



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การสร้างแผนที่โครโมโซมในกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย
ชนิดไมโครแซทเทลไลต์และดีเอ็นเอเครื่องหมายจากลำดับเบสไอเอสที

The Genetic Linkage Map of *Dendrobium* Orchid Based on Microsatellite
and EST-derived Markers

นามผู้วิจัย นางสาวนริศ เจือจุน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์จุลภาค คຸ້ນวงศ์, Ph. D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(Mr. Hugo Volkaert, Ph. D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph. D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D. Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสถิตี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การสร้างแผนที่โครโมโซมในกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย
ชนิดไมโครแซทเทลไลต์และดีเอ็นเอเครื่องหมายจากลำดับเบสอีเอสที

The Genetic Linkage Map of *Dendrobium* Orchid Based on Microsatellite
and EST-derived Markers

โดย

นางสาวนริศ เจือจุน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นริศ เจือจน 2556: การสร้างแผนที่โครโมโซมในกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้ดีเอ็นเอ
เครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์และดีเอ็นเอเครื่องหมายจากลำดับเบสอีเอสที
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
เกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
รองศาสตราจารย์จุลภาค คูนวงศ์, Ph. D. 88 หน้า

การพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายจากลำดับเบสอีเอสทีของกล้วยไม้สกุลหวาย ฟาแลนด์อป
ซิส และออนซิดีเยม จำนวน 301 เครื่องหมาย พบความแตกต่างของดีเอ็นเอระหว่าง *Dendrobium*
'Caesar' กับ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* จำนวน 20 เครื่องหมาย
(6.6%) และจากดีเอ็นเอเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 295 เครื่องหมายให้ความแตกต่าง
ของดีเอ็นเอ 100 เครื่องหมาย (33.9%) นำดีเอ็นเอเครื่องหมาย 134 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นชนิด
ไมโครแซทเทลไลต์ 90 เครื่องหมาย และดีเอ็นเอเครื่องหมายจากอีเอสที 17 เครื่องหมาย ไปสร้าง
แผนที่โครโมโซมของกล้วยไม้สกุลหวาย โดยใช้ประชากรลูกผสม F₁ ระหว่าง *Dendrobium*
'Caesar' กับ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* ที่มีจำนวนชุดของ
โครโมโซมเป็นดิพลอยด์ ($2n=2x=38$) จำนวน 224 ต้น พบว่ามีการกระจายตัวของจีโนไทป์ใน
ประชากรลูกผสมในอัตราส่วน 1:1:1:1, 1:1 และ 3:1 จำนวน 40 ตำแหน่ง (29.6%) 83 ตำแหน่ง
(62.2%) และ 11 ตำแหน่ง (8.1%) ตามลำดับ และมีดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีการกระจายตัวไม่
เป็นไปตามอัตราส่วนจำนวน 11 ตำแหน่ง (8.1%) ที่ $P<0.05$ และ 49 ตำแหน่ง (36.3%) ที่ $P<0.01$
จากดีเอ็นเอเครื่องหมาย 134 ตำแหน่ง นำมาสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจ โดยใช้โปรแกรม JoinMap
v.3 (Van Ooijen and Voorrips, 2001) โดยยอมรับค่า LOD มากกว่า 3 maximum distance 50 cM
สามารถจัดเป็นกลุ่มลิงค์เกจได้ 22 กลุ่ม ประกอบด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย 110 ตำแหน่ง คิดเป็น
ระยะทาง 1,024.7 cM

Narisa Juejun 2013: The Genetic Linkage Map of *Dendrobium* Orchid Based on Microsatellite and EST-derived Markers. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Julapark Chunwongse. Ph. D. 88 pages.

Three hundred and one EST-derived markers were developed from *Dendrobium*, *Phalaenopsis* and *Oncidium* EST. Twenty (6.6%) of EST-derived markers and 100 (33.9%) of microsatellite markers showed DNA polymorphism between *Dendrobium* ‘Caesar’ and (*Dendrobium* ‘Sri-Racha’ x *D.* ‘Snowfire’) x *D. bigibbum*. A genetic linkage map of *Dendrobium* orchid was constructed using microsatellite and EST-derived markers on an F₁ diploid population (2n=2x=38) of 224 individuals from a cross between *Dendrobium* ‘Caesar’ and (*Dendrobium* ‘Sri-Racha’ x *D.* ‘Snowfire’) x *D. bigibbum*. Total of 134 loci comprised of 90 microsatellite and 17 EST-derived markers were used in linkage analysis. Forty markers were found to be segregating at 1:1:1:1 ratio (29.6%), 83 at 1:1 ratio (62.2%) and 11 at 3:1 ratio (8.1%). About 8% of loci showed a distorted segregation at P<0.05 and 36% at P<0.01. The genetic linkage map was constructed using JoinMap v.3 (Van Ooijen and Voorrips, 2001) with minimum LOD score of 3 and maximum distance of 50 cM. The linkage map comprised of 25 groups with 110 loci and spanned 1,024.7 cM.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จุลภาค คุณวงศ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำเรื่องการเรียนรู้ การทำวิจัย และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี Dr. Hugo Volgaert กรรมการที่ปรึกษา ที่ให้คำปรึกษา และตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์นี้จนเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบพระคุณ ดร.ธีรยุทธ ตูจินดา ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก และดร.จรัสรัตน์ มงคลศิริวัฒนา ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานักศึกษาศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบคุณ คุณฉัฐพร คุณวงศ์ที่ได้ให้คำปรึกษา ในการทำงานวิจัย ตลอดจนความรู้ในการทำการทดลอง เทคนิคและคำแนะนำต่างๆ ในการทำงานวิจัยและการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอขอบคุณ คุณกาญจนา จัยเอี่ยม คุณพนิดา ฐาตุจิรังค์กุล คุณณัฏฐา ศรีสวัสดิ์ คุณกมล สิริ เพชรบูรณ์ คุณอุไรวรรณ พงษ์พยัคเลิศ คุณรัตนดา ลาสุข คุณเกรียงไกร วงษ์ปาน คุณสุดาทิพย์ สุวรรณประเสริฐ คุณพรพนัช มีกุลและพี่ๆ น้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณ พ่อแม่ พี่น้อง และสมาชิกในครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน คอยช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจในการศึกษาตลอดมา

ท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบูรพาอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ต่างๆ ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันให้แก่ข้าพเจ้า

นริสา เจือจุน

มีนาคม 2556

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	13
อุปกรณ์	13
วิธีการ	15
ผลและวิจารณ์	21
ผล	21
วิจารณ์	39
สรุป	48
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	49
ภาคผนวก	57
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	88

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 คีเอ็นเอเครื่องหมาย และ เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของคีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP	18
2 รหัสจีโนไทป์สำหรับประชากรผสมข้าม ที่ใช้ในโปรแกรม JoinMap	19
3 การตรวจสอบความแตกต่างของคีเอ็นเอในแต่ละกลุ่มผสม	21
4 จำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์ที่พบในฐานข้อมูลอีเอสทีของกล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส	23
5 ผลการตรวจสอบความแตกต่างของคีเอ็นเอใน <i>Dendrobium</i> 'Caesar' และ (<i>Dendrobium</i> 'Sri-Racha' x <i>D.</i> 'Snowfire') x <i>D. bigibbum</i>	26
6 สรุปการทดสอบการกระจายตัวของคีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดต่างๆ ในประชากรลูกผสม	30
ตารางผนวกที่	
1 การกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลต์ชนิดต่างๆ ในอีเอสทีของ <i>Phalaenopsis</i>	58
2 คีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจของกล้วยไม้สกุลหวาย	59
3 ลำดับเบสของคีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการสร้างแผนที่โครโซม	64
4 คีเอ็นเอเครื่องหมายที่ออกแบบจากอีเอสทีและยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้อง	72
5 แสดงค่า similarity ของประชากรลูกผสม C2CP	73
6 ข้อมูลลักษณะทางฟีโนไทป์ในประชากรลูกผสม	78

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
1	ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์ ที่ให้ความแตกต่างของดีเอ็นเอในกล้วยไม้ทั้ง 5 สายพันธุ์	22
2	ชนิดของลำดับเบสซ้ำไมโครแซทเทลไลต์ที่กระจายอยู่ในจีโนมของฟาแลนอปซิส	24
3	แถบดีเอ็นเอที่สามารถอ่านผลได้ชัดเจนใน <i>Dendrobium</i> ‘Caesar’ (<i>Dendrobium</i> ‘Sri-Racha’ x <i>D.</i> ‘Snowfire’) x <i>D. bigibbum</i> และ <i>Phalaenopsis</i> sp.	27
4	ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบ co-dominant ที่แสดงการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:1:1:1	31
5	ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เป็น dominant มีการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:1	32
6	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ORCT58 ที่มีลักษณะเป็น null allele	33
7	ดีเอ็นเอเครื่องหมาย CB032073PI ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hinf</i> I ที่ให้คะแนนแถบดีเอ็นเอ C2 และ CP เป็น hk และ hk	34
8	ประชากรที่มีจำนวนของอัลลีลแตกต่างจากต้นอื่น ในดีเอ็นเอเครื่องหมาย ORCT33	35
9	แผนที่กลุ่มลิงค์ของกล้วยไม้ จากประชากรลูกผสม <i>Dendrobium</i> ‘Caesar’ กับ (<i>Dendrobium</i> ‘Sri-Racha’ x <i>D.</i> ‘Snowfire’) x <i>D. bigibbum</i>	37
ภาพผนวกที่		
1	ลักษณะดอกของ <i>Dendrobium</i> ‘Caesar’ (2N) หวายแกระ (<i>Dendrobium</i> ‘Sri-Racha’ x <i>D.</i> ‘Snowfire’) x <i>D. bigibbum</i> และประชากรกล้วยไม้ลูกผสมบางต้น	75
2	ลักษณะช่อดอกของ <i>Dendrobium</i> ‘Caesar’ (2N), (<i>Dendrobium</i> ‘Sri-Racha’ x <i>D.</i> ‘Snowfire’) x <i>D. bigibbum</i> และประชากรกล้วยไม้ลูกผสมบางต้น	76
3	ประวัติพันธุ์ <i>Dendrobium</i> ‘Sri-Racha’	77
4	ประวัติพันธุ์ <i>Dendrobium</i> ‘Snowfire’	77
5	ประวัติพันธุ์ <i>Dendrobium</i> ‘Caesar’	77

การสร้างแผนที่โครโมโซมในกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย
ชนิดไมโครแซทเทลไลต์และดีเอ็นเอเครื่องหมายจากลำดับเบสไอเอสที

The Genetic Linkage Map of *Dendrobium* Orchid Based on Microsatellite
and EST-derived Markers

คำนำ

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Class Monocots) อยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Family Orchidaceae) นับเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดของพืชมีดอก (Subdivision Angiospermata) ประกอบด้วยกล้วยไม้กว่า 25,000 ชนิด (species) มีถิ่นกำเนิดอยู่ทุกที่ทั่วโลก ยกเว้นทวีปแอนตาร์กติกา (กรรชิต, 2550)

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศผู้ส่งออกกล้วยไม้รายใหญ่ของโลก ในปี 2550 มีมูลค่าการส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกประมาณ 24,564 ตัน มูลค่ากว่า 2,544.84 ล้านบาท และปริมาณการส่งออกกล้วยไม้กระถาง 63,991 ตัน มูลค่า 766 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร) โดยมีประเทศคู่ค้าที่สำคัญได้แก่ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา อิตาลี สหราชอาณาจักร ฝรั่งเศส เนเธอร์แลนด์ และกำลังขยายตลาดไปในกลุ่มประเทศในตะวันออกกลาง และประเทศจีน ทำให้ตลาดการส่งออกกล้วยไม้มีแนวโน้มขยายตัวขึ้นทุกปี สร้างรายได้ให้แก่ผู้ปลูกเลี้ยงอย่างสูง

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ เพื่อสร้างพันธุ์ใหม่ที่มีความหลากหลาย ทั้งในด้านรูปร่าง สี สัน และความทนทานต่อสภาพแวดล้อม เพื่อสนองต่อความต้องการของตลาดที่มีความแตกต่างกันในแต่ละประเทศ จึงมีความสำคัญ ซึ่งการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เพื่อการค้าในยุคแรกนั้น เป็นการส่งต้นกล้วยไม้จากต่างประเทศมาปลูก และขยายพันธุ์โดยการแยกชำ ซึ่งกว่าจะสามารถตัดดอกเพื่อขายได้นั้นต้องใช้เวลานานตั้งแต่ 3 ปีขึ้นไป ต่อมาจึงมีการใช้ต้นพันธุ์ที่ส่งมาจากต่างประเทศเป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อสร้างลูกผสม ซึ่งอาจเกิดจากการผสมภายในชนิด (intraspecific) หรือข้ามชนิด (interspecific) จากนั้นจึงคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะที่ต้องการ มาทำการขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้การขยายพันธุ์กล้วยไม้เป็นไปอย่างรวดเร็วขึ้น (กรรชิต, 2550)

ในปัจจุบันเทคโนโลยีทางด้านชีวโมเลกุลได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการศึกษาวิจัย เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด ซึ่งแผนที่โครโมโซมระดับโมเลกุลจัดเป็นเครื่องมือในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์ที่สามารถประยุกต์ใช้ได้หลากหลายแนวทาง เช่น ใช้บอกระยะระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายบนแท่งโครโมโซม มีประโยชน์ในการหาตำแหน่งของยีนที่สนใจ ทั้งยีนที่ควบคุมลักษณะแบบยีนเดี่ยว (single gene) หรือยีนที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณ (quantitative trait loci) การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายในการช่วยคัดเลือกลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ (marker assisted selection) การศึกษาจีโนมเปรียบเทียบระหว่างพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน หรือวงศ์ใกล้เคียงกัน เพื่อศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ระหว่างพืชในกลุ่มการแยกสัณฐาน การโคลนยีนที่สนใจศึกษา (Kole, 2004)

ดีเอ็นเอเครื่องหมายเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการใช้สร้างแผนที่โครโมโซม เนื่องจากสิ่งแวดลอมไม่มีอิทธิพลต่อจีโนม ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการสร้างแผนที่โครโมโซมมีหลายชนิด เช่น ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด random amplification of polymorphic DNA (RAPD), restriction fragment length polymorphism (RFLP), amplified fragment length polymorphism (AFLP), sequence characterized amplified region (SCAR), cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS), single-strand conformational polymorphism (SSCP), simple sequence repeat (SSR), single nucleotide polymorphism (SNP) เป็นต้น โดยแต่ละเทคนิคมีข้อจำกัดที่แตกต่างกันออกไป ไม่ว่าจะเป็นค่าใช้จ่ายในการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมาย ความถูกต้องแม่นยำ ซึ่งเทคนิค SSR หรือ microsatellite เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดข่มร่วม (co-dominant marker) ที่ให้ความแตกต่างของดีเอ็นเอสูง การทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม (reproducibility) วิธีการตรวจสอบใช้ระยเวลาน้อย จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในการสร้างแผนที่โครโมโซม (Brondani *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 2005)

โดยในการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์นั้น มีค่าใช้จ่ายสูงและใช้เวลานาน ซึ่งในการสร้างแผนที่โครโมโซมจำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวนมาก ในปัจจุบันได้มีการเผยแพร่ลำดับเบสเอสทีในฐานข้อมูลสาธารณะทั่วไป ทำให้ลำดับเบสเอสทีกลายเป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาทางด้านจีโนมิกส์ รวมถึงใช้ข้อมูลเอสทีสร้างดีเอ็นเอเครื่องหมายเพื่อใช้ในการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจในพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งยังมีค่าใช้จ่ายที่น้อย ใช้ระยะเวลาไม่มากเมื่อเทียบกับการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์จากจีโนมดีเอ็นเอโดยทั่วไป (Eujayl *et al.*, 2004; Saha *et al.*, 2004)

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจในกล้วยไม้สกุลหวายเพื่อเป็นข้อมูลในงานวิจัยและปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลนี้ต่อไปในอนาคต โดยประชากรที่ใช้ในการสร้างแผนที่โครโมโซมครั้งนี้เป็นประชากรที่ได้จากการผสมระหว่างแม่พันธุ์ คือ *Dendrobium* 'Caesar' และพ่อพันธุ์คือ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* ซึ่งมีจำนวนชุดของโครโมโซมเป็น Diploid (2N) เท่ากับ 38 ซึ่งได้ทำการตรวจนับโครโมโซมของ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* โดย สิริพร (2546) ในส่วนของลักษณะการกระจายตัวของจีโนไทป์ในประชากรลูกผสมนี้พบว่าคล้ายกับในประชากร F_2 จึงมีความเหมาะสมสำหรับการสร้างแผนที่โครโมโซมระดับโมเลกุลในพืชที่ยังไม่มีข้อมูลการศึกษาทางด้านดีเอ็นเออยู่มากนัก

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายจากลำดับเบสดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย ฟาแลนด์-นอปซิส และออนซิเดียม
2. ศึกษาระดับความแตกต่างของดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย 5 สายพันธุ์ ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์
3. ศึกษาการกระจายตัวของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์และดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ออกแบบจากลำดับเบสดีเอ็นเอที่ในประชากรลูกผสมระหว่างกล้วยไม้พันธุ์ ชีซาร์ *Dendrobium* 'Caesar' (2N) กับหวายแกระ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum*
4. ศึกษาความสัมพันธ์ของกลุ่มลิงค์เกจ เพื่อสร้างแผนที่โครโมโซมของกล้วยไม้สกุลหวาย

การตรวจเอกสาร

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Class Monocots) อยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Family Orchidaceae) นับเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดของพืชมีดอก (Subdivision Angiospermata) ประกอบด้วยกล้วยไม้กว่า 25,000 ชนิด (species) มีการกระจายพันธุ์ซึ่งสัมพันธ์กับสภาพแวดล้อม สามารถเจริญเติบโตได้ในหลายพื้นที่ ทั้งในเขตอบอุ่น และเขตร้อน ยกเว้นทวีปแอนตาร์กติกา กล้วยไม้ที่มีถิ่นกำเนิดต่างกัน ก็จะมีลักษณะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันด้วย กล้วยไม้ที่พบมากในเขตอบอุ่นมักเป็นพวกกล้วยไม้ดิน (terrestrial orchid) ส่วนกล้วยไม้ในเขตร้อนมักเป็นกล้วยไม้อากาศ (epiphytic orchid) (ครรรชิต, 2550)

กล้วยไม้สกุลหวาย

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) เป็นหนึ่งในสกุลที่ใหญ่ที่สุดของพืชในวงศ์กล้วยไม้ มีจำนวนมากกว่า 1,000 ชนิด มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเทือกเขาหิมาลัยกระจายมาถึงอินเดีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ไต้หวัน ญี่ปุ่น ออสเตรเลีย และหมู่เกาะทางตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิก บางชนิดพบกระจายอยู่ทั่วไป บางชนิดพบในเฉพาะบางท้องถิ่น กล้วยไม้สกุลหวายถูกแบ่งเป็น 41 หมวด (section) ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยมีหมวดที่มีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ ได้แก่ *Phalaenanthe*, *Spatulata* (*Ceratobium*), *Eleutheroglossum* (*Spatulata*) และ *Latouria* (Kamemoto *et al.*, 1999)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลหวาย

คำว่า *dendrobium* มีที่มาจากภาษากรีก 2 คำ “*dendron*” มีความหมายว่า ต้นไม้ และ “*bios*” มีความหมายว่า อาศัย *dendrobium* จึงมีความหมายว่า อาศัยอยู่กับต้นไม้ เนื่องจากกล้วยไม้สกุลหวายส่วนใหญ่เป็นพืชอิงอาศัย (epiphyte) มีรากเกาะอยู่กับกิ่งหรือลำต้นของต้นไม้อื่นๆ กล้วยไม้สกุลหวายจัดอยู่ในกลุ่มที่มีการเจริญเติบโตแบบฐานร่วม (sympodial) คือมีลำต้นแตกหน่อไปในแนวนอน ราบไปกับพื้นวัสดุที่อาศัยหรืออาจพบฝังตัวอยู่ใต้ผิวดิน เรียกลำต้นลักษณะนี้ว่า เหง้า (rhizome) (ระพี, 2548) ลักษณะของราก ส่วนใหญ่มีรูปร่างเรียวยาว รากถูกห่อหุ้มด้วยโครงสร้างที่มีลักษณะนุ่ม เรียกว่า “*velamen*” ซึ่งทำให้เก็บความชุ่มชื้นได้ดีเป็นพิเศษ กล้วยไม้สกุลหวายจึงไม่ชอบสภาพอากาศแบบชื้นแฉะ นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณรากมีคลอโรฟิลล์ จึงทำให้สามารถสังเคราะห์แสงได้ ส่วนลำต้นของกล้วยไม้สกุลหวายมีรูปร่างหลากหลายมีลักษณะเป็นทรงกระบอก

ลำต้นโป่งพอง เรียกว่า ลำลูกกล้วย (pseudobulb) ทำหน้าที่เก็บสะสมอาหารและน้ำ ใบของกล้วยไม้ มีรูปร่างหลากหลาย การเรียงตัวของเส้นใบเป็นแบบขนาน ใบเรียงสลับกันตลอดทั้งต้น (alternate) และดอกกล้วยไม้ทุกชนิดเป็นดอกสมบูรณ์เพศ (hermaphroditic หรือ bisexual flower) คือ มีทั้ง เกสรเพศผู้และเพศเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ส่วนก้านเกสรตัวผู้ผู้นั้นอยู่รวมกับก้านของยอดเกสรตัวเมีย เรียกว่า เส้าเกสร (column) เชื่อมต่อไปถึงรังไข่ (ระพี, 2548; Schelpe and Stewart, 1990)

เซลล์วิทยาของกล้วยไม้

จากการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอในจีโนม (ค่า C) ด้วยเทคนิค Flow cytometry ของกล้วยไม้ สกุลหวายจำนวน 37 สกุล โดย Jones และคณะ (1998) พบว่าค่า C ในแต่ละสายพันธุ์ (Species) นั้น มีค่าแตกต่างกันออกไป โดยมีค่าตั้งแต่ $1C = 738$ ล้านเบส ในกล้วยไม้สายพันธุ์ *D. crumenatum* ไปจนถึง $1C = 2041$ ล้านเบส ในกล้วยไม้ *D. spectabile* ซึ่งค่า C นั้น จะมีความสัมพันธ์กับจำนวนชุดของโครโมโซม (Kamemoto, 1999) นอกจากได้มีการรวบรวมจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลหวายจำนวน 257 ชนิด โดย Kamemoto (1999) ซึ่งจำนวนชนิดที่รวบรวมนั้นคิดเป็น 1 ใน 4 ของจำนวนกล้วยไม้ในสกุลทั้งหมด พบว่ากล้วยไม้สกุลหวายส่วนใหญ่มีจำนวนชุดโครโมโซมอยู่ที่ $2N = 2x = 38$ แต่บางส่วนของกล้วยไม้ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็น $2N = 2x = 36, 40$ หรือ $2N = 4x = 76, 80$ และมีอยู่ 1 ชนิดคือ *D. kingianum* ที่แสดงจำนวนชุดของโครโมโซม เป็นโพลีพลอยด์ คือ $2N = 38, 58, 76$ และ 114 ซึ่งจำนวนชุดของโครโมโซมที่ต่างกันจะใช้ประโยชน์ในการช่วยจำแนกภายในสายพันธุ์ และศิริพร (2546) ได้ศึกษาทางไซโตเจเนติกโดยการนับจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลหวาย 14 สายพันธุ์ พบว่า (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* มีจำนวนโครโมโซม $2N = 38$

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างพันธุ์ให้มีลักษณะตรงกับความต้องการของผู้บริโภค เช่น มีความสวยงาม สีสดใสโต คงทน ปลุกเลี้ยงง่าย ให้ผลผลิตสูง ช่อดอกมีความยาวกลมกลืนกับดอก ง่ายต่อการบรรจุหีบห่อและการขนส่ง (ครรชิต, 2550) แต่เนื่องจากกล้วยไม้เป็นไม้ยืนต้น มีวงจรชีวิตตั้งแต่ 3 ปีขึ้นไป ทำให้เป็นอุปสรรคสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ซึ่งต้องใช้ระยะเวลานาน ต่อมาเมื่อเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามามีบทบาทในการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ ทำให้การขยายพันธุ์สามารถทำได้ครั้งละจำนวนมาก จึงทำให้การปรับปรุงพันธุ์เป็นไปอย่างรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

ในการศึกษาพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล ที่นำไปสู่วิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบใหม่ๆ เช่น การเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (chromosome doubling) เพื่อลดความเป็นหมันของลูกผสม ที่จะใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ และยังทำให้มีลักษณะบางประการดีขึ้น เช่น ความหนาของกลีบดอก หรือใบ การทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ทำให้สารพันธุกรรมผิดปกติ ส่งผลการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอก ซึ่งบางลักษณะมีความแปลกใหม่ตรงกับความต้องการ เช่น กล้วยไม้พันธุ์การคำแดงวาสนา ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของพันธุ์ บอม 17 หรือการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์กล้วยไม้ เพื่อสร้างพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัส (Kamemoto, 1999)

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์

ไมโครแซทเทลไลต์ เป็นบริเวณที่มีลำดับเบสสายสั้นๆ 1-6 เบส เรียงตัวต่อกัน โดยจำนวนเบสซ้ำที่พบในสิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ เป็นแบบ mononucleotide และ dinucleotide ไมโครแซทเทลไลต์สามารถแบ่งได้ 3 ประเภทตามลักษณะเบสสายสั้น 1. Perfect repeat คือ ลำดับเบสซ้ำๆ ต่อกันอย่างต่อเนื่อง เช่น $(AG)_n$ 2. Imperfect repeat คือในบริเวณที่ซ้ำกันถูกแทรกด้วยเบสมากกว่า 1 เบส เช่น $(TC)_nA(TC)_n$ 3. Compound repeat คือบริเวณที่ประกอบด้วยชุดของดีเอ็นเอหลายแบบ เช่น $(AT)_n(AG)_n$ และ 4. Compound imperfect repeat คือประกอบด้วยชุดของดีเอ็นเอหลายแบบและถูกแทรกด้วยลำดับเบสที่ไม่ซ้ำ เช่น $(AG)_nA(AT)_n$

ความแปรปรวนของจำนวนซ้ำบริเวณไมโครแซทเทลไลต์นั้น เกิดจากการกลายพันธุ์ หรือมีสาเหตุจากความผิดพลาดในระหว่างกระบวนการจำลองดีเอ็นเอ (DNA replication) มีรูปแบบการเกิด 2 แบบคือ แบบแรก เกิดจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอระหว่างโครโมโซมที่เป็นโฮโมโลกัส ซึ่งมีการจับกันอย่างไม่สมบูรณ์ ส่วนมากจะเกิดในบริเวณที่เป็น tandem repeat ทำให้เกิดการเพิ่ม (insertion) หรือการลด (deletion) ของชิ้นดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอ 2 สาย มีจำนวนซ้ำไม่เท่ากัน เรียกว่าการเกิด unequal crossing-over (UCO) แบบที่สอง เกิดจากการอ่านเบสเลื่อนไปของเอนไซม์ DNA polymerase ระหว่างกระบวนการจำลองตัว (DNA replication) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์ เรียกว่าการเกิด slip-strand mispairing (SSM) (Hancock, 1999)

ในระยะแรกของการศึกษาไมโครแซทเทลไลต์ จะสร้าง probe ที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ ร่วมกับเทคนิค RFLP เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอ แต่เมื่อมีการค้นพบเทคนิค PCR โดย K. Mullis ในปี ค.ศ.1985 ทำให้การตรวจสอบผลเป็นไปอย่างรวดเร็วขึ้น โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลางที่เป็นเจลอะกาโรสหรืออะครีลาไมด์

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์ (simple sequence repeat) เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพสูงในการแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอ และสามารถทำซ้ำได้ (high reproducibility) (Brondani *et al.*, 1998; Cai *et al.*, 2005) ทั้งยังใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นในปริมาณน้อย แต่มีข้อเสียคือ ต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายสูง (Scott *et al.*, 2000; Saha *et al.*, 2004) เนื่องจากต้องการขั้นตอน การโคลนนิ่ง การหาลำดับเบส การตรวจสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายให้มีความจำเพาะต่อไมโครแซทเทลไลต์

การใช้ประโยชน์จากดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์ในกล้วยไม้

Pellegrino *et al.* (2001) สร้างดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์จากจีโนมมิคโลบารี ของกล้วยไม้ *Serapias vomeracea* จำนวน 576 โคลน เป็นโคลนที่มีลำดับเบสซ้ำ 54 โคลน สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 18 คู่ และใช้ตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสกุล *Serapias* 4 species ได้ 6 คู่ โดยมีจำนวนอัลลีล 3-6 อัลลีลต่อตำแหน่ง ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลนี้ได้

ทิพวัลย์ และคณะ (2549) ได้พัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์ ใช้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้า 40 พันธุ์ ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย 40 ตำแหน่ง พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมาย 15 ตำแหน่งสามารถใช้บอกความแตกต่างได้ โดยใช้จัดกลุ่มและสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

Yue *et al.* (2006) พัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์จากจีโนมมิคโลบารี ของกล้วยไม้สกุลหวายในบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำเป็น CA/TG และ GA/CT นำมาออกแบบไพรเมอร์ได้ 15 คู่ สามารถให้ความแตกต่างทางดีเอ็นเอของกล้วยไม้ 42 สายพันธุ์ จำนวน 14 คู่ มีจำนวนอัลลีล 6-33 อัลลีลต่อตำแหน่ง ใช้สร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ 42 สายพันธุ์ โดยมีค่า genetic distance อยู่ที่ 0.18

Boonsrangsom *et al.* (2008) พัฒนาคีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์จากจีโนมิกไลบรารี ของกล้วยไม้สกุลหวาย ได้โคลนที่มีลำดับเบสซ้ำ 195 โคลน ออกแบบไพรเมอร์ได้ 73 คู่ เพื่อนำมาตรวจสอบความแตกต่างในกล้วยไม้สกุลหวาย 49 สายพันธุ์ พบว่ามี 8 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างได้ โดยมีจำนวนอัลลีล 4-7 อัลลีลต่อตำแหน่ง ใช้สร้างแผนภูมิต้นไม้ เพื่อแสดงความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ได้

คีเอ็นเอเครื่องหมายจากลำดับเบสอีเอสที

อีเอสที (ESTs: expressed sequence tags) คือ ลำดับเบสสายสั้นๆ ที่ได้จาก mRNA ของสิ่งมีชีวิต เป็นตัวแทนของยีนที่แสดงออกในช่วงเวลาที่ทำการศึกษาหรือทำการเก็บตัวอย่าง mRNA ของสิ่งมีชีวิตนั้น (Brown, 2006)

เนื่องจากอีเอสทีเป็นส่วนของคีเอ็นเอที่ถอดรหัสแล้ว และคาดว่าจะเป็นส่วนของยีน จึงน่าจะมีการอนุรักษ์ลำดับเบสและมีอัตราการถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกที่สูง (Saha *et al.*, 2004) การออกแบบคีเอ็นเอเครื่องหมายจากลำดับเบสอีเอสทีในพืชหนึ่งๆ จึงสามารถนำไปใช้ในพืชที่อยู่ในวงศ์ใกล้เคียงกันได้ (Cordeiro *et al.*, 2001; Rowland and Dhanaraj, 2003; Eujayl *et al.*, 2004; Saha *et al.*, 2004) ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการสร้างคีเอ็นเอเครื่องหมายของพืชที่มีการศึกษาทางด้านจีโนมิกส์อยู่น้อยได้ และในการสร้างแผนที่โครโมโซม ตำแหน่งของคีเอ็นเอเครื่องหมายอีเอสทีในแผนที่ อาจระบุถึงตำแหน่งของยีนได้ด้วย

คีเอ็นเอเครื่องหมายที่ขนาดบริเวณอินตรอน

อินตรอน (intron) เป็นคีเอ็นเอบริเวณที่ไม่ถูกถอดรหัสเป็นโปรตีน (non-coding region) จะถูกตัดออกในขั้นตอน post-transcription โดยกระบวนการ splicing ซึ่งอินตรอนเป็นบริเวณที่มีความแปรปรวนของลำดับเบสมากกว่า เอกซอน (exon) เนื่องจาก อินตรอนเกิดการกลายพันธุ์ในอัตราที่สูงกว่า เอกซอน จึงมีการใช้ประโยชน์จากความแปรปรวนของลำดับเบสบริเวณอินตรอนในการสร้างคีเอ็นเอเครื่องหมายที่ขนาดบริเวณอินตรอน เพื่อประโยชน์ในการสร้างแผนที่โครโมโซม การหาคีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพ หรือการศึกษาจีโนมเปรียบเทียบ

Wei *et al.* (2005) สร้างดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ขนานบริเวณอินทรอน (intron-flanking EST-PCR markers) ของ *Rhododendron* โดยใช้ข้อมูล ESTs (expressed sequence tags) ของ *Rhododendron* เปรียบเทียบกับ ลำดับเบสของ *Arabidopsis* พบดีเอ็นเอเครื่องหมาย 27 คู่ (61%) สามารถให้ความแตกต่างระหว่าง *Rhododendron* 6 สายพันธุ์ได้

Tamura *et al.* (2008) สร้างดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ขนานบริเวณอินทรอนของ *Lolium* และ *Festuca* โดยเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสจีโนมิกส์ของข้าว พบ PCR marker จำนวน 61 คู่ และ PCR-RFLP marker 134 คู่สามารถให้ความแตกต่างของดีเอ็นเอระหว่าง *Lolium* และ *Festuca* ได้

ประชากรที่ใช้สร้างแผนที่โครโมโซม

การสร้างแผนที่โครโมโซม จะคำนวณจากความถี่ในการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซม ระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายในประชากรรุ่นลูก การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์จึงจะคัดเลือกคู่ที่มีความแตกต่างของฟีโนไทป์และจีโนไทป์อย่างเห็นได้ชัด มักใช้คู่พ่อแม่ที่เป็นโฮโมไซโกต โดยประชากรที่ใช้ในการสร้างแผนที่มีหลายประเภทซึ่งแต่ละประเภทมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันออกไป (Paterson, 1996) ประชากรที่ใช้ในการสร้างแผนที่โครโมโซมได้แก่

ประชากรแบบผสมกลับ (backcross population) ที่เกิดจากการผสมระหว่าง ประชากร F_1 กับพ่อหรือแม่พันธุ์ มากกว่า 2 รุ่น โครโมโซมที่เป็นรีคอมบิแนนท์จะมีเพียง 1 แท่งของ โฮโมโลกัส โครโมโซม ข้อจำกัดในการใช้ประชากรนี้ คือจะให้ค่าความถี่ในการเกิดรีคอมบิแนนท์ที่ต่ำ โดยจะแสดงจีโนไทป์เพียง 2 จีโนไทป์ต่อตำแหน่งเท่านั้น

ประชากร F_2 ที่เกิดจากการผสมตัวเองของประชากร F_1 เป็นการรวมอัลลีลจากทั้งพ่อและแม่ไว้ด้วยกัน มีจำนวนจีโนไทป์มากกว่า 3 ตำแหน่ง เช่น AA, Aa, aa (Paterson, 1996) สามารถให้ข้อมูลในการเกิดรีคอมบิแนนท์มากกว่าประชากรผสมกลับ มีประโยชน์มากในการศึกษาปฏิริยาของยีน อย่างไรก็ตามทั้งประชากรแบบผสมกลับ และประชากร F_2 มักใช้ในการสร้างแผนที่โครโมโซมของพืชที่ยังมีข้อมูลการศึกษาด้านพันธุศาสตร์น้อยอยู่

ประชากรดับเบิลแฮพลอยด์ (double haploid: DH) สามารถใช้กับพืชบางชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยงอับละอองเรณูได้เท่านั้น โดยจะมีลักษณะพันธุกรรมที่เป็น homologous โดยแต่ละแท่งโครโมโซมจะมีรูปแบบจีโนไทป์ที่เป็นรีคอมบิแนนท์ที่เหมือนกัน

ประชากร recombinant inbred line (RIL) สร้างจากการผสมกลับของประชากร F_2 จำนวน 5-6 รุ่น ด้วยวิธี single-seed descent (SSD) ประชากรเกือบจะเป็นโฮโมไซกัส มีการกระจายตัวที่ต่ำ คล้ายกับ ประชากร DH เป็นประชากรที่มีประโยชน์มากเนื่องจากมีความคงตัวสามารถใช้เมล็ดพันธุ์ในการศึกษาต่อไปได้เลย หรือใช้หาตำแหน่งของกลุ่มของยีนที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณ แต่มีปัญหาคือเป็นประชากรที่สร้างยากต้องทำการผสมตัวเองมากกว่า 5-6 รุ่น

แต่พืชบางชนิดที่มีการผสมข้ามตามธรรมชาติ เช่น อ้อย มันฝรั่ง และกล้วยไม้ การสร้างประชากรในลักษณะที่ได้กล่าวมาแล้วทำได้ยาก เนื่องจากพืชมีความเป็นเฮเทอโรไซกัสสูง ประชากรที่ใช้ในการสร้างแผนที่ของพืชผสมข้ามเป็นประชากร F_1 ที่มีการกระจายตัวของจีโนไทป์แบบ F_2 ซึ่งมีวิธีการวิเคราะห์ข้อมูลจะแตกต่างกันแตกต่างจากพืชผสมตัวเอง ซึ่งในการเลือกใช้ประชากรลักษณะใดในการสร้างแผนที่นั้นขึ้นอยู่กับลักษณะการสืบพันธุ์ของพืชชนิดนั้นๆ ชนิดของดีเอ็นเอเครื่องหมายที่จะใช้ในการสร้างแผนที่ และความหนาแน่นของโครโมโซม (Kole *et al.*, 2007)

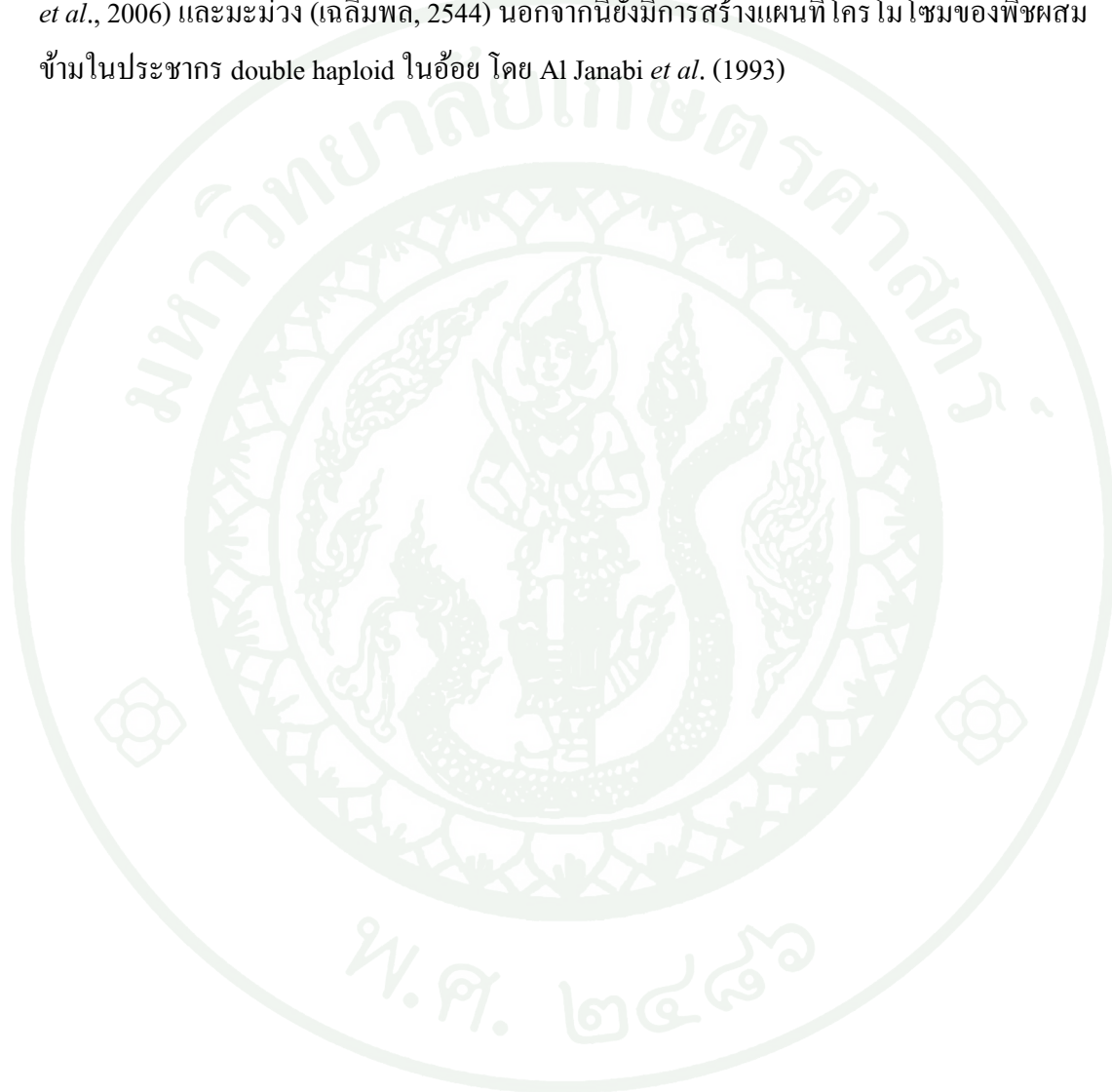
แผนที่โครโมโซมในพืช

การสร้างแผนที่โครโมโซมจะคำนวณจากความถี่ในการเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซมระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายในประชากรรุ่นลูก โดย 1 เปอร์เซ็นต์รีคอมบิแนนท์ จะมีระยะทางเป็น 1 เซนติมอร์แกน (centiMorgan: cM) บนแผนที่โครโมโซม ซึ่งความสมบูรณ์ของแผนที่โครโมโซมนั้น พิจารณาจากจำนวนกลุ่มลิงค์เกจ จะต้องมีความเท่ากันกับจำนวนโครโมโซมในเซลล์สืบพันธุ์ (n) และไม่มีดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ไม่อยู่ในกลุ่มลิงค์เกจ (Paterson, 1996)

ในการสร้างแผนที่โครโมโซมของพืชผสมตัวเอง (self pollination) ส่วนมากจะใช้ประชากรผสมกลับ หรือ ประชากร RIL (recombinant inbred line) แม้ว่าจะเป็นประชากรที่สร้างได้ยาก แต่ก็มีประโยชน์มากเนื่องจากประชากรมีลักษณะเป็นโฮโมไซกัส สามารถเก็บเมล็ดปลูกซ้ำได้ มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ต่ำ เช่น การสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจของถั่วเหลือง โดย พนิดาและคณะ (2549) โดยใช้ประชากร RIL ซึ่งมีลักษณะต้านทานต่อโรคราสนิม

สำหรับการสร้างแผนที่ของพืชที่มีการผสมข้าม (cross pollination) ซึ่งมีความเป็นเฮเทอโรไซกัสสูง นั้น มักพบว่ามีข้อจำกัดในการผสมตัวเอง การสร้างประชากรจากการผสมตัวเอง เช่น ประชากรผสมกลับ หรือ ประชากร RIL ทำได้ยาก จึงนิยมใช้ประชากร F_1 ทั้งที่ได้จากการผสมข้ามชนิด (interspecific cross) หรือภายในชนิด (intraspecific cross) ซึ่งมีการกระจายตัวของดีเอ็นเอใน

ประชากรสูง โดยในการสร้างกลุ่มลิงค์เกนนั้นจะ ใช้วิธีการ two-way pseudo testcross (Grattapaglia and Sederoff, 1994) ส่วนใหญ่จะสร้างกลุ่มลิงค์เกน 2 กลุ่มตามอัลลีลที่ปรากฏในพ่อหรือแม่พันธุ์ แล้วจึงนำข้อมูลของทั้ง 2 กลุ่มมาเชื่อมกัน สร้างกลุ่มลิงค์เกนที่สมบูรณ์ เช่นการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกนในแอปเปิ้ล (Hemmat *et al.*, 1994), ยูคาลิปตัส (Grattapaglia and Sederoff, 1994; Brondani *et al.*, 1998), มันสำปะหลัง (Fregene *et al.*, 1997), กิ่ว (Testolin *et al.*, 2001), อาร์ติโชค (Lanteri *et al.*, 2006) และมะม่วง (เฉลิมพล, 2544) นอกจากนี้ยังมีการสร้างแผนที่โครโมโซมของพืชผสมข้ามในประชากร double haploid ในอ้อย โดย Al Janabi *et al.* (1993)



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. กล้วยไม้

1.1 กล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์การค้าจำนวน 5 สายพันธุ์ซึ่งมีจำนวนชุดโครโมโซมเป็นดิพลอยด์(2N) ได้แก่

1.1.1 (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* (CP)

1.1.2 *Dendrobium* 'Caesar' (2N) (C2)

1.1.3 *Dendrobium* Sonia 'Bom No.17' (B17)

1.1.4 *Dendrobium* 'Dang Sa-Ard' (DS)

1.1.5 *Dendrobium* hybrid 'Sanan White' (SW)

1.2 กล้วยไม้สกุลฟาแลนนอปซิส *Phalaenopsis* sp.

1.3 กล้วยไม้สกุลออนซิเดียม *Oncidium* sp.

1.4 ประชากรลูกผสมที่ใช้ในการสร้างแผนที่โครโมโซมระดับโมเลกุลซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง *Dendrobium* 'Caesar' (2N) และ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* จำนวน 224 ต้น

2. ดีเอ็นเอเครื่องหมาย

2.1 ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์

ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์จำนวนทั้งหมด 295 คู่ ซึ่งได้จากการพัฒนาโดยทิพย์วัลย์และคณะ (2549) จำนวน 106 คู่ จาก Boonsrangsom *et al.* (2008) จำนวน 8 คู่ จาก Yue *et al.* (2006) จำนวน 14 คู่ และจาก จุลภาคและคณะ (ผลงานไม่ได้ตีพิมพ์) จำนวน 167 คู่

2.2 ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ออกแบบจากลำดับเบสอีเอสที

ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ออกแบบจากลำดับเบสอีเอสทีที่ได้จากการศึกษานี้ ทั้งหมด 301 คู่ โดยแบ่งเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ออกแบบคร่อมไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 195 คู่ และคร่อมบริเวณอินทรอน 106 คู่

วิธีการ

1. การสร้างดีเอ็นเอเครื่องหมายจากลำดับเบสอีเอสที

ค้นหาข้อมูลอีเอสทีของกล้วยไม้สกุล *Dendrobium Phalaenopsis* และ *Oncidium* จากฐานข้อมูล Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> วันที่ 30/11/2552) โดยให้ลำดับเบสอยู่ในรูปแบบ FASTA มีความยาวของลำดับเบสอีเอสทีมากกว่า 200 เบส คัดกรองอีเอสทีที่มีลำดับเบสเหมือนกันด้วยโปรแกรม Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit>)

1.1 ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ครอบคลุมไมโครแซทเทลไลต์

หาลำดับเบสที่มีไมโครแซทเทลไลต์แทรกอยู่ โดยใช้โปรแกรม WebSat (<http://wsmartins.net/websat>) โดยมีข้อกำหนดสำหรับไมโครแซทเทลไลต์ในลำดับเบสคือ เป็นเบสซ้ำตั้งแต่ 2 เบสถึง 4 เบส โดยมีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 5 ซ้ำขึ้นไป จากนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณไมโครแซทเทลไลต์ โดยใช้โปรแกรม Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3>) โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบ จะต้องมีความยาว 18-25 คู่เบส ปริมาณเบส G และ C ในไพรเมอร์อยู่ระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ annealing 50-55 องศาเซลเซียส และมีขนาด PCR product 150 ถึง 500 คู่เบส

1.2 ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ครอบคลุมบริเวณอินทรอน

นำลำดับเบสอีเอสทีที่อยู่ในรูปแบบ FASTA มาเปรียบเทียบกับ cDNA (complementary DNA) ของข้าวในฐานข้อมูล The Computation Biology and Functional Genomics (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi>) อีเอสทีของกล้วยไม้ที่เหมือนกับ cDNA ของข้าวจะนำไปเปรียบเทียบกับ จีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวจากฐานข้อมูล Genbank โดยใช้โปรแกรม BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) เพื่อระบุตำแหน่งที่ขึ้นเอกซอนต่อกัน จากนั้นจึงออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณที่มีความเหมือนกันของลำดับเบสระหว่างกล้วยไม้และข้าวให้ครอบคลุมบริเวณอินทรอนอย่างน้อย 1 อินทรอน ใช้โปรแกรม Primer3 มีข้อกำหนดในการออกแบบไพรเมอร์เหมือนกับการออกแบบไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์ นอกจากนี้ยังใช้โปรแกรม PIP marker (Yang *et al.*, 2007) (<http://ibi.zju.edu.cn/pgl/pip/design.html>) ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้ลำดับเบสอีเอสทีที่อยู่ในรูปแบบ FASTA โปรแกรมจะเปรียบเทียบกับ EST กับฐานข้อมูลจีโนมิกดี

เอ็นเอของข้าวซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเหมือนกับกล้วยไม้เพื่อทำนายตำแหน่งอินทรอน จากนั้นโปรแกรมจะออกแบบไพรเมอร์จากลำดับเบส EST ให้ครอบคลุมบริเวณอินทรอน

2. การสกัดดีเอ็นเอกล้วยไม้

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบของกล้วยไม้ดัดแปลงจากวิธีการของ Fulton *et al.* (1996) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ

2.1 นำใบของกล้วยไม้ประมาณ 3 กรัม มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ เติม Extraction buffer [0.35M Sucrose, 0.1M Tris base, 5mM EDTA (pH8.0), 1% Sodium metabisulfite, 1% PVP] 2.5 มิลลิลิตร แล้วบดในโกร่งให้ละเอียด กรองเอาเศษใบออก ด้วยผ้าขาวบาง นำสารละลายที่กรองได้ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรให้ได้ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร

2.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง เติม Extraction buffer 350 ไมโครลิตร ละลายตะกอนให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม Nuclei lysis buffer [0.2M Tris, 0.05M EDTA, 2M NaCl, 2% CTAB] 350 ไมโครลิตร และ 5% Sarkosyl 100 ไมโครลิตร พลิกหลอดเบาๆ จนสารละลายเข้ากันดี นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 30-60 นาที

2.3 เติม Chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 1 เท่าของสารละลายที่มีอยู่ พลิกหลอด 200 ครั้งให้สารละลายทำปฏิกิริยา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.4 ดูดส่วนใสด้านบนมา 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol 1 เท่า พลิกกลับหลอดเบาๆ จนสารเป็นเนื้อเดียวกัน หรือเห็นตะกอนดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทใสส่วนทิ้ง

2.5 ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และผึ่งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 5 นาที ละลายตะกอนด้วย 1X TE buffer {10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA (pH8.0)} ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 20 นาที

2.6 ตกตะกอนอีกครั้งโดยเติม 95% ethanol (-20 องศาเซลเซียส) 2 เท่า และ 3M sodium acetate 0.1 เท่า พลิกหลอดให้สารละลายเข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วเดิมอีก 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และ ผึ่งตะกอนให้แห้งที่ 65 องศาเซลเซียส 5 นาที

2.7 เติม 1X TE buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และเทคนิค PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

3.1 ปฏิกริยา PCR ประกอบด้วย ดีเอ็นเอปริมาณ 25 นาโนกรัม, 0.1 mM dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.25 μ M forward primer, 0.25 μ M reverse primer, 1X PCR buffer และ 0.05 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas) โดยมีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร

3.2 ทำปฏิกริยาในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ PTC-100 (MJ research) โดยในการทำปฏิกริยาของไพรเมอร์ชนิดไมโครแซทเทลไลท์ จะมีรอบการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที จากนั้นเริ่มปฏิกริยา PCR ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที (denaturation) 50-60 องศาเซลเซียส (annealing) ขึ้นกับไพรเมอร์แต่ละคู่ 30 วินาที และที่ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที (extension) จำนวนทั้งหมด 34 รอบ

ส่วนไพรเมอร์ที่ออกแบบจากอีเอสที จะทำปฏิกริยา touchdown PCR (Don *et al.*, 1991) เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการเข้าจับของไพรเมอร์ โดยมีรอบการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิดังนี้คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที ตามด้วยการทำ touchdown จำนวน 10 รอบที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 60 หรือ 65 องศาเซลเซียส ขึ้นกับไพรเมอร์ เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที โดยที่อุณหภูมิในการทำ annealing จะลดลงรอบละ 1 องศาเซลเซียส จากนั้นจะทำปฏิกริยาอีก 24 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 50 หรือ 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และที่ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที (extension)

3.3 นำผลผลิต DNA จากปฏิกริยา PCR มาตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ ดังที่แสดงในตารางที่ 1 โดยในปฏิกริยามีปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วยผลผลิตจากปฏิกริยา

PCR 5 μ l, 1X buffer, 1X BSA และ เอนไซม์ 2 ยูนิต แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 ดีเอ็นเอเครื่องหมาย และ เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

Marker	enzyme	Marker	enzyme	Marker	enzyme
AF038840-1DI	<i>Hinf</i> I	CB032210PI	<i>Hinf</i> I	CB033161-1PI	<i>Hae</i> III
U64031DI	<i>Hinf</i> I	CB032380PI	<i>Hinf</i> I	CB032617PS	<i>Alu</i> I
AY134752PI	<i>Taq</i> I	CB032425PI	<i>Hinf</i> I	ORCA214	<i>Taq</i> I
DQ198170PI	<i>Bst</i> NI	CB032610PI	<i>Hinf</i> I	ORCT1	<i>Taq</i> I
CB032073PI	<i>Hinf</i> I	CB032915PI	<i>Hinf</i> I	ORCT160	<i>Alu</i> I

4. การตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR มาเติม sequencing dye {98% Formamide, 0.025% bromophenol blue, 0.025% xylene cyanol, 10 mM EDTA} 2 เท่า แยกขนาดของดีเอ็นเอด้วย กระแสไฟฟ้า ในเจลอะคริลาไมด์ 4.5% {acrylamide:bis-acrylamide=24:1, 7.5M Urea, 1X TBE buffer [0.045 M Tris-Borate, 0.001M EDTA (pH 8.0)]} ผ่านสารละลายตัวกลาง 1X TBE ข้อมแถบ ดีเอ็นเอด้วยวิธีซิลเวอร์ไนเตรท (Benbouza *et al.*, 2006) โดยนำแผ่นเจลมาแช่และเขย่าเบาๆ ในน้ำยา fix/stop (10% absolute ethanol, 0.5% glacial acetic acid) ปริมาตร 1.5 ลิตรที่มีอุณหภูมิ 10-12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาข้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (0.15% silver nitrate, 37% formaldehyde) ปริมาตร 1.5 ลิตร เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 6-7 นาที จากนั้นล้างเจลด้วยน้ำสะอาด 1 ครั้ง นำไปแช่ในน้ำยา developer (0.15% sodium carbonate, 37% formaldehyde) เขย่าเบาๆ จนปรากฏ แถบดีเอ็นเอ จึงหยุดปฏิกิริยา โดยการแช่ในน้ำยา fix/stop 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด เขย่าเบาๆ 2 นาที ผึ่งให้เจลแห้ง จึงนำไปอ่านผล

5. การสร้างกลุ่มลิงค์เกอ

5.1 ทำการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอของดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความแตกต่างระหว่างพ่อแม่พันธุ์ และมีการกระจายตัวในประชากรลูกผสมตามแบบรหัสของประชากรผสมข้าม (CP) ที่

กำหนดไว้ในโปรแกรม JoinMap version 3.0 (Van Ooijen and Voorrips, 2001) จากนั้นนำข้อมูลการกระจายตัวของจีโนไทป์แต่ละแบบ มาทดสอบอัตราส่วนการกระจายตัว ด้วยค่าไคสแควร์ด้วยโปรแกรม JoinMap v.3.0 ในคำสั่ง Locus genotype frequency ในอัตราส่วนดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รหัสจีโนไทป์สำหรับประชากรผสมข้าม (cross pollination) ที่ใช้ในโปรแกรม JoinMap

Code	Segregation genotype	ratio	คำอธิบาย
abxcd	ac, ad, bc, bd, --	1:1:1:1	พ่อและแม่เป็นเฮเทอโรไซกัสที่มีทั้งหมด 4 อัลลีล
efxeg	ef, eg, ee, fg, --	1:1:1:1	พ่อและแม่เป็นเฮเทอโรไซกัสที่มีทั้งหมด 3 อัลลีล
hxxhk	hh, hk, kk, h-, k-, --	1:2:1	พ่อและแม่เป็นเฮเทอโรไซกัสที่มีทั้งหมด 2 อัลลีล
lxxll	lm, ll, --	1:1	แม่เป็นเฮเทอโรไซกัส
nnxnp	nn, np, --	1:1	พ่อเป็นเฮเทอโรไซกัส

5.2 ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอเครื่องหมายเพื่อสร้างกลุ่มลิงค์เกจ ใช้โปรแกรม JoinMap version 3.0 (Van Ooijen and Voorrips, 2001) ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ไม่มีข้อมูลของประชากรเกิน 22 ต้นจาก 224 ต้นและต้นที่ไม่มีข้อมูลดีเอ็นเอเครื่องหมายเกิน 10 เปอร์เซ็นของดีเอ็นเอเครื่องหมายทั้งหมดจะไม่นำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ และในการวิเคราะห์ ยอมรับค่า LOD ตั้งแต่ 3.0 กำหนดค่า $REC = 0.45$ ระยะระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายจะแปลงเป็น ระยะเซนติมอร์แกน โดยใช้ mapping function ของ Haldane (Haldane, 1919) ซึ่งจะไม่นำโอกาสในการเกิด crossover interference มาคำนวณ ระยะทางที่ได้นำมาวัดเป็นกลุ่มลิงค์เกจ โดยใช้โปรแกรม MapChart (Voorrips, 2002)

สถานที่

ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัด
นครปฐม

โรงเรียนเพาะชำกล้วยไม้ ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต
กำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาทำการวิจัย

มิถุนายน 2551-มีนาคม 2556

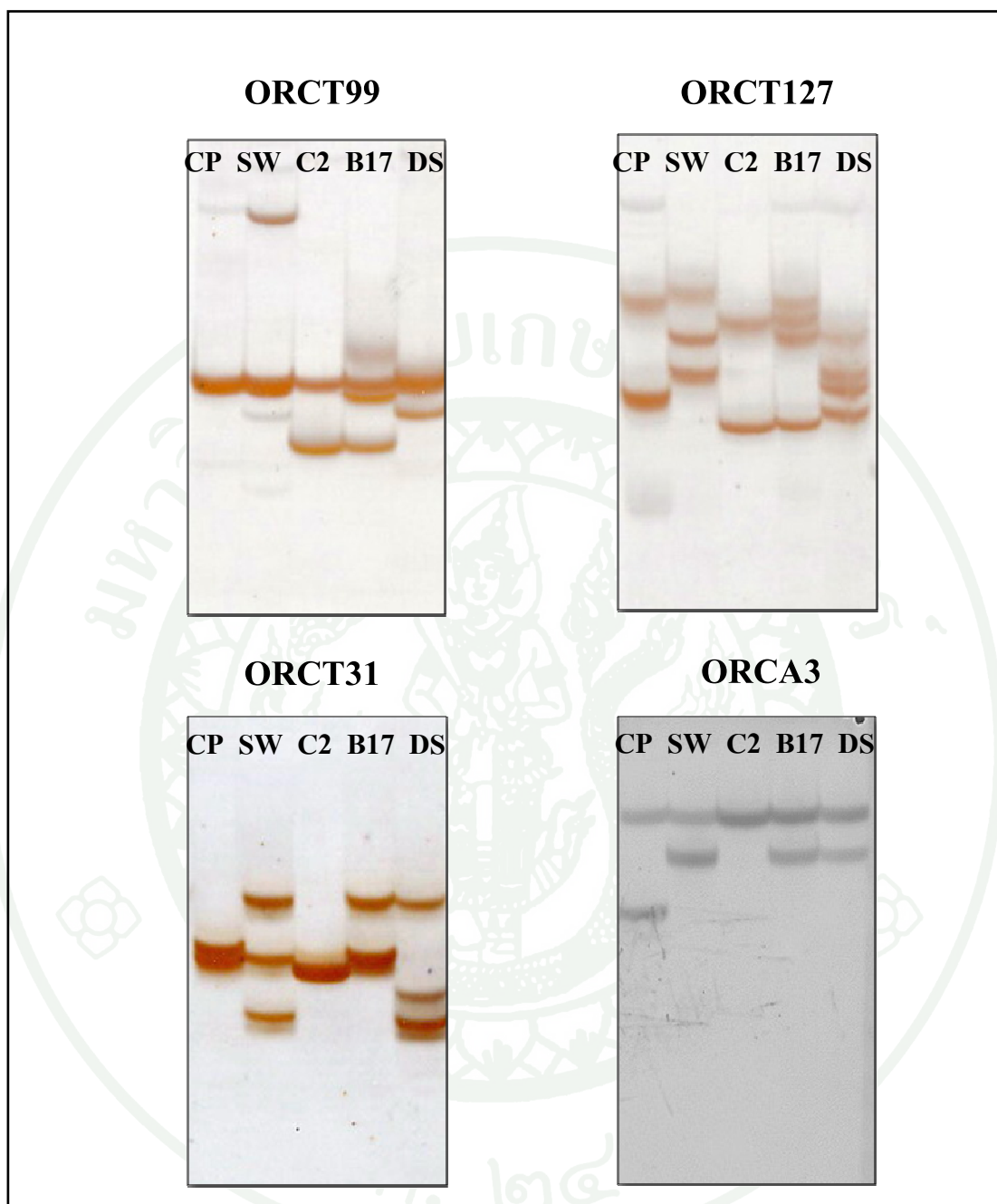
ผลการทดลอง

ระดับความแตกต่างของดีเอ็นเอระหว่างกล้วยไม้สกุลหวาย 4 กลุ่มด้วยเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์

ในการประเมินกลุ่มผสมเพื่อคัดเลือกระบชากรที่มีความแตกต่างของดีเอ็นเอระหว่างกล้วยไม้สกุลหวาย 4 กลุ่ม ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 128 ตำแหน่ง ให้ผลดังตารางที่ 3 โดยระหว่างกลุ่มผสม *Dendrobium* 'Caesar' (C2) กับ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* (CP) พบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่าง C2 และ CP จำนวน 61 ตำแหน่ง (100%) ระหว่างกลุ่มผสม *Dendrobium* Sonia 'Bom No.17' (B17) และ CP พบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่าง B17 และ CP จำนวน 57 ตำแหน่ง (100%) ระหว่างกลุ่มผสม *Dendrobium* 'Dang Sa-Ard' (DS) และ CP พบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่าง DS และ CP จำนวน 55 ตำแหน่ง (98%) และระหว่างกลุ่มผสม *Dendrobium* hybrid 'Sanan White' (SW) และ CP พบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างระหว่าง SW และ CP จำนวน 57 ตำแหน่ง (100%)

ตารางที่ 3 การตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอในแต่ละกลุ่มผสม โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 128 เครื่องหมาย

Parent	Non-specific loci	Specific loci	
		Polymorphic	Monomorphic
C2xCP	67	61	0
B17xCP	71	57	0
DSxCP	72	55	1
SWxCP	71	57	0



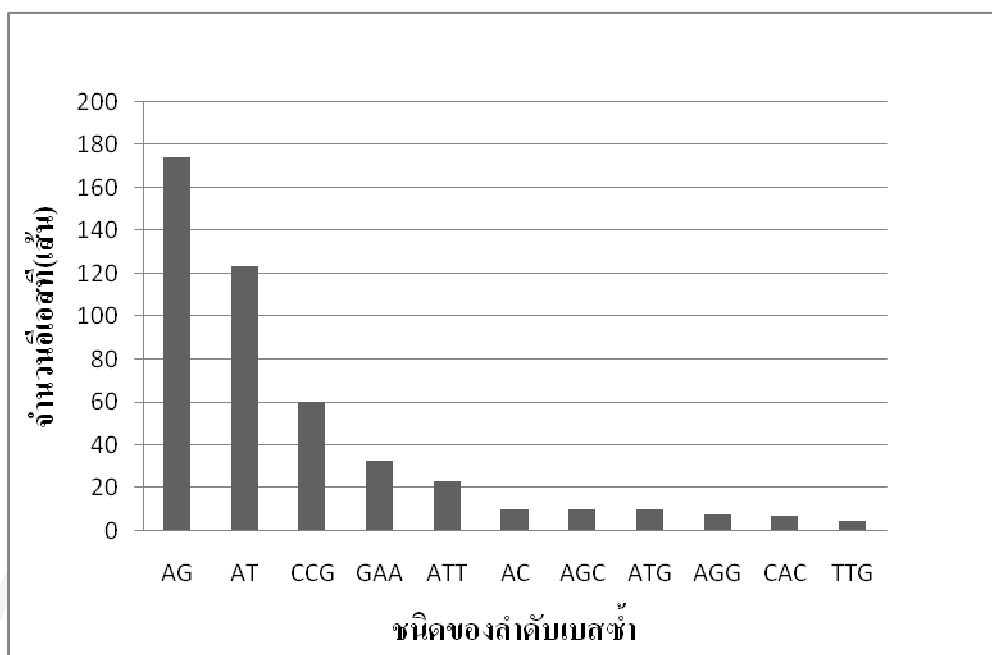
ภาพที่ 1 ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ ที่ให้ความแตกต่างของดีเอ็นเอในกล้วยไม้ทั้ง 5 สายพันธุ์

การตรวจสอบเบสซ้ำไมโครแซทเทลไลต์ในฐานข้อมูลอีเอสทีของกล้วยไม้ *Phalaenopsis*

จากข้อมูลลำดับเบสอีเอสทีของ *Phalaenopsis* ทั้งหมด 5,888 เส้น จาก *Phalaenopsis equestis* 3,549 เส้น และจาก *P. violaceae* 2,339 เส้น พบอีเอสทีที่มีไมโครแซทเทลไลต์อยู่ในลำดับเบส ทั้งหมด 466 เส้น (7.91%) โดยส่วนใหญ่เป็นลำดับเบสซ้ำแบบ dinucleotide ถึง 308 เส้น (66.1%) แบบ trinucleotide ทั้งหมด 155 เส้น (33.3%) และแบบ tetranucleotide เพียง 2 เส้น (0.43%) (ตารางที่ 4) ชนิดของลำดับเบส dinucleotide ที่พบในอีเอสทีสูงที่สุดคือแบบ (AG)_n จำนวน 174 เส้น (57%) รองลงมาคือ (AT)_n จำนวน 123 เส้น (40%) และ (AC)_n จำนวน 10 เส้น (3%) ลำดับเบส trinucleotide ที่พบมากที่สุดคือ (GGC)_n จำนวน 60 เส้น (38%) รองลงมาคือ (GAA)_n จำนวน 33 เส้น (21%) และ (ATT)_n จำนวน 23 เส้น (15%) (ตารางภาคผนวก 1)

ตารางที่ 4 จำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลต์ที่พบในฐานข้อมูลอีเอสทีของกล้วยไม้สกุล ฟาแลนอปซิส โดยจำนวนซ้ำที่พบมากที่สุดในอีเอสทีคือชนิดที่เป็น 2 เบสซ้ำ

ประเภทของจำนวนซ้ำ	จำนวนอีเอสที
Dinucleotide	308(66%)
Trinucleotide	156(33.5%)
Tetranucleotide	2(0.5%)
รวม	466



ภาพที่ 2 ชนิดของลำดับเบสที่ไม่โครโซมที่ไลต์ที่กระจายอยู่ในอีเอสทีของฟาเลนอปซิส

ความแตกต่างของดีเอ็นเอพ่อแม่พันธุ์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอจากลำดับเบสอีเอสที

จากลำดับเบสอีเอสทีของกล้วยไม้ 3 สกุลได้แก่ *Dendrobium Phalaenopsis* และ *Oncidium* สามารถออกแบบดีเอ็นเอเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากอีเอสทีของ *Phalaenopsis* ได้ทั้งหมด 177 คู่ จากอีเอสทีของ *Dendrobium* ได้ 5 คู่ และจากอีเอสทีของ *Oncidium* ได้ 13 คู่ และออกแบบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ครอบคลุมบริเวณอินทรอนจากอีเอสที *Dendrobium* ได้ทั้งหมด 14 คู่ และจากอีเอสทีของ *Phalaenopsis* ได้ 92 คู่

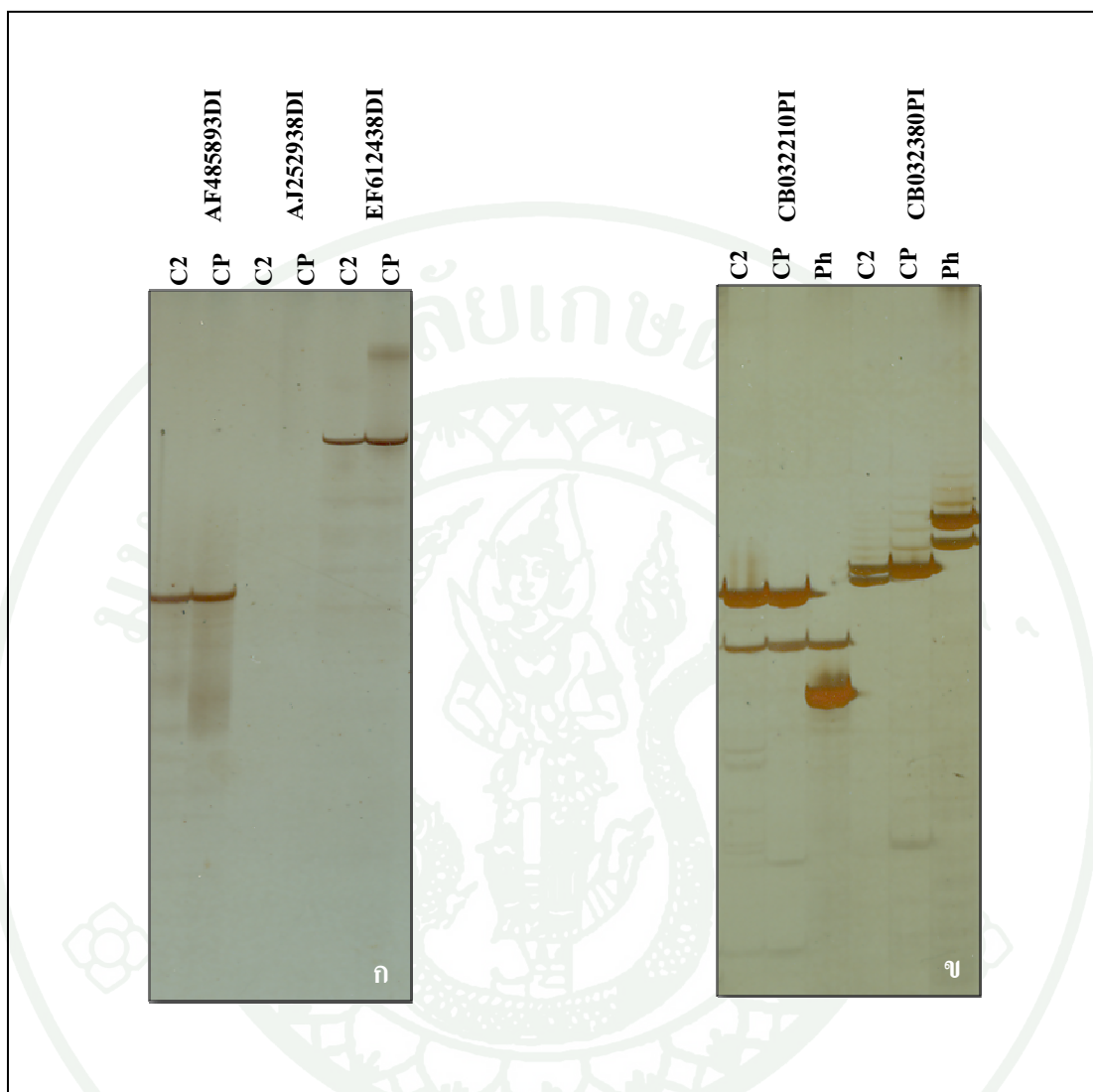
จากดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ออกแบบจากอีเอสทีทั้งหมด 301 ตำแหน่ง ทดสอบความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายใน *Dendrobium* 'Caesar' กับ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* ด้วยเทคนิค PCR พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ออกแบบจากลำดับเบสอีเอสทีของ *Dendrobium* ทั้งหมด 19 เครื่องหมาย สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนใน *Dendrobium* 'Caesar' และ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* 11 เครื่องหมาย (58%) และมี 7 เครื่องหมาย (37%) ที่สามารถให้ความแตกต่างของดีเอ็นเอระหว่าง *Dendrobium* 'Caesar' และ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* ได้ ซึ่งในจำนวนนี้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย 3 เครื่องหมาย ได้แก่ AF038840-1DI U64031DI และ AF485892DI ต้องใช้เทคนิค PCR-RFLP หรือ cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) ในการตรวจความแตกต่างดีเอ็นเอของพ่อแม่พันธุ์

ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ออกแบบจากลำดับเบสอีเอสทีของ *Phalaenopsis* ทั้งหมด 269 เครื่องหมาย สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนใน *Phalaenopsis* sp. ทั้งหมด 135 เครื่องหมาย (50%) และใน *Dendrobium* 'Caesar' และ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* 40 เครื่องหมาย (15%) โดยมีดีเอ็นเอเครื่องหมาย 13 เครื่องหมาย (5%) ที่ให้ความแตกต่างของดีเอ็นเอระหว่างกล้วยไม้สกุลหวาย 2 สายพันธุ์นี้ และมีดีเอ็นเอเครื่องหมาย 11 เครื่องหมาย ที่ต้องใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอเครื่องหมายจากลำดับเบสของอีเอสทีของ *Oncidium* ทั้งหมด 13 เครื่องหมาย สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอใน *Oncidium* sp. ได้ 6 ตำแหน่ง (52%) และไม่มีดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สามารถทำให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอใน *Dendrobium* 'Caesar' และ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum*

ตารางที่ 5 ผลการตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอใน *Dendrobium* ‘Caesar’ และ (*Dendrobium* ‘Sri-Racha’ x *D.* ‘Snowfire’) x *D. bigibbum* ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ออกแบบจาก ลำดับเบสอีเอสทีจำนวน 301 เครื่องหมาย

Organism	Type of marker	Number of markers	Amplified marker		Polymorphic marker
			<i>Phalaenopsis</i> <i>/Oncidium</i>	C2CP	
<i>Dendrobium</i>	EST-SSR	5	-	3	3
	Intron-flanking	14	-	8	4
	Total	19	-	11	7
<i>Phalaenopsis</i>	EST-SSR	117	76	34	10
	Intron-flanking	92	59	6	3
	Total	269	135	40	13
<i>Oncidium</i>	EST-SSR	13	8	-	-
Total		301		51	20



ภาพที่ 3 แถบดีเอ็นเอที่สามารถอ่านผลได้ชัดเจนใน *Dendrobium* 'Caesar' (C2) (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D. 'Snowfire'*) x *D. bigibbum* (CP) และ *Phalaenopsis* sp. (Ph)
 ก) ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ออกแบบจากลำดับเบสฮีสทีของ *Dendrobium*
 ข) ดีเอ็นเอ เครื่องหมายที่ออกแบบจากลำดับเบสฮีสทีของ *Phalaenopsis*

การกระจายตัวของดีเอ็นเอเครื่องหมายในประชากรลูกผสมระหว่าง *Dendrobium* ‘Caesar’ กับ (*Dendrobium* ‘Sri-Racha’ x *D.* ‘Snowfire’) x *D.* *bigibbum*

เมื่อนำดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ให้ความแตกต่างของดีเอ็นเอระหว่าง *Dendrobium* ‘Caesar’ และ (*Dendrobium* ‘Sri-Racha’ x *D.* ‘Snowfire’) x *D.* *bigibbum* จำนวน 107 เครื่องหมาย คิดเป็น 134 ตำแหน่ง เนื่องจากดีเอ็นเอเครื่องหมาย 19 เครื่องหมาย ที่แสดงแถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 ตำแหน่ง โดยจากดีเอ็นเอเครื่องหมายที่นำมาทดสอบจำนวน 107 เครื่องหมาย เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบ co-dominant จำนวน 81 เครื่องหมาย และแบบ dominant จำนวน 26 เครื่องหมาย เมื่อนำมาทดสอบการกระจายตัวในประชากรลูกผสม F_1 จำนวน 224 ต้น โดยที่ดีเอ็นเอเครื่องหมายจะมีอัตราส่วนจีโนไทป์ในประชากรตามที่ทำการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอที่กำหนดไว้ในโปรแกรม JoinMap พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายมีการอัตราส่วนการกระจายตัวของจีโนไทป์ในประชากร 3 แบบ คือ 1:1:1:1 ที่เป็นอัตราส่วนจีโนไทป์ในประชากร F_2 อัตราส่วน 3:1 และ 1:1 ที่เป็นอัตราส่วนของดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เป็น dominant

ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่กระจายตัวในอัตราส่วน 1:1:1:1 มีจำนวน 40 ตำแหน่ง (29.9%) ในจำนวนนี้มีดีเอ็นเอเครื่องหมาย 19 ตำแหน่ง (47.5%) ที่แสดงลักษณะอัลลีลที่เป็น null allele คือเป็นอัลลีลที่ไม่ปรากฏเนื่องจากไพรเมอร์ไม่สามารถ amplified ได้ โดย null allele นั้นพบที่เกิดในจีโนไทป์ของ C2 ทั้ง 19 ตำแหน่ง ซึ่งดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เป็น null allele สามารถสังเกตได้จากการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอที่ผิดปกติในประชากร เช่น ใน C2 แสดงแถบดีเอ็นเอเป็น A_1A_1 ส่วน CP แสดงแถบดีเอ็นเอเป็น A_2A_3 ดังนั้นในประชากรควรจะแสดงแถบดีเอ็นเอเป็น 2 แบบคือ A_1A_2 และ A_1A_3 และมีอัตราส่วนการกระจายตัวเป็น 1:1 แต่ในการทดลองพบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายบางตำแหน่งที่แสดงแถบดีเอ็นเอในประชากรเป็น 4 แบบ คือ A_1A_2 A_1A_3 A_2A_2 และ A_3A_3 ในอัตราส่วน 1:1:1:1 จึงคาดว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่งนี้น่าจะมีลักษณะของ null allele โดยที่แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเพียง 1 แถบ ใน C2 นั้น ประกอบด้วย 2 อัลลีล โดยที่อีกอัลลีลนั้นไม่ปรากฏให้เห็นแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 6) และในการให้คะแนนแถบดีเอ็นเอเพื่อวิเคราะห์โดยโปรแกรม JoinMap v.3 จะแทนแถบดีเอ็นเอใน C2 และ CP ด้วยสัญลักษณ์ ab และ cd โดยที่ b คือ null allele และเมื่อนำดีเอ็นเอเครื่องหมาย 40 ตำแหน่งทดสอบอัตราส่วนการกระจายตัวในประชากรด้วยค่าไคสแควร์ ด้วยโปรแกรม JoinMap คำสั่ง Locus genotype frequency ที่ $P < 0.05$ พบว่า มีดีเอ็นเอเครื่องหมาย 23 ตำแหน่ง มีการกระจายตัวไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 1:1:1:1

ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีการกระจายตัวในอัตราส่วน 3:1 มีทั้งหมด 11 ตำแหน่ง (8.2%) ในการทดลองดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีการกระจายตัวในอัตราส่วน 3:1 นี้ มีการปรากฏของ null allele ทั้งหมด โดยใน C2 และ CP นั้นแสดงแถบดีเอ็นเอ A_1A_1 เหมือนกัน คือมีลักษณะเป็น monomorphic แต่กลับพบว่าการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอในประชากรเป็นแบบ มีและไม่มีแถบดีเอ็นเอ จึงคาดว่า ทั้ง C2 และ CP น่าจะมี null allele และให้คะแนนแถบดีเอ็นเอของ C2 และ CP ด้วยสัญลักษณ์ hk และ hk ในประชากรที่มีแถบดีเอ็นเอจะแทนด้วยสัญลักษณ์ h- คือไม่สามารถแยกความแตกต่างของ homozygous ที่เป็น hh และ heterozygous ที่เป็น hk ซึ่ง k คือ null allele ได้ ส่วนประชากรที่ไม่มีแถบดีเอ็นเอจะแทนด้วยสัญลักษณ์ kk (ภาพที่ 7) เมื่อทดสอบด้วยค่าไคสแควร์ที่ $P < 0.05$ พบว่ามีดีเอ็นเอเครื่องหมาย 2 ตำแหน่งที่มีการกระจายตัวไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 3:1

ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีการกระจายตัวอัตราส่วน 1:1 มีจำนวน 83 ตำแหน่ง (61.9%) เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ให้คะแนนเฉพาะแถบดีเอ็นเอของ C2 จำนวน 60 ตำแหน่ง และให้คะแนนแถบดีเอ็นเอของ CP จำนวน 23 ตำแหน่ง เมื่อทดสอบด้วยค่าไคสแควร์พบว่ามีดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีการกระจายตัวไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 1:1 ($P < 0.05$) จำนวน 35 ตำแหน่ง ซึ่งจากดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ทดสอบทั้งหมด 134 ตำแหน่ง พบดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีการกระจายตัวไม่เป็นไปตามอัตราส่วนจำนวนทั้งหมด 60 ตำแหน่ง (44.8%) โดยแบ่งเป็น ที่ค่า $P < 0.05$ 13 ตำแหน่ง ที่ $0.005 < P < 0.01$ จำนวน 21 ตำแหน่ง และที่ $P < 0.005$ จำนวน 26 ตำแหน่ง

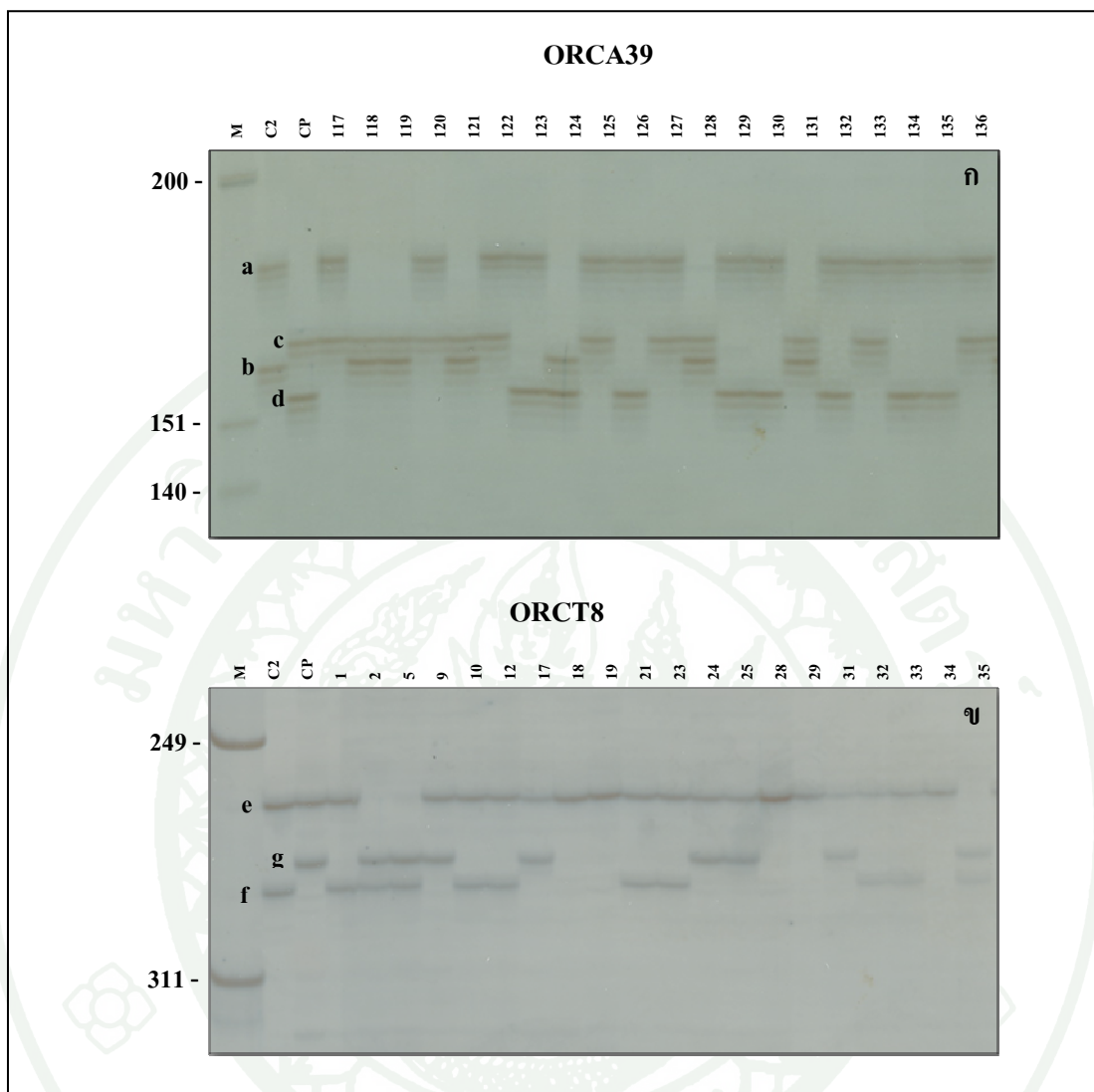
ในประชากรลูกผสมปรากฏต้นที่มีการกระจายตัวของดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เป็น co-dominant ในบางตำแหน่งแตกต่างจากต้นอื่น เช่นในกรณีที่ประชากรส่วนใหญ่จะมีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ แต่มีบางต้นที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ หรือบางต้นมีแถบดีเอ็นเอถึง 3 แถบ ได้แก่ ต้นที่ 1 มีดีเอ็นเอเครื่องหมาย 6 ตำแหน่งที่มีการกระจายตัวที่ผิดปกติ ต้นที่ 33 มี 25 ตำแหน่ง ต้นที่ 38 มี 21 ตำแหน่ง ต้นที่ 107 และ 197 มี 4 ตำแหน่ง ต้นที่ 104, 140 และ 185 มี 3 ตำแหน่ง ต้นที่ 40, 81, 162, 166, 168, และ 202 มี 2 ตำแหน่ง และ ต้นที่ 15, 22, 57, 65, 71, 88, 139, 154, 175 และ 218 มี 1 ตำแหน่ง ซึ่งในต้นที่พบว่ามีจำนวนอัลลีลที่ผิดปกตินี้ จะไม่นำจีโนไทป์ในดีเอ็นเอเครื่องหมายตำแหน่งนั้นมาคำนวณถึงค้เกจ

สำหรับข้อมูลเบื้องต้นจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม JoinMap ในคำสั่ง Similarity of individual พบว่ามีประชากรที่ทำการทดสอบ 18 กลุ่ม ที่มีค่าความเหมือนกันของจีโนไทป์ (similarity) สูงว่า 0.95 คือ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ต้นที่ 14, 118, 137, 195, 196 และ 200 กลุ่มที่ 2 ต้นที่ 29, 36, 42 และ 44 กลุ่มที่ 3 ต้นที่ 61, 79 และ 210 ที่เหลือเป็นคู่ที่มีความเหมือนกัน ได้แก่ ต้นเบอร์ 10

กับ 54 ต้น 30 กับ 39 ต้น 31 กับ 106 ต้น 43 กับ 50 ต้น 55 กับ 114 ต้น 60 กับ 86 ต้น 73 กับ 108 ต้น 87 กับ 192 และต้น 93 กับ 94 ต้น 103 กับ 147 ต้น 134 กับ 135 ต้น 140 กับ 185 ต้น 170 กับ 189 ต้น 203 กับ 219 และต้น 206 กับ 222 โดยต้นที่ 36 กับต้นที่ 42 และต้นที่ 195 และ 196 มีจีโนมที่เหมือนกันในทุกๆดีเอ็นเอเครื่องหมาย (ตารางภาคผนวกที่ 5)

ตารางที่ 6 สรุปการทดสอบการกระจายตัวของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดต่างๆ ในประชากร
ลูกผสมระหว่าง *Dendrobium* ‘Caesar’ และ (*Dendrobium* ‘Sri-Racha’ x *D.* ‘Snowfire’)
x *D. bigibbum*

	Total	Type of marker	
		SSR	EST
Number of marker screened in parent	596	295	301
Number of amplified marker	166	115	51
Number of polymorphic marker	120	100	20
Number of suitable marker for mapping	107	90	17
Number of suitable loci for mapping	134	109	25
Segregation 1:1	83	61	22
Segregation 1:1:1:1	40	39	1
Segregation 3:1	11	9	2
Distorted loci χ^2 (P<0.05)	60	48	12

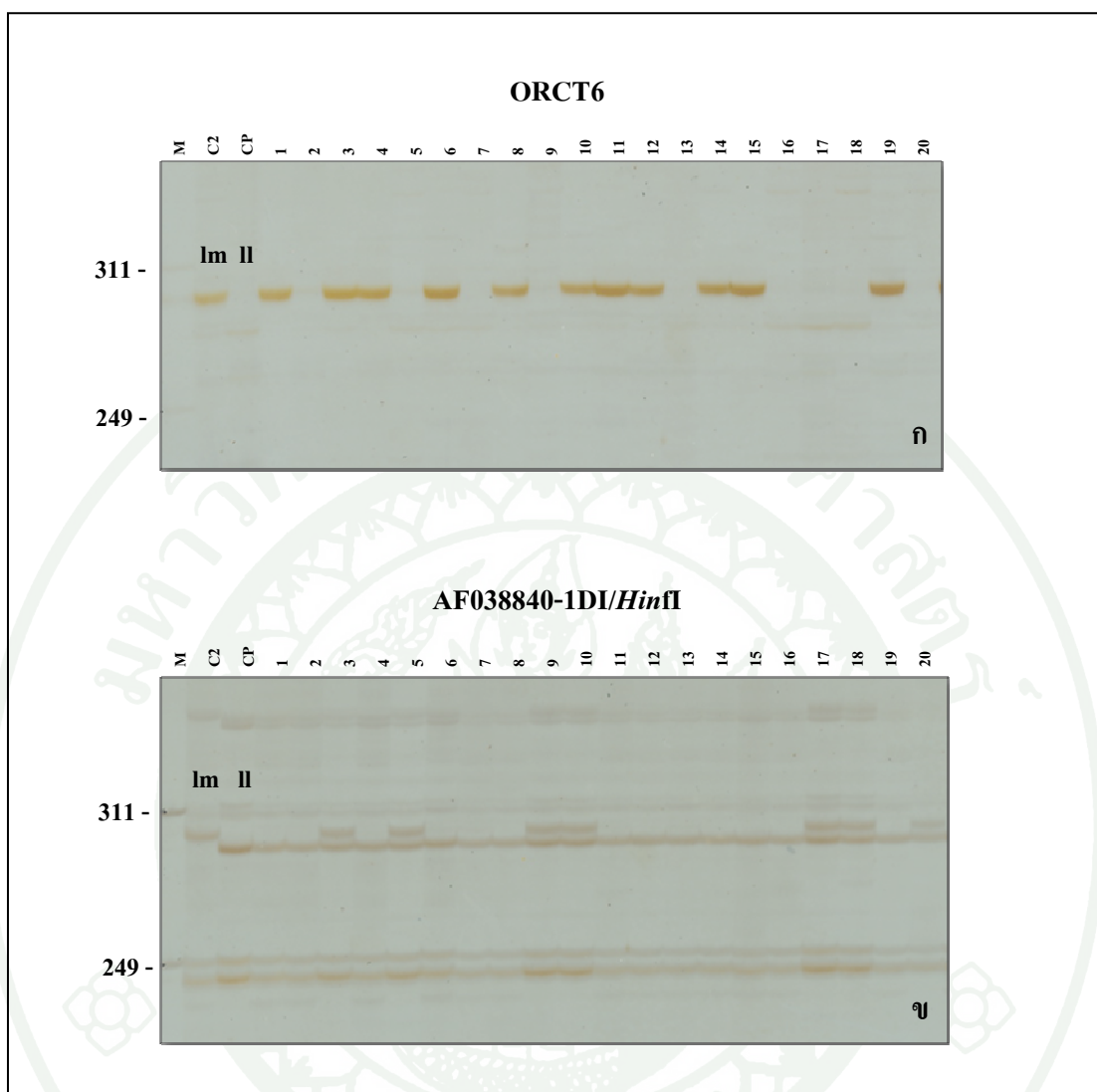


ภาพที่ 4 ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่แสดงแถบดีเอ็นเอแบบ co-dominant ที่แสดงการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:1:1:1

ก) ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ORCA39 สัญลักษณ์ในการให้คะแนนเป็น ab และ cd

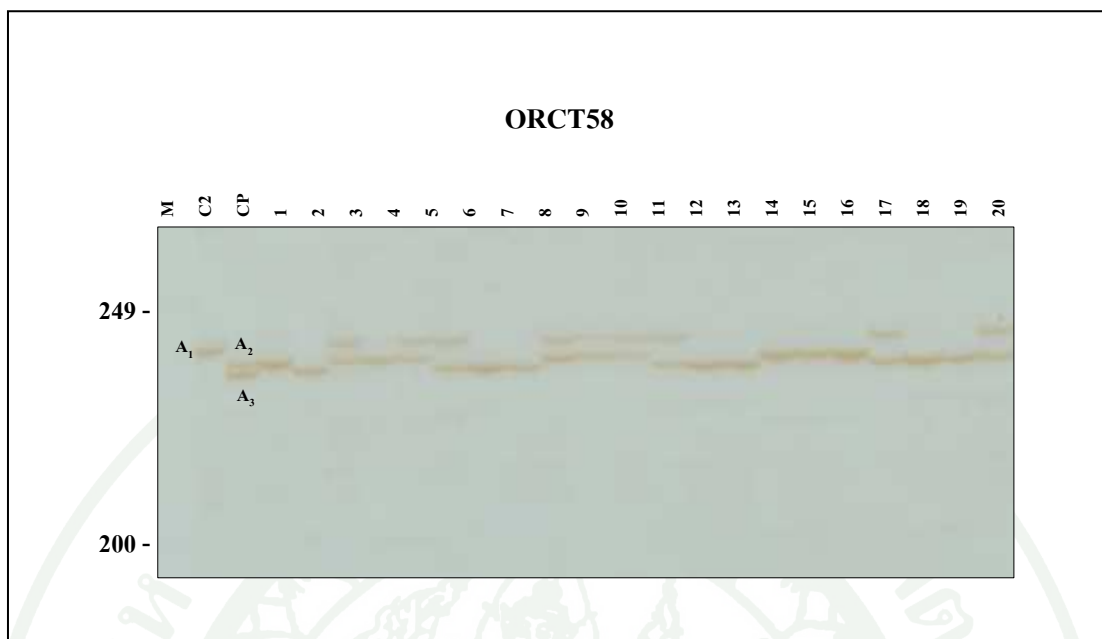
ข) ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ORCT8 สัญลักษณ์ในการให้คะแนนเป็น ef และ eg

M = ดีเอ็นเอเครื่องหมายมาตรฐาน ϕ x174 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HinfI* ซึ่งทราบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ มีหน่วยเป็นคู่เบส

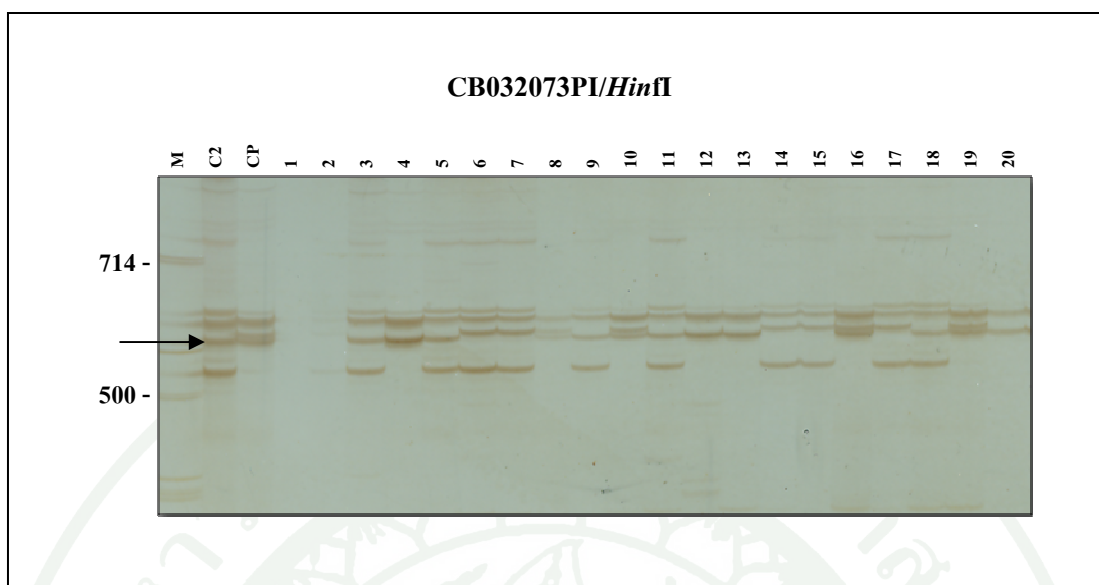


ภาพที่ 5 ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เป็น dominant มีการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:1

- ก) ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ORCT6 สัญลักษณะในการให้คะแนนคือ Im และ II
- ข) ดีเอ็นเอเครื่องหมาย AF038840-1DI ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*II สัญลักษณะในการให้คะแนนคือ Im และ II

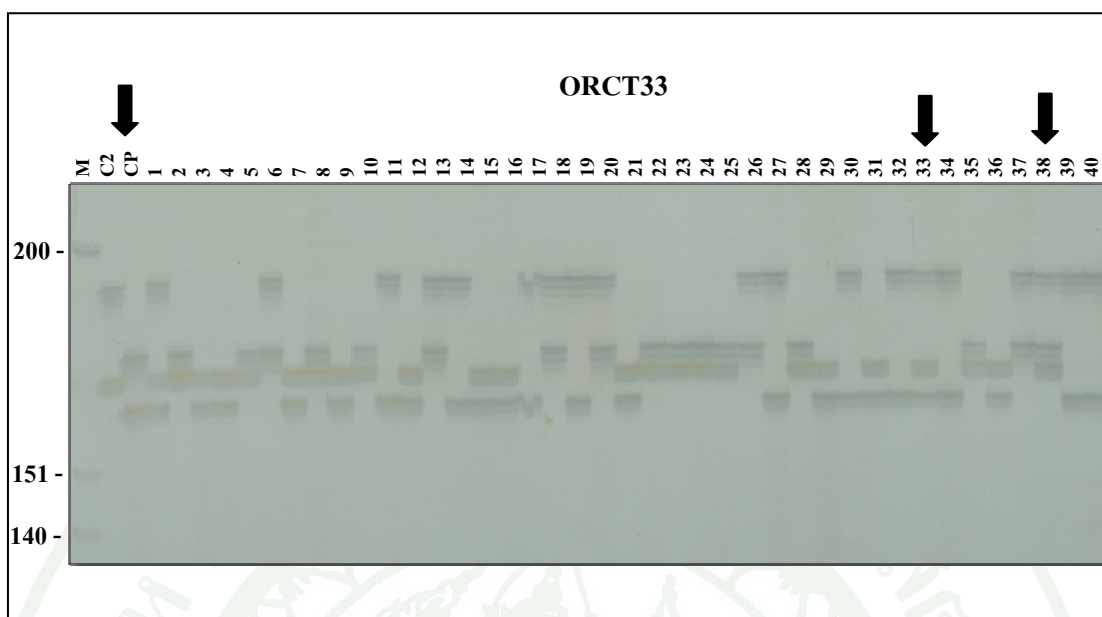


ภาพที่ 6 ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ORCT58 ที่มีลักษณะเป็น null allele โดยที่ใน C2 แสดงแถบดีเอ็นเอ A_1A_1 และใน CP แสดงแถบดีเอ็นเอ A_2A_3 และในประชากรแสดงจีโนไทป์ A_2A_2 , A_3A_3 , A_1A_3 และ A_1A_2 ซึ่งเป็นจีโนไทป์ที่คัดปดจากที่ในประชากรควรจะมิจีโนไทป์ A_1A_2 และ A_1A_3



ภาพที่ 7 ดีเอ็นเอเครื่องหมาย CB032073PI ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinf*I ที่ให้คะแนนแถบ ดีเอ็นเอ C2 และ CP เป็น hk และ hk โดยในประชากรที่มีแถบดีเอ็นเอเหมือน C2 และ CP ให้คะแนนด้วยสัญลักษณ์ h- ที่ไม่มีแถบดีเอ็นเอให้คะแนน kk โดยมีอัตราส่วนการกระจายตัว h:kk เป็น 3:1

→ แถบดีเอ็นเอที่ให้คะแนนแบบ hkhk



ภาพที่ 8 ประชากรที่มีจำนวนของอัลลีลแตกต่างจากต้นอื่น ในดีเอ็นเอเครื่องหมาย ORCT33

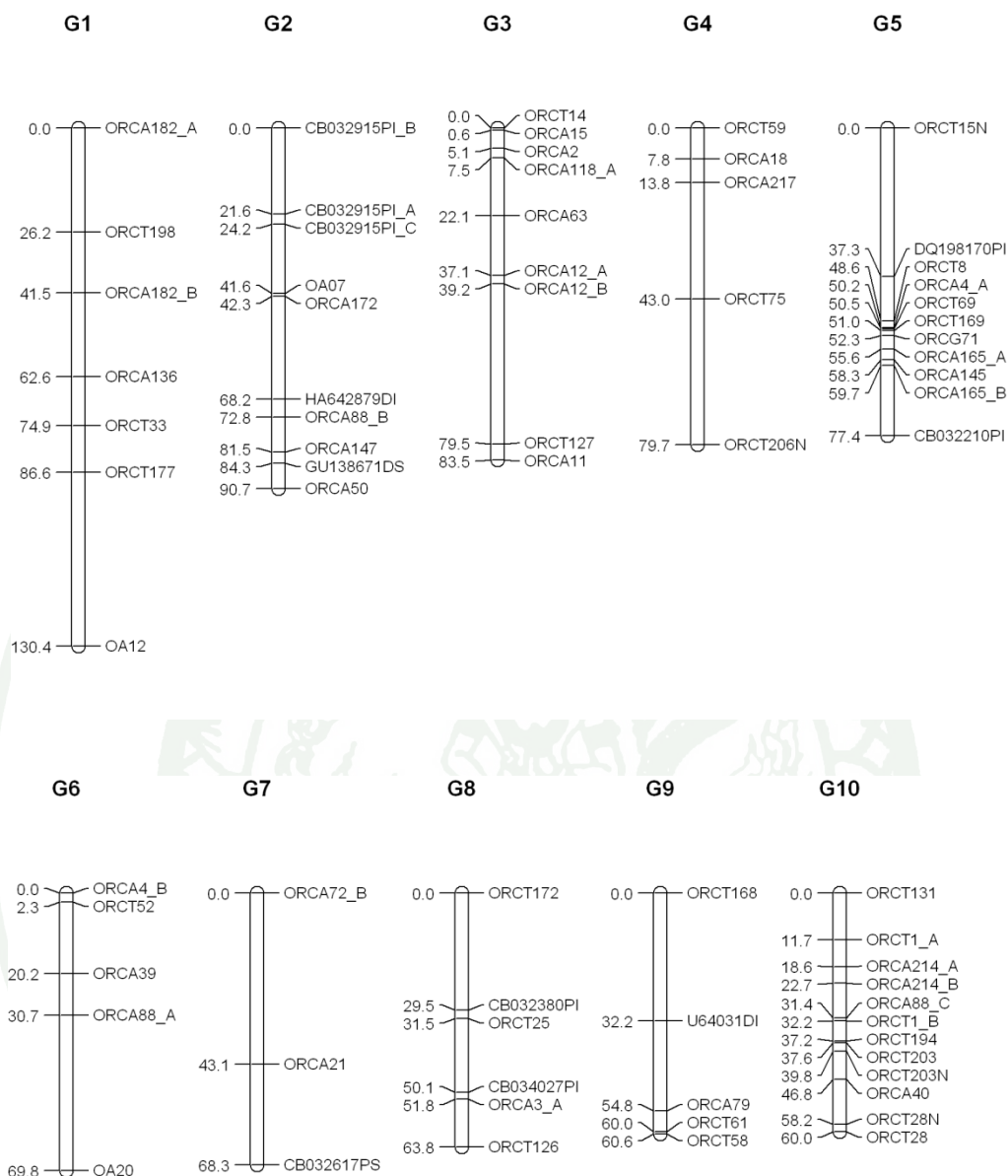


= ต้นที่มีจำนวนของอัลลีลแตกต่างจากต้นอื่นในประชากร

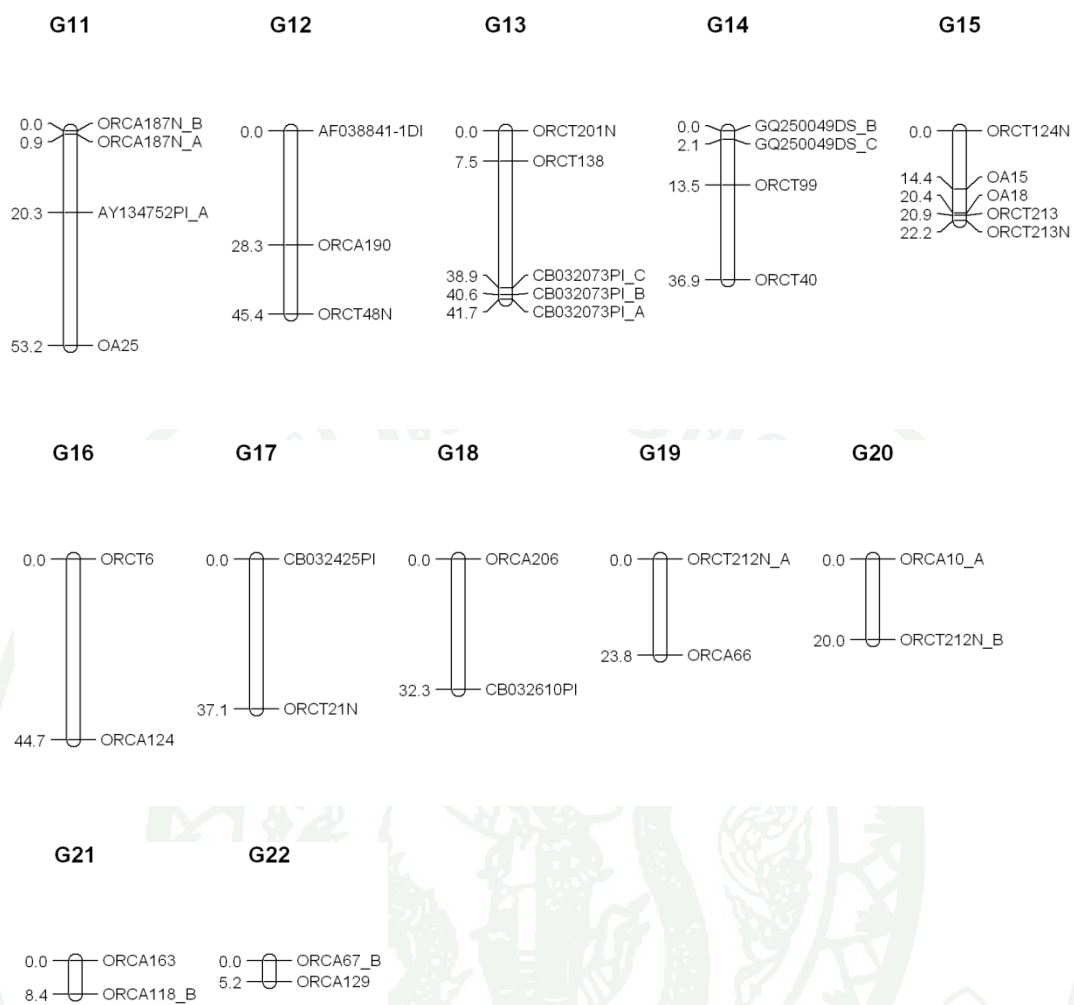
โดยต้นที่ 1, 33 และ 38 มีอัลลีลที่เหมือนกับพ่อแม่จำนวน 3 อัลลีล ในขณะที่ต้นอื่นมีเพียง 2 อัลลีล

**ความสัมพันธ์ของกลุ่มลิงค์เกจของประชากรลูกผสมระหว่าง *Dendrobium* ‘Caesar’ กับ
(*Dendrobium* ‘Sri-Racha’ x *D.* ‘Snowfire’) x *D.* *bigibbum***

หลังจากที่ตัดประชากรต้นที่ขาดข้อมูลดีเอ็นเอเครื่องหมายมากกว่า 14 ตำแหน่ง (10%) จำนวน 18 ต้นออก แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม JoinMap version 3.0 โดยใช้ mapping function ของ Haldane ชนิดของประชากรเป็นแบบผสมข้าม (cross pollinate: CP) ค่า $LOD \geq 3$ สร้างเป็นกลุ่มลิงค์เกจได้ทั้งหมด 22 กลุ่ม (ภาพที่ 7) ประกอบด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายทั้งหมด 110 ตำแหน่ง ในแต่ละลิงค์เกจมีดีเอ็นเอเครื่องหมายตั้งแต่ 2-12 ตำแหน่ง กลุ่มที่มีดีเอ็นเอเครื่องหมายมากที่สุด 12 ตำแหน่งคือกลุ่มที่ 10 และกลุ่มที่มีดีเอ็นเอเครื่องหมายน้อยที่สุด 2 ตำแหน่งมี 7 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มที่ 16 ถึง 22 โดยคิดเป็นระยะทางรวม 1,024.7 เซนติเมอร์แกน ระยะทางเฉลี่ยระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายเท่ากับ 9.32 เซนติเมอร์แกน มีดีเอ็นเอเครื่องหมาย 24 ตำแหน่ง (17.9%) ที่ไม่อยู่ในกลุ่มลิงค์เกจใดๆ



ภาพที่ 9 แผนที่กลุ่มลิงค์เกจของกล้วยไม้ จากประชากรลูกผสม *Dendrobium* 'Caesar' กับ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D.* *bigibbum* โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ชนิดไมโครแซทเทลไลต์และอีเอสที ใช้ Haldane mapping function ยอมรับ LOD ≥ 3 ตัวเลขด้านบนแสดงลำดับกลุ่มลิงค์เกจ ตัวเลขทางซ้ายมือแสดงเป็นระยะทางในหน่วย เซนติมอร์แกน และทางขวามือคือชื่อดีเอ็นเอเครื่องหมาย



ภาพที่ 9 (ต่อ)

วิจารณ์

การตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอระหว่างพ่อแม่พันธุ์ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

การทดสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 128 ตำแหน่ง ระหว่างกล้วยไม้สกุลหวาย 4 คู่ผสม ให้ค่าความแตกต่างของดีเอ็นเอในคู่ที่เป็นพ่อแม่พันธุ์ของประชากรที่ใช้สร้างแผนที่โครโมโซมสูงถึง 100% คือในทุกคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพ่อแม่พันธุ์ได้นั้น จะมีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ ค่า polymorphism ของแต่ละคู่ผสมที่สูงมาก ก็เนื่องมาจากกล้วยไม้เป็นพืชผสมข้าม ทำให้มีระดับ heterozygosity ที่สูง ดังเช่นการศึกษาในพืชผสมข้ามอื่นๆ เช่น หญ้าชอยเซีย (*zoyzia grass*) (Cai *et al.*, 2005) พืช (Sosinski *et al.*, 2000) นอกจากนี้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เป็น co-dominant สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นที่เป็น heterozygous และต้นที่เป็น homozygous ได้ ให้ค่าความแตกต่างของดีเอ็นเอในระดับที่สูง และยังสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ ทิพวัลย์ และคณะ (2549) ที่พัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์ ORCA และ ORCT พบว่า ดีเอ็นเอเครื่องหมายเหล่านี้ให้ค่า polymorphism information content (PIC) ที่ค่อนข้างสูง เฉลี่ยประมาณ 0.71 แสดงว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายเหล่านี้ใช้แยกความแตกต่างของดีเอ็นเอในกล้วยไม้ได้ดี และในการเปรียบเทียบความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้ค่า similarity index (SI) ของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 5 สายพันธุ์ยังพบว่า (*Dendrobium* ‘Sri-Racha’ x *D.* ‘Snowfire’) x *D. bigibbum* มีค่า SI เท่ากับ 0.16 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าพันธุ์อื่นที่จะมีค่าอยู่ระหว่าง 0.6-1.0 แสดงว่า (*Dendrobium* ‘Sri-Racha’ x *D.* ‘Snowfire’) x *D. bigibbum* มีลักษณะทางพันธุกรรมต่างจากพันธุ์อื่นๆ มากที่สุด

ประชากรที่ใช้ในการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจ

พ่อแม่พันธุ์ของประชากรที่ใช้สร้างแผนที่โครโมโซม ควรเป็นพ่อแม่พันธุ์ที่มีความแตกต่างของจีโนไทป์และฟีโนไทป์ที่สูง (Paterson, 1996) จากการทดสอบความแตกต่างดีเอ็นเอของทั้ง 4 คู่ผสม พบว่าอยู่ในระดับที่สูงทุกคู่ผสม มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ แต่เมื่อพิจารณาลักษณะฟีโนไทป์แล้วพบว่าคู่ผสมระหว่าง *Dendrobium* ‘Caesar’ (2N) และ (*Dendrobium* ‘Sri-Racha’ x *D.* ‘Snowfire’) x *D. bigibbum* มีความแตกต่างของลักษณะที่น่าสนใจหลายลักษณะ โดย *Dendrobium* ‘Caesar’ (2N) เป็นกล้วยไม้กลีบแคบ กลีบดอกเป็นสีชมพู มีลายริ้ว ดอกมีขนาด

ใหญ่ ช่อดอกยาว จำนวนดอกมาก ลำลูกกล้วยยาวและมีสีเขียว ในขณะที่ (*Dendrobium* ‘Sri-Racha’ x *D.* ‘Snowfire’) x *D. bigibbum* มีดอกทรงกลม กลีบสีขาว มีจำนวนดอกน้อย ดอกเล็ก ลำลูกกล้วยสั้นจนได้ชื่อว่า หวายแกระ และมีสีม่วง ดังนั้นในการสร้างแผนที่โครโมโซมของกล้วยไม้สกุลหวายนี้ จึงใช้ประชากรที่ได้จากคู่ผสม *Dendrobium* ‘Caesar’ (2N) และ (*Dendrobium* ‘Sri-Racha’ x *D.* ‘Snowfire’) x *D. bigibbum* เป็น mapping population (ภาพผนวกที่ 1 และ 2)

ประชากรที่ใช้ในการสร้างแผนที่โครโมโซมของพืชผสมข้าม ส่วนใหญ่จะใช้ประชากร F_1 ที่จะมีการกระจายตัวของจีโนไทป์เหมือนกับ ประชากร F_2 ไม่ว่าจะเป็นลูกผสมภายในชนิดเดียวกัน (intraspecific cross) เช่น อาร์ติโชก (Lanteri *et al.*, 2006) หรือลูกผสมข้ามชนิด (interspecific cross) เช่น กล้วยไม้ (Xue *et al.*, 2010) almond x peach (Joobeur *et al.*, 1998) กุหลาบ (Dugo *et al.*, 2005) และกาแฟ (Ky *et al.*, 2000) ซึ่งข้อดีของประชากร F_1 คือเป็นประชากรที่สามารถสร้างได้ในระยะเวลาอันรวดเร็ว ให้ข้อมูลจีโนไทป์มาก (Paterson, 1996) จึงเหมาะกับการนำมาใช้สร้างแผนที่โครโมโซมของกล้วยไม้สกุลหวาย ที่ยังมีการศึกษาทางด้านจีโนมิกส์น้อย

ไมโครแซทเทลไลต์ในอียีสของ *Phalaenopsis*

ลำดับเบสอียีสของกล้วยไม้ *Phalaenopsis* มีไมโครแซทเทลไลต์แทรกอยู่ถึง 6.81% ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในพืชอื่นๆ เช่น ข้าวบาร์เลย์ (3.4%) ข้าวสาลี (3.2%) ข้าวโพด (1.5%) ข้าวฟ่าง (3.6%) ข้าว (4.7%) (Kantety *et al.*, 2002) ถั่วอัลฟาฟ่า (3%) (Eujayl *et al.*, 2004) องุ่น (2.5%) (Scott *et al.*, 2000) และอ้อย (2.88%) (Cordeiro *et al.*, 2001) ลักษณะของซ้ำที่พบมากที่สุดคือไมโครแซทเทลไลต์แบบ 2 เบส แตกต่างจากการศึกษาในพืชอื่นๆ ที่พบสัดส่วนของจำนวนซ้ำที่เป็น 3 แบบสูงกว่า เช่น การศึกษาไมโครแซทเทลไลต์ในอียีสของธัญพืช โดย Varshney *et al.* (2002) พบว่าอียีสของ ข้าว ข้าวบาเลย์ ข้าวฟ่าง ข้าวโพด และ ข้าวสาลี ล้วนแต่มีไมโครแซทเทลไลต์ที่เป็น 3 เบสสูงที่สุด แต่ในการศึกษาของ Cordeiro *et al.* (2001) ที่เปรียบเทียบชนิดของไมโครแซทเทลไลต์ในอียีสที่ระหว่างอ้อย และองุ่น พบว่าอ้อยมีไมโครแซทเทลไลต์แบบ 3 เบสมากที่สุด ในขณะที่องุ่นมีแบบ 2 เบสมากที่สุด แสดงว่าพืชแต่ละชนิดมีการกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลต์ในอียีสที่แตกต่างกันออกไป และเบสซ้ำแบบ 2 เบสที่พบในอียีสของฟาลาเลนออปซิสส่วนใหญ่เป็น GA สอดคล้องกับการศึกษาไมโครแซทเทลไลต์ในลำดับเบสอียีสขององุ่น ที่พบเบสซ้ำชนิด GA อยู่มากที่สุด (Cordeiro *et al.*, 2001) ส่วน CCG คือชนิดของไมโครแซทเทลไลต์แบบ 3 เบสที่พบมากที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาในอียีสของธัญพืช (Kantety *et al.*,

2002; Varshney *et al.*, 2002; Eujayl *et al.*, 2004) และจากการศึกษาของ Cho *et al.* (2000) พบว่า บริเวณ coding region ของข้าว จะมีสัดส่วนของเบส GC สูงกว่า non-coding region

ความแตกต่างดีเอ็นเอของเครื่องหมายดีเอ็นเอจากลำดับเบสอีเอสที

ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ออกแบบจากอีเอสทีของกล้วยไม้ไม่สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอใน พืชที่ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมห่างกันอย่าง *Phalaenopsis* และ *Dendrobium* ซึ่งอยู่คนละสกุลได้ ก็เพราะว่าอีเอสทีเป็นดีเอ็นเอที่ได้จากส่วนของ coding-region ซึ่งจะมีถ่ายทอดลำดับเบสที่ เหมือนกันไปในประชากรและในสิ่งมีชีวิต (Saha *et al.*, 2004) เนื่องจากยีนเป็นส่วนสำคัญสำหรับการมีชีวิตอยู่รอด การเกิดการเปลี่ยนแปลงในลำดับเบสภายในยีน อาจส่งผลให้สิ่งมีชีวิตนั้นๆตายได้ อย่างไรก็ตามจำนวนของดีเอ็นเอเครื่องหมายจาก *Phalaenopsis* ที่สามารถใช้กับ *Dendrobium* ได้นั้นมีค่าที่ไม่สูงนัก (28%) เมื่อเปรียบเทียบกับทดสอบในพืชอื่น เช่นระหว่าง อ้อยป่า (*Erianthus*) และ ข้าวฟ่างซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกัน โดย Cordeiro *et al.* (2001) พบว่ามีดีเอ็นเอเครื่องหมายที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของพืชทั้งสองชนิดได้นั้น สูงถึง 100% ซึ่งแสดงว่าพืชทั้งสองชนิดมีการถ่ายทอด หรือมีความเหมือนกันของลำดับเบสในบริเวณที่ศึกษาสูงมาก การศึกษาในถั่วอัลฟาฟา มีการถ่ายทอดภายในชนิด 74% (Eujayl *et al.*, 2004) และการทดสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายจากอีเอสทีของ Tall fescue (*Festuca arundinacea*) มีการถ่ายทอดระหว่างพืชชนิดเดียวกัน 80-90% และในการศึกษาพืชต่างสกุล ได้แก่ *Lolium perenne* ข้าว (*Oryza sativa*) และ ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) มีการถ่ายทอดอยู่ที่ 40-60% (Saha *et al.*, 2004) การที่มีถ่ายทอดของลำดับเบสที่ไม่สูงระหว่าง *Phalaenopsis* และ *Dendrobium* อาจกล่าวได้ว่ากล้วยไม้ 2 ชนิดนี้มีความห่างกันทางพันธุกรรม เช่นเดียวกันการทดสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายจากอีเอสที *Oncidium* ใน *Dendrobium* ที่ไม่มีดีเอ็นเอเครื่องหมายจาก *Oncidium* ที่สามารถเพิ่มจำนวนแถบดีเอ็นเอใน *Dendrobium* ได้เลย แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ ได้ทำการทดสอบกับกล้วยไม้เพียง 3 วงศ์เท่านั้นคือ *Phalaenopsis* *Dendrobium* และ *Oncidium* อีกทั้งมีจำนวนพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาน้อย เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อที่จะพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายเพื่อใช้ในการสร้างแผนที่โครโมโซมของกล้วยไม้สกุลหวาย จึงไม่สามารถสรุปได้ถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยอาศัยข้อมูลนี้ได้ ถ้าหากเพิ่มจำนวนสายพันธุ์และความหลากหลายของกล้วยไม้ที่ใช้ในการศึกษาให้มากยิ่งขึ้น น่าจะสามารถบอกได้ถึงความสัมพันธ์และการถ่ายทอดความเหมือนกันของลำดับเบสโดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายอีเอสทีได้ดียิ่งขึ้น

การที่อีเอสทีมีการอนุรักษ์ลำดับเบสในสิ่งมีชีวิต ส่งผลให้ค่าความแตกต่างของดีเอ็นเอเครื่องหมายจากอีเอสทีนั้นค่อนข้างต่ำ (33-37%) แม้ว่ากล้วยไม้จะเป็นพืชผสมข้ามก็ตาม ในการ

ทดลองนี้ต้องใช้เทคนิค PCR-RFLP ทดสอบความแตกต่างในดีเอ็นเอเครื่องหมาย 14 เครื่องหมาย (70%) โดยเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ได้จากอีเอสทีของ *Phalaenopsis* 12 เครื่องหมาย และจาก *Dendrobium* 2 เครื่องหมาย ซึ่งความแตกต่างของดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ต่ำ อาจเกิดจากการอนุรักษ์ลำดับเบสระหว่าง *Dendrobium* 'Caesar' และ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D.* *bigibbum*

ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ออกแบบจากอีเอสทีของ *Dendrobium* จำนวน 8 เครื่องหมาย (42%) ของ *Phalaenopsis* 134 เครื่องหมาย (50%) และจาก *Oncidium* 5 เครื่องหมาย (38%) ที่ไม่สามารถให้แถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลเดียวกับที่ใช้ในการออกแบบอีเอสทีได้นั้น น่าจะมีสาเหตุจากความแตกต่างของลำดับเบสระหว่างชนิดของกล้วยไม้ที่ใช้ในการทดลองกับกล้วยไม้ที่ใช้ในการสร้างอีเอสที หรือเกิดจากสภาพในการทำปฏิกิริยา PCR ที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ อาจเกิดจากการออกแบบไพรเมอร์ที่ไม่ดี ไพรเมอร์มีตำแหน่งอยู่ระหว่างรอยต่อของเอกซอน ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าจับกับจีโนมิกดีเอ็นเอในการทำปฏิกิริยา PCR ได้ หรือว่าชิ้นอินทรอนที่แทรกระหว่างไพรเมอร์นั้นมีขนาดใหญ่กว่าที่คาดไว้ ทำให้ *Taq* DNA polymerase ไม่สามารถต่อสายดีเอ็นเอได้สำเร็จ

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายอีเอสทีจะให้ค่าความแตกต่างดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลหวายที่ต่ำ แต่ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดอีเอสทียังคงเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอเครื่องหมายที่น่าสนใจ ในการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายในฐานะข้อมูลที่มีอยู่แล้วเพื่อนำมาใช้ในกล้วยไม้สกุลหวายและสกุลอื่น เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายในการพัฒนาถูกกว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดชนิดอื่นๆ เพราะไม่มีขั้นตอนในการโคลนนิ่งและการหาลำดับเบส เนื่องจากอาศัยลำดับเบสจากฐานข้อมูลสาธารณะในการออกแบบดีเอ็นเอเครื่องหมาย ในการศึกษาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณหรือลักษณะทางคุณภาพ ตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมายอีเอสทีที่มีสัมพันธ์กับลักษณะใดที่สนใจ มีความเป็นไปได้ว่านั่นก็คือตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะนั้นๆ และการที่ดีเอ็นเอเครื่องหมายอีเอสทีสามารถใช้กับพืชที่อยู่ในสกุลใกล้เคียงกัน ทำให้สามารถนำดีเอ็นเอเครื่องหมายอีเอสทีมาใช้ในการศึกษาจีโนมเปรียบเทียบระหว่างกล้วยไม้ได้ ในปัจจุบันมีฐานข้อมูลอีเอสทีเป็นจำนวนมากในเวปไซด์สาธารณะ ซึ่งทำให้การศึกษาทางด้านจีโนมิกส์ของพืชที่มีการศึกษาน้อยนั้นมีค่าใช้จ่ายที่น้อยลงและสะดวกมากยิ่งขึ้น

การทดสอบการกระจายตัวของดีเอ็นเอในประชากร

จากการทดสอบการกระจายตัวของดีเอ็นเอเครื่องหมายในประชากรลูกผสมระหว่าง *Dendrobium* 'Caesar' และ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* พบว่ามีการกระจายตัวของดีเอ็นเอเครื่องหมายในอัตราส่วน 1:1:1:1 ซึ่งเป็นอัตราส่วนของดีเอ็นเอเครื่องหมายในประชากร F_1 ที่เป็น co-dominant intercross marker คือเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีแถบดีเอ็นเอทั้งใน *Dendrobium* 'Caesar' และ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* และมีจำนวนอัลลีล ตั้งแต่ 3 อัลลีล ได้แก่ $A_1A_2 \times A_1A_3$ หรือ 4 อัลลีล $A_1A_2 \times A_3A_4$ สำหรับอัตราส่วน 3:1 เป็นอัตราส่วนของดีเอ็นเอเครื่องหมาย dominant intercross marker ซึ่งในการสร้างแผนที่โครโมโซมด้วยวิธี two-way pseudo testcross (Grattapaglia and Sederoff, 1994) ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เป็น intercross นี้จะใช้ในการเชื่อมกลุ่มลิงค์เกจ 2 กลุ่ม ที่เป็นกลุ่มที่สร้างจากดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ปรากฏเฉพาะในพ่อพันธุ์ (Paternal testcross marker) และอีกกลุ่มได้จากดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ปรากฏเฉพาะในแม่พันธุ์ (Maternal testcross marker) เช่น การสร้างแผนที่โครโมโซมของ อาร์ติโชค (Lanteri *et al.*, 2006) มะม่วง (เฉลิมพล, 2544) โดยดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เป็น testcross นี้จะมีอัตราส่วนการกระจายตัวของดีเอ็นเอเครื่องหมายเป็น 1:1

ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจในกล้วยไม้ที่แสดงแถบดีเอ็นเอเป็นแบบ co-dominant พบว่าเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มี null allele อยู่ถึง 36 เครื่องหมาย คิดเป็น 44% ของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด co-dominant ที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด ซึ่ง null allele นั้นสามารถพบได้เป็นปกติของการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์ในการวิเคราะห์จีโนมไทป์ของสิ่งมีชีวิต (Dakin and Avise, 2004) ในการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร การปรากฏของ null allele ในดีเอ็นเอเครื่องหมายอาจทำให้การคำนวณความถี่อัลลีลในประชากรมีความผิดพลาดได้ (Reece *et al.*, 2004) ทั้งนี้ Dakin and Avise (2004) ได้อธิบายถึงสาเหตุของการเกิด null allele ว่าเกิดจากการที่ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้าจับกับสายดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ได้ เนื่องมาจากการเกิดมิวเตชันของลำดับเบส เช่น การเกิด insertion หรือว่า deletion โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบริเวณปลาย 3' ในบริเวณจับของไพรเมอร์บนสายดีเอ็นเอ

การทดสอบอัตราส่วนการกระจายตัวของจีโนมไทป์ด้วยค่าไคสแควร์ พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมาย 45% มีการกระจายตัวของจีโนมไทป์ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 1:1:1:1, 3:1 และ 1:1 ที่ค่า $P < 0.05$ ได้มีการรายงานอัตราส่วนที่ผิดปกติของดีเอ็นเอเครื่องหมายในพืชหลายชนิดซึ่งพบว่าเกิดกับดีเอ็นเอเครื่องหมายทุกประเภท และมีสัดส่วนของตำแหน่งที่แสดงความผิดปกติที่แตกต่างกัน

ออกไป เช่น การสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย AFLP ในพืช *Cryptomeria japonica* พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมาย 69% มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน 1:1 (Nikaido *et al.*, 1999) การสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจของกาแฟ ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย AFLP และ RFLP พบว่ามีดีเอ็นเอเครื่องหมาย 30% ที่กระจายตัวของจีโนไทป์ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน (Ky *et al.*, 2000) การสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจของ apricot ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย AFLP และ SSR มีดีเอ็นเอเครื่องหมาย 24% ที่มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน (Vilanova *et al.*, 2003) และการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจขององุ่น ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย AFLP ISSR และ RAPD พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมาย 9% ที่มีการกระจายตัวของจีโนไทป์ไม่เป็นไปตามอัตราส่วน (Douceff *et al.*, 2004) โดยจะเห็นได้ว่าสัดส่วนของดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ไม่เป็นไปตามอัตราส่วนจีโนไทป์ในประชากรลูกผสม *Dendrobium* 'Caesar' (C2) และ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum*(CP) นั้นมีค่าสูงมากเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น โดยที่ค่า $P < 0.001$ มีดีเอ็นเอเครื่องหมายจำนวนมากถึง 13% ที่การกระจายตัวไม่เป็นไปตามอัตราส่วนของจีโนไทป์ สาเหตุในการเกิดการกระจายตัวที่ผิดปกติขึ้น มีสาเหตุสำคัญมาจากปัจจัยทางชีวภาพของพืช เช่น การเกิด null allele (Pekkinen *et al.*, 2005) การเลือกผสมของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะ meiosis การมีชีวิตรอดของไซโกต (Bradshaw and Stettler, 1994) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการกระจายตัวที่ไม่เป็นไปตามอัตราส่วนในพืชผสมข้าม (Song *et al.*, 2006) เนื่องจากการเกิด inbreeding depression ในพืชผสมข้าม จะส่งผลให้การมีชีวิตรอดของไซโกตที่เป็น homozygous ลดลง จึงเกิดการกระจายตัวของจีโนไทป์ที่ผิดปกติ

แม้ว่าการนำดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีการกระจายตัวที่ไม่เป็นไปตามอัตราส่วนมาใช้ในการคำนวณลิงค์เกจ อาจส่งผลต่อความถูกต้องของระยะทางและอันดับของดีเอ็นเอเครื่องหมายในกลุ่มลิงค์เกจได้ (Song *et al.*, 2006) แต่การไม่ใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายเหล่านี้ในการคำนวณ อาจทำให้ได้กลุ่มลิงค์เกจที่ไม่สมบูรณ์ได้เช่นกัน (Cervera *et al.*, 2001) โดยในการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจของกล้วยไม้สกุลหวายในครั้งนี้ มีจำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการศึกษาน้อย ถ้าหากตัดดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ให้การกระจายตัวออกไป จะทำให้ได้แผนที่ที่มีจำนวนกลุ่มลิงค์เกคน้อยลง จึงใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายทุกตำแหน่งในการคำนวณ ซึ่งถ้าหากมีจำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจเพิ่มขึ้น การตัดดีเอ็นเอเครื่องหมายบางตำแหน่งที่มีอัตราส่วนการกระจายตัวที่ผิดปกติสูงมากๆ ($P < 0.001$) ออกจากการคำนวณแผนที่กลุ่มลิงค์เกจ ก็จะส่งผลกระทบต่อจำนวนกลุ่มลิงค์เกคน้อยลง

ในประชากรที่ทดสอบด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เป็น co-dominant พบว่ามีบางต้นที่มีจำนวนอัลลีล 3 อัลลีลหรือมีเพียง 1 อัลลีล ต่างจากต้นอื่นในประชากรที่พบเพียง 2 อัลลีล โดยทั่วไป

แล้วต้นที่เป็นดิพลอยด์จะมีจำนวนอัลลีลมากที่สุดเพียง 2 อัลลีล (ในกรณีที่มีเพียง 1 loci) การที่พบว่าจำนวนอัลลีลต่างจาก 2 อัลลีล อาจแสดงถึงความผิดปกติของโครโมโซม เกิดมีชิ้นส่วนของโครโมโซม หรือทั้งโครโมโซม (aneuploid) เพิ่มเข้ามาในจีโนมของกล้วยไม้ แต่ไม่ใช่การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม เนื่องจากมีดีเอ็นเอเครื่องหมายเพียงบางตำแหน่งที่แสดงจำนวนอัลลีล 3 อัลลีล หรือ 1 อัลลีล ซึ่งอาจต้องทำการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเพื่อลักษณะของโครโมโซมของต้นที่มีจีโนมไทป์ที่ผิดปกติต่อไป

การตรวจสอบความเหมือนกันของจีโนมไทป์ของกล้วยไม้แต่ละต้นในประชากรด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย 134 ตำแหน่ง โดยคำสั่ง similarity of individual ในโปรแกรม JoinMap v.3 พบว่าต้นที่มีค่า similarity มากกว่า 0.95 นั้น สามารถจัดเป็นกลุ่มได้ 18 กลุ่ม ค่า similarity ใช้อธิบายได้ว่าภายในกลุ่มนั้นให้ค่าจีโนมไทป์ในแต่ละดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เหมือนกันมากกว่า 95% ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า ต้นที่มีค่า similarity สูงถึง 1.0 ได้แก่ต้นที่ 36 กับ 42 และต้นที่ 195 กับ 196 (มี missing data 1 เครื่องหมาย) นั้น น่าจะเป็นต้นที่มาจากโคลนเดียวกัน ที่อาจเกิดจากการคัดต้นในการปลูกกล้วยไม้เพื่อสร้างประชากร เนื่องจากกล้วยไม้สกุลหวายมีการเจริญเติบโตไปทางด้านข้างโดยการแตกหน่อจนมีลักษณะเป็นกอที่มี 3-4 ต้น และหลังจากที่นำลูกกล้วยไม้ออกจากขวดจะอนุบาลกล้วยไม้ร่วมกันในตะกร้าพลาสติกแล้วจึงแยกใส่กระถาง ซึ่งเป็นไปได้ว่าในการแยกหน่อกล้วยไม้ใส่กระถางนั้น กล้วยไม้ที่มีลักษณะเป็นกอ ถูกแยกออกจากกันให้อยู่คนละกระถาง ทำให้กล้วยไม้ที่มีโคลนเดียวกันนั้นมีหลายชำ และเมื่อสุ่มกล้วยไม้เข้ามาทำการทดลองก็ได้กล้วยไม้ที่มีโคลนเดียวกันมาอยู่ในประชากรด้วย

กลุ่มลักษณะของกล้วยไม้สกุลหวาย

กล้วยไม้มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน $x=19$ ในการศึกษาปริมาณดีเอ็นเอของ *Dendrobium* 'Caesar' (C2) และ (*Dendrobium* Sri-Racha x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* พบว่าปริมาณดีเอ็นเอในจีโนมเท่ากับ 4.23 pg/2C และ 2.96 pg/2C ตามลำดับ ส่วนในการศึกษาประชากรลูกผสมบางต้นพบว่าโดยเฉลี่ยแล้วจะมีปริมาณดีเอ็นเออยู่ที่ 3.26 pg/2C (สุกัญญา, 2551) จึงคาดว่าประชากรลูกผสม *Dendrobium* 'Caesar' (C2) และ (*Dendrobium* Sri-Racha x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* จะมีขนาดของจีโนม 1C ประมาณ 1,572.8 Mbp (1pg=965 Mbp) (Straus, 1971)

จากการคำนวณกลุ่มลักษณะของกล้วยไม้สกุลหวาย โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์และดีเอ็นเอเครื่องหมายจากอีเอสทีทั้งหมด 134 ตำแหน่ง โดยใช้โปรแกรม JoinMap v.3

ยอมรับค่า $LOD \geq 3$ ใช้รูปแบบข้อมูลของพืชผสมข้าม สร้างเป็นแผนที่ลิงค์เกจของกล้วยไม้ที่มีจำนวน 22 กลุ่มครอบคลุมระยะทาง 1,024.7 cM โดยกลุ่มที่มีจำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายมากกว่า 2 ตำแหน่งมีจำนวน 15 กลุ่ม และกลุ่มที่มีดีเอ็นเอเครื่องหมาย 2 ตำแหน่งจำนวน 7 กลุ่ม การที่ยังมีกลุ่มลิงค์เกจย่อยๆ ที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายน้อยกว่า 3 ตำแหน่ง และมีดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ไม่เข้าไปอยู่ในกลุ่มลิงค์เกจอยู่อีกหลายตำแหน่ง แสดงให้เห็นว่ากลุ่มลิงค์เกจที่ได้ยังไม่สมบูรณ์ เนื่องจากดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการศึกษายังมีอยู่น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับ การสร้างแผนที่โครโมโซมในพืชอื่นๆ เช่นใน กาแฟ (Ky *et al.*, 2000) หนุ่ยชอยเซีย (Cai *et al.*, 2005) อาร์ติโชค (Lanteri *et al.*, 2006) และแอปเปิ้ล (Dugo *et al.*, 2005)

ในการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจ การที่ไม่ได้ตัดดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีการกระจายตัวของอัลลีลที่ผิดปกติออกจากการคำนวณ พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายเหล่านี้ที่ค่า $P < 0.05$ มีการรวมตัวกันอยู่บนกลุ่มลิงค์เกจหลายกลุ่ม ได้แก่ G2 ที่มีดีเอ็นเอเครื่องหมาย 90% ที่มีการกระจายตัวที่ผิดปกติ เมื่อเทียบกับจำนวนดีเอ็นเอเครื่องหมายในลิงค์เกจทั้งหมด G3 (55%) G8 (83%) และ G10 (67%) บริเวณที่มีการเกาะกลุ่มกันของดีเอ็นเอเครื่องหมายในกลุ่มลิงค์เกจนี้ อาจเป็นบริเวณมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดการกระจายตัวที่ไม่เป็นไปตามอัตราส่วนของดีเอ็นเอเครื่องหมาย โดย Lu *et al.* (2002) ได้ศึกษาบริเวณของโครโมโซมที่มีผลต่อการกระจายตัวที่ผิดปกติของดีเอ็นเอเครื่องหมายในข้าวโพด พบว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีการกระจายตัวที่ผิดปกติมีตำแหน่งอยู่รวมเป็นกันกลุ่ม 18 กลุ่ม กระจายอยู่บนโครโมโซมทั้ง 10 แท่งของข้าวโพด ซึ่งดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีการกระจายตัวที่ผิดปกตินี้ สามารถใช้ศึกษาตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีผลต่อลักษณะทางชีวภาพของพืชที่ส่งผลต่อการเกิดการกระจายตัวที่ผิดปกติ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการงอกของละอองเรณู ความมีชีวิตรอดของเซลล์สืบพันธุ์หรือ lethal gene (Song *et al.*, 2006)

ในแผนที่กลุ่มลิงค์เกจ ดีเอ็นเอเครื่องหมายบางคู่ที่มีแถบดีเอ็นเอลักษณะเป็น co-dominant แต่มีการให้คะแนนแยกแต่ละแถบดีเอ็นเอแบบ dominant โดยคาดว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายเหล่านี้จะอยู่บนลิงค์เกจตำแหน่งเดียวกัน แต่จากผลการทดลองกลับพบว่ามีความห่างกันเล็กน้อย เช่น ใน G5 ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ORCA165 ที่มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ให้คะแนนแถบดีเอ็นเอเป็นคนละตำแหน่ง พบว่ามีความห่างของทั้ง 2 ตำแหน่งห่างกัน 4 เซนติเมอร์แกน เมื่อพิจารณาลักษณะการความสัมพันธ์ของแถบดีเอ็นเอแล้วพบว่า เป็น co-dominant ที่มี null allele และไม่สามารถให้คะแนนในแบบ co-dominant ได้ คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายให้จีโนไทป์ของ *Dendrobium* 'Caesar' และ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* เป็น ef และ eg โดยที่ f แทน null allele ซึ่งจะไม่สามารถแยกจีโนไทป์ที่เป็น ee และ ef ในประชากรได้ จึงให้คะแนนจีโนไทป์ในแบบ dominant ในแถบดีเอ็นเอ e และ g ซึ่งเช่นเดียวกับการมีระยะห่างของดีเอ็นเอเครื่องหมาย ORCT203 และ

ORCT203N ใน G10 ที่ออกแบบมาจากจีโนมิกส์ไลบรารีโคลนเดียวกัน ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ORCT187 ใน G11 ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ORCA10 และ ORCA105 ใน G23 แสดงว่าดีเอ็นเอเครื่องหมายที่เป็น null allele ส่งผลต่อการคำนวณระยะระหว่างดีเอ็นเอเครื่องหมายในการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจ และคาดว่าตำแหน่งของดีเอ็นเอเครื่องหมาย CB032073PI_A, CB032073PI_B และ CB032073PI_C บน G13 ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ORCA12_A และ ORCA12_B บน G3 และ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย ORCT213 และ ORCT213 บน G15 GQ250049DS_B และ GQ250049_C บน G14 ที่ไม่ได้อยู่ในตำแหน่งเดียวกันนั้น น่าจะมีสาเหตุมาจาก null allele เช่นกัน

ในการสร้างกลุ่มลิงค์เกจของกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้ประชากรลูกผสมระหว่าง *Dendrobium* 'Caesar' และ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* จำนวน 224 ต้น ได้ทำการเก็บลักษณะต่างๆของกล้วยไม้ลูกผสมบางต้น (ตารางผนวกที่ 3) ได้แก่ ขนาดของลำลูกกล้วย ขนาดใบ ขนาดดอก ความยาวก้านช่อดอก ขนาดกลีบเลี้ยง-กลีบดอก สีของก้านช่อดอก และสีของดอก โดยที่ *Dendrobium* 'Caesar' และ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* เป็นกล้วยไม้ที่มีความแตกต่างของลักษณะหลายลักษณะ เช่น ขนาดและสีของลำต้น ขนาดและสีของดอก รูปร่างของกลีบเลี้ยงและกลีบดอก ซึ่งพบว่ามีกระจายตัวของลักษณะต่างๆ อยู่ในประชากรลูกผสม ซึ่งสามารถใช้ข้อมูลฟีโนไทป์เหล่านี้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์กับดีเอ็นเอเครื่องหมายต่อไป

แผนที่กลุ่มลิงค์เกจของกล้วยไม้ที่ได้จากการทดลองเป็นลิงค์เกจที่ยังไม่สมบูรณ์ เป็นก้าวแรกของการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลของกล้วยไม้ แต่อย่างไรก็ตามดีเอ็นเอเครื่องหมายและกลุ่มลิงค์เกจสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลหวายได้ การศึกษาดีเอ็นเอเครื่องหมายหรือโครโมโซมบริเวณที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะคุณภาพและปริมาณ เช่น การหาตำแหน่งยีนต้านทาน plum pox virus และ self-incompatibility ในประชากร F_2 ของ apricot (Vilanova *et al.*, 2003) การศึกษาคำแหน่ง QTL ที่มีความเกี่ยวข้องกับขนาดดอก ขนาดใบ วันออกดอก และความต้านทานต่อโรคราแป้งของกุหลาบ (Dugo *et al.*, 2005) เพื่อใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายเหล่านี้ในการช่วยคัดเลือกลักษณะ ทำให้ลดระยะเวลา และเพิ่มความถูกต้องในการปรับปรุงพันธุ์ การนำดีเอ็นเอเครื่องหมายของกล้วยไม้สกุลหวายมาศึกษาจีโนมเปรียบเทียบกับภายในกล้วยไม้สกุลหวายหรือคนละสกุล เช่น การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายจากข้าวบาร์เลย์ในการศึกษาจีโนมเปรียบเทียบระหว่าง ข้าวบาร์เลย์ ข้าวสาลี ข้าวไรย์ และข้าว (Varshney *et al.*, 2005)

สรุป

จากการศึกษาความระดับแตกต่างของดีเอ็นเอระหว่างกล้วยไม้สกุลหวาย 4 กลุ่ม ด้วย ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 128 คู่ มีค่าความแตกต่างดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 98-100% และเมื่อพิจารณาทั้งลักษณะจีโนไทป์และฟีโนไทป์ พบว่า *Dendrobium* 'Caesar' (C2) และ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* มีความเหมาะสมที่จะเป็นพ่อแม่พันธุ์ของประชากรที่ใช้สำหรับสร้างแผนที่โครโมโซมในกล้วยไม้สกุลหวาย

ในการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ในอียีสต์ของกล้วยไม้ 3 สกุล ได้แก่ ฟาแลนนอปซิส, หวาย และออนซิเดียม ทั้งหมด 6,838 เส้น พบอียีสต์ที่มีไมโครแซทเทลไลต์แทรกอยู่จำนวน 466 เส้น (6.8%) โดยชนิดของซ้ำที่พบมากที่สุดเป็นแบบ 2 เบสจำนวน 308 เส้น (66%) รองลงมาคือแบบ 3 เบส จำนวน 155 เส้น (33%) โดยเบสซ้ำที่พบมากที่สุดคือ GA จำนวน 174 เส้น (57%)

สามารถออกแบบดีเอ็นเอเครื่องหมายจากลำดับเบสอียีสต์ของกล้วยไม้สกุลหวาย ฟาแลนนอปซิสและออนซิเดียม ได้ทั้งหมด 301 คู่ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอใน *Dendrobium* 'Caesar' (C2) และ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* จำนวน 51 คู่ (17%) และให้ความแตกต่างของดีเอ็นเอระหว่าง 2 สายพันธุ์ได้จำนวน 20 คู่ (6.6%) สามารถนำไปใช้ในการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจได้ 17 คู่

จากการศึกษาการกระจายตัวของดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์และดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ออกแบบจากอียีสต์ พบว่ามีการกระจายตัวในอัตราส่วน 1:1:1:1 จำนวน 40 ตำแหน่ง อัตราส่วน 3:1 จำนวน 11 ตำแหน่ง และ อัตราส่วน 1:1 จำนวน 83 ตำแหน่ง มีดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีการกระจายตัวไม่เป็นไปตามอัตราส่วนจำนวน 60 ตำแหน่ง

สร้างกลุ่มลิงค์เกจของประชากรลูกผสม *Dendrobium* 'Caesar' (C2) และ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* ได้ 22 กลุ่ม ประกอบด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมาย 110 ตำแหน่ง เป็นระยะทางรวม 1,024.7 เซนติเมอร์แกน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ครรชิต ธรรมศิริ. 2550. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน), กรุงเทพฯ.

เฉลิมพล ภูมิไชย์. 2544. การศึกษาดีเอ็นเอเครื่องหมายในมะม่วงพันธุ์ Alphonso และ Palmer และประชากรลูกผสม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทิพวัลย์ อยู่ชา, ณัฐพร คูนวงศ์ และ จุลภาค คูนวงศ์. 2549. ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์ที่ใช้จำแนกพันธุ์และตรวจสอบพันธุ์ประวัติกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์การค้า. ว. วิทย. กษ. 37(2): 163-174.

พนิดา ฐาตุจิรางค์กุล, ณัฐพร คูนวงศ์ และ จุลภาค คูนวงศ์. 2549. การสร้างแผนที่โครโมโซมในประชากรกล้วยไม้หวายสายพันธุ์แท้คอมมิเนนซ์โดยใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลต์. ว. วิทย. กษ. 37(5): 415-420.

ระพี สาคริก. 2548. กล้วยไม้สำหรับผู้เริ่มต้น. บริษัท วชิระ จำกัด, กรุงเทพฯ.

ศิริพร เชื้อจีน. 2546. การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์และความสมบูรณ์ของกล้วยไม้บางพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุกัญญา แซ่อ่อง. 2553. การศึกษาปริมาณดีเอ็นเอของประชากรกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย ระหว่าง *Dendrobium* 'Caesar' (C2) และ (*Dendrobium* Sri-Racha x *D. Snowfire*) x *D. bigibbum* ด้วยเครื่องโพลีไซโตมิเตอร์. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Al-Janabi, S.M., R.J. Honeycutt, M. McClelland and B.W.S. Sobral. 1993. A Genetic Linkage Map of *Saccharum Spontaneum* L. 'SES208'. **Genetics**. 134:1249-1260.

- Benbouza, H., J.M. Jacquemin, J.P. Baudoin and G. Mergeai. 2006. Optimization of a reliable fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** 10(2): 77-81.
- Boonsrangsom, T., P. Pongtongkam, S. Masuthon and S. Piyachoksagul. 2008. Development of microsatellite markers for *Dendrobium* orchids. **Thai J. Genet.** 1(1): 47-56.
- Bradshaw, H.D. and R.F. Stettler. 1994. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. II. Segregation distortion due to genetic load. **Theor. Appl. Genet.** 89: 551-558.
- Brondani, R.P.V., C. Brondani, R. Tarchini and D. Grattapaglia. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. **Theor. Appl. Genet.** 97: 816-827.
- Brown, T.A., 2006. **Genomes 3**. Garland science publishing, New York.
- Cai, H.W., M. Inoue, N. Yuyama, W. Takahashi, M. Hirata and T. Sasaki. 2005. Isolation, Characterization and mapping of simple sequence repeat markers in zoysiagrass (*Zoysia* spp.). **Theor. Appl. Genet.** 112: 158-166.
- Cervera, M.T., Y. Strome, B. Ivens, J. Gusmão, B. H. Liu, V. Hostyn, J. van Slycken, M.V. Montagu and W. Boerjan. 2001. Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoids*, *P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. **Genetics.** 158: 787-809.
- Cho, Y.G., T. Ishii, S. Temnykh, X. Chen, L. Lipovich, S.R. McCouch, W.D. Park, N. Ayres and S. Cartinhour. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** 100: 713-722.

- Cordeiro, G.M., R. Casu, C.L. McIntyre, J.M. Manners and R.J. Henry. 2001. Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum. **Plant Sci.** 160: 1115-1123.
- Dakin, E.E. and J.C. Avise. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity.** 93: 504-509.
- Don, R.H., P.T. Cox, B.J. Wainwright, K. Baker and J.S. Mattick. 1991. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucl. Acids Res.** 19(14): 4008.
- Doucleff, M., Y. Jin, F. Gao, S. Riaz, A.F. Krivanek and M.A. Walker. 2004. A genetic linkage map of grape, utilizing *Vitis rupestris* and *Vitis arizonica*. **Theor. Appl. Genet.** 109: 1178-1187.
- Dugo, M.L., Z. Satovic, T. Millán, J.I. Cubero, D. Rubiales, A. Cabrera and A.M. Torres. 2005. Genetic mapping of QTLs controlling horticultural traits in diploid roses. **Theor. Appl. Genet.** 111: 511-520.
- Eujayl, I., M.K. Sledge, L. Wang, G.D. May, K. Chekhovsky, J.C. Zwonitzer and M.A.R. Mian. 2004. *Medicago truncatula* EST-SSR reveal across-species genetic markers for *Medicago* spp. **Theor. Appl. Genet.** 108: 414-422.
- Fregene, M., F. Angel, R. Gomez, F. Rodriguez, P. Chavarriaga, W. Roca, J. Tohme and M. Bonierbale. 1997. A molecular genetic map of cassava (*Manihot eaculenta* Crantz). **Theor. Appl. Genet.** 95: 431-441.
- Fulton, T.M., J. Chunwongse and S.D. Tanksley. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. **Plant Mol. Biol. Rep.** 13(3): 207-209.

- Grattapaglia, D. and R.R. Sederoff. 1994. Genetics linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross : mapping strategy and RAPD markers. **Genetics**. 137: 1121-1137.
- Haldane, J.B.S. 1919. The combination of linkage value and the calculation of distances between the loci of linked factors. **Genetics**. 8: 299-309.
- Hancock, J.M. 1999. Microsatellites and Other Simple Sequences: Genomic Context and Mutational Mechanisms, pp. 1-9. *In*. D. B. Goldstein and C. Schlötterer. **Microsatellites: Evolution and Applications**. Oxford University Press, Oxford.
- Hemmat, M., N.F. Weeden, A.G. Manganaris and D.M. Lawson. 1994. Molecular marker linkage map for Apple. **J. Hered.** 85: 4-11.
- Jones, W.E., A.R. Kuehnle and K. Arumuganathan. 1998. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. **Ann. Bot.** 82: 189-195.
- Joobeur, T., M.A. Viruel, M.C. de Vicente, B. Jauregui, J. Ballester, M.T. Dettori, I. Verde, M.J. Truco, R. Messeguer, I. Batlle, R. Quarta, E. Dirlewanger and P. Arus. 1998. Construction of a saturated linkage map for *Prunus* using and almond x peach F₂ progeny. **Theor. Appl. Genet.** 97: 1034-1041.
- Kamemoto, H., T.D. Amore and A.K. Kuehnle. 1999. **Breeding Dendrobium Orchid in Hawaii**. University of Hawaii Press, Honolulu.
- Kantety, R.V., M. La Rota, D.E. Matthews and M. Sorrells. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. **Plant. Mol. Biol.** 48: 501-510.
- Kole, C. 2007. **Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants**. Academic Press, Texas.

Kole, C. and P.K. Gupta. 2004. Genome Mapping and Map Based Cloning, pp. 257-299. In. H. K. Jain and M. C. Kharkwal (eds.). **Plant Breeding-Mendelian to Molecular Approached**. Narosa Publishing House, New Dalhi.

Ky, C.L., P. Barre, M. Lorieux, P. Trouslot, S. Akaffou, J. Louarn, A. Charrier, S. Hamon and M. Noirot. 2000. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). **Theor. Appl. Genet.** 101: 669-676.

Lanteri, S., A. Acquadro, C. Comino, R. Mauro, G. Mauromicale and E. Portis. 2006. A first linkage map of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* L.) based on AFLP, S-SAP, M-AFLP and microsatellite markers. **Theor. Appl. Genet.** 112: 1532-1542.

Lu, H., J. Romero-Severson and R. Bernardo. 2002. Chromosome regions associated with segregation distortion in maize. **Theor. Appl. Genet.** 105: 622-628.

Nikaido, A., H. Yoshimaru, Y. Tsumura, Y. Suyama, M. Murai and K. Nagasaka. 1999. Segregation distortion for AFLP markers in *Cryptomeria japonica*. **Genes. Genet. Syst.** 74: 55-59.

Paterson, H.A. 1996. **Genome Mapping in Plants**. Academic Press, Texas.

Pekkinen, M., S. Varvio, K.K. M. Kulju, H. Kärkkäinen, S. Smolander, A. Viherä-Aarnio, V. Koski and M.J. Sillanpää. 2005. Linkage map of birch, *Betula pendula* Roth, based on microsatellites and amplified fragment length polymorphisms. **Genome.** 48: 619-625.

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.

- Reece, K. C., W. L. Ribeiro, P. M. Gaffney, R. B. Carnegie and S. K. Allen. 2004. Microsatellite marker development and analysis in Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*): Confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios. **J Hered.** 95(4): 346-352.
- Rowland, L.J. and A.L. Dhanaraj. 2003. Utility of Blueberry-derived EST-SSR primers in Related Ericaceae Species. **Hort. Science.** 38(7): 1428-1432.
- Saha, M. C., M.A.R. Mian, I. Eujayl, J.C. Zwonitzer and L. Wang. 2004. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species. **Theor. Appl. Genet.** 109: 783-791.
- Schelpe, J. and J. Stewart. 1990. **Dendrobiums: An Introduction to the species in cultivation.** Blackmore Press, Dorset.
- Scott, K.D., P. Eggler, G. Seation, M. Rossetto, E.M. Ablett, L.S. Lee and R.J. Henry. 2000. Analysis f SSRs derived from grape ESTs. **Theor. Appl. Genet.** 100: 723-726.
- Song, X.L., X.Z. Sun and T.Z. Zhang. 2006. Segregation distortion and its effect on genetic mapping in plants. **Chin. J. Agric. Biotechol.** 3(3): 163-169.
- Sosinski, B., M. Gannavarapu, L.D. Hager, L.E. Beck, G.J. King, C.D. Ryder, S. Rajapakse, W.V. Baird, R.E. Ballard and A.G. Abbott. 2000. Characterization of microsatellite marker in peach [*Prunus persica* (L.) Batch]. **Theor. Appl. Genet.** 101: 421-428.
- Straus, N.A. 1971. Comparative DNA renaturation kinetics in Amphibians. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 68(4): 799-802.

- Tamura, K., J. Yonemaru, H. Hisano, H. Kanamori, J. King, I. P. King, K. Tase, Y. Sanada, T. Komatsu and T. Yamada. 2009. Development of intron-flanking EST markers for the *Lolium/Festuca* complex using rice genomic information. **Theor. Appl. Genet.** 118: 1549-1560.
- Testolin, R., W.G. Huang, O. Lain, R. Messina, A. Vecchione and G. Cipriani. 2001. A kiwifruit (*Actinidia* spp.) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers. **Theor. Appl. Genet.** 103: 30-36.
- Van Ooijen, J.W. and R.E. Voorrips. 2001. **JoinMap[®] 3.0**, Software for the Calculation of Genetic Linkage maps. **Plant Research International**. Wageningen, The Netherlands.
- Varshney, R.K., T. Thiel, N. Stein, P. Langridge and A. Graner. 2002. *In silico* analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. **Cell. Mol. Biol. Lett.** 7: 537-546.
- Varshney, R.K., R. Sigmund, A. Börner, V. Korzun, N. Stein, M.E. Sorrells, P. Langridge and A. Graner. 2005. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. **Plant Sci.** 168: 195-202.
- Vilanova, S., C. Romero, A.G. Abbott, G. Llácer and M.L. Badenes. 2003. An apricot (*Prunus armeniaca* L.) F₂ progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping plum pox virus resistance and self-incompatibility traits. **Theor. Appl. Genet.** 107: 239-247.
- Voorrips, R.E. 2002. **MapChart**: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **J. Hered.** 93(1): 77-78.
- Wei, H., Y. Fu and R. Arora. 2005. Intron-flanking EST-PCR markers: from genetic marker development to gene structure analysis in *Rhododendron*. **Theor. Appl. Genet.** 111: 1347-1356.

Xue, D., S. Feng, H. Zhao, H. Jiang, B. Shen, N. Shi, J. Lu, J. Liu and H. wang. 2010. The linkage maps of *Dendrobium* species based on RAPD and SRAP markers. **J. Genet. Genomics.** 37: 197-204.

Yang, L., G. Jin, X. Zhao, Y. Zheng, Z. Xu, and W. Wu. 2007. PIP: a database of potential intron polymorphism markers. **Bioinformatics.** 23: 2174-2177.

Yue, G.H., L.T. Lam Chan and Y. Hong. 2006. Development of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in identification of *Dendrobium* varieties. **Mol. Ecol. Notes.** 6: 832-834.



ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 การกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลต์ชนิดต่างๆ ในจีโนมของ *Phalaenopsis*
แยกเป็น *P. violaceae* และ *P. equestris*

Repeat motifs	Number of ESTs		Repeat motifs	Number of ESTs	
	<i>P. equestris</i>	<i>P. violaceae</i>		<i>P. equestris</i>	<i>P. violaceae</i>
(AT) _n	38	6	(TCC) _n	1	-
(AG) _n	14	12	(TGC) _n	1	-
(AC) _n	1	4	(TTG) _n	1	-
(TA) _n	73	6	(TAA) _n	-	1
(TG) _n	2	-	(CCG) _n	29	6
(TC) _n	47	24	(CAT) _n	1	-
(GA) _n	35	3	(CTT) _n	8	-
(GT) _n	1	1	(CCT) _n	1	2
(GC) _n	-	1	(CAC) _n	4	2
(CA) _n	1	-	(CGG) _n	4	-
(CT) _n	22	17	(CGC) _n	4	1
(AGG) _n	5	1	(CAG) _n	1	-
(AAT) _n	2	-	(CAA) _n	2	2
(AGC) _n	1	1	(CTC) _n	1	-
(ATG) _n	1	-	(CTG) _n	1	-
(ACG) _n	1	-	(GCC) _n	6	-
(AGG) _n	1	1	(GCG) _n	1	1
(AGA) _n	1	-	(GTC) _n	1	-
(ACC) _n	-	1	(GCT) _n	1	-
(TAT) _n	16	2	(GCA) _n	2	-
(TTC) _n	10	-	(GAT) _n	2	-
(TGA) _n	4	2	(GAA) _n	4	-
(TAA) _n	1	1	(GGC) _n	4	4
(TCT) _n	4	-	(GGA) _n	1	-

ตารางผนวกที่ 2 ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการสร้างแผนที่กลุ่มลิงค์เกจของกล้วยไม้สกุลหวาย
ในประชากรลูกผสมระหว่าง *Dendrobium* ‘Caesar’ (C2) และ (*Dendrobium* ‘Sri-
Racha’ x *D.* ‘Snowfire’) x *D. bigibbum*

No of loci	Primer	Type	loci	Segregation type	df	Sig.
1	AF038841-1DI	EST	-	(lmxll)	1	**
2	HA642879DI	EST	-	(lmxll)	1	****
3	U64031DI	EST	-	(nnxnp)	1	-
4	GQ250049DS	EST	A	(nnxnp)	1	-
5			B	(hkxhk)	1	-
6			C	(lmxll)	1	-
7	GU138671DS	EST	-	(lmxll)	1	**
8	AY134752PI	EST	A	(lmxll)	1	****
9			B	(nnxnp)	1	***
10	AY771992PI	EST	-	(lmxll)	1	****
11	CB032073PI	EST	A	(nnxnp)	1	-
12			B	(hkxhk)	1	-
13			C	(lmxll)	1	-
14	CB032210PI	EST	-	(lmxll)	1	-
15	CB032380PI	EST	-	(lmxll)	1	**
16	CB032425PI	EST	-	(lmxll)	1	-
17	CB032610PI	EST	-	(abxcd)	3	-
18	CB032915PI	EST	A	(lmxll)	1	*****
19			B	(nnxnp)	1	*****
20			C	(nnxnp)	1	-
21	CB033161-1PI	EST	-	(nnxnp)	1	-
22	CB034027PI	EST	-	(lmxll)	1	-
23	DQ198170PI	EST	-	(lmxll)	1	-
24	CB032617PS	EST	-	(lmxll)	1	-
25	ORCA2	SSR	-	(abxcd)	3	**
26	ORCA3	SSR	A	(hkxhk)	1	-
27			B	(nnxnp)	1	-

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

No of loci	Primer	Type	Loci	Segregation type	df	Sig.
28	ORCA4	SSR	A	(lmxll)	1	-
29			B	(lmxll)	1	***
30	ORCA9	SSR	-	(lmxll)	1	-
31	ORCA10	SSR	A	(lmxll)	1	****
32			B	(nnxnp)	1	-
33			C	(hkxhk)	1	-
34	ORCA11	SSR	-	(abxcd)	3	-
35	ORCA12	SSR	A	(lmxll)	1	**
36			B	(hkxhk)	1	-
37	ORCA15	SSR	-	(abxcd)	3	****
38	ORCA18	SSR	-	(lmxll)	1	-
39	ORCA21	SSR	-	(lmxll)	1	-
40	ORCA23	SSR	-	(abxcd)	3	-
41	ORCA39	SSR	-	(abxcd)	3	-
42	ORCA40	SSR	-	(abxcd)	3	-
43	ORCA50	SSR	-	(abxcd)	3	*
44	ORCA63	SSR	-	(abxcd)	3	*
45	ORCA66	SSR	-	(nnxnp)	1	-
46	ORCA67	SSR	A	(lmxll)	1	-
47			B	(nnxnp)	1	-
48	ORCA72	SSR	A	(hkxhk)	1	-
49			B	(lmxll)	1	-
50			C	(nnxnp)	1	-
51	ORCA79	SSR	-	(abxcd)	3	**
52	ORCA88	SSR	A	(lmxll)	1	*
53			B	(lmxll)	1	**
54			C	(lmxll)	1	**
55	ORCA105	SSR	A	(nnxnp)	1	-
56			B	(hkxhk)	1	-

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

No of Loci	Primer	Type	Loci	Segregation type	df	Sig.
57	ORCA118	SSR	A	(lmxll)	1	*****
58			B	(nnxnp)	1	*****
59	ORCA122	SSR	-	(lmxll)	1	-
60	ORCA124	SSR	-	(lmxll)	1	-
61	ORCA129	SSR	-	(abxcd)	3	-
62	ORCA136	SSR	-	(lmxll)	1	*
63	ORCA145	SSR	-	(lmxll)	1	-
64	ORCA147	SSR	-	(abxcd)	3	**
65	ORCA163	SSR	-	(nnxnp)	1	**
66	ORCA165	SSR	A	(hkxhk)	1	-
67			B	(nnxnp)	1	**
68	ORCA172	SSR	-	(abxcd)	3	*****
69	ORCA182	SSR	A	(nnxnp)	1	-
70			B	(lmxll)	1	-
71	ORCA187N	SSR	A	(hkxhk)	1	*
72			B	(lmxll)	1	-
73	ORCA190	SSR	-	(abxcd)	3	**
74	ORCA206	SSR	-	(lmxll)	1	-
75	ORCA214N	SSR	A	(nnxnp)	1	-
76			B	(hkxhk)	1	*
77	ORCA217	SSR	-	(lmxll)	1	-
78	ORCG71	SSR	-	(lmxll)	1	-
79	ORCT1	SSR	A	(nnxnp)	1	-
80			B	(lmxll)	1	**
81	ORCT2	SSR	-	(lmxll)	1	**
82	ORCT6	SSR	-	(lmxll)	1	-
83	ORCT8	SSR	-	(efxeg)	3	-
84	ORCT14	SSR	-	(abxcd)	3	*****
85	ORCT15N	SSR	-	(lmxll)	1	*

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

No of loci	Primer	Type	Loci	Segregation type	df	Sig.
86	ORCT21N	SSR	-	(lmxl1)	1	-
87	ORCT25	SSR	-	(lmxl1)	1	***
88	ORCT28	SSR	-	(abxcd)	3	*
89	ORCT28N	SSR	-	(efxeg)	3	-
90	ORCT33	SSR	-	(abxcd)	3	-
91	ORCT40	SSR	-	(abxcd)	3	*****
92	ORCT48N	SSR	-	(lmxl1)	1	-
93	ORCT52	SSR	-	(lmxl1)	1	**
94	ORCT58	SSR	-	(abxcd)	3	***
95	ORCT59	SSR	-	(lmxl1)	1	-
96	ORCT61	SSR	-	(abxcd)	3	**
97	ORCT69	SSR	-	(lmxl1)	1	-
98	ORCT72	SSR	-	(nnxnp)	1	-
99	ORCT75	SSR	-	(lmxl1)	1	-
100	ORCT93	SSR	-	(abxcd)	3	**
101	ORCT99	SSR	-	(lmxl1)	1	-
102	ORCT124N	SSR	-	(abxcd)	3	**
103	ORCT126	SSR	-	(lmxl1)	1	**
104	ORCT127	SSR	-	(abxcd)	3	-
105	ORCT131	SSR	-	(abxcd)	3	-
106	ORCT138	SSR	-	(abxcd)	3	-
107	ORCT151	SSR	-	(lmxl1)	1	**
108	ORCT152N	SSR	-	(lmxl1)	1	**
109	ORCT160	SSR	A	(abxcd)	3	-
110			B	(hkxhk)	1	-
111			C	(nnxnp)	1	-
112	ORCT168	SSR	-	(abxcd)	3	**
113	ORCT169	SSR	-	(lmxl1)	1	-
114	ORCT172	SSR	-	(lmxl1)	1	*****

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

No of loci	Primer	Type	Loci	Segregation type	df	Sig.
115	ORCT177	SSR	-	(lmxll)	1	-
116	ORCT194	SSR	-	(abxcd)	3	-
117	ORCT198	SSR	-	(abxcd)	3	-
118	ORCT200	SSR	-	(lmxll)	1	-
119	ORCT201N	SSR	-	(abxcd)	3	**
120	ORCT202N	SSR	-	(nnxnp)	1	*
121	ORCT203	SSR	-	(abxcd)	3	-
122	ORCT203N	SSR	-	(abxcd)	3	****
123	ORCT206N	SSR	-	(lmxll)	1	*****
124	ORCT212N	SSR	A	(nnxnp)	1	-
125			B	(lmxll)	1	-
126	ORCT213	SSR	-	(lmxll)	1	*
127	ORCT213N	SSR	-	(lmxll)	1	*
128	OA07	SSR	-	(abxcd)	3	*****
129	OA12	SSR	-	(abxcd)	3	-
130	OA15	SSR	-	(abxcd)	3	**
131	OA18	SSR	-	(abxcd)	3	-
132	OA19	SSR	-	(abxcd)	3	-
133	OA20	SSR	-	(abxcd)	3	-
134	OA25	SSR	-	(lmxll)	1	***

หมายเหตุ Sig. = Significant

* = Probability<0.05

**=Probability<0.01

***=Probability<0.005

****=Probability<0.001

*****=Probability<0.0005

*****=Probability<0.0001

*****=Probability<0.00005

ตารางผนวกที่ 3 ลำดับเบสของดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้ในการสร้างแผนที่โครโมโซม

Number	Marker	Primer sequence (3'-5')	Reference
1	AF038840-1DI	F: GAGAACTGGGGATTCTTCGAG R: TGGGAGATTCCGTGGTTCAG	A
2	HA642879DI	F: AAGGCTCACACCAACAAAGG R: TGCCGTCCTCCCTTGTAAC	A
3	U64031DI	F: GTTTCAGGACTATCATGGCCTC R: GATGAAGGTGAGGAGCTCGT	A
4	GQ250049DS	F: CGACTGTGGATGTTTCAGTTGT R: CTGTCACCCAAGAAATCAGTTG	A
5	GU138671DS	F: CTTGTCCCGACTCCTTATTACC R: TTTGTGGAAGAGAAGACACAGC	A
6	AY134752PI	F: CTCTCTTTATGCCAGTGGTCG R: ATTGGGACAGTATGGCTGACAC	A
7	AY771992PI	F: GATGCTGGAGAAATACCAGCAG R: GTTAAGAGAGTTCAGATCCTCCC	A
8	CB032073PI	F: GCTATGAATGCAGCCGAAAT R: AATGTTGCTGGAAAGCCAGT	A
9	CB032210PI	F: GGAGCAACAAATAGGCCAAA R: GTTGAGCACCTCAGCATCAA	A
10	CB032380PI	F: GCCGTCACACCTCTTGATCT R: CCCAGCAATGTCCGAATAAT	A
11	CB032425PI	F: ACAAGACCACTTCGAGAACTCC R: AGGGTGTTAGCAATTAGGCAGA	A
12	CB032610PI	F: ATATGGGAGGGATGGGTTTC R: GCTTCTCCAAGCCATAAGCA	A
13	CB032915PI	F: CGCCTTTGGAGATTTGTGT GCATATCAGGGGAACCTTGA	A
14	CB033161-1PI	F: ATCTTCGTCAAACCCTAACG R: AACGAGGTGAAGCGTCGAT	A

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

Number	Marker	Primer sequence (3'-5')	Reference
15	CB034027PI	F: TCTTCCTCTCCCAAACCAATAA R: AGTGGAGCAGTAGCCCTGTAAG	A
16	DQ198170PI	F: ATGGCAGGGAGTGGGTCTTT R: ACAGAATCGGGGATGACATTG	A
17	CB032617PS	F: GAGAGCAGGGATTAGGTGATG R: CAACAGATACAAATGCAGGGAA	A
18	ORCA2	F: TTTTGGGACCTAATGATGGA R: AAATGGGAATGGGTGAGTGA	B
19	ORCA3	F: GAAGGTAAGTGGTCAAAAATG R: GGTAGGTTGTAATGTTGCGA	B
20	ORCA4	F: TTGATCCTCAAATCGCAAAG R: TAGGCACCATGAGCAGATGA	B
21	ORCA9	F: ACCAACCACCTGAACTGGAC R: GTCTTCAATCCTCCATTGGC	B
22	ORCA10	F: GGGAAATGTGAAGGTCTGCA R: GCACCCTCACACGTAAAC	B
23	ORCA11	F: GGATGGTCGAGTGGTGAAG R: AGCGCTGAGGCCGCCGGTGGAG	B
24	ORCA12	F: TGTACATCCTTGCCATCGAC R: CCTTGA ACTCTGTCAAGCCC	B
25	ORCA15	F: AGCATAGCCCATACTCTCTCT R: TGAAATGGTATCAGGAGACTT	A
26	ORCA18	F: TGCATGTGTCTCGATTAGGG R: CCCGGGTAAACTAGGACTGA	A
27	ORCA21	F: TGGGCAAAGTAAGGGCTA R: CGTTGGAGCTCGTCGA	A
28	ORCA23	F: CCACTCTAACTCCACTTCACA R: GCATGTTTGCTCCTAGC	A

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

Number	Marker	Primer sequence (3'-5')	Reference
29	ORCA39	F: TCCTCTTTGGAACAGCCACT R: AGGCATTTTGAAGAGGCAAC	B
30	ORCA40	F: CAAGCTACTTCAGACTCATC R: GAAGACACTGCTCATATTTTC	B
31	ORCA50	F: GCTAGGGCATCTGAGCAATC R: TGCTCATCTCTCTGCTCACG	B
32	ORCA63	F: TCTTGTAATTCAAAGCGGGC R: GGCAAAGATCCATCACCAAC	B
33	ORCA66	F: CCCTAAAACCCAAAATAATCCA R: TCGCAAATCGGGTATCAAAT	A
34	ORCA67	F: GTGTGATTAGGGTCCTCTACC R: AACCTAGTGGACCTTAGCAAT	A
35	ORCA72	F: GCAACTCTTTATGTGCACGAGT R: GCACATGCAACACAAACAAA	A
36	ORCA79	F: AACATCTCACCAGAATCATTG R: CCTAATTCGGATACACTGCTA	A
37	ORCA88	F: CTAACAAGAATGAAGCAGCTCT R: TGTTACTGATGGATTACCCTAC	B
38	ORCA105	F: ATTCAGAAGGCACTGGGAAA R: TGCACATGCACACGTTACAC	A
39	ORCA118	F: TGATTTTAGGGCATCATAGTG R: TGCATAGTTGAGAAGATGGAT	A
40	ORCA122	F: TTGTTAGACTCGGATGACTGCT R: TAGATCAGCTTCAGCTCATGCT	B
41	ORCA124	F: TAAAATGTGCGTATACGTGAG R: CTATTGCCCATGCTTAGATAC	A
42	ORCA129	F: CTTTCCAATTCCTTCCATTAT R: ATCTGTTCCAGGGTTTCAG	A

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

Number	Marker	Primer sequence (3'-5')	Reference
43	ORCA136	F: AAGAGGAAGAAAAATGACTCC R: CATCCATTTCATCCAAAAC	A
44	ORCA145	F: GCTTTGCTAGGTTGAGATGTA R: TGTCCGTATGATACCTGACTT	A
45	ORCA147	F: AGCTGGTTTCAGAGAGAGAAG R: ATCGAGTGTACTGCTCATTG	A
46	ORCA163	F: TGATTTTAGGGCATCATAGTG R: TGCATAGTTGAGAAGATGGAT	A
47	ORCA165	F: GAAGGAGAACCTTGTGTGCAAC R: TGTCATATGTGTTGGCTTGCT	B
48	ORCA172	F: TAATCCTTGAACCCCTCCT R: GCCACCTAGTAAGTGCCAT	B
49	ORCA182	F: TACACACACACACACACAC R: TCCCATTGAGAACTAAAAACC	A
50	ORCA187N	F: CTGCAACATAAAATTCACCAT R: CTTGTGTTCAAGATGGTCTCT	A
51	ORCA190	F: CGACTACTGCTAGAAATCTGAA R: GCCCATTCACCTTTTACTCTCT	A
52	ORCA206	F: TGCTGGAGCAGGTCAGTCT R: CGGCAAGACCTAGCATCAC	B
53	ORCA214N	F: CCATGAAGAAAGGCATTTGAA R: AAGGGATGCATCATCCACAC	A
54	ORCA217	F: CCAACTGCCTAGCTCTCGT R: TCATCCATAGCTACGCATGGT	B
55	ORCG71	F: GATTTCTCTGCCAAGTCTCA R: AATCTCCCTTTCTCTCCCTA	A
56	ORCT1	F: GCCAGAGTGCTTTTCTGGTC R: CAAATTTTGGAGCCCACAG	A

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

Number	Marker	Primer sequence (3'-5')	Reference
57	ORCT2	F: CCTAGCGGTACTAGGCACCA R: CCTCCTAGTTGTTATCCCAC	B
58	ORCT6	F: CTCCTGCTTGGATTTGCTTC R: CACCTCATCACATCTTGCCAT	B
59	ORCT8	F: GAGGTGGGGATGAGGAATAGA R: ATCTAGCCACCAGTGCTGCCA	B
60	ORCT14	F: GTCAACCTGAAAAGTACAAG R: TTTTGGCATCCTCTATACTCA	A
61	ORCT15N	F: AAGCTTGCGCGTTTGAGTGTG R: TGCTCACTAGCTCCATAATTT	A
62	ORCT21N	F: GATTTTGCTTTATGTGCAGAC R: CCCTCTCTTTTGTTCAGTT	A
63	ORCT25	F: GTCAACTTCACAATAAGA R: CAGCTAGCAAGTCTATTT	B
64	ORCT28	F: TATTCAAAGCCTGCCATGTG R: GCTTGTCGTGTGGAGTCAAA	B
65	ORCT28N	F: ACACGACAAGCAAAGAGTTAC R: AAGAAGGAGATGAAGACCAAC	A
66	ORCT33	F: TGCATCTGGGAATGTGAGAG R: ACCCATTCCTATGATGGAA	B
67	ORCT40	F: GGCTCTGGAGATAACTAGGTTTC R: CGTTCTCCAGCTCTTCCTCT	B
68	ORCT48N	F: TTACGACGGAATATTTATTGG R: CTCTTTTATGTCAGAGCATCC	A
69	ORCT52	F: GGCAACCCCATCTATAGCAA R: ATGGCTATCGACTCCTCGAA	B
70	ORCT58	F: ATGGAGAGGGATGAAGAGTGT R: ATCCCATTACCTTTGGAGTCTC	B

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

Number	Marker	Primer sequence (3'-5')	Reference
71	ORCT59	F: TGGAAGTTTCGGCATTACAC R: GTAGGGTAATAGTAGCCTACCT	B
72	ORCT61	F: AGAGAGAGAAAAAGAGCATGG R: AAGGCAGAGCATCATAACAATA	A
73	ORCT69	F: AAGAGGAAGGATCTACTC R: ATAATGTGGCTTAGTCAG	B
74	ORCT72	F: GCTTCACCAACTCCGAGAC R: GGCCATGCTTTCCTTCACTA	B
75	ORCT75	F: ATGAGCCAGCGTATGTGTTG R: CCTCCACCTTAGGGCATGT	B
76	ORCT93	F: GTGCAGCATTGGTGAGAGAA R: TCAATTGACAGCAAAGCCTG	B
77	ORCT99	F: TTGGAGGGTGGGTTCTCTCT R: GCTCCTTGCTTGCCCTCT	B
78	ORCT124N	F: AAGTTGTGAGAAAGTGGTTTG R: GCCATAGCTTGGAATAAGA	A
79	ORCT126	F: GAAGAGAAGTGAAAGAGTGT R: TATCTATTGCTTATGGGCTGTC	B
80	ORCT127	F: TCTACTGTGTTTCTCATCCATC R: GTAGGCAGAAAATGAGAAGTTC	B
81	ORCT131	F: GATGGATCTCTTGAAAGGGT R: CTAACCACTCATTCTGCTCC	B
82	ORCT138	F: TGAAGCCAGATAGGACAGGAGT R: GCATTTACTTGGCATGTGCACT	B
83	ORCT151	F: CAGACCTAAAATTTCCCAAATG R: TCTCGAGATCGCTTCTCAGG	A
84	ORCT152N	F: CAAACAAATGAAAAACAGTGG R: TACCGGAAAGGGTATGCTA	A

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

Number	Marker	Primer sequence (3'-5')	Reference
85	ORCT160	F: GGTGGCTCTCTTGCTGGTAT R: TTCTCTCTCCTCCGCTTTGA	A
86	ORCT168	F: GATGTAGAGTTTGAGGGAGAGT R: GCTATCTTAGTCATCGACCAAC	B
87	ORCT169	F: CTATCCACTTGGACCAATCCTT R: AGAGGAAGGAGGTAATCTTGCT	B
88	ORCT172	F: AAAGGGAGAGAAAATGCAAGG R: GAGGCATCGATGACACCAAC	A
89	ORCT177	F: GAGAAAGGCAAAGGGAGAGAGT R: CCACCACACCACTATCATCAAC	B
90	ORCT194	F: GATGCCCAATTTGAGCACAGT R: TCACACTCCAGATGAACAGTCT	B
91	ORCT198	F: CGAGTCATTCCTTGCTGGAAC R: TATGCAGCTCAAGTCTGACTTC	B
92	ORCT200	F: TCCCATCTTTCCTTTATTTT R: AACCTTGTTCTCTCTCTTTCC	A
93	ORCT201N	F: GTAAAATCCAATCTTCCCACT R: ACAGCCATCTCTTTACATCTG	A
94	ORCT202N	F: TTCAGCTCTCTTCTCAGGTAA R: CGGAACAACAAATCAGTAAGA	A
95	ORCT203	F: GATGCCCAATTTGAGCACAGT R: CTCACACTCCAGATGAACAGT	B
96	ORCT203N	F: TCTTTCTCTGTTTCTTTCTGG R: ACACTCCAGATGAACAGTCTC	A
97	ORCT206N	F: GTTTGTGTGTTTGTGGCTTAG R: GATTTTTCTCTCTCCCCACTA	A
98	ORCT212N	F: GAGAGCTTTGGAGAGAGAGAG R: ACACAACCCATTACTTTTTCA	A

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

Number	Marker	Primer sequence (3'-5')	Reference
99	ORCT213	F:GAATAGGAGAAGGAGAAGCAGT R:TTCTTCATTCTCCATCCACAGT	B
100	ORCT213N	F: AAATGTTCTTCAGGTTTCCTTC R: GAGATTCTTCATTCTCCATCC	A
101	OA07	F: CCTATCCGAGGAGAACCATAA R: AAGCTTTGAGATTCTTTGTGACT	C
102	OA12	F: GCATTCTTTGCCTAATTCAGGAA R: TCCACCCTTTCATCCAAATACTTC	C
103	OA15	F: ACAGCGTTAACATAAACCATAAGC R: CTGCCCCGAGATTCAGC	C
104	OA18	F: GGAACGGAGAAGATTAAGACAACC R: TGCCCTCACATGCCGTATT	C
105	OA19	F: TAAGGCAAACCTTGAGTGCTTTATT R: CTTGTGATTTCTTTGCCTTTCTT	C
106	OA20	F: CATATATTAGCCACTTCACTCTC R: ATGTCCACCTCCCTAAAATAGTA	C
107	OA25	F: GGAAGGGCCTAAGTGGATG R: GCGTACCATGCTTAACATTCA	C

หมายเหตุ F = Forward primer

R = Reverse primer

A = จุลภาคและคณะ (ผลงานไม่ได้ตีพิมพ์)

B = ทิพย์วัลย์และคณะ 2546

C = Yue *et al.* 2006

ตารางผนวกที่ 4 คีเอ็นเอเครื่องหมายที่ออกแบบจากอีเอสทีและยีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้อง

primer	Genbank Accession No.	Expected gene
AF038841-1DI	AF038840	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase
HA642879DI	HA642879	MYB
U64031DI	U64031	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase
GQ250049DS	GQ250049	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GU138671DS	GU138671	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase
AY134752PI	AY134752	Actin (PACT4)
AY771992PI	AY771992	MADS box transcription factor
CB032073PI	CB032073	Ribosylation factor
CB032210PI	CB032210	Cell division cycle protein
CB032380PI	CB032380	Phosphate transporter
CB032425PI	CB032425	Phosphatase
CB032610PI	CB032610	GDP
CB032915PI	CB032915	Phosphatase
CB033161-1PI	CB033161	Ubiquitin
CB034027PI	CB034027	Unknown
DQ198170PI	DQ198170	Indole-3 acetic acid (IAA) hydrolase
CB032617PS	CB032617	Unknown

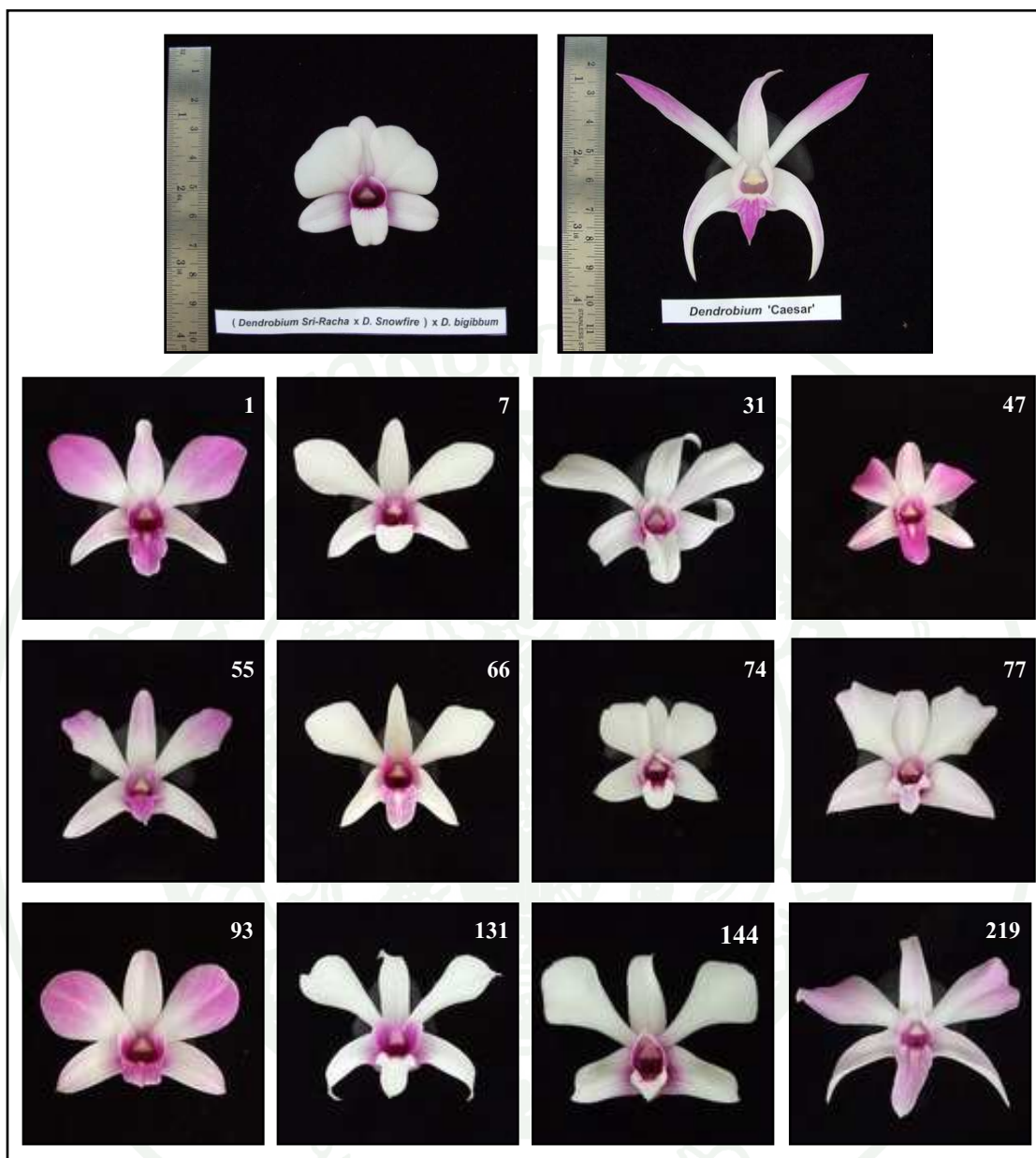
ที่มา: GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> วันที่ 6/4/2554)

ตารางผนวกที่ 5 แสดงค่า similarity ของประชากรถูกผสม C2CP โดยใช้โปรแกรม JoinMap
คำสั่ง similarity of individual

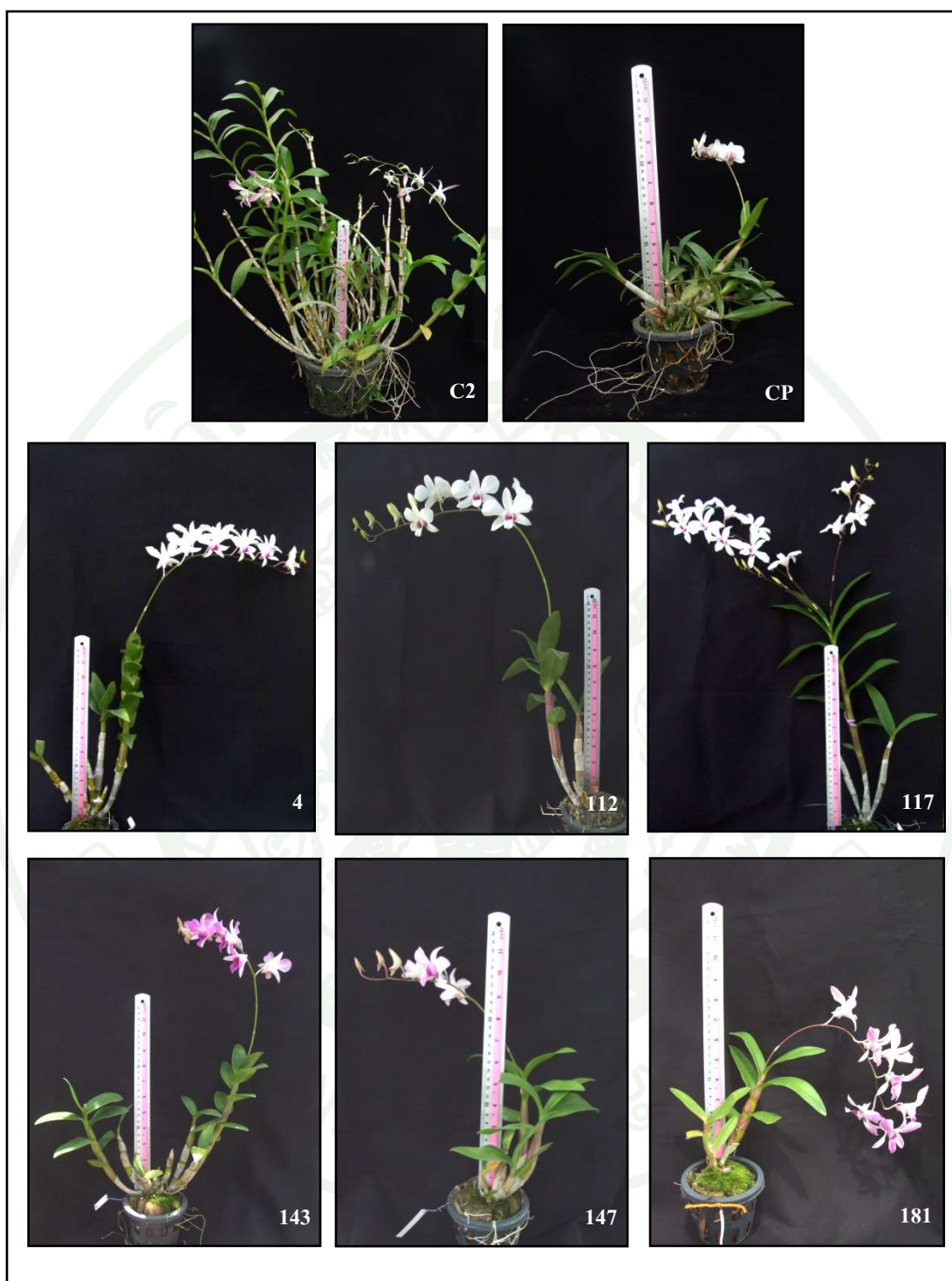
Number	Individual1	Individual2	Similarity
1	10	54	0.985
2	14	118	0.955
3	14	137	0.963
4	14	195	0.978
5	14	196	0.97
6	14	200	0.978
7	29	36	0.97
8	29	42	0.97
9	29	44	0.978
10	30	39	0.978
11	31	106	0.985
12	36	42	1
13	36	44	0.993
14	42	44	0.993
15	43	50	0.97
16	55	114	0.97
17	60	86	0.993
18	61	79	0.993
19	61	210	0.993
20	73	108	0.97
21	79	210	0.985
22	87	192	0.955
23	93	94	0.985
24	103	147	0.963
25	118	137	0.963
26	118	195	0.978
27	118	196	0.97
28	118	200	0.978

ตารางผนวกที่ 5 (ต่อ)

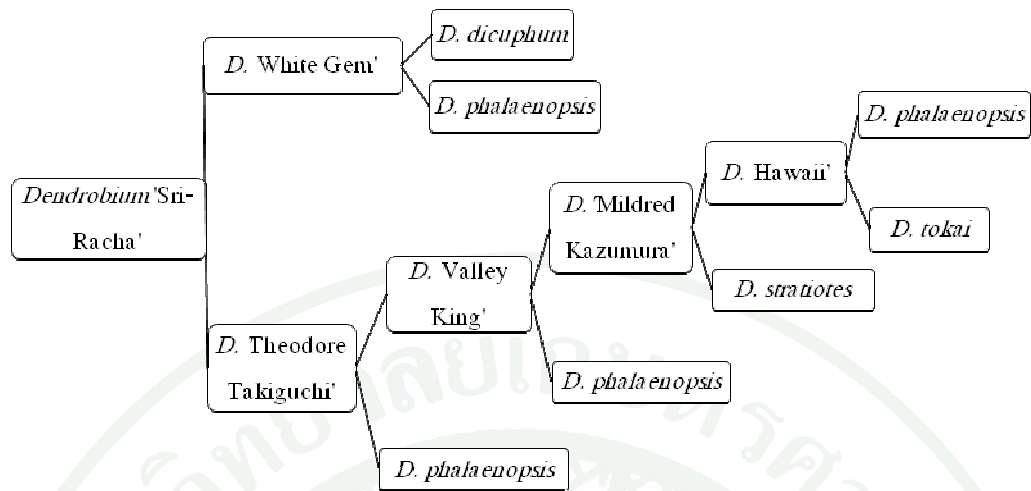
Number	Individual1	Individual2	Similarity
29	134	135	0.978
30	137	195	0.985
31	137	196	0.978
32	137	200	0.97
33	140	185	0.955
34	170	189	0.97
35	195	196	0.993
36	195	200	0.985
37	196	200	0.978
38	203	219	0.955
39	206	222	0.985



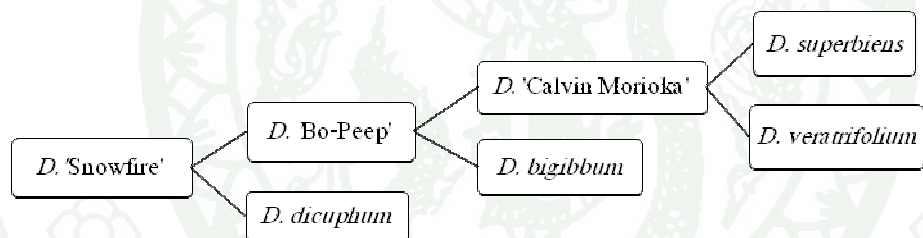
ภาพผนวกที่ 1 ลักษณะดอกของ *Dendrobium* 'Caesar' (2N) (C2) หวายแกระ (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* (CP) และประชากรกล้วยไม้ลูกผสม (C2CP) บางต้น



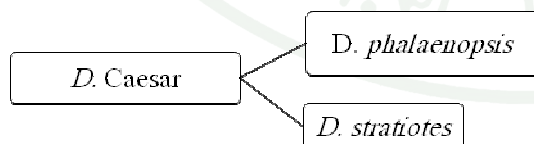
ภาพผนวกที่ 2 ลักษณะช่อดอกของ *Dendrobium* 'Caesar' (2N) (C2) (*Dendrobium* 'Sri-Racha' x *D.* 'Snowfire') x *D. bigibbum* (CP) และประชากรกล้วยไม้ลูกผสม (C2CP) บางต้น



ภาพผนวกที่ 3 ประวัติพันธุ์ *Dendrobium* 'Sri-Racha'



ภาพผนวกที่ 4 ประวัติพันธุ์ *Dendrobium* 'Snowfire'



ภาพผนวกที่ 5 ประวัติพันธุ์ *Dendrobium* 'Caesar' (2N)

ที่มา: Wildcatt Orchids Database (2002)

ตารางผนวกที่ 6 ข้อมูลลักษณะทางฟีโนไทป์ในประชากรลูกผสม *Dendrobium* ‘Caesar’ กับ (*Dendrobium* ‘Sri-Racha’ x *D.* ‘Snowfire’) x *D.* *bigibbum*

ต้นที่	ใบ	ลำลูกกล้วย		ก้านช่อดอก			ดอก	กลีบดอก			ปากดอก		กลีบเลี้ยงบน		กลีบเลี้ยงซ้าย				
	กxยxn	ย	ส	ย1	ย2	สี	กxย	ก	ย	สี	ก	ย	สีใน	สีนอก	ก	ย	ก	ย	สี
C2	3.5x11.9x0.08	30.3	3.2	17.9	29.2	ช	7.2x6.8	1.2	5.5	W+N80B	1.4	4.2	N81B	N80A	1	4.1	1.3	4.1	W+N80C
CP	2x10.4x0.05	8.2	3.3	10.3	5.6	ช>ม	4.5x3.9	2.2	2.8	W	0.95	2.4	W+N81A	W	1.1	2.3	1.1	2.3	W+N81A
1	2.9x8.3x0.08	16.9	4.5	20.5	11.2	ม	6.2x5.1	2.1	4	N80A	1.2	3.2	N81A	N81A	1.2	3.2	1.25	3.5	W+N80A
2	2.4x10.8x0.09	13.3	5	14.6	16.9	ช	6.2x5.1	2	4.3	W	1.1	3.6	N81A	W	0.95	3.3	1.2	3.3	W
3	2.6x10.9x0.08	14	-	17.5	9.9	ม>ช	6.2x5.2	2.4	3.9	N81B	1.6	3.5	N81A	N81B	1.2	3.1	1.3	3.3	N81B
4	3.3x11.2x0.09	14.3	4.7	9.1	12.7	ม>ช	6.8x5	1.7	4.3	W+N85D	1.05	3.5	N81A	W+N55D	0.95	3.4	1.1	3.3	W+N85D
5	2.3x8.1x0.13	7.6	5.1	14.1	16.6	ม>ช	6.8x4.6	2	1.3	W	1.15	3.3	N81A	W	1.05	3.3	1.2	3.6	W
7	2.3x9.6x0.05	12.2	3.8	12	11.5	ช	7.1x5.2	2.1	4.4	W	1.4	3.8	N81A	W	1.1	3.4	1.3	3.4	N85A
8	3.2x1.4x0.09	15.3	3.3	13.7	11	ช	7.1x5.3	1.5	4.2	W	1.1	3.4	N80A	N81B	0.9	3.3	1	3.4	N76D
9	3.4x9.2x0.08	17.8	4.5	13.5	19	มช	5x4.7	2.05	3.3	W+N85D	1.1	3	N81A	W+N85D	1.05	2.7	1.2	2.7	W+N85D
10	2.5x9.4x0.08	13.8	4.5	14.2	10.7	ช>ม	5.8x4.8	1.3	3.6	W+145B	1.1	3	N81A	W	1	2.9	1.2	3	W+145B
11	2.2x8.5x0.09	8.8	3.8	7.2	7.2	ม	5.7x4.8	1.3	3.2	N81B	0.9	3	N81B	N81B	1.1	3.6	1.2	3.1	N81C

หมายเหตุ ก = ความกว้าง ย = ความยาว น = ความหนา ย1 = วัดจากโคนก้านถึงดอกแรก ย2 = วัดจากดอกแรกถึงดอกสุดท้าย ม = สีม่วง ช = สีเขียว มช = ม่วงเข้ม มค = ม่วงแดง หน่วย = เซนติเมตร

เทียบสีจาก color chart : The Royal Horticultural Society

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

ต้นที่	ใบ	ลำลูกกล้วย		ก้านช่อดอก			ดอก	กลีบดอก			ปากดอก		กลีบเลี้ยงบน		กลีบเลี้ยงซ้าย				
	กxยxn	ข	ส	ย1	ย2	สี	กxย	ก	ข	สี	ก	ข	สีใน	สีนอก	ก	ข	ก	ข	สี
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W+N81B	-	-	N81A	N81B	-	-	-	-	N81B
16	2.6x7.5x0.1	8.5	3.7	-	-	-	5.5x4.1	1.9	3.5	W	1.2	3.1	N81A	W	1.1	2.7	1.2	2.8	W+N80A
19	2.5x11.3x0.08	14.2	4.5	14	10.3	ข	6.1x5.4	2	3.8	N84A	1.2	3.1	N81A	N84A	1	3.5	1.2	3.3	N84A
21	3.7x12x0.08	12.5	5.2	9.6	14.3	ข	6.3x5	2.1	4.1	W	1.2	3.2	N81A	W	1.3	3.4	1.5	3.5	W
23	2.5x9.4x0.1	11.6	4.7	10.2	9.6	ข>ม	5.1x4.6	2	3.5	W	1.5	3.1	N81A	W	1	2.2	1.1	3	W
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N81B	-	-	N81A	N81B	-	-	-	-	N81D
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	N81A	W	-	-	-	-	W
29	1.7x10.3x0.08	8	4	7	6.4	ข	4.7x4.8	1.9	3.3	W	1	3.1	N81B	W	0.9	3	1.2	3	W
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	86D	-	-	N81A	W	-	-	-	-	86D
32	2.9x8.6x0.09	12.3	4.3	10.5	12.5	ม	5.8x4.8	2.3	4	N80D	1.2	3.2	N81A	N80A	1	3.1	1.2	3.5	N80B
33	2.8x11.5x0.09	8.4	4.7	13.4	9.9	มข	7.6x6.4	1.9	4.2	N80B	1.4	3.8	N81A	N81B	1.2	4	1.4	4	N80B
34	2.7x10.8x0.08	37.5	4.3	12	24.9	ข>ม	5.8x4.1	1.7	3.2	N82A	1	2.8	N81A	N82A	1	3.1	1	3	N82A
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N81D	-	-	N81B	N81D	-	-	-	-	N81D
38	4.3x13.1x0.09	39.4	4.8	15.6	15.3	ม	7.9x6.5	2.3	4.7	N81B	1.5	3.6	N81A	N81B	1.2	3.4	1.4	3.7	N81C
40	2.9x8.8x0.05	21.3	3	11	12.8	ข>ม	5.8x5.7	2	3.9	N81B	1	3.6	N81A	N81B	1.15	3.7	1.5	3.5	N81B
41	3.4x12.8x0.08	18.8	4.8	13.1	13.7	ม	6.8x5.8	2	3.8	W	1.2	3.2	N81A	W	1	3.7	1.1	3.5	W
42	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	N81A	W	-	-	-	-	W

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

ต้นที่	ใบ	ลำลูกกล้วย		ก้านช่อดอก			ดอก	กลีบดอก			ปากดอก				กลีบเลี้ยงบน		กลีบเลี้ยงซ้าย		
	กxยxn	ย	ส	ย1	ย2	สี	กxย	ก	ย	สี	ก	ย	สีใน	สีนอก	ก	ย	ก	ย	สี
43	2.9x8.9x0.05	23.2	3.2	13.7	10.7	ข	4.9x4.8	1.2	3.7	W	1.1	3.5	N81A	W	0.9	2.8	1	2.9	W
44	2.3x8.3x0.05	15	4.1	8.5	7.5	ข	5.5x4.8	2	3.5	W	1	3.1	N81B	W	1.1	3	1.2	3	W
45	-	-	-	-	-	ข	-	-	-	N81D	1.2	3.6	N81A	N81D	1.3	3.4	1.3	3.3	N81D
46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W+N81D	-	-	N81A	W	-	-	-	-	W+N81D
49	3x8.8x0.1	10.8	4.6	9.7	10.5	มด	15.4x4.3	1.8	3.3	85D	1.1	3.1	N81A	77A	1.1	2.6	1.1	2.6	85D
50	-	-	-	-	-	ม	-	5.5	5	W	1.1	3.4	N81A	W	0.9	2.9	1.2	3	W
52	3.7x12.8x0.07	24.5	4.6	17.5	13.6	ม>ข	5.8x4.9	2.2	3.9	N80A	1	3.2	N81A	N80A	1.1	3.4	1.2	3.2	N81A
53	3.5x10.4x0.08	17.4	4.1	13.9	12.3	ม>ข	6.1x5.9	2.2	4.2	N81A	1.2	3.6	N81A	N81A	1	3.6	1.3	3.7	N81A
54	1.9x8.6x0.09	15.2	4.2	11	13.6	ข>ม	5.3x4.2	1.5	3.3	N85D	1.2	2.9	N81A	W	1	2.8	1.1	3	N85D
55	3.3x9.2x0.1	13.4	5.2	12.7	10	มข	6.1x5.1	1.7	4.5	W+N81B	1.3	3.6	N81B	N80A	1	3.5	1.2	3.7	W+N81B
58	-	-	-	-	-	มข	-	-	-	N81B	-	-	N81A	N81B	-	-	-	-	N81B
59	2.5x10.2x0.08	10.6	3.5	9	12.7	มข	6.2x5.9	1.9	4.7	W	1.4	3.4	N81A	N80C	1.1	3.1	1.3	3.1	W+N80A
60	2.2x10.6x0.08	10.3	3.5	15.2	9.5	ข>ม	5.7x5.2	1.6	3.5	-	0.8	3.2	-	-	1	3	1.1	3.2	-
61	-	-	-	-	-	ม>ข	5.4x6	2.4	4.2	W	1.4	3.6	N81A	W	1.1	3.4	1.3	3.5	W+N80A
63	2.8x8.7x0.9	9.2	5.2	6.7	9.3	ข	5x4.2	1.6	3.3	N76D	1.3	3.7	N81A	N76D	0.9	2.3	1.1	2.6	N76D
65	2.7x9.7x0.08	14.3	4.2	8.5	11.7	ข>ม	5.1x4.8	2	4.1	N80C	1.4	3.5	N80A	N80C	1.1	3.4	1.2	3.5	N80C
66	2.8x9.8x0.08	20.2	4.7	9	17.4	ข	6x4.8	1.9	4	W	1.2	3.5	N81A	N81A	1	3	1.1	3.4	W

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

ต้นที่	ใบ	ลำลูกกล้วย			ก้านช่อดอก		ดอก	กลีบดอก			ปากดอก		กลีบเลี้ยงบน		กลีบเลี้ยงซ้าย				
	กxยxn	ย	ส	ย1	ย2	สี	กxย	ก	ย	สี	ก	ย	สีใน	สีนอก	ก	ย	ก	ย	สี
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N81B	-	-	N81A	N81A	-	-	-	-	N81C
68	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N81B	-	-	N80A	N81A	-	-	-	-	
69	2.7x12.4x0.08	24.3	3	15.2	13.1	ข	5x4.5	1.8	3	N81B	1	2.8	N81A	N81A	1.1	2.7	1.5	2.9	N81C
72	2.4x8.6x0.1	10.2	4.4	5.9	6.2	ม>ข	5.5x4.7	1.8	3.7	N81C	1.1	3	N81A	N81B	1	3.2	1.2	3.1	N81D
73	2.1x12.4x0.07	16.2	4.5	10.4	9.3	ข>ม	7.9x6.2	1.6	5	145D	0.9	3.5	N81A	145D	1	4	1.2	3.7	145D
74	-	-	-	-	-	ข=ม	-	-	-	W	-	-	N81A	W	-	-	-	-	W
75	3.4x12.1x0.08	22.2	5.8	20.7	16.5	มข	6.5x5.5	2.7	4	N81C	1.3	3.3	N81A	N81B	1.3	3.8	1.4	3.8	N81C
77	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W+N81C	-	-	N81A	W	-	-	-	-	W+N81C
78	3.7x9x0.07	25.4	4	14.6	18.1	ข	5.2x4.9	2	3.8	76C	1.3	3.4	N81A	76C	1.1	3.1	1.2	3.2	76C
80	2.4x10.6x0.08	11.8	4	-	-	-	6.2x4.9	1.6	3.5	W	0.9	3.3	N81A	W	0.9	3.1	1	3.2	W
81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	N80A	W	-	-	-	-	W
83	2.1x7x0.09	14.2	3.8	12.9	10.8	มข=ข	5.7x5.2	2.1	3.6	W+77B	1.1	3.5	N81A	W	1.15	3.1	1.3	3.1	W+N80A
84	-	-	-	-	-	ข>ม	4.8x3.6	1.8	3	W	1.1	2.8	N80A	W	1	2.7	1	2.8	W+N81C
85	3.05x10.4x0.07	31.5	4.6	15	25.9	ข	6.3x5.6	1.9	4	W+N76D	1	3.7	N81A	W+N76D	1	3.5	1.2	3.6	W+N76D
87	2.7x10.8x0.08	16	5.6	15.6	10	ม	5.8x4.8	1.8	3	N80A	1	3.1	N80A	N80A	0.9	3	1.1	2.9	N80A
92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	N81A	W	-	-	-	-	W
93	2.8x12.1x0.05	24.5	6	25.5	17.6	ม	6.4x5.5	2.4	3.8	N80A	1.1	3	N81A	N80A	1.1	3.3	1.2	3.3	N81C

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

ต้นที่	ใบ	ลำลูกกล้วย			ก้านช่อดอก			ดอก	กลีบดอก			ปากดอก			กลีบเลี้ยงบน		กลีบเลี้ยงซ้าย		
	กxยxn	ย	ส	ย1	ย2	สี	กxย	ก	ย	สี	ก	ย	สีใน	สีนอก	ก	ย	ก	ย	สี
94	3x12.5x0.07	25.2	4.6	21.2	15.7	ม	6.5x5.2	2.3	3.9	N81B	1.1	3.2	N81A	N81A	1.2	3.4	1.2	3.4	N81B
99	2.5x10.1x0.08	10.8	4.3	-	-	ข=ม	5.5x5	1.6	4	W	1.4	3	N81C	W	0.9	3.2	1.2	3.2	W
100	2.8x9.8x0.08	18	4.9	16.4	9.4	มข	5.1x4.7	1.8	3.4	N81B	1	3.3	N81A	N81B	0.9	2.8	1.1	3.1	N81B
101	3.3x11.7x0.08	25.7	3.6	21	15.1	ข>ม	6x5.4	2.3	3.9	N80A	1.3	3.2	N81A	N80A	1.3	3.5	1.4	3.4	N80A
105	2.7x10.1x0.08	15	4	14.4	10.3	มข	6.7x5.5	1.9	4	W+N81B	1	3.2	N81B	N81C	1.2	3.2	1.3	3.3	W+N81C
106	2.5x12.7x0.08	13	4.5	-	-	ม>ข	9.2x6	2.1	5.4	W	1.1	3.6	N81A	W	1.1	4.3	1.3	3.3	W+N78A
108	2.2x11.9x0.07	9.3	4	10.7	10.7	ข>ม	8.2x5.6	1.6	4.8	W	0.95	3.4	N81A	W	0.9	3.7	1.2	3.5	W
109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N81B	-	-	N81A	N81B	-	-	-	-	N80B
111	3x9.8x0.09	16	5.5	9.3	13.1	ม>ข	6.3x5.1	1.7	3.8	W	1.1	3.3	N81A	W	1	3.1	1.1	3.3	W+N80A
112	2.9x9.4x0.08	10.9	5.5	13.7	11.3	ข>ม	5.9x4.7	1.9	3.2	W	1.1	3.2	N81A	W	0.9	3.1	1.1	3	W
113	2.7x11.9x0.08	19.2	5	13.7	14	มข>ข	5.8x5.1	2	3.6	N81C	1.3	3.3	N80A	N80B	1	3.3	1.2	3.4	W+N81C
114	3.4x9.8x0.08	19	5.1	13.9	14.5	มข	5.9x4.9	1.6	4.8	W+N81A	1.2	3.4	N81A	N81A	1	3.5	1.3	3.5	W+N81B
115	3.3x12.9x0.08	14.8	6.5	10.8	14.2	ข>ม	5.7x5.4	1.9	4	N81B	1.3	3.6	N81A	N81C	1	3.5	1.1	3.8	N81C
117	3.5x12x0.04	35.6	4.5	15.1	20.9	มข	7.5x5.7	2.6	4.5	N80D	1.4	3.7	N81A	N80D	1.3	3.8	1.4	4	N80D
118	2.9x7x0.11	13.2	5	-	-	ข>ม	6x5.3	2.2	3.8	N80C	1.2	3.2	N80A	N80B	1	3.5	1.2	3.5	N80C
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N85D	-	-	N81A	N81B	-	-	-	-	N85D
124	3.2x9.4x0.09	10.2	4.7	11	14.1	ข>ม	5.3x4.9	1.9	3.5	W+N81B	1.3	3.2	N81A	N80A	1.1	3	1.3	3.1	W+N80B

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

ต้นไม้	ใบ	ลำลูกกล้วย		ก้านช่อดอก			ดอก	กลีบดอก			ปากดอก			กลีบเลี้ยงบน		กลีบเลี้ยงซ้าย			
	กxยxn	ย	ส	ย1	ย2	สี	กxย	ก	ย	สี	ก	ย	สีใน	สีนอก	ก	ย	ก	ย	สี
125	3.2x10.7x0.06	17.7	6.2	7.8	10.7	ม	7x5.3	1.9	4	N81B	1	3.3	N81A	N81A	1	3.5	1.1	3.2	N85D
126	3.5x1.2x0.05	42.7	4.4	17.4	14.4	ม>ข	5.5x4.6	2.2	3.5	W	1.15	3.2	N81A	W	1.15	3	1.2	3	W
127	2.8x7.8x0.08	15	3.6	18.3	13.6	ม>ข	6.4x4.6	1.8	4	N81B	0.9	3.2	N81A	N80A	1	3.9	1.1	3.1	N81C
128	2.4x8.6x0.06	11	3.8	10.8	11.7	ม	4.9x4	1.5	3.3	N81B	0.9	2.9	N80A	N81B	0.8	2.6	1	2.8	N81C
129	2.4x10.3x0.09	12.8	2.9	14.3	8.7	ข	5.6x4.9	1.6	3.9	-	0.9	2.3	-	-	0.9	2.7	1.2	2.7	-
131	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	N81A	W	-	-	-	-	W
132	3.5x9.1x0.09	17.2	5.4	15	14.8	ม>ข	5.6x5	2.1	3.2	N81B	1.1	3	N81A	N81b	1.1	3.2	1.2	3.2	N81B
133	2.2x10.8x0.07	19.3	3.2	12.1	9.9	ข>ม	5.1x5	1.5	3	W	1	3.1	N81A	W	1	3.2	1.1	3.2	W
136	2.5x12.4x0.07	13.7	4.3	19.5	13	มข>ข	5.4x5.2	1.8	3.6	N82C	1.1	3	N81A	N82C	1	3.3	1.2	3.2	N82C
137	2.9x8.8x0.12	15.4	4.3	9.7	10.2	ข>ม	5.2x5.7	2.2	3.7	N81B	1.2	3.2	N80A	N81B	1	3.3	1.2	3.3	N81C
139	2.3x9.5x0.07	16.2	2.8	14.3	15	ข=ม	7.4x4.7	2.7	4.6	W+N80C	1.1	3.5	N81A	N80C	1.2	3.7	1.3	3.7	W+N81B
141	3.1x9.1x0.08	22.6	3.8	10.4	12.4	ม	5.9x4.9	2.1	3.5	W	1.1	3.2	N81A	W	1.1	3.1	1.3	3.2	W
142	3.7x8.7x-	12.4	4.7	12.3	9	ข>ม	5.1x4.4	1.6	3.2	N81D	1.1	3.2	N81A	N81D	1	3	1.2	3.2	N81D
143	3.9x6.9x0.09	22.8	4.5	15.9	13.4	ข	5.5x5.1	2.3	3.9	N81B	1.3	3.4	N81A	N81A	1.1	3.2	1.2	3.3	N81B
144	2.8x12.6x0.09	14.5	5.5	12	7.8	ข>ม	6x4.8	2.1	3.8	W	1	3	N81A	W	1	3.1	1.3	3.1	W
146	3.2x10.7x0.07	23.3	-	9.3	15.7	-	4.8x3.9	1.5	3.2	W	0.9	2.8	N81A	W	0.9	2.5	1	2.5	W
147	2.9x10.2x0.08	13.5	4.1	12.2	12	ข>ม	5.4x4.8	1.6	3.6	N82C	1.2	3	N81A	N81B	1.1	3.2	1.4	3.1	N82B

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

ต้นไม้	ใบ	ลำลูกกล้วย		ก้านช่อดอก			ดอก	กลีบดอก			ปากดอก				กลีบเลี้ยงบน		กลีบเลี้ยงซ้าย		
	กxยxn	ย	ส	ย1	ย2	สี	กxย	ก	ย	สี	ก	ย	สีใน	สีนอก	ก	ย	ก	ย	สี
148	2.2x10.6x0.08	15	3.6	9.4	8.6	ม	5.5x5.2	1.7	3.7	N81B	1.2	3.3	N80A	N80A	1	3.3	1.1	3.1	N81B
149	3.1x9.5x0.09	10.5	4.1	-	-	ข	6x4.9	1.8	3.6	N76C	1.3	3	N81A	N81B	1	3.3	1.3	3.1	N76C
151	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W+N85C	-	-	N81A	W+N81A	-	-	-	-	W+N85C
152	2.8x8.8x0.11	21.7	4.1	13	13.7	ข	6.6x5.9	1.6	3.9	W+N81D	1.1	3.4	N81A	W	0.9	3.5	1.1	3.4	W+N81D
153	3x8x0.08	13.2	4	8.2	12	ข	5.9x5.3	1.8	3.6	N84D	1.4	3.4	N81A	N81D	1	3.2	1.1	3.3	W
154	2.6x10.8x0.13	11.4	4.1	8.8	10	ข	6.4x5.1	1.1	3.7	W	1.1	3.5	N81A	W	0.9	3	1	2.9	W
155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N81C	-	-	N81A	N81B	-	-	-	-	N81C
158	3.1x14x0.09	25.3	3.7	22.7	15.4	ข	5.7x5.1	2.1	3.7	W	1.2	3.2	N81A	W	1.1	3.2	1.2	3.2	N81C
159	3.1x11.5x0.09	23.3	4.5	11.3	17.5	ม>ข	7.1x5.6	2	4.5	N81C	1.3	3.6	N81B	N81C	1.1	3.5	1.2	3.6	N81C
160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	W	-	-	N81A	W	-	-	-	-	W
161	3x8.9x0.08	19.2	3.7	17.5	20.6	มค	6.4x5.6	1.7	4	N80A	1	3.6	N81A	N80A	1	3.6	1.2	3.7	W+N81B
162	3.3x8x0.06	12.9	4.3	13.5	14.6	ข>ม	5.8x5.9	2.1	4.4	N81C	1.05	3.6	N81A	N81b	1.15	4	1.4	3.8	W+N81B
168	3.2x13.2x0.05	39.2	4.8	12	21.4	ม	5.8x5.2	2.1	4.4	N82A	1.4	3.5	N81A	N82A	1	4	1.1	3.6	N82A
170	2.2x10.7x0.04	17.7	4.2	9	9.8	มข	5.8x5.1	1.9	3.4	N80C	1.1	3	N81C	N81A	1.1	3.2	1.3	3.7	N80C
172	2.7x9.3x1.7	10.2	4.6	8.3	11.2	มข=ข	5.2x6	2.1	3.9	N81B	1.3	3.4	N78A	N81B	1.1	3.2	1.2	3.2	4C
173	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N81C	-	-	N81A	N81B	-	-	-	-	N81C
174	3.2x8.5x0.16	14	5.7	11	21.3	ม	7.2x6	2.5	4.3	N80B	1.3	3.8	N81A	N80A	1.2	3.5	1.2	3.7	N80D

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

ต้นที่	ใบ	ลำลูกกล้วย		ก้านช่อดอก			ดอก	กลีบดอก			ปากดอก			กลีบเลี้ยงบน		กลีบเลี้ยงซ้าย			
	กxยxn	ย	ส	ย1	ย2	สี	กxย	ก	ย	สี	ก	ย	สีใน	สีนอก	ก	ย	ก	ย	สี
175	2.5x7.2x0.08	14.2	4.5	13.5	13.7	ม>ข	6.3x5.3	2.1	3.7	N80A	1.3	3.2	N81A	N80A	1	3.4	1.1	3.1	N80B
181	2.7x10.2x0.09	12.5	5	10.8	16.3	ม	6.8x5.2	2.1	4.3	N81B	1.1	3.4	N81C	N81B	1	3.4	1.2	3.5	N81C
182	-	-	-	-	-	มข	-	-	-	N81B	-	-	N81A	N81B	-	-	-	-	N81B
183	3x11.5x0.06	22	3.4	14.1	16.5	ม=ข	5.8x4.3	1.6	3.7	N85D	1	3.2	N81A	N84D	1	3	1.3	2.9	N84D
186	2.4x10.1x0.08	14	4	11	10	ม	6.4x4.9	2	4.5	W	1	3.5	N80A	W	1.2	4	1.3	3.8	W+N80B
187	3x11x0.05	24.2	3.1	9.8	14.1	ข>ม	5.4x4.8	1.25	3.3	145+84C	1.3	3.1	N81A	145D	1	2.9	1.2	2.9	W+145D
188	3.5x10.5x0.06	20.4	4.9	12.3	13.9	ข>มข	6x5.1	1.5	3.8	W+N80A	1.2	3.1	N81A	W	1	3	1.2	3.1	W+N80A
189	2.6x11.5x0.07	20	4	14	14.1	ม>ข	6.4x5	2.1	4	N81D	1.2	3.1	N81A	N81C	1.2	3.1	1.4	3.5	N85D
190	1.7x9.5x0.09	12.4	3.6	6.9	8.7	มค	5.6x4.6	1.9	3.5	N80A	1.2	3.3	N81A	N81A	1.1	3	.2	3.2	W+N80B
191	2.3x8.8x0.08	14.3	4.3	10.8	7.7	ม>ข	5.4x5	1.7	3.5	N81B	0.9	3.2	N81A	N81B	0.9	3.2	1	3.3	N81B
192	2.8x11.3x0.07	18.1	4.1	14.5	13.3	ข>ม	4.7x3.8	1.5	3	N81B	0.9	2.9	N81A	N80A	0.85	2.5	1	2.7	W+N81D
193	3x9.5x0.08	18.5	3.6	22.6	15.1	ม	5.1x4.6	1.5	3	N81C	1	3.1	N81A	N81B	1	2.7	1.1	3.2	W
195	3.2x9.7x0.06	20.8	3.8	9.8	17	ข>ม	6.3x5.3	2.2	4.2	N80B	1.2	3.7	N81A	N80B	1	3.7	1.3	4	N80C
196	3x7.7x0.1	14.4	4.7	7.1	11.7	ข>ม	5.4x5.2	2.2	3.6	N81B	1.1	3.2	N80A	N81B	1	3.4	1.1	3.4	N81C
198	2.5x9.7x0.07	13.2	4.1	12	16	ม>ข	5.1x5.1	2	4	W	1	3.5	N81A	W	1.1	3.4	1.2	3.5	W+N80A
199	2.2x6.6x0.09	13	4.3	7.6	7.1	ข	5.5x4.4	1.1	3.2	W+77C	0.9	2.9	77A	W	1	2.7	1.1	2.8	W+77C
200	3.4x8x0.06	23.2	4	9.2	14.3	ม>ข	6.3x5.9	2.2	4.2	N82B	1.1	3.9	N81A	N81B	1	3.7	1.9	4	N82B

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

ต้นไม้	ใบ	ลำลูกกล้วย			ก้านช่อดอก			ดอก	กลีบดอก				ปากดอก		กลีบเลี้ยงบน		กลีบเลี้ยงซ้าย		
	กxยxn	ย	ส	ย1	ย2	สี	กxย	ก	ย	สี	ก	ย	สีใน	สีนอก	ก	ย	ก	ย	สี
201	3.1x9.4x0.07	9.2	5	12.6	8.6	ข>ม	6.4x5.3	2.1	4.1	W	1.3	3	N81A	W	1.1	3.3	1.2	3.1	W+N80A
202	3.1x8.6x0.08	15.8	4.8	7.2	9.3	ข>ม	6.2x5.9	2.1	4	N81B	1	3.5	N81A	N81B	1.2	4	1.3	3.7	N81B
203	2.5x7.3x0.07	6.6	3.9	9	7.3	ม>ข	6.5x5.2	2.4	4	N80B	1.2	3.9	N81A	N80A	1.2	3.5	.2	3.7	N80B
204	3.1x10.2x0.09	13.5	4.8	15.9	11	ม	6x4.8	1.6	4	W	1	3.5	N80A	W	0.9	3.2	1	3.2	W
205	3.1x8.8x0.05	15.2	3.7	10.6	10.1	ม	6.4x5	1.9	3.2	-	1	3.2	-	-	1	3	1.2	3.2	-
207	2.6x9.3x0.09	14.5	4.5	9.6	11.4	มข	6x5.8	2.5	3.9	N81C	1.2	3.2	N80A	N81C	1.1	3.2	1.3	3.3	N81C
209	2.3x8x0.08	9.8	4	10.7	7.6	-	4.2x4.3	1.3	3.3	W	1	2.8	N81A	W	1	2.7	1.1	3	W
210	2.6x9.8x0.08	14.5	4.5	9.5	10.1	ม>ข	4.9x4.8	2.3	3.2	W	1.3	3.2	N81A	W	1	2.9	1.2	2.9	W
211	3.2x10.2x0.06	10.7	4.3	7.9	12.5	ข	5.2x4.8	1.3	3.5	W	1.2	2.7	N81A	W	1	3.2	1.1	3.1	W
212	3x9.9x0.08	12.5	3.8	10.3	8.6	ข	6x5.2	2	3.3	-	1	3.3	-	-	1	3	1.2	3.3	-
213	3x9.7x-	11.3	4.1	8.9	12.7	ม	6.5x5.3	2.5	4.1	N81B	1.1	3.4	N81A	N81B	1.2	3.5	1.2	3.5	N81C
214	2.8x9x0.07	12.2	4.5	-	-	ข>ม	5.4x5.1	1.9	3.6	N85D	1.1	3	N81A	W	1.1	3.3	1.2	3	N85D
215	3x10.9x0.07	19.8	3.9	11.2	14.9	ข>ม	5.9x5.2	2.1	4	-	1.3	3.2	-	-	1	3	1.1	3.2	-
216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	N80A	-	-	N77A	N80A	-	-	-	-	W+N80A
217	2.9x10.8x0.07	21.3	4.7	12.2	13.7	ข>ม	5.2x5.4	1.5	3.8	W	1	3.1	N81A	W	1	3.2	1.3	3	W
218	3x9x0.11	9.1	4	6.1	4.8	ข	4.5x5.4	1.6	3	W	1	2.4	N81A	W	0.9	2.6	1.1	2.6	W+N81A
219	2.3x7.9x0.08	6	3.6	8.5	7	ข>ม	5.8x5.4	2.2	4.1	N81C	1	3.6	N81B	N81A	1.1	3.3	1.2	3.4	N81C

ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

ต้นไม้ที่	ใบ	ลำลูกกล้วย		ก้านช่อดอก			ดอก	กลีบดอก			ปากดอก			กลีบเลี้ยงบน		กลีบเลี้ยงซ้าย			
	กxยxn	ย	ส	ย1	ย2	สี	กxย	ก	ย	สี	ก	ย	สีใน	สีนอก	ก	ย	ก	ย	สี
224	3.6x11.7x0.06	31.7	4.3	21.3	19.4	ม>ข	5.9x5.5	2.4	3.7	N81C	1.3	3.5	N80A	N81C	1.1	3.4	1.2	3.5	N81C

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวนริศ เจือจุน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	20 ธันวาคม พ.ศ. 2525
สถานที่เกิด	ต. เนินฆ้อ อ. แกลง จ. ระยอง
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	ทุนการศึกษา จากศูนย์ความเป็นเลิศด้าน เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงาน คณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ