อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

1.1 อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ

- โกร่งบดตัวอย่าง
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerate centrifuge machine)
- ชุดดูดสารละลายอัตโนมัติ (micropipette)
- เครื่องวัดความเป็นกรด – ด่างของสารละลาย (pH meter)
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine: Perkin Elmer thermal cycler)
- ชุดอิเล็กโทรโฟริซีสแนวนอน (Horizontal Electrophoresis)
- ชุดอิเล็กโทรโฟริซีส แนวตั้ง (Vertical Electrophoresis) สำหรับ PAGE
- เครื่องเขย่า รุ่น ROBOTA
- ชุดถ่ายภาพเจลอะกาโรส

1.2 วัสดุสิ้นเปลือง

- pipette tip ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ขนาด 10, 100 และ 1000 ไมโครลิตร)
- 0.2 ml PCR tube / 96 well plate
- หลอดทดลอง ขนาด 1.5 ml และ 2 ml

1.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- Cetyltrimethylammonipm bromide (CTAB)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate)
- NaCl
- EDTA
- Tris base
- Polyvinylpyrrolidone (PVP-40)
- Sodium acetate
- Ethanol
- Isopropanol
- Chloroform
- Isoamyl alchohol
- Octanol

1.4 สารละลายที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 1 โมลาร์ pH 8.0
- สารละลาย EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH8.0
- สารละลาย extraction buffer (2%CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 2% β-mercaptoethanol)
- สารละลาย Phenol: Chloroform: isoamyl alchohol (25:24:1)
- สารละลาย Chloroform- Octanol (24:1)
- β-mercaptoethanol
- NaCl 5 โมลาร์
- สารละลาย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0)
- Sodium acetate 2 โมลาร์
- Potassium acetate 5 โมลาร์
- น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

1.5 เอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- RNase A
- Proteinase K

1.6 สารเคมี และเอนไซม์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

- dNTPs
- $MgCl_2$
- 10x PCR buffer
- *Taq* DNA polymerase
- Primer

1.7 สารเคมี และสารละลายที่ใช้ใน Agarose Gel Electrophoresis

- Agarose
- TBE buffer (Boric acid, Tris-base, 0.5 EDTA (pH8.0))
- DNA marker standard
- Ethidium bromide

1.8 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Polyacrylamide Gel Electrophoresis

- 6 % polyacrylamide gel (40% polyacrylamide, urea, TBE buffer)
- TBE buffer (Boric acid, Tris-base, 0.5 EDTA (pH8.0))
- Ammonium persulfate
- TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine)

- 95% Ethanol
- Bine silane
- Sigma coat
- 37% formaldehyde

1.9 สารเคมีในการทำ Silver straining

- 10 % acetic acid
- 37 % formaldehyde
- 0.1 % silver nitrate
- Sodium carbonate
- Sodium thiosulfate

วิธีการทดลอง

1. เชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

1.1 เชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

เชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้จากการรวบรวมจากแหล่งต่างๆในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ใน 5 จังหวัด ได้แก่ ร้อยเอ็ด อุบลราชธานี ศรีสะเกษ เลย และ มุกดาหาร โดยโครงการ การเก็บรวบรวมและศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งภายใต้แผนงานการวิจัยและพัฒนาศักยภาพของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง ซึ่งนำมาอนุบาลเพื่อปลูกขยายพันธุ์ในโรงเรือนเพาะชำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

1.2. บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ (ที่ศึกษาในการทดลอง) ดังนี้

- ลักษณะดอก เช่น ดอกลู่ ดอกผึ่ง
- ลักษณะใบ เช่น ใบกลมสั้น ใบกลมยาว ใบเรียวเล็ก ใบเรียวยาว ใบเรียวกว้าง
- สีกลีบดอก เช่น สีขาว สีม่วงอ่อนเกือบขาว สีม่วงอ่อน สีม่วงเข้ม
- สีปากดอก เช่น สีม่วง สีแดงเข้ม สีส้ม สีเหลือง สีขาว สีม่วงเข้ม สีส้มอมเหลือง
- สีก้านดอก เช่น สีเขียว สีเหลืองเขียว

2. การทดสอบวิธีการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

เก็บใบอ่อนรองจากใบยอดอ่อน ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis sp.*) ตัดเป็นชิ้นเล็กเพื่อใช้ในการศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมโดยดำเนินการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 4 วิธี รายละเอียดดังนี้

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)

วิธีที่ 4 20% SDS (ดัดแปลงจาก Dellaporta et al., 1983)

2.1 วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดย 2%CTAB method (ดัดแปลงจาก Lodhi et al., 1994)

1. เตรียมตัวอย่างใบอ่อนของกล้วยไม้ประมาณ 200 มิลลิกรัม ใส่ในโกร่งที่แช่เย็น บดให้ละเอียด ถ่ายผงใบลงในหลอดเซนติฟิวซ์ขนาด 2 มิลลิลิตร

2. เติม CTAB extraction buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl เติม 2 % β- mercaptoethanol) แล้วเติม

polyvinylpyrrolidone (PVP-40) 50 มิลลิกรม ในหลอดเซนติฟิวซ์ ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

3. เติมสารละลาย Chloroform: Octanol ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

4. ไปเปตสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาณครึ่งหนึ่งของปริมาตรสารที่ดูดได้ และเติม Isopropanol เท่ากับส่วนใส ผสมเบาๆให้เข้ากัน

5. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง

6. ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ~ 2 ครั้ง ปล่อยให้ดีเอ็นเอแห้ง

7. ละลายดีเอ็นเอในน้ำ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

8. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 3 คืน เติม RNaseA (10mg/ml) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และเก็ดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดย Modification CTAB method (Knapp และ Chandlee, 1996)

1. นำใบ กล้วยไม้ 200 มิลลิกรัม ใส่ในโกร่งเติมไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียด ถ่ายผงใบลงในหลอดเซนติฟิวซ์

2. เติม Extraction buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร (3% CTAB, 1.42 M NaCl, 20 mM EDTA, 100mM Tris-Cl; pH 8.0, 2% polyvinylpyrrolidone และ 5 mM Ascorbic acid) บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. เติม Chloroform: Isoamyl alcohol (24: 1) ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 12000 รอบ นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. ไปเปตส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 5 % CTAB solution in 0.7 mM NaCl ปริมาตร 1/5 เท่า บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. เติม CIA (chloroform: isoamyl alcohol) ปริมาตรเท่ากันกับส่วนใสที่ไปเปตได้ ผสมเบาๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 12000 รอบ นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. ไปเปตส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม Ethanol 100 % ที่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีให้ ดีเอ็นเอตกตะกอน (-20 องศาเซลเซียส 1 คืน) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 12000 รอบ นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง

7. ล้างตะกอนด้วย 70 % Ethanol 2 ครั้ง ตากตะกอนให้แห้ง (ทิ้งไว้ 1 คืน) ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำ 100 ไมโครลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2.3 วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดย 2%CTAB with phenol-chloroform (Sue et al., 1997)

1. บดใบกล้วยไม้ให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว แล้วถ่ายผงใบลงในหลอดเซนติฟิวซ์ขนาด 2 มิลลิลิตร

2. เติม Extraction buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร (100 mM Tris, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8.0), 2% CTAB, 0.3% β-mercaptoethanol) และเติม PVP ประมาณ 50 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 25-60 นาที

3. นำออกมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 4- 6 นาที และเติม Chloroform: octanol (24:1) ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่เติม Chloroform: octanol (24:1) อีกเพื่อกำจัด PVP ในสารละลาย

4. เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 1/2 เท่า ผสมให้เข้ากัน และเติม 95% Ethanol ที่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่า ผสมให้เข้ากันถ้าต้องการให้ดีเอ็นเอตกตะกอนต้องแช่ที่ – 20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หรืออาจจะแช่นาน 1 คืน

5. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง

6. ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ตากตะกอนที่ 37 องศาเซลเซียส หรือใน vacuum จนแห้ง (ประมาณ 1 ชั่วโมง)

7. ละลายตะกอนด้วย TE buffer 300 ไมโครลิตร ที่ 4-6 องศาเซลเซียส 1 คืน เติม 3 ไมโครลิตร RNase A (10 mg/ml) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชม. และเติม Proteinase K 3 µl (1 mg/ml) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส อีก 15 - 30 นาที

8. เติม Phenol: chloroform 150:150 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 - 20 นาที

9. ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม Sodium acetate เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 1/10 เท่า และ absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า เก็บไว้ในตู้เย็น 1 คืน

10. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10-20 นาที

11. ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ตากตะกอนให้แห้ง เติม TE buffer 100-200 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2.4 วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดย 20% SDS (ดัดแปลงจาก Dellarpota et al., 1983)

1. บดใบกล้วยไม้มาให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวแล้วถ่ายลงในหลอดเซนติฟิวซ์ ที่มี Extraction buffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl) ปริมาตร 650 ไมโครลิตร และเติม β- mercaptoethanol บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เติม 20% SDS ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยเขย่าอย่างแรงบ่มที่ 65 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที ผสมกลับหลอดไปมาครั้งคราว

2. เติม Potassium acetate เข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าอย่างแรงแล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

3. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย Chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ลงไป 1 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ดูดมา ผสมโดยกลับหลอดไปมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4. ไปเปตสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม Isopropanol ปริมาตร 0.7 เท่าของสารละลายที่ดูดมาผสมเบาๆ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

5. เกี่ยวตะกอนดีเอ็นเอขึ้นมาใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วผึ่งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส จนตะกอนละลายหมด

6. เติม Absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่มี เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

7. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ ห้อง เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง

8. ล้างด้วยเอทานอล 70 % ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที 2 ครั้ง เทสารละลายออก

9. ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนด้วย RNase A buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 15 mM NaCl) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

10. กำจัด RNA โดยเติม RNase A ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

11. กำจัด RNase A และโปรตีนออก โดยเติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

12. ไปเปตสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม Chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ลงไป 1 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ดูดมา ผสมโดยกลับหลอดไปมา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง

ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่

13. เติม Sodium acetate 3 โมลาร์ pH 5.2 ลงไป 0.1 เท่า และเติม absolute ethanol ลงไป 2 เท่า ของปริมาตรสารละลายที่ดูดมา เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เก็บที่ – 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 % ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง

14. ละลายตะกอนด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1mM EDTA) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

การประเมินความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยเปรียบเทียบกับปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน [Lambda DNA(Fermentas)] 50 และ 100 นาโนกรัม ด้วยวิธีวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส ใช้เจลอะกาโรส (agarose gel) ที่มีความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1x TBE buffer โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ด้วย Gel document

3. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งโดยเทคนิคอาร์เอพีดี (Genetic diversity analysis of *Doritis* germplasm using RAPD technique)

3.1 เชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่ศึกษา

นำเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่ปลูกในเรือนเพาะชำจากการเก็บรวบรวมจากสถานที่ต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 3 จังหวัด ได้แก่ ร้อยเอ็ด อุบลราชธานี และมุกดาหาร มาใช้ในการศึกษาการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี จำนวน 50 สายต้น

3.2 การศึกษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของปฏิกิริยาอาร์เอพีดี

สุ่มดีเอ็นเอของกล้วยไม้แดงอุบลและกล้วยไม้ม้าวิ่ง จำนวน 4 ตัวอย่างได้แก่ สายต้น MDD3, MDD11, MDM14 และMDM15 มาเป็นตัวแทนในการศึกษาองค์ประกอบของสารละลายที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์จากเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPA01 เป็นตัวเริ่มการเข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบของกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิ่ง ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร กำหนดความเข้มข้นของ dNTPs และไพรเมอร์คงที่ คือ dNTPs เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ และ 0.6 ไมโครโมลาร์ และกำหนดตัวแปรขององค์ประกอบสารละลายที่จะศึกษา 3 ตัวแปรได้แก่ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ, ความเข้มข้น *Taq* DNA polymerase และความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

1. ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบที่ระดับความเข้มข้น 2 ระดับได้แก่ 10 และ20 นาโนกรัม

2. ความเข้มข้น Taq DNA polymerase 2 ระดับ คือ 0.5 ยูนิต และ 1 ยูนิต

3. ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 2, 2.5 และ 3 มิลลิโมลาร์

จากตัวแปรขององค์ประกอบของสารละลายที่ศึกษา สามารถกำหนดตำหรับการทดลอง (Treatment condition) ได้ 12 ตำหรับการทดลอง ดังแสดงในไดอะแกรม ภาพที่ 1 ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Perkin Elemer thermal cycler 9700 โปรแกรมที่ใช้ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ มี ดังนี้

ขั้นที่ 1: Denaturation: 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

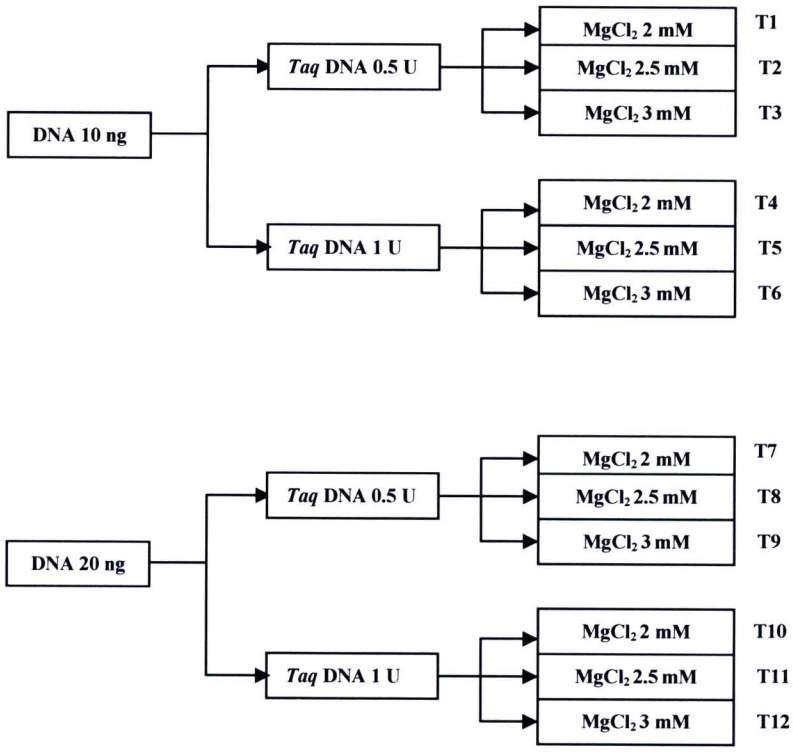
ขั้นที่ 2: PCR cycle จำนวน 40 รอบ

1. Denaturation: 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
2. Annealing: 36 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
3. Extension: 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

ขั้นที่ 3: Long Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3.3 การคัดเลือกไพรเมอร์อาร์เอพีดีเพื่อใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (RAPD primer screening for Doritis DNA fingerprinting)

สุ่มดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 4 ตัวอย่างได้แก่ สายต้น MDD3, MDD11, MDM14 และMDM15 เพื่อเป็นตัวแทนในการคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) ได้ชัดเจน โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 110 ไพรเมอร์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมจากผลการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมในปฏิกิริยาอาร์เอพีดี-พีซีอาร์ (ข้อ 3.2) สำหรับ PCR profile ประกอบด้วยอุณหภูมิ denaturation เริ่มแรก 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และเข้าสู่ cycle จำนวน 40 รอบ ที่อุณหภูมิ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และบ่มในรอบสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที



ภาพที่ 1 แสดงไดอะแกรมตำหรับการทดลอง (Treatment; T) ของการศึกษาระดับความเข้มข้นของสารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 12 ตำหรับการทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ OPA01 รายละเอียดของตำหรับการทดลอง 12 ตำหรับการทดลอง มีดังนี้

T 1 = DNA 10 ng, *Taq* DNA 0.5 U, $MgCl_2$ 2 mM
T 2 = DNA 10 ng, *Taq* DNA 0.5 U, MgCl2 2.5 mM
T 3 = DNA 10 ng, *Taq* DNA 0.5 U, MgCl2 3 mM
T 4 = DNA 10 ng, *Taq* DNA 1 U, MgCl2 2 mM
T 5 = DNA 10 ng, *Taq* DNA 1 U, MgCl2 2.5 mM
T 6 = DNA 10 ng, *Taq* DNA 1 U, MgCl2 3 mM
T 7 = DNA 20 ng, *Taq* DNA 0.5 U, MgCl2 2 mM
T 8 = DNA 20 ng, *Taq* DNA 0.5 U, MgCl2 2.5 mM
T 9 = DNA 20 ng, *Taq* DNA 0.5 U, MgCl2 3 mM
T 10 = DNA 20 ng, *Taq* DNA 1 U, MgCl2 2 mM
T 11 = DNA 20 ng, *Taq* DNA 1U, MgCl2 2.5 mM
T 12 = DNA 20 ng, *Taq* DNA 1 U, $MgCl_2$ 3 mM

3.4 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD fingerprints)

นำดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 50 สายต้นมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้มีการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสม (Optimization of RAPD-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้จากการคัดเลือกไพรเมอร์ (ข้อ 3.3) บันทึกแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่นำมาศึกษา

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลอาร์เอพีดี (RAPD data analysis)

3.5.1 การอ่านข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ซึ่งจะบันทึกค่าความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ (polymorphism) โดยบันทึกแบบ binary data คือ ถ้าพันธุ์ใดปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่กำหนด ให้กำหนดค่าเป็น 1 (presence) แต่ถ้าพันธุ์ใดไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ตรวจสอบ ให้กำหนดค่าเป็น 0 (absence)

3.5.2 นำข้อมูล binary data ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 50 สายต้น มาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc version 2.2 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System)(Rohlf, 2004) โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice (Dice's Similarity coefficient) (Dice, 1945) โดยประเมินจาก

$$GS = Nij / Ni + Nj$$

โดยที่ Nij คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างที่ i และ j

Ni คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างที่ i

Nj คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างที่ j

จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (Cluster analysis) ด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method based on Arithmetic average (UPGMA) เพื่อสร้าง dendrogram ที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จากนั้นจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (Principal component analysis: PCA) เพื่อตรวจสอบความผันแปรของจีโนไทป์ และตรวจสอบความแม่นยำของการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation coefficient (r) ซึ่งค่าที่บ่งบอกถึงความน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่ม โดยเปรียบเทียบระหว่าง genetic similarity matrix ที่ใช้ในการจัดกลุ่มและค่า cophenetic value matrix

4. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี (Genetic diversity analysis of *Doritis* germplasm using AFLP technique)

4.1 เชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

นำเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่ปลูกในเรือนเพาะชำ จากการเก็บรวมจากแหล่งต่างๆในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 5 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดร้อยเอ็ด จังหวัดเลย จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดมุกดาหาร จังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 51 สายต้น มาใช้ในการศึกษาการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

4.2 การคัดเลือกไพรเมอร์เอเอฟแอลพี (AFLP primers screening)

4.2.1 ขั้นตอนของเทคนิคเอเอฟแอลพี (Vos et al., 1995) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. การตัดหรือย่อยดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาณ 100 นาโนกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดใน คือ *Eco*RI (New England, BioLabs) และ *Mse*I (New England, BioLabs) อย่างละ 4 ยูนิต ในปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1.30 ชั่วโมง จากนั้นเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I ด้วย DNA adapter ได้แก่ *Eco*RI adapter และ *Mse*I adapter โดยนำดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาเติมสารละลายที่ประกอบด้วย *Eco*RI adapter (5 pmol/µl) 2.24 µl, *Mse*I adapter (25 pmol/µl) 3.2 µl, 10x ligase buffer 4 µl, ATP (10 mM) 4.8 µl, T4 DNA ligase 0.5 unit (GE) รวมปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

2. นำดีเอ็นเอที่ตัดและเชื่อมต่อด้วย adapter มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 ครั้ง ประกอบด้วย preselective amplification และ selective amplification โดย preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณโดยการใช้ไพรเมอร์เพิ่มเบสเฉพาะเพื่อคัดเลือก 1 เบส โดยใช้ *Eco*RI+A และ *Mse*I+C (ตารางที่ 2) โดยนำดีเอ็นเอจาก Restriction- ligation solution มาทำปฏิกิริยาปริมาตร รวม 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย RL DNA solution 4 µl, primer E-92R11 (5 pmole/ µl) 0.6 µl, primer M-92H20 (5 pmole/µl) 0.6 µl, 2.5 mM dNTP 1.2 µl, 10X PCR buffer 1 µl, 25 mM $MgCl_2$ 0.9 µl, *Taq* DNA polymerase (5U/µl) 0.5 µl นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วย PCR profile 94 °C นาน 30 วินาที 56 ° C นาน 60 วินาที และ 72 ° C นาน 60 วินาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นเจือจาง preselective amplification products และนำไปเพิ่มประมาณดีเอ็นเอโดย selective amplification ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' *Eco*RI และ *Mse*I primer จำนวน 3 เบสโดยนำดีเอ็นเอจาก diluted preselective

amplification products มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยมีปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย preselective amplification products 5 µl, primer E+3 (5 pmole/ µl) 1 µl, primer M+3 (5 pmole/µl) 1 µl, 2.5 mM dNTP 1.6 µl, 10X PCR buffer (20 mM $MgCl_2$) 1.6 µl, *Taq* DNA polymerase (5U/µl) 0.1 µl นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้โปรแกรม touch down ซึ่งมี PCR profile ดังนี้เริ่มจาก 94 °C นาน30 วินาที 65 °C นาน 30 วินาที และ 72 °C นาน 60 วินาที จำนวน 1 รอบ แล้วลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65°C) ลงรอบละ 0.7 °C จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย 94 °C นาน 30 วินาที 56 °C นาน 30 วินาที และ 72 °C นาน 60 วินาที จำนวน 23 รอบ และ long extension 72 °C นาน 10 นาที แล้วนำไปแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

3. การแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค denaturing polyacrylamide gel electrophoresis โดยนำดีเอ็นเอ Selective amplification มาแยกขนาดด้วย 6% polyacrylamide gel ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 60 วัตถ์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำกระจกมาย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท เพื่อตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ (polymorphism)

4.2.2 การคัดเลือกไพรเมอร์เอเอฟแอลพีเพื่อใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง โดยทำการสุ่มตัวอย่างดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 5 สายต้น ได้แก่ MVP26, MVP19, TT7, MVP17 และMVP39 เป็นตัวแทนในการคัดเลือกไพรเมอร์เอเอฟแอลพีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) ได้ชัดเจน โดยใช้ไพรเมอร์ *Eco*RI +3/ *Mse*I+3 จำนวน 40 คู่ไพรเมอร์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ตารางที่ 2) ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ (preselective amplification products) 5 µl, primer E+3 (5 pmole/ µl) 1 µl, primer M+3 (5 pmole/µl) 1 µl, 2.5 mM dNTP 1.6 µl, 10X PCR buffer (20 mM MgCl2) 1.6 µl, *Taq* DNA polymerase (5U/µl) 0.1 µl โดยใช้โปรแกรม touch down 94 °C นาน 30 วินาที 65 °C นาน 30 วินาที และ 72 °C นาน 60 วินาที จำนวน 1 รอบ แล้วลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65°C) ลงรอบละ 0.7 °C จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย 94 °C นาน 30 วินาที 56 °C นาน 30 วินาที และ 72 °C นาน 60 วินาที จำนวน 23 รอบ และ long extension 72 °C นาน 60 วินาที

ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบส adapter และไพรเมอร์เอเอฟแอลพีทั้งหมดที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Adapter/Primers	Name	Sequence 5' to 3'
*Eco*RI Adaptors	91M35	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	91M36	5'-AATTGGTACGCAGTC-3'
*Mse*I Adaptors	92A18	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
	92A19	5'-TACTCAGGACTCAT-3'
*Eco*RI +1 Primer	92R11	5'-GACTGCGTACCAATTC/A-3'
*Mse*I +1 Primer	92H20	5'-GATGAGTCCTGAGTAA/C-3'
*Eco*RI +3 Primers	92SO5	5'-GACTGCGTACCAATTC/ACA-3'
	E-01	5'-GACTGCGTACCAATTC/AAC-3'
	E-02	5'-GACTGCGTACCAATTC/AAG-3'
	E04	5'-GACTGCGTACCAATTC/ACC-3'
	E05	5'-GACTGCGTACCAATTC/ACG-3'
*Mse*I +3 Primers	92G23	5'-GATGAGTCCTGAGTAA/CAG-3'
	92G24	5'-GATGAGTCCTGAGTAA/CAT-3'
	92G29	5'-GATGAGTCCTGAGTAA/CTG-3'
	92G30	5'-GATGAGTCCTGAGTAA/CTC-3'
	92G31	5'-GATGAGTCCTGAGTAA/CTT-3'
	92F10	5'-GATGAGTCCTGAGTAA/CAC-3'
	92F41	5'-GATGAGTCCTGAGTAA/CAA-3'

4.3 การสร้างลายพิมพ์เอเอฟแอลพี (AFLP fingerprinting)

นำดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 51 สายต้นมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ *Eco*RI +3/ *Mse*I+3 ที่ได้จากการคัดเลือก (ข้อ 4.2.2) ทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้จากแต่ละคู่ไพรเมอร์ที่แสดงความแตกต่างแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนและสามารถนำไปใช้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและบันทึกผล polymorphism ที่เกิดขึ้น

4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลเอเอฟแอลพี (AFLP data analysis)

4.4.1 การอ่านข้อมูลของลายพิมพ์เอเอฟแอลพี

บันทึกข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี แบบ binary data โดยกำหนดให้ 1 เป็นการปรากฏแถบดีเอ็นเอ (presence) และกำหนดให้ 0 เป็นการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (absence)

4.4.2. การคำนวณค่า Polymorphic information content (PIC)

ค่า Polymorphic information content (PIC) เป็นค่าที่บ่งบอกโอกาสที่จะพบตัวอย่างที่สุ่มมา โดยสุ่ม 2 ตัวอย่างที่มีความแตกต่างกัน (polymorphism) ที่ตำแหน่งของ marker ที่กำหนดโดยประเมินจาก

$$H = 1 - \sum_{i=1}^{k} p_i^2$$

โดยที่ p_i คือ ความถี่ของ i^{th} อัลลีล (allele) และ k คือจำนวนของอัลลีล (Ott, 1991)

4.4.3.วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

นำข้อมูล binary data ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 51 สายต้นมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc version 2.2 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (Rohlf, 2004) โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice (Dice's Similarity coefficient) (Dice, 1945) โดยประเมินจาก

$$GS = Nij / Ni + Nj$$

โดยที่ Nij คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างที่ i และ j

Ni คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างที่ i

Nj คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างที่ j

จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (Cluster analysis) ด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method based on Arithmetic average (UPGMA) เพื่อสร้าง dendrogram ที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จากนั้นจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (Principal component analysis: PCA) เพื่อตรวจสอบความผันแปรของจีโนไทป์ และตรวจสอบความแม่นยำของการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation coefficient (r) ซึ่งค่าที่บ่งบอกถึงความน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่ม โดยเปรียบเทียบระหว่าง genetic similarity matrix ที่ใช้ในการจัดกลุ่มและค่า cophenetic value matrix

5. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องหมายอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

5.1 เชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

นำเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่ได้จากการวิเคราะห์ผลจากเทคนิคอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี จำนวน 32 สายต้น มาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องหมายอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี

5.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

นำดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 32 สายต้น มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดี จำนวน 22 ไพรเมอร์ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ 10 นาโนกรัม แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ *Taq* DNA polymerase เข้มข้น 1 ยูนิต dNTPs 200 ไมโครโมลาร์ RAPD primer 0.6 ไมโครโมลาร์ และ 1x buffer สำหรับ PCR profile ประกอบด้วยอุณหภูมิ denaturation เริ่มแรก 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และเข้าสู่ cycle จำนวน 40 รอบ ที่อุณหภูมิ denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ annealing ที่ 36 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และบ่มในรอบสุดท้าย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำมาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ (polymorphism) ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซีส ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.2 เปอร์เซ็นต์

5.3 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

นำดีเอ็นของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 32 สายต้นมาสร้างลายพิมพ์เอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ *Eco*RI+3 และ *Mse*I+3 จำนวน 12 คู่ไพรเมอร์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร รวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย preselective amplification products 5 µl, primer E+3 (5 pmole/µl) 1 µl, primer M+3 (5 pmole/µl) 1 µl, 2.5 mM dNTP 1.6 µl, 10X PCR buffer (20 mM $MgCl_2$) 1.6 µl, *Taq* DNA polymerase (5U/µl) 0.1 µl นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาพีซี

อาร์ โดยใช้โปรแกรม touch down 94 °C นาน 30 วินาที 65 °C นาน 30 วินาที และ 72 °C นาน 60 วินาที จำนวน 1 รอบ แล้วลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65°C) ลงรอบละ 0.7 °C จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย 94 °C นาน 30 วินาที , 56 °C นาน 30 วินาที และ 72 °C นาน 60 วินาที จำนวน 23 รอบ แล้วนำไปแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ใน 6% polyacrylamide gel ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 60 วัตถ์ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำกระจกมาย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท เพื่อตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ (polymorphism)

5.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี เทคนิคเอเอฟแอลพี และเทคนิคอาร์เอพีดีร่วมกับเทคนิคเอเอฟแอลพี

โดยทำการบันทึกข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจากเทคนิคอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี จำนวน 32 สายต้น แบบ binary data จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.2 เริ่มจากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของ Dice นำข้อมูลความเหมือนทางพันธุกรรมมาจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA ตรวจสอบความแม่นยำของการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation coefficient (r)