

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่
โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี และการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ
กล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิดในประเทศไทยโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งไอทีเอส

The Evaluation of Genetic Diversity of *Paphiopedilum exul* Using AFLP Markers
and Preliminary Study on Genetic Relationship
of Some *Paphiopedilum* spp. in Thailand by ITS Sequence Analysis

โดย

นายจักรพันธ์ วนิชกุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม)
พ.ศ. 2549

ISBN 974-16-2256-2

จักรพันธ์ วนิชกุล 2549: การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลือง
กระบี่โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี และการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารี
บางชนิดในประเทศไทยโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งไอทีเอส ปรินญาวิทยาศาสตร์
มหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: อาจารย์ศุภจิตรา จางตระกูล, D.F. 102 หน้า
ISBN 974-16-2256-2

จากการใช้ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลือง
กระบี่ 6 แห่ง ซึ่งกระจายพันธุ์อยู่บริเวณภาคใต้ของประเทศไทย พบว่าทั้ง 6 แห่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism
เฉลี่ยเท่ากับ 80.0% ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมเฉลี่ยเท่ากับ 0.301 โดยแหล่งอำเภอปลายพระยา จังหวัดกระบี่
มีค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism สูงสุด 91.27% และแหล่งเกาะน้อย อำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่ มีความหลากหลาย
ทางพันธุกรรมสูงสุด 0.334 ในขณะที่แหล่งเกาะนัง อำเภอเมือง จังหวัดกระบี่ มีค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism ต่ำสุด
62.70% สอดคล้องกับค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำสุด 0.263 จากการจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์ทาง
พันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แห่ง จากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูล
เบื้องต้นสำหรับการวางแผนอนุรักษ์กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ในอนาคตได้

จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งไอทีเอส (ITS, Internal Transcribed Spacer)
เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิดที่พบกระจายพันธุ์อยู่ในประเทศไทย
ผลการวิเคราะห์พบว่ามีการจัดกลุ่มที่สอดคล้องกับการจัดแบ่งโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งแบ่งเป็น 2
สกุลย่อยคือ Paphiopedilum และ Brachypetalum อย่างไรก็ตามพบว่ารองเท้านารีช่องอ่างทองแสดงความสัมพันธ์
ทางพันธุกรรมเข้ากับสกุลย่อย Paphiopedilum ซึ่งแตกต่างจากการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาที่ถูกจัดอยู่ในสกุลย่อย
Brachypetalum เพื่อหาคำตอบของรองเท้านารีช่องอ่างทองจึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเพิ่มเติม
โดยนำชนิดที่ถูกจัดอยู่ในสกุลย่อย Brachypetalum มาวิเคราะห์ร่วมกัน ผลการวิเคราะห์พบว่ารองเท้านารีช่องอ่างทอง
แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับรองเท้านารีขาวสตูล และรองเท้านารีเหลืองตรงตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อ
พิจารณาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของรองเท้านารีตุงกาญจน์ ซึ่งเป็นกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดใหม่และยังไม่ได้
รับการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์พบว่าแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกับรองเท้านารีอินทนนท์
รองเท้านารีอินทนนท์ลาว และรองเท้านารีคอยดูตามลำดับ การศึกษาในครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่ารองเท้านารี
เหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองอุดร และรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกันมาก
สอดคล้องกับการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาที่กำหนดให้ใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ร่วมกันว่า *Paphiopedilum concolor*

Jakkapun Wanichkul 2006: The Evaluation of Genetic Diversity of *Paphiopedilum exul* Using AFLP Markers and Preliminary Study on Genetic Relationship of Some *Paphiopedilum* spp. in Thailand by ITS Sequence Analysis. Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program.
Thesis Advisor: Mrs.Suchitra changtrachoon, D.F. 102 pages.
ISBN 974-16-2256-2

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers were used to evaluate genetic diversity in six populations of *Paphiopedilum exul*. The result showed that, average percentage of polymorphic loci and expected heterozygosity were 80.0% and 0.301 respectively. Population from the Plaiypraya Krabi province had the highest percentage of polymorphic loci 91.27% and population from the Kaonoi Aowleuk Krabi province had the highest expected heterozygosity 0.334. Whereas the lowest genetic variation was found in population from the Koanak Krabi province with 62.70% polymorphic loci and expected heterozygosity of 0.263. The study also revealed genetic relationship of the six populations. These preliminary results can help planning a conservation program of *Paphiopedilum exul* in the future.

Internal Transcribed Spacer (ITS) sequence analysis was used to study genetic relationship of some *Paphiopedilum* spp. distributing in Thailand. Neighbor-joining tree revealed two clusters of which one corresponded to morphological characteristic of subgenera, *Paphiopedilum* and *Brachypetalum*. However, *Paphiopedilum* x Ang Thong, a member of the subgenus *Brachypetalum* showed close genetic relationship with subgenus *Paphiopedilum*. To better understand the position of *Paph.* x Ang Thong, only species from the subgenus *Brachypetalum* were used for reconstructing the tree. The result showed that *Paph.* x Ang Thong was the closest relative of *Paph. niveum* and *Paph. godefroyae* respectively. Furthermore, an unknown specie called “TungKarn”, was placed close to *Paph. villosum*, *Paph. gratixianum* and *Paph. charlesworthii* respectively, all belonging to the subgenus *Paphiopedilum*. Moreover, three different Thai common names such as “Leung Prachin”, “Leung Karn” and “Leung Udom” resulted in confirming on the same specie of *Paph.concolor*.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.สุจิตรา จางตระกูล ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือ พร้อมทั้งให้การสนับสนุนงานวิจัยวิทยานิพนธ์ด้วยดีตลอดมา ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก และศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำสั่งสอน และตรวจแก้วิทยานิพนธ์จนถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบคุณกลุ่มงานวิจัยอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่าและเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพรรณพืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ในการให้ความช่วยเหลือ ด้านห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆในการศึกษาค้นคว้า และอาจารย์กนกวรรณ ถนอมจิตร อาจารย์ผู้ปูพื้นฐานความรู้ทางด้านกล้วยไม้ และให้ความช่วยเหลือแนะนำสถานที่ในการรวบรวม ตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารี ขอขอบคุณคุณ ไกรฤทธิ์ เวศวรุต นายกษมาคมกล้วยไม้รองเท้านารี แห่งประเทศไทย คุณสมเดช โอภาณุรักษธรรม หัวหน้าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้รองเท้านารี ในพระบรมราชดำริ อาจารย์ธีระพันธ์ โตธีระกุล และคุณอลงกรณ์ ยะมุงคุณ แห่งโครงการพัฒนา ดอยตุง สำหรับคำแนะนำและข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับกล้วยไม้รองเท้านารีที่มีคุณค่าอย่างยิ่งในการ จัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอขอบคุณ คุณชูศักดิ์ ชูสิทธิ์ คุณศักดิ์ชัย ชัยพงษ์พัฒนา คุณธนา พานิช คุณวัชรินทร์ วิชาสวรรค์ โยธิน ในความช่วยเหลือด้านการเก็บรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารี ขอขอบคุณคุณกมล ฉวีวรรณ คุณทวี กันหาวัน คุณจิรวรรณ แสงสว่าง คุณจันทร์เพ็ญ บุญทอง คุณชมพูนุท พรเจริญพร รวมทั้งทีมงานจาก www.tonmaiclub.com ทุกคน และท่านอื่นๆที่ไม่อาจ กล่าวลงในที่นี้ได้หมดสำหรับความช่วยเหลือต่างๆ ที่ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้

คุณงามความดีที่ได้จากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ข้าพเจ้าขอมอบให้กับผู้มีพระคุณทุกท่าน คุณแม่ คุณพ่อ พี่ และทุกคนในครอบครัว บรรพบุรุษผู้ล่วงลับ ครูบาอาจารย์ตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน มิตรสหาย ทุกๆท่าน ตลอดจนสรรพชีวิตเพื่อนร่วมโลกทั้งมวล

จักรพันธ์ วนิชกุล

มีนาคม 2549

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล <i>Paphiopedilum</i>	4
การจัดจำแนกชนิดกล้วยไม้รองเท้านารีในสกุล <i>Paphiopedilum</i>	7
การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต	16
การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม	17
เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism)	22
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequencing analysis)	27
อุปกรณ์และวิธีการ	32
การเก็บรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารี	32
การสกัดดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารี	34
การวิเคราะห์ดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี	37
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆในประเทศไทย	42
สถานที่และระยะเวลาทำงานวิจัย	48
ผลและวิจารณ์	49
ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่	
โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี	49
ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธีเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์	64
สรุป	79
ข้อเสนอแนะ	81
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	85
ภาคผนวก	91

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ <i>Paphiopedilum exul</i> (Ridl.) Rolfe แหล่งต่างๆ	32
2	ตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีจำนวน 15 ชนิด ที่มีการกระจายพันธุ์อยู่ใน ประเทศไทย ที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม	33
3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter และ primer ในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วย เอเอฟแอลพี	41
4	คู่ไพรเมอร์จำนวน 13 คู่ ที่คัดเลือกได้จากจำนวนคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่	51
5	แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphic loci ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ทั้ง 6 แหล่ง	61
6	แสดงค่า gene diversity ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง	61
7	แสดงค่า genetic distances และ identities (NEI'S (1972/1978) DISTANCE) ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง	62
8	แสดงค่า genetic distances ของการจัดกลุ่มกล้วยไม้รองเท้านารีแหล่งต่างๆ เรียงตามระดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ที่ได้จากการคำนวณวิธี UPGMA โดยใช้โปรแกรม TFGPA	63
9	เปรียบเทียบขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ (bp) ของอินตรอนเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอส (ITS, Internal Transcribed Spacer) ในกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆ จำนวน 15 ชนิด ที่ใช้ในการการศึกษา	71

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนที่แสดงตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ แหล่งต่างๆ	33
2	แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ที่สกัดได้	50
3	ตัวอย่างการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม 4 คู่ จากทั้งหมด 64 คู่	52
4	แสดงภาพลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ที่ได้ จากการทำอิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้เครื่อง Gel-Scan 3000 ในภาพเป็น ตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพีจากการใช้คู่ไพรเมอร์ที่ E-AGC / M-CTC จากแหล่ง อ.ปะเหลียน จ.ตรัง	53
5	แสดงภาพลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ที่ได้ จากการทำอิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้เครื่อง Gel-Scan 3000 ในภาพเป็น ตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพีจากการใช้คู่ไพรเมอร์ที่ E-ACC / M-CAC จากแหล่ง อ.ปลายพระยา จ.กระบี่	54
6	แสดงภาพลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ที่ได้ จากการทำอิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้เครื่อง Gel-Scan 3000 ในภาพเป็น ตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพีจากการใช้คู่ไพรเมอร์ที่ E-AGC / M-CAA จากแหล่งเกาะนัง อ.เมือง จ.กระบี่	55
7	แสดงภาพลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ที่ได้ จากการทำอิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้เครื่อง Gel-Scan 3000 ในภาพเป็น ตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพีจากการใช้คู่ไพรเมอร์ที่ E-AAC / M-CTC จากแหล่งเกาะน้อย อ.อ่าวลึก จ.กระบี่	56
8	แสดงภาพลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ที่ได้ จากการทำอิเล็กโทรโฟริซิส โดยใช้เครื่อง Gel-Scan 3000 ในภาพเป็น ตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพีจากการใช้คู่ไพรเมอร์ที่ E-AGC / M-CAG จากแหล่งบ้านคลองเตย อ.ทับปุด จ.พังงา	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9	แสดงภาพลายพิมพ์เอเอฟแอลพีของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้เครื่อง Gel-Scan 3000 ในภาพเป็นตัวอย่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพีจากการใช้คู่ไพรเมอร์ที่ E-AGC / M-CAG จากแหล่ง อ.เขาพนม จ.กระบี่	58
10	แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง	63
11	แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิดที่สกัดได้	64
12	แสดงการตรวจวิเคราะห์ชนิดเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้น	65
13	แสดงการตรวจวิเคราะห์ชนิดเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอส ที่ได้จากการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้น เปรียบเทียบกับการเพิ่มปริมาณชนิดเอ็นเอบริเวณตำแหน่งไอทีเอสโดยตรงจากจีโนมมิกดีเอ็นเอ	66
14	แสดงการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างชนิดเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอส ของกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆ	67
15	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม จากความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งไอทีเอส ของกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆ จำนวน 15 ชนิด	73
16	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม จากความสัมพันธ์ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงตำแหน่งไอทีเอส ของกล้วยไม้รองเท้านารีในหมู่ <i>Brachypetalum</i> ซึ่งประกอบด้วย <i>Paphiopedilum bellatulum</i> , <i>Paph. concolor</i> , <i>Paph. godefroyae</i> , <i>Paph. niveum</i> และ <i>Paph. x Ang Thong</i>	78

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
1	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีเหลืองปราจีน (<i>Paph. concolor</i> P)	97
2	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีเหลืองอุดร (<i>Paph. concolor</i> A)	97
3	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีเหลืองกาญจน์ (<i>Paph. concolor</i> K)	98
4	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีเหลืองตรัง (<i>Paph. godefroyae</i>)	98
5	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีขาวสตูล (<i>Paph. niveum</i>)	98
6	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีช่องอ่างทอง (<i>Paph. x Ang Thong</i>)	99
7	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีฟาหอย (<i>Paph. bellatulum</i>)	99
8	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีคางกบแดง (<i>Paph. appletonianum</i>)	99
9	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีคางกบ (<i>Paph. callosum</i>)	100
10	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีสุขะกุล (<i>Paph. sukhakulii</i>)	100
11	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีเมืองกาญจน์ (<i>Paph. parishii</i>)	100
12	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีอินทนนท์ (<i>Paph. villosum</i>)	101
13	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีอินทนนท์ลาว (<i>Paph. gratixianum</i>)	101
14	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีคอยตุง (<i>Paph. charlesworthii</i>)	101
15	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีตุงกาญจน์ (<i>Paph. sp.</i>)	102
16	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีเหลืองกระบี่ (<i>Paph. exul</i>)	102
17	ภาพดอกกล้วยไม้ร่องเท้านารีเหลืองเลย (<i>Paph. hirsutissimum</i>)	102