ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247725

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย โดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

โดย : ผศ.ดร.สุรีพร เกตุงาม

พฤศจิกายน พ.ศ. 2553

b00252166

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
247725

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยโดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Genetic Diversity Assessment of Local Thai *Doritis* Germplasm in Northeast of Thailand using DNA Markers

โดย

ผศ.ดร.สุรีพร เกตุงาม

คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

พฤศจิกายน พ.ศ. 2553

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยโดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Genetic Diversity Assessment of Local Thai *Doritis* Germplasm in Northeast of Thailand using DNA Markers

โดย

ผศ.ดร.สุรีพร เกตุงาม

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณ
ประจำปีงบประมาณ 2550-2552

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
กิตติกรรมประกาศ	ฎ
สารบัญตาราง	ฏ
สารบัญรูปภาพ	ฑ
บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	19
ผลการวิจัย	37
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย	109
เอกสารอ้างอิง	113
ภาคผนวก	117
บทความวิจัยและการนำเสนอผลงานวิจัย	119

บทสรุปผู้บริหาร

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ ทำการศึกษาในเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่เก็บรวบรวมมาจาก 5 จังหวัด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่จังหวัดอุบลราชธานี ร้อยเอ็ด มุกดาหาร เลย และศรีสะเกษ รวม 69 สายต้น งานวิจัยประกอบด้วย 4 งานวิจัยย่อย ได้แก่ 1) การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 2) การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งโดยเทคนิคอาร์เอพีดี 3) การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี และ 4) การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเทคนิคอาร์เอพีดี และเทคนิคเอเอฟแอลพีในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

จากการศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอสำหรับกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 4 วิธี ได้แก่ วิธีที่ 1) 2% CTAB method (ดัดแปลงจาก Lodhi et al., 1994) วิธีที่ 2) Modification CTAB method (Knapp and Chandlee, 1996) วิธีที่ 3) 2% CTAB with phenol-chloroform (Sue et al., 1997) และ วิธีที่ 4) 20% SDS (ดัดแปลงจาก Dellaporta et al., 1983) ผลการศึกษาพบว่า วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง คือ การใช้วิธี 2% CTAB with phenol-chloroform ของ Sue et al. (1997) โดยได้ดีเอ็นเอได้ปริมาณมาก ประมาณ 5-10 ไมโครกรัม ดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดี มีลักษณะใสไม่มีสี และวิธีการสกัดดีเอ็นเอนี้สามารถลดปัญหาการปนเปื้อนของโพลีแซคคาไรด์ และสารประกอบฟีโนลิก ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งโดยเทคนิคอาร์เอพีดี จำนวน 50 สายต้น จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการศึกษาระดับความเข้มข้นขององค์ประกอบสารละลายในปฏิกิริยาอาร์เอพีดีที่เหมาะสมในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 4 สายต้น ได้แก่ สายต้น MDD3, MDD11, MDM14 และMDM15 โดยใช้ OPA01 เป็นไพรเมอร์ในการเข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบของกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิ่งในปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร กำหนดตัวแปรที่ศึกษา 3 ตัวแปรได้แก่ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ 2 ระดับ ได้แก่ 10 และ20 นาโนกรัม ความเข้มข้น *Taq* DNA polymerase 2 ระดับ ได้แก่ 0.5 ยูนิต และ 1 ยูนิต และความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ 3 ระดับ ได้แก่ 2, 2.5 และ 3 มิลลิโมลาร์ โดยกำหนดความเข้มข้นของ dNTPs และไพรเมอร์คงที่ คือ 200 และ 0.6 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ รวมตำหรับการทดลอง 12 ตำหรับ การทดลอง ใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วยโปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 40 รอบ ที่ Denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Annealing 36 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ Extension 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตาม

ด้วย Long Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ผลการศึกษา พบว่า ระดับความเข้มข้นขององค์ประกอบสารละลายพีซีอาร์ที่เหมาะสมสำหรับการสร้างลายพิมพ์อาร์เอพีดีของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ 10 นาโนกรัม แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 2.5 มิลลิโมลาร์ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต dNTPs 200 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์อาร์เอพีดี 0.6 ไมโครโมลาร์ และ สารละลาย PCR buffer 1X จากนั้นทำการคัดกรองไพรเมอร์อาร์เอพีดีที่เหมาะสมสำหรับการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง โดยศึกษาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดี จำนวน 110 ไพรเมอร์ พบว่า มีไพรเมอร์อาร์เอพีดีที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จำนวน 32 ไพรเมอร์ และมีไพรเมอร์อาร์เอพีดีที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และแสดงความแตกต่างระหว่างสายต้น (polymorphism) จำนวน 27 ไพรเมอร์ นำไปสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 50 สายต้น สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวน 336 แถบ และได้เครื่องหมายอาร์เอพีดีที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (polymorphic bands) จำนวน 204 เครื่องหมาย แต่ละไพรเมอร์ให้เครื่องหมายอาร์เอพีดีได้จำนวน ตั้งแต่ 2 ถึง 15 เครื่องหมาย คิดเป็นค่าเฉลี่ย 7 เครื่องหมาย ต่อไพรเมอร์ แถบดีเอ็นเอที่ได้ (fragment length) มีขนาดตั้งแต่ 400 ถึง 3000 คู่เบส โดยไพรเมอร์ OPD20 ให้จำนวนเครื่องหมายอาร์เอพีดีสูงสุด คือ 15 เครื่องหมาย ได้แถบดีเอ็นเอมีขนาดตั้งแต่ 600 ถึง 2500 คู่เบส รองลงมาคือไพรเมอร์ OPA01 OPB01 OPE05 OPF06 และOPF14 (11 เครื่องหมาย) ส่วน ไพรเมอร์ OPA03 OPA08 และ OPB04 ให้เครื่องหมายอาร์เอพีดีน้อยสุด คือ 2 เครื่องหมาย นำข้อมูลเครื่องหมายอาร์เอพีดีมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมโดยวิธีของ Dice (Dice's Similarity coefficient) พบว่า มีค่าตั้งแต่ 0.43 ถึง 0.98 คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.69 เมื่อนำข้อมูลความเหมือนทางพันธุกรรมมาจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA (UPGMA clusters analysis) และการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (Principal component analysis; PCA) พบว่า จัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และสามารถแยกกลุ่มกล้วยไม้ม้าวิ่ง และกล้วยไม้แดงอุบลได้อย่างชัดเจน ค่าผลรวมที่ได้จากการวิเคราะห์ปัจจัยหลักสามปัจจัยแรกสามารถอธิบายความผันแปรทั้งหมดของการประเมินความเหมือนทางพันธุกรรมได้ 43.71 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation coefficient (r = 0.75) บ่งชี้ว่าการจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุล ม้าวิ่งโดยเครื่องหมายอาร์เอพีดีมีความน่าเชื่อถือในระดับปานกลาง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี จำนวน 51 สายต้น จากการคัดกรองไพรเมอร์เอเอฟแอลพี (*Eco*RI+ 3 / *Mse*I+3) จำนวน 40 คู่ไพรเมอร์ ในตัวแทนกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 5 สายต้น ได้แก่ MVP26, MVP19, TT7, MVP17 และMVP39 พบว่า มีไพรเมอร์เอเอฟแอลพี จำนวน 12 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอชัดเจน จากนั้นนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเชื้อ

พันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 51 สายต้น ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวน 810 แถบ โดยได้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (AFLP markers) จำนวน 319 เครื่องหมาย โดยไพรเมอร์แต่ละคู่ให้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีเฉลี่ย จำนวน 26.58 เครื่องหมาย โดยแถบดีเอ็นเอ (marker size) มีขนาด ตั้งแต่ 200 ถึง 1000 คู่เบส เครื่องหมายเอเอฟแอลพีที่ได้มีจำนวนตั้งแต่ 17 ถึง 40 เครื่องหมาย โดยไพรเมอร์คู่ E-AAG/M-CAG ให้จำนวนเครื่องหมายสูงสุด คือ 40 เครื่องหมาย คิดเป็น 57.14 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนเครื่องหมายทั้งหมด ส่วนไพรเมอร์คู่ E-ACA/M-CAA ให้จำนวนเครื่องหมายน้อยสุด คือ 17 เครื่องหมาย คิดเป็น 23.61 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเครื่องหมายทั้งหมด ค่า polymorphic information content (PIC) หรือ heterozygosities ของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี จำนวน 319 เครื่องหมาย มีค่าตั้งแต่ 0.01-0.50 โดยมีค่า PICs ในช่วง 0.46-0.50 คิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเครื่องหมายทั้งหมด เมื่อนำเครื่องหมายเอเอฟแอลพีมาประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยวิธีของ Dice พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกันทางพันธุกรรม มีค่าตั้งแต่ 0.46 ถึง 0.98 โดยมีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.67 เมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกันทางพันธุกรรมมาจัดกลุ่มโดยใช้วิธี UPGMA และการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (PCA) พบว่า สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้เป็น 4 กลุ่ม และแยกกลุ่มกล้วยไม้ม้าวิ่ง และกล้วยไม้แดงอุบลได้อย่างชัดเจน ผลการวิเคราะห์ PCA สามพารามิเตอร์แรก สามารถอธิบายความผันแปร ของการประเมินความเหมือนทางพันธุกรรมได้ 52.82 เปอร์เซ็นต์ การจัดกลุ่มโดย UPGMA จากค่าความเหมือนทางพันธุกรรมมีค่า cophenetic correlation coefficient สูง ($r = 0.86$) แสดงว่าการจัดกลุ่มมีความเหมาะสมและมีความน่าเชื่อถือสูง

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเทคนิคอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี ในการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 32 สายต้น พบว่า จากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จากปฏิกิริยาอาร์เอพีดี จำนวน 22 assays สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้ 272 ตำแหน่ง โดยมี polymorphic markers จำนวน 165 เครื่องหมาย คิดเป็นค่าเฉลี่ย 7.5 เครื่องหมาย ต่อไพรเมอร์ ในขณะที่การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี จำนวน 12 assays ได้ polymorphic markers จำนวนสูงถึง 299 เครื่องหมาย คิดเป็นค่าเฉลี่ยของจำนวน polymorphic marker สูงถึง 26.58 เครื่องหมายต่อคู่ไพรเมอร์ โดยค่า effective multiplex ratio ซึ่งหมายถึง จำนวนของ polymorphic marker ที่ได้ในหนึ่งปฏิกิริยา ของเทคนิคเอเอฟแอลพีมีค่าสูงกว่า ค่า effective multiplex ratio ที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี ถึง 3.5 เท่า และเมื่อพิจารณาค่า marker index ซึ่งเป็นผลคูณของค่า effective multiplex ratio และค่า heterozygosity พบว่า เทคนิคเอเอฟแอลพี มีค่า marker index สูงกว่าเทคนิคอาร์เอพีดี (7.44 และ 2.55 ตามลำดับ) ถึง 2.9 เท่า เมื่อนำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 32 สายต้น ที่ได้จากเครื่องหมายอาร์เอพีดี และเครื่องหมายเอเอฟแอลพี รวมทั้งสิ้นจำนวน 464 เครื่องหมาย มาประเมินความสัมพันธ์ทาง

พันธุกรรม โดยวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกันทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Dice พบว่า มีค่าตั้งแต่ 0.50 ถึง 0.96 คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.67 จากนั้นนำมาจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA พบว่าสามารถจัดกลุ่มของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และแยกกลุ่มกล้วยไม้ม้าวิ่ง และกล้วยไม้แดงอุบลได้อย่างชัดเจน ค่าความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA มีค่า cophenetic correlation coefficient สูง (r = 0.87) บ่งชี้ได้ว่าการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 32 สายต้น โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี จำนวน 464 เครื่องหมาย เป็นการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมที่เหมาะสม และมีความน่าเชื่อถือสูง

ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจากแหล่งกระจายพันธุ์ใน 5 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ (อาร์เอพีดี และ เอเอฟแอลพี) แสดงให้เห็นว่า เชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งดังกล่าวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ โดยมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (Dice's similarity coefficient) เฉลี่ย 0.67-0.69 และสามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้ม้าวิ่ง และกล้วยไม้แดงอุบลออกจากกันได้อย่างชัดเจน จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเทคนิคอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพีในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง แสดงให้เห็นว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีมีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพในการนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ให้ ค่า effective multiplex ratio และ marker index สูงกว่าเทคนิคอาร์เอพีดี อย่างไรก็ตามเครื่องหมายอาร์เอพีดียังนิยมนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยาก และ ค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการใช้เทคนิคอื่นๆ ข้อมูลความความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งนี้ จะเป็นฐานข้อมูลสำคัญทางพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อการค้าต่อไปในอนาคต

247725

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งต้นโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ เชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้ที่นำมาศึกษาได้มาจากแหล่งกระจายพันธุ์ใน 5 จังหวัด ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยได้แก่ อุบลราชธานี ร้อยเอ็ด มุกดาหาร เลย และศรีสะเกษ รวม จำนวน 69 สายต้น จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 4 วิธี พบว่า วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง คือ วิธี 2% CTAB with phenol-chloroform ของ Sue et al. (1997) โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณมากเฉลี่ย 5-10 ไมโครกรัม และ คุณภาพดี โดยมีลักษณะใสไม่มีสี และวิธีนี้มีการปนเปื้อนของโพลีแซคคาไรด์ และสารประกอบฟีโนลิก น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 50 สายต้น โดยเทคนิคอาร์เอพีดี เริ่มจากการศึกษาระดับความเข้มข้นขององค์ประกอบสารละลายในปฏิกิริยาอาร์เอพีดีที่เหมาะสม กำหนดตัวแปรขององค์ประกอบสารละลายที่จะศึกษา 3 ตัวแปรได้แก่ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 2 ระดับ ได้แก่ 10 และ20 นาโนกรัม ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ 3 ระดับ ได้แก่ 2, 2.5 and 3.0 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้น *Taq* DNA polymerase 2 ระดับ ได้แก่ 0.5 และ 1 ยูนิต และ กำหนดความเข้มข้นของ dNTPs และไพรเมอร์ OPA01 คงที่ คือ 200 และ 0.6 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ PCR profile ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วยโปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 40 รอบ ที่ Denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที Annealing 36 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ Extension 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตามด้วย Long Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ผลการศึกษา พบว่า ระดับความเข้มข้นขององค์ประกอบสารละลายพีซีอาร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งโดยเทคนิคอาร์เอพีดีที่เหมาะสมในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ได้แก่ ดีเอ็นต้นแบบ 10 นาโนกรัม *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 2.5 มิลลิโมลาร์ dNTPs 200 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์อาร์เอพีดี 0.6 ไมโครโมลาร์ และ สารละลาย PCR buffer 1X จากการคัดกรองไพรเมอร์อาร์เอพีดี จำนวน 110 ไพรเมอร์ พบว่า มี 27 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และแสดงความแตกต่างระหว่างสายต้น (polymorphism) เมื่อนำไพรเมอร์ดังกล่าวมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 50 สายต้น สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ (เครื่องหมายอาร์เอพีดี) จำนวน 204 เครื่องหมาย แต่ละไพรเมอร์ให้เครื่องหมายอาร์เอพีดีได้ จำนวน ตั้งแต่ 2 ถึง 15 เครื่องหมาย คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7 เครื่องหมายต่อไพรเมอร์ นำข้อมูลเครื่องหมายอาร์เอพีดีมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมโดยวิธีของ Dice (Dice's Similarity coefficient) พบว่า มีค่าตั้งแต่ 0.43 ถึง 0.98 คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.69 เมื่อนำมาจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA (UPGMA cluster analysis) และ

247725

วิเคราะห์ปัจจัยหลัก (Principal component analysis: PCA) พบว่า จัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และแยกกลุ่มกล้วยไม้ม้าวิ่ง และกล้วยไม้แดงอุบลได้อย่างชัดเจน ค่าผลรวมที่ได้จากการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก สามปัจจัยแรกสามารถอธิบายความผันแปรทั้งหมดของการประเมินความเหมือนทางพันธุกรรมได้ 43.71 เปอร์เซ็นต์ และ ประเมินความเหมาะสมของการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมจากค่า cophenetic correlation coefficient (r) พบว่ามีความน่าเชื่อถือในระดับปานกลาง (r= 0.75)

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 51 สายต้น ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี จากการคัดกรองไพรเมอร์เอเอฟแอลพี (*Eco*RI+3 /*Mse*I+3) จำนวน 40 คู่ พบว่า มี 12 คู่ไพรเมอร์ ให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอชัดเจน ได้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ (AFLP markers) จำนวน 319 เครื่องหมาย คิดเป็นค่าเฉลี่ย 26.58 เครื่องหมายต่อคู่ไพรเมอร์ ค่า polymorphic information content (PIC) หรือ heterozygosity ของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี มีค่าตั้งแต่ 0.01-0.50 โดยค่า PICs ในช่วง 0.46-0.50 คิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเครื่องหมายทั้งหมด นำข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพีมาประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธีของ Dice พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้ม้าวิ่งที่ศึกษา มีค่าตั้งแต่ 0.46 ถึง 0.98 คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.67 จากนั้นนำข้อมูลความเหมือนทางพันธุกรรมมาจัดกลุ่มโดยใช้วิธี UPGMA และการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (PCA) สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้เป็น 4 กลุ่ม และแยกกลุ่มกล้วยไม้ม้าวิ่ง และกล้วยไม้แดงอุบลได้อย่างชัดเจน ผลการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (PCA) สามพารามิเตอร์แรก สามารถอธิบายความผันแปรของการประเมินความเหมือนทางพันธุกรรมได้ 52.82 เปอร์เซ็นต์ การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมมีความน่าเชื่อถือในระดับสูง (r = 0.86)

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างเทคนิคอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี ในการประเมินความผันแปรทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 32 สายต้น พบว่า การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จากเทคนิคอาร์เอพีดี จำนวน 22 assays และ เทคนิคเอเอฟแอลพี จำนวน 12 assays สามารถได้ polymorphic markers จำนวน 165 และ 299 เครื่องหมาย ตามลำดับ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 7.5 และ 26.58 เครื่องหมายต่อ assay ตามลำดับ โดยพบว่า เทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถให้ค่า effective multiplex ratio ซึ่งหมายถึง จำนวนของ polymorphic marker ที่ได้ในหนึ่งปฏิกิริยา สูงกว่า เทคนิคอาร์เอพีดี ถึง 3.5 เท่า และเมื่อพิจารณาค่า marker index ซึ่งเป็นผลคูณระหว่างค่า effective multiplex ratio และค่า heterozygosity พบว่า เทคนิคเอเอฟแอลพี มีค่า marker index สูงกว่าเทคนิคอาร์เอพีดี (7.44 และ 2.55 ตามลำดับ) ถึง 2.9 เท่า เมื่อนำเครื่องหมายอาร์เอพีดี และเครื่องหมายเอเอฟแอลพี รวมจำนวน 464 เครื่องหมาย มาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกันทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Dice พบว่า มีค่าตั้งแต่ 0.50 ถึง 0.96 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.67 จากนั้นนำมาจัดกลุ่มพันธุกรรม

247725

โดยวิธี UPGMA พบว่า สามารถจัดกลุ่มของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยสามารถแยกกลุ่มกล้วยไม้ม้าวิ่ง และกล้วยไม้แดงอุบลได้อย่างชัดเจน การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมมีความเหมาะสมและน่าเชื่อถือในระดับสูง (r= 0.87)

ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจากแหล่งกระจายพันธุ์ใน 5 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ (อาร์เอพีดี และ เอเอฟแอลพี) พบว่า เชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งดังกล่าว มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีมีความเหมาะสมในการนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ข้อมูลความความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งนี้ จะเป็นฐานข้อมูลสำคัญทางพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อการค้าต่อไปในอนาคต

คำหลัก: กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ความหลากหลายทางพันธุกรรม เครื่องหมายดีเอ็นเอ เทคนิคอาร์เอพีดี เทคนิคเอเอฟแอลพี

Abstract

247725

The objective of this research was to evaluate genetic diversity of *Doritis* germplasm in the Northeast of Thailand using DNA marker. Sixty nine *Doritis* samples were collected from 5 provinces including Ubon Ratchathani, Roi Et, Mukdanan, Loai and Srisaket. The comparison of 4 DNA extraction methods for *Doritis* germplasm indicated that the CTAB method as described by Sue et al (1997) gave high quantity and quality of DNA and less contamination of polysaccharide and phenolic compound comparing to those of other methods.

The assessment of genetic diversity of 50 *Doritis* germplasm was carried out using RAPD technique. The optimized RAPD reaction was performed by varying the concentration of DNA template (10 and 20 ng), $MgCl_2$ (2, 2.5 and 3.0 mM), and *Taq* DNA polymerase (0.5 and 1.0 unit) while fixing the concentration of RAPD primer and dNTPs at the concentration of 0.6 uM and 200 uM respectively. Reproducible amplification patterns with OPA01 primer were obtained using 2.5 mM of $MgCl_2$, 10 ng of template DNA and 1 U of *Taq* DNA polymerase in 20 ul of the reaction. The reaction were carried out in a thermal cycler (Perkin Elmer 9700) according to following amplification profile of initial denaturation at 94°C for five min, followed by 40 cycles of one min at 94°C, one min at 36°C and two min of 72°C. The reaction was further extended at 72°C for 10 min. Reproducible amplification patterns with OPA02 primer were obtained using 2.5 mM of $MgCl_2$, 10 ng of template DNA and 1 unit of *Taq* DNA polymerase in 20 ul of the reaction. Out of 110 RAPD primers screened, 27 primers revealing clear patterns of DNA amplification were selected for fingerprinting of 50 *Doritis* germplasm, which yielded a total of 204 polymorphic RAPD markers. Each primer produces RAPD markers ranging from 2 to 15 markers, with the average of 7 markers per primer. Dice's similarity coefficients for pair-wise comparisons ranged from 0.55 to 0.82, with the average of 0.76. A dendrogram constructed on the basis of the unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) clearly grouped 50 *Doritis* germplasm into two clusters, *Doritis pulcherrima* cluster and Daeng Ubon *(Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana)* cluster. The *Doritis pulcherrima* cluster consisted of genotypes whereas the other comprised of Daeng Ubon genotypes. The first three principal component analysis

247725

(PCA) accounted for 43.71 % of the total variation of the estimated genetic similarity. A moderately high cophenetic correlation coefficient (r= 0.75) indicated a good fit of this performed cluster analysis.

The determination of genetic relationships of 51 *Doritis* germplasm from the Northeast of Thailand was performed using AFLP technique. Out of 40 AFLP primer pairs of *Eco*RI+3 and *Mse*I+3 selective nucleotides screening, 12 AFLP primers showing clear patterns of DNA amplification were selected, which yielded a total of 319 AFLP markers, with an average of 26.58 polymorphic markers per AFLP primer pair. The AFLP fingerprints of 51 *Doritis* germplasm was scored as binary data. The polymorphic information content (PIC) of AFLP markers ranges from 0.01 to 0.5. The PIC score in the range from 0.46 to 0.5 was accounted for 70 % of total AFLP markers. Genetic similarity among *Doritis* genotypes based on Dice's coefficient was in the range of 0.46 to 0.98 with an average of 0.67. These similarity coefficients were utilized to construct a dendrogram using the unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA). The dendrogram was grouped into 4 clusters and clearly separated Daeng Ubon from *Doritis pulcherrima* clusters. The first three principal component analysis (PCA) accounted for 52.82 % of the total variation of the estimated genetic similarity. Cophenetic correlation coefficient was high (r= 0.86), showing a goodness of fit of this dendrogram.

The comparison of the efficiency between RAPD technique and AFLP technique for genetic variability determination was carried out in 32 *Doritis* germplasm. RAPD and AFLP fingerprinting of *Doritis* germplasm were performed in 22 and 12 assays, respectively which yielded 165 and 299 polymorphic markers, respectively, with an average of 7.5 and 26.58 markers per assay) more than RAPD technique for 3.5 times. Furthermore, marker index (the multiply of effective multiplex ratio and heterozygosity) from AFLP techniques (7.44) was higher than that from RAPD technique (2.55) for 2.9 times. The total of 464 polymorphic markers were combined from 165 RAPD and 299 AFLP markers and used for genetic determination of 32 *Doritis* germplasm using Dice similarity coefficient. Genetic similarity among *Doritis* genotypes was in the range of 0.50 to 0.96 with an average of 0.67. UPGMA cluster analysis was clearly grouped 32 *Doritis* germplasm into two clusters, *Doritis pulcherrima* cluster and Daeng Ubon *(Doritis pulcherrima* var.

247725

buyssoniana) cluster. Cophenetic correlation coefficient was high (r= 0.87), indicating a goodness of fit of this dendrogram.

The results from this research suggested that genetic diversity of *Doritis* germplasm distributed in 5 provinces in the Northeast of Thailand using RAPD and AFLP markers was less diverse. The marker comparison study revealed that AFLP technique was suitable for DNA fingerprinting and diversity study in living organisms due to high throughput polymorphic markers produce per assay. The genetic diversity and relationship information among *Doritis* germpalsm in the Northeast of Thailand will be useful for *Doritis* breeding in the future.

Keywords: *Doritis* orchid, Genetic diversity, DNA marker, RAPD technique, AFLP technique

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัย ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษาครั้งนี้ ทุนวิจัยที่ได้รับการสนับสนุนนี้อยู่ในส่วนแผนงานสนับสนุนด้านวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี วิจัย และนวัตกรรม ภายใต้งาน ผลงานวิจัยเพื่อสร้างองค์ความรู้ งบประมาณแผ่นดิน ปี 2550-2552 โครงการวิจัย "การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยโดยการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ" นี้เป็นโครงการย่อย ภายใต้ชุดโครงการวิจัย "การวิจัยและพัฒนาศักยภาพของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง"

ผู้วิจัย ขอขอบคุณ ผศ. ศรีประไพ ธรรมแสง และ ผศ.ดร. กาญจนา รุ่งรัชกานนท์ ที่เอื้อเฟื้อเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย ขอขอบคุณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่เอื้อเฟื้อสถานที่วิจัย และอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย ขอขอบคุณ นางสาวพัชรี ลาโคตร ผู้ช่วยวิจัยโครงการ และ ท้ายสุด ขอขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเปรียบเทียบลักษณะและคุณสมบัติด้านเทคนิคอาร์เอพีดี และเทคนิคเอเอฟแอลพี	18
2	แสดงลำดับเบสของ adapter และไพรเมอร์เอเอฟแอลพีทั้งหมดที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	32
3	แสดงรายชื่อกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่รวบรวมจากสถานที่ต่างๆจาก 5 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 69 สายต้น	38
4	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 69 สายต้น	42
5	แสดงรายชื่อกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 50 สายต้น ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์อาร์เอพีดี	53
6	ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง	54
7	แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์อาร์เอพีดี และเปอร์เซ็นต์ GC content ที่จะนำไปสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 50 สายต้น	57
8	แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์อาร์เอพีดี จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด (total bands) จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic bands) และขนาดของแถบดีเอ็นเอ (fragment length- bp) ของไพรเมอร์อาร์เอพีดีจำนวน 27 ไพรเมอร์	59
9	ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice (Dice's Similarity coefficient) ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 50 ตัวอย่างโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีจำนวน 204 เครื่องหมาย	66
10	แสดงรายชื่อกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 51 สายต้น ที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์เอเอฟแอลพี	74
11	แสดงคู่ไพรเมอร์เอเอฟแอลพีที่ใช้ในการคัดกรองการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 40 คู่ไพรเมอร์	75
12	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 51 สายต้นของ AFLP fingerprints และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic bands)	78

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของ Dice (Dice's Similarity coefficient) ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 51 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี จำนวน 319 เครื่องหมาย	87
14	แสดงรายชื่อกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่ใช้ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องหมายอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี	96
15	แสดงลำดับเบสของไพรเมอร์อาร์เอพีดี เปอร์เซ็นต์ GC content จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างของ (polymorphic bands) และขนาดของแถบดีเอ็นเอ (fragment length-bp)	97
16	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 32 สายต้นจาก AFLP fingerprints และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic band)	98
17	แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องหมายอาร์เอพีดี และเครื่องหมายเอเอฟแอลพีในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 32 สายต้น	99
18	ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 32 สายต้น ที่ได้จากเครื่องหมายอาร์เอพีดี จำนวน 165 เครื่องหมาย	101
19	ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 32 สายต้น ที่ได้จากเครื่องหมายเอเอฟแอล จำนวน 299 เครื่องหมาย	103
20	ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 32 สายต้น ที่ได้จากเครื่องหมายอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี จำนวน 464 เครื่องหมาย	106

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงไดอะแกรมตำหรับการทดลอง (Treatment; T) ของการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 12 ตำหรับการทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ OPA01	28
2	แสดงตัวอย่างความแตกต่างลักษณะดอกภายในกลุ่มของกล้วยไม้แดงอุบล.....	46
3	แสดงตัวอย่างความแตกต่างลักษณะต้นภายในกลุ่มของกล้วยไม้แดงอุบล.....	47
4	แสดงตัวอย่างความแตกต่างของลักษณะดอกภายในกลุ่มกล้วยไม้ม้าวิ่ง.....	48
5	แสดงตัวอย่างความแตกต่างลักษณะต้นภายในกลุ่มของกล้วยไม้ม้าวิ่ง.....	49
6	แสดงปริมาณแถบดีเอ็นเอที่สกัดได้ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 54 สายต้น โดยใช้วิธี 2% CTAB with phenol-chloroform ของ Sue et al. (1997).....	51
7	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสแสดงผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA 01 ใน 12 ตำหรับการทดลอง (T1-12) ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 4 สายต้น.....	55
8	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสแสดงผลการตรวจสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากคัดเลือกไพรเมอร์ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 4 สายต้น	56
9	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 54 สายต้น โดยใช้ไพรเมอร์ OPC 19.....	60
10	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 54 สายต้น โดยใช้ไพรเมอร์ OPC20.....	61
11	Dendrogam แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 50 สายต้น ด้วยวิธี UPGMAโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีจำนวน 204 เครื่องหมาย.....	72
12	การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (PCA) ของเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 50 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี จำนวน 204 เครื่องหมาย.....	73
13	แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการคัดกรองไพรเมอร์เอเอฟแอลพี (*Eco*RI+ 3 / *Mse*I+3) จำนวน 6 คู่ไพรเมอร์.....	76

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	แสดงตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการคัดกรองไพรเมอร์เอเอฟแอลพี (*Eco*RI+ 3 / *Mse*I+3) จำนวน 5 คู่ไพรเมอร์.....	77
15	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 33 สายต้น โดยใช้ไพรเมอร์เอเอฟแอลพี E02/M92G30 (E-AAG/M-CTC).....	79
16	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 34 สายต้น โดยใช้ไพรเมอร์เอเอฟแอลพี E02/M92G31 (E-AAG/M-CTT).....	80
17	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 33 สายต้น โดยใช้ไพรเมอร์เอเอฟแอลพี E02/M-CTA (E-AAG/M-CTA).....	81
18	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 16 สายต้น โดยใช้ไพรเมอร์เอเอฟแอลพี E02/M-CTA (E-AAG/M-CTA).....	82
19	การกระจายตัวของค่า Polymorphic information content (PIC) ของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี 319 เครื่องหมายในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 51 ตัวอย่าง.....	83
20	Dendrogam แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 51 สายต้นด้วยวิธี UPGMA โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี จำนวน 319 เครื่องหมาย.....	93
21	การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (PCA) ของเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 51 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี จำนวน 319 เครื่องหมาย.....	93
22	Dendrogram แสดงการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 32 สายต้น โดยวิธี UPGMA cluster analysis.....	104
23	Dendrogam แสดงการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 32 สายต้น ด้วยวิธี UPGMA โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพี จำนวน 165 เครื่องหมายและเครื่องหมายเอเอฟแอลพี จำนวน 299 เครื่องหมาย.....	107