พันธุ์ *Dendrobium Caesar* (4N) มีชุดโครโมโซมเป็นแบบ Allotetraploid (Kamemoto, 1998) ซึ่งจีโนมที่มีความแตกต่างกันของลูกผสมข้ามระหว่างชนิด (interspecific hybrid) ใน *Dendrobium Caesar* (2N) อาจทำให้เกิดความเป็นหมันได้ เพราะโครโมโซมไม่สามารถเข้าคู่กันได้ อย่างสมบูรณ์ จึงต้องทำการเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมด้วยสารโคลชิซิน เพื่อลดความเป็นหมันของต้นลูกผสม และใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ต่อไป (ครรชิต, 2547) ทั้งนี้สามารถศึกษาลักษณะทางคาโอไทป์ หรือฟีโนไทป์ประกอบ เพื่อทำการตรวจสอบสมมติฐานได้ถูกต้อง และแม่นยำยิ่งขึ้น

การตรวจสอบค่า Bootstrap value เป็นการประเมินความเชื่อมั่นทางสถิติของกิ่งสาขาของแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการสุ่มกลับตัวอย่าง (resampling) ของข้อมูล สร้างเป็นแผนภูมิจากจำนวนครั้ง (replication) ของการสุ่ม ประมวลออกมาเป็นค่าความน่าจะเป็นของโอกาสที่จะเกิดกิ่งสาขาในรูปแบบต่าง ๆ เป็นเปอร์เซ็นต์ เพื่อบอกอัตราการเกิดความแปรปรวนในการจัดกลุ่ม (Nei and Kumar, 2000)

จากการประเมินค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ โดยวิธี Bootstrap testing พบว่า ระหว่างพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Earsakul'-2 กับพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Red Joe'-3 และพันธุ์ *Dendrobium Caesar* (2N) กับพันธุ์ *Dendrobium Caesar* (4N) มีค่า Bootstrap value เท่ากับ 100 จากการสุ่มข้อมูล 1,000 ครั้ง (replicates) แสดงให้เห็นว่า ไม่มีการกระจายตัวของข้อมูล จึงไม่เกิดความแปรปรวนในการจัดกลุ่ม หากทำการสุ่มจัดกลุ่มใหม่ 1,000 ครั้ง จะมีโอกาสพบกิ่งสาขาย่อยรูปแบบนี้เกิดขึ้น 100% ของจำนวนครั้งที่สุ่ม

ส่วนในบางกิ่งสาขาที่มีค่า Bootstrap value ลดลงมา แสดงว่า มีโอกาสที่จะแสดงภาพแผนภูมิในรูปแบบอื่นๆ ได้ แต่แผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ดีที่สุด จะถูกสร้างขึ้นภายใต้หลักการสุ่มกลับมาสร้างใหม่ (reconstruction) ดังนั้นถ้าภายในกิ่งสาขาย่อยของแผนภูมิไม่ได้รับการสนับสนุนจากค่า Bootstrap value แผนภูมินั้นก็ไม่ควรตัดทิ้ง เพราะนั่นคือสมมติฐานของแผนภูมิ ซึ่งต้องมีแผนภูมิ 1 แบบที่ถูกต้อง แม้ว่าค่า Bootstrap value จะต่ำ จากการประมวลผลด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ ส่วนค่า Bootstrap value ที่มีค่าสูง เป็นการรับประกันว่า

แผนภูมินั้นควรจะมียุทธวิธีแบบของกิ่งสาขาแบบนี้ โดยตัดความเป็นไปได้จากปัจจัยอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องทิ้งไป (Nei and Kumar, 2000)

ส่วนการจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างจีโนไทป์ โดยการวิเคราะห์ PCoA ออกมาในรูปแบบของกราฟสมการเชิงเส้น 3 มิติ บอกระยะพิคคของกล้วยไม้แต่ละจีโนไทป์ ช่วยเพิ่มมิติของภาพ และลดความซับซ้อนของข้อมูลที่มีจำนวนมาก ทำให้สามารถเข้าใจได้ง่ายขึ้น (Elmaci, 1999) โดยพันธุ์ที่มีพิคคอยู่บนแกนของกราฟใกล้เคียงกัน ได้แก่ พันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'Daeng Vasana', *Dendrobium Sonia* 'Earsakul'-1, *Dendrobium Sonia* 'Earsakul'-2, *Dendrobium Sonia* 'Red Joe' -1, *Dendrobium Sonia* 'Red Joe' -2, *Dendrobium Sonia* 'Red Joe'-3, *Dendrobium Sonia* 'No.17'-1 และพันธุ์ *Dendrobium Sonia* 'No.17'-2 สามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (ภาพที่ 5) ส่วนพันธุ์ *Dendrobium Caesar* (2N) และ *Dendrobium Caesar* (4N) มีตำแหน่งของพิคคอยู่บนแกนของกราฟที่ระดับเดียวกัน (ภาพที่ 5) แสดงว่าไม่มีความแปรปรวนของข้อมูลของอัลลีลแต่ละตำแหน่ง แสดงความสัมพันธ์ของข้อมูลสอดคล้องกับการแสดงภาพแผนภูมิต้นไม้ (2 มิติ) เนื่องจากข้อมูลที่น่าวิเคราะห์เป็นข้อมูลเดียวกัน แต่มีการนำเสนอออกมาในรูปแบบ 2 มิติ และ 3 มิติ เพื่อให้สามารถเข้าใจได้ง่ายขึ้น

การจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า 24 accessions ในรูปแผนภูมิต้นไม้ (2มิติ) และกราฟสมการเชิงเส้น (3มิติ) แสดงผลการวิเคราะห์ที่สอดคล้องกัน โดยในแต่ละจีโนไทป์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม สามารถจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ เมื่อวิเคราะห์ PcoA ออกมาในรูปแบบกราฟสมการเชิงเส้น (3 มิติ) สามารถลดความซับซ้อนของข้อมูลที่มีปริมาณมากได้ (Elmaci, 1999) ทำให้สามารถเข้าใจได้ง่ายขึ้น นำมาใช้ในการจัดกลุ่มแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรม และบอกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ เพื่อจำแนกพันธุ์ และจัดทำฐานข้อมูลทางพันธุกรรมสำหรับงานปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายต่อไปในอนาคต

ทั้งนี้การประเมินค่าทางสถิติต่าง ๆ อยู่บนพื้นฐานของทฤษฎีสถิติประชากรของ Hardy-Weinberg ซึ่งประชากรอยู่ในสภาพดิพลอยด์ และดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งกระจายตัวกันอย่างอิสระ เนื่องจากขณะนี้กำลังอยู่ในขั้นตอนการศึกษาแผนที่โครโมโซมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า ซึ่งในอนาคตจะสามารถทราบตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละชนิด และทำการคัดเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายที่กระจายตัวอย่างอิสระมาใช้ตรวจสอบความแตกต่างได้ละเอียดมาก

ขึ้น นอกจากนั้นอาจใช้เทคนิคชีวโมเลกุลในการจำแนกความเป็นโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกต ทำให้สามารถคำนวณความถี่ของอัลลีลได้แม่นยำขึ้น

จากข้อมูลข้างต้นพบว่ากล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าในประชากรนี้ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง สามารถนำดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ มาใช้ในการจำแนกความแตกต่างในระดับจีโนไทป์ของกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ และใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ตรวจประวัติทางพันธุกรรม และสร้างแผนที่โครโมโซม เพื่อใช้ในการงานปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายต่อไป

### การตรวจประวัติทางพันธุกรรม

จากการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพ่อแม่และลูก ในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ผสมที่เกิดจากพันธุ์ *D. Burana Jade* x  $\{(D. Sri-Racha \times D. Snowfire) \times D. bigibbum \text{ var } compactum\}$  จำนวน 7 โคลน โดยมีพันธุ์ *D. Burana Jade* เป็นแม่พันธุ์ และพันธุ์  $(D. Sri-Racha \times D. Snowfire) \times D. bigibbum \text{ var } compactum$  เป็นพ่อพันธุ์ พบว่า กล้วยไม้ทั้งหมด 7 โคลน เป็นลูกผสมที่เกิดจากพันธุ์ *D. Burana Jade* x  $\{(D. Sri-Racha \times D. Snowfire) \times D. bigibbum \text{ var } compactum\}$  เนื่องจากมีแถบดีเอ็นเอของพ่อและแม่ปรากฏอยู่ในต้นลูกผสมทั้งหมด (ภาพที่ 6) ถ้าโคลนนั้นไม่ใช่ลูกผสม จะมีแถบดีเอ็นเอของแม่ และแถบดีเอ็นเออื่นที่ไม่ใช่พ่อปรากฏ หรือไม่มีแถบดีเอ็นเอของพ่อหรือแม่เลยก็ได้ (ณัญญา, 2546)

ทำการประเมินค่า PE เพื่อบอกความเป็นไปได้ในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของพ่อโดยสุ่มไปยังลูก (Weir, 1996) โดยค่า PE ของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งขึ้นอยู่กับจำนวนความถี่ของอัลลีล ณ ตำแหน่งนั้น ๆ (Curi *et al.*, 2002) บนสมมติฐานสมคูลประชากรของ Hardy-Weinberg และดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งมีการกระจายตัวกันอย่างอิสระ (Tomasco *et al.*, 2002)

จากข้อมูลความถี่ของอัลลีล 5 ตำแหน่งดีเอ็นเอเครื่องหมายในประชากร (ตารางผนวกที่ 2) ถูกนำมาใช้ในการคำนวณค่า PE ของกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสม *D. Burana Jade* x  $\{(D. Sri-Racha \times D. Snowfire) \times D. bigibbum \text{ var } compactum\}$  เพื่อบอกความน่าจะเป็นในการคัดต้นพ่อที่เป็นเท็จออกพบว่า ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถบอกความน่าจะเป็นในการคัดต้นพ่อ

ที่เป็นที่ใจออกได้มากที่สุดคือ 96.04% ที่ตำแหน่ง ORCT33 ในกล้วยไม้ลูกผสมต้นที่ 1 ถึงต้นที่ 7 ส่วนดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สามารถบอกความน่าจะเป็นในการคัดต้นพ่อที่เป็นที่ใจออกได้น้อยที่สุดคือ 46.24% (ต้นที่ 3) 60.84% (ต้นที่ 1 และ 2) ที่ตำแหน่ง ORCT40 และ 70.56% (ต้นที่ 4, 5, 6 และ 7) ที่ตำแหน่ง ORCA165 (ตารางที่ 5) โดยค่า PE ที่ประเมินได้นั้น ขึ้นอยู่กับความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่งในประชากรที่ทำการศึกษา เมื่อจำนวนอัลลีลหรือความถี่ของอัลลีล ณ ตำแหน่งนั้น ๆ เพิ่มขึ้น ค่า PE ที่ตำแหน่งนั้นก็เพิ่มขึ้น (Weir, 1996) ทำให้สามารถบอกความน่าจะเป็นในการคัดต้นพ่อที่เป็นที่ใจออกได้มากขึ้นด้วย

เมื่อเพิ่มจำนวนตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบมากขึ้น ก็จะมีค่าความน่าจะเป็นในการคัดพ่อที่เป็นที่ใจออกไปได้มากขึ้นด้วย เช่น ในกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสม *D. Burana Jade* x {(*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum*} ต้นที่ 1 เมื่อทำการตรวจสอบความสัมพันธ์ของความเป็นพ่อโดยสุ่ม ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 1 ตำแหน่ง (ORCT33) สามารถบอกความน่าจะเป็นในการคัดต้นที่เป็นพ่อที่ใจออกไปได้ 96.04% และเมื่อเพิ่มตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมายมากขึ้นเป็น 5 ตำแหน่ง สามารถบอกความน่าจะเป็นได้มากที่สุด 99.99% ส่วนในกล้วยไม้ลูกผสมต้นอื่น ๆ ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน

เมื่อพิจารณาลักษณะทางฟีโนไทป์ (ภาพที่ 7) พบว่า กล้วยไม้ลูกผสมที่เกิดจากพันธุ์ *D. Burana Jade* x {(*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum*} ทั้ง 7 โคลน มีลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ รูปทรงของลำต้น ใบ ดอก และลักษณะการเจริญเติบโตทางด้านข้าง ที่แตกต่างกัน แม้ว่าจะเกิดมาจากพ่อแม่พันธุ์เดียวกัน ในกรณีลูกผสมที่เกิดจากพ่อแม่พันธุ์เดียวกัน และโคลนเดียวกัน มีลักษณะทางฟีโนไทป์แตกต่างกัน เมื่อตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ พบว่า นอกจากจะสามารถบอกความแตกต่างในระดับจีโนไทป์แล้ว ยังสามารถตรวจสอบการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ไปสู่ลูกได้ โดยโคลนที่เป็นลูกผสมจะมีลักษณะทางจีโนไทป์ของพ่อแม่ร่วมกัน สามารถบอกความเป็นลูกผสมที่เกิดจากพันธุ์ *D. Burana Jade* x {(*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum*} ได้ และสามารถตรวจสอบพันธุประวัติได้ว่าโคลนใดมีความสัมพันธ์กันทางสายเลือดระหว่างพ่อแม่และลูก

ดังนั้นการนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ สามารถนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์ ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ไปสู่ลูก ตรวจสอบพันธุประวัติ และจัดทำฐานข้อมูลทางพันธุกรรมสำหรับงานปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายต่อไปได้

## สรุป

จากการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ทั้งหมด 40 ตำแหน่ง ในกล้วยไม้สกุลหวายประชากรนี้ สามารถบอกความแตกต่างได้ชัดเจน 15 ตำแหน่ง คือ ORCA40, ORCA63, ORCA84, ORCA165, ORCT6, ORCT8, ORCT11, ORCT33, ORCT35, ORCT40, ORCT52, ORCT58, ORCT59, ORCT69 และ ORCT72

ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สามารถอ่านผลได้ มีขนาดของอัลลีลอยู่ในช่วงประมาณ 158-402 คู่เบส และมีจำนวนของอัลลีลต่อตำแหน่งโดยเฉลี่ย 6.67 อัลลีล ประเมินค่า Expected Heterozygosity (He) จากข้อมูลความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่ง พบว่า มีค่า He อยู่ระหว่าง 0.35 ที่ตำแหน่ง ORCT69 ถึง 0.89 ที่ตำแหน่ง ORCA40 และ ORCT58 โดยมีค่า He เฉลี่ยประมาณ 0.74 แสดงว่ากล้วยไม้ในประชากรที่ศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง

มีค่า Polymorphism Information Content (PIC) อยู่ในช่วงประมาณ 0.3206-0.8845 ตำแหน่งที่มีค่า PIC สูงสุดเท่ากับ 0.8845 คือ ORCT58 และต่ำสุดเท่ากับ 0.3206 คือ ORCT69 โดยเฉลี่ยมีค่า PIC ประมาณ 0.7172 ซึ่งมีค่า PIC ค่อนข้างสูง สามารถบอกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ได้ดี จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรม และจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายต่อไปได้

ค่า Probability of Identity (PI) มีค่าต่ำสุดเท่ากับ 0.0227 ที่ตำแหน่ง ORCT58 และสูงสุดเท่ากับ 0.4642 ที่ตำแหน่ง ORCT 69 แสดงว่า มีโอกาสที่จะพบกล้วยไม้ที่มีจีโนไทป์เหมือนกันที่ตำแหน่ง ORCT58 เป็น 1 ใน 44 และตำแหน่ง ORCT 69 เป็น 1 ใน 2 และมีค่า PI รวมทั้ง 15 ตำแหน่งดีเอ็นเอเครื่องหมายเท่ากับ  $8.66 \times 10^{-17}$  มีโอกาสที่จะพบกล้วยไม้ที่มีจีโนไทป์เหมือนกันทุกตำแหน่ง 1 ใน  $10^{16}$

เมื่อประเมินค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient, r) ของค่า PIC และค่า PI เท่ากับ  $-0.9885$  ซึ่งแสดงว่า ค่า PIC และค่า PI มีความสัมพันธ์กันค่อนข้างสูง ในทิศทางตรงกันข้าม ดังนั้นจึงสามารถพิจารณาเลือกดีเอ็นเอเครื่องหมายจากค่า PIC หรือค่า PI เพียงอย่างเดียวมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างได้

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด ไมโครแซทเทลไลท์ 15 ตำแหน่ง สามารถจำแนกความแตกต่างทางจีโนไทป์ได้ โดยมีโอกาสพบกล้วยไม้ที่มีจีโนไทป์เหมือนกันทั้ง 15 ตำแหน่งเท่ากับ  $1$  ใน  $10^{16}$  และบอกความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ได้ โดยมีค่าดัชนีความเหมือนตั้งแต่ 0.16 ถึง 1.00 สามารถนำข้อมูลแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ มาใช้เป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมในงานปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายต่อไปได้

เมื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมในระดับจีโนไทป์ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ลูกผสมที่เกิดจาก *D. Burana Jade* x  $\{(D. Sri-Racha$  x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum* } จำนวน 7 โคลน ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด ไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง ได้แก่ ORCA40, ORCA63, ORCA165, ORCT33 และ ORCT40 พบว่าค่า PE มีค่าสูงสุดที่ตำแหน่ง ORCT33 (0.9604) ในกล้วยไม้ลูกผสมต้นที่ 1 ถึงต้นที่ 7 ส่วนดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีค่า PE ต่ำสุดคือตำแหน่ง ORCT40 ในกล้วยไม้ลูกผสมต้นที่ 1, 2 และ 3 (0.6084, 0.6084 และ 0.4624) และตำแหน่ง ORCA165 ในกล้วยไม้ลูกผสมต้นที่ 4, 5, 6 และ 7 (0.7056, 0.7056, 0.7056 และ 0.7056) ซึ่งค่า PE ที่ประเมินได้นั้น ขึ้นอยู่กับจำนวนอัลลีลหรือความถี่ของอัลลีล ณ ตำแหน่งนั้น ๆ เมื่อจำนวนอัลลีลหรือความถี่ของอัลลีลเพิ่มขึ้น ค่า PE ณ ตำแหน่งนั้นก็เพิ่มขึ้นด้วย

เมื่อเพิ่มจำนวนตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมายในการตรวจสอบมากขึ้น ก็จะมีค่าความน่าจะเป็นในการคัดพ่อที่เป็นเท็จออกไปได้มากขึ้น จึงสามารถนำดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดนี้มาใช้ในการสืบประวัติทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ผสม และตรวจสอบความเป็นลูกผสมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์อื่น ๆ ได้

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ครรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน), กรุงเทพฯ.

ณัฏยา ศรีสวัสดิ์. 2546. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศลูกผสม โดยการใช้เครื่องหมาย Microsatellite. ว. วิทย. กษ. 34 (4-6): 121-128.

นिरนาม. 2548. ข้อมูลพืชที่ขจัดทะเบียนพันธุ์ใหม่. แหล่งที่มา : [http://www.news.cedis.or.th/detail.php?id=524bng=en&group\\_id=1](http://www.news.cedis.or.th/detail.php?id=524bng=en&group_id=1), 10 ตุลาคม 2548.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2543. พันธุศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 398 น.

มานิตย์ ใจกรรจ. 2547. ประวัติการพัฒนากล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ลูกผสม. เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่อง โครงการจัดทำฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* SW.) ที่มีการค้าในประเทศไทย วันที่ 24 พฤศจิกายน 2547. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2548. สถิตินำเข้า-ส่งออก. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. แหล่งที่มา: [http://www.oae.go.th/oae\\_go\\_th/statIm\\_Ex.php](http://www.oae.go.th/oae_go_th/statIm_Ex.php), 10 พฤศจิกายน 2548.

สุภาพ สุนทรนนท์. 2547. การรจําแนกพันธุ์กล้วยไม้ด้วยลายพิมพ์ DNA. เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่อง โครงการจัดทำฐานข้อมูลเชื้อพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* SW.) ที่มีการค้าในประเทศไทย วันที่ 24 พฤศจิกายน 2547. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สุรพล อุปศิษกุล. 2528. สถิติการวางแผนการทดลองเบื้องต้น. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ศิริพร เชื้อจีน. 2546. การศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์และความสมบูรณ์พันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวายบางพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อบจันท์ ไททอง. 2546. **กล้วยไม้เมืองไทย**. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.
- อภิรดา ประชวรวงษ์. 2542. การผลิตเอทิลินของกล้วยสกุลหวายพันธุ์ชิวาร์ดีพลอยด์ และเตตราพลอยด์. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Anonymous. 2003. Measures of genetic diversity. pp. 1-24. In **GCP's Training course on "Plant genetic diversity analysis and marker-assisted breeding": 20 August-4 September 2005**. Center for Agricultural Biotechnology (CAB) Kasetsart University. Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, Thailand.
- Anonymous. 2002. Dendrobium hybrid "Jaquelyn Thomas". Available Source: <http://www.plantoftheweek.org/week167.shtml>, November 18, 2004.
- Anonymous. 2006. Fundamental concepts in genetics. Available Source: <http://www.smd.qmul.ac.uk/statgen/dcurtis/lectures/introgen.html>, January 27, 2006.
- Bessert, M. L. and G. Orti. 2003. Microsatellite loci for paternity analysis in the fathead minnow, *Pimephales promelas* (Teleostei: Cyprinidae). **Mol. Ecol. Notes**. 3: 532-534.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. David. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **Am. J. Hum. Genet.** 32 : 314-331.
- Brown., T.A. 1999. **Genome**. The Bath Press Ltd., United Kingdom.

- Campbell, V.V., G. Rowe, T.J.C. Beebee and M.J. Hutchings. 2002. Isolation and characterization of microsatellite primers for the fragment orchid *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Brown (Orchidaceae). **Cons. Genet.** 3: 209-210.
- Collins, J.E., J.M. Heward, J. Carr-Smith, J. Daykin, J.A. Franklyn and S.C.L. Gough. 2003. Association of a rare Thyroglobulin gene microsatellite variant with autoimmune thyroid disease. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 88 (10): 5039-5042.
- Chauhan, M., A.K. Gupta and S. Dhillon. 2004. Genetic characterization of Indian Spiti horses. **J. Genet.** 83(3): 291-295.
- Cote, F.X., C. Teisson and X. Perrier. 2001. Somaclonal variation rate evolution in plant tissue culture: contribution to understanding through a statistical approach. **Dev. Bio\_Plant.** 37: 539-542.
- Curi, R.A. and C.R. Lopes. 2002. Evaluation of nine microsatellite loci and misidentification paternity frequency in a population of Gyr breed bovines. **Braz. J. vet.Res. anim. Sci.** 39(3): 129-135.
- Dressler, R.L. 1993. **Phylogeny and classification of the orchid family.** Cambridge University Press Inc., Cambridge.
- Flanagan, M. 2004. Microsatellite. Background and Review , pp. 48-51 *In* Summer Genomics Workshop Handbook. **Summer Genomics Workshop June-July 2004.** NSF Potato genome center for plant genomics training and education, Peru.
- Ghislain, M., F. Rodriguez, F. Villamon, J. Nunez, R. Waugh and M. Bonierbabe. 1999. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification. **CIP Program Report 1999-2000.** p 167-174.

- Glenn, T. 2001. MSAT protocols. Available Source: <http://gator.boil.ac.edu/Msats/manual.html>, May 21, 2001.
- Hartl, D. and A.G. Clark. 1997. **Principles of population genetics**. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Hayden, M.J. and P.J. Sharp. 2001. Targeted development of informative Microsatellite (SSR) markers. **Nucleic Acids Res.** 29(8): e44-4.
- Idury, R.M. and L.R. Cardon. 1997. A simple method for automated allele binning in Microsatellite markers. **Genome Res.** 7: 1104-1109.
- Jakabova, D., J. Trandzik, J. Chrastina, L. Hudecova, E. Zetochova, J. Bulla, A. Bugarsky, F. Jakab and P. Kozlik. 2002. Effectiveness of six highly polymorphic microsatellite makers in resolving paternity cases in thorough bred horses in Slovakia. **Czech J. Anim. Sci.** 47 (12): 497-501.
- James, C.M., F. Wilson, A.M. Hadonou and K.R. Tobutt. 2003. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in diploid strawberry (*Fragaria vesca* L.) for mapping, diversity studies and clone identification. **Mol. Ecol. Notes.** 3: 171-173.
- Kamemoto, H., A.R. Kuehnle and T.D. Amore. 1998. *Dendrobium* Lorrie Mortimer, UH1577. **New Plants for Hawaii Dendrobium Cultivar Release 3: NPH-D-3.**
- Kamemoto, H., T.D. Amore and A.R. Kuehnle. 1999. **Breeding Dendrobium orchids in Hawaii.** University of Hawaii Press, Honolulu.
- Kaul, R., A. Singh, R.K. Vijn, M.S. Tandia and R. Behl. 2001. Evaluation of the genetic variability of 13 microsatellite markers in native Indian pigs. **J. Genet.** 80(3): 149-153.

- Kosman, E. and K.J. Leonard. 2005. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid and polyploid species. **Mol. Ecol.** 14: 415-424.
- Kyle, C. 2002. **The evolution of microsatellites**. Available Source: <http://www.biology.ualberta.ca/courses.hp/biol606/Lecture.98.09.Kyle.html>. November 8, 2002.
- Li, C.D., C.A. Fatokun, Bubi, B.B. Singh and G.J. Scoles. 2001. Determining genetic similarities and relationship among cowpea breeding lines and cultivars by microsatellite markers. **Crop. Sci.** 41: 189-197.
- Machado, C.R. and C.F.M. Menck. 1997. Human DNA repair diseases: From genome instability to cancer. **Braz. J. Genet.** 20 (4): ISSN 0100-8455.
- Morris, B. 1994. **Science and Our Future Biotechnology**. Cambridge University Press, Perth.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. **Molecular evolution and phylogenetics**. Oxford University Press, New York.
- Nei, M. and W. Li. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics.** 89: 583-590.
- \_\_\_\_\_. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 76: 5269-5273.
- Pellegrino, G., D. Cafasso, A. Widmer, M. Soliva, A. Musacchio and S. Cozzolino. 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci from the orchid *Serapias vomeracea* (Orchidaceae) and cross-priming to other *Serapias* species. **Mol. Ecol. Notes.** 1: 279-280.

- Poncet, V., P. Hamon, J. Minier, C. Carasco, S. Hamon and M. Noirot. 2004. SSR Cross-amplification and variation within coffee trees (*Coffea* spp.). **Genome**. 47: 1071-1081.
- Rohlf, F.J. 1997. **NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Exeter Software**. (Computer program). Setanket, New York.
- Schelpe, S., J. Stewart. 1990. **Dendrobiums** an introduction to the species in cultivation. Blackmore Press. Shaftesbury, Dorset.
- Selvi, A., N.V. Nair, N. Balasundaram and T. Mohapatra. 2003. Evaluation of maize microsatellite markers for genetic diversity analysis and fingerprinting in sugarcane. **Genome**. 46: 394-403.
- Shete, S., H. Tiwari and R.C. Elston. 2000. On estimating the heterozygosity and polymorphism information content value. **Theor. Popul. Biol.** 57(3): 265-271.
- Soliva, M., B. Gautschi, C. Salzmann, I. Tenzer and A. Widmer. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the orchid *Ophrys araneola* (Orchidaceae) and a test of cross-species amplification. **Mol. Ecol.** 9(12): 2178-2179.
- Tomasco, I., G. Wlasiuk and E.P. Lessa. 2002. Evaluation of polymorphism in ten microsatellite loci in Uruguayan sheep flocks. **Genet. Mol. Biol.** 25(1): 37-41.
- Van Dongen, W. F. D. and R.A. Mulder. 2005 Isolation and characterization of Microsatellite markers for paternity assessment in the golden whistler (*Pachycephala pectoralis*: ares). **Mol. Ecol. Notes**. 5: 4-6.
- Wei. Y.M., Y.C. Hou, Z.H. Yan, W. Wu, Z.Q. zhang, D.C. Liu and Y.L. Zheng. 2005. Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat (*Triticum aestivum* L.) landraces highly resistant to *Fusarium* head blight. **J. Appl. Genet.** 46(1): 3-9.

- Weir, B.S. 1996. **Genetic data analysis II**. Sinauer Associates, Inc. Publishers., Massachsetts.
- Yap, I. V. and R. J. Nelson.1996. **Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms.**  
(Computer program). International Rice Research Institute. Manita, Philippines.
- Zajc, I. And J. Sampson. 1999. Utility of caninin microsatellites in revealing the relationships of pure bred dogs. **J. Hered.** 90(1): 104-107.
- Zehdi, S., M. Trifi, N. Billotte, M. Marrakchi and J. C. Pintaud. 2004. Genetic diversity of Tunisian date palms (*Phoenix dactylifera* L.) revealed by nuclear Microsatellite polymorphism. **Hereditas.** 141: 278-287.
- Zhang, D. P., D. Carbajulca, L. Ojeda, G. Rossel, S. Milla, C. Herrera and M. Ghislain.  
Microsatellite analysis of genetic diversity in sweetpotato varieties from Latin America.  
**CIP Program Report 1999-2000.** p 295-301.

**ภาคผนวก**

**ภาคผนวก ก**  
**การประเมินค่าทางพันธุศาสตร์ประชากร**

## องค์ประกอบทางพันธุกรรมของประชากร

### 1. ความถี่ของอัลลีล

คำนวณความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่ง

$$\text{ความถี่ของอัลลีล } i \text{ ตำแหน่งที่ } A \text{ (} p_i \text{)} = \frac{\text{จำนวนอัลลีล } i \text{ ตำแหน่งที่ } A}{\text{จำนวนอัลลีลทั้งหมดที่ตำแหน่ง } A} \quad (1)$$

### 2. หลักการของ Hardy-Weinberg

เมื่อประชากรมีการผสมพันธุ์แบบสุ่ม ความถี่ของอัลลีล และความถี่ของจีโนไทป์จะคงที่ จากชั่วหนึ่งไปยังอีกชั่วหนึ่ง ภายใต้สมมติฐานสมมูลประชากรดังนี้ (Hartl and Clark, 1997)

- 1.) ประชากรต้องมีขนาดใหญ่
- 2.) มีการผสมพันธุ์โดยสุ่มภายในประชากร
- 3.) ไม่มีการกลายพันธุ์ (mutation) การอพยพ (migration) และการคัดเลือก (selection) ภายในประชากรนั้น
- 4.) แต่ละตำแหน่งไม่อยู่บนโครโมโซมเพศ

		<b>เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้</b>	
		อัลลีล	อัลลีล
		A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
		p <sub>1</sub>	p <sub>2</sub>
เซลล์สืบพันธุ์	อัลลีล	A <sub>1</sub> p <sub>1</sub>	A <sub>1</sub> p <sub>2</sub>
เพศเมีย	ความถี่อัลลีล	A <sub>2</sub> p <sub>1</sub>	A <sub>2</sub> p <sub>2</sub>

ในสภาพสมดุลประชากรภายใต้สมมติฐาน Hardy-Weinberg เมื่อสิ่งมีชีวิตนั้นอยู่ในสภาพดิพลอยด์ และดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งมีการกระจายตัวกันอย่างอิสระ

$$\text{ความถี่ของจีโนไทป์ } A_1A_1 = p_1^2$$

$$\text{ความถี่ของจีโนไทป์ } A_1A_2 = 2p_1 p_2$$

$$\text{ความถี่ของจีโนไทป์ } A_2A_2 = p_2^2$$

### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การประเมินค่าทางสถิติต่างๆ ภายในประชากรที่ทำการศึกษานี้ อยู่บนสมมติฐานสมดุลประชากรของ Hardy-Weinberg และดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งมีการกระจายตัวกันอย่างอิสระ โดยอัลลีลที่เป็นโฮโมโลกัสกันอยู่ในสภาพดิพลอยด์

#### 1. การประเมินค่า Expected Heterozygosity (He) (Nei, 1978)

ค่า He คำนวณจากความถี่ของอัลลีลแต่ละตำแหน่ง ตามสมมติฐานของ Hardy-Weinberg เพื่อประเมินสัดส่วนของจีโนไทป์ที่อยู่ในรูปเฮเทอโรไซกัส บอกความแปรปรวนทางพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรนั้น (Hartl and Clark, 1997)

$$He = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \quad (2)$$

#### 2. การประเมินค่า Polymorphism Information Content (PIC) (Botstein *et al.*, 1980)

ค่า PIC เป็นค่าที่ใช้วัดความแตกต่างทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง (Shet *et al.*, 2000) เพื่อบอกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ เมื่อตรวจสอบโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่ง สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 - 2 \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k p_i^2 p_j^2 \quad (3)$$

### 3. การประเมินค่า **Probability of Identity (PI)** (Kaul *et al.*, 2001)

ค่า PI ประเมินความน่าจะเป็นในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างจีโนไทป์ โดยสุ่ม เพื่อให้ทราบโอกาสที่จะพบสิ่งมีชีวิต 2 ชนิดที่มีจีโนไทป์เหมือนกัน ณ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ตำแหน่งนั้น ๆ (Kaul *et al.*, 2001) ได้ดังนี้

$$PI_n = \sum_{i=1}^k (p_i^2)^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k (2p_i p_j)^2 \quad (4)$$

เมื่อพิจารณาค่า PI ร่วมกันตั้งแต่ 2 ตำแหน่งขึ้นไป จะได้

$$PI_{combined} = \prod_{n=1}^m PI = (PI_1)(PI_2)...(PI_m) \quad (5)$$

### 4. การประเมินค่า **Exclusion probability (PE)** (Weir, 1996)

ค่า PE บอกความเป็นไปได้ในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของพ่อ โดยสุ่มไปยังลูก (Weir, 1996) โดยค่า PE ของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งขึ้นอยู่กับจำนวนความถี่ของอัลลีล ณ ตำแหน่งนั้น ๆ (Curi *et al.*, 2002)

$$PE_n = \sum_i p_i (1 - p_i)^2 - \frac{1}{2} \sum_j \sum_{i \neq j} p_i^2 p_j^2 (4 - 3p_i - 3p_j) \quad (6)$$

เมื่อพิจารณาค่า PE ร่วมกันตั้งแต่ 2 ตำแหน่งขึ้นไป จะได้

$$PE_{combined} = 1 - \prod_{n=1}^m (1 - PE_n) \quad (7)$$

โดยที่

$p_i$	=	ความถี่ของอัลลีลที่ $i$ ณ ตำแหน่งนั้น
$p_j$	=	ความถี่ของอัลลีลที่ $j$ ณ ตำแหน่งนั้น
$k$	=	จำนวนของอัลลีล ณ ตำแหน่งนั้น
$PI_n$	=	ค่า PI ตำแหน่งที่ $n$
$PE_n$	=	ค่า PE ตำแหน่งที่ $n$
$m$	=	จำนวนตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมาย

### 5. การประเมินค่าดัชนีความเหมือน (Similarity Index, SI)

แปลงข้อมูลให้เป็นแบบไบนารี ในตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าเป็น 1 ถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจะให้ค่าเป็น 0 นำข้อมูลแบบไบนารีมาประเมินค่าดัชนีความเหมือน(SI) โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ Jaccard (Jaccard's coefficient) (Nei and Li, 1979) ทำการวิเคราะห์จัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA (Unweighed pair-group method using arithmetic average) ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.01 (Rohlf, 1997) เพื่อแสดงแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างจีโนไทป์ โดยใช้ค่า cophenetic correlation ( $r$ ) ซึ่งเป็นค่าที่สามารถบ่งบอกว่าการจัดกลุ่มที่ได้อยู่ในเกณฑ์ที่ดีหรือไม่ โดยถ้าค่า  $r \geq 0.9$  ถือว่าการจัดกลุ่มอยู่ในเกณฑ์ที่ดีมาก ถ้าค่า  $r$  อยู่ระหว่าง 0.8-0.9 หมายถึงอยู่ในเกณฑ์ที่ดี (Rohlf, 1997)

การคำนวณค่า SI โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ชนิดต่างๆ (Anonymous, 2003) ดังต่อไปนี้

		พันธุ์ที่ $j$	
		1	0
พันธุ์ที่ $i$	1	a	b
	0	c	d

- 1.) Simple matching coefficient (SM):  $(a + d)/(a + b + c + d)$
- 2.) Jaccard coefficient (J):  $a/(a + b + c)$
- 3.) Nei-Li coefficient หรือ Dice coefficient:  $2a/(2a + b + c)$

โดยที่  $a, b, c$  และ  $d$  คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในแต่ละตำแหน่งของพันธุ์  $i$  และพันธุ์  $j$

ตารางผนวกที่ 1 จำนวนอัลลีลของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 15 ตำแหน่งในกล้วยไม้พันธุ์การค้า 24 accessions

ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย	ขนาด ของอัลลีล																					จำนวนอัลลีล แต่ละตำแหน่ง	ความถี่อัลลีล แต่ละตำแหน่ง				
		SSB	BJ	CS2N	CS4N	CW	DS	AN-1	AN-2	EW	HN	IW	JT	MW	NB	SW	DV	BES-1	BES-2	BJR-1	BJR-2			BJR-3	B17-1	B17-2	WO
<b>ORCA40</b>	268	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.06
	260	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.05
	256	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	0.08
	253	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.03
	241	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	-	1	1	0	1	1	0	1	1	0	9	0.14
	239	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	-	0	1	1	1	1	1	1	1	0	11	0.17
	235	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0.06
	221	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.06
	218	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.06
	214	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.02
	212	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	-	1	1	1	1	0	1	0	1	0	8	0.12
	200	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	-	1	1	1	1	1	1	1	1	0	11	0.17

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

เครื่องหมาย	ดีเอ็นเอ ขนาดของ อัลลีล	จำนวนอัลลีล																								ความถี่อัลลีล			
		SSB	BJ	CS2N	CS4N	CW	DS	AN-1	AN-2	EW	HN	IW	JT	MW	NB	SW	DV	BES-1	BES-2	BJR-1	BJR-2	BJR-3	B17-1	B17-2	WO	แต่ละตำแหน่ง	แต่ละตำแหน่ง		
<b>ORCA63</b>	290	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.02	
	287	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	8	0.14	
	284	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.07	
	280	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	0.31	
	277	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	18	0.31	
	266	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	9	0.15
	264	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.02	
<b>ORCA84</b>	331	-	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.04	
	329	-	0	0	0	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19	0.39	
	322	-	0	1	1	0	1	-	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	0.27	
	317	-	0	0	0	1	0	-	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	15	0.31	
<b>ORCA165</b>	401	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	1	-	0	0	0	-	1	1	0	3	0.07		
	364	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	-	1	-	1	1	1	-	1	1	1	9	0.21		

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย	ขนาด ของอัลลีล																								จำนวนอัลลีล	ความถี่อัลลีล		
		SSB	BJ	CS2N	CS4N	CW	DS	AN-1	AN-2	EW	HN	IW	JT	MW	NB	SW	DV	BES-1	BES-2	BJR-1	BJR-2	BJR-3	B17-1	B17-2	WO	แต่ละตำแหน่ง	แต่ละตำแหน่ง	
ORCA165	351	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	-	0	-	0	0	0	-	0	0	0	4	0.09	
	322	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-	0	-	0	0	0	-	0	0	0	2	0.05	
	314	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	-	0	-	0	0	0	-	0	0	0	3	0.07	
	310	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	1	-	1	1	1	-	1	1	0	9	0.21	
	302	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	-	0	-	0	0	0	-	0	0	0	6	0.14
	281	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-	1	-	0	0	0	-	1	1	1	7	0.16	
ORCT6	309	-	-	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	14	0.33	
	299	-	-	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8	0.19	
	293	-	-	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	14	0.33	
	286	-	-	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0.14	
ORCT8	287	1	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	23	0.43	
	281	0	1	0	0	0	0	-	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	9	0.17	
	278	0	0	0	0	1	0	-	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	8	0.15	
	267	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.02	
	260	0	0	1	1	0	1	-	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	13	0.24

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย	ขนาดของ อัลลีล	จำนวนอัลลีล																							ความถี่อัลลีล			
		SSB	BJ	CS2N	CS4N	CW	DS	AN-1	AN-2	EW	HN	IW	JT	MW	NB	SW	DV	BES-1	BES-2	BJR-1	BJR-2	BJR-3	B17-1	B17-2	WO	แต่ละตำแหน่ง	แต่ละตำแหน่ง	
<b>ORCT11</b>	326	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	-	0	1	1	1	1	-	1	1	0	1	0	0	0	9	0.21	
	324	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	-	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	1	0	5	0.12	
	321	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0.02	
	319	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	-	0	1	0	0	1	-	0	1	0	0	0	0	1	7	0.17	
	317	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	-	1	0	1	1	0	-	1	0	1	1	0	0	0	10	0.24	
	314	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	-	0	0	0	0	1	-	1	1	1	1	1	1	1	0	10	0.24
<b>ORCT33</b>	198	0	0	0	0	1	0	-	-	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.04	
	195	0	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.02	
	187	0	0	1	1	0	0	-	-	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	11	0.24
	180	0	1	0	0	1	1	-	-	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	0.22
	170	1	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.02	
	167	0	1	1	1	1	1	-	-	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	20	0.43
	158	1	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.02

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย	ขนาด ของอัลลีล	ดีเอ็นเอ																							จำนวนอัลลีล		ความถี่อัลลีล	
		SSB	BJ	CS2N	CS4N	CW	DS	AN-1	AN-2	EW	HN	IW	JT	MW	NB	SW	DV	BES-1	BES-2	BJR-1	BJR-2	BJR-3	B17-1	B17-2	WO	แต่ละตำแหน่ง	แต่ละตำแหน่ง	
<b>ORCT35</b>	253	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.02
	249	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	23	0.48
	246	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	24	0.50
<b>ORCT40</b>	204	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	13	0.22	
	198	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.03
	192	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.07
	186	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	13	0.22
	177	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	9	0.16	
	173	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0.10
	171	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	5	0.09	
	160	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	0.10

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ดีเอ็นเอ เครื่องหมาย	ขนาด ของอัลลีล																					จำนวนอัลลีล	ความถี่อัลลีล					
		SSB	BJ	CS2N	CS4N	CW	DS	AN-1	AN-2	EW	HN	IW	JT	MW	NB	SW	DV	BES-1	BES-2	BJR-1	BJR-2	BJR-3	B17-1	B17-2	WO	แต่ละตำแหน่ง	แต่ละตำแหน่ง	
<b>ORCT52</b>	291	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.03	
	287	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	9	0.12	
	282	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	7	0.10	
	278	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.03	
	269	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	9	0.12	
	263	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	5	0.07	
	259	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	7	0.10
	245	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	10	0.14
	240	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	10	0.14
	235	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	12	0.16
<b>ORCT58</b>	328	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.02	
	321	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	6	0.07	
	317	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	13	0.16	

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ดีเอ็นเอ	ขนาด																									จำนวนอัลลีล	ความถี่อัลลีล	
เครื่องหมาย	ของอัลลีล	SSB	BJ	CS2N	CS4N	CW	DS	AN-1	AN-2	EW	HN	IW	JT	MW	NB	SW	DV	BES-1	BES-2	BJR-1	BJR-2	BJR-3	B17-1	B17-2	WO	แต่ละตำแหน่ง	แต่ละตำแหน่ง	
<b>ORCT58</b>	314	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	6	0.07	
	310	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	5	0.06	
	234	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	5	0.06	
	231	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	9	0.11	
	229	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	11	0.14	
	227	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	11	0.14
	225	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	10	0.12
	223	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0.04
<b>ORCT59</b>	290	-	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0.03	
	323	-	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	-	1	1	1	1	1	1	-	0	15	0.50
	319	-	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	-	0	0	0	0	0	0	-	1	5	0.17
	312	-	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	-	1	1	1	1	1	1	-	0	9	0.30
<b>ORCT69</b>	211	0	1	1	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	0.79	
	209	1	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.04	

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ดีเอ็นเอ	ขนาด																									จำนวนอัลลีล	ความถี่อัลลีล	
เครื่องหมาย	ของอัลลีล	SSB	BJ	CS2N	CS4N	CW	DS	AN-1	AN-2	EW	HN	IW	JT	MW	NB	SW	DV	BES-1	BES-2	BJR-1	BJR-2	BJR-3	B17-1	B17-2	WO	แต่ละตำแหน่ง	แต่ละตำแหน่ง	
<b>ORCT69</b>	196	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0.18
<b>ORCT72</b>	233	0	-	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	8	0.17	
	220	0	-	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.04	
	219	0	-	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	7	0.15
	216	1	-	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	8	0.17	
	214	0	-	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	10	0.22	
	211	0	-	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3	0.07	
	200	0	-	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.07	
	174	0	-	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	5	0.11	

**ตารางผนวกที่ 2** ขนาดของอัลลีล และความถี่อัลลีลของดีเอ็นเอเครื่องหมายแต่ละตำแหน่งของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าทั้งหมด 19 พันธุ์ 24 accessions โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ 15 ตำแหน่ง

ตำแหน่ง ของดีเอ็นเอ เครื่องหมาย และขนาด ของอัลลีล (คู่เบส)									
<b>ORCA40</b>		<b>ORCA63</b>		<b>ORCA 84</b>		<b>ORCA 165</b>		<b>ORCT 6</b>	
268	0.06	290	0.02	331	0.04	402	0.07	309	0.33
260	0.05	288	0.14	329	0.39	364	0.21	299	0.19
256	0.08	284	0.07	323	0.27	352	0.09	293	0.33
252	0.03	280	0.31	317	0.31	322	0.05	285	0.14
240	0.14	278	0.31			314	0.07		
238	0.17	266	0.15			310	0.21		
234	0.06	264	0.02			302	0.14		
220	0.06					282	0.16		
218	0.06								
214	0.02								
212	0.12								
200	0.17								
<b>ORCT8</b>		<b>ORCT11</b>		<b>ORCT 33</b>		<b>ORCT 35</b>		<b>ORCT 40</b>	
288	0.43	326	0.21	198	0.04	254	0.02	204	0.22
282	0.17	324	0.12	194	0.02	250	0.48	198	0.03
278	0.15	322	0.02	186	0.24	246	0.50	192	0.07
268	0.02	320	0.17	180	0.22			186	0.22
260	0.24	318	0.24	170	0.02			176	0.16
		314	0.24	166	0.43			172	0.10
				158	0.02			170	0.09
								160	0.10

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ตำแหน่ง ของดีเอ็นเอ เครื่องหมาย และขนาด ของอัลลีล (คู่เบส)									
ORCT 52		ORCT 58		ORCT 59		ORCT 69		ORCT 72	
291	0.03	329	0.02	324	0.50	212	0.79	232	0.17
287	0.12	321	0.07	320	0.17	210	0.04	220	0.04
283	0.10	317	0.16	312	0.30	196	0.18	218	0.15
279	0.03	315	0.07	290	0.03			216	0.17
269	0.12	311	0.06					214	0.22
263	0.07	235	0.06					210	0.07
259	0.10	231	0.11					200	0.07
245	0.14	229	0.14					174	0.11
241	0.14	227	0.14						
235	0.16	225	0.12						
		223	0.04						

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่า similarity index ของกล้วยไม้ 24 accessions โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ Jaccard (Jaccard's coefficient) (Nei and Li, 1979)

Accessions	SSB	BJ	CS2N	CS4N	CW	DS	AN-1	AN-2	EW	HN	IW	JT	MW	NB	SW	DV	BES-1	BES-2	BJR-1	BJR-2	BJR-3	B17-1	B17-2	WO	
SSB	1.0000																								
BJ	0.1818	1.0000																							
CS2N	0.0833	0.1622	1.0000																						
CS4N	0.0833	0.1622	1.0000	1.0000																					
CW	0.1458	0.2553	0.1273	0.1273	1.0000																				
DS	0.2000	0.2439	0.2174	0.2174	0.3214	1.0000																			
AN-1	0.2188	0.1818	0.1351	0.1351	0.2340	0.2927	1.0000																		
AN-2	0.2353	0.1750	0.2250	0.2250	0.2453	0.2708	0.4000	1.0000																	
EW	0.1667	0.2619	0.1667	0.1667	0.3704	0.3077	0.3846	0.2917	1.0000																
HN	0.0930	0.2619	0.2558	0.2558	0.2000	0.2453	0.1591	0.2292	0.2941	1.0000															
IW	0.1875	0.2647	0.1538	0.1538	0.3191	0.3750	0.2727	0.3611	0.3659	0.3500	1.0000														
JT	0.1250	0.2250	0.2381	0.2381	0.2963	0.3617	0.1951	0.1875	0.3617	0.3191	0.4444	1.0000													
MW	0.2500	0.3250	0.1200	0.1200	0.4800	0.3333	0.2045	0.1765	0.2830	0.2692	0.4000	0.4545	1.0000												
NB	0.1463	0.3684	0.2174	0.2174	0.2759	0.3077	0.3077	0.2500	0.3333	0.2692	0.3023	0.3333	0.2830	1.0000											
SW	0.1714	0.4545	0.1905	0.1905	0.4773	0.2708	0.2703	0.2791	0.5676	0.3256	0.3784	0.4737	0.4286	0.4750	1.0000										
DV	0.1702	0.2000	0.3913	0.3913	0.2424	0.2881	0.3721	0.3800	0.2667	0.2759	0.3125	0.2414	0.2063	0.2667	0.2453	1.0000									
BES-1	0.1190	0.2051	0.3500	0.3500	0.1897	0.3333	0.3611	0.3488	0.3191	0.3556	0.2889	0.3556	0.2549	0.3125	0.2609	0.6190	1.0000								
BES-2	0.1522	0.1837	0.5122	0.5122	0.2500	0.3455	0.2391	0.3958	0.2759	0.3585	0.3556	0.2727	0.2131	0.2982	0.2941	0.6735	0.6190	1.0000							
BJR-1	0.1277	0.2340	0.3778	0.3778	0.2500	0.2982	0.3902	0.4255	0.2542	0.3333	0.3261	0.2727	0.2131	0.2982	0.3000	0.7083	0.5814	0.6667	1.0000						
BJR-2	0.1250	0.1818	0.4595	0.4595	0.2203	0.3469	0.3158	0.3409	0.2453	0.3617	0.3171	0.3778	0.2222	0.2941	0.2340	0.5417	0.6053	0.6000	0.6744	1.0000					
BJR-3	0.1667	0.1702	0.5128	0.5128	0.2712	0.3654	0.2558	0.4222	0.2830	0.3600	0.3721	0.2885	0.2281	0.3269	0.2941	0.6889	0.6190	1.0000	0.6522	0.5814	1.0000				
B17-1	0.1667	0.1667	0.4500	0.4500	0.2258	0.3208	0.2558	0.3696	0.2069	0.3077	0.2826	0.2692	0.2069	0.2500	0.1765	0.6596	0.6000	0.5833	0.4902	0.6585	0.5909	1.0000			
B17-2	0.1429	0.1837	0.4091	0.4091	0.2308	0.2759	0.3256	0.4255	0.2759	0.2909	0.2917	0.2500	0.1563	0.2542	0.2157	0.8837	0.6667	0.6809	0.6458	0.5435	0.6977	0.7045	1.0000		
WO	0.2000	0.3824	0.2308	0.2308	0.3200	0.2766	0.2500	0.2326	0.5385	0.2340	0.3611	0.2727	0.3333	0.3333	0.5143	0.2593	0.2667	0.2453	0.2453	0.1837	0.2400	0.1923	0.2453	1.0000	

ภาคผนวก ข  
ประวัติของกล้วยไม้ที่ทำการศึกษา

**(*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum***



กล้วยไม้พันธุ์ (*D. Sri-Racha* x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* var *compactum* เป็นกล้วยไม้แคระ นิยมใช้เป็นไม้กระถาง เนื่องจากลำต้นอวบสั้น สูงประมาณ 10-15 เซนติเมตร ดอกกึ่งฟอร์มกลีบดอกมีสีขาวปากด้านในมีสีม่วงแดงเข้ม ปลายปากมนสีขาว ออกดอกตลอดปี เลี้ยงง่ายโตเร็ว แตกตะเกียงจากลำต้นเดิมจำนวนมาก ทางสวนกล้วยไม้ใจรักได้ทำการคัดเลือกมาจากกล้วยไม้เพาะเมล็ดของบริษัท บางกอกฟลาวเวอร์เซ็นเตอร์ จำกัด และใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ เพื่อผลิตกล้วยไม้ลูกผสมต้นเตี้ยหรือแคระต่อไป (ศิริพร, 2546)

*Dendrobium Burana Jade*



กล้วยไม้ *D. Burana Jade* เป็นกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างพันธุ์ *D. Bangkok Green* x *D. Burana Fancy* จัดทะเบียนพันธุ์ ณ สมาคมพืชสวน ประเทศอังกฤษ ในปี ค.ศ. 1996 โดยคุณพงศ์ธร บุรณะรักษธรรม (Wildcatt Orchids Database, 2002) ซึ่งเป็นผู้ผสมและผู้จดทะเบียน ดอกกึ่งฟอร์มสี่เหลี่ยม ปากสีน้ำตาลเข้ม ช่อดอกยาวตรง ระยะระหว่างช่อดอกแคบ ใบใหญ่และหนา ลำต้นอวบอ้วน ต้นสูง นิยมใช้เป็นกล้วยไม้ตัดดอกและไม้กระถาง (ศิริพร, 2546)

*Dendrobium Caesar* (2N)



กล้วยไม้ *Dendrobium Caesar* (2N) เป็นกล้วยไม้ลูกผสมข้ามชนิด (species) ของกล้วยไม้สายพันธุ์แท้ระหว่าง *D. phalaenopsis* และ *D. stratiotes* จัดทะเบียนพันธุ์ ณ สมาคมพืชสวนประเทศอังกฤษโดย Nagrok ในปี ค.ศ. 1930 เป็นกล้วยไม้ที่มีลำต้นสูง ฐานกลีบดอกและกลีบเลี้ยงมีสีขาว ปลายกลีบดอกมีสีม่วงอ่อน ช่อดอกยาว การจัดเรียงของดอกสวยงาม นิยมใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ของกล้วยไม้ตัดดอกและไม้กระถาง (Wildcatt Orchids Database, 2002)

*Dendrobium Caesar* (4N)



กล้วยไม้ *Dendrobium Caesar* (4N) เป็นกล้วยไม้ที่เกิดมาจากการกลายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Dendrobium Caesar* (2N) (อภิวรา, 2542) ซึ่งเป็นลูกผสมข้ามชนิด (species) ที่มีจีโนมต่างชนิดกัน (diploid hybrid) ทำให้กล้วยไม้พันธุ์ *Dendrobium Caesar* (4N) มีจำนวนชุดโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นแบบ Allotetraploid (Kamemoto, 1998) ดอกมีขนาดใหญ่กว่าปกติ กลีบดอกหนา โดยเฉพาะส่วนปาก (อภิวรา, 2542) ฐานกลีบดอกและกลีบเลี้ยงมีสีขาว ปลายกลีบดอกมีสีม่วงอ่อน ลำต้นสูง มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับกล้วยไม้ *Dendrobium Caesar* (2N) มาก

*Dendrobium* hybrid 'Cholticha White'



กล้วยไม้ *Dendrobium* hybrid 'Cholticha White' เป็นกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการจดทะเบียนพันธุ์ นิยมใช้เป็นไม้ตัดดอก ลักษณะดอกเป็นแบบกิ่งพอร์ม กลีบดอกและกลีบปากมีสีขาวสะอาด ด้านในกลีบปากมีสีเขียวอ่อนเล็กน้อย ระยะห่างระหว่างดอกปานกลาง ความยาวช่อดอกประมาณ 30-40 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับสภาพการปลูกเลี้ยง ช่วงฤดูฝนมักเป็นโรคเกสรดำ ทำให้เป็นอุปสรรคทางการค้า

*Dendrobium* Dang Sa-Ard



กล้วยไม้ *Dendrobium* Dang Sa-Ard เป็นกล้วยไม้ลูกผสมที่เกิดจากพันธุ์ *D. Pramot* x *D. Mae-Klong River* จดทะเบียนพันธุ์ ณ สมาคมพืชสวน ประเทศไทย โดย Yamprayoon S. ในปี ค.ศ. 1999 (Wildcatt Orchids Database, 2002) ดอกกึ่งฟอร์ม กลีบดอกและกลีบเลี้ยงมีสีม่วงแดงเข้ม มีการจัดเรียงของดอกสวยงาม ลำต้นสูงประมาณ 30-40 เซนติเมตร นิยมใช้เป็นไม้ตัดดอกเพื่อการค้า

*Dendrobium* Ekapol 'Anna'



กล้วยไม้ *Dendrobium* Ekapol 'Anna' เป็นกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสมที่มาจากพันธุ์ *D. Lim* Hepa x *D. Tomie Drake* ผสมพันธุ์และจดทะเบียนพันธุ์โดย คุณปราโมทย์ จิตรราพงษ์ ในปี ค.ศ. 1982 (Wildcatt Orchids Database, 2002) ลักษณะเด่นของพันธุ์ *D. Ekapol 'Anna'* คือ เป็นกล้วยไม้สกุลหวายดอกฟอร์มกลม สีชมพู ซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาดญี่ปุ่นมาก มีลักษณะด้อยคือ เมื่อดำสุดท้ายให้ช่อดอกหมดก่อน (ประมาณ 13 ช่อ) ถึงจะแตกหน่อใหม่เป็นลำต่อไป ไม่ชอบการเร่งให้ปุ๋ย (มานิตย์, 2547)

*Dendrobium* hybrid 'Emma White'



กล้วยไม้ *Dendrobium* hybrid 'Emma White' เป็นกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการจดทะเบียนพันธุ์ ลักษณะดอกกึ่งฟอร์ม กลีบดอกมีสีขาวอมสีเขียวย่อมนๆ ตรงกลางดอกมีสีขาวอมเขียว เข้มกว่าบนกลีบดอก ช่อดอกยาวปานกลาง (ประมาณ 30-40 เซนติเมตร) ลำต้นสั้นกลมอ้วน มีสีเขียว เหมาะสำหรับเป็นไม้กระถางและไม้ตัดดอก

*Dendrobium* hybrid ‘Honey’



กล้วยไม้ *Dendrobium* hybrid ‘Honey’ เป็นกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมที่ไม่ได้รับการจดทะเบียนพันธุ์ ลักษณะดอกฟอร์มกลม กลีบดอกมีสีขาวอมชมพูอ่อนเล็กน้อย กลีบปากมีสีชมพูอ่อน เข้มกว่าสีบนกลีบดอก ปลายกลีบดอกมนกลม กลีบดอกหนาแผ่ออกกว้าง เมื่อสะท้อนกับแสงแดด จะเห็นเป็นแสงระยิบที่กลีบดอก นิยมใช้เป็นกล้วยไม้ตัดดอกเพื่อการค้า

*Dendrobium Intuwong*



กล้วยไม้ *Dendrobium Intuwong* เป็นกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสมระหว่าง *D. Darcie Mikami* x *D. Walter Oumae* ผสมพันธุ์และจดทะเบียนพันธุ์ ณ สมาคมพืชสวน ประเทศอังกฤษ โดย คุณสิริพงษ์ อินทวงศ์ ในปี ค.ศ. 1979 (Wildcatt Orchids Database, 2002) เป็นกล้วยไม้สกุลหวาย กิ่งฟอร์ม กลีบดอกและกลีบเลี้ยงมีสีชมพู โคนกลีบดอกแคบเรียวยาว ปลายกลีบดอกโค้งมนแผ่ออก ช่อดอกยาว นิยมใช้เป็นไม้ตัดดอกเพื่อการค้า

*Dendrobium Jaquelyn Thomas*



กล้วยไม้ *Dendrobium Jaquelyn Thomas* เป็นกล้วยไม้ลูกผสมข้ามชนิด (species) ของกล้วยไม้สายพันธุ์แท้ระหว่าง *D. gouldii* และ *D. phalaenopsis* จัดทะเบียนพันธุ์ ณ สมาคมพืชสวนประเทศอังกฤษ โดย Thomas R.K. ในปี ค.ศ. 1949 (Wildcatt Orchids Database, 2002) ได้รับการพัฒนาพันธุ์โดยมหาวิทยาลัยฮาวาย ในปี ค.ศ. 1970 เพื่อใช้เป็นกล้วยไม้ตัดดอกอุตสาหกรรม เนื่องจากมีอายุการปักแจกันนาน (ประมาณ 18 วัน) (Anonymous, 2002) เป็นกล้วยไม้สกุลหวายฟอร์มกลีบ ลักษณะของกลีบดอกและกลีบปากมีสีขาว และเส้าเกสรมีสีขาว ช่อดอกยาว นิยมใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อสร้างกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์การค้า สำหรับใช้เป็นไม้ตัดดอกและไม้กระถางต่อไป

*Dendrobium* hybrid 'Mayuree White'



กล้วยไม้ *Dendrobium* hybrid 'Mayuree White' เป็นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าเพื่อใช้ในการตัดดอก มีลักษณะดอกฟอร์มกลีบ สีขาวสะอาด ด้านในมีสีเขียวอ่อนช่อดอกยาว ระยะห่างระหว่างช่อดอกกว้าง ก้านช่อดอกยาว เป็นพันธุ์ที่ไม่ได้รับการจดทะเบียนพันธุ์ นิยมใช้เป็นไม้ตัดดอกเพื่อการค้า มีชื่อเรียกโดยทั่วไปว่า “หวายขาวมยุรี”

*Dendrobium* hybrid ‘Sakura’



กล้วยไม้ *Dendrobium* hybrid ‘Sakura’ เป็นกล้วยไม้พันธุ์ผสมที่เกษตรกรมักเรียกสั้นๆ ว่า “ซากุระ” นิยมปลูกเป็นไม้ตัดดอก ทรงช่อสวยงาม ระยะระหว่างก้านดอกถี่ ดอกกึ่งฟอร์ม สีสชมพูอ่อน หน้าแล้งให้ผลผลิตดีกว่าหวายกลุ่มเดียวกัน แต่ต้นจะต่อยอดง่าย และมักเป็นโรคใบจุด เกสรดำ ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการส่งออก เพราะดอกจะเหี่ยวเร็ว

*Dendrobium* hybrid ‘Sanan White’



กล้วยไม้ *Dendrobium* hybrid ‘Sanan White’ เป็นกล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้รับการจดทะเบียนพันธุ์ ลักษณะดอกฟอร์มกลีบ กลีบดอกและกลีบปากมีสีขาวสะอาด ช่อดอกและก้านช่อดอกยาว ลำต้นเทียมอ้วนกลม สูงปานกลาง ใบยาวเรียวสีเขียว มีกลิ่นหอมเล็กน้อย นิยมใช้เป็นไม้ตัดดอกเพื่อการค้า มีชื่อเรียกกันโดยทั่วไปว่า “พันธุ์ขาวสนาน”

*Dendrobium* Sonia ‘Daeng Vasana’



กล้วยไม้ *Dendrobium* Sonia ‘Daeng Vasana’ เป็นกล้วยไม้สกุลหวายที่กลายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ *Dendrobium* Sonia ‘No.17’ จัดทะเบียนพันธุ์เมื่อ พ.ศ. 2546 โดยคุณวาสนา อนุตธโต ตามพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ. 2542 ของกรมวิชาการ เกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ลักษณะต้นมีขนาดเล็ก ลำลูกกล้วยหนาปานกลาง ความยาวใบ ความกว้างใบ และความหนาของใบ ใบสีเขียวปานกลาง การเรียงตัวของดอกบนช่อดอก 2 แถว ระยะห่างของดอกบนช่อดอกปานกลาง จำนวนช่อดอกต่อลำลูกกล้วยปานกลาง จำนวนดอกบนช่อดอก และความยาวช่อดอกปานกลาง ความยาวก้านช่อดอกปานกลาง ลักษณะแกนกลางก้านช่อดอกตรง ก้านดอกไม่มีบิด ลักษณะฟอร์มดอก กิ่งกลีบกิ่งฟอร์ม กลีบไม่มีบิด กลีบดอกหนา ดอกไม่มีกลิ่น กลีบดอกสีม่วงอมแดง ลวดลายบนกลีบดอกสีม่วงอมแดง กลีบเลี้ยงไม่มีบิดหรือบิดน้อยมาก มีสีแดงอมม่วง สีลวดลายบนกลีบเลี้ยงด้านบนมีสีแดงอมม่วง หูกลีบปากเปิดเล็กน้อย บริเวณกลางปากมีสีม่วงริมขอบปากเป็นคลื่นเล็กน้อย ไม่เป็นฝอยหรือเป็นฝอยละเอียดมาก สีหมอนบนปากขาวปนม่วง สีของเส้าเกสรขาวเต็มม่วง 3 จุด สีฝากรอบอับเรณูสีเหลืองอ่อน (นิรนาม, 2548)

*Dendrobium* Sonia ‘Earsakul’



กล้วยไม้ *Dendrobium* Sonia ‘Earsakul’ เป็นกล้วยไม้ที่เกิดมาจากการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Dendrobium* Sonia ‘Red Joe’ มีชื่อเรียกกันโดยทั่วไปว่า ‘บอม เอียสกุล’ ลักษณะดอกกึ่งฟอร์ม กลีบดอกและกลีบปากมีสีแดงบานเย็นเข้ม มีสีสดกว่า *Dendrobium* Sonia ‘Red Joe’ บริเวณกลางดอกมีสีขาว เป็นกล้วยไม้ตัดดอกพันธุ์การค้าที่สำคัญของประเทศไทย เป็นที่ต้องการของตลาดในแถบประเทศยุโรป

*Dendrobium* Sonia ‘Red Joe’



กล้วยไม้ *Dendrobium* Sonia ‘Red Joe’ เป็นกล้วยไม้ที่เกิดมาจากการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของ *Dendrobium* Sonia ‘BOM Joe’ กล้วยไม้ *Dendrobium* Sonia ‘Red Joe’ เป็นที่รู้จักกันในชื่อ “บอมโจแดง” นิยมปลูกเป็นกล้วยไม้ตัดดอก กลีบดอกหนา ดอกมีสีบานเย็นเข้ม และมีสีขาวแซมบริเวณกลางดอก ช่อดอกยาว แต่ช่อดอกจะสั้นกว่าบอม 17 ดอกบานทน และดอกตูมฝ่อน้อยกว่าเมื่ออากาศเปลี่ยนแปลง ออกดอกตลอดทั้งปี แต่ช่วงหน้าร้อนจะมีปริมาณดอกน้อย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพการปลูกเลี้ยง เป็นพันธุ์ที่ให้หน่อใหม่เร็ว (ศิริพร, 2546)

*Dendrobium Sonia* ‘No.17’



กล้วยไม้ *Dendrobium Sonia* เป็นกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสมระหว่าง *D. Caesar* x *D. Tomie Drake* โดยคุณปราโมทย์ จิตธราพงษ์ เป็นผู้ผสมพันธุ์ในปี พ. ศ. 2527 หลังจากนั้นคุณทิพากร แสงอุทัย (บริษัท Excel Orchid Co.Ltd.) ได้นำต้นลูกผสมที่ได้มาทำการคัดเลือก และส่งเสริมทางการตลาด ในปี พ.ศ. 2529 และจดทะเบียนพันธุ์ ณ สมาคมพืชสวน ประเทศอังกฤษ โดยคุณตรีกุล โสภณศิริ เป็นผู้ยื่นขอจดทะเบียนในนาม บริษัทบางกอกออร์คิด จำกัด ในปี พ.ศ. 2527 (Wildcatt Orchids Database, 2002) บางครั้งเรียกชื่อพันธุ์นี้ว่า “พันธุ์บอม” หรือ BOM ซึ่งเป็นชื่อย่อมาจาก Bangkok Orchid Mericlone ทางบริษัทบางกอกออร์คิดได้นำมาขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และคัดเลือกต้นที่มีลักษณะดีได้ต้นที่ 17 จึงเรียกพันธุ์นี้ว่า *Dendrobium Sonia* ‘No.17’ (มานิตย์, 2547)

*Dendrobium* Walter Oumae



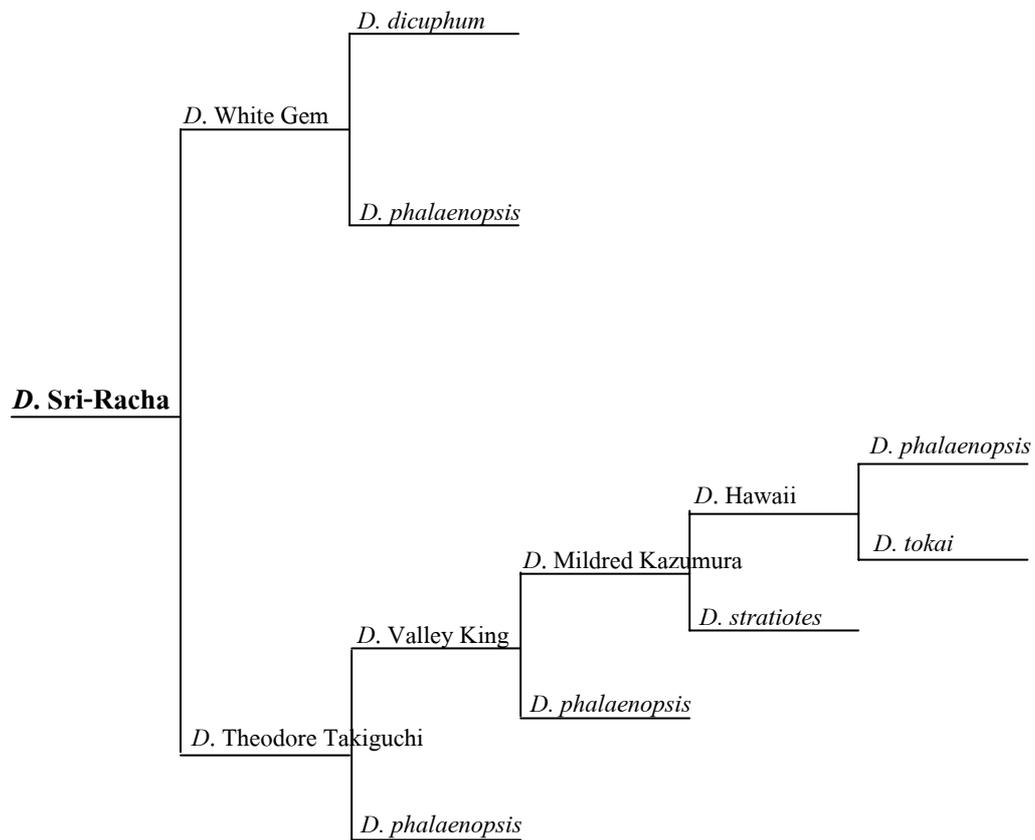
*Dendrobium* Walter Oumae เป็นกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสมระหว่าง *D. Theodore Takiguchi* x *D. grantii* จัดทะเบียนพันธุ์ ณ สมาคมพืชสวน ประเทศอังกฤษ โดย Oumae W. ในปี ค.ศ. 1963 (Wildcatt Orchids Database, 2002) ลักษณะดอกเป็นแบบฟอร์มกลีบ สีขาวสะอาด ระยะเวลาห่างระหว่างช่อดอกมาก ช่อดอกและก้านช่อดอกยาว ลำต้นเทียมกลมยาวสีเขียว ใบเรียวยาวสีเขียว พันธุ์นี้นำมาปลูกเป็นการค้าในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2512-ปัจจุบัน (มานิตย์, 2547)

ตารางภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ชนิดแท้ (species) ของกล้วยไม้ลูกผสมพันธุ์การค้าที่ได้รับการจดทะเบียนพันธุ์ ณ สมาคมพืชสวน ประเทศไทย

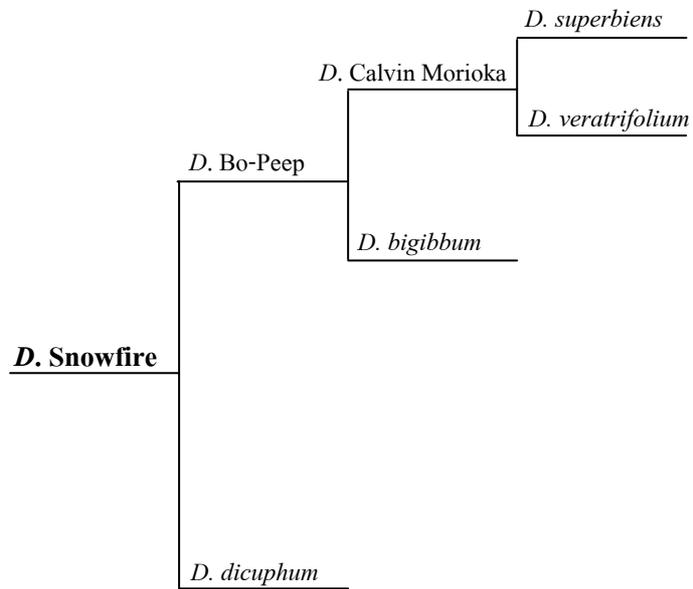
Orchid species	Section	D. Burana Jade	D. Caesar	D. Dang Sa-Ard	D. Ekapol	D. Intuwong	D. Jaquelyn Thomus	D. Snowfire	D. Sonia	D. Sri-Racha	D. Walter Oumae
<i>D. phalaenopsis</i>	<i>Phalaenanth</i>	39.06	50	54.69	76.95	57.81	50		62.5	65.63	40.63
<i>D. bigibbum</i>	<i>Phalaenanth</i>			7.03				25			
<i>D. schroederianum</i>	<i>Phalaenanth</i>			12.3							
<i>D. dicuphum</i>	<i>Phalaenanth</i>							50		25	
<i>D. superbiens</i>	<i>Phalaenanth</i>			10.55				12.5			
<i>D. stratiotes</i>	<i>Spatulata (Ceratobium)</i>	7.81	50	0.78	10.16	6.25			28.13	6.25	6.25
<i>D. tokai</i>	<i>Spatulata (Ceratobium)</i>	9.38		4.3	3.52	4.69			3.13	3.13	3.13
<i>D. aries</i>	<i>Spatulata (Ceratobium)</i>	3.13									
<i>D. grantii</i>	<i>Spatulata (Ceratobium)</i>	6.25				25					50
<i>D. schulleri</i>	<i>Spatulata (Ceratobium)</i>	28.13									
<i>D. undulatum</i>	<i>Spatulata (Ceratobium)</i>	3.13									
<i>D. gouldii</i>	<i>Spatulata (Ceratobium)</i>			6.25	9.38	6.25	50		6.25		
<i>D. taurinum</i>	<i>Spatulata (Ceratobium)</i>	3.13		4.1							
<i>D. veratrifolium</i>	<i>Spatulata (Ceratobium)</i>							12.5			

ที่มา: Wildcatt Orchids Database (2002) มีหน่วยเป็น เปอร์เซ็นต์ (%)

ประวัติพันธุ์ *D. Sri-Racha*

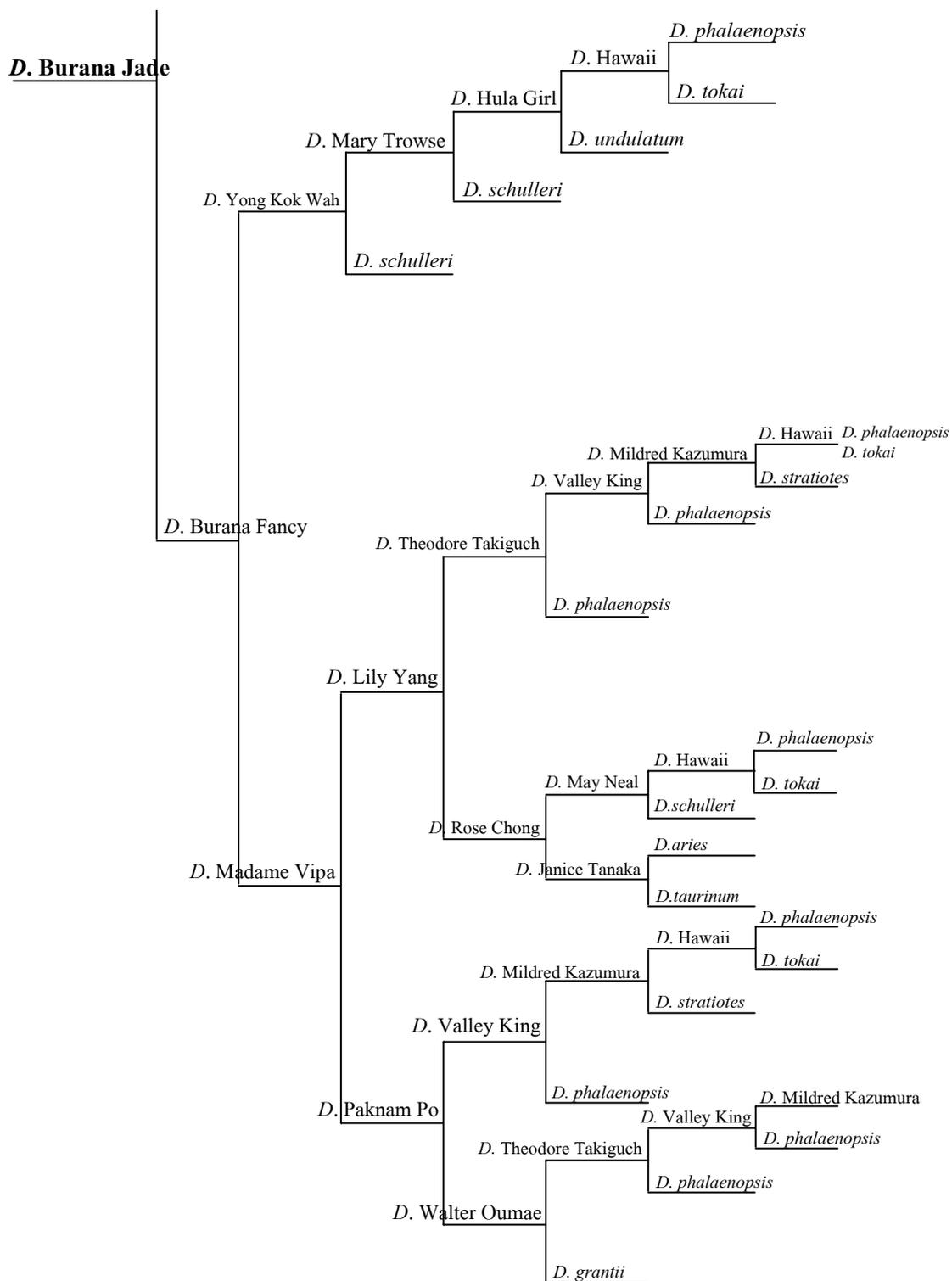


ประวัติพันธุ์ *D. Snowfire*



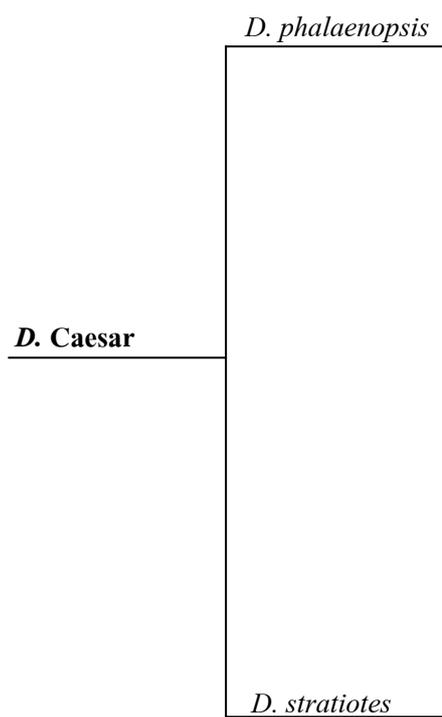


**ประวัติพันธุ์ *D. Burana Jade* (ต่อ)**

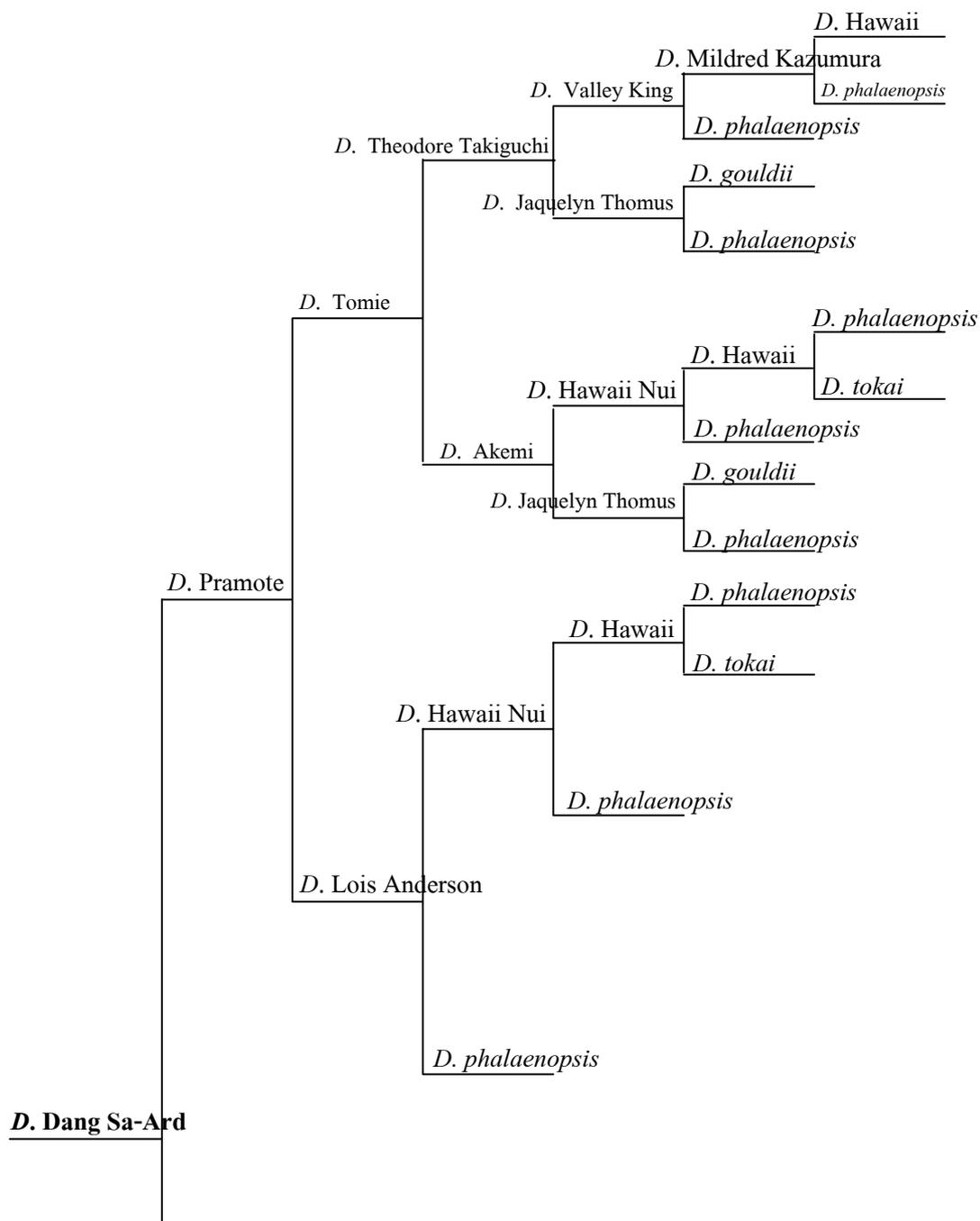


ที่มา: Wildcatt Orchids Database (2002)

ประวัติพันธุ์ *D. Caesar*

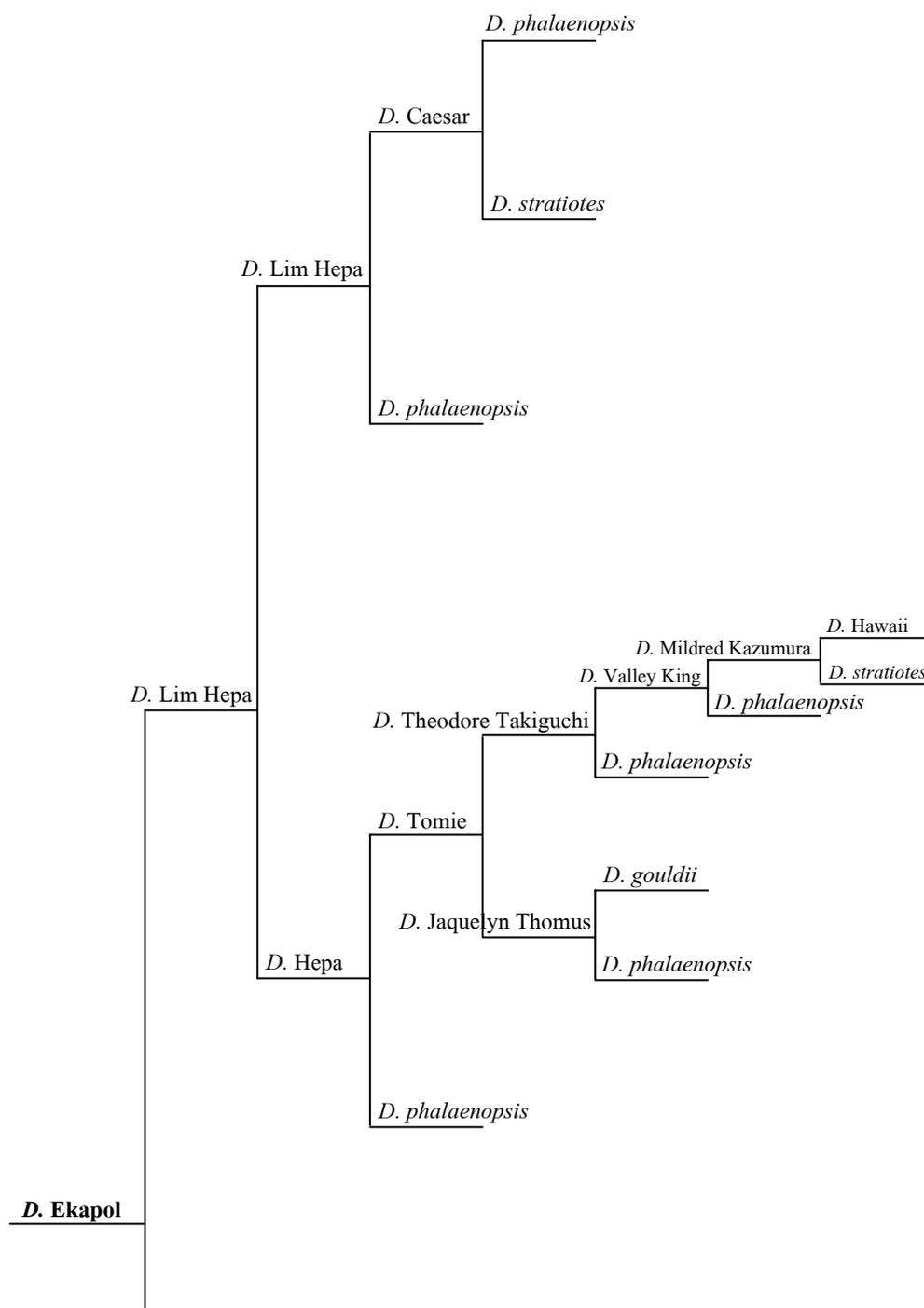


ประวัติพันธุ์ *D. Dang Sa-Ard*



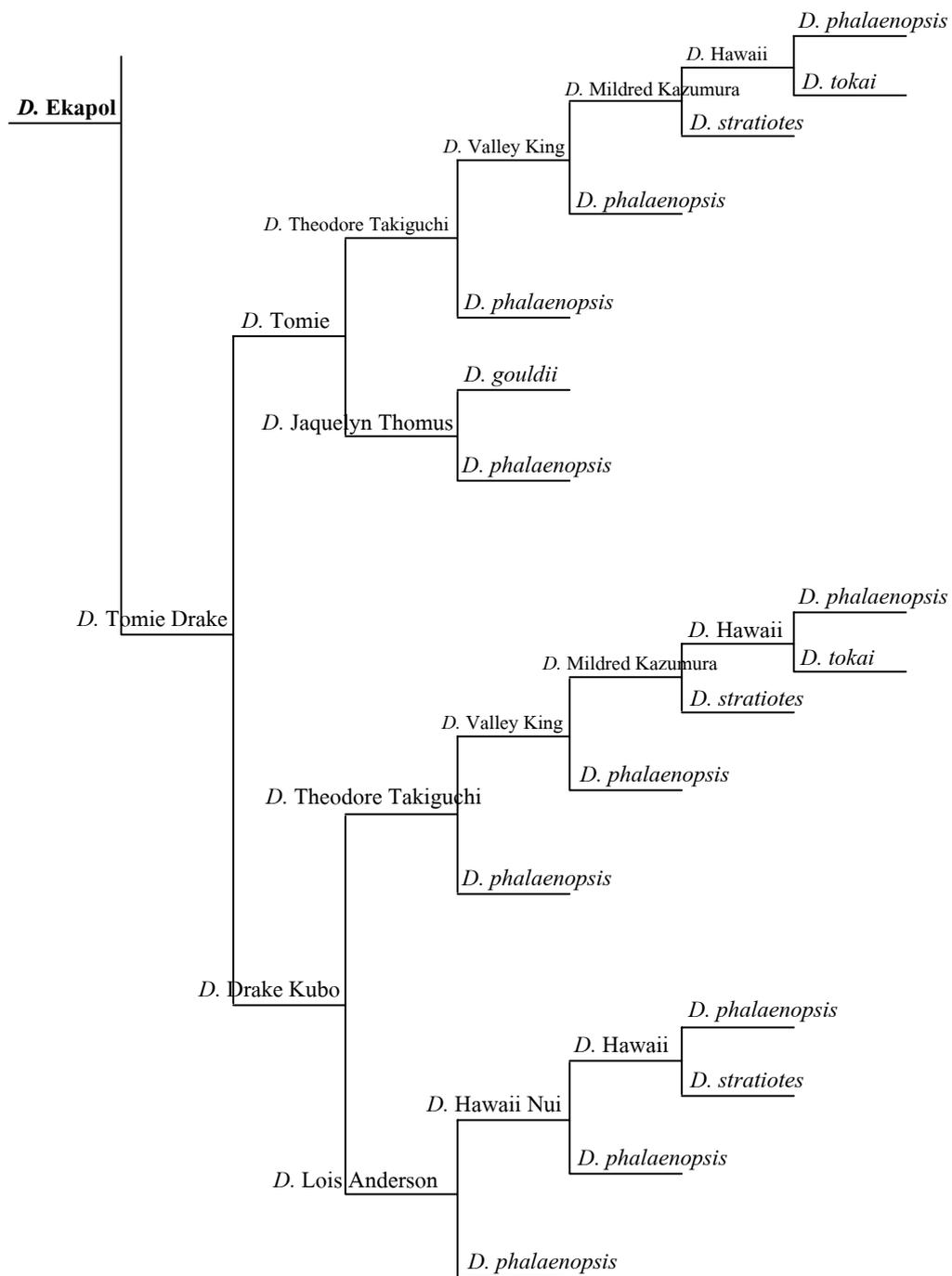


**ประวัติพันธุ์ *D. Ekapol***



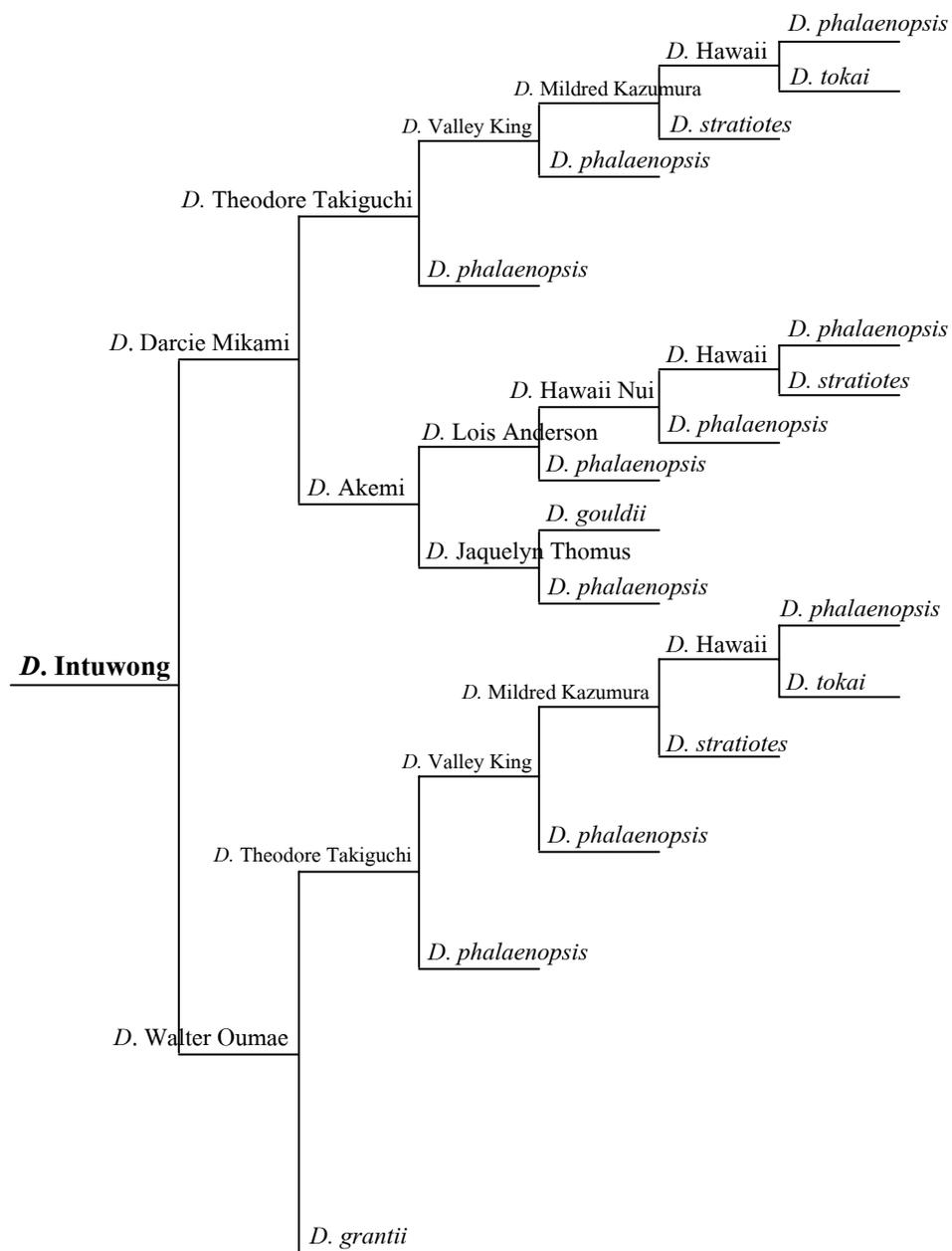
ที่มา: Wildcatt Orchids Database (2002)

**ประวัติพันธุ์ *D. Ekapol* (ต่อ)**

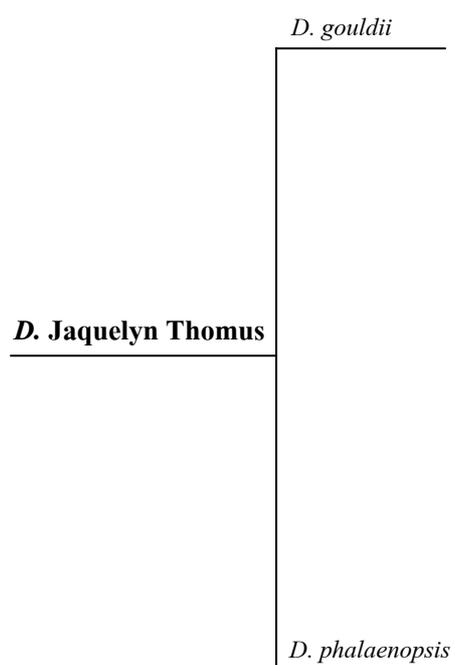


ที่มา: Wildcatt Orchids Database (2002)

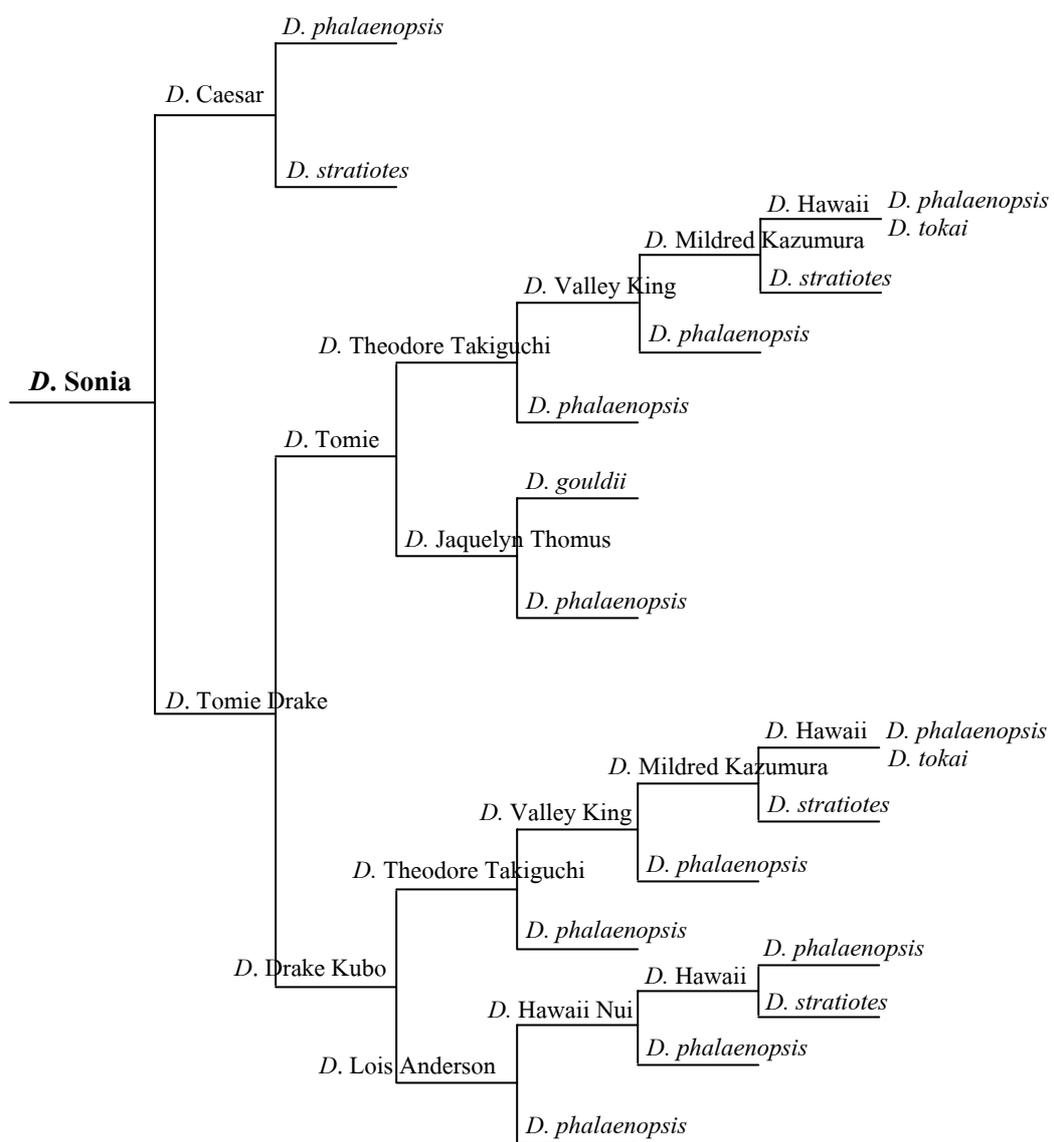
**ประวัติพันธุ์ *D. Intuwong***



ประวัติพันธุ์ *D. Jaquelyn Thomus*



**ประวัติพันธุ์ *D. Sonia***



ที่มา: Wildcatt Orchids Database (2002)

ประวัติพันธุ์ *D. Walter Oumae*

