รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากฐานข้อมูล EST และการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

Development of EST-microsatellite from expressed sequence tag database and assessment of genetic diversity of *Doritis* germplasm

โดย

รศ. ดร. สุรีพร เกตุงาม และ คณะ

ชุดโครงการ: การพัฒนาสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อเพิ่มศักยภาพเชิงพาณิชย์

ได้รับจัดสรรงบประมาณดำเนินโครงการวิจัยจาก มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 - 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากฐานข้อมูล EST และการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

Development of EST-microsatellite from expressed sequence tag database and assessment of genetic diversity of *Doritis* germplasm

โดย

รศ. ดร. สุรีพร เกตุงาม	คณะเกษตรศาสตร์ ม. อุบลราชธานี
ผศ. ดร. ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์	คณะวิทยาศาสตร์ ม. เกษตรศาสตร์ (บางเขน)
ดร. ทินน์ พรหมโชติ	คณะเกษตรศาสตร์ ม. อุบลราชธานี

ชุดโครงการ: การพัฒนาสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อเพิ่มศักยภาพเชิงพาณิชย์

ได้รับจัดสรรงบประมาณดำเนินโครงการวิจัยจาก มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
กิตติกรรมประกาศ	ซ
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
การตรวจเอกสาร	4
วิธีการวิจัย	11
ผลการวิจัย	22
การเก็บรวบรวมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง	22
การสกัดดีเอ็นเอ	23
การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จาก EST database ของกล้วยไม้	24
ค่า polymorphic information content (PIC)	34
การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง	38
การตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมกล้วยไม้	43
วิจารณ์ผลการวิจัย	56
สรุปผลการวิจัย	60
เอกสารอ้างอิง	62
ภาคผนวก	68
บทความวิจัย	69

บทสรุปผู้บริหาร

การพัฒนาเครื่องหมาย EST-microsatellite ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ รวมทั้งการตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสมได้ นอกจากนี้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาขึ้นใหม่จากกล้วยไม้ต่างชนิด/ต่างสกุล สามารถนำมาถ่ายโอน (cross transferability) ใช้ศึกษาในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) พัฒนาเครื่องหมาย EST-microsatellite จากยีนที่มีการแสดงออกของกล้วยไม้ในฐานข้อมูล GenBank 2) ตรวจสอบการการถ่ายโอนของเครื่องหมาย G-microsatellite ของกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 3) เพื่อประเมินศักยภาพของเครื่องหมาย EST-microsatellite และ G-microsatellite ดังกล่าวในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และตรวจสอบเอกลักษณ์ของสายพันธุ์กล้วยไม้ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับกล้วยไม้ต่างสกุล

การพัฒนาเครื่องหมาย EST-microsatellite จากฐานข้อมูล EST ของกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ได้ข้อมูลลำดับเบส EST ของกล้วยไม้ทั้งหมด จำนวน 8,009 ลำดับเบส ข้อมูล mRNA ของกล้วยไม้สกุล *Doritis* จำนวน 14 ลำดับเบส และ mRNA ของกล้วยไม้สายพันธุ์อื่น ๆ อีก จำนวน 88 ลำดับเบส จัดกลุ่มข้อมูลและคัดเลือกคุณภาพของข้อมูลโดยใช้โปรแกรม CAP3 Sequence Assembly Program (http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php) ได้ข้อมูลที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานทั้งหมด 1,261 ข้อมูล จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาค้นหา EST ที่มีไมโครแซทเทลไลท์ เพื่อออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Troll software (http://wsmartins.net/websat/) ได้ไพรเมอร์ EST-microsatellite ทั้งหมด 177 คู่ ประกอบด้วย ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบลำดับเบสซ้ำ 1 เบส จำนวน 60 คู่ (33.90 เปอร์เซ็นต์) ลำดับเบสซ้ำ 2 เบส จำนวน 68 คู่ (38.42 เปอร์เซ็นต์) ลำดับเบสซ้ำ 3 เบส จำนวน 37 คู่ (22.03 เปอร์เซ็นต์) ลำดับเบสซ้ำ 4 เบส จำนวน 5 คู่ (2.82 เปอร์เซ็นต์) ลำดับเบสซ้ำ 5 เบส จำนวน 1 คู่ (0.56 เปอร์เซ็นต์) และลำดับเบสซ้ำ 6 เบส จำนวน 6 คู่ (3.39 เปอร์เซ็นต์) ทำการเลือกไพรเมอร์ EST-microsatellite ที่มีขนาดของแถบดีเอ็นเอ ประมาณ 100 – 400 คู่เบส จำนวน 100 คู่ มาทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง โดยมีการปรับอุณหภูมิการเข้าคู่ระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์ (annealing temperature) ให้เหมาะสม ได้ไพรเมอร์ EST-microsatellite ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้ จำนวน 25 คู่ (คิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์)

ดำเนินการสืบค้นเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (G-microsatellite) จากกล้วยไม้สกุลอื่นที่มีเผยแพร่ใน public domain รวมจำนวน 35 คู่ ประกอบด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากกล้วยไม้สกุล *Dendrobiums* จำนวน 29 คู่ และสกุล *Serapias vomeracea* จำนวน 6 คู่ นำมาทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้ม้าวิ่ง โดยใช้องค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เช่นเดียวกันกับการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite โดยการปรับอุณหภูมิที่ใช้ในการเข้าคู่ระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์ (annealing temperature) ให้เหมาะสม ได้ไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้อย่างชัดเจน จำนวน 8 คู่ (คิดเป็น 22.86 เปอร์เซ็นต์)

การประเมินศักยภาพของเครื่องหมาย EST-microsatellite ที่พัฒนาได้จากฐานข้อมูล EST (25 เครื่องหมาย) และ G-microsatellite (8 เครื่องหมาย) โดยนำมาประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และตรวจสอบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หรือแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้เครื่อง HAD-GT12™ capillary gel electrophoresis system (Qiagen, Germany) พบว่า ได้อัลลีลทั้งหมด จำนวน 142 อัลลีล และมีอัลลีลที่แสดงความแตกต่างในเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง รวมจำนวน 92 อัลลีล ค่าเฉลี่ยของอัลลีลต่อเครื่องหมายเท่ากับ 4.6 อัลลีล ค่า Polymorphic information content (PIC) ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ รวมจำนวน 20 เครื่องหมาย มีค่าระหว่าง 0.124 – 0.844 คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.620 บ่งชี้ได้ว่าประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการนำไปใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งอยู่ในระดับปานกลางถึงค่อนข้างสูง ค่าสัมประสิทธิ์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Dice's Similarity Coefficient) ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 24 ตัวอย่าง มีค่าตั้งแต่ 0.19-0.70 ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.53 บ่งชี้ว่ากล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่นำมาศึกษามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับปานกลาง เมื่อนำข้อมูลความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาจัดกลุ่ม ด้วยวิธี UPGMA (UPGMA cluster analysis) และการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (principle component analysis: PCA) พบว่า สามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของกล้วยไม้ลูกผสมต่างสกุลระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกับสกุลอื่น จำนวน 6 คู่ผสม ประกอบด้วยกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับ สกุลฟาแลนอปซีส จำนวน 4 คู่ผสม และสกุลม้าวิ่ง กับ สกุลเข็ม จำนวน 2 คู่ผสม ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 33 คู่ ประกอบด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite ที่พัฒนาขึ้นใหม่จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 25 เครื่องหมาย และ G-microsatellite ของกล้วยไม้ชนิดอื่น จำนวน 8 เครื่องหมาย และสืบค้นหาเครื่องหมาย G-microsatellite เพิ่มเติมอีก จำนวน 25 เครื่องหมาย นำมาตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ของกล้วยไม้ทั้ง 3 สกุล (parental screening) พบว่า มีเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกับสกุลฟาแลนอปซีส จำนวน 10 เครื่องหมาย ประกอบด้วย เครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 6 เครื่องหมาย (A48 B34 B27 B28 B2 และ B41) และ G-microsatellite จำนวน 4 เครื่องหมาย (KNU-CC-32 KNU-CC-71 PGB209 และ PGCT17) และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับสกุลเข็ม จำนวน 4 เครื่องหมาย ประกอบด้วย เครื่องหมาย

EST-microsatellite จำนวน 3 เครื่องหมาย (A48 B9 และ B28) และ G-microsatellite จำนวน 1 เครื่องหมาย (KNU-CC-55) เมื่อนำเครื่องหมายดังกล่าวมาตรวจสอบกล้วยไม้ลูกผสม พบว่า สามารถยืนยันความเป็นลูกผสมของกล้วยไม้ต่างสกุลอย่าง เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาขึ้นใหม่ ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ และการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมาย EST-microsatellite จากฐานข้อมูลของยีนที่มีการแสดงออกเพื่อใช้ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ตรวจสอบการถ่ายโอนของเครื่องหมาย G-microsatellite ของกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และเพื่อประเมินศักยภาพของเครื่องหมาย microsatellite ดังกล่าวในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง และตรวจสอบเอกลักษณ์ของกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกับกล้วยไม้ต่างสกุล จากการค้นหาข้อมูลลำดับเบสของยีนที่มีการแสดงออกจากฐานข้อมูล EST ของกล้วยไม้ จำนวน 8,009 ลำดับเบส ข้อมูล mRNA ของกล้วยไม้สายพันธุ์อื่น ๆ จำนวน 88 ลำดับเบส และข้อมูล mRNA ของกล้วยไม้สกุล *Doritis* จำนวน 14 ลำดับเบส ออกแบบไพรเมอร์ EST-microsatellite ได้ทั้งหมด จำนวน 177 คู่ โดยพบไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสซ้ำ 2 เบสสูงสุด คิดเป็น 38.42 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือลำดับเบสซ้ำ 1 เบส (33.90 เปอร์เซ็นต์) และลำดับเบสซ้ำ 3 เบส (22.03 เปอร์เซ็นต์) โดยมีรูปแบบของเบสซ้ำที่พบส่วนใหญ่แบบ $(TC/GA)_n$ $(A/T)_n$ และ $(CGG/CCG)_n$ ตามลำดับ เลือกไพรเมอร์ EST-microsatellite จำนวน 100 คู่ และสืบค้นไพรเมอร์ G-microsatellite ของกล้วยไม้สกุลอื่น ๆ รวมจำนวน 35 คู่ มาทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง พบว่า ไพรเมอร์ EST-microsatellite จำนวน 25 คู่ และไพรเมอร์ G-microsatellite จำนวน 8 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้ และนำไปใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง อัลลีลของไมโครแซทเทลไลท์ที่แสดงความแตกต่างระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่นำมาศึกษา มีจำนวน 92 อัลลีล ซึ่งได้มาจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 20 เครื่องหมาย ประกอบด้วย เครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 13 เครื่องหมาย (57 อัลลีล) และ เครื่องหมาย G-microsatellite จำนวน 7 เครื่องหมาย (35 อัลลีล) ค่า PIC ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ มีค่าตั้งแต่ 0.124 - 0.844 เฉลี่ยเท่ากับ 0.620 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (Dice's similarity) ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 24 ตัวอย่าง มีค่าตั้งแต่ 0.19-0.70 การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA และ PCA ให้ผลสอดคล้องกัน โดยสามารถจัดกลุ่มเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง ได้ 2 กลุ่มใหญ่ การตรวจสอบเอกลักษณ์ของกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกับสกุลฟาแลนอปซีส และ กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกับสกุลเข็ม โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 32 เครื่องหมาย ประกอบด้วย เครื่องหมาย EST-microsatellite ที่พัฒนาได้จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวน 25 เครื่องหมาย และ เครื่องหมาย G-microsatellite จำนวน 8 เครื่องหมาย พบว่า มีเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 6 เครื่องหมาย (A48 B34 B27 B28 B2 และ B41) และ G-microsatellite จำนวน 4 เครื่องหมาย (KNU-CC-32 KNU-CC-71 PGB209 และ PGCT17) ที่สามารถตรวจสอบเอกลักษณ์ของกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับสกุลฟาแลนอปซีสได้ และมีเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 3 เครื่องหมาย (A48, B9 และ B28) และ G-microsatellite จำนวน 1 เครื่องหมาย (KNU-CC-55)

ที่สามารถตรวจสอบเอกลักษณ์ของกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับสกุลเข็มได้อย่างชัดเจน เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาได้ จากการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาพันธุกรรม และการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเชิงพาณิชย์ได้ในอนาคต

คำสำคัญ: กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ยีนที่แสดงออก การถ่ายโอน ความหลากหลายทางพันธุกรรม การตรวจสอบสายพันธุ์ลูกผสม

Abstract

The research was aimed to generate new EST-microsatellite markers from EST database for *Doritis* orchid, to examine the transferability of genomic microsatellite markers from other orchids in *Doritis* and to evaluate their potential of those markers for genetic diversity assessment and hybrid identification of *Doritis*. Eight thousand and nine ESTs and 88 mRNA sequences belonged to family Orchidaceae and 14 *Doritis* mRNA sequences were collected and analyzed for microsatellite. A total of 177 EST-microsatellite were identified. Of these microsatellites, 38.42% were di-nucleotide repeats, followed by mono- (33.90%) and tri-nucleotide repeat (22.03%), respectively. $(TC/GA)_n$, $(A/T)_n$ and $(CGG/CCG)_n$ predominated in dimers, monomers and trimers, respectively One hundred novel EST-microsatellite and 35 public G-microsatellites primer pairs were tested for DNA amplification in *Doritis*, of these 25 novel EST-microsatellite and public 8 G-microsatellites primer pairs were successfully amplified and used for genetic diversity assessment in 24 *Doritis* accessions. A total of 92 polymorphic alleles were generated from 20 microsatellites markers which consisted of 13 EST-microsatellite (57 alleles) and 7 G-microsatellite (35 alleles) markers. The average of polymorphic content (PIC) value was 0.620 and ranged from 0.124 - 0.844. Dice's genetic similarity coefficient among 24 *Doritis* accessions ranged from 0.19-0.70. Cluster analysis based on unweightedpair group method using arithmetic average (UPGMA) and principal component analysis (PCA) clearly grouped 24 *Doritis* accessions into two major clusters. Hybrid progeny from 2 intergeneric crosses, *Doritis* sp. x *Phalanenopsis* sp. and *Doritis* sp. and *Ascocentrum* sp., were identified using 32 microsatellite markers including novel 25 EST-microsatellite and public 8 G-microsatellite markers. Six EST-microsatellite markers (A48, B34, B27, B28, B2 and B41) and 4 G-microsatellite markers (KNU-CC-32, KNU-CC-71, PGB209 and PGCT17) were able to distinguish hybrid from the crosses between *Doritis* sp. x *Phalanenopsis* sp. whereas 3 EST-microsatellite (A48, B9 and B28) and one G-microsatellite markers (KNU-CC-55) were able to identify hybrid between the crosses between *Doritis* sp. X *Ascocentrum* sp. Theses microsatellite markers developed in this study enrich the current resource of molecular markers which would facilitate further genetic studies and molecular breeding of commercial *Doritis* in future.

Key words: *Doritis*, microsatellite markers, expressed sequence tag (EST), transferability, genetic diversity, hybrid identification

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยและคณะ ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ โครงการวิจัย “การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากฐานข้อมูล EST และการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง” นี้เป็นหนึ่งในโครงการวิจัยย่อยภายใต้ชุดโครงการวิจัย “การพัฒนาสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อเพิ่มศักยภาพเชิงพาณิชย์” งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยสร้างองค์ความรู้เพื่อการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมของชุมชน ในส่วนแผนงานวิจัยบูรณาการตามทิศทางการวิจัยของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ภายใต้งานการพัฒนาการเกษตร การบริหารจัดการแหล่งน้ำ และการแปรรูปสินค้าการเกษตร งบประมาณแผ่นดิน ปี 2554 และ ปี 2555

ผู้วิจัยและคณะ ขอขอบคุณคณะวิจัยจากโครงการวิจัยย่อยที่ 2 “โครงการการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อเป็นไม้ประดับกระถาง” ที่ให้ความเอื้อเฟื้อเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งและกล้วยไม้ลูกผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่ (ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ) และอุปกรณ์ ในการดำเนินการวิจัย และท้ายสุด ขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนร่วมทุกท่าน ที่ช่วยให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายชื่อไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ของกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ ที่มีเผยแพร่ในบทความวิจัย รวมทั้งหมด จำนวน 35 คู่	14
2	รายชื่อคู่ผสมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกับกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีส จำนวน 4 คู่ และกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับ กล้วยไม้เข็ม จำนวน 2 คู่ผสม รวมจำนวน 6 คู่ผสม	17
3	รายชื่อไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้จากการสืบค้นจากกล้วยไม้ชนิดอื่นที่จะนำมาตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสมเพิ่มเติม จำนวน 25 คู่	20
4	รายชื่อกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่รวบรวมจากสถานที่ต่าง ๆ ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 24 ตัวอย่าง	22
5	จำนวน และความถี่ของลำดับเบสซ้ำชนิดต่างๆ ที่พบใน ESTs ของกล้วยไม้	26
6	EST - microsatellite primers จากฐานข้อมูล EST กล้วยไม้วงศ์ Orchidaceae จำนวน 25 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้ม้าวิ่งได้	30
7	G-microsatellite primers จากกล้วยไม้สกุลอื่น จำนวน 8 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่ได้จากกล้วยไม้ม้าวิ่งได้	32
8	ลำดับเบสของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 20 คู่ ประกอบด้วย EST-microsatellite primer จำนวน 13 คู่ และ G-microsatellite primer จำนวน 7 คู่ แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างในเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ลำดับเบสซ้ำ อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม ขนาดของอัลลีล จำนวนอัลลีล ค่า PIC และหน้าที่ของโปรตีนจากฐานข้อมูล NCBI (BLASTX)	35
9	ค่าประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม โดยวิธี Dice (Dice's similarity coefficient) ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยใช้อัลลีลที่แสดงความแตกต่าง จำนวน 92 อัลลีล	39

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
10	ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมระหว่าง *Phalaenopsis wedding* x NK14 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) ด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 5 คู่ (A48 B34 B28 B2 และ B41) และ G-microsatellite จำนวน 4 คู่ (KNU-CC-32 KNU-CC-71 PGB209 และ PGCT17)	45
11	ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมระหว่าง *Phalaenopsis wedding* x PK3 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) ด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 5 คู่ (A48 B34 B28 B2 และ B41) และ G-microsatellite จำนวน 4 คู่ (KNU-CC-32 KNU-CC-71 PGB209 และ PGCT17)	46
12	ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมระหว่าง *Phaleanopsis ember* var *wedding* x RE4 (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) ด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 5 คู่ (A48 B34 B27 B48 และ B41) และ G-microsatellite จำนวน 2 คู่ (KNU-CC-32 และ KNU-CC-71)	50
13	ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมระหว่าง NK13 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Phalaenopsis*-Red ด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 6 คู่ (A48 B34 B27 B28 B2 และ B41) และ G-microsatellite จำนวน 3 คู่ (KNU-CC-32 KNU-CC-71 และ PGCT17)	51
14	ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมระหว่าง UN10 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Ascocentrum* sp. (เข็มแดง) ด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 3 คู่ (A48 B9 และ B28) และ G-microsatellite จำนวน 1 คู่ (KNU-CC-55)	54
15	ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมระหว่าง NK4 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Ascocentrum* sp. (เข็มแสด) ด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 3 คู่ (A48 B9 และ B28) และ G-microsatellite จำนวน 1 คู่ (KNU-CC-55)	55

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแสดงปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอของกล้วยไม้ จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐาน	23
2	Histogram แสดงความถี่ของ EST-microsatellite จำนวนทั้งหมด 177 คู่ ที่จำแนกตามชนิดของลำดับเบสซ้ำ ได้แก่ mono- di- tri- tetra- penta and hexa–nucleotide repeats	25
3	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ด้วยไพรเมอร์ EST-microsatellite	27
4	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ด้วยไพรเมอร์ EST-microsatellite ที่มีการเพิ่มปริมาณ $MgCl_2$	28
5	อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ด้วยไพรเมอร์ที่ได้จากกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ จำนวน 8 คู่	29
6	การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 24 ตัวอย่าง ด้วยวิธี UPGMA โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 92 เครื่องหมาย (อัลลีล)	41
7	การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (PCA) ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 92 อัลลีล	42
8	โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสม ระหว่างกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีส กับ สกุลม้าวิ่ง จำนวน 2 คู่ โดยใช้ไพรเมอร์ G-microsatellite KNU-CC-32	44

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
9	โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสการตรวจสอบลูกผสม ระหว่างกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีสกับสกุลม้าวิ่ง จำนวน 2 คู่ โดยใช้ไพรเมอร์ G-microsatellite KNU-CC-71	44
10	โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีสกับสกุลม้าวิ่งโดยใช้ไพรเมอร์ EST-microsatellite-A48	47
11	โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีสกับสกุลม้าวิ่งโดยใช้ไพรเมอร์ EST-microsatellite-B28	48
12	โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีสกับสกุลม้าวิ่งโดยใช้ไพรเมอร์ EST-microsatellite-B34	48
13	โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีสกับสกุลม้าวิ่งโดยใช้ไพรเมอร์ EST-microsatellite-B41	49
14	โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีสกับสกุลม้าวิ่งโดยใช้ไพรเมอร์ G-microsatellite - KNU-CC-71	49
15	โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับสกุลเข็ม โดยใช้ไพรเมอร์ EST-microsatellite - A48	52
16	โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับสกุลเข็มโดยใช้ไพรเมอร์ EST-microsatellite-B29	53
17	โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกับสกุลเข็มโดยใช้ไพรเมอร์G-microsatellite -KNU-CC-55	53

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กล้วยไม้เป็นไม้ตัดดอกที่สำคัญทางเศรษฐกิจของไทย แหล่งกำเนิดอยู่ในเขตร้อนมีประมาณ 740 สกุลหรือ 18,000 ชนิด ในปัจจุบันประเทศไทยได้รับการยอมรับว่าเป็นแหล่งผลิตต้นพันธุ์และดอกกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญที่สุดของโลก นอกจากนี้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กำหนดให้กล้วยไม้เป็นหนึ่งในสี่ของพืชในกลุ่ม Product champion ของประเทศ ซึ่งในปี 2549 มีปริมาณการส่งออกสูงถึง 23,334 ตัน และทำรายได้จากการส่งออก 2,581.01 ล้านบาท โดยปริมาณการส่งออกมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) ซึ่งมูลค่าจากการส่งออกกว่าครึ่ง ได้มาจากตลาดในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเป็นตลาดที่มีความต้องการสินค้าที่มีคุณภาพและมีมาตรฐานสูง (จุลภาค และคณะ, 2548) ศูนย์วิจัยกสิกรไทย คาดการณ์ว่า มูลค่าการส่งออกกล้วยไม้ของไทยปี 2551 จะขยายตัวในอัตราไม่ต่ำกว่าร้อยละ 10 คิดเป็นมูลค่าประมาณ 93.9 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ โดยมีตลาดส่งออกสำคัญคือ ญี่ปุ่น สหรัฐฯ และสหภาพยุโรป ดังนั้นกล้วยไม้จึงเป็นไม้ดอกอีกชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูงในการพัฒนาโดยจะต้องมีการวางแผนด้านการเกษตรเชิงยุทธศาสตร์อย่างจริงจังและมีประสิทธิภาพ ประเทศไทยอาจกลายเป็นผู้นำด้านการผลิตกล้วยไม้ที่สำคัญของโลกก็ได้ นอกจากนี้สภาพภูมิอากาศ และสภาพแวดล้อมต่างๆ ในประเทศมีความเหมาะสมอย่างยิ่งต่อการผลิตกล้วยไม้ จึงมีความเป็นไปได้สูงที่ประเทศไทยจะกลายเป็นศูนย์กลางความรู้และการผลิตกล้วยไม้ที่สำคัญของโลกในอนาคต

กล้วยไม้แดงอุบลจัดอยู่ในกลุ่มกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง เป็นกล้วยไม้พื้นเมืองของจังหวัดอุบลราชธานี ลักษณะเด่นคือสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่ค่อนข้างแห้งแล้ง ซึ่งแตกต่างจากกล้วยไม้จำพวกหวายที่ชอบอากาศแบบร้อนชื้นมากกว่า (ครรชิต, 2541) ลักษณะของทรงต้นและดอกเหมาะสำหรับนำมาพัฒนาเป็นกล้วยไม้กระถาง ปัจจุบันยังไม่มีการพัฒนาเพื่อการส่งออกไปต่างประเทศ จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่ากล้วยไม้แดงอุบลมีศักยภาพสำหรับการผลิตในเชิงการค้าระดับอุตสาหกรรมของประเทศหรือระหว่างประเทศได้ ถ้าสามารถพัฒนาได้ประเทศไทยจะมีกล้วยไม้กระถางเพื่อการส่งออกชนิดใหม่เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นการพัฒนาพืชท้องถิ่นให้มีศักยภาพในระดับประเทศและระดับโลกอีกด้วย การพัฒนาพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้แดงอุบล จึงถือเป็นอีกบทบาทหนึ่งที่สำคัญของการพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์เป็นเป็นไม้กระถาง โดยในปัจจุบันลักษณะที่นักปรับปรุงพันธุ์ต้องการคือ ความหลากหลายของสีดอก และทรงต้นที่มีขนาดเล็กลง กะทัดรัดเหมาะสมกับการเป็นกล้วยไม้กระถาง จึงได้ริเริ่มโครงการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้แดงอุบล โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาพันธุ์ใหม่ให้เหมาะสมต่อการเป็นกล้วยไม้กระถาง แต่การพัฒนาพันธุ์ต้องใช้ระยะเวลานาน จึงต้องอาศัยเครื่องมือทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาเสริม เพื่อสามารถคัดเลือกลูกผสมที่ต้องการได้ในระยะแรกของการเจริญเติบโต ลดระยะเวลาในการพัฒนาพันธุ์ และเพิ่มประสิทธิภาพของการสร้างพันธุ์ใหม่

ปัจจุบันเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลมีบทบาทมากกับการปรับปรุงพันธุ์พืช นักปรับปรุงพันธุ์นิยมนำเครื่องมือเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในหลากหลายรูปแบบ เพื่อประสิทธิภาพการพัฒนาพันธุ์ เช่น นำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรที่นักปรับปรุงพันธุ์รวบรวมพันธุ์ไว้สำหรับคัดเลือกพ่อแม่ที่จะใช้ในการสร้างประชากรรุ่นต่อไป ซึ่งโดยทั่วไปนิยมผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง เพื่อให้เกิดความหลากหลายของลูกผสมในรุ่นต่อไป การทำแผนที่ยีนเพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลพันธุกรรมพื้นฐานของพืชพันธุ์นั้น ๆ และก้าวไปสู่การดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อสร้างสายพันธุ์ที่นักปรับปรุงพันธุ์ต้องการ และการศึกษาลักษณะพันธุกรรม (genotype) ควบคู่กับลักษณะปรากฏ (phenotype) หรือที่เรียกกันว่า QTL (quantitative trait loci) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการคัดเลือกลูกผสมของนักปรับปรุงพันธุ์ให้ตรงกับลักษณะพันธุกรรมที่มีอยู่ของต้นลูกผสมให้มากที่สุด หรือเพื่อลดบทบาทของสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการแสดงออกของลักษณะปรากฏในต้นลูกผสมให้น้อยที่สุด เป็นต้น

การพัฒนางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับงานปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ การจัดจำแนกพันธุ์กล้วยไม้ การศึกษาพันธุกรรมของประชากรกล้วยไม้ และการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงกับประชากรกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ถือว่ามีความสำคัญต่อการผลิตกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในประเทศไทย ซึ่งโดยทั่วไปวิธีการดั้งเดิมการพัฒนาและคัดเลือกพันธุ์จะพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏให้เห็น ซึ่งต้องใช้ระยะเวลานาน สำหรับกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง อาจใช้เวลาอย่างน้อย 4 ปี สำหรับการเจริญเติบโตตั้งแต่เมล็ดงอกจนออกดอก การปฏิบัติค่อนข้างยุ่งยากและอาจเกิดข้อผิดพลาดได้ง่าย มีการลงทุนสูงด้านการดูแลและการเขตกรรม นอกจากนี้การแสดงออกของลักษณะปรากฏต่างๆ (phenotype) ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งมักผันแปรตามสภาพแวดล้อมที่ได้รับ กล่าวคือ ถ้ากล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้รับน้ำ ปุ๋ย และสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต จะทำให้ต้นมีความแข็งแรง และดอกมีคุณภาพที่ดี ในทางตรงกันข้ามถ้าได้รับสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต อาจทำให้ต้นหยุดชะงักการเจริญเติบโต และไม่ออกดอก เป็นต้น ต่างๆ เหล้านี้จะเห็นได้ว่าล้วนแต่เป็นปัญหาที่ทำให้การพัฒนาพันธุ์ประสบกับความล้มเหลวได้ แนวทางหนึ่งที่สามารถนำมาใช้แก้ปัญหาดังกล่าวคือ การใช้เทคนิคการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมที่นักปรับปรุงพันธุ์ต้องการด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอซึ่งมีหลายวิธี เช่น RAPD (Random amplified polymorphic DNA) (William et al., 1990) AFLP (Amplified fragment length polymorphism) (Vos et al., 1995) SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) (Li and Quiros, 2001) ซึ่งเป็นวิธีตรวจแบบสุ่มโดยการตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่ง ใช้วิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยพีซีอาร์แบบประยุกต์ วิธีการทั้งหลายเหล่านี้ยังมีข้อบกพร่องในเรื่องของความเฉพาะเจาะจงน้อยและไม่สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับห้องปฏิบัติการอื่นๆ ได้ (สุรินทร์, 2545) ปัจจุบันได้มีการค้นพบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า ได้แก่ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite marker) หรือ simple sequence repeat (SSR marker) ซึ่งใช้วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์เช่นเดียวกัน แต่มีการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะและมี

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่แน่นอน สามารถทำซ้ำได้ในห้องปฏิบัติการต่างๆ นิยมใช้ในการตรวจสอบสิ่งที่มีชีวิตที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกันเพราะเป็นเครื่องหมายที่มีความแม่นยำสูง สามารถบ่งบอกสภาพพันธุกรรมแบบโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ จึงสามารถส่งข้อมูลแลกเปลี่ยนระหว่างห้องปฏิบัติการได้ เหมาะสำหรับการตรวจสอบเพื่อจดทะเบียนและรับรองพันธุ์ หรือใช้ศึกษาโครงสร้างของประชากร การทำแผนที่ยีน และการศึกษา QTL เป็นต้น ในพืชมีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เพื่อใช้ในการตรวจสอบและการพัฒนาพันธุ์หลายชนิด เช่น พืชตระกูลถั่ว (Hüttel et al., 1999; He et al., 2003) วัชพืชบางชนิด (Juillet et al., 2003) *Arabidopsis* และ *Arabis* (Clauss et al., 2002) กล้วยไม้สกุล *Ophyrus* (Soliva et al., 2000) และ กล้วยไม้สกุล *Dendrobium* (Boonsrangsom et al., 2008) เป็นต้น โดยการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในปัจจุบันใช้วิธี enrichment เพื่อเพิ่มโอกาสที่จะตรวจพบลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์มากขึ้น (Cordeiro et al., 1999; Rivera et al., 2003) ทำให้การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทำได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น

สำหรับในกล้วยไม้บางชนิดได้มีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์บ้างแล้ว ตัวอย่างเช่น กล้วยไม้สกุลแวนด้า (ปรารถนา, 2550) และกล้วยไม้สกุลหวาย (จุลภาค และคณะ, 2548) แต่ยังไม่มีเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่จำเพาะสำหรับกล้วยไม้ในสกุลม้าวิ่ง ซึ่งขั้นตอนการพัฒนาลูกผสมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งนั้น มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องตรวจสอบความเป็น true to type ของลูกผสมที่ถูกพัฒนาขึ้นว่าเกิดมาจากต้นพันธุ์พ่อแม่ที่ต้องการจริงหรือไม่เพื่อใช้ยืนยันในทางการค้าเชิงพาณิชย์ ดังนั้นเพื่อสามารถตรวจสอบความเป็น true to type ของลูกผสมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ขึ้นมา เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ตรวจสอบลูกผสมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเครื่องหมาย EST-microsatellite จาก ยีนที่มีการแสดงออก (expressed sequence tag) ของกล้วยไม้ ใน Genbank

2. เพื่อตรวจสอบการใช้ประโยชน์ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ ที่มีการเผยแพร่ใน public domain cross transferability กับกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

3. เพื่อนำเครื่องหมาย EST-microsatellite และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากกล้วยไม้ต่างสกุลมา ตรวจสอบความเป็นเอกลักษณ์ของลูกผสมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่ได้มีการพัฒนาสายพันธุ์ขึ้น (hybrid identification)

4. เพื่อนำเครื่องหมาย EST-microsatellite และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากกล้วยไม้ต่างสกุลมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

การตรวจเอกสาร

ข้อมูลทั่วไปของกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Subclass Monocotyledoneae) อยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Family Orchidaceae) ซึ่งนับเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดวงศ์หนึ่งของพืชมีดอก (Class angiosperm) กล้วยไม้เป็นพืชที่มีวิวัฒนาการและการปรับตัวอย่างสูงในหลายรูปแบบ จึงสามารถกระจายพันธุ์อยู่ได้ในทุกภูมิภาคของโลก รูปแบบการเจริญเติบโตของกล้วยไม้มีหลายแบบ จากการสำรวจพบกล้วยไม้ที่ขึ้นบนต้นไม้ (epiphyte) 73% ที่เหลือพบขึ้นตามพื้นป่า (terrestrial) เช่น พื้นดิน พื้นหิน และที่ชื้นแฉะ ความแตกต่างของชนิดกล้วยไม้จะพบมากในเขตร้อน (tropic) และมักจะเป็นกล้วยไม้อากาศ (epiphytic orchids) ส่วนกล้วยไม้ที่อยู่ในเขตอบอุ่น (temperate) มักเป็นพวกกล้วยไม้ดิน (terrestrial orchids) (ครรชิต, 2541) คาดว่าในโลก มีกล้วยไม้ประมาณ 17,000-35,000 ชนิด ปัจจุบันสำรวจและจำแนกได้ 796 สกุล ประมาณ 19,500 ชนิด (Dressler, 1993) สำหรับในประเทศไทยมีจำนวน 178 สกุล รวม 1,128 ชนิด (วีรชัย, 2548)

เนื่องจากกล้วยไม้มีจำนวนชนิดมากมาย ดังนั้นจึงมีลักษณะต้นหลากหลาย ทั้งลักษณะการเจริญเติบโต รูปร่างของต้น ซึ่งอาจมีลักษณะเป็นหัว (tuber) อยู่ใต้ดิน เป็นเหง้า (rhizome) อยู่เหนือพื้นดิน หรือเป็นเหง้าเจริญอยู่บนต้นไม้ (ปฐพีชล, 2547) ความสูงของต้น พบตั้งแต่ 1 นิ้ว และให้ดอกมีขนาดเท่าหัวเข็มหมุด ไปจนถึงต้นสูง 3 เมตร หรือมีลำเป็นเถายาว มากกว่า 20 เมตร และให้ช่อดอกยาวถึง 15 ฟุต (Shuttleworth et al., 1970)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) เป็นกล้วยไม้ดิน มักขึ้นเป็นกอใหญ่บนลานหิน ซอกผาหิน หรือลานดินกว้างบนเขาสูง ที่ค่อนข้างแห้งแล้ง หรือผิวดินร่วนในบริเวณที่มีต้นไม้เตี้ยๆและโปร่ง บังร่มเล็กน้อย ลำต้นรูปทรงกระบอกสูงประมาณ 5-12 เซนติเมตร. มีหลายข้อ ใบเป็นรูปรีแกมขอบขนานกว้าง 2-4 เซนติเมตรยาว 7-12 เซนติเมตร ออกที่ข้อ มีหลายใบ เรียงสลับระนาบเดียว ใบหนาและค่อนข้างแข็ง ใบอ่อนพับออกตามยาว มีอายุหลายฤดู กาบใบติดคาต้น สีเขียวถึงสีแดงคล้ำ ดอกมีลักษณะเป็นช่อยาวและตั้งตรง ก้านช่อดอกยาว 20-50 เซนติเมตร. แต่ละช่อประกอบด้วยดอกย่อยจำนวนมาก เรียงเวียน กลีบเลี้ยง และกลีบดอกเป็นสีม่วงอ่อน หรือสีม่วงแดง ใบประดับไม่หลุดร่วง ช่อดอก ก้านดอก และรังไข่เกลี้ยง กลีบเลี้ยงและกลีบดอกแยกเป็นอิสระ กลีบเลี้ยงจะลู่ไปทางด้านหลัง ทำให้เวลาดอกบานแล้วดูคล้ายหัวม้ากำลังวิ่งตะบึง จึงถูกเรียกชื่อตามลักษณะดังกล่าวว่า “ม้าวิ่ง” กลีบปากเป็นสีขาวแซมขึ้นจากโคนกลีบ บางชนิด พันธุ์สีจะแตกต่างกันเห็นได้ชัดเจน มีด้วยกันหลายสี เช่น สีขาว สีเหลือง สีแดง และสีม่วง

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกระจายพันธุ์อยู่ในพม่า ไทย ลาว กัมพูชา มาเลเซีย อินโดนีเซีย พบในธรรมชาติมี เพียงชนิดเดียวคือ โดไรติส พูลเคอไรมา (*Doritis pulcherrima*) หรือเรียกว่า “ม้าวิ่ง” และมีอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นสายพันธุ์ย่อย (variety) มีดอกใหญ่กว่าธรรมดา พบทางภาคเหนือและภาคอีสานของไทย คือ “ม้าบิน” (*Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis*) และ “แดงอุบล” ซึ่งแยกเป็นพันธุ์บีสโซเนียนา (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) ซึ่งแดงอุบลนี้ พบว่ามีโครโมโซมเป็น 2 เท่าของม้าวิ่งทั่วๆ ไป กล้วยไม้ในสกุลม้าวิ่งส่วนใหญ่นิยมนำไปผสมกับสกุลฟาเลนอปซิส ได้สกุลใหม่ว่า “โดไรเตนอปซิส (*Doritaenopsis*)” นอกจากนี้ยังมีการนำไปผสมกับสกุลอื่นอีก เช่น สกุลเข็ม แวนด้า และช้าง เป็นต้น

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Marker) หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซมในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือในออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนี่เองที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้ (สุรีพร, 2546)

การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยเทคนิคทางอณูวิทยาซึ่งเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” (DNA Fingerprinting) ซึ่งหมายถึงแบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ๆ นั่นเอง สามารถนำมาตรวจสอบความแตกต่าง หรือโพลีมอร์ฟิซึมของสิ่งมีชีวิต หรือสายพันธุ์พืชที่ต้องการตรวจสอบได้

เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่นิยมนำมาใช้ในการการเกษตร ส่วนใหญ่จะเป็น PCR-based marker ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวดีเอ็นเอ หรือ เทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction technique) ตัวอย่าง เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD marker) (William et al., 1990) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP marker) (Vos et al., 1995) และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) หรือ เอสเอสอาร์ (SSR marker) เป็นต้น

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite Marker)

ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) เป็นกลุ่มดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำ (repetitive DNA) พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ความผันแปรของจำนวนเบสซ้ำในส่วนต่างๆของจีโนมของสิ่งมีชีวิตสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดีโดยที่โพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นนั้น เป็นผลเนื่องมาจากจำนวนครั้งของเบสซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ในโลกัสหนึ่งๆ (Powell et al., 1996) ไมโครแซทเทลไลท์ มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น “Simple Sequence Repeats (SSR)” “Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP)” และ “Sequence-tagged Microsatellite Site (STMS)” เป็นต้น (สุรีพร, 2546) ดังนั้น ไมโครแซทเทลไลท์ จึงหมายถึง ลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยเบส 1-6 เบส ชุดที่ซ้ำกันนี้จะอยู่ติดกันแบบหัวต่อหาง เช่น $(A)_n$ $(CA)_n$ $(TCC)_n$ และ $(GATA)_n$ เป็นต้น เมื่อ n คือจำนวนชุดซ้ำ พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ศึกษา

หน้าที่ของไมโครแซทเทลไลท์ ยังไม่ทราบแน่ชัด มีไมโครแซทเทลไลท์บางส่วนที่มีการอนุรักษ์ (conserved) โดยพบอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ในขณะที่บางส่วนทำหน้าที่ได้เนื่องจากอยู่ในส่วนนำรหัสของยีน นอกจากนี้ยังพบว่าไมโครแซทเทลไลท์บางชนิด สามารถจับกับโปรตีนที่จำเพาะและทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน (enhancer) โดยความแปรปรวนของจำนวนซ้ำ มีผลต่อการควบคุมการทำงานของยีน ลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลท์บางแบบยังมีผลต่อโครงสร้างของเส้นใยโครมาตินด้วย (Godldstein and Schlötterer, 1999)

ไมโครแซทเทลไลท์เป็นลำดับเบสที่ไม่เสถียร มีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าลำดับเบสทั่วๆ ไป โดยการกลายพันธุ์ของไมโครแซทเทลไลท์มักเกิดจากการขาดหายไปของลำดับเบสซ้ำ (deletion) หรือการเพิ่มขึ้นของลำดับเบสซ้ำ (insertion) ต่างจากลำดับเบสทั่วไปที่มักเกิดการกลายแบบการแทนที่เบส โดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของชุดซ้ำ มีกลไก 2 แบบคือ 1.) การเลื่อนของสายดีเอ็นเอที่จับคู่กันขณะเกิดการจำลองโมเลกุล (Slip-strand mis pairing) หรือที่เรียกว่าเกิด slippage (Levinson and Gutman, 1987) และ 2.) การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่เท่ากัน (unequal crossing over) (Richard and Pâques, 2000)

เนื่องจากลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ มีอัตราการกลายพันธุ์สูงประกอบกับมีการกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม จึงมีการนำดีเอ็นเอในส่วนนี้มาใช้ศึกษาในทางพันธุกรรมกันอย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการทำแผนที่โครโมโซม การศึกษาวิวัฒนาการ และความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอต่ำ (Areshchenkova and Ganal, 2002)

วิธีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์แบบดั้งเดิมนั้นจะใช้เทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล เตรียมห้องสมุดจีโนม (genome library) โดยการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แล้วเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวกับดีเอ็นเอพาหะ (DNA vector) ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวน จากนั้นคัดเลือกโคลนโดยการไฮบริไดซ์กับโพรบที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ (SSR probe) แล้วแยกดีเอ็นเอออกจากแบคทีเรียเพื่อหาลำดับเบสที่อยู่ขนาบข้างกับไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ และออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน (He et al., 2003) ในปัจจุบันการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์นิยมใช้วิธี enrichment โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอร่วมกับการไฮบริไดเซชันชิ้นดีเอ็นเอกับโพรบที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ที่ติดปลายด้วยไบโอติน (biotin) และแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วย magnetic bead ที่หุ้มด้วย streptavidin (Edwards et al., 1996) ซึ่งหลังจากกำจัดดีเอ็นเอส่วนเกินออกไปแล้วจะมีชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ 50-90 เปอร์เซ็นต์ ก่อนจะเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะต่อไป (Butcher et al., 2000) วิธีการ enrichment นี้มีประสิทธิภาพสูง และการใช้เวลาในการพัฒนาน้อยกว่าวิธีดั้งเดิม (Billotte et al., 2001) จากข้อดีของวิธี enrichment จึงมีผู้ใช้วิธีนี้พัฒนาการหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อตรวจสอบสิ่งมีชีวิตกันอย่างกว้างขวาง อาทิเช่น การพัฒนาเครื่องหมาย SSR ของเมลอน โดยทำการโคลนลำดับเบสของไมโครแซลเทลไลท์ได้มากถึง 700 โคลน จาก Tsp-AG/TG microsatellite enriched library และสามารถสร้างไพรเมอร์ได้ถึง 144 ไพรเมอร์ ในจำนวนนี้สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพได้ 67 ไพรเมอร์ ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเมลอน (Ritschell et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในอ้อย (Pinto et al., 2004) ฝ้าย (Qureshi et al., 2004) ข้าว ข้าวสาลี และบาร์เลย์ (Rota et al., 2005) สำหรับในกล้วยไม้หวาย *Dendrobium* มีรายงานการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยวิธี enrichment เช่นเดียวกัน และประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี โดยสามารถสร้างเครื่องหมาย SSR ได้จำนวน 8 เครื่องหมาย (Boonsrangsom et al., 2008) การพัฒนาเครื่องหมาย SSR จำนวน 4 เครื่องหมายในกล้วยไม้ *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Brown (Campbell et al., 2002) การพัฒนาเครื่องหมาย SSR จำนวน 8 เครื่องหมายในกล้วยไม้ *Ophrys fusca* (Cotrim et al., 2008)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาได้นี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ง่าย เนื่องจากเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้วิธีการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ จึงต้องการดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อยและชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบก็มีขนาดเล็ก จึงใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ไม่ต้องมีคุณภาพมากนัก นอกจากนี้ ผลการตรวจสอบยังมีความแม่นยำ สามารถส่งข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์เพื่อนำไปใช้ที่ห้องปฏิบัติการใดก็ได้ มีโพลีมอร์ฟิซึมสูง และยังมีการข่มแบบ codominance จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ มีการกระจายทั่วทั้งจีโนม เหมาะสำหรับใช้ในการทำแผนที่จีโนม ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ อีกมากมาย (สุรินทร์, 2549) เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและ

พิสูจน์ความหลากหลายทางพันธุกรรมลูกผสมของมันฝรั่งด้วยเครื่องหมาย SSR (Hwang et al., 2002) การนำเครื่องหมาย SSR จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างลูกผสมของส้ม (Oliveira et al., 2002) เป็นต้น

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ขึ้นมาจากฐานข้อมูลสาธารณะ Expressed sequence tags (EST) ที่อยู่ใน GenBank ซึ่งวิธีนี้จะช่วยลดต้นทุนในการพัฒนาเครื่องหมาย SSR และยังได้เครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนของยีนโดยตรง EST เป็นลำดับดีเอ็นเอส่วนที่เป็น complementary DNA (cDNA) ของ mRNA ที่ทำหน้าที่คัดลอกรหัสดีเอ็นเอบางส่วนของจีโนม มีขนาด 500-800 นิวคลีโอไทด์ โดยเกี่ยวข้องกับยีนที่มีการแสดงออก ซึ่งจะทำให้สามารถระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางพันธุกรรมได้เร็ว (Poncet et al., 2006) นอกจากนี้เครื่องหมาย EST-microsatellite ที่พัฒนาขึ้นนี้ สามารถนำไปถ่ายโอน (species/genera cross transferability) ในพืชที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมต่างชนิด หรือต่างสกุล ที่อยู่ในวงศ์เดียวกันได้ ทั้งนี้เนื่องมาจากพืชเหล่านี้มีบรรพบุรุษร่วมกัน (common ancestor) ทำให้ยีนที่แสดงออกเกิดการอนุรักษ์ (gene conserve) ที่ไม่เปลี่ยนแปลงหน้าที่การทำงาน (Feng et al., 2009; Naresh et al., 2009; Poncet et al., 2006) การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในจากฐานข้อมูล EST ปัจจุบันสามารถพัฒนาได้อย่างกว้างขวาง ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และใบเลี้ยงคู่ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยมีความถี่ของไมโครแซทเทลไลท์ที่พบใน EST ของกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยวประมาณ 1.5-7.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มพืชใบเลี้ยงคู่จะพบประมาณ 2.65 ถึง 16.82 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานการใช้เทคนิคนี้ศึกษาสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น การพัฒนาและการทำแผนที่โครโมโซมของข้าวสาลีโดยใช้เครื่องหมาย EST-SSR และการประยุกต์เพื่อค้นหาโครโมโซม Rye ในข้าวสาลี (Li-Fang et al., 2008) การประเมินผลทางพันธุกรรมของ EST-SSR ที่ได้มาจากฝ้าย (Yu et al., 2008) การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในหญ้าสายพันธุ์ gramineous (Linzhi et al., 2008) และการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของเอลมอนด์ป่าโดยใช้เครื่องหมาย EST-SSR (Omirshat et al., 2009) การพัฒนาเครื่องหมาย EST-microsatellite เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พริก (*Capsicum annuum* L.) และการถ่ายโอนเครื่องหมาย EST-microsatellite ในพืชตระกูล *Solonaceae* เช่น มะเขือ ยาสูบ มันฝรั่ง และมะเขือเทศ (Ince et al., 2010) การถ่ายโอนเครื่องหมาย EST-microsatellite ของถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) ในถั่วเขียว (*Arachis hypogaea* L.) (He et al., 2006) การใช้ประโยชน์จากฐานข้อมูล EST-microsatellite ของสายพันธุ์ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) และถั่วลิสงพันธุ์ป่า (Liang et al., 2009) การถ่ายโอนเครื่องหมาย EST-microsatellite ของข้าวบาร์เลย์ในข้าวสาลี ข้าวไรน์ (rye) และข้าว (rice) (Varshney et al., 2005) การถ่ายโอนเครื่องหมายเครื่องหมาย EST-microsatellite ของแอพริคอท (apricot) ในองุ่น (Decroocq et al., 2003) เป็นต้น

การศึกษาพันธุกรรมของกล้วยไม้ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

ได้มีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ด้วยวิธี enrichment โดยการสร้าง DNA library และพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากฐานข้อมูล EST สำหรับการศึกษาพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปถ่ายโอน ในกล้วยไม้ต่างชนิด/ต่างสกุล (cross species/genera transferability) ได้ เช่น การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้พันธุ์ต่าง ๆ ในกลุ่ม *Dendrobium* (Boonsrangsom et al., 2008; Lu et. al., 2012) การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อประเมินความหลากหลาย และโครงสร้างประชากรของกล้วยไม้ *Dendrobium loddigesii* (Cai et al., 2012) การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในกล้วยไม้ *Phalaenopsis gigantea* (Rodrigues and Kumar, 2009) และกล้วยไม้ในสกุล *Phalaenopsis* (Fatimah and Sukma, 2011) การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากกล้วยไม้ *Cymbidium goeringii* และนำไปถ่ายโอนใน (cross-amplification) ใน *Cymbidium sinensis* และ *Cymbidium hybridium* เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ในสกุล *Cymbidium* (Moe et al., 2010) การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของกล้วยไม้ vanilla พันธุ์ปลูก และถ่ายโอนเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ใน vanilla ต่างชนิด (Bory et al., 2008) การพัฒนาเครื่องหมาย EST-microsatellite เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ในกลุ่มของ Chinese orchid (*Cymbidium* spp.) จำนวน 6 ชนิด (*Cymbidium goeringii*, *C. faberi, C. ensifolium*, *C. kanran*, *C. sinense* และ *C. goeringii var. longibracteatum*) (Huang et al., 2010) การพัฒนาเครื่องหมาย EST-microsatellite ในกล้วยไม้สกุลแวนด้า (Teh et al., 2011.) การพัฒนาเครื่องหมาย EST-microsatellite จาก *Dendrobium nobile* และนำไปใช้ประโยชน์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* (*Dendrobium* phylogeny analysis) (Lu et al., 2013.) และการสร้างแผนที่พันธุกรรมของ *Dendrobium moniliforme* และ *D. officinale*ด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite (Lu et al., 2012) เป็นต้น

การตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสม

ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite markers) มาใช้การจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิด และประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี Ritschel et al. (2004) ทำการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จาก enriched genomic library เพื่อการจำแนกพันธุกรรมของเมลอน พบว่า เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ที่พัฒนาได้จำนวน 55 เครื่องหมาย สามารถจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของลูกผสมในโครงการปรับปรุงพันธุ์เมลอนได้อย่างมีประสิทธิภาพและชัดเจน และพบว่าการกระจายตัวของอัลลีลเป็นไปตามหลักการของเมนเดล

(Mendelian expectations) ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ สามารถนำมาใช้ตรวจสอบพันธุกรรมของลูกผสมได้เป็นอย่างดี

สำหรับในกล้วยไม้ได้มีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เช่นเดียวกัน โดยมีรายงานว่า ปรารถนา (2550) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับกล้วยไม้สกุลแวนด้า และพบว่าห้องสมุดจีโนมที่ใช้โพรบแบบ dinucleotide $(CA)_{15}$ และ $(GA)_{15}$ ได้โคลนที่ให้ผลบวกซึ่งมีไมโครแซทเทลไลท์ประมาณ 82 เปอร์เซ็นต์ และได้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ตรวจสอบกล้วยไม้สกุลแวนด้าได้จำนวน 9 เครื่องหมาย Boonsrangsom et al. (2008) ทำการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium sp.)* และสามารถนำเครื่องหมายดังกล่าวมาใช้จัดจำแนกลูกผสมกล้วยไม้จำนวน 49 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 42 เครื่องหมาย ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จากยีนที่มีการแสดงออก (Express sequence tag) จากฐานข้อมูลสาธารณะของ EST เพื่อตรวจสอบเอกลักษณ์หรือตรวจสอบความบริสุทธิ์ของลูกผสมได้ จากการรายงานของ Naresh et al. (2009) ที่ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากฐานข้อมูล EST ของดอกคำฝอย เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ลูกผสม ได้ไพรเมอร์ EST-microsatellite จำนวน 119 คู่ ทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้เครื่องหมาย EST-microsatellite สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จำนวน 74 คู่ จากนั้นทำการตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์พ่อแม่ด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 74 คู่ พบว่ามีเพียงเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 5 คู่ เท่านั้นที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ และเครื่องหมาย EST - microsatellite จำนวน 5 คู่นี้ สามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดอกคำฝอยลูกผสมได้

วิธีการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

การรวบรวมเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ดำเนินโดยโครงการ การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อเป็นไม้ประดับกระถาง (โครงการย่อยที่ 2 ภายใต้ชุดโครงการวิจัย “การพัฒนาสายพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อเพิ่มศักยภาพเชิงพาณิชย์”) นำมาอนุบาลในเรือนเพาะชำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

2. การสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

การสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง โดยใช้วิธี 2% CTAB with phenol-chloroform (Sue et al., 1997) โดยมีรายละเอียด ดังนี้

บดใบกล้วยไม้ให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว แล้วถ่ายผงใบลงในหลอดขนาด 2,000 µl เติม Extraction buffer 650 µl (100 mM Tris 1.4 M NaCl 20 mM EDTA (pH 8.0) 2% CTAB 0.3% β-mercaptoethanol) และเติม PVP ประมาณ 50 mg ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 65˚C นาน 25-60 นาที นำออกมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 4- 6 นาทีและเติม chloroform: octanol (24:1) ปริมาตร 650 µl ผสมโดยกลับหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยง 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม chloroform: octanol (24:1) อีกเพื่อกำจัด PVP ในสารละลายปั่นเหวี่ยง 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่เติม 1/2 volumeของ 5 M NaCl ผสมให้เข้ากัน และเติม 2 volume ของ 95% ethanol ที่เย็นจัดผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ตากตะกอนที่ 37˚C หรือใน vacuum จนแห้ง ละลายตะกอนด้วย TE buffer 300 µl ที่ 4-6˚C 1 คืน

เติม 3 µl RNase A (10 mg/ml) บ่มที่ 37˚C 60 นาที และเติม Proteinase K 3 µl (1 mg/ml) บ่มที่ 37˚C อีก 15-30 นาที เติม phenol: chloroform ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10-20 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 2 M sodium acetate ปริมาตร 1/10 เท่า และ absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20˚C นาน 1 คืน ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10-20 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ตากตะกอนให้แห้ง เติม TE buffer 100-200 µl เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ เก็บที่ -20˚C

การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส (Agarose gel electrophoresis) 1.0 % โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณที่แน่นอนด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 80 โวลต์ ในสารละลาย 1x TBE buffer การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอภายใต้แสง UV และภาพถ่ายโดยใช้เครื่อง Gel document

3. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จาก EST database ของกล้วยไม้

3.1 การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จาก EST database ของกล้วยไม้

สืบค้นหาลำดับเบสของ EST จากฐานข้อมูลของกล้วยไม้สกุลต่างๆ และรวบรวมข้อมูลโดยเฉพาะจากฐานข้อมูลใน GenBank Database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) จากนั้นนำมาจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม CAP3 Sequence Assembly Program (http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php) (Huang and Madan, 1999) ความยาวไม่เกิน 5.4 เมกะเบส แล้วนำข้อมูลที่ได้มาค้นหาไมโครแซทเทลไลท์ และออกแบบไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Troll software (http://wsmartins.net/websat/) โดยกำหนดค่าการค้นหาจำนวนเบสซ้ำน้อย ได้แก่ เบสซ้ำหนึ่งเบส (mono-repeat motif) สองเบส (di-repeat motif) สามเบส (tri-repeat motif) สี่เบส (tetra-repeat motif) ห้าเบส (penta-repeat motif) และหกเบส (hexa-repeat motif) ให้มีจำนวนซ้ำน้อยที่สุดเป็น 10 6 5 4 4 และ 4 ซ้ำตามลำดับ เมื่อได้ลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์แล้ว ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่ขนาบข้างกับไมโครแซทเทลไลท์ โดยมีหลักเกณฑ์ในการออกแบบไพรเมอร์ ดังนี้ ความยาวของไพรเมอร์ (primer length) ระหว่าง 18-27 คู่เบส ปริมาณ GC (GC content) 40-80 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิในการ annealing ระหว่าง 57-68˚C และขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (product size) ประมาณ 100-400 คู่เบส

3.2 ทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

ตรวจสอบความสามารถของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ ประมาณ 25-30 ng, dNTPs 0.25 mM forward และ reverse primers 0.25 µM 1x PCR buffer (with 1.5 mM $MgCl_2$) (ขึ้นอยู่กับไพรเมอร์แต่ละคู่ ที่ต้องมีการปรับเพิ่ม $MgCl_2$) และ 1 U *Taq* polymerase ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้โปรแกรมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94˚C นาน 3 นาที ตามด้วย PCR cycle จำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94˚C นาน 30 วินาที annealing นาน 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72˚C นาน 1 นาที และ long extension ที่อุณหภูมิ 72˚C นาน 10 นาทีโดยใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่แตกต่างกัน คือ 48 50 52 54 56 58 และ 62 ˚C ตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะการโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

3.3 การตรวจสอบการถ่ายโอนของ G - microsatellite ของกล้วยไม้ชนิดอื่นในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (Cross transferability of G – microsatellite)

สืบค้นหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของกล้วยไม้ชนิดอื่น ที่มีเผยแพร่ในบทความวิจัย รวมทั้งหมด จำนวน 35 คู่ ประกอบด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* จำนวน 29 คู่ กล้วยไม้ *Serapias vomeracea* จำนวน 6 คู่ (ตารางที่ 1)

นำมาตรวจสอบความสามารถของไพรเมอร์ ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ด้วยองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 25 ng dNTPs 0.25 mM Forward และ Reverse primers 0.25 µM 1x PCR buffer (with 15 mM $MgCl_2$) และ *Taq* polymerase 0.5 ยูนิต ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ˚C นาน 5 นาที ตามด้วย PCR cycle จำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ˚C นาน 30 วินาที annealing (Gradient annealing temperature) นาน 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72˚C นาน 1 นาที แล้วตามด้วย Long Extension ที่ 72˚C นาน 10 นาที 1 ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 1 รายชื่อไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ของกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ ที่มีเผยแพร่ในบทความวิจัย รวมทั้งหมด จำนวน 35 คู่

Primer name		Sequence 5'-3'		Tm (°C)	Orchid source.	Reference
		Forward primer	Revert primer			
1	ORCA40	CAAGCTACTTCAGACTCATC	GAAGACACTGCTCATATTTC	55	*Dendrobiums* sp.	ทิพวัลย์ 2549
2	ORCA63	TCTTGTAATTCAAAGCGGGC	GGCAAAGATCCATCACCAAC	50	*Dendrobiums* sp.	ทิพวัลย์ 2549
3	ORCA84	TGCTCTTGCATTCCTTACGACT	CACGAGGAAGAAATGCACACTC	50	*Dendrobiums* sp.	ทิพวัลย์ 2549
4	ORCA165	GAAGGAGAACCTTGTGTGCAAC	TGTCACTATGTGTTGGCTTGCT	50	*Dendrobiums* sp.	ทิพวัลย์ 2549
5	ORCT6	CTCCTTGCTTGGATTTGCTTC	CACCTCATCACATCTTGCCAT	50	*Dendrobiums* sp.	ทิพวัลย์ 2549
6	ORCT8	GAGGTGGGGATGAGGAATAGA	ATCTAGCCACCAGTGCTGCCA	50	*Dendrobiums* sp.	ทิพวัลย์ 2549
7	ORCT11	AGCAGCACTTGGGTTTATGTC	GAATCTGAACTGCATGGCTCT	50	*Dendrobiums* sp.	ทิพวัลย์ 2549
8	ORCT33	TGCATCTGGGAATGTGAGAG	ACCCATTGCCTATGATGGAA	50	*Dendrobiums* sp.	ทิพวัลย์ 2549
9	ORCT35	AATCCTACACTTTGGCAACAAA	TTTGAATCCTCTTGGACGTTCT	50	*Dendrobiums* sp.	ทิพวัลย์ 2549
10	ORCT40	GGCTCTGGAGATAACTAGGTTC	CGTTCTCCAGCTCTTCCTCT	50	*Dendrobiums* sp.	ทิพวัลย์ 2549
11	ORCT52	GGCAACCCCATCTATAGCAA	ATGGCTATCGACTCCTCGAA	55	*Dendrobiums* sp.	ทิพวัลย์ 2549
12	ORCT58	ATGGAGAGGGATGAAGAGTGT	ATCCCATTACCTTTGGAGTCTC	55	*Dendrobiums* sp.	ทิพวัลย์ 2549
13	ORCT59	TGGAAGTTTCGGCATTACAC	GTAGGGTAATAGTAGCCTACCT	55	*Dendrobiums* sp.	ทิพวัลย์ 2549
14	ORCT69	AAGAGGAAGGATCTACTC	ATAATGTGGCTTAGTCAG	55	*Dendrobiums* sp.	ทิพวัลย์ 2549
15	ORCT72	GCTTCACCAACTTCCGAGAC	GGCCATGCTTTCCTTCACTA	50	*Dendrobiums* sp.	ทิพวัลย์ 2549
16	sv01	TTTAGATGGCTGTGTGTGTTAGG	CAGCACATCCCATCCCTCTAAATCC	55	*Serapias*	Pellegrino et al., 2001
17	sv02	GTGTGAGGTGTAGTTGAGGAGA	TTTTGCTCACCTCCATCAGC	58	*Serapias*	Pellegrino et al., 2001
18	sv03	TAATAGGTTGGGATGTCTTAGAGGG	ACAGCACTCACACTCTGAACTCTCC	55	*Serapias*	Pellegrino et al., 2001

ตารางที่ 1 รายชื่อไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ของกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ ที่มีเผยแพร่ในบทความวิจัย รวมทั้งหมด จำนวน 35 คู่ (ต่อ)

Primer name		Sequence 5'-3'		Tm (°C)	Orchid source.	Reference
		Forward primer	Revert primer			
19	sv04	CTGGTCTCTTCTTTCTGGAT	AACACCAACACACATATACAT	55	*Serapias vomeracea*	Pellegrino et al., 2001
20	sv05	GTCAACCACCTCTTTGCATG	GGTTGAACACTGCTCGTCTACCGA	58	*Serapias vomeracea*	Pellegrino et al., 2001
21	sv06	CATTACAACAAGTTTAGAGCGG	GATATAGTTGCCGACTAATCC	55	*Serapias vomeracea*	Pellegrino et al., 2001
22	OA08	AGGCAAAATATAACATACCTCAAT	AATCAAGCCATTTATCTCCTCT	48	*Dendrobium*	Yue et al., 2006
23	OA12	GCATTCTTTTGCCTAATTCAGGAA	TCCACCCTTTCATCCAAATACTTC	50	*Dendrobium*	Yue et al., 2006
24	OA15	ACAGCGTTAACATAAACCATAAGC	CTGCCCGCAGATTCAGC	50	*Dendrobium*	Yue et al., 2006
25	OA18	GGAACGGAGAAGATTAAGACAACC	TGCCCTCACATGCCGTATT	50	*Dendrobium*	Yue et al., 2006
26	OA19	TAAGGCAAACTTGAGTGCTTTATT	CTTGTGATTTCTTTGCCTTTCTT	50	*Dendrobium*	Yue et al., 2006
27	OA20	CATATATTAGCCACTTCACTCTC	ATGTCCACCTCCCTAAAATAGTA	50	*Dendrobium*	Yue et al., 2006
28	OA21	AAATGGGGAAAAAGGAAAGGAC	ATCCCTCCCCTCGCTCTCTC	50	*Dendrobium*	Yue et al., 2006
29	OA23	CATCCCAGCCCTTTTTCAC	GAGAGCAAGAGGAGGATGGAA	45	*Dendrobium*	Yue et al., 2006
30	OA24	GAGCAACGGGAGGGATAGAGATAT	ACCTCTGTCTCCCTCTTGTCCATC	50	*Dendrobium*	Yue et al., 2006
31	OA25	GGAAGGGCCTAAGTGGATG	GCGTACCATGCTTAACATTCA	55	*Dendrobium*	Yue et al., 2006
32	OA07	CCTATCCGAGGAGAACCATAA	AAGCTTTGAGATTCTTTTGTGACT	50	*Dendrobium*	Yue et al., 2006
33	S122	GTGACTCGAGCCTTGGAATACG	ACGCCGGTGAAAGAAGAAGAG	50	*Dendrobium*	Yue et al., 2006

**Tm = Malting temperature

4. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

4.1 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting)

นำดีเอ็นเอของเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ EST - microsatellite ที่ได้จากการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้ม้าวิ่ง (ข้อ 3.2) และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของกล้วยไม้ชนิดอื่น (ข้อ 3.3) บันทึกข้อมูลอัลลีลของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างของเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่นำมาศึกษาในรูปแบบไบนารี่ โดยกำหนดให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ และไม่ปรากฏ เป็น 1 และ 0 ตามลำดับ

4.2 ค่า Polymorphic information content (PIC)

การคำนวณค่า Polymorphic information content (PIC) หรือ Heterozygosities ของ RAPD markers ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกโอกาสที่จะพบตัวอย่างที่สุ่มมาโดยสุ่ม (random sampling) สองตัวอย่างที่มีความแตกต่างกัน (polymorphisms) ที่ตำแหน่งของ marker ที่กำหนด โดยประเมินจาก

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

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

4.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์กล้วยไม้ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NYSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) (Rohlf, 2000) โดยอาศัยค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice (Dice's Similarity coefficient) จากนั้นนำมาคำนวณหา Genetic similarity ระหว่างจีโนไทป์ของสายพันธุ์กล้วยไม้ที่นำมาศึกษา สร้างเป็น Genetic similarity matrix ซึ่งจะใช้เป็น ข้อมูลในการวิเคราะห์ cluster analysis เพื่อจัดกลุ่มสายพันธุ์กล้วยไม้ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Dendrogram) โดยอาศัยการวิเคราะห์ด้วยวิธี unweighted pair group method on the basis of arithmetic averages (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) และวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (Principal component analysis: PCA)

5. การตรวจสอบลูกผสมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

นำลูกผสมต่างสกุลที่ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์ จากการสร้างลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับ กล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีส จำนวน 4 คู่ และกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับ กล้วยไม้สกุลเข็ม จำนวน 2 คู่ผสม จากโครงการ “การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพื่อเป็นไม้ประดับกระถาง” (โครงการย่อยที่ 2) และสายพันธุ์พ่อแม่ สกัดดีเอ็นเอตามวิธี 2% CTAB with phenol-chloroform (Sue et al., 1997) ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายชื่อคู่ผสมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับ กล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีส จำนวน 4 คู่ และกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับ กล้วยไม้สกุลเข็ม จำนวน 2 คู่ผสม รวมจำนวน 6 คู่ผสม

ลำดับ	สายพันธุ์แม่	สายพันธุ์พ่อ
1	*Phalaenopsis wedding*	NK14 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*)
2	*Phalaenopsis wedding*	PK3 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*)
3	*Phaleanopsis ember var wedding*	RE4 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*)
4	NK13 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*)	*Phalaenopsis*-Red
5	UN10 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*).	*Ascocentrum* sp. (เข็มแดง)
6	NK4 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*).	*Ascocentrum* sp. (เข็มแสด)

5.1 การตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสมด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite

ตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสม จำนวน 6 คู่ (ตารางที่ 2) ด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite ที่ได้จากการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง มาคัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ได้ ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ ประมาณ 25-30 ng 0.25 mM dNTPs 0.25 µM Forward และ Reverse primers 1x PCR buffer (with 15 mM $MgCl_2$) และ 1 U *Taq* polymerase แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้โปรแกรมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94˚C นาน 3 นาที ตามด้วย PCR cycle จำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94˚C นาน 30 วินาที specific annealing นาน 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 ˚C นาน 1 นาที และ long extension ที่อุณหภูมิ 72˚C นาน 10 นาที จากนั้นนำมาแยกขนาดและความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ด้วย 7 % polyacrylamide gel ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 60 วัตต์ ที่อุณหภูมิ 45˚C นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำกระจกมาย้อมด้วย silver nitrate เพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น

5.2 การตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสมด้วยเครื่องหมายจีโนมิกไมโครแซทเทลไลท์ของกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ

ตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสม จำนวน 6 คู่ ด้วยเครื่องหมายจีโนมิกไมโครแซทเทลไลท์ของกล้วยไม้ชนิดอื่น ที่ได้จากการสืบค้นจากบทความวิจัย สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 8 คู่ มาคัดเลือกเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ได้ ด้วยองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 25 ng dNTPs 0.25 mM Forward และ Reverse primers 0.25 µM 1x PCR buffer (with 15 mM $MgCl_2$) และ *Taq* polymerase 0.5 ยูนิต ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ โดยใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ˚C นาน 5 นาที ตามด้วย PCR cycle จำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ˚C นาน 30 วินาที annealing (Gradient annealing temperature) นาน 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 ˚C นาน 1 นาที แล้วตามด้วย Long Extension ที่ 72 ˚C นาน 10 นาที 1 ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

สืบค้นหาเครื่องหมายจีโนมิกไมโครแซทเทลไลท์ของกล้วยไม้ชนิดอื่นเพิ่มอีก จำนวน 25 คู่ (ตารางที่ 3) ประกอบด้วย กล้วยไม้สกุล *Cymbidium* จำนวน 5 คู่ และสกุล *Phalaenopsis* จำนวน 20 คู่ ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 20 µl ประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ ประมาณ 25-30 ng dNTPs 0.25 mM Forward และ Reverse primers 0.25 µM 1x PCR buffer (with 15 mM $MgCl_2$) และ *Taq* polymerase 1 ยูนิต โดยใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่แตกต่างกันดังนี้

ไพรเมอร์ที่ได้จากกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* ใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ˚C นาน 3 นาที ตามด้วย PCR cycle รอบที่ 1 จำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ˚C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 ˚C นาน 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 ˚C นาน 1 นาที PCR cycle รอบที่ 2 จำนวน 10 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ˚C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 53 ˚C นาน 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72˚C นาน 1 นาที และ long extension ที่อุณหภูมิ 72˚C นาน 10 นาที

ไพรเมอร์ที่ได้จากกล้วยไม้สกุลสกุลฟาแลนอปซีส ใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 ˚C นาน 3 นาที ตามด้วย PCR cycle จำนวน 35 รอบ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94˚C นาน 30 วินาที specific annealing นาน 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72˚C นาน 1 นาที และ long extension ที่อุณหภูมิ 72˚C นาน 10 นาที และ ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3 รายชื่อไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้จากการสืบค้นจากกล้วยไม้ชนิดอื่นที่จะนำมาตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสมเพิ่มเติม จำนวน 25 คู่

	Primer name	Sequence 5'-3'		Tm (°C)	Orchid source	Reference
		Forward primer	Revert primer			
1	KNU-CC-32	AAAACCTTGATCCTCACAAGA	TGGGTCGACATGATCTGT T	55	*Cymbidium* sp.	Moe et al., 2010
2	KNU-CC-43	TCGCTGCGCCTATACAGT	CTCAGCTGTTGCCTCCAC	55	*Cymbidium* sp.	Moe et al., 2010
3	KNU-CC-40	AAGCTCTGTCTTCATCCTTCAA	TGGTGTGGAGAGAGGTTTTT	55	*Cymbidium* sp.	Moe et al., 2010
4	KNU-CC-55	AAGGTTGCATTTTCCCTCA	ACTAGGTGGGGTCGGCTA	55	*Cymbidium* sp.	Moe et al., 2010
5	KNU-CC-71	GATTTCAGCCCTCGGAGT	ACTAGGTGGGGTCGGCTA	55	*Cymbidium* sp.	Moe et al., 2010
6	PAC209	GGCGCGGCACACACACACA	CATCCAGAGGCAGTGAGACA	59	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
7	PGVB11	TGCATTCTTGCTTCGTTTTG	CGAGAAGCATTAAGCTGCATT	59	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
8	PGAC05	TGCGAAAACACACACACACA	ACCCTCCCTCACTCATTTCC	60	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
9	PGA06	GTGAAAGACACACACACACACA	GGTTGTACGCCTTTGTCGAT	58	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
10	PGA16	TGAACGAACACACACACACACA	TTGGCCTTAAGGATAATACATCAA	58	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
11	PGA04	GGGCACACACACACACACA	CACACACACACCCAAAAAGC	58	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
12	PGCT17	GGAAGGCCTCTCTCTCTCTCTCT	TCTCCCTCTCCATCACACATT	59	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
13	PGB209	TGTCTCACTGCCTCTGGATG	TGGGCGGACACACCACAC	59	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
14	PPGAC40	GGCAGGAACACACACACAC	CGGGACAATTATGGACCAAT	58	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
15	PGJ45	TAGAGGCACTGCATTTGTGC	ATGATTTCCGGTTGGTTGAG	60	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009

ตารางที่ 3 รายชื่อไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้จากการสืบค้นจากกล้วยไม้ชนิดอื่นที่จะนำมาตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสมเพิ่มเติม จำนวน 25 คู่ (ต่อ)

	Primer name	Sequence 5'-3'		Tm (°C)	Orchid source	Reference
		Forward primer	Revert primer			
16	PGCT35	GGGGCACCTCTCTCTCTCTCT	CACCGCACACAGATCAAAAG	59	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
17	PGAC36	GACGGACACACACACACACAC	TGTGCCAAAATAATTCCCATC	59	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
18	PGV01	TGGGAATGATGATTAGTTTGGA	CCAAATTTGACCCTTTTCA	59	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
19	PGCT13	GGAAGGGCTCTCTCTCTCTCT	TTGCCCTCCTCTCTTTCTTT	58	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
20	PGCT15	GAGAGAGGGAGGCATACTTTG	GGTTGAGAAGGTGGGATGAA	58	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
21	PGE13	GTCCCAATGATGATGATGATGAT	TGATGGTCATCCCTTAGGAAA	59	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
22	PGCT20B	AGCGACGAGCATAAAAAGGA	CATCTCTCCTCTCCCACCAT	59	*Phalaenopsis gigantea*	Rodrigues and Kumar, 2009
23	IPS7	GTTTGTTGTCAGAGAAGCATT	AATTGAGACCTTCACTTCCTC	57	*Phalaenopsis* Orchid	Fatimah, 2011
24	IPS14	TAGTTTGTTTCGTGGTTCAGT	TGGTGTGAATTATCTCGTTCT	57	*Phalaenopsis* Orchid	Fatimah, 2011
25	IPS15	CGTTTCACTCAAAGTTTTGTT	TCCTGACGTAATATTTGTTGG	57	*Phalaenopsis* Orchid	Fatimah, 2011

ผลการวิจัย

1. การเก็บรวบรวมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

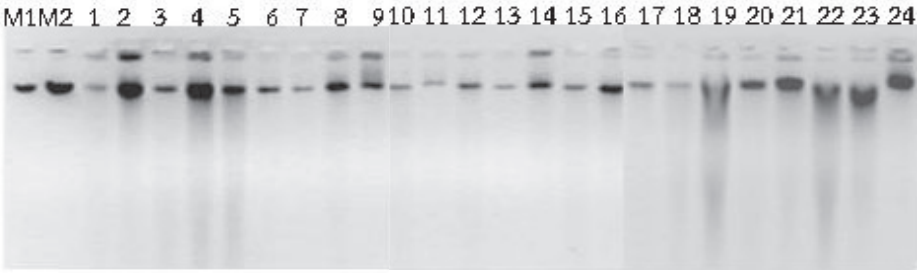
การรวบรวมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือแล้วนำมาอนุบาลในเรือนเพาะชำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประกอบด้วย กล้วยไม้แดงอุบล จำนวน 15 ตัวอย่าง และกล้วยไม้ม้าวิ่ง จำนวน 9 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 รายชื่อกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่รวบรวมจากสถานที่ต่าง ๆ ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 24 ตัวอย่าง

ลำดับ	รหัสพันธุ์	ชื่อพันธุ์	สถานที่รวบรวม
1	RO4	แดงอุบล	ซื้อจากชาวบ้าน จ.ร้อยเอ็ด
2	RO10	แดงอุบล	ซื้อจากชาวบ้าน จ.ร้อยเอ็ด
3	CM8	แดงอุบล	ต. ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลราชธานี
4	CM11	แดงอุบล	ต. ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลราชธานี
5	CM16	แดงอุบล	ต. ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลราชธานี
6	DB6	แดงอุบล	ซื้อจากชาวบ้าน ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลราชธานี
7	DB8	แดงอุบล	ซื้อจากชาวบ้าน ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลราชธานี
8	MDD2	แดงอุบล	ซื้อที่ตลาดอินโดจีน อ.เมือง จ.มุกดาหาร
9	MDD3	แดงอุบล	ซื้อที่ตลาดอินโดจีน อ.เมือง จ.มุกดาหาร
10	MDD6	แดงอุบล	ซื้อที่ตลาดอินโดจีน อ.เมือง จ.มุกดาหาร
11	MDD10	แดงอุบล	ซื้อที่ตลาดอินโดจีน อ.เมือง จ.มุกดาหาร
12	MDD11	แดงอุบล	ซื้อที่ตลาดอินโดจีน อ.เมือง จ.มุกดาหาร
13	MDD15	แดงอุบล	ซื้อที่ตลาดอินโดจีน อ.เมือง จ.มุกดาหาร
14	MDD20	แดงอุบล	ซื้อที่ตลาดอินโดจีน อ.เมือง จ.มุกดาหาร
15	MDD22	แดงอุบล	ซื้อที่ตลาดอินโดจีน อ.เมือง จ.มุกดาหาร
16	MV4	ม้าวิ่ง	ซื้อจากชาวบ้าน ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลราชธานี
17	PT1	ม้าวิ่ง	อุทยานแห่งชาติภูผาเทิบ จ.มุกดาหาร
18	PT2	ม้าวิ่ง	อุทยานแห่งชาติภูผาเทิบ จ.มุกดาหาร
19	MDM14	ม้าวิ่ง	ซื้อที่ตลาดอินโดจีน อ.เมือง จ.มุกดาหาร
20	MDM18	ม้าวิ่ง	ซื้อที่ตลาดอินโดจีน อ.เมือง จ.มุกดาหาร
21	MDM21	ม้าวิ่ง	ซื้อที่ตลาดอินโดจีน อ.เมือง จ.มุกดาหาร
22	MVP2	ม้าวิ่ง	อ.โพธิ์ไทร จ.อุบลราชธานี
23	MVP26	ม้าวิ่ง	อ.โพธิ์ไทร จ.อุบลราชธานี
24	MVP27	ม้าวิ่ง	อ.โพธิ์ไทร จ.อุบลราชธานี

2. การสกัดดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างกล้วยไม้ จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน (Lambda DNA) ความเข้มข้น 50 และ 100 นาโนกรัม ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1x TBE buffer โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ถ่ายภาพเจลอะกาโรส โดยใช้ Gel document พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ มีความเข้มข้นประมาณ 3 - 10 ไมโครกรัม ต่อไมโครลิตร (ภาพที่ 1)

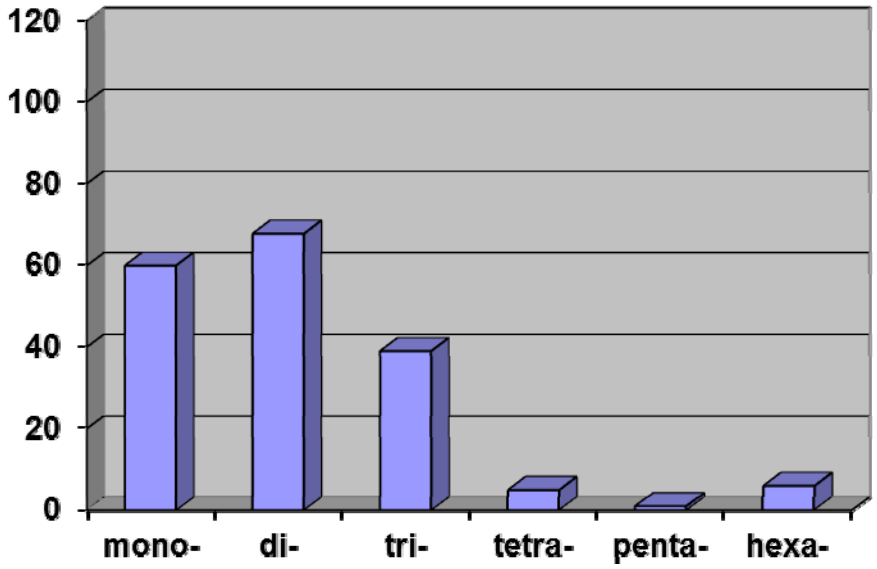


ภาพที่ 1 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแสดงปริมาณจีโนมิกดีเอ็นเอของกล้วยไม้ จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐาน (M1= DNA standard 100 ng, M2 = DNA standard 200 ng (Fermentas))

3. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จาก EST database ของกล้วยไม้

3.1 การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จาก EST database ของกล้วยไม้

จากการค้นหาลำดับเบสของเครื่องหมาย EST จากฐานข้อมูลของกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ จากฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). (สืบค้นเมื่อเดือนกุมภาพันธ์ 2553) ได้ข้อมูลลำดับเบส EST ของกล้วยไม้ทั้งหมด จำนวน 8,009 ลำดับเบส ข้อมูล mRNA ของกล้วยไม้สกุล *Doritis* 14 ลำดับเบส และ mRNA ของกล้วยไม้สายพันธุ์อื่น ๆ อีก 88 ลำดับเบส บันทึกข้อมูลลำดับเบสในรูปแบบ FASTA จากนั้นทำการจัดกลุ่มข้อมูลและคัดเลือกคุณภาพของข้อมูลโดยใช้โปรแกรม CAP3 Sequence Assembly Program (http://pbil.univ-lyon1.fr/ cap3.php) (Huang and Madan, 1999) โดยกำหนดความยาวไม่เกิน 5.4 เมกะเบส พบว่า ได้ข้อมูลที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานทั้งหมด 1,261 ลำดับเบส ค้นหา EST ที่มีไมโครแซทเทลไลท์ และออกแบบไพรเมอร์ที่เป็น unique sequence ขนาบหัวท้ายกับไมโครแซทเทลไลท์ โดยใช้โปรแกรม Troll software (http://wsmartins.net/websat/) พบว่า ได้ข้อมูลไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ ทั้งหมด จำนวน 177 คู่ ประกอบด้วย ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบลำดับเบสซ้ำ 1 เบส (mono-type) จำนวน 60 คู่ คิดเป็น 33.90 เปอร์เซ็นต์ ลำดับเบสซ้ำ 2 เบส (di-type) จำนวน 68 คู่ คิดเป็น 38.42 เปอร์เซ็นต์ ลำดับเบสซ้ำ 3 เบส (tri-type) จำนวน 37 คู่ คิดเป็น 22.03 เปอร์เซ็นต์ ลำดับเบสซ้ำ 4 เบส (tetra-type) จำนวน 5 คู่ คิดเป็น 2.82 เปอร์เซ็นต์ ลำดับเบสซ้ำ 5 เบส (penta-type) จำนวน 1 คู่ คิดเป็น 0.56 เปอร์เซ็นต์ และลำดับเบสซ้ำ 6 เบส (hexa-type) จำนวน 6 คู่ คิดเป็น 3.39 เปอร์เซ็นต์ โดยรูปแบบของลำดับเบสซ้ำ 1 เบส พบมากที่สุดคือ A/T คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบ 32.20 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เบสซ้ำ 2 เบส คือ TC/GA คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบ 15.17 เปอร์เซ็นต์ และ AG/CT คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบ 11.24 เปอร์เซ็นต์ รูปแบบของลำดับเบสซ้ำ 3 เบสที่พบมากคือ CGG/CCG คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบ 8.43 เปอร์เซ็นต์ รูปแบบของลำดับเบสซ้ำ 4 เบสที่พบมากคือ AAAC/GTTT คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความถี่ที่พบ 2.81 เปอร์เซ็นต์ส่วนลำดับเบสซ้ำ 5 เบส และ 6 เบส จะพบค่อนข้างน้อย (ภาพที่ 2 ตารางที่ 5)



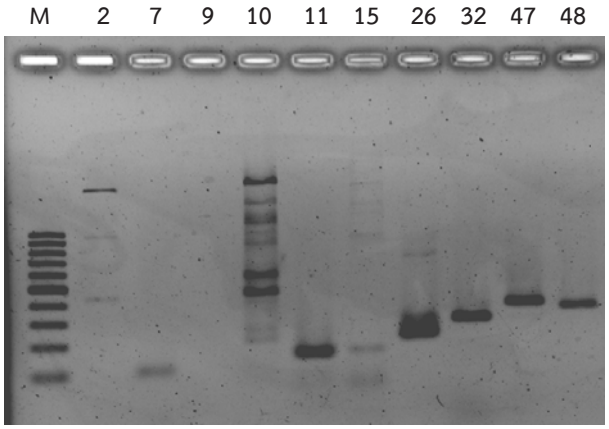
ภาพที่ 2 Histogram แสดงความถี่ของ EST-microsatellite จำนวนทั้งหมด 177 คู่ ที่จำแนกตามชนิดของลำดับเบสซ้ำ ได้แก่ mono- di- tri- tetra- penta and hexa – nucleotide repeats

ตารางที่ 5 จำนวน และความถี่ของลำดับเบสซ้ำชนิดต่างๆ ที่พบใน ESTs ของกล้วยไม้

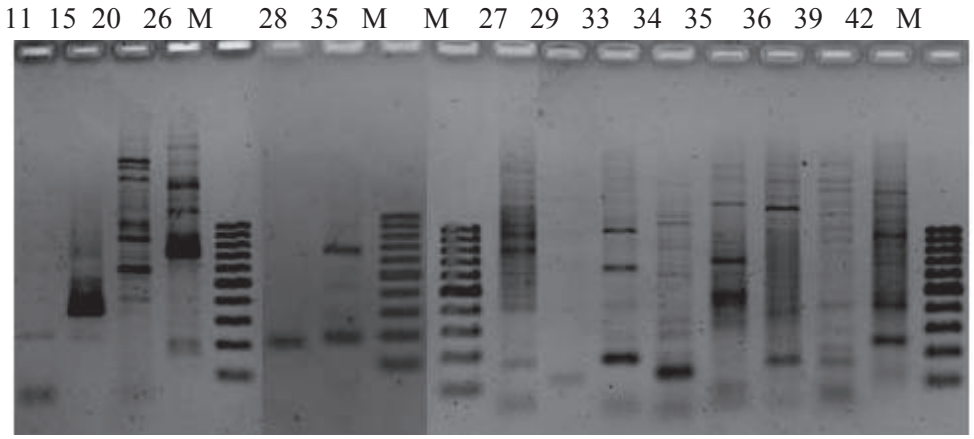
Repeat unit	SSR motif	Number	Frequency
mono-repeat	A/T	57	32.02247
	G/C	3	1.685393
di-repeat	AT	10	5.617978
	TA	8	4.494382
	CA	1	0.561798
	AC/GT	2	1.123596
	AG/CT	20	11.23596
	TC/GA	27	15.16854
tri-repeat	AAG/CTT	3	1.685393
	AGG/CCT	2	1.123596
	ATC/GAT	2	1.123596
	AGA/TCT	1	0.561798
	ATA/TAT	1	0.561798
	CAA/TTG	3	1.685393
	CGG/CCG	15	8.42697
	GAC/GTC	1	0.561798
	GCG/CGC	3	1.685393
	GTG/CAC	3	1.685393
	TGA/TCA	1	0.561798
	TGG/CCA	1	3.571429
	TTC/GAA	2	1.123596
tetra-repeat	AAAC/GTTT	5	2.808989
penta-repeat	TTGGT/ACCAA	1	0.561798
	CCCAAA/TTTGGG	2	1.123596
hexa-repeat	CGGCAG/CTGCCG	3	1.685393
	TAACCC/GGGTTA	1	0.561798

3.2 ทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเครื่องหมาย EST-microsatellite ที่พัฒนาได้ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

จาก EST-microsatellite ที่ออกแบบได้ จำนวน 177 คู่ ทำการเลือกไพรเมอร์ EST-microsatellite ที่มีขนาดของแถบดีเอ็นเอที่คาดหมาย (expected size) ประมาณ 100 – 400 คู่เบส จำนวน 100 คู่ ที่ได้จากการออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมด จำนวน 177 คู่ มาทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยการปรับอุณหภูมิในการเข้าคู่ระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์ (annealing temperature) ณ อุณหภูมิต่าง ๆ (ระหว่าง 48 – 65˚C) พบว่ามีไพรเมอร์ EST-microsatellite จำนวน 12 คู่ (คู่ที่ 1-12) (ภาพที่ 3 และ ตารางที่ 6) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จากนั้นทำการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง โดยการปรับความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น เป็น 1.25 มิลลิโมลาร์ พบว่าได้ไพรเมอร์ EST-microsatellite ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งเพิ่มอีก จำนวน 13 คู่ (คู่ที่ 13-25) (ภาพที่ 4 ตารางที่ 6) รวมไพรเมอร์ EST-microsatellite ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 25 คู่ คิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ของไพรเมอร์ที่เลือกมาทั้งหมด (ตารางที่ 6) และไพรเมอร์ที่ได้นี้จะนำไปสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง และตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับกล้วยไม้สกุลอื่นต่อไป



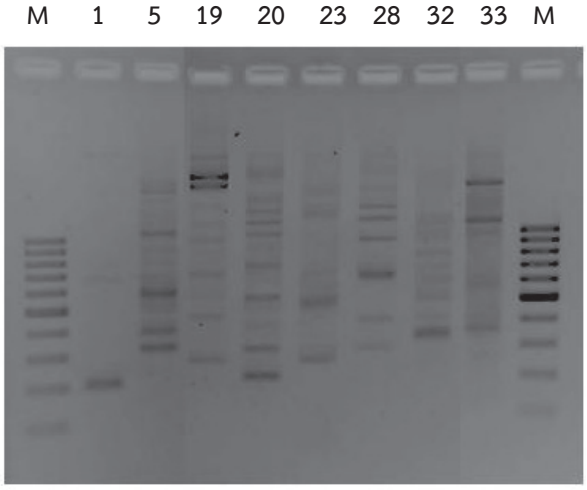
ภาพที่ 3 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ด้วยไพรเมอร์ EST - microsatellite (M = DNA marker 100 bp (Fermentas)
2 = ORESTM5 (A2) 7 = ORESTM59 (A7) 9 = ORESTM109 (A9)
10 = ORESTM115 (A10) 11 = ORESTM127 (A11) 15 = ORESTM136 (A15)
26 = ORPHESTM16 (A26) 32 = ORESTM27 (A47) 47 = ORESTM27 (A47)
48 = ORESTM35 (A48))



ภาพที่ 4 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ด้วยไพรเมอร์ EST-microsatellite ที่มีการเพิ่มปริมาณ $MgCl_2$ (M = DNA marker 100 bp (Fermentas) 11 = CL491CONTIG1-(B11) 15 = GI|109152185-(B15) 20 = GI|110663752-(B20) 26 = CL340CONTIG1-(B26) 27 = CL455CONTIG1-(B27) 28 = GI|109151933-(B28) 29 = GI|109153057-(B29) 33 = GI|109153889-(B33) 34 = GI|109154341-(B34) 35 = CL106CONTIG1-(B35) 36 = CL275CONTIG1-(B36) 39 = CL106CONTIG1-(B39) 42 = CL32CONTIG1-(B42))

3.3 การตรวจสอบการถ่ายโอนของ G-microsatellite ของกล้วยไม้ชนิดอื่นในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (Cross transferability of G-microsatellite)

การสืบค้นเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากกล้วยไม้สกุลอื่นที่มีเผยแพร่ในบทความวิจัย จากกล้วยไม้สกุล *Dendrobiums* จำนวน 29 คู่ และสกุล *Serapias vomeracea* จำนวน 6 คู่ (ตารางที่ 6) ได้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ทั้งหมด จำนวน 35 คู่ นำมาทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้ม้าวิ่ง โดยใช้องค์ประกอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเช่นเดียวกันกับการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite โดยปรับอุณหภูมิที่ใช้ในการเข้าคู่ระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรเมอร์ (annealing temperature) ผลการตรวจสอบ พบว่า ได้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้อย่างชัดเจน จำนวน 8 คู่ คิดเป็น 22.86 เปอร์เซ็นต์ของไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ที่นำมาทดสอบ และไพรเมอร์ที่ได้จะนำไปสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง และนำไปทดสอบในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับกล้วยไม้สกุลอื่นต่อไป (ภาพที่ 5 ตารางที่ 7)



ภาพที่ 5 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งด้วยไพรเมอร์ที่ได้จากกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ จำนวน 8 คู่ (M = 100 bp (Fermentas), 1 = ORCA40 (C1) 5 = ORCT6 (C5) 19 = OA20 (C19) 20 = sv04 (C20) 23 = OA08 (C23) 28 = S130 (C28) 32 = S122 (C32) 33 = OA19 (C33))

ตารางที่ 6 EST - microsatellite primers จากฐานข้อมูล EST กล้วยไม้วงศ์ Orchidaceae จำนวน 25 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้ม้าวิ่งได้

ลำดับ	Name	Forward sequence (5'-3')	Revert sequence (5'-3')	Temp.	Product size	Repeat motif
1	ORESTM127 (A11)	CTTGATGAATGTGAGGAAACCA	AAACCTTACTGTTGGGCACACT	62	~200bp	(CAA)5
2	ORESTM136 (A15)	ACCCTTTTCTTGGCTTCTAACC	ATGGAGTGGATCTCTTGCTCTC	58	~150bp	(AG)5
3	ORPHESTM16 (A 26)	TGGAAATGACAAGGTTTCTGTG	TTGAGCTTAGGAGGCAAATAGG	62	~230bp	(GGAGCA)4
4	ORESTM8(A 32)	GTCTTGGTCTGATGAACATGGA	TTGTTGTTGTTATTGCTACCGC	58	~250bp	(CAA)5
5	ORESTM27 (A 47)	ATTGACGATGAAACCATGACTG	AGAAATACTCACCACTGCCCTG	62	~400bp	(GGC)5
6	ORESTM35 (A 48)	TCTTTTCTCCCTCTCCATTCAG	AGAAGCAGCAGAACTAGAACCG	58	~350bp	(GA)6
7	ORESTM59(A7)	TTCTTCTGTGCATCTTTTGCTC	CACAAACCCAATTTAACACCCT	54	120bp	(A)11
8	CL296CONTIG1-(B2)	AGACGGGCTTAATGATGTCATT	TGGTATGTATGTAAATGCCCCA	56	250	(TGG)5
9	CL195CONTIG1-(B9)	AAGTCGTTGCTTCTCCCTCTC	AAAGGAATTGGAAGAGTTGCTG	58	250	(TAACCC)3
10	CL186CONTIG1-(B24)	CCATCACGGTCACGATCTAAT	GGAAGTCCAGAAAGGAAGAACA	56	350	(GCC)7
11	CL10CONTIG1-(B37)	ATGGCAGCAGTTGAGGTAGAAT	TCCATTACTCTGAAACCGTGCT	48	400	(TC)6
12	CL4CONTIG1-(B41)	ATGGCAGCAGTTGAGGTAGAAT	TGCCTTCTTCGGTCTTAGTCTC	58	180	(CCG)6
13	CL491CONTIG1-(B11)	AGGTGAAGGCTGGATTCTTGT	GTACTCCACTCCGAACGAAAAC	52	230	(TTGGT)4
14	GI|109152185-(B15)	AGCTGAGGTGGTAGAGACGAAG	CCAGGACAACCCATTTGATAAC	56	350	(CCG)6
15	GI|110663752-(B20)	TGGCGGGTCTTCAACAATA	GCCCTGTTTGGATCACTTTCTA	50	200,300	(AAAC)4
16	CL340CONTIG1-(B26)	CAAATCTTAACTTCTGTCCCCG	CATGCTATCCACTCCACCATTA	48	150,200	(AAG)8
17	CL455CONTIG1-(B27)	CATTCCATTCATCTCTCATCCA	TACAAATCAAAGTCATCGTCGG	56	150	(CGG)5

ตารางที่ 6 EST - microsatellite primers จากฐานข้อมูล EST กล้วยไม้วงศ์ Orchidaceae จำนวน 25 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้ม้าวิ่งได้ (ต่อ)

ลำดับ	Name	Forward sequence (5'-3')	Revert sequence (5'-3')	Temp.	Product size	Repeat motif
18	GI|109151933-(B28)	GAAGCAGCAGCAGAAGAGGT	GCTTTCGACTCCATTACTCTGAA	56	150	(CGC)5
19	GI|109153057-(B29)	AGCACAGAAAACAAAGCATGAG	AACGGAAATCCTTGAACCAGT	58	130	(CAC)5
20	GI|109153889-(B33)	CCCCAACTCATCTCCACCT	TAATAACTGGGCAGCAAGTCG	56	200	(CCCAAA)7
21	GI|109154341-(B34)	AATCCAAATCCAACACCAACTC	TAATTCCAGCCACAGTCTCCTT	58	180	(GGC)5
22	CL106CONTIG1-(B35)	TTTCCATCCTCCTCACTTCATT	AGTATCGTCAAAGCCAGGGATA	50	180,250	(AC)7
23	CL275CONTIG1-(B36)	AGTCCCTCTCCGTCCTATGATT	CTTCTTTCCAGTCATGTCCAGC	52	150	(GAA)6
24	CL106CONTIG1-(B39)	GCACGAGGATCAATTTAGCATA	GGAAGATGATGGGTACGTCATT	48	150,200	(AC)7
25	CL32CONTIG1-(B42)	CTCTCTCCTAACCCTCTCCCTC	AGCAATGGGAAGAAACACATCT	48	230	(CCCAAA)6

ตารางที่ 7 G-microsatellite primers จากกล้วยไม้สกุลอื่น จำนวน 8 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่ได้จากกล้วยไม้ม้าวิ่งได้

ลำดับ	Name	Forward sequence (5'-3')	Revert sequence (5'-3')	Temp.	Product size	Repeat motif
1	ORCA40(C1)	CAAGCTACTTCAGACTCATC	GAAGACACTGCTCATATTTC	46	230	**
2	ORCT6(C5)	CTCCTTGCTTGGATTTGCTTC	CACCTCATCACATCTTGCCAT	42	300,350	**
3	OA20(C19)	CATATATTAGCCACTTCACTCTC	ATGTCCACCTCCCTAAAATAGTA	42	200,300	(CT)8AC(CT)5
4	sv04(C20)	CTGGTCTCTTCTTTCTGGAT	AACACCAACACACATATACAT	42	250	F(TG)8CA(TGCG)12,R(TG)10(TGCG)6
5	OA08(C23)	AGGCAAAATATAACATACCTCAAT	AATCAAGCCATTTATCTCCTCT	42	250,400	(TC)5(GT)18
6	S130(C28)	CTCATGCATAAATTTAGGGTAGA	ACAACACGAACAAGTAGTCATC	38	350	(TG)15TA(TG)7
7	S122(C32)	GTGACTCGAGCCTTGGAATACG	ACGCCGGTGAAAGAAGAAGAG	42	350	F(TC)9(AC)4,RAT(AC)8
8	OA19(C33)	AAGGCAAACTTGAGTGCTTTATT	CTTGTGATTTCTTTGCCTTTCTT	42	250	(GA)31

** ไม่ปรากฏข้อมูลจำนวนเบสซ้ำ

4. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

4.1 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

นำไพรเมอร์ EST-microsatellite ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ชัดเจนในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 25 คู่ และไพรเมอร์ที่ได้จากการค้นหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากกล้วยไม้ชนิดอื่นๆ (G-microsatellite) จำนวน 8 คู่ (ตารางที่ 6 และตารางที่ 7) มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4) โดยตรวจสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง HAD-GT12^{TM} capillary gel electrophoresis system (Qiagen, Germany) พบว่า จากไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ ทั้งหมด จำนวน 33 คู่ ประกอบด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 25 คู่ (ตารางที่ 6) และเครื่องหมาย G-microsatellite จำนวน 8 คู่ (ตารางที่ 7) สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง ได้อัลลีลทั้งหมด จำนวน 142 อัลลีล โดยมีไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ ที่ให้แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 20 คู่ ประกอบด้วย ไพรเมอร์ EST-microsatellite จำนวน 13 คู่ ได้อัลลีลที่แสดงความแตกต่าง จำนวน 57 อัลลีล และ G-microsatellite จำนวน 7 คู่ ได้อัลลีลที่แสดงความแตกต่าง จำนวน 35 อัลลีล รวมอัลลีลที่แสดงความแตกต่างในเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง ทั้งหมด 92 อัลลีล เฉลี่ย 4.6 อัลลีลต่อคู่ไพรเมอร์ ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้ (size range) อยู่ระหว่าง 74-419 คู่เบส อัลลีลที่ได้มีจำนวนตั้งแต่ 2-8 อัลลีล โดยคู่ไพรเมอร์ที่ได้อัลลีลสูงสุด คือ G-microsatellite ไพรเมอร์ 20C (SV04) ได้อัลลีล จำนวน 8 อัลลีล และไพรเมอร์ที่ได้จำนวนอัลลีลน้อยสุด คือ EST-microsatellite ที่พัฒนาได้ คู่ไพรเมอร์ A11 (CB032260), A26 (C0742605.1) และ 2B (CK859111.1) จำนวน 2 อัลลีล ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่พัฒนามาจากฐานข้อมูล EST (EST-microsatellite) (ตารางที่ 8)

4.2 ค่า Polymorphic information content (PIC)

ค่า Polymorphic information content (PIC) ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 20 เครื่องหมาย มีค่าตั้งแต่ 0.124 – 0.844 เฉลี่ยเท่ากับ 0.620 (ตารางที่ 8) บ่งชี้ได้ว่าประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการนำไปใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งอยู่ในระดับปานกลาง ถึงค่อนข้างสูง ซึ่งประกอบด้วย ค่า PIC ของเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 13 คู่ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.124 - 0.828 คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.615 บ่งชี้ว่าค่า PIC ของเครื่องหมาย EST-microsatellite มีค่าอยู่ในระดับปานกลางถึงปานสูง โดยเครื่องหมาย 34B (CK855825.1) มีค่า PIC สูงสุดเท่ากับ 0.828 รองลงมา 35B (CB855825.1) 36 B (CK856598.1) 39B (CK857960.1) มีค่า PIC เท่ากับ 0.784 0.751 และ 0.733 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า เครื่องหมาย EST-microsatellite ทั้ง 4 เครื่องหมาย เป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพเหมาะสำหรับใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และ เครื่องหมาย 2B (CK859111.1) มีค่า PIC ต่ำสุด เท่ากับ 0.124 หน้าที่ของโปรตีนของเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 13 คู่ ที่ได้จากการค้นหาในฐานข้อมูล NCBI (BLASTX search protein databases using a translated nucleotide query) พบว่า ยีนส่วนใหญ่คาดว่าจะสามารถสังเคราะห์เป็นโปรตีน (predicted protein) และเป็นยีนที่ไม่ทราบหน้าที่ของโปรตีน (unknown) (ตารางที่ 8) และค่า PIC ของเครื่องหมาย G-microsatellite จำนวน 7 คู่ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.289 - 0.844 คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.627 บ่งชี้ว่าค่า PIC ของเครื่องหมาย G-microsatellite มีค่าอยู่ในระดับปานกลางถึงปานสูง โดยเครื่องหมาย 1C (SV04) มีค่า PIC สูงสุดเท่ากับ 0.844 รองลงมา 32C (S122) มีค่า PIC เท่ากับ 0.789 และเครื่องหมาย 23C มีค่า PIC ต่ำสุด เท่ากับ 0.289 และเครื่องหมาย G-microsatellite พัฒนามาจากส่วนที่เป็นจีโนมิกดีเอ็นเอจึงไม่พบหน้าที่การสังเคราะห์โปรตีนในฐานข้อมูล

ตารางที่ 8 ลำดับเบสของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 20 คู่ ประกอบด้วย EST-microsatellite primer จำนวน 13 คู่ และ G-microsatellite primer จำนวน 7 คู่ แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างในเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ลำดับเบสซ้ำ อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม ขนาดของอัลลีล จำนวนอัลลีล ค่า PIC และหน้าที่ของโปรตีนจากฐานข้อมูล NCBI (BLASTX)

Name	Genbank accession no.	Forward sequence (5'-3') / Revert sequence (5'-3')	Repeat motif	Tm*	size range	no. of alleles	PIC	protein description
EST-microsatellite primer								
1. 7A	CB034531.1	TTCTTCTGTGCATCTTTTGCTC CACAAACCCAATTTAACACCCT	$(A)_{11}$	54	74-85	5	0.679	Fiber protein Fb11AAN77150.1
2. 11A	CB032260	CTTGATGAATGTGAGGAAACCA AAACCTTACTGTTGGGCACACT	$(CAA)_5$	62	116-119	2	0.495	Not hit
3. 26A	C0742605.1	TGGAAATGACAAGGTTTCTGTG TTGAGCTTAGGAGGCAAATAGG	$(GGAGCA)_4$	62	183-189	2	0.453	Not hit
4. 2B	CK859111.1	AGACGGGCTTAATGATGTCATT TGGTATGTATGTAAATGCCCCA	$(TGG)_5$	56	244-247	2	0.124	Unknown protein ACR34461.1
5. 27B	CB031838.1	CATTCCATTCATCTCTCATCCA TACAAATCAAAGTCATCGTCGG	$(CGG)_5$	56	127-183	6	0.667	Abscisic stress ripening ACZ50749.1
6. 28B	CK857691.1	GAAGCAGCAGCAGAAGAGGT GCTTTCGACTCCATTACTCTGAA	$(CGC)_5$	56	122-129	3	0.613	Not hit
7. 29B	CB0343051	AGCACAGAAAACAAAGCATGAG AACGGAAATCCTTGAACCAGT	$(CAC)_5$	58	89-98	4	0.640	Stress responsive protein NP001149550.1

* Tm คือ Annealing Temperature ที่เหมาะสม

ตารางที่ 8 ลำดับเบสของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 20 คู่ ประกอบด้วย EST-microsatellite primer จำนวน 13 คู่ และ G-microsatellite primer จำนวน 7 คู่ แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างในเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ลำดับเบสซ้ำ อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม ขนาดของอัลลีล จำนวนอัลลีล ค่า PIC และหน้าที่ของโปรตีนจากฐานข้อมูล NCBI (BLASTX) (ต่อ)

Name	Genbank accession no.	Forward sequence (5'-3') / Revert sequence (5'-3')	Repeat motif	Tm *	size range	no. of alleles	PIC	protein description
8. 34B	CK855825.1	AATCCAAATCCAACACCAACTC TAATTCCAGCCACAGTCTCCTT	$(GGC)_5$	58	136-165	7	0.828	Unnamed protein product NP001174118.1
9. 35B	CB855825.1	TTTCCATCCTCCTCACTTCATT AGTATCGTCAAAGCCAGGGATA	$(AC)_7$	50	157-178	7	0.784	LLA-115 ABI4885901
10. 36B	CK856598.1	AGTCCCTCTCCGTCCTATGATT CTTCTTTCCAGTCATGTCCAGC	$(GAA)_6$	52	100-114	6	0.751	Hypothetical protein XP002443940.1
11. 37B	CK859137	ATGGCAGCAGTTGAGGTAGAAT TCCATTACTCTGAAACCGTGCT	$(TC)_6$	48	393-402	4	0.630	Not hit
12. 39B	CK857960.1	GCACGAGGATCAATTTAGCATA GGAAGATGATGGGTACGTCATT	$(AC)_7$	48	145-212	6	0.733	Cleavage dioxygenase Q48K96.1
13. 41B	CB034609	ATGGCAGCAGTTGAGGTAGAAT TGCCTTCTTCGGTCTTAGTCTC	$(CCG)_6$	58	194-200	3	0.604	Not hit

ตารางที่ 8 ลำดับเบสของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 20 คู่ ประกอบด้วย EST-microsatellite primer จำนวน 13 คู่ และ G-microsatellite primer จำนวน 7 คู่ แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างในเชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง ลำดับเบสซ้ำ อุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสม ขนาดของอัลลีล จำนวนอัลลีล ค่า PIC และหน้าที่ของโปรตีนจากฐานข้อมูล NCBI (BLASTX) (ต่อ)

Name	Genbank accession no.	Forward sequence (5'-3') / Revert sequence (5'-3')	Repeat motif	Tm*	size range	no. of alleles	PIC	protein description
G-microsatellite primer								
14. 1C	ORCA40 (Yoocha et al., 2006)	CAAGCTACTTCAGACTCATC GAAGACACTGCTCATATTTC	$F(TG)_8CA(TGCG)_{12}$, $R(TG)_{10}(TGCG)_6$	46	200-209	4	0.664	-
15. 5C	ORCT6 (Yoocha et al., 2006)	CTCCTTGCTTGGATTTGCTTC CACCTCATCACATCTTGCCAT	$(TC)_5(GT)_{18}$	42	250-262	6	0.653	-
16. 19C	OA20 (Yue et al., 2006)	CATATATTAGCCACTTCACTCTC ATGTCCACCTCCCTAAAATAGTA	data not shown	42	321-419	4	0.583	-
17. 20C	SV04 (Pellegrino et al., 2001)	CTGGTCTCTTCTTTCTGGAT AACACCAACACACATATACAT	$(CT)_8AC(CT)_5$	42	284-305	8	0.844	-
18. 23C	OA08 (Yue et al., 2006)	AGGCAAAATATAACATACCTCAAT AATCAAGCCATTTATCTCCTCT	data not shown	42	200-289	3	0.289	-
19. 32C	S122 (Yue et al., 2006)	GTGACTCGAGCCTTGGAATACG ACGCCGGTGAAAGAAGAAGAG	$F(TC)_9(AC)_4$,$RAT(AC)_8$	42	333-358	6	0.789	-
20. 33C	OA19 (Yue et al., 2006)	AAGGCAAACTTGAGTGCTTTATT CTTGTGATTTCTTTGCCTTTCTT	$(GA)_{31}$	42	260-374	4	0.567	-

4.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Genetic Similarity)

จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของ Dice's Similarity Coefficient ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 24 ตัวอย่าง พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งมีค่าตั้งแต่ 0.19-0.70 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.53 โดยกล้วยไม้ม้าวิ่งรหัส MDM14 กับ MDM18 มีค่าความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากที่สุด (0.70) และกล้วยไม้แดงอุบลรหัส MDD2 กับ MDD11 มีค่าความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมน้อยที่สุด (0.19) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกล้วยไม้ม้าวิ่งและแดงอุบลมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันน้อย หรือไม่แตกต่างกันเมื่ออยู่ในระยะที่มีการเจริญเติบโต การจำแนกความแตกต่างโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาระหว่างกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิ่งนั้น ทำได้ค่อนข้างยาก ยกเว้นในระยะเจริญเติบโตเต็มที่ และในระยะออกดอก โดยขนาดดอกของกล้วยไม้แดงอุบลจะใหญ่กว่ากล้วยไม้ม้าวิ่ง รวมทั้งก้านช่อดอกกล้วยไม้แดงอุบลจะยาวกว่ากล้วยไม้ม้าวิ่ง ดังนั้นจึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างกล้วยไม้แดงอุบลและม้าวิ่งได้อย่างชัดเจน (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ค่าประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม โดยวิธี Dice (Dice's similarity coefficient) ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยใช้อัลลีลที่แสดงความแตกต่าง จำนวน 92 อัลลีล

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1. MDM14	1.00																							
2. MDM18	0.70	1.00																						
3. MDM21	0.54	0.51	1.00																					
4. PT1	0.47	0.48	0.40	1.00																				
5. PT2	0.42	0.39	0.43	0.58	1.00																			
6. MVP2	0.67	0.60	0.54	0.60	0.58	1.00																		
7. MVP26	0.57	0.58	0.56	0.48	0.42	0.67	1.00																	
8. MVP27	0.62	0.48	0.41	0.46	0.53	0.51	0.48	1.00																
9. MDD2	0.35	0.35	0.26	0.31	0.30	0.33	0.37	0.37	1.00															
10. MDD3	0.48	0.42	0.42	0.35	0.35	0.41	0.53	0.55	0.50	1.00														
11. MDD6	0.36	0.41	0.41	0.42	0.49	0.39	0.43	0.42	0.37	0.51	1.00													
12. MDD10	0.49	0.42	0.38	0.48	0.51	0.49	0.36	0.52	0.43	0.45	0.52	1.00												
13. MDD11	0.24	0.29	0.51	0.48	0.33	0.31	0.25	0.30	0.19	0.24	0.43	0.50	1.00											
14. MDD15	0.38	0.31	0.43	0.39	0.55	0.57	0.45	0.48	0.51	0.45	0.56	0.46	0.27	1.00										
15. MDD20	0.42	0.47	0.35	0.40	0.48	0.42	0.33	0.49	0.43	0.50	0.37	0.51	0.47	0.38	1.00									
16. MDD22	0.37	0.42	0.46	0.21	0.25	0.40	0.36	0.35	0.38	0.44	0.35	0.41	0.22	0.33	0.33	1.00								
17. CM8	0.51	0.44	0.29	0.50	0.49	0.51	0.48	0.54	0.53	0.44	0.27	0.52	0.26	0.40	0.57	0.47	1.00							
18. CM11	0.37	0.34	0.25	0.43	0.38	0.32	0.31	0.39	0.46	0.52	0.43	0.49	0.44	0.24	0.46	0.28	0.43	1.00						
19. CM16	0.46	0.50	0.31	0.56	0.47	0.38	0.42	0.56	0.51	0.53	0.48	0.54	0.42	0.35	0.47	0.34	0.48	0.60	1.00					
20. MV4	0.38	0.39	0.39	0.50	0.34	0.51	0.47	0.32	0.34	0.34	0.41	0.24	0.32	0.38	0.24	0.28	0.27	0.28	0.43	1.00				
21. DB6	0.45	0.49	0.50	0.39	0.42	0.41	0.41	0.55	0.42	0.66	0.55	0.49	0.33	0.53	0.42	0.48	0.40	0.41	0.56	0.38	1.00			
22. DB8	0.44	0.44	0.49	0.50	0.57	0.47	0.48	0.46	0.41	0.58	0.50	0.60	0.52	0.40	0.65	0.35	0.46	0.59	0.52	0.27	0.51	1.00		
23. RO4	0.41	0.34	0.30	0.50	0.42	0.40	0.48	0.46	0.53	0.51	0.46	0.41	0.40	0.44	0.34	0.25	0.54	0.55	0.59	0.46	0.51	0.57	1.00	
24. RO10	0.39	0.29	0.52	0.41	0.44	0.35	0.38	0.38	0.44	0.46	0.38	0.47	0.51	0.35	0.32	0.27	0.38	0.50	0.51	0.27	0.39	0.57	0.60	1.00

การจัดกลุ่มทางพันธุกรรม (Cluster analysis)

การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง ด้วยวิธี UPGMA พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (ภาพที่ 6) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (Cluster I) ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อย คือกล้วยไม้แดงอุบล 2 กลุ่ม และกล้วยไม้ม้าวิ่งอีก 1 กลุ่ม ดังนี้

-กลุ่มย่อยที่ 1 (sub-cluster I-I) ประกอบด้วยกล้วยไม้แดงอุบลจำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ MDD2 CM8 CM11 CM16 RO5 และ RO10 โดยกล้วยไม้แดงอุบลรหัส CM11 กับ CM16 มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากที่สุด (0.60) อาจเนื่องมาจากทั้งสองตัวอย่างรวบรวมมาจากสถานที่เดียวกัน (ต. ช่องเม็ก อ.สิรินธร จ.อุบลราชธานี)

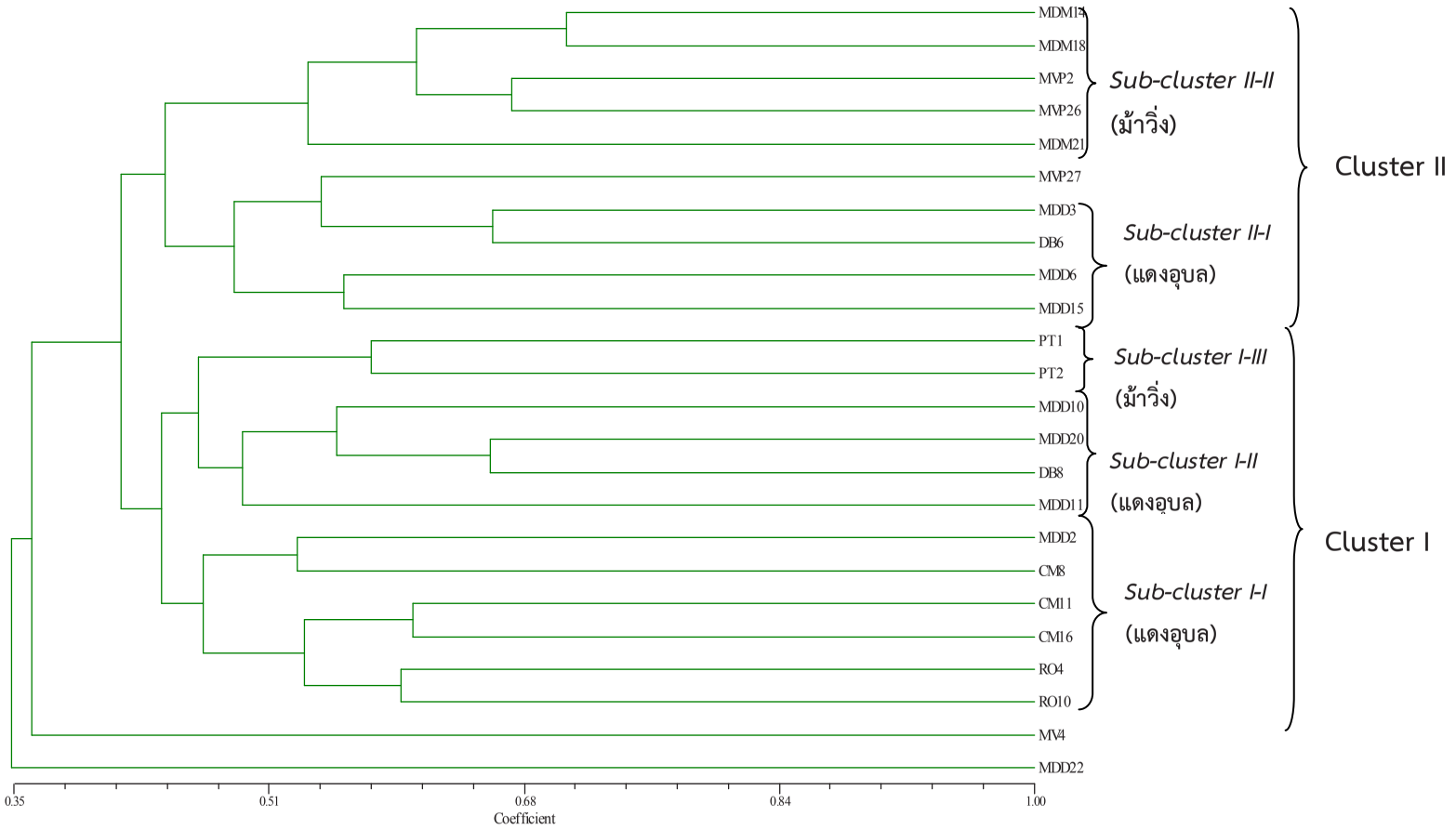
-กลุ่มย่อยที่ 2 (sub-cluster I-II) ประกอบด้วยกล้วยไม้แดงอุบลจำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ DB8 MDD2 MDD10 และ MDD11

-กลุ่มย่อยที่ 3 (sub-cluster I-II) ประกอบด้วยกล้วยไม้แดงม้าวิ่งจำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ PT1 และ PT2 ซึ่งทั้งสองตัวอย่างรวบรวมมาจากสถานที่เดียวกัน (อุทยานแห่งชาติภูผาเทิบ จ.มุกดาหาร) และมีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง (0.58)

กลุ่มที่ 2 (Cluster II) ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือกล้วยไม้แดงอุบล และกล้วยไม้ม้าวิ่ง ดังนี้

-กลุ่มย่อยที่ 1 (sub-cluster II-I) ประกอบด้วยกล้วยไม้แดงอุบลจำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ MDD3 DB6 MDD6 และ MDD15

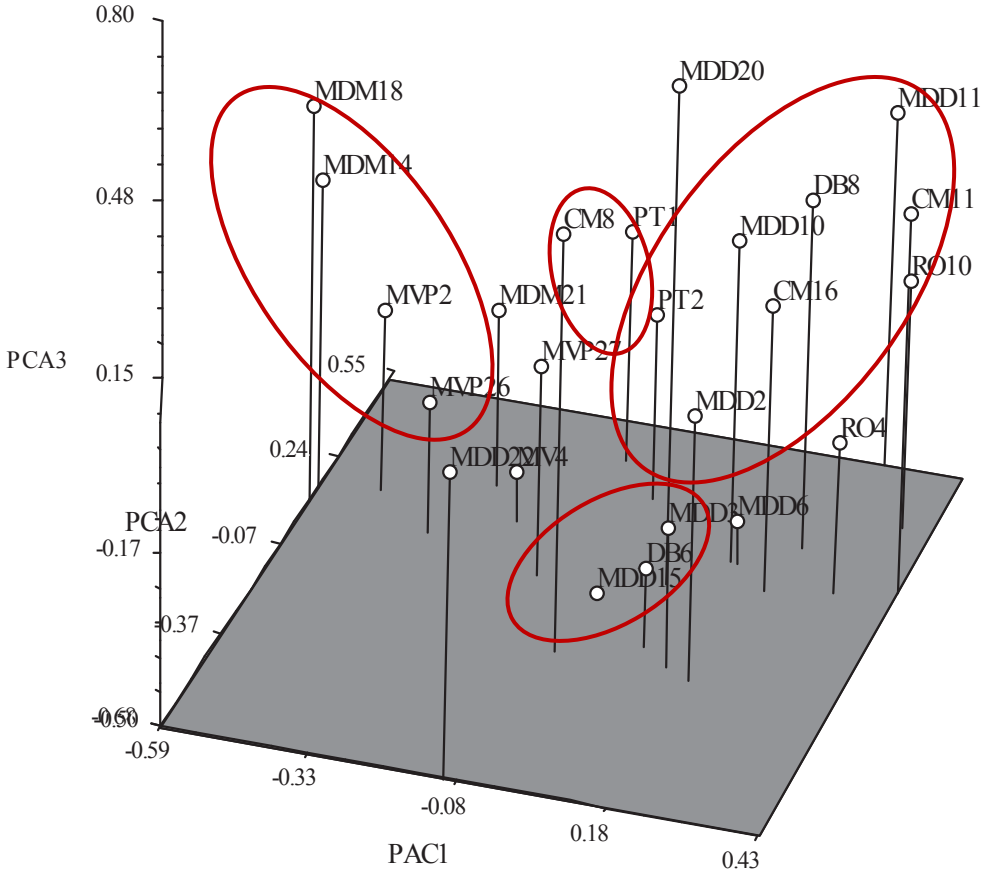
-กลุ่มย่อยที่ 2 (sub-cluster II-II) ประกอบด้วยกล้วยไม้ม้าวิ่งจำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ MDM14 MDM18 MVP2 และ MVP26 โดยตัวอย่าง MDM14 กับ MDM18 มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.70 (ซื้อที่ตลาดอินโดจีน อ.เมือง จ.มุกดาหาร) และ MVP2 กับ MVP26 ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.67 (อ.โพธิ์ไทร จ.อุบลราชธานี)



ภาพที่ 6 การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 24 ตัวอย่าง ด้วยวิธี UPGMA โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 92 เครื่องหมาย (อัลลีล)

การวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (Principal component analysis: PCA)

การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (Principal component analysis: PCA) สามปัจจัยแรกสามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 26.93 เปอร์เซ็นต์ โดยองค์ประกอบหลักที่ 1 2 และ 3 ครอบคลุมความแปรปรวน 10.74 เปอร์เซ็นต์ 8.58 เปอร์เซ็นต์ และ 7.61 เปอร์เซ็นต์ ของความแปรปรวนทั้งหมดตามลำดับ พบว่าการจัดกลุ่มโดยวิธี PCA ให้ผลสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA cluster analysis (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (PCA) ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 92 อัลลีล

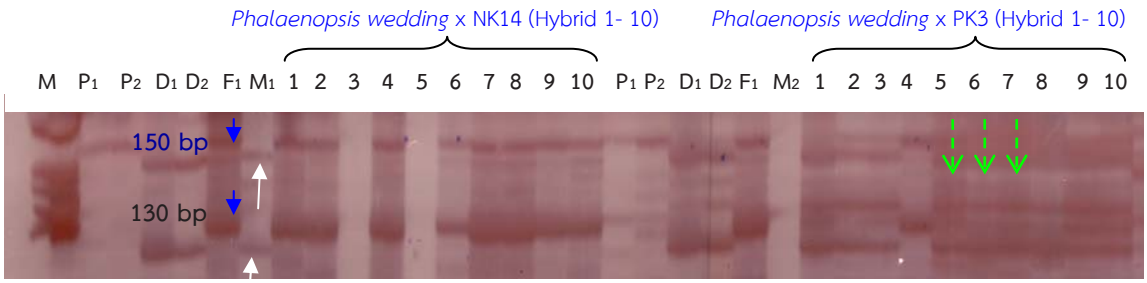
5. การตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสม

นำเครื่องหมาย EST-microsatellite ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 25 คู่ (ตารางที่ 6) เครื่องหมาย G-microsatellite ของกล้วยไม้ชนิดอื่น จำนวน 8 คู่ (ตารางที่ 7) และสืบค้นหาเครื่องหมาย G-microsatellite เพิ่มเติมอีก จำนวน 25 คู่ (ตารางที่ 3) มาตรวจสอบและคัดกรองเครื่องหมายที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ได้ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้มีการพัฒนากล้วยไม้สกุลม้าวิ่งลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับ สกุลฟาแลนอปซีส และสกุลม้าวิ่ง กับ สกุลเข็ม รวมจำนวน 6 คู่ผสม (ตารางที่ 2) โดยใช้กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 2 ตัวอย่าง สกุลฟาแลนอปซีส (*Phaleanopsis ember*) จำนวน 2 ตัวอย่าง และ สกุลเข็ม (เข็มแสด *Ascocentrum* sp.) จำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ใช้เป็นพันธุ์ตรวจสอบ (Check) และสุ่มเลือกลูกผสมจากแต่ละคู่ผสมมา จำนวน 10 – 15 ตัวอย่าง ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมที่ได้ในแต่ละคู่ มีดังนี้

คู่ที่ 1. *Phalaenopsis wedding* x NK14 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) โดยเลือกลูกผสม (hybrid) มาตรวจสอบ จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า มีไพรเมอร์ EST-microsatellite จำนวน 5 คู่ ได้แก่ A48 B2 B28 B34 และ B41 โดยเครื่องหมาย EST-microsetellite จำนวน 4 เครื่องหมาย คือ B2 B28 B34 และ B41 สามารถเพิ่มปริมาณและแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของลูกผสมทั้ง 10 ตัวอย่างได้ เนื่องจากลูกผสมทั้ง 10 ตัวอย่างมีขนาดของแถบดีเอ็นเอเท่ากับสายพันธุ์แม่ จึงไม่สามารถนำมาใช้ในการระบุเอกลักษณ์ของลูกผสมได้ ส่วนเครื่องหมาย EST-microsetellite A48 ตรวจพบลูกผสมในตัวอย่างที่ 4 6 8 และ และเครื่องหมาย G-microsatellite ของกล้วยไม้ชนิดอื่น จำนวน 4 คู่ ได้แก่ KNU-CC-32 KNU-CC-71 PGB209 และ PGCT 17 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของลูกผสมทั้ง 10 ตัวอย่างได้ เนื่องจากลูกผสมทั้ง 10 ตัวอย่างมีขนาดอัลลีลเหมือนสายพันธุ์แม่ (ตารางที่ 10 ภาพที่ 8-9)

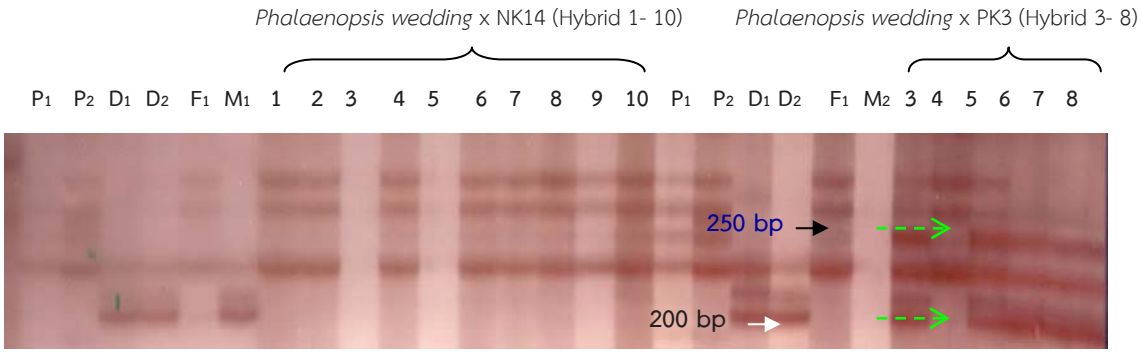
คู่ที่ 2. *P. wedding* x PK3 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) และลูกผสม (hybrid) จำนวน 10 ตัวอย่าง แต่เนื่องจากสายพันธุ์พ่อไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ดังนั้นจึงใช้กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งที่เป็นพันธุ์เปรียบเทียบเป็นตัวแทนในการตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอสายพันธุ์พ่อ ผลการตรวจสอบ พบว่า ไพรเมอร์ EST-microsatellite A48 ลูกผสมที่ได้ 10 ตัวอย่างมีขนาดอัลลีลเหมือนสายพันธุ์พ่อ ยกเว้นตัวอย่างที่ 4 ที่มีขนาดอัลลีลเหมือนสายพันธุ์แม่ ไพรเมอร์ B2 ลูกผสมที่ได้ 10 ตัวอย่าง มีขนาดอัลลีลเหมือนสายพันธุ์พ่อแม่ ยกเว้นตัวอย่างที่ 6 ที่มีขนาดอัลลีลเหมือนสายพันธุ์แม่ ไพรเมอร์ B28 ลูกผสมตัวอย่างที่ 1-5 มีขนาดอัลลีลเหมือนสายพันธุ์แม่ ส่วนตัวอย่างที่ 6-9 มีขนาดอัลลีลเหมือนสายพันธุ์พ่อแม่ ไพรเมอร์ B34 ลูกผสมที่ได้มีขนาดอัลลีลเหมือนสายพันธุ์พ่อแม่ เกือบทุกตัวอย่าง ยกเว้นตัวอย่างที่ 2 ที่มีขนาดอีลลีลเหมือนสายพันธุ์แม่ไพรเมอร์ B41 มีลูกผสมตัวอย่างที่ 1-3, 5, 7 และ 10 ที่มีขนาดอัลลีลเหมือนสายพันธุ์พ่อแม่ ตัวอย่างที่ 4 และ 9 มีขนาดอัลลีลเหมือนสายพันธุ์แม่ และ

ตัวอย่างที่ 6 และ 8 มีขนาดอัลลีลเหมือนสายพันธุ์พ่อไพรเมอร์ G-microsatellite จำนวน 4 คู่ ได้แก่ KNU-CC-32 KNU-CC-71 PGB209 และ PGCT 17 พบขนาดอัลลีลของลูกผสมทุกตัวอย่างเหมือนสายพันธุ์พ่อแม่ ยกเว้นตัวอย่างที่ 4 ที่มีขนาดอัลลีลเหมือนสายพันธุ์แม่ (ตารางที่ 11 ภาพที่ 8-9)



ภาพที่ 8 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสม ระหว่างกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีส กับ สกุลม้าวิ่ง จำนวน 2 คู่ โดยใช้ไพรเมอร์ G-microsatellite KNU-CC-32 (M = 100bp ladder (Fermentas) P1 P2 = *Phalaenopsis ember* (Check) D1 D2 = *Doritis* (Check) F1 = *Phalaenopsis wedding* M1 = NK14 M2 = PK3)

**ลูกศรสีดำ คือ อัลลีลของสายพันธุ์แม่ / ลูกศรสีขาว คือ อัลลีลของสายพันธุ์พ่อ / ลูกศรประ คือ อัลลีลของลูกผสม



ภาพที่ 9 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสม ระหว่างกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีส กับ สกุลม้าวิ่ง จำนวน 2 คู่ โดยใช้ไพรเมอร์ G-microsatellite KNU-CC-71 (M = 100bp ladder (Fermentas) P1 P2 = *Phalaenopsis ember* (Check) D1 D2 = *Doritis* (Check) F1 = *Phalaenopsis wedding* M1 = NK14 M2 = PK3)

**ลูกศรสีดำ คือ อัลลีลของสายพันธุ์แม่ / ลูกศรสีขาว คือ อัลลีลของสายพันธุ์พ่อ / ลูกศรประ คือ อัลลีลของลูกผสม

ตารางที่ 10 ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมระหว่าง *Phalaenopsis wedding* x NK14 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) ด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 5 คู่ (A48 B34 B28 B2 และ B41) และ G-microsatellite จำนวน 4 คู่ (KNU-CC-32 KNU-CC-71 PGB209 และ PGCT17)

Markers / ตัวอย่าง	Pha. 1	Pha. 2	Dor1	Dor2	Pha.wed	Nk14	PwN1	PwN2	PwN3	PwN4	PwN5	PwN6	PwN7	PwN8	PwN9	PwN10
A48	2	2	1	1	2	1	2	2	-99	1,2	-99	1,2	2	1,2	1,2	2
B34	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B28	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	-99	2	2	2	2	2
B2	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	-99	1	1	1	1	1
B41	-	-	-	-	2,3	1	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3
KNU-CC-32	-	-	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
KNU-CC-71	2	2	1	1	2	1	2	2	-99	2	-99	2	2	2	2	2
PGB209	1,3	1,3	-99	2	1,3	-99	1,3	1,3	-99	1,3	-99	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
PGCT17	2	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

**หมายเหตุ Pha. 1 และ Pha.2 คือ *Phalaenopsis ember* (พันธุ์ตรวจสอบ) Dor1 และ Dor2 = *Doritis,* (พันธุ์ตรวจสอบ) Pha.wed คือ *Phalaenopsis wedding* NK14 คือ แดงอุบลรหัส NK14 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) และ PwN1 ถึง PwN10 คือ ลูกผสมระหว่าง *Phalaenopsis wedding* x NK14 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*)

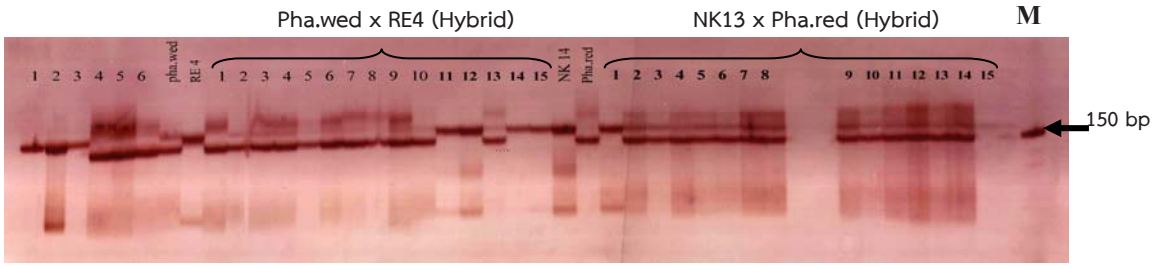
ตารางที่ 11 ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมระหว่าง *Phalaenopsis wedding* x PK3 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) ด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 5 คู่ (A48 B34 B28 B2 และ B41) และ G-microsatellite จำนวน 4 คู่ (KNU-CC-32 KNU-CC-71 PGB209 และ PGCT17)

Markers / ตัวอย่าง	Pha. 1	Pha. 2	Dor1	Dor2	Pha.wed	PK3	PwP1	PwP2	PwP3	PwP4	PwP5	PwP6	PwP7	PwP8	PwP9	PwP10
A48	2	2	1	1	2	---	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
B34	1	1	2	2	1	--	1,2	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
B28	2	2	1	1	2	--	2	2	2	2	2	1,2	1,2	1,2	1,2	-99
B2	1	1	2	2	1	--	1,2	1,2	1,2	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
B41	-	-	-	-	2,3	--	1,2	1,2	1,2	2,3	1,2	1	1,2	1	2,3	1,2
KNU-CC-32	-	-	1	1	2	--	1,2	1,2	1,2	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
KNU-CC-71	2	2	1	1	2	--	1,2	1,2	1,2	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
PGB209	1,3	1,3	-99	2	1,3	--	2,3	2,3	2,3	1,3	2,3	2,3	2,3	2,3	1,2	1,2,3
PGCT17	2	2	1	1	-99	--	1,2	1,2	1,2	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2

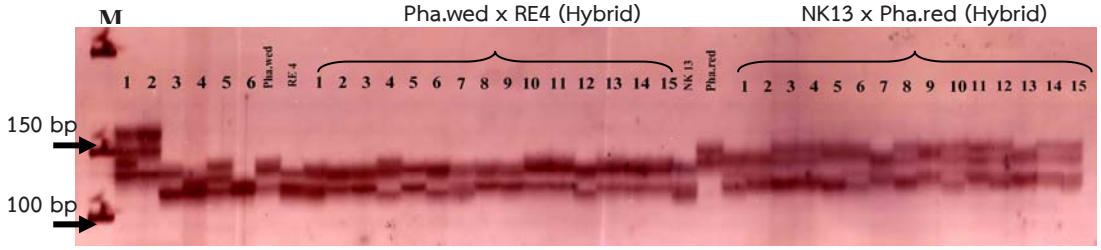
**หมายเหตุ Pha 1 และ 2 คือ *Phalaenopsis ember* (พันธุ์ตรวจสอบ) Dor1 และ Dor2 = *Doritis*, (พันธุ์ตรวจสอบ) Pha.wed คือ *Phalaenopsis wedding* PK3 คือ แดงอุบลรหัส PK3 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) และ PwN1 ถึง PwN10 คือ ลูกผสมระหว่าง *Phalaenopsis wedding* x PK3 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*)

คู่ที่ 3 *Phaleanopsis ember var wedding* x RE4 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) และลูกผสม จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่ามีไพรเมอร์ EST-microsatellite จำนวน 5 คู่ ได้แก่ A48 B27 B28 B34 และ B41 และไพรเมอร์ G-microsatellite จำนวน 2 คู่ ได้แก่ KNU-CC-32 และKNU-CC-71 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ได้ และแสดงผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสม ทั้ง 15 ตัวอย่าง ได้ชัดเจนทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 12 ภาพที่ 10-14)

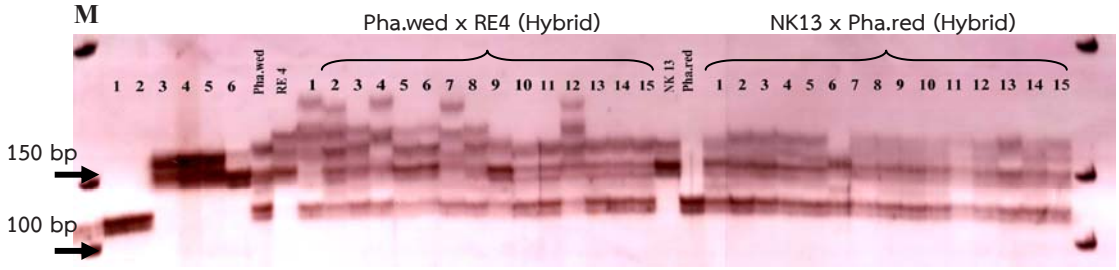
คู่ที่ 4 NK13 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Phalaenopsis*-Red พบว่ามีไพรเมอร์ EST-microsatellite จำนวน 6 คู่ ได้แก่ A48 B2 B27 B28 B34 และ B41 และ ไพรเมอร์ G-microsatellite จำนวน 3 คู่ ได้แก่ KNU-CC-32 KNU-CC-71 และ PGCT17 ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ และตรวจสอบลูกผสมทั้ง 15 ตัวอย่างได้อย่างชัดเจนโดยเฉพาะไพรเมอร์ EST-microsatellite A48, B34 และ B41 ที่สามารถตรวจสอบลูกผสมได้ทุกตัวอย่าง โดยลูกผสมทั้ง 15 ตัวอย่าง แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนทั้งสายพันธุ์พ่อและแม่ และทั้งสองสายพันธุ์มีจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัส ทำให้แถบดีเอ็นเอที่ได้แสดงอัลลีลที่แตกต่างกัน เมื่อนำมาตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสมจึงสามารถระบุได้ชัดเจนว่าลูกผสมที่ได้นั้นมีแถบดีเอ็นเอมาจากสายพันธุ์พ่อหรือสายพันธุ์แม่ (ตารางที่ 13 ภาพที่ 10-14)



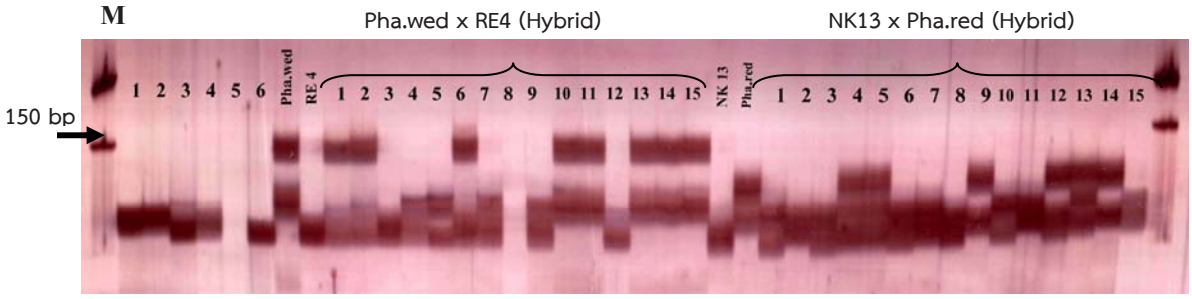
ภาพที่ 10 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีสกับ สกุลม้าวิ่ง โดยใช้ไพรเมอร์ EST-microsatellite - A48 (M = 100 bp ladder (Fermentas) 1-2 = *Phalaenopsis ember* (Check) 3-6 = *Doritis* (Check) คู่ผสมที่ 1 *Phaleanopsis ember* var *wedding* (Pha.wed) x RE4 และ ลูกผสมจำนวน 15 ตัวอย่าง คู่ผสมที่ 2 NK13 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Phalaenopsis*-Red และ ลูกผสมจำนวน 15 ตัวอย่าง)



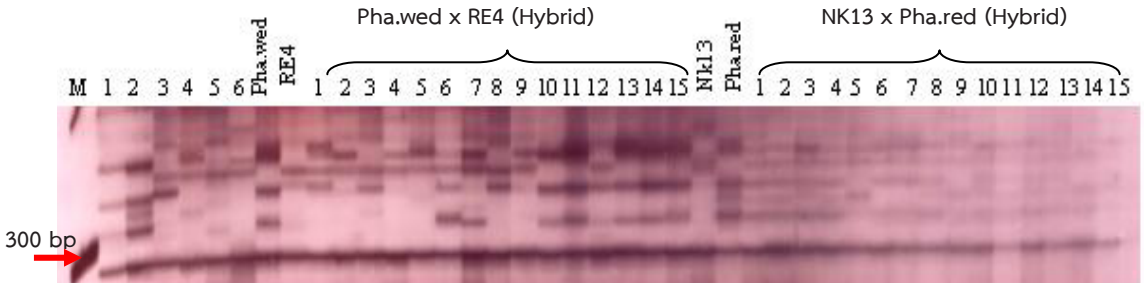
ภาพที่ 11 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีส กับ สกุลม้าวิ่ง โดยใช้ไพรเมอร์ EST-microsatellite - B28 (M = 100 bp ladder (Fermentas) 1-2 = *Phalaenopsis ember* (Check) 3-6 = *Doritis* (Check) คู่ผสมที่ 1 *Phaleanopsis ember* var *wedding* (Pha.wed) x RE4 และ ลูกผสมจำนวน 15 ตัวอย่าง คู่ผสมที่ 2 NK13 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Phalaenopsis*-Red และลูกผสมจำนวน 15 ตัวอย่าง)



ภาพที่ 12 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีส กับ สกุลม้าวิ่ง โดยใช้ไพรเมอร์ EST-microsatellite - B34 (M = 100 bp ladder (Fermentas) 1-2 = *Phalaenopsis ember* (Check) 3-6 = *Doritis* (Check) คู่ผสมที่ 1 *Phaleanopsis ember* var *wedding* (Pha.wed) x RE4 และ ลูกผสมจำนวน 15 ตัวอย่าง คู่ผสมที่ 2 NK13 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Phalaenopsis*-Red และลูกผสมจำนวน 15 ตัวอย่าง)



ภาพที่ 13 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีส กับ สกุลม้าวิ่ง โดยใช้ไพรเมอร์ EST-microsatellite - B41 (M = 100 bp ladder (Fermentas) 1-2 = *Phalaenopsis ember* (Check) 3-6 = *Doritis* (Check) คู่ผสมที่ 1 *Phaleanopsis ember* var *wedding* (Pha.wed) x RE4 และ ลูกผสมจำนวน 15 ตัวอย่าง คู่ผสมที่ 2 NK13 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Phalaenopsis*-Red และลูกผสมจำนวน 15 ตัวอย่าง)



ภาพที่ 14 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลฟาแลนอปซีส กับ สกุลม้าวิ่ง โดยใช้ไพรเมอร์ G-microsatellite - KNU-CC-71 (M = 100 bp ladder (Fermentas) 1-2 = *Phalaenopsis ember* (Check) 3-6 = *Doritis* (Check) คู่ผสมที่ 1 *Phaleanopsis ember* var *wedding* (Pha.wed) x RE4 และ ลูกผสม จำนวน 15 ตัวอย่าง คู่ผสมที่ 2 NK13 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Phalaenopsis*-Red และลูกผสมจำนวน 15 ตัวอย่าง)

ตารางที่ 12 ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมระหว่าง *Phaleanopsis ember var wedding* x RE4 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) ด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 5 คู่ (A48 B34 B27 B48 และ B41) และ G-microsatellite จำนวน 2 คู่ (KNU-CC-32 และ KNU-CC-71)

ตัวอย่าง/markers	Pha1	Pha 2	D1	D2	D3	D4	Pha.wed	RE4	PR1	PR2	PR3	PR4	PR5	PR6	PR7	PR8	PR9	PR10	PR11	PR12	PR13	PR14	PR15
A48	2	2	1	1	1	1,2	2	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	2	2	1,2	2	2	2
B34	1	1	2,3	2,3	2,3	2	1,2	2,3	1,3	1,2,3	1,2,3	1,2	1,2,3	1,2,3	1,2	1,2,3	1,2	1,2	1,2	1,2,3	1,2	1,2	1,2
B27	2	2	1	1	1	1	2	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
B28	4	4	2,4	2	2,3,5	2	4,5	1,2,3	1,2,3,4	2,3,4	2,3,4	1,2,4,5	2,4	1,3,4	1,2,3,4	2,3,4	2,3,4	2,4	2,4	1,3,4	2,3,4,5	2,3,4,5	2,3,4,5
B41	2	2	1	1	-99	1	2,4	1	1,4	1,4	1	1,2	1,2	1,4	1,2	-99	1,2	2,4	2,4	1	2,4	2,4	2,4
KNU-CC-32	3	3	1,4	1,4	1,4	2,4	2,3	1,4	1,4	1,4	1,2,4	3,4	1,3,4	1,3,4	1,3,4	2,4	1,3,4	2,3	2,3	1,3,4	1,3	1,3	1,3
KNU-CC-71	1,3	1,3	1,2	2	2	2	1,3	2	1,2,3	1,2,3	1,2	1,2,3	2,3	1,2,3	1,2,3	1,2	1,2,3	1,3	1,3	1,2	1,3	1,3	1,3

**หมายเหตุ Pha 1 และ 2 คือ *Phalaenopsis ember* (พันธุ์ตรวจสอบ) D1 ถึง D4 = *Doritis*, (พันธุ์ตรวจสอบ) Pha.wed คือ *Phaleanopsis ember var wedding* RE4 คือ แดงอุบลรหัส RE4 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) และ PR1 ถึง PR15 คือ ลูกผสมระหว่าง *Phaleanopsis ember var wedding* x RE4 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*)

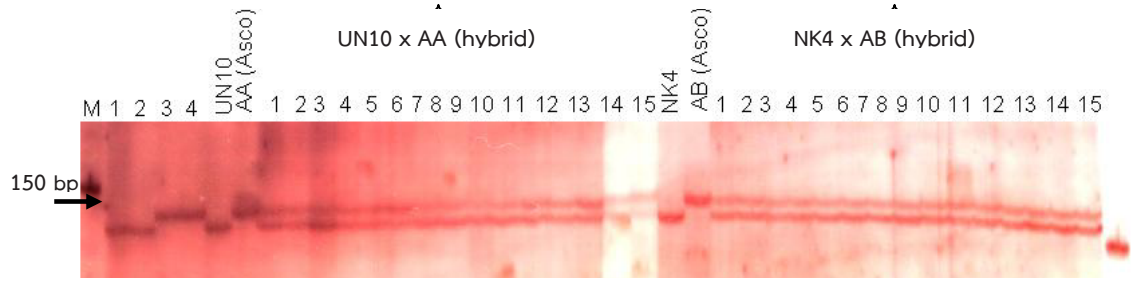
ตารางที่ 13 ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมระหว่าง NK13 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Phalaenopsis*-Red ด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 6 คู่ (A48 B34 B27 B28 B2 และ B41) และ G-microsatellite จำนวน 3 คู่ (KNU-CC-32 KNU-CC-71 และ PGCT17)

ตัวอย่าง/markers	ph1	ph2	D1	D2	D3	D4	NK13	Pha red	NP1	NP2	NP3	NP4	NP5	NP6	NP7	NP8	NP9	NP10	NP11	NP12	NP13	NP14	NP15
A48	2	2	1	1	1	1,2	1	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	-99	1,2
B34	1	1	2,3	2,3	2,3	2	2,3	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
B27	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1,2	1,2	2	1,2	-99	1,2	2	2	2	2	1,2	1	1,2
B28	4	4	2,4	2	2,3,5	2	1,2,3	3,5	2,3,4	2,3,4	2,3,5	2,3,5	2,4,5	2,4,5	2,3,4	1,2,3,5	2,4,5	1,3,5	2,3,5	1,2,3,5	1,2,3,4	1,2,3,5	1,2,3,5
B2	2	2	-99	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
B41	2	2	1	1	-99	1	1	2,3	1,2	1,2	1,2	1,2,3	1,2,3	1,2	1,2	1,2	1,3	1,2	1,2	1,3	1,2,3	1,3	1,2
KNU-CC-32	3	3	1,4	1,4	1,4	2,4	1,4	3	1,3,4	1,4	1,3,4	1,3,4	1,4	1,4	1,3,4	1,3,4	1,3,4	1,3,4	1,3,4	1,3,4	1,4	1,3,4	1,4
KNU-CC-71	1,3	1,3	1,2	2	2	2	2	1,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	2,3	1,2,3
PGCT17	2	2	-99	1	1	-99	1	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2

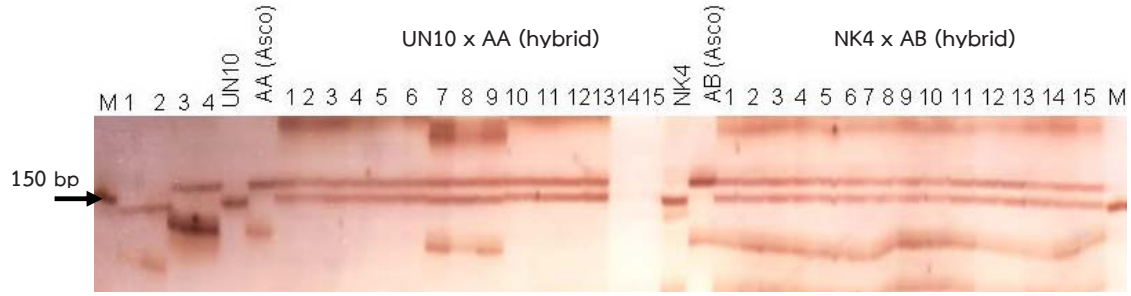
**หมายเหตุ Pha 1 และ 2 คือ *Phalaenopsis ember* (พันธุ์ตรวจสอบ) D1 ถึง D4 = *Doritis* (พันธุ์ตรวจสอบ) NK13 คือ แดงอุบลรหัส NK13 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) Pha red คือ *Phalaenopsis*-Red และ NP 1 ถึง NP 15 คือ ลูกผสมระหว่าง NK13 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Phalaenopsis*-Red

คู่ที่ 5 UN10 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*). x *Ascocentrum* sp. (เข็มแดง) และลูกผสม (hybrid) จำนวน 15 ตัวอย่าง พบว่า มีไพรเมอร์ EST-microsatellite จำนวน 3 คู่ ได้แก่ A48 B9 และ B28 และไพรเมอร์ G-microsatellite จำนวน 1 คู่ได้แก่ KNU-CC-55 ที่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พ่อแม่ และแสดงผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสมได้ชัดเจนทุกตัวอย่าง ยกเว้นลูกผสมตัวอย่าง 1 และ 13 ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ (ตารางที่ 14 ภาพที่ 15-17)

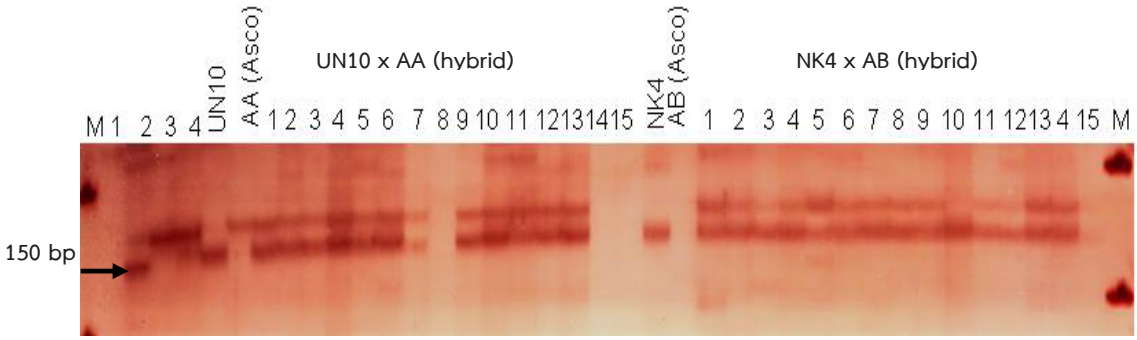
คู่ที่ 6 NK4 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*). x *Ascocentrum* sp. (เข็มแสด) และลูกผสม (hybrid) จำนวน 14 ตัวอย่าง พบว่า มีไพรเมอร์ EST-microsatellite จำนวน 3 คู่ ได้แก่ A48 B9 และ B28 และไพรเมอร์ G-microsatellite จำนวน 1 คู่ ได้แก่ KNU-CC-55 ที่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พ่อแม่ และแสดงผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสมได้ชัดเจนทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 15 ภาพที่ 15-17)



ภาพที่ 15 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับสกุลเข็ม โดยใช้ไพรเมอร์ EST-microsatellite - A48 (M = 100 bp ladder (Fermentas) 1-2 = แดงอุบล 3-4 = เข็มแสด คู่ผสมที่ 1 UN10 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*). x *Ascocentrum* sp. (เข็มแดง) และลูกผสม จำนวน 15 ตัวอย่าง คู่ผสมที่ 2 NK4 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Ascocentrum* sp. (เข็มแสด) และลูกผสม จำนวน 15 ตัวอย่าง



ภาพที่ 16 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับสกุลเข็มโดยใช้ไพรเมอร์ EST-microsatellite - B29 (M = 100 bp ladder (Fermentas) 1-2 = แดงอุบล 3-4 = เข็มแสด คู่ผสมที่ 1 UN10 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Ascocentrum* sp. (เข็มแดง) และลูกผสม จำนวน 15 ตัวอย่าง คู่ผสมที่ 2 NK4 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Ascocentrum* sp. (เข็มแสด) และลูกผสม จำนวน 15 ตัวอย่าง



ภาพที่ 17 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการตรวจสอบลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับสกุลเข็มโดยใช้ไพรเมอร์ G-microsatellite -KNU-CC-55 (M = 100 bp ladder (Fermentas) 1-2 = แดงอุบล 3-4 = เข็มแสด คู่ผสมที่ 1 UN10 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Ascocentrum* sp. (เข็มแดง) และลูกผสม จำนวน 15 ตัวอย่าง คู่ผสมที่ 2 NK4 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Ascocentrum* sp. (เข็มแสด) และลูกผสม จำนวน 15 ตัวอย่าง

ตารางที่ 14 ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมระหว่าง UN10 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*). x *Ascocentrum* sp. (เข็มแดง) ด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 3 คู่ (A48 B9 และ B28) และ G-microsatellite จำนวน 1 คู่ (KNU-CC-55)

ตัวอย่าง/markers	DB8	NK4	As1	As2	UN10	AA	AH2	AH3	AH4	AH5	AH6	AH7	AH8	AH9	AH10	AH11	AH12	AH14	AH15	AH1	AH13
A48	1	1	2	2	1	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	-	-
B9	1	1,3	2	2	1,3	2	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1	1,2,3	1,2,3	3	-	-
B28	1	1	2	2	1	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	-	-
KNU-CC-55	-	1	2	2	1	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	-	-

**หมายเหตุ: DB8 และ NK14 คือ แดงอุบล (พันธุ์ตรวจสอบ) As1 และ As2 คือ เข็มแสด (พันธุ์ตรวจสอบ) UN10 คือ แดงอุบล (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*). AA คือ *Ascocentrum* sp.(เข็มแดง) AH 1 ถึง AH15 คือลูกผสม UN10 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*). x *Ascocentrum* sp.(เข็มแดง)

ตารางที่ 15 ผลการตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมระหว่าง NK4 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*). x *Ascocentrum* sp. (เข็มแสด) ด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 3 คู่ (A48 B9 และ B28) และ G-microsatellite จำนวน 1 คู่ (KNU-CC-55)

ตัวอย่าง/markers	DB8	NK4	As1	As2	NK4	AB	BH1	BH2	BH3	BH4	BH5	BH6	BH7	BH8	BH9	BH10	BH11	BH12	BH13	BH14
A48	1	1	2	2	1	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
B9	1	1,3	2	2	1,3	2	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3
B28	1	1	2	2	1	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
KNU-CC-55	-	1	2	2	1	2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1	1,2	1,2	1,2	1,2

**หมายเหตุ: DB8 และ NK14 คือ แดงอุบล (พันธุ์ตรวจสอบ) As1 และ As2 คือ เข็มแสด (พันธุ์ตรวจสอบ) NK4 คือ แดงอุบล NK4 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*).AB คือ *Ascocentrum* sp. (เข็มแสด) BH 1 ถึง BH15 คือลูกผสม(*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*). x *Ascocentrum* sp. (เข็มแสด)

วิจารณ์ผลการวิจัย

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

การพัฒนาเครื่องหมาย EST-microsatellite ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จากฐานข้อมูล EST ของกล้วยไม้ต่าง ๆ ในวงศ์กล้วยไม้ เพื่อนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายที่เฉพาะในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จากการสืบค้นฐานข้อมูลลำดับเบสของกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ ใน GenBank Database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยทำการสืบค้นเมื่อเดือนกุมภาพันธ์ 2553 ได้ข้อมูลที่เป็นลำดับเบสของ EST ของกล้วยไม้ทั้งหมด จำนวน 8,009 ลำดับเบส ข้อมูล mRNA ของกล้วยไม้สกุล *Doritis* 14 ลำดับเบส และ mRNA ของกล้วยไม้สายพันธุ์อื่น ๆ อีก 88 ลำดับเบส เมื่อทำการจัดกลุ่มข้อมูล (assembly) และออกแบบไพรเมอร์ ได้ไพรเมอร์ทั้งหมด จำนวน 177 คู่ จำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ในการออกแบบนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ หลายปัจจัย ได้แก่ การกำหนดหลักเกณฑ์ที่ใช้ในการค้นหา และออกแบบไมโครแซทเทลไลท์ เช่น ความยาวของไพรเมอร์ (Primer length) อุณหภูมิในการเข้าคู่ของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (Tm) เปอร์เซ็นต์ GC (GC content) และ ขนาดของดีเอ็นเอคาดหมาย (expected size) เป็นต้น จำนวนของข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการรวบรวมข้อมูลจากฐานข้อมูล โปรแกรมที่ใช้ในการค้นหาแต่ละโปรแกรมที่แตกต่างกัน และวิธีการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน (Castro et al., 2012; Varshney et al., 2005) ปัจจัยดังกล่าวส่งผลให้จำนวนไพรเมอร์ที่พัฒนาได้แตกต่างกัน

การพัฒนาเครื่องหมาย EST microsatellite นั้น จะช่วยลดข้อจำกัดในการพัฒนาเครื่องหมายไมโคแซทเทลไลท์แบบดั้งเดิมได้ เนื่องจากสามารถพัฒนาได้ง่าย ลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการพัฒนาเครื่องหมาย อีกทั้งยังได้เครื่องหมายที่พัฒนามาจากยีนที่มีการแสดงออกโดยตรง ส่วนใหญ่ลำดับข้อมูลของ EST ที่พบในฐานข้อมูลสาธารณะนั้นจะเป็นข้อมูลลำดับเบสของพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สำหรับพืชเฉพาะถิ่นหรือพืชพื้นเมืองจะพบลำดับข้อมูลของ EST ในฐานข้อมูลค่อนข้างน้อยหรือไม่พบเลย ดังนั้นในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จากฐานข้อมูล EST สำหรับพืชเฉพาะถิ่นดังกล่าว จึงต้องใช้ข้อมูล EST ของพืชที่อยู่ในสกุลหรือวงศ์เดียวกันที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการร่วมกัน ซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะมาจากยีนที่มีต้นกำเนิดเดียวกัน (common ancestor) ซึ่งเครื่องหมายที่พัฒนาได้จากพืชดังกล่าวสามารถพัฒนามาใช้ประโยชน์ในพืชเฉพาะถิ่นได้ อย่างไรก็ตามก็ต้องมีการตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายที่พัฒนาได้ดังกล่าวในพืชเฉพาะถิ่นที่ต้องการศึกษา (Chapman et al., 2009; Dendoum et al., 2012; Naresh et al., 2009; Poncet et al., 2006)

การพัฒนาเครื่องหมาย EST-microsatellite จากฐานข้อมูล EST ของกล้วยไม้ต่าง ๆ ในวงศ์กล้วยไม้ ส่วนใหญ่ลำดับเบสซ้ำที่พบสูงสุดจะเป็นลำดับเบสซ้ำ 2 เบส (38.42 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือลำดับเบสซ้ำ 1 เบส (30.90 เปอร์เซ็นต์) และ เบสซ้ำ 3 เบส ตามลำดับ (22.03 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ โดยรูปแบบของลำดับเบสซ้ำ 2 เบส ที่พบมากที่สุด คือ AG/CT ส่วนลำดับเบสซ้ำแบบ CG/GC จะไม่พบ

เลย สอดคล้องกับการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ของกล้วยไม้หวาย (*Dendrobium nobile*) (Lu et al., 2013) และสกุลซิมบิเดียม (*Cymbidium* genus) (Moe et al., 2010) ที่พบว่าส่วนใหญ่จะพบลำดับเบสซ้ำ 2 เบส แบบ AG มากที่สุด และลำดับเบสซ้ำแบบ CG จะพบได้น้อยมากในกล้วยไม้ทั้ง 2 สกุล รวมทั้งในกลุ่มธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด ถั่วเหลือง (Nicot et al., 2004) และกลุ่มพืชใบเลี้ยงคู่ เป็นต้น (Poncet et al., 2006) และรูปแบบของลำดับเบสซ้ำ 3 เบส ที่พบมาก คือ CGG/GCC ซึ่งความถี่ลำดับเบสซ้ำ 3 เบส ชนิดนี้จะพบได้น้อยในกล้วยไม้หวาย (*Dendrobium nobile*) (Lu et al., 2013) สกุลซิมบิเดียม (*Cymbidium* genus) (Moe et al., 2010) และกลุ่มพืชใบเลี้ยงคู่ โดยรูปแบบที่พบส่วนใหญ่จะเป็นแบบ AAG (Yu et al., 2004) ส่วนในกล้วยไม้สกุลแวนด้าพบความถี่ของลำดับเบส 2 เบส แบบ AT/TA มากที่สุด รองลงคือความถี่ของเบสซ้ำ 3 เบส แบบAAG/TTC และ AGA/TCT และรูปแบบของลำดับเบสซ้ำชนิดอื่นจะพบได้น้อยในกล้วยไม้สกุลนี้ (The et al., 2011)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

จากการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเครื่องหมาย EST-microsatellite และจาก G-microsatellite ที่รวบรวมจากบทความวิจัย พบว่า เครื่องหมายเครื่องหมาย EST-microsatellite และ G-microsatellite จำนวน 25 คู่ และ 8 คู่ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้ นำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดังกล่าว มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง ตรวจสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง HAD-GT12™ capillary gel electrophoresis system (Qiagen, Germany) พบว่า ได้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่แสดงความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 20 คู่ ได้อัลลีลที่แสดงความแตกต่าง จำนวน 92 อัลลีล ประกอบด้วย ไพรเมอร์ EST-microsatellite ที่แสดงความแตกต่างในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 13 คู่ ได้อัลลีลที่แสดงความแตกต่าง จำนวน 57 อัลลีล เฉลี่ย 4 อัลลีลต่อไพรเมอร์ จำนวนอัลลีลที่ได้อยู่ระหว่าง 2- 7 อัลลีล โดยมีไพรเมอร์ B34 และ B35 ที่มีจำนวนอัลลีลสูงสุด คือ จำนวน 7 อัลลีล

ค่า Polymorphic information content (PIC value) มีค่า 0.828 และ 0.786 ตามลำดับ รองลงมาคือ ไพรเมอร์ B27 B39 และ B2 จำนวน 6 อัลลีล ค่า PIC มีค่า 0.751 0.733 และ 0.667 ตามลำดับ บ่งชี้ได้ว่าค่า PIC ของเครื่องหมาย EST-microsatellite ทั้ง 5 เครื่องหมาย มีค่าอยู่ในระดับค่อนข้างสูง และมีไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ (G-microsatellite) จากกล้วยไม้สกุลอื่นที่แสดงความแตกต่างในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 7 คู่ ได้อัลลีลที่แสดงความแตกต่าง จำนวน 35 อัลลีล เฉลี่ย 5 อัลลีลต่อไพรเมอร์ จำนวนอัลลีลที่ได้อยู่ระหว่าง 2-8 อัลลีล โดยมีไพรเมอร์ SV04 มีจำนวนอัลลีลสูงสุด คือ 8 อัลลีล ค่า PIC มีค่าเท่ากับ 0.844 บ่งชี้ได้ว่า ค่า PIC ของเครื่องหมายนี้มีค่าอยู่ในระดับสูง เนื่องจากเครื่องหมาย G - microsatellite พัฒนามาจากจีโนมิกดีเอ็นเอ อาจเป็นส่วนของยีน หรือไม่ใช่ยีนก็ได้ จึงมีความแปรปรวนสูง และมีโอกาสเกิดโพลีมอร์ฟิซึมได้สูงกว่าเครื่องหมาย EST-microsatellite แต่เครื่องหมาย EST-microsatellite สามารถนำไปใช้ในการถ่ายโอน (cross transferability) ในพืชที่มี

ความสัมพันธ์ใกล้ชิดที่อยู่ในสกุลเดียวกัน หรือต่างสกุลแต่อยู่ในวงศ์เดียวกันได้สูงกว่าเครื่องหมาย G-microsatellite ทั้งนี้เนื่องมาจากเครื่องหมาย EST-microsatellite พัฒนามาจากยีนที่มีการแสดงออก และเป็นยีนที่มีการอนุรักษ์ลำดับเบส (conserve sequence) อาจมาจากต้นกำเนิดหรือบรรพบุรุษร่วมกัน (Barati and Arzani, 2012; Chapman et al., 2009; Datta et al., 2010; Fang et al., 2010; Gupta et al., 2003; Poncet et al., 2006)

ค่าสัมประสิทธิ์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งจำนวน 24 ตัวอย่าง มีค่าตั้งแต่ 0.19- 0.70 เฉลี่ยเท่ากับ 0.53 การจัดกลุ่มทางพันธุกรรม (UPGMA cluster analysis) และการวิเคราะห์ปัจจัยหลัก (PCA) สามารถจัดกลุ่ม ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และภายในกลุ่มใหญ่นั้นสามารถแยกเป็นกลุ่มย่อยระหว่างกลุ่มของกล้วยไม้ม้าวิ่ง และแดงอุบลได้อย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่า เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์มีประสิทธิภาพในนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสม

การคัดกรองเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 33 คู่ (EST-microsatellite จำนวน 25 คู่ และ G-microsatellite) ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ ที่ใช้ในการพัฒนาลูกผสมกล้วยต่างสกุล จำนวน 2 ชุด ประกอบด้วย คู่ผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกับสกุลฟาแลนอปซีส (ประกอบด้วย *Phalaenopsis ember* var *wedding* และ *Phalaenopsis*-Red) และกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกับสกุลเข็ม ได้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกับสกุลฟาแลนอปซีส ได้จำนวน 10 เครื่องหมาย (ประกอบด้วย EST-microsatellite จำนวน 6 เครื่องหมาย และ G-microsatellite จำนวน 4 เครื่องหมาย) และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกับสกุลเข็ม ได้จำนวน 4 เครื่องหมาย (EST-microsatellite จำนวน 3 เครื่องหมาย และ G-microsatellite จำนวน 1 เครื่องหมาย)

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสมระหว่าง *Phaleanopsis ember* var wedding x NK 14 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) และลูกผสมระหว่าง *Phaleanopsis ember* var wedding x PK3 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 9 เครื่องหมาย (ประกอบด้วย EST-microsatellite จำนวน 5 เครื่องหมาย และ G-microsatellite จำนวน 4 เครื่องหมาย) พบว่า ลูกผสมที่ได้ส่วนใหญ่จะมีจีโนไทป์เหมือนสายพันธุ์แม่ อาจเนื่องมาจากลูกผสมส่วนใหญ่มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จากเนื้อเยื่อของฝักที่เป็นสายพันธุ์แม่ที่เจริญเติบโตในระหว่างการเพาะเลี้ยงในสภาพที่ปลอดเชื้อ และ *Phaleanopsis ember var wedding* เป็นพันธุ์กล้วยไม้ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์แล้ว ไม่ทราบที่มาของฐานพันธุกรรม (genetic background) ที่ชัดเจน และมีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ดังนั้น จึงแยกความแตกต่าง

ได้ยาก ประกอบกับเครื่องหมาย G-microsatellite ที่นำมาตรวจสอบนั้นพัฒนาจากกล้วยไม้สกุลอื่น (*Cymbidium* sp. และ *Phalaenopsis gigantea*) ต่างจากกล้วยไม้ในสกุลที่นำมาสร้างลูกผสมที่ได้ในโครงการที่ 1 (*Phaleanopsis* และ *Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏไม่เป็นไปตามที่คาดการณ์ไว้

การตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสมระหว่าง NK13 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Phalaenopsis*-Red และ *Phaleanopsis ember var wedding* x RE4 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) จำนวน 15 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 10 เครื่องหมาย (ประกอบด้วย EST-microsatellite จำนวน 6 เครื่องหมาย และ G-microsatellite จำนวน 4 เครื่องหมาย) และการตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสมระหว่าง UN10 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Ascocentrum* sp. (เข็มแดง) และ NK4 (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) x *Ascocentrum* sp. (เข็มแสด) จำนวน 15 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 4 เครื่องหมาย (ประกอบด้วย EST-microsatellite จำนวน 3 เครื่องหมาย และ G-microsatellite จำนวน 1 เครื่องหมาย) พบว่า ลูกผสมที่ได้ทั้ง 15 ตัวอย่าง สามารถระบุได้ชัดเจนว่าเกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ เนื่องจากสายพันธุ์พ่อแม่มีจีโนไทป์เป็นโฮโมไซกัส ลูกที่ได้มีจีโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัสที่เกิดจากการผสมจริงระหว่างสองสายพันธุ์เป็นไปตามความคาดหมาย

ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ลูกผสมของกล้วยไม้ที่ได้จากการผสมข้ามสกุลครั้งนี้ เป็นการบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการบ่งชี้กล้วยไม้ลูกผสมได้อย่างชัดเจน การตรวจสอบและยืนยันความเป็นเอกลักษณ์ของลูกผสม โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในขณะต้นยังเล็กทำได้ค่อนข้างยาก ดังนั้นการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่มีความจำเพาะจึงเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงการข่มรวม ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ที่เป็นโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนามาจากยีนที่แสดงออก (EST) จะมีข้อดีเด่น คือสามารถนำมาใช้ตรวจสอบพืชต่างสกุลหรือต่างสปีชีส์ที่มีบรรพบุรุษเดียวกันได้ จากการตรวจสอบเอกลักษณ์ของลูกผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกับสกุลฟาแลนอปซีส และกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกับสกุลเข็ม พบว่า จากไพรเมอร์ EST-microsatellite ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 25 คู่ มีเพียงไพรเมอร์ EST-microsatellite จำนวน 3 เครื่องหมาย เท่านั้นที่สามารถตรวจสอบลูกผสมที่มาจาก 3 สกุลได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Naresh et al. (2009) ที่พัฒนาเครื่องหมาย EST-microsatellite เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดอกคำฝอยลูกผสม จากการคัดกรองเครื่องหมาย EST-microsatellite ที่แยกความแตกต่างระหว่างพ่อแม่ได้ จำนวน จำนวน 119 คู่ พบว่ามีเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 5 คู่ เท่านั้นที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสมได้

สรุปผลการวิจัย

1) การพัฒนาเครื่องหมาย EST - microsatellite จากฐานข้อมูล EST พืชในวงศ์กล้วยไม้ทั้งหมดจำนวน 8,009 ลำดับเบส ข้อมูล mRNA ของกล้วยไม้สกุล *Doritis* จำนวน 14 ลำดับเบส และข้อมูล mRNA ของกล้วยไม้สายพันธุ์อื่น ๆ อีก จำนวน 88 ลำดับเบส เมื่อจัดกลุ่ม และค้นหาไมโครแซทเทลไลท์ ออกแบบไพรเมอร์ ได้ไพรเมอร์ EST-microsatellite จำนวน 177 คู่ โดยพบไมโครแซทเทลไลท์แบบซ้ำ 2 เบสมากที่สุด รองลงมาคือเบสซ้ำ 1 เบส และ 3 เบส ตามลำดับ รูปแบบของลำดับเบสซ้ำ 2 เบส ที่พบมากที่สุด คือ TC/GA รองลงมาคือ AG/CT (15.17 และ 11.24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) สุ่มเลือกไพรเมอร์ EST-microsatellite มาทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้ม้าวิ่ง จำนวน 100 คู่ มีไพรเมอร์ EST-microsatellite จำนวน 25 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ชัดเจน นอกจากนี้ได้สืบค้นหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (G-microsatellite) จากกล้วยไม้สกุลอื่น จำนวน 35 คู่ ทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้ม้าวิ่ง ได้เครื่องหมาย G-microsatellite ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้ม้าวิ่ง จำนวน 8 คู่

2) สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 33 คู่ ประกอบด้วย EST-microsatellite จำนวน 25 คู่ และ G-microsatellite จำนวน 8 คู่ ได้อัลลีลทั้งหมด จำนวน 142 อัลลีล โดยมีไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ที่ให้แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 20 คู่ ประกอบด้วยไพรเมอร์ EST-- microsatellite จำนวน 13 คู่ ได้อัลลีลที่แสดงความแตกต่าง จำนวน 57 อัลลีล และ G-microsatellite จำนวน 7 คู่ ได้อัลลีลที่แสดงความแตกต่าง จำนวน 35 อัลลีล รวมอัลลีลที่แสดงความแตกต่างในเชื้อพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง จำนวน 24 ตัวอย่าง ทั้งหมด 92 อัลลีล เฉลี่ย 4.6 อัลลีลต่อคู่ไพรเมอร์ ค่า PIC ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 20 คู่ มีค่าระหว่าง 0.124 – 0.844 คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.620 บ่งชี้ได้ว่าประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการนำไปใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งอยู่ในระดับปานกลางถึงค่อนข้างสูง ค่าสัมประสิทธิ์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมีค่าตั้งแต่ 0.19-0.70 การจัดกลุ่มทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA และ PCA ให้ผลสอดคล้องกัน โดยสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และภายในกลุ่มย่อยสามารถแยกกลุ่มระหว่างกล้วยไม้ม้าวิ่ง และแดงอุบลได้อย่างชัดเจน

3) การตรวจสอบเอกลักษณ์ของกล้วยไม้ลูกผสมต่างสกุล จำนวน 6 คู่ผสม ประกอบด้วยคู่ผสมระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับ สกุลฟาแลนอปซีส จำนวน 4 คู่ผสม และ สกุลม้าวิ่ง กับ สกุลเข็ม จำนวน 2 คู่ผสม เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 33 คู่ ประกอบด้วยเครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 25 คู่ เครื่องหมาย G-microsatellite จำนวน 8 คู่ และสืบค้นเครื่องหมาย G-microsatellite เพิ่มเติมอีกจำนวน 25 คู่ พบว่า ได้เครื่องหมาย EST-microsatellite จำนวน 5 คู่ (A48, B2, B28, B34 และ B41) และ เครื่องหมาย G-microsatellite จำนวน 4 คู่ (KNU-CC-32, KNU-CC-71, PGB209 และ

PGCT17) ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง กับ สกุลฟาแลนอปซีส และเครื่องหมาย EST - microsatellite จำนวน 3 คู่ (A48, B9, และ B28) เครื่องหมาย G-microsatellite จำนวน 1 คู่ (KNU-CC-55) ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสกุลม้าวิ่ง กับ สกุลเข็ม ได้อย่างชัดเจน ซึ่งเครื่องหมายดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบเอกลักษณ์ของกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างสกุลดังกล่าวได้

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้จากการพัฒนาครั้งนี้ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อการอนุรักษ์ และคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ที่เหมาะสม เพื่อสร้างกล้วยไม้ลูกผสม *Doritis* เชิงพาณิชย์ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ครรชิต ธรรมศิริ. 2541. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. อัมรินทร์พริ้นติ้งแอนพับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ

จุลภาค คุ้นวงศ์, ทิพวัลย์ อยู่ชา, พนิดา ฐาตุจิรางค์กูล และฉัฐพร คุ้นวงศ์. 2548. การสร้างดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SSLP ของกล้วยไม้สกุลหวาย. ใน การประชุมประจำปี สวทช. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, ปทุมธานี.

ปฐพีชล วายุอัคคี. 2547. คู่มือกล้วยไม้. ครั้งที่ 1. เพ็ท-แพล้น พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

ปรารถนา เผือกวิไล. 2550. การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับกล้วยไม้สกุลแวนด้า. วิทยานิพนท์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 70 หน้า

สุรีพร เกตุงาม 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปีที่ 5 (2): 37-58

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2549. เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์, น. 19-23. เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ. กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. ดอกกล้วยไม้สด. สถิตินำเข้า-ส่งออก. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/statistic/export/1301OC.xls, 19 กันยายน 2550.

Barati, M. and A. Arzani. 2012. Genetic diversity revealed by EST-SSR markers in cultivated and wild safflower. Biochem Syst Ecol 44: 117-123.

Billotte, N., A. M. Risterucci, E. Barcelos, J. L. Noyer, P. Amblard and F. C. Baurens. 2001. Development, characterization, and across-taxa utility of oil palm (*Elacis guineensis* Jacq) microsatellite markers. Genome 44: 413-425.

Boonsrangsom, T., P. Pongtongkam, S. Masuthon and S. Peyachoknagul. 2008. Development of microsatellite markers for *Dendrobium* orchids. Thai J Genet 1(1): 47-56.

Bory, S., D. Da Silva, A.-M. Risterucci, M. Grisoni, P. Besse and M.-F. Duval. 2008. Development of microsatellite markers in cultivated vanilla: Polymorphism and transferability to other vanilla species. Scientia Hort 115: 420–425.

Brown, S. M., A. K. Szewc-McFadden, and S. Kresovish. 1996. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis. *In*. Methods of plant genome analysis: Their merits and pitfalls. Jauhar, P.P. (ed.). CRS Press, Boca raton, FL. U.S.A. p. 147-159

Butcher, P. A., S. Decroocq, Y. Gray and G. F. Moran. 2002. Developmental, inheritance and across-species amplification of microsatellite markers from *Acacia mangium*. Theor Appl Genet 101: 1282-1290.

Campbell, V. V., G. Rowe, T. J. C. Beebee and M. J. Hutchings. 2002. Isolation and characterization of microsatellite primers for the Fragrant Orchid *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Brown (Orchidaceae). Conserv Genet 3: 209-210.

Cai, X., Z. Fenga, B. Houa, W. Xinga and X. Dinga. 2012. Development of microsatellite markers for genetic diversity analysis of *Dendrobium loddigesii* Rolfe, an endangered orchid in China. Biochem Syst Ecol 43: 42-47.

Chapman, M. A., J. Hvala, J. Strever, M. Matvienko, A. Kozik, R. W. Michelmore, S. Tang, S. J. Knapp and J. M. Burke. 2009. Development, polymorphism, and cross-taxon utility of EST–SSR markers from safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Theor Appl Genet 120: 85–91.

Clauss, M. J., H. Cobban and T. Mitchell-Olds. 2002. Cross-species microsatellite markers for elucidating population structure in *Arabidopsis a*nd *Arabis* (Brassicaeae). Mol Ecol 11: 591-601.

Cordeiro, G. M., T. L. Maguire, K. J. Edwards and R. J. Henry. 1999. Optimization of a microsatellite enrichment technique in *Saccharum* spp. Plant Mol Biol Rept 17: 225-229.

Cotrim, H. C., F. A. Monteiro, E. S. Sousa, M. F. Fay, M. W. Chase and M. S. Pais. 2008. Isolation and characterization of novel polymorphic nuclear microsatellite markers from *Ophrys fusca* (Orchidaceae) and cross-species amplification. Conserv Genet 10: 739-742.

Decroocq, V., M. G. Fave, L. Hagen, L. Bordenave and S. Decroocq. 2003. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. Theor Appl Genet 106: 912–922

Dressler, R. L. 1993. Phylogeny and Classification of the Orchid Family. Cambridge University Press. p. 321.

Edwards, K. J., J. H. A. Barker, A. Daly, C. Janes and A. Karp. 1996. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. Biotechnique. 20: 758-760.

Fatimah and D. Sukma. 2011. Development of sequence-based microsatellite marker for *Phalaenopsis* Orchid. HAYATI J Biosci 18(2): 71-76.

Godldstein, D. B. and C. Schlötterer. 1999. Microsatellites evolution and application. 1st ed. Oxford university press, Great Britain.

He, G., R. Meng, M. Newman, G. Ao, R. N. Pitman and C. S. PraKash. 2003. Microsatellite as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). PMC Plant Biol 3: 1-6.

He, G., F. E. Woullard, I. Marong and B. Z. Guo. 2006. Transferability of soybean SSR markers in peanut (*Arachis hypogaea* L.). Peanut Science 33: 22-28.

Huang, Y., F. Li and K. Chen. 2010. Analysis of diversity and relationships among Chinese orchid cultivars using EST-SSR markers. Biochem Syst Ecol 38: 93-102.

Hüttel, B., P. Winter, K. Weising, W. Choumane, F. Weigand and G. Kahl. 1999. Sequence-tagged microsattellite site markers for chickpea (*Cicer arietium L*.). Genome. 42: 210-217.

Hwang, S. Y., Y. T. Tseng and H. F. Lo. 2002. Application of simple sequence repeats in determining the genetic relationship of cultivars used in sweet potato polycross breeding in Taiwan. Scientia Hort 93: 215-224.

Ince, A. G., M. Karaca and A. N. Onus. 2010. Polymorphic microsatellite markers transferable across *Capsicum* species. Plant Mol Biol Rept 28: 285-291.

Joshi, S. P., V. S. Gupta, R. K. Aggarwal, P. K. Ranjekar and D. S. Brar. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. Theor Appl Genet 100: 1311-1320.

Juillet, N., H. Freymond, L. Degen and J. Goudet. 2003. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite loci in the bladder campion, *Silene vulgais* (Caryophyllaceae). Mol Ecol Notes 3: 358-359.

Levinson, G. and G. A. Gutman. 1987. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacterophage M13 in *Echeichia coli* K-12. Nucl Acids Res 15: 5323-5338.

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

Li-Fang, Z., L. Feng, B. Qian, H. Xu, Z. Pei and Z. Qi. 2008. Development and chromosome mapping of new wheat EST-SSR markers and application for characterizing rye chromosome added in wheat. Acta Agron Sin 34 (6): 926–933.

Linzhi, L., J. Wang, Y. Guo, f. Jiang, Y. Xu, Y. Wang, H. Pan, G. Han, R. Li and S. Li. 2008. Development of SSR markers from EST of graminous species and their chromosome location on wheat. Progress Natu Science 18: 1485-1490.

Lu, J-J, H.-Y. Zhao, N-N. Suo, S. Wang, B. Shen, H-Z. Wang and J-J. Liu. 2012. Genetic linkage maps of *Dendrobium moniliforme* and *D. officinale* based on EST-SSR, SRAP, ISSR and RAPD markers. Scientia Hort 137: 1-10.

Lu, J-J., J-Y. Kang, S-G. Feng, H-Y. Zhao, J-J. Liu and H-Z. Wang. 2013. Transferability of SSR markers derived from *Dendrobium nobile* expressed sequence tags (ESTs) and their utilization in *Dendrobium* phylogeny analysis. Scientia Hort 158: 8–15.

Moe, K. T., W. Zhao, H-S. Song, Y-H. Kim, J-W. Chung, Y-I. Cho, P. H. Park, H-S. Park, S-C. Chae and Y-J. Park. 2010. Development of SSR markers to study diversity in the genus *Cymbidium*. Biochem Syst Ecol 38: 585-594.

Naresh, V., K. N. Yamini, P. Rajendrakumar and V. D. Kumar. 2009. EST-SSR marker-based assay for genetic purity assessment of safflower hybrids. Euphytica 170: 347-353.

Oliveira, A. C., A. N. Garcia, M. Cristofani and M. A. Machado. 2002. Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. Euphytica 128: 397-403.

Omirshat, T., Y. Geng, L. Zeng, S. Dong, F. Chen, J. Chen, Z. Song and Y. Zhong. 2009. Assessment of genetic diversity and population structure of Chinese wild almond, *Amygdalus nana*, using EST- and genomic SSRs. Biochem Syst Ecol 37: 146-153.

Paterson, A. H. 1996. Genome mapping in plants. Academic Press, Inc., San Diego, California, U.S.A. p. 330.

Paterson, A. H., S. D. Tankslay, and M. E. Sorrells. 1991. DNA markers in plant improvement. Adv Agron 46: 39-90.

Pinto, L. R., K. M. Oliveira, E. C. Ulian, A. A. F. Garcia and A. P. de Souza. 2004. Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats. Genome 47: 795-804.

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.

Rohlf, F.J., 2000. NTYSYS pc2.1: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter software, NewYork.

Poncet, V., M. Rondeau, C. Trachant, A. Cayrel, S. Hamon, A.D. Kochko. and P. Hamon. 2006. SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST-SSRs as makers for the *Coffea* genus. Mol Genet Genomics 276: 436-449.

Powell, W., C. Machray, and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Sci 1: 215-222.

Qureshi, S. N., S. Saha, R. V. Kantety and J. N. Jenkins. 2004. EST-SSR: A new class of genetic markers in cotton. J Cotton Sci 8: 112-123.

Richard G. and F. Pâques. 2000. Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. EMBO Rep 1: 122–126.

Ritschel, P. S., T. C. L. Lins, R. L. Tristan, G. S. C. Buso, J. A. Buso and M. E. Ferreira. 2004. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). BMC Plant Biology 4: 1471-1485.

Rivera, M. A. J., G. C. Graham and G. K. Roderick. 2003. Isolation and characterization of nine microsatellite loci from the Hawaiian geauper *Epinephelus quernus* (Serranidae) for population genetic analyses. Mar Biotechnol 5: 126-129.

Rodrigues, K. F. and S. V. Kumar. 2009. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Phalaenopsis gigantea*. Conserv Genet 10:559–562.

Rota, M. L., R. V. Kantety, J. K. Yu and M. E. Sorrells. 2005. Nonrandom distribution and frequencies of genomic and EST-derived microsatellite markers in rice, wheat and barley. BMC Genomics 6: 1-12.

Shuttleworth, F. S., H. S. Zim and G. W. Dillon. 1970. Orchids. Golden Press. New York.

Soliva, M., B. Gautshi, C. Salzmann, I. Tenzer and A. Widmer. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the orchid *Ophyrys araneola* (Orchidaceae) and a test cross-species amplification. Mol. Ecol. 9: 2178-2179.

Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. Numerical taxonomy. W. H. Freeman and Company, San Francisco.

Stuab, J. E., and F. C. Serquen. 1996. Genetic markers, map construction, and their applications in plant breeding. Hort Sci 31(5): 729-741.

Sue, P., L. G. Bailey and B. R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol component. Plant Mol Bio Rept 15 (1): 8-15.

Tankslay, S. D., N. D. Young, A. H. Paterson, and M. W. Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. Biotechnology. 7: 257-264.

Teh, S-L. W-S. Chan, J. O. Abdullah and P. Namasivayam. 2011. Development of expressed sequence tag resources for *Vanda* Mimi Palmer and data mining for EST-SSR. Mol Biol Rep 38: 3903–3909.

Varshney, R. K., R. Sigmund, A. Borner. V. Korzun. N. Stein. M. E. Sorrells. P. Langrige. and A. Graner. 2005. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. Plant Sci 168: 195-202.

Venkatachalam, L, R. V. Sreedhar and N. Bhagyalakshmi. 2008. The use of genetic markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and phylogenetic relationships among banana cultivars. Mol Biol Evol 47: 974-985.

Vos, P., R. Hogers, M. Blecker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuipe and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucl Acids Res 23: 4407-4414.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. I. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl Acids Res 18: 6231-6235.

Yu, J. K., T. M. Dake, S. Singh, D. Bescher, W. Li, B. Gill and M. E. Sorrells. 2004. Development and mapping of EST-derived simple sequence repeat markers for hexapoid wheat. Genome 47: 805-818.

Yue, G. H., L.T. Lam-Chen 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

บทความวิจัย

1. ผลงานวิจัยในวารสารนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง

Jantasuriyarat, C., S. Ritchuay, P. Pattarawat, P. Srifah Huehne and S. Kate-Ngam. 2012. Development and transferability of EST-SSR and transferability of genomic SSR markers for genetic diversity assessment of *Doritis*. Biochemical Systematics and Ecology 45: 57–65.

2. นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการนานาชาติ 2 เรื่อง

Ritchuay, S., Jantasuriyarat, C. and Kate-ngam, S. 2012. Development of EST-SSR and transferability of genomic SSR markers of orchid species for genetic diversity assessment of *Doritis* species in Thailand. The 3rd International Agricultural Students Symposium (IASS) February 19-28, 2012. University of Putra Malaysia, Malaysia.

Ritchuay S, Jantasuriyarat C and Kate-ngam S. 2010. Development of EST-SSR markers for orchid in *Doritis* family. The 2nd International Agricultural Students Symposium (IASS) July 11-20, 2010. University of Putra Malaysia, Malaysia.

Biochemical Systematics and Ecology 45 (2012) 57–65

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical Systematics and Ecology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochemsyseco

Development and transferability of EST-SSR and transferability of genomic SSR markers for genetic diversity assessment of *Doritis*

Chatchawan Jantasuriyarat [a,b,*], Savitree Ritchuay [a], Pawat Pattarawat [a], Pattana Srifah Huehne [a], Sureeporn Kate-Ngam [c]

[a] Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand
[b] Center for Advanced Studies in Tropical Natural Resources, National Research University-Kasetsart University (CASTNAR, NRU-KU), Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand
[c] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Warin Chamrap, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 January 2012
Accepted 1 July 2012
Available online 4 August 2012

Keywords:
Doritis
Microsatellite
Transferability
Genetic diversity

ABSTRACT

Doritis is a wild terrestrial orchid, originated in the Northeastern part of Thailand. With its good floral structure and very diverse color, it has high potential to develop into commercial ornamental plant or to use as a hybridizer with other orchid species. Unfortunately it has not been studied in detail for its potential of development. In this study we developed SSR markers from EST database and examined the transferability of genomic SSR markers from other orchids in *Doritis*. 8009 ESTs belonged to family *Orchidaceae* were collected and analyzed for microsatellite. A total of 195 EST-SSR were identified. Twenty-three EST-SSR and seven genomic SSR primers (from *Dendrobium* and *Serapias*) were used for genetic diversity assessment of *Doritis* germplasm. 142 alleles were generated in which, 92 alleles (64.8%) showed polymorphism among 30 *Doritis* accessions (*Doritis regnieriana*, *Doritis pulcherrima* and *D. pulcherrima* var. *buyssoniana*.). The polymorphic information content (PIC) average at 0.6076 and ranged from 0.1244 to 0.8439. The phylogenetic tree based on UPGMA showed three major clades based on their taxonomy indicating that SSR markers developed in this study can be used for identification, conservation and selection of appropriate parents for the *Doritis* hybrid production in future.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Doritis, a monopodial lithophytic species, is a genus closely related to *Phalaenopsis*. It comprises only two species: *Doritis regnieriana* Lindl. and *Doritis pulcherrima* Rchb.f. (Kamemoto and Sakarik, 1975). This orchid is widely distributed in Indochina, Burma, Thailand, Malaysia and Sumatra (Christenson, 2001). Three varieties are commonly found in Thailand including *D. regnieriana*, *D. pulcherrima* and *D. pulcherrima* var. *buyssoniana*. *D. regnieriana* is known by the locals as "Ma-wing-krae". *D. pulcherrima* is known as "Ma-wing" because the shape of flower resembles the head of a running horse. *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* abounds in the northeast of Thailand, on the banks of the Mekong River in Ubon Ratchathani province, which Thais refer to as "Daeng Ubon" (red Ubon). With larger flowers, larger leaves and longer inflorescences than *D. pulcherrima*, it is considered a variation of *D. pulcherrima* distinctive enough to warrant a botanical variety status (Kamemoto and Sakarik, 1975). In general, orchids in genus *Doritis* can grow in a relatively dry environment. The characteristics of the plant, especially the flower, are considered to have potential in the horticultural trade.

* Corresponding author. Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand. Tel.: +66 2562 5555; fax: +66 2579 5528.
E-mail address: fscicwj@ku.ac.th (C. Jantasuriyarat).

0305-1978/$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2012.07.005

Currently, the lack of information about *Doritis* genetic diversity and its evolution is one of the obstacles of using *Doritis* to its maximum potential and developing new exotic ornamental hybrids. The use of molecular technologies will help to speed up this process including using molecular markers in the selection of parents for hybrid production. Determining the genetic diversity of *Doritis* is an important step in generating the information for breeders to breed new *Doritis* hybrids.

In this study we developed SSR markers from EST database of other orchid genera and examined the transferability of genomic SSR markers from other orchid genera to *Doritis*. We then used these SSR markers (both EST-SSR and genomic SSR) to assess genetic diversity of 30 *Doritis* accessions from the northeast of Thailand. The data obtained from this research will be useful for the selection of appropriate parents for the *Doritis* hybrid production.

2. Materials and methods

2.1. Plant materials and DNA extraction

Thirty accessions of *Doritis* were collected from Northeastern part of Thailand including three accessions of *D. regnieriana* Lindl., twelve accessions of *D. pulcherrima* Rchb.f. and fifteen accessions of *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* (Table 1 and Fig. 1). All *Doritis* samples were cultured in the greenhouse at the Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University. The total genomic DNA was extracted from young leaves using a modified CTAB method (Doyle and Doyle, 1990). DNA concentrations were evaluated using a NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermoscientific), then diluted to 50 ng/μl and stored at −20 °C.

2.2. Development of EST-SSR markers

A total of 8018 EST sequences of *Doritis* and other related orchid species (*Dendrobium* and *Phalaenopsis*) were downloaded from National Center for Biotechnology Information (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (GenBank) in September 2010. These EST sequences were processed by trimming off vector sequences, clustered and assembled using the TGIL (http://sourceforge.net/projects/tgicl/) and CAP3 program (http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php). The unique sequences were used to analyze repeated patterns and design primers by using the troll software (http://wsmartins.net/websat/), defining minimum SSR repeats of 10, 6, 5, 4, 4 and 4 base pairs for mono-, di-, tri-, tetra-, penta- and hexa-nucleotide repeats respectively. Primers were designed flanking the SSR and generated PCR products 100–400 base pairs in length. Primer size ranges between 18 and 27 base pairs, melting temperature of primer ranges between 57 and 68 °C and GC content ranges between 40 and 80%. One hundred primer pairs were randomly selected and synthesized at Pacific Science Co., Ltd and BioDesign Co., Ltd for PCR amplification.

Table 1
Accession number, Taxon and collection site of *Doritis* for study.

No.	Accession no.	Taxon	Collection site
1	S2	*D. regnieriana*	Sarabury
2	S3	*D. regnieriana*	Sarabury
3	S4	*D. regnieriana*	Sarabury
4	M2	*D. pulcherrima*	Sarabury
5	M5	*D. pulcherrima*	Sarabury
6	Mah	*D. pulcherrima*	Chiang Rai
7	RO4	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*	Roi Et
8	RO10	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*	Roi Et
9	DB6	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*	Sirindhon, Ubon Ratchathani
10	DB8	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*	Sirindhon, Ubon Ratchathani
11	MDD2	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*	Indochaina market, Mukdahan
12	MDD3	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*	Indochaina market, Mukdahan
13	MDD6	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*	Indochaina market, Mukdahan
14	MDD10	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*	Indochaina market, Mukdahan
15	MDD11	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*	Indochaina market, Mukdahan
16	MDD15	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*	Indochaina market, Mukdahan
17	MDD20	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*	Indochaina market, Mukdahan
18	MDD22	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*	Indochaina market, Mukdahan
19	CM8	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*	Sirindhon, Ubon Ratchathani
20	CM11	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*	Sirindhon, Ubon Ratchathani
21	CM16	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*	Sirindhon, Ubon Ratchathani
22	MV4	*D. pulcherrima*	Sirindhon, Ubon Ratchathani
23	MVP2	*D. pulcherrima*	Pho Sai, Ubon Ratchathani
24	MVP26	*D. pulcherrima*	Pho Sai, Ubon Ratchathani
25	MVP27	*D. pulcherrima*	Pho Sai, Ubon Ratchathani
26	PT1	*D. pulcherrima*	Phu Pha Thoep National park Mukdahan
27	PT2	*D. pulcherrima*	Phu Pha Thoep National park Mukdahan
28	MDM14	*D. pulcherrima*	Indochaina market, Mukdahan
29	MDM18	*D. pulcherrima*	Indochaina market, Mukdahan
30	MDM21	*D. pulcherrima*	Indochaina market, Mukdahan

Fig. 1. Map of Thailand showing the collection sites (circle: *D. pulcherrima*, square: *D. buyssoniana* and triangle: *D. regnieriana*).

2.3. EST-SSR amplification

PCR reactions were carried out in a final volume of 20 μl, containing approximately 50 ng of genomic DNA, 0.5 units of DreamTaq™ DNA Polymerase (Fermentas, USA), 1× DreamTaq™ DNA Polymerase buffer, 5 μM of each primer and 200 μM of dNTP. Amplification reactions were carried out on a Bioer GenePro Thermal Cycler (USA) using the following cycling profile: 94° C for 5 min followed by 30 cycles at 94° C for 30 s, 48–62° C (gradient) for 30 s, 72° C for 60 s, final extension step at 72° C for 10 min and the PCR products were stored at 4° C before analysis. The PCR products were separated on 2.0% agarose gel electrophoresis at 75 V for 1.5 h and visualized under UV light after staining with ethidium bromide. The detection of polymorphism of PCR products was carried out by HAD-GT12™ capillary gel electrophoresis system (Qiagene, Germany) following the manufacturer's protocol using OM500 method.

2.4. Transferability of genomic SSR

Thirty five genomic SSR markers developed from other orchid species including 6 SSR markers from *Serapias* (Pellegrino et al., 2001) and 29 SSR markers from *Dendrobium* (Yoocha et al., 2006; Yue et al., 2006) were tested for amplification in *Doritis* using the same PCR amplification protocol mentioned above. Those primer pairs that can amplify a clear band in *Doritis* were used for genetic diversity assessment.

2.5. Genetic diversity and phylogenetic analysis

For data analysis, the polymorphic of EST- and genomic-SSR alleles were scored for the presence (1) and absence (0) for all thirty individuals. The number of polymorphic bands (PB), percentage of polymorphic bands (PPB), the observed number of alleles per locus (A_o), effective number of alleles per locus (A_e), expected heterozygosity (H_e) and Shannon's information index (H_o) was calculated using POPGENE v.1.31 (Yeh et al., 1999). Polymorphism information content (PIC) was calculated by applying the formula given by Anderson et al. (1993). The NTSYS pc version 2.1 software package (Rohlf, 2000) was used to calculate Dice genetic similarity coefficient (Nei and Li, 1979) for cluster analysis using the unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA). Principal Coordinate Analysis (PCA) was also performed using NTSYS-pc software to resolve the patterns of clustering among genotypes. AMOVA was used to investigate genetic diversity among and within species (Excoffier et al., 1992; Missio et al., 2009) using Arlequin3.5 software program (http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3).

3. Results

3.1. EST-SSR identification, development and characterization

From a total of 8018 ESTs of orchid species obtained from GenBank EST database, an assembly of high quality ESTs generated 1765 unique sequences including 695 contigs and 1070 singletons. The EST-SSR search software was identified and designed 195 SSR primer pairs, based on criteria described in Materials and methods. From a total of 195 identified EST-SSR, there were 67 (34.36%) mono-nucleotide repeats, 76 (38.98%) di-nucleotide repeats, 39 (20%) tri-nucleotide repeats, 6 (0.38%) tetra-nucleotide repeats, 1 (0.51%) penta-nucleotide repeat and 6 (3.08%) hexa-nucleotide repeats (Table 2). The TA/GA motif was the most common among di-nucleotide repeats accounting for 14.87% followed by AC/CT (12.82%), AT (5.13%), TA (4.1%) and AC/GT (1.54%) as shown in Table 2. One hundred EST-SSR primer pairs were randomly selected and synthesized for evaluating the applicability of developed EST-SSR in *Doritis*. Twenty-three EST-SSR primers (23%) yielded unambiguous PCR products among 30 *Doritis* accessions (Table 3).

3.2. Genomic SSR marker transferability

Transferability of thirty five genomic SSR markers from other orchid genus was employed for amplification in *Doritis*. Seven SSR primer pairs (20%) were successful in *Doritis* DNA amplification and were used for genetic diversity assessment. One primer pair belonged to *Serapias* (20C) and six pairs belonged to *Dendrobium* (1C, 5C, 19C, 23C, 32C, 33C) (Table 3).

Table 2
The frequency of repeat motifs in EST-SSR markers.

Repeat unit	Motifs	Number	Frequency
Mono-nucleotide	A/T	64	32.82050
	G/C	3	1.53846
Di-nucleotide	TC/GA	29	14.87180
	AG/CT	25	12.82050
	AT	10	5.12821
	TA	8	4.10256
	AC/GT	3	1.53846
	CA	1	0.51282
Tri-nucleotide	CGG/CCG	8	4.10256
	GCC/GGC	7	3.58974
	GCG/CGC	3	1.53846
	GTG/CAC	3	1.53846
	AAG/CTT	3	1.53846
	CAA/TTG	3	1.53846
	AGG/CCT	2	1.02564
	ATC/GAT	2	1.02564
	TTC/GAA	2	1.02564
	AGA/TCT	1	0.51282
	ATA/TAT	1	0.51282
	GAC/GTC	1	0.51282
	CAG/CTG	1	0.51282
	TGA/TCA	1	0.51282
	TGG/CCA	1	0.51282
Tetra-nucleotide	AAAC/GTTT	5	2.56410
	AATT/TTAA	1	0.51282
Penta-nucleotide	TTGGT/ACCAA	1	0.51282
Hexa-nucleotide	CGGCAG/CTGCCG	3	1.53846
	CCCAAA/TTTGGG	2	1.02564
	TAACCC/GGGTTA	1	0.51282
Total		195	100

Table 3
Sequences of 20 polymorphic primers, their accession number, repeat motif, annealing temperature, size range of product, number of alleles, PIC and protein description.

Name	GenBank accession no.	Forward Reword	Repeat motif	T_a	Size range	No. of alleles	PIC	Protein description and reference
7A	CB034531.1	TTCTTCTGTGCATCTTTTGCTC CACAAACCCAATTTAACACCCT	(A)11	54	74–85	5	0.6794	Fiber protein Fb11 AAN77150.1
11A	CB032260	CTTGATGAATGTGAGGAAACCA AAACCTTACTGTTGGGCACACT	(CAA)5	62	116–119	2	0.495	Not hit
26A	CO742605.1	TGGAAATGACAAGGTTTCTGTG TTGAGCTTAGGAGGCAAATAGG	(GGAGCA)4	62	183–189	2	0.4528	Not hit
2B	CK859111.1	AGACGGGCTTAATGATGTCATT TGGTATGTATGTAAATGCCCCA	(TGG)5	56	244–247	2	0.1244	Unknown protein ACR34461.1
27B	CB031838.1	CATTCCATTCATCTCTCATCCA TACAAATCAAAGTCATCGTCGG	(CGG)5	56	127–183	6	0.6672	Abscisic stress ripening ACZ50749.1
28B	CK857691.1	GAAGCAGCAGCAGAAGAGGT GCTTTCGACTCCATTACTCTGAA	(CGC)5	56	122–129	3	0.6128	Not hit
29B	CB0343051	AGCACAGAAAACAAAGCATGAG AACGGAAATCCTTGAACCAGT	(CAC)5	58	89–98	4	0.6397	Stress responsive protein NP_001149550.1
34B	CK855825.1	AATCCAAATCCAACACCAACTC TAATTCCAGCCACAGTCTCCTT	(GGC)5	58	136–165	7	0.8278	Unnamed protein product NP_001174118.1
35B	CB855825.1	TTTCCATCCTCCTCACTTCATT AGTATCGTCAAAGCCAGGGATA	(AC)7	50	157–178	7	0.7836	LLA-115 ABI4885901
36B	CK856598.1	AGTCCCTCTCCGTCCTATGATT CTTCTTTCCAGTCATGTCCAGC	(GAA)6	52	100–114	6	0.7511	Hypothetical protein XP_002443940.1
37B	CK859137	ATGGCAGCAGTTGAGGTAGAAT TCCATTACTCTGAAACCGTGCT	(TC)6	48	393–402	4	0.63	Not hit
39B	CK857960.1	GCACGAGGATCAATTTAGCATA GGAAGATGATGGGTACGTCATT	(AC)7	48	145–212	6	0.7328	Cleavage dioxygenase Q48K96.1
41B	CB034609	ATGGCAGCAGTTGAGGTAGAAT TGCCTTCTTCGGTCTTAGTCTC	(CCG)6	58	194–200	3	0.6039	Not hit
1C	ORCA40	CAAGCTACTTCAGACTCATC GAAGACACTGCTCATATTTC	F(TG)8CA(TGCG)12, R(TG)10(TGCG)6	46	200–209	4	0.6639	(Yoocha et al., 2006)
5C	ORCT6	CTCCTTGCTTGGATTTGCTTC CACCTCATCACATCTTGCCAT	(TC)5(GT)18	42	250–262	6	0.6533	(Yoocha et al., 2006)
19C	OA20	CATATATTAGCCACTTCACTCTC ATGTCCACCTCCCTAAAATAGTA	Data not shown	42	321–419	4	0.5828	(Yue et al., 2006)
20C	sv04	CTGGTCTCTTCTTTCTGGAT AACACCAACACACATATACAT	(CT)8AC(CT)5	42	284–305	8	0.8439	(Pellegrino et al., 2001)
23C	OA08	AGGCAAAATATAACATACCTCAAT AATCAAGCCATTTATCTCCTCT	Data not shown	42	200–289	3	0.2886	(Yue et al., 2006)
32C	S122	GTGACTCGAGCCTTGGAATACG ACGCCGGTGAAAGAAGAAGAG	F(TC)9(AC)4, RAT(AC)8	42	333–358	6	0.7889	(Yue et al., 2006)
33C	OA19	AAGGCAAACTTGAGTGCTTTATT CTTGTGATTTCTTTGCCTTTCTT	(GA)31	42	260–374	4	0.5672	(Yue et al., 2006)

3.3. Polymorphism of SSR markers

Thirty SSR primer pairs (23 EST-SSRs and 7 genomic SSRs) were used for genetic diversity assessment of 30 *Doritis* accessions, collected in Northeastern part of Thailand. Twenty of thirty primers showed polymorphic bands. A total of 142 SSR alleles were generated, 92 alleles (64.8%) showed polymorphism among *Doritis* accessions. The numbers of polymorphic bands were on average at 4.6 alleles per locus (ranged from 2 to 8). The polymorphic information content (PIC) varied from 0.1244 (2B) to 0.8439 (20C) with an average of 0.6076 (Table 4). The observed number of alleles per locus (A_o) ranged from 2.25 to 4.15 (mean = 3.33) and the effective number of alleles per locus (A_e) ranged from 1.9227 to 3.0805 (mean = 2.49). The percentage of polymorphic loci (PPB) per species was relatively high and ranged from 90% in *D. regnieriana* to 100% in *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* (Table 4).

3.4. Genetic diversity and phylogenetic analysis

The expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.5233 to 0.6194 (mean = 0.558), of which *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* showed the highest level of H_e and *D. regnieriana* showed the lowest. *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* exhibited the greatest level of variability (PPB: 100%, H_e: 0.6194, H_o: 1.1235, respectively), whereas the *D. regnieriana* exhibited the lowest level of variability (PPB: 90%, H_e: 0.5233, H_o: 0.6768, respectively) as shown in Table 4. The AMOVA result revealed 10.59% and

Table 4
Genetic diversity of 3 species of *Doritis*.

Species	No. of SSR locus	No. of PB[a]	PPB[b]	A_o[c]	A_e[d]	H_e[e]	H_o[f]
D. regnieriana	20	18	90%	2.25	1.9227	0.5233	0.35
D. pulcherrima	20	19	95%	3.6	2.4675	0.5317	0.225
D. pulcherrima var. *buyssoniana*	20	20	100%	4.15	3.0805	0.6144	0.3036

[a] (PB), number of polymorphic band.
[b] (PPB), percentage of polymorphic band.
[c] (A_o), observed number of alleles per locus.
[d] (A_e), effective number of alleles per locus.
[e] (H_e), expected heterozygosity.
[f] (H_o), Shannon's information index.

89.408% variation presented among and within species (*D. regnieriana*, *D. pulcherrima* and *D. pulcherrima* var. *buyssoniana*) (Table 5) respectively and fixation indices from AMOVA was 0.106 ($P < 0.001$).

The UPGMA was used to generate a dendrogram, based on Dice's similarity, for genetic relationship of 30 *Doritis* accessions (Fig. 2). The dendrogram revealed 3 major clades, grouped by species of *Doritis* accessions. For example, *D. regnieriana* including S2, S3 and S4 were clustered in the same group, same as *D. pulcherrima* and *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* accessions were also grouped based on their taxonomy.

The genetic distance between species showed the highest level between *D. regnieriana* and *D. pulcherrima* (0.3036) and the lowest level between *D. pulcherrima* and *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* (0.1739) (Table 6). The principle coordinate analysis (PCA) separated 30 accessions into 3 major groups based on their taxonomy, which was consistent with the result of phylogenetic analysis (Fig. 3).

4. Discussion

4.1. EST-SSR development and polymorphism

Studies of expressed sequence tag (EST) have generated a vast amount of publicly available sequence data from many plant species (Li et al., 2011). EST-SSRs are different from traditional SSR (genomic-SSR) marker, which have some intrinsic advantages over genomic SSRs in their direct association with transcribed genes, lower expense of development, and high level of transferability to related species (Mian et al., 2005). In the present study, EST-SSRs were developed from orchid species and used for genetic diversity assessment in *Doritis*. Twenty three primer pairs from a total of 100 primer pairs (23%) were successfully amplified genomic DNA of *Doritis*. This percentage was low when compared with the previous reports in which 952 successfully amplified markers from 994 markers (95.8%) in hops (Koelling et al., 2011); 31 from 35 markers (88.6%) in cucumbers (Hu et al., 2010); 44 from 50 markers (88%) in sesames (Wei et al., 2008); 251 from 290 markers (86.5%) in peanuts (Liang et al., 2009); 10 from 12 markers (83%) in oil palms (Singh et al., 2008); 170 from 239 markers (71.13%) in Japanese chestnuts (Nishio et al., 2011) and 54 from 97 markers (55.7%) in teas (Ma et al., 2012). One explanation for the low percentage of SSR product amplification might be due to the principle attributable to natural sequence variations existing within the primer binding sites of different orchid species, since the majority of EST sequences were obtained from *Dendrobium* and *Phalaenopsis* (only few sequences from *Doritis*). Another reason might be the poor quality sequence of the ESTs from which the SSR primers were designed (Park et al., 2010).

4.2. SSR transferability

Genomic SSRs from other orchid genera were used to study the transferability in *Doritis*. From 35 primer pairs, 7 primer pairs (20%) were able to amplify PCR products in 30 *Doritis* accessions. These percentages of transferability were similar to previous studies in other plant species (Bory et al., 2008; Hu et al., 2011; Li et al., 2011; Tahan et al., 2009; Wunsch, 2009). The transferability of SSR markers depends on the genetic relatedness among examined species which includes the difference in DNA sequence, genome size and evolution rate (Xie et al., 2010). The low percentage of transferability may result from the evolutionary distance between *Dendrobium* and *Serapias* and *Doritis*. The two genera are not closely related to *Doritis* as *Phalaenopsis*. When compared EST-SSR and genomic SSR markers, the level of transferability of EST-SSR markers were higher than that of genomic SSR markers. The result indicated that the conserved nature of coding sequences compared with non-

Table 5
Analysis of molecular variance (AMOVA) of *Doritis* germplasms.

Source of variation	Sum of squares	Variance component	Percentage variation	*P*-value
Among species	35.242	0.68184	10.59%	<0.001
Within species	328.092	5.7559	89.4082	<0.001
Total	363.333	6.4379		

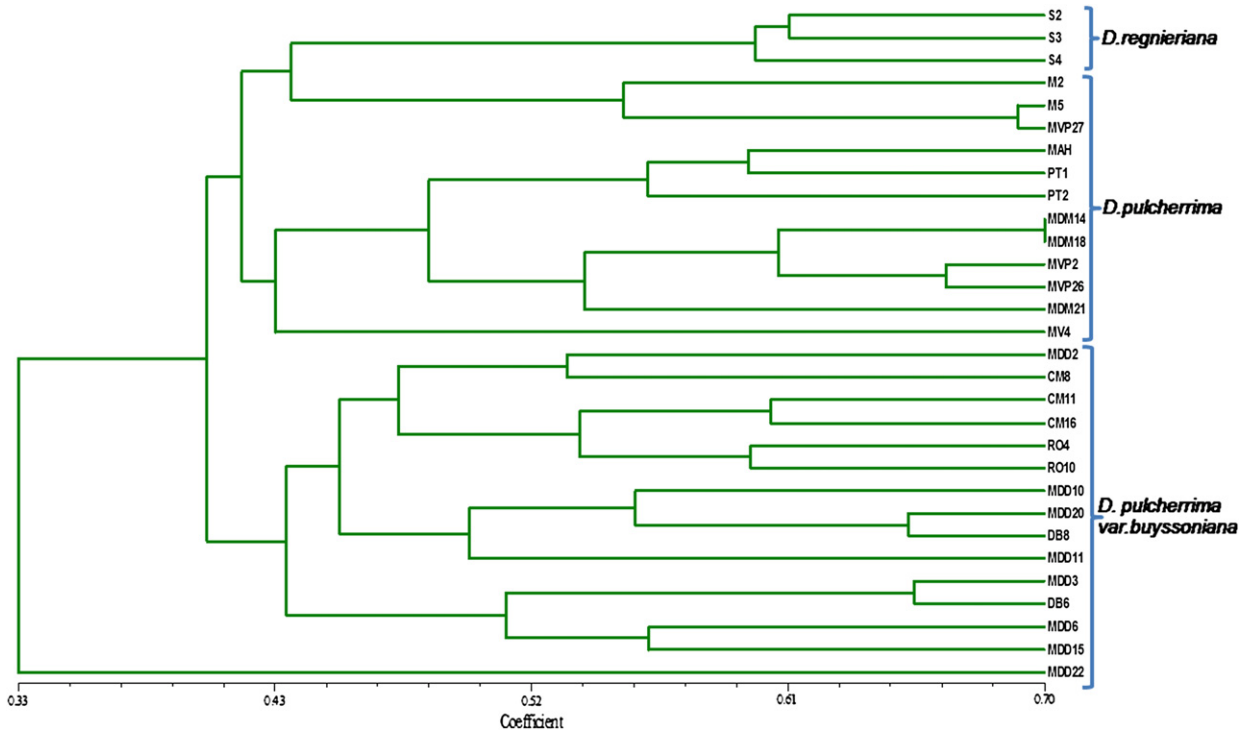


Fig. 2. The genetic relationship between 30 accessions, based on Dice's similarity coefficient.

coding genomic DNA and that the mutation frequency of EST sequences is lower than that of genomic DNA sequence (Wen et al., 2010). In contrast when consider the percentage of genomic SSR and EST-SSR markers producing polymorphic alleles, genomic SSR (100%) were higher than EST-SSR (56.5%) due to the conserved sequence in transcribed regions of genes (Hu et al., 2011; Wen et al., 2010). Our result was consistent with previous studies in other plant species (Eujayl et al., 2004; Gao et al., 2005; Luro et al., 2008).

4.3. Genetic diversity of Doritis

The genetic diversity was measured by the polymorphic information content (PIC) and the polymorphism rate (P). The loci polymorphism can be considered high, medium or low if PIC > 0.5, $0.5 >$ PIC > 0.25 and PIC < 0.25 (Xie et al., 2010). In the present study the result showed a medium PIC value in both EST-SSR (0.6154) and genomic SSR (0.5064). The PIC values average at 0.6076 and indicate the usefulness of DNA markers for gene mapping, molecular breeding and germplasm evaluation (Wei et al., 2008). This result suggested that EST-SSR and genomic SSR markers from this study could contribute substantive information to the genetics and breeding research of *Doritis*.

A UPGMA dendrogram, inferred from the shared allele frequencies among 30 accessions, formed 3 main groups distinguished by species and variety. Three accessions of *D. regnieriana* were grouped together, twelve accessions of *D. pulcherrima* were grouped together and fifteen accessions of *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* were also grouped together. The *D. regnieriana* group was placed closer to *D. pulcherrima* than to *D. pulcherrima* var. *buyssoniana*. This result was in agreement with the chromosome studied and floral architecture and size as both *D. regnieriana* and *D. pulcherrima* are diploid species, $2n = 2x = 38$ with small sized flowers and backward pointing sepals but *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* is a tetraploid species, $2n = 4x = 76$ with larger sized flowers and broad sepals. *D. pulcherrima* and *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* were placed next to each other as they both are the same species (Christenson, 2001). Both species have similar characteristics with the

Table 6
Nei's unbiased genetic distance among 3 species of *Doritis*.

Species	*D. regnieriana*	*D. pulcherrima*	*D. pulcherrima* var. *buyssoniana*
D. regnieriana	0.0000		
D. pulcherrima	0.3036	0.0000	
D. pulcherrima var. *buyssoniana*	0.2623	0.1739	0.0000

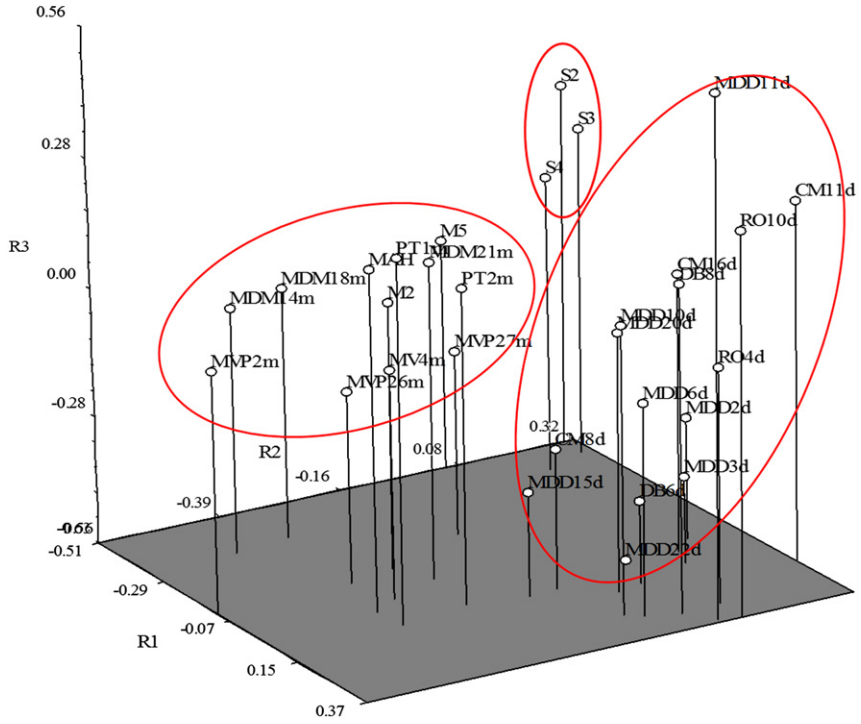


Fig. 3. Principles coordinate analysis for SSR markers using the genetic similarity matrix for 30 *Doritis* accessions.

tetraploid exhibiting larger structure than the diploid variety (Kamemoto and Sakarik, 1975). This result was also consistent with Nei's unbiased genetic distance between population, *D. pulcherrima* and *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* was close to each other (0.1739) while both were more distance with *D. regnieriana*.

In conclusion, the EST-SSR and genomic SSR markers, developed from other orchid genera, were successfully employed to measure genetic diversity and relationships within this *Doritis* collection. Future studies with these SSR markers could be useful for identification, conservation and selection of appropriate parents for the hybrid production.

Acknowledgments

This work is supported by grants from The Thailand Research Fund (TRF), The Commission on Higher Education and Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI) (No. MRG5380008), from Ubon Ratchathani University and from the Faculty of Science, Kasetsart University. The authors would like to thank Assist. Prof. Sriprapi Thammasaeng and Assist. Prof. Dr. Kanchana Rungruchakanon for providing *Doritis* germplasms in this study and Mr. Neal Rasmine for critically reviewing this manuscript.

References

Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Tanksley, S.D., Sorrells, M.E., 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome 36, 181–186.
Bory, S., Dasilva, D., Risterucci, A., Grisoni, M., Besse, P., Duval, M., 2008. Development of microsatellite markers in cultivated vanilla: polymorphism and transferability to other vanilla species. Scientia Horticulturae 115, 420–425.
Christenson, E.A., 2001. Phalaenopsis, a Monograph. Timber Press, Portland, Oregon.
Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12, 13–15.
Eujayl, I., Sledge, M.K., Wang, L., May, G.D., Chekhovskiy, K., Zwonitzer, J.C., Mian, M.A., 2004. *Medicago truncatula* EST-SSRs reveal cross-species genetic markers for *Medicago* spp. Theoretical and Applied Genetics 108, 414–422.
Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotyes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131, 479–491.
Gao, L.Z., Zhang, C.H., Jia, J.Z., 2005. Cross-species transferability of rice microsatellites in its wild relatives and the potential for conservation genetic studies. Genetic Resources and Crop Evolution 52, 931–940.
Hu, J.B., Zhou, X.Y., Li, J.W., 2010. Development of novel EST-SSR markers for cucumber (*Cucumis sativus*) and their transferability to related species. Scientia Horticulturae 125, 534–538.
Hu, J., Wang, L., Li, J., 2011. Comparison of genomic SSR and EST-SSR markers for estimating genetic diversity in cucumber. Biologia Plantarum 55, 577–580.
Kamemoto, H., Sakarik, R., 1975. Beautiful Thai Orchid Species. The orchid society of Thailand, Bangkok.
Koelling, J., Coles, M.C., Matthews, P.D., Schwekendiek, A., 2011. Development of new microsatellite markers (SSRs) for *Humulus lupulus*. Molecular Breeding. http://dx.doi.org/10.1007/s11032-011-9637-z.

Li, G., Ra, W.H., Park, J.W., Kwan, S.W., Lee, J.H., Park, C.B., Park, Y.B., 2011. Developing EST-SSR markers to study molecular diversity in *Liriope* and *Ophiopogon*. Biochemical Systematics and Ecology 39, 241–252.
Liang, X., Chen, X., Hong, Y., Liu, H., Zhou, G., Li, S., Guo, B., 2009. Utility of EST-derived SSR in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) and *Arachis* wild species. BMC Plant Biology 9, 35.
Luro, F.L., Costantino, G., Terol, J., Argout, X., Allario, T., Wincker, P., Talon, M., Ollitrault, P., Morillon, R., 2008. Transferability of the EST-SSRs developed on *Nules clementine* (Citrus clementina Hort ex Tan) to other *Citrus* species and their effectiveness for genetic mapping. BMC Genomics 9, 287.
Ma, J.Q., Ma, C.L., Yao, M.Z., Jin, J.Q., Wang, Z.L., Wang, X.C., Chen, L., 2012. Microsatellite markers from tea plant expressed sequence tags (ESTs) and their applicability for cross-species/genera amplification and genetic mapping. Scientia Horticulturae 124, 167–175.
Mian, M.A., Saha, M.C., Hopskins, A.A., Wang, Z.Y., 2005. Use of tall fescue EST-SSR markers in phylogenetic analysis of cool-season for age grasses. Genome 48, 637–647.
Missio, R.F., Eveline, T.C., Euniae, M.Z., Guilherme, F.P., Ana, P.R., Laercio, Z., Antonio, A.P., Ney, S.S., 2009. Assessment of EST-SSR markers for genetic analysis on coffee. Bragantia 68, 573–581.
Nei, M., Li, W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76, 5269–5273.
Nishio, S., Yamamoto, T., Terakami, S., Sawamura, Y., Takada, N., Nishitani, C., Saito, T., 2011. Novel genomic and EST-derived SSR markers in Japanese chestnuts. Scientia Horticulturae 130, 838–846.
Park, Y.H., Ahn, S.G., Choi, Y.M., Oh, H.J., Ahn, D.C., Kim, J.G., Kang, J.S., Choi, Y.W., Jeong, B.R., 2010. Roes (*Rosa hybrida* L.) EST-derived microsatellite markers and their transferability to strawberry (*Fragaria* spp.). Scientia Horticulturae 125, 733–739.
Pellegrino, G., Cafasso, D., Widmer, A., Soliva, M., Musacchio, A., Cozzolino, S., 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci from the orchid *Serapias vomeracea* (*Orchidaceae*) and cross-priming to other *Serapias* species. Molecular Ecology Note 1, 279–280.
Rohlf, F.J., 2000. NTYSYS pc2.1: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter software, NewYork.
Singh, R., Zakil, N.M., Ting, N.C., Rosli, R., Tan, S.G., Low, E.L., Ithnin, M., Cheah, S.C., 2008. Exploiting an oil palm EST database for the development of gene-derived SSR markers and their exploitation for assessment of genetic diversity. Biologia 63, 227–235.
Tahan, O., Geng, Y., Zeng, L., Dong, S., Chen, F., Chen, J., Song, Z., Zhong, Y., 2009. Assessment of genetic diversity and population structure of Chinese wild almond, *Amygdalus nana*, using EST- and genomic SSRs. Biochemical Systematics and Ecology 37, 146–153.
Wei, L.B., Zhang, H.Y., Zheng, Y.Z., Guo, W.Z., Zhang, T.Z., 2008. Developing EST-derived microsatellites in sesame (*Sesamun indicum* L.). Acta Agronomica Sinica 34, 2077–2084.
Wen, M., Wang, H., Xai, Z., Zou, M., Lu, C., Wang, W., 2010. Development of EST-SSR and genomic-SSR markers to assess genetic diversity in *Jatropha Curcas* L. BMC Research Notes 3, 42.
Wunsch, A., 2009. Cross-transferable polymorphic SSR loci in *Prunus* species. Scientia Horticulturae 120, 348–352.
Xie, W.G., Zhang, X.Q., Cai, H.W., Liu, W., Peng, Y., 2010. Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). Biochemical Systematics and Ecology 38, 740–749.
Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.J.B., 1999. POPGENE Version 1.32. Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis. Computer program and documentation distributed by the University of Alberta and Centre of International Forestry Research, Alberta, Canada.
Yoocha, T., Chunwongse, C., Chunwongse, J., 2006. Study of genetic relationship among commercial *Dendrobiums* using microsatellite markers. Agricultural Science Journal 37, 163–174.
Yue, G.H., Lam-Chen, L.T., Hong, Y., 2006. Development of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in identification of *Dendrobium* varieties. Molecular Ecology Note 6, 832–834.

IASS

THE 3RD INTERNATIONAL AGRICULTURE STUDENTS SYMPOSIUM

19 - 28 FEBRUARY 2012

Agriculture: Sharing and Collaborating For The Future

Organized By:

UPM

In Collaboration With:

Principal Sponsor:

GENTING PLANTATIONS

DEVELOPMENT OF EST-SSR AND TRANSFERABILITY OF GENOMIC SSR MARKERS OF ORCHID SPECIES FOR GENETIC DIVERSITY ASSESSMENT OF DORITIS SPECIES IN THAILAND

Savitree Ritchuay[1], Chatchawan Jantasuriyarat[2] and Sureeporn Kate-ngam[3]
[1,2] Department of Genetics, Faculty of Science, Bangkhen Campus Kasetsart Universit, Bangkok and
[3] Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani
[1] g521440208@ku.ac.th, [2] fscicwj@ku.ac.th, [3]katengas@agri.ubu.ac.th

Doritis is one of the orchid family in the northern part of Thailand with extremely high genetic diversity. Unfortunately it has not been studied in detail for its potential development into high value ornamental export. In this study we developed SSR markers from the EST database of other orchid species for the use in breeding program of Doritis species and transferability from the other species into Doritis. Thirty EST-SSRs primers and seven genomic SSRs primers (from Dendrobium and Serapias) generated 142 alleles, among them 92 alleles (64.8%) which show polymorphism between 30 Doritis accessions, with the number of polymorphic band ranging from 2-8 bands. The phylogenetic tree based on UPGMA showed three major clades of Doritis (D. regnieriana, D. pulcherrima and D. buyssoniana) indicating that these primers are useful for study in genetic diversity and they will be useful for breeding program of Doritis in future.

Keywords: EST, microsatellite markers, Doritis sp.