



วิทยานิพนธ์

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย

DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE MARKERS FOR
DENDROBIUM ORCHIDS

นางสาวฐนิตา บุญสร้างสม

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

พันธุศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย

Development of Microsatellite Markers for *Dendrobium* Orchids

นามผู้วิจัย นางสาวฐนิตา บุญสร้างสม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล, Dr.Agr.)

กรรมการ

(ศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, วท.ม.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ปทุมทริกา หะรินสุต, Dr.Agr.Sci.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจฉกหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลท์สำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย

Development of Microsatellite Markers for *Dendrobium* Orchids

โดย

นางสาวฐนิตา บุญสร้างสม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2550

ฐนิตา บุญสร้างสม 2550: การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล,
Dr.Agr. 89 หน้า

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับกล้วยไม้สกุลหวายใช้วิธี SSR enrichment โดยสร้างห้องสมุดจีโนม (genomic libraries) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ *MseI* หรือ *TaqI* และคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซทเทลไลท์ด้วย โอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบที่ติดฉลากด้วยไบโอติน สำหรับกลุ่มที่ตัดด้วย *MseI* ใช้โพรบจำนวน 6 ชนิด คือ (CA)₁₅, (GA)₁₅, (ACC)₁₀, (CCT)₁₀, (GAT)₁₀ และ (ATCT)₇ ส่วนกลุ่มที่ตัดด้วย *TaqI* ใช้โพรบ 4 ชนิด คือ (CA)₁₅, (GA)₁₅, (ACC)₁₀ และ (CCT)₁₀ และตรวจสอบซ้ำด้วยวิธี dot blot hybridization จากการศึกษพบว่าได้โคลนที่ให้ผลบวกคิดเป็น 26% และ 90% เมื่อนำมาหาลำดับเบสพบโคลนที่มีลำดับเบสซ้ำ 62.8% และ 88.8% ในกลุ่มแรกและกลุ่มสองตามลำดับ ซึ่งจำแนกได้เป็น GA/TC มากที่สุดถึง 50% รองลงมาคือ CCT/AGG 22.8% ลำดับเบสซ้ำแบบผสม (compound repeat) 15 แบบรวม 20.4% CA/TG และ GAT/ATC น้อยที่สุดพบเพียง 0.6% นอกจากนี้ยังพบลำดับเบสซ้ำชนิดอื่นคือ (GGGTTTA)_n/(TAAACCC)_n 5.6% จากการออกแบบไพรเมอร์ 73 คู่ พบว่าไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดตามที่คาดหมาย ทำให้สามารถตรวจพบโพลิมอร์ฟิซึมในประชากร โดยมีจำนวนแอลลีลอยู่ระหว่าง 4-7 แอลลีล มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.25 แอลลีลต่อตำแหน่ง มีค่า observed heterozygosity (H_o) อยู่ระหว่าง 0.0612-1.0000 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.7398 ส่วนค่า expected heterozygosity (H_e) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0788-0.7323 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.5871 สำหรับค่า effective number of allele (n_e) นั้นพบว่าอยู่ระหว่าง 1.0855-3.7355 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.7850 เมื่อนำผลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์ที่พัฒนาขึ้นจากโปรแกรม NTSYS-pc version 2.1m พบว่าสามารถแยกพันธุ์ของกล้วยไม้ได้ แต่ไม่สามารถจัดกลุ่มได้อย่างชัดเจน

Thanita Boonsrangsom 2007: Development of Microsatellite Markers for *Dendrobium* Orchids. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Associate Professor Surin Peyachoknagul, Dr.Agr. 89 pages.

Microsatellite markers for *Dendrobium* orchids were developed using SSR enrichment procedure. Two genomic libraries were constructed from the DNA digested with either *Mse*I or *Taq*I. They were screened for the presence of microsatellite sequences with 6 types of biotinylated oligonucleotide probes ((CA)₁₅, (GA)₁₅, (ACC)₁₀, (CCT)₁₀, (GAT)₁₀ and (ATCT)₇) for DNA digested with *Mse*I and with 4 types of biotinylated oligonucleotide probes ((CA)₁₅, (GA)₁₅, (ACC)₁₀ and (CCT)₁₀) for those digested with *Taq*I. The positive clones were reconfirmed by dot blot hybridization showing 26% and 90% of the respective two groups. The total of 195 positive clones were sequenced, of which 62.8% and 88.8% contained SSR motifs, respectively. Different types of repeat motif were found comprising of GA/TC (50.0%), CCT/AGG (22.8%), 15 types of compound repeat (20.4%), GGGTTTA_n/TAAACCC_n (5.6%), CA/TG (0.6%) and GAT/ATC (0.6%). Seventy-three clones were chosen for primer design. Eight primer pairs could be used to amplify the products giving the expected sizes and detect genetic polymorphism in the population with the allele numbers ranging from 4 to 7 (average 5.25 alleles per locus), observed heterozygosity (H_o) of 0.0612 to 1.0000 (average 0.7398), expected heterozygosity (H_e) of 0.0788 to 0.7323 (average 0.5871) and effective number of allele (n_e) of 1.0855 to 3.7355 (average 2.7850). The genetic relationships of 49 *Dendrobium* hybrids were analyzed using NTSYS-pc version 2.1m program. The results showed that *Dendrobium* samples could be identified but they were not clearly separated into distinct clusters.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีจากความกรุณาของ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล ประธานกรรมการ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ซึ่งแนะ ตลอดจนได้ตรวจสอบข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดช่วงเวลาที่ทำงานวิจัย จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ กรรมการวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร. ปุณทริกา หะริณสูตร กรรมการวิชารอง และรองศาสตราจารย์ ดร. ประศาสตร์ เกี่ยมณี ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจสอบ และตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกท่านที่กรุณาอบรมสั่งสอน ถ่ายทอดวิชาความรู้ และให้กำลังใจเป็นอย่างดีเสมอมา

ขอขอบคุณที่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกคนที่คอยให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่คอยดูแล ส่งเสริม และให้เงินทุนสนับสนุนจนข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษา และคอยเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

จูนิตา บุญสร้างสม

มีนาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
อุปกรณ์	21
วิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	26
สรุปผลการทดลอง	45
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	47
ภาคผนวก	67
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	89

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายที่ใช้ในการศึกษา	21
2	เปรียบเทียบจำนวนโคลนที่ได้ระหว่างการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลท์จากห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด	27
3	เปรียบเทียบความถี่ของลำดับเบสแต่ละชนิดที่พบระหว่างการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลท์จากห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด	29
4	ลำดับเบสชนิดต่าง ๆ ที่พบในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซเทลไลท์	30
5	ชื่อไพรเมอร์ ลำดับเบสของไพรเมอร์ จำนวนเบส ชนิดและลักษณะของลำดับเบสซ้ำ ค่า GC content และค่า T_m	34
6	จำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) และค่า effective number of allele (n_e) ที่ได้จากการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ต่าง ๆ	42
ตารางผนวกที่		
1	ค่า similarity index ที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงของแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย	80

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลำดับเบสของโคลนที่มีลำดับเบสซ้ำมากกว่า 1 ชนิด คือ $(GA)_n$ และ $(GT)_n(GA)_n$	32
2	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR02 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 203-224 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ ลูกศรชี้ คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 5 แอลลีล	36
3	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR06 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 195-208 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ ลูกศรชี้ คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 6 แอลลีล	36
4	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR12 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 152-172 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ ลูกศรชี้ คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 5 แอลลีล	37
5	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR26 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 169-182 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ ลูกศรชี้ คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 4 แอลลีล	37
6	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR30 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 171-183 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ ลูกศรชี้ คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 4 แอลลีล	38
7	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR31 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 219-230 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ ลูกศรชี้ คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 7 แอลลีล	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR49 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 190-200 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ ลูกศรชี้ คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 5 แอลลีล	39
9	ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR67 พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 104-129 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ ลูกศรชี้ คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 6 แอลลีล	39
10	การจัดกลุ่มของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง เพื่อแสดงความ ใกล้ชิดทางพันธุกรรมในรูปแบบของ phylogenetic tree โดยการวิเคราะห์ด้วย โปรแกรม NTSYS-pc version 2.1m	44

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

PCR	=	Polymerase chain reaction
RAPD	=	Random amplified polymorphic DNA
AFLP	=	Amplified fragment length polymorphism
ITS	=	Internal transcribed spacer
SSH	=	Suppression subtractive hybridization
SSR	=	Simple sequence repeats
STR	=	Short tandem repeats
SSLP	=	Simple sequence length polymorphism
VNTR	=	Variable number of tandem repeats
T_a	=	Annealing temperature
T_m	=	Melting temperature
PIC	=	Polymorphic information content
H_o	=	Observed heterozygosity
H_e	=	Expected heterozygosity
n_e	=	Effective number of allele
UPGMA	=	Unweighed pair-group method using arithmetic average

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย

Development of Microsatellite Markers for *Dendrobium* Orchids

คำนำ

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) เป็นกล้วยไม้สกุลที่ใหญ่ที่สุด มีการแพร่กระจายพันธุ์ออกไปในบริเวณกว้างทั้งในทวีปเอเชีย และหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก เมื่อนับรวมกล้วยไม้ที่พบแล้วมีประมาณ 1,000 ชนิด (มาลินี, 2542) กล้วยไม้นับว่าเป็นไม้ตัดดอกที่สำคัญอันดับหนึ่งของประเทศ อุตสาหกรรมกล้วยไม้ของประเทศไทยได้ขยายตัวเป็นอย่างมากในปัจจุบันเมื่อเทียบกับไม้ตัดดอกชนิดอื่น ๆ ทั้งทางด้านพื้นที่ปลูก ปริมาณผลผลิตต่อไร่ และจำนวนผู้ปลูกเลี้ยง มีการปลูกเลี้ยงคิดเป็นพื้นที่ประมาณ 17,500 ไร่ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2546) และทำรายได้ให้แก่ผู้ที่เกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมกล้วยไม้ ทั้งจากการใช้บริโภคภายในประเทศ และการส่งออกดอกกล้วยไม้ประมาณปีละ 2,000 ล้านบาท โดยในปี พ.ศ. 2546 มีการส่งออกดอกกล้วยไม้คิดเป็นมูลค่าประมาณ 1,985.4 ล้านบาท และส่งออกต้นกล้วยไม้คิดเป็นมูลค่าประมาณ 377.04 ล้านบาท (กรมศุลกากร, 2547) ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกกล้วยไม้ตัดดอกเขตร้อนรายใหญ่ที่สุดของโลก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสกุลหวาย (Laws, 1995) กล้วยไม้สกุลนี้จึงได้รับการพัฒนาพันธุ์ขึ้นกว่า 100 พันธุ์ และมีปริมาณการส่งออกไปต่างประเทศประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของกล้วยไม้ส่งออกทั้งหมด

เนื่องจากกล้วยไม้สกุลหวายมีความหลากหลายทั้งในด้านรูปร่าง ขนาดลำต้น และใบ ส่วนทางด้านดอกก็มีความหลากหลายในด้านขนาด รูปร่าง สีกลิ่น จำนวนดอก การจัดเรียงดอกภายในช่อ และกลิ่นหอมของดอก นอกจากนี้ยังสามารถจะนำมาผสมพันธุ์ข้ามชนิด และข้ามสกุลได้อย่างกว้างขวาง จึงเป็นการเพิ่มความหลากหลายในด้านลูกผสมอีกมากมาย (ครรชิต, 2547) ลักษณะของกล้วยไม้สกุลนี้ค่อนข้างที่จะไม่แน่นอน (Lavarack *et al.*, 2000) ทำให้เกิดความสับสนได้ง่ายต่อการนำไปใช้ประโยชน์ การจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถแยกได้ชัดเจน จึงได้มีการนำเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลเข้ามาช่วยในการตรวจสอบให้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

ไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite) หรือ simple sequence repeat (SSR) เป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเรียงตัวซ้ำกันประมาณ 1-6 นิวคลีโอไทด์ และมีการกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม การใช้ไมโคร

แซทเทลไลท์เป็นเครื่องหมายมีข้อดีเนื่องจากเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) สูง มีการกระจายทั่วจีโนม แสดงการข้ามแบบข้ามร่วมกัน (codominance) และการวิเคราะห์สามารถทำได้ง่าย และรวดเร็ว (Weber, 1990) นิยมใช้ตรวจสอบสิ่งมีชีวิตที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก ๆ ข้อด้อยของการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ คือการพัฒนาเครื่องหมายทำได้ยาก เนื่องจากต้องโคลนส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซทเทลไลท์ นำมาหาลำดับเบส และออกแบบไพรเมอร์

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ มีวิธีการที่ยุ่งยาก และเป็นข้อจำกัดในการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในพืชชนิดใหม่ ๆ การใช้เทคนิค SSR enrichment เป็นแนวทางหนึ่งที่จะทำให้การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เป็นไปได้ง่ายขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์สำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย โดยใช้วิธีการหาโคลนที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซทเทลไลท์จาก library แบบ enrich ซึ่งช่วยให้การพัฒนาเครื่องหมายเป็นไปได้เร็วขึ้น และทำการตรวจสอบดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายชนิดต่าง ๆ โดยนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้แล้ว ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย และนำเครื่องหมายดังกล่าวมาใช้ในการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายชนิดต่าง ๆ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การตรวจเอกสาร

ข้อมูลทั่วไปของกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Subclass Monocotyledoneae) อยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Family Orchidaceae) นับเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดวงศ์หนึ่งในพืชมีดอก (Class Angiospermae) ประกอบด้วยกล้วยไม้ประมาณ 25,000 ชนิด (species) หรือ 7-10 เปอร์เซ็นต์ของพืชดอกทั้งหมด (Dressler, 1981) เจริญเติบโตได้ในทุกทวีปยกเว้นทวีปแอนตาร์กติกา รูปแบบการเจริญเติบโตมีหลายแบบ เช่น เจริญเติบโตบนกิ่งไม้ พื้นหิน พื้นดิน และที่ชื้นแฉะ ความแตกต่างของชนิดกล้วยไม้จะพบมากในเขตร้อน และมักเป็นกล้วยไม้อากาศ (epiphyte) ส่วนกล้วยไม้เขตอบอุ่นมักเป็นพวกกล้วยไม้ดิน (terrestrial) มีขนาดต้นตั้งแต่ขนาดเล็กที่สุดที่สั้นกว่า 1 นิ้ว และให้ดอกมีขนาดเท่าหัวเข็มหมุดไปจนถึงใหญ่ที่สุดซึ่งลำต้นสูงตั้งแต่ 5 ฟุตไปจนถึง 10 ฟุต และให้ช่อดอกยาวถึง 15 ฟุต (Shuttleworth *et al.*, 1970)

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.) เป็นกล้วยไม้สกุลที่ใหญ่ที่สุด มีการแพร่กระจายพันธุ์ออกไปในบริเวณกว้างทั้งในทวีปเอเชีย และหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก เมื่อนับรวมกล้วยไม้ที่พบแล้วได้ประมาณ 1,000 ชนิด ฉะนั้นนักพฤกษศาสตร์ได้จำแนกกล้วยไม้สกุลหวายออกเป็นหมู่ประมาณ 20 หมู่ สำหรับที่พบในประเทศไทยคือพบในป่าธรรมชาติมีมากกว่า 130 ชนิด ซึ่งมีรูปร่างลักษณะทั้งดอก ใบ และลำลูกกล้วยแตกต่างกันออกไปอย่างกว้างขวาง (มาลินี, 2542)

กล้วยไม้สกุลหวายมีระบบรากกึ่งอากาศ (semi-epiphyte) และมีการเจริญเติบโตประเภทแตกกอ (sympodial) แตกหน่อปีละ 2-3 หน่อและเจริญเติบโตเต็มที่ภายใน 3-6 เดือน เมื่อสุดลำจะออกดอก 1-3 ช่อ จากตาที่ปลาย และตาที่ซอกถัดลงมา ช่อดอกมีอายุ 45-60 วัน บาน $\frac{3}{4}$ ของช่อก็เก็บเกี่ยวได้ แต่ละลำจะผลิตดอกได้ 5-15 ช่อ ขึ้นอยู่กับพันธุ์และความสมบูรณ์ของต้น กล้วยไม้สกุลหวายมีความสวยงาม ราคาถูกเมื่อเทียบกับกล้วยไม้สกุลอื่น ๆ ทนต่อสภาพแวดล้อม ให้ผลผลิตเร็ว และจำนวนมาก กล้วยไม้สกุลหวายที่ได้รับความนิยมประกอบด้วย

ดอกสีขาว เช่น พันธุ์ขาว 4 เอ็น พันธุ์ขาว 5 เอ็น พันธุ์ขาวประวิทย์ พันธุ์ขาวสนาน พันธุ์แจกเกอลีนโทมัส พันธุ์อลเดอร์ไอมาย

ดอกสีชมพูเข้มปนขาว เช่น พันธุ์บอม 17 พันธุ์บอม 17 กลาย พันธุ์บอมโจ พันธุ์บอมโจเอีย
สกุล พันธุ์มัสทีน

ดอกสีชมพูอ่อนปนขาว เช่น พันธุ์ชาคุระ พันธุ์แอนนา

ดอกสีชมพู เช่น พันธุ์อินทวงศ์ พันธุ์ชีชาร์ พันธุ์แพนด้า

ดอกสีเหลือง เช่น พันธุ์ฟาดิมา พันธุ์เกษมโกลด์ พันธุ์ Mary Mak พันธุ์ Mary Trowse พันธุ์
Tongchai Gold

ดอกสีม่วง เช่น พันธุ์ซาบิน

ดอกสีขีวอ่อน เช่น พันธุ์บุรณะเจด

ดอกสีม่วงอมฟ้า เช่น พันธุ์ Kultana Blue พันธุ์ Halawa Beauty พันธุ์ Izumi
(สถาบันพัฒนาวิสาหกิจขนาดกลางและขนาดย่อม, 2548)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลหวาย

ราก เป็นรากกึ่งอากาศ (semi-epiphyte) ที่เกาะอยู่ตามต้นไม้ บางส่วนจะขนานไปกับตาม
เปลือกไม้ บางส่วนเกาะยึดแนบสนิทกับต้นไม้ (ไพบูลย์, 2521) ผิวนอกของรากมีสารคล้าย
ฟองน้ำห่อหุ้มอยู่ซึ่งเรียกว่า velamen ทำหน้าที่อุ้มน้ำจากน้ำฝนหรือน้ำค้างเก็บไว้เพื่อป้องกันการ
ขาดน้ำ ป้องกันเนื้อเยื่อภายในได้รับบาดเจ็บและช่วยยึดเกาะติดกับต้นไม้ นอกจากนี้รากกล้วยไม้มี
คลอโรฟิลล์จึงสามารถสังเคราะห์แสงได้ (ครรรชิต, 2547)

ลำต้น มีลักษณะการเจริญเติบโตและรูปทรงแบบซิมโพเดียล (sympodial) คือมีการเจริญไป
ตามแนวนอนด้วยเหง้า (rhizome) มีส่วนก้านใบที่อวบอ้วนทำหน้าที่เก็บน้ำเก็บอาหารเพื่อการ
เจริญเติบโตของลำใหม่ เรียกว่าลำลูกกล้วย (pseudo-bulb) บนลำลูกกล้วยจะมีข้อ ปล้อง และตา
(ระพี, 2530) เมื่อลำต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะแตกหน่อเป็นลำต้นใหม่และเป็นกอ (บรรณ, 2534)

ใบ มีการเรียงตัวของเส้นใบเป็นแบบขนาน ใบเรียงสลับกันตลอดลำต้น เมื่อต้นเจริญเติบโต
เต็มที่ บางชนิดมีใบแน่นทึบปลายยอด ขณะที่บางชนิดมีใบตลอดทั้งลำต้น (สวนพฤกษศาสตร์
สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์, 2543) การเรียงตัวของใบ (phyllotaxy) เป็นแบบสลับ ลักษณะการเรียงตัว
ในขณะที่ยังมีสภาพเป็นตา (vernation) เรียงซ้อนทับกัน (duplicate) หรือทับเวียนกัน (convolute)
(เต็ม, 2510) ส่วนกาบใบจะโอบรอบลำลูกกล้วยตรงส่วนปล้องซึ่งอยู่เหนือจากข้อที่โคนกาบใบนั้น

ติดอยู่ ส่วนที่ถูกแสงสว่างจะมีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ ซึ่งสามารถสังเคราะห์แสงได้เช่นเดียวกันกับใบ (ระพี, 2530)

ช่อดอก เป็นแบบ racemose ชนิด raceme คือ ดอกที่โคนช่อดอกจะบานก่อน และบานเรียงไล่ไปที่ดอกอ่อนกว่าตามลำดับขึ้นไปยังปลายยอดของช่อที่มีดอกอ่อนที่สุด ช่อดอกหนึ่ง ๆ มีหลายดอก ลักษณะช่อดอกตรง ส่วนที่อยู่ใต้ดอกล่างสุดลงมาถึงโคนช่อดอก เรียกว่า ก้านช่อดอก (peduncle) ส่วนที่เหนือขึ้นไปของดอกล่างสุดถึงสุดยอดของช่อดอก เรียกว่า แกนกลางของช่อดอก (rachis) ดอกแต่ละดอกมีก้านดอก เรียกว่า ก้านดอกย่อย (pedicel) บริเวณโคนก้านดอกจะพบกาบรองดอก (bract) อยู่เสมอ ซึ่งมีลักษณะต่าง ๆ กันไป และอาจหลุดไปเมื่อดอกบาน หรือติดอยู่จนติดฝัก ขึ้นอยู่กับชนิดของกล้วยไม้ ช่อดอกมีกำเนิดมาจากตาบริเวณข้อที่ปลายลำลูกกล้วย หรือตามข้อบริเวณลำลูกกล้วย (เต็ม, 2510)

ดอก ดอกของกล้วยไม้เป็นดอกสมบูรณ์เพศ (complete flower) มีวงเกสรเพศผู้ เพศเมีย กลีบดอก และกลีบเลี้ยงอยู่ในดอกเดียวกัน ดอกของกล้วยไม้ประกอบด้วยกลีบเลี้ยง (sepal) เป็นกลีบที่อยู่ชั้นนอกสุดหรือด้านหลังสุด ทำหน้าที่ห่อหุ้มส่วนประกอบอื่น ๆ ของดอกไว้ขณะที่ดอกตูม มีจำนวน 3 กลีบ กลีบดอก (petal) อยู่ถัดจากกลีบเลี้ยงมี 3 กลีบ กลีบหนึ่งเปลี่ยนรูปร่างและมีสีสันแตกต่างออกไปเรียกว่า กลีบปาก (lip) เส้าเกสร (column) เป็นส่วนที่อยู่ตรงกลางดอก เกิดจากการรวมกันของก้านชูเกสรเพศผู้และก้านชูเกสรเพศเมีย เกสรเพศผู้และแองเกสรเพศเมียจะมีเยื่อ rostellum กัน ไม่ให้เกิดการถ่ายเรณูในดอกเดียวกัน (สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์, 2543) กลีบชั้นนอกบนและคู่ล่างขนาดยาวพอ ๆ กัน โดยกลีบชั้นนอกบนจะอยู่อย่างอิสระเดี่ยว ๆ ส่วนกลีบชั้นนอกคู่ล่างของดอกประสานเชื่อมติดกับฐานหรือสันหลังของเส้าเกสร และส่วนโคนของกลีบชั้นนอกคู่ล่างและส่วนฐานของเส้าเกสรซึ่งประกอบกันนี้จะปูดออกมา มีลักษณะคล้ายเคียวที่เรียกว่า เคียวดอก สำหรับกลีบชั้นในทั้งสองกลีบมีลักษณะต่าง ๆ กัน แล้วแต่ชนิดพันธุ์ของกล้วยไม้นั้น ๆ (บรรณ, 2534) เกสรเพศผู้ (stamen) รวมตัวกันเป็นก้อนเรณูที่มีลักษณะคล้ายขี้ผึ้ง และฝากรอบก้อนเรณูที่อยู่ด้านบนสุดของเส้าเกสรทำหน้าที่บังหรือห่อหุ้มก้อนเรณู เกสรเพศเมีย (pistil) ประกอบด้วยส่วนของยอดเกสรเพศเมียและรังไข่ที่อยู่ในตำแหน่งต่ำกว่าวงกลีบดอก หรืออยู่ด้านหลัง (สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์, 2543)

การจำแนกกล้วยไม้

การจำแนกประเภทของกล้วยไม้ออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ตามลักษณะภายนอก เพื่อสะดวกในการปลูกเลี้ยง การขยายพันธุ์ ตลอดจนการศึกษาค้นคว้า ซึ่งการจำแนกกล้วยไม้สามารถจำแนกได้ดังนี้

1. การจำแนกตามหลักพฤกษศาสตร์

การจำแนกกล้วยไม้ได้มีการพัฒนามาตลอดระยะเวลา 150 ปี โดยเริ่มจาก Carolus Linnaeus ในปี 1753 ในปี 1830-1840 ได้มีการจำแนกโดย John Lindley ต่อมาก็มีนักจำแนกพันธุ์พืชอีกหลายท่าน ได้แก่ Pfitzer ในปี 1887, Schlechter ในปี 1926, Mansfeld ในปี 1937, Dressler และ Dodson ในปี 1960, Garay ในปี 1960 และ 1972 และ Dressler ในปี 1981 ซึ่งมีการปรับปรุงอีกหลายครั้งจนกระทั่งในปี 1993 โดยได้จำแนกกล้วยไม้สกุลหายตามหัวข้อหลัก ๆ ดังนี้

อาณาจักร (Kingdom)	Plantae
จำพวก (Division)	Magnoliophyta
ชั้น (Class)	Liliopsida
อันดับ (Order)	Asparagales
วงศ์ (Family)	Orchidaceae
วงศ์ย่อย (Subfamily)	Epidendroideae
เผ่า (Tribe)	Dendrobieae
เผ่าย่อย (Subtribe)	Dendrobiinae
สกุล (Genus)	<i>Dendrobium</i>

การจัดแบ่งตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ได้อาศัยหลักการจัดแบ่งตามอนุกรมวิธาน (taxonomy) ซึ่งเป็นหลักการที่ใช้ในการจัดหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ บนโลกนี้ กล้วยไม้จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Orchidaceae และได้มีการแบ่งออกเป็น 6 subfamily ด้วยกัน (Pridgeon *et al.*, 1999, 2001, 2003, 2006) ได้แก่ 1.) subfamily Apostasioideae 2.) subfamily Cypripedioideae 3.) subfamily Epidendroideae 4.) subfamily Higher Epidendroideae 5.) subfamily Orchidoideae 6.) subfamily Vanilloideae

2. การจำแนกตามระบบราก (สำอังก์, 2548)

2.1 กล้วยไม้ที่มีระบบรากแบบรากดิน (terrestrial) เกิดจากหัวที่อวบน้ำซึ่งอยู่ใต้ดิน ตัวรากจะมีน้ำมาก กล้วยไม้ประเภทนี้มักจะพบอยู่ตามธรรมชาติในพื้นที่ที่มีสภาพของฤดูกาลมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน เช่น ในเขตที่มีฤดูฝนซึ่งมีฝนตกชุกและมีฤดูแล้งซึ่งแห้งสลับกัน เมื่อถึงฤดูฝนหัวก็จะแตกหน่อและใบอ่อนชูพ่นขึ้นมาจากผิวดิน ส่วนหัวนั้นก็จะเจริญเป็นหัวใหม่เพิ่มขึ้นมาอีก และอาจจะออกดอกในตอนปลายฤดู เมื่อพ้นฤดูฝนไปแล้วก็จะทรุดโทรมและแห้งไป คงเหลือแต่หัวซึ่งอวบน้ำและมีอาหารสะสมอยู่ฝังอยู่ในดิน มีการพักตัวและสามารถทนความแห้งแล้งหรือแม้แต่การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่ค่อนข้างรุนแรง เช่น ร้อนจัด เย็นจัด ได้เป็นอย่างดีจนกระทั่งถึงฤดูที่มีน้ำ มีแสงสว่าง และอุณหภูมิเหมาะสมก็จะเจริญเป็นหน่อและใบอ่อนอีกครั้งหนึ่ง กล้วยไม้ที่มีระบบรากแบบรากดินที่พบในประเทศไทยมีหลายสกุล เช่น เพคไทลิส (*Pecteilis*) และแบรคคิโอไรทิส (*Brachycorythis*) เป็นต้น

2.2 กล้วยไม้ที่มีระบบรากแบบรากกึ่งดิน (semi-terrestrial) ไม่มีหัวอวบน้ำเหมือนประเภทที่มีระบบรากแบบรากดิน มักพบตามธรรมชาติในสภาพที่ขึ้นอยู่บนพื้นดิน แต่วางไม่มีลักษณะอวบน้ำ รากสามารถเก็บสะสมน้ำได้ดีพอสมควร รากขนอ่อนแทบจะไม่มีเลย บางครั้งจะพบว่าใบอาจจะหลุดร่วงไปในฤดูแล้งจนเหลือแต่ตอ แต่ตาที่อยู่ติดต่อกันก็ยังคงอยู่ เมื่อได้รับความชื้นและสภาพแวดล้อมเหมาะสมก็จะแตกหน่อใหม่ได้อีก หากมีลำลูกกล้วยก็อาจจะอยู่ใต้ผิวดินหรือเหนือผิวดินก็ได้ กล้วยไม้ประเภทนี้มีระบบรากค่อนข้างละเอียด ส่วนใหญ่มักอาศัยอยู่ตามพื้นที่ซึ่งมีหินผุและใบไม้ผุตกทับถมอยู่ที่พื้นดินและจะอาศัยสิ่งเหล่านี้เป็นอาหารด้วย กล้วยไม้ที่มีระบบรากแบบรากกึ่งดิน ได้แก่ กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี สกุลเอื้องพร้าว (*Phaius*) สกุลฮาเบนาเรีย (*Habenaria*) สกุลสเปโรทิลลิส (*Spathoglottis*) และกล้วยไม้บางชนิดในสกุลยูโลเฟีย (*Eulophia*)

2.3 กล้วยไม้ที่มีระบบรากแบบรากกึ่งอากาศ (semi-epiphyte) โดยธรรมชาติจะขึ้นอยู่บนพื้นดิน บนหิน และบนต้นไม้ หากพบขึ้นอยู่บนพื้นดินก็จะอยู่บนพื้นซึ่งมีใบไม้ผุตกทับถมกันค่อนข้างหนา เนื่องจากเป็นสภาพที่โปร่งช่วยให้อากาศถ่ายเทได้สะดวก หรือเป็นพื้นที่สูงที่ไม่ทำให้น้ำขังอยู่นาน กล้วยไม้ที่มีระบบรากแบบนี้มีลักษณะและคุณสมบัติเอนเอียงไปทางรากอากาศมากยิ่งขึ้น กล่าวคือ เซลล์ผิวของรากมีชั้นเซลล์ที่หนาและมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ ผิวนอกเกลี้ยงไม่มีขน มีคุณสมบัติคล้ายฟองน้ำคือเก็บและดูดน้ำได้มาก นอกจากนั้นยังสามารถนำน้ำไปตามเซลล์ผิวได้ตลอดความยาวของราก กล้วยไม้ที่มีรากแบบรากกึ่งอากาศนี้ก็มีรากแขนงใหญ่หยาบอยู่กันอย่าง

แน่นหนา ไม่มีรากขนอ่อน รากมีขนาดเล็กกว่ารากอากาศ และมีแขนงรากเล็กกว่าและหนาแน่นกว่า นอกจากนี้รากส่วนมากยังซ่อนตัวอยู่ในเครื่องปลูก มีส่วนน้อยที่โผล่ออกมารับอากาศและแสงภายนอกภาชนะปลูก และไม่ชอบสภาพเครื่องปลูกที่แน่นทึบหรือเปียกแฉะนานเกินไปอันเป็นเหตุให้รากได้รับอากาศไม่เพียงพอ กล้วยไม้ที่มีรากแบบนี้ ได้แก่ กล้วยไม้สกุลแคทลียา สกุลหวาย สกุลออนซิเดียม และสกุลซิมบิเดียม เป็นต้น

2.4 กล้วยไม้ที่มีระบบรากแบบรากอากาศ (epiphyte) กล้วยไม้ที่มีระบบรากเป็นรากอากาศอย่างแท้จริงนั้นมักพบขึ้นอยู่ตามต้นไม้ รากจะมีขนาดใหญ่และหยาบ ผิวรากหนา รากจะทำหน้าที่ดูดน้ำ เก็บน้ำ และนำน้ำไปตามรากได้เป็นอย่างดี ทำให้สามารถทนต่อความแห้งแล้งได้ดี แม้ว่าจะไม่ถูกน้ำหรือไม่รดน้ำเลยเป็นระยะเวลานาน กล้วยไม้ที่มีระบบรากแบบรากอากาศนี้จะไม่ชอบอยู่ในสภาพที่เปียกแฉะนานเกินไป แต่ชอบสภาพที่โปร่งทำให้รากสามารถแห้งได้รวดเร็วหลังจากเปียกน้ำ บางส่วนของรากมีสีเขียวของคลอโรฟิลล์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ารากอากาศสามารถทำหน้าที่ปรุงอาหารได้เมื่อมีแสงสว่าง เพราะฉะนั้นรากประเภทนี้จึงไม่หลบแสงสว่างเหมือนรากต้นไม้ดินทั่วไป กล้วยไม้ที่มีระบบรากอากาศ ได้แก่ กล้วยไม้สกุลแวนด้า สกุลช้าง สกุลกุหลาบ สกุลแมลงปอ สกุลเข็ม และสกุลเรแนนเซอร์

3. การจำแนกตามลักษณะการเจริญเติบโต (สลิล และนฤมล, 2545)

3.1 การเจริญเติบโตทางปลายยอด (monopodial vegetative) เป็นลักษณะการเจริญเติบโตของส่วนยอดที่ไม่จำกัดคือ มีเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่สามารถเจริญได้อย่างไม่สิ้นสุด และยังสามารถสร้างเนื้อเยื่อเจริญใหม่ที่ด้านข้างได้ ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นก็สามารถเจริญได้อย่างไม่สิ้นสุดเช่นกัน กล้วยไม้ที่มีลักษณะการเจริญเติบโตเช่นนี้ เช่น สกุลฟ้ามุ่ย สกุลเอื้องหวาดพราหมณ์ สกุลช้าง สกุลเข็ม เป็นต้น

3.2 การเจริญเติบโตทางด้านข้างของลำต้น (sympodial vegetative) เป็นลักษณะการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดที่มีอยู่อย่างจำกัด แต่สร้างเนื้อเยื่อเจริญใหม่จากจุดเจริญที่ด้านข้างของลำต้น และจะสร้างยอดใหม่ในช่วงฤดูกาลที่เหมาะสมเท่านั้น ต้นที่สร้างขึ้นมาใหม่อาจเกิดชิดกับลำต้นหรือลำลูกกล้วยเดิม ทำให้มีลักษณะเป็นกอแน่น เช่น กล้วยไม้สกุลกะเหรี่ยง สกุลหวาย เป็นต้น หรืออาจสร้างห่างกันบนเหง้าที่ทอดยาว ทำให้กล้วยไม้มีลักษณะเป็นกอที่คล้ายสายโซ่ (chain-like) เช่น กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตา สกุลเอื้องเทียน เป็นต้น

4. การจำแนกตามลักษณะการอาศัย (สลิล และนฤมล, 2545)

4.1 กล้วยไม้อิงอาศัย (epiphytic orchid) เป็นกล้วยไม้ที่อาศัยบนไม้ยืนต้น โดยมีรากช่วยในการยึดเกาะให้ติดแน่น และยังสามารถหาอาหารมาเลี้ยงลำต้นด้วย กลุ่มไม้กลุ่มนี้มีจำนวนชนิดมากที่สุดที่พบในประเทศไทย เช่น สกุลฟ้ามุ่ย สกุลเอื้องกุหลาบ สกุลสิงโตกลอกตา สกุลหวาย เป็นต้น

4.2 กล้วยไม้ดิน (terrestrial orchid) เป็นกล้วยไม้ที่มีรากหรือส่วนของลำต้นอาศัยที่ผิวหน้าดินหรือใต้ผิวดินที่เรียกว่า “ลำต้นใต้ดิน” หลายชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ทุกฤดูกาล เช่น วานน้ำทอง วานนกธุม มักพบกล้วยไม้เหล่านี้ในป่าดงดิบ หลายชนิดมีการพักตัวในฤดูกาลที่ไม่เหมาะสม โดยเหลือเพียงลำต้นใต้ดินเท่านั้น เช่น สกุลลิ้นมังกร สกุลท้าวอุลุล สกุลวานอึ้ง สกุลบัวสันโดษ เป็นต้น กล้วยไม้กลุ่มนี้มีจำนวนชนิดรองลงมาจากกลุ่มกล้วยไม้อิงอาศัย

4.3 กล้วยไม้อาศัยบนหิน (lithophytic orchid) เป็นกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตและขยายเผ่าพันธุ์ได้โดยอาศัยอยู่บนหินแทนการยึดเกาะบนดินหรือต้นไม้ มักพบอยู่ใกล้กับมอสและไลเคน กล้วยไม้กลุ่มนี้ เช่น ม้าวิ่ง เอื้องกระเจี๊ยง เอื้องคำหิน เป็นต้น

5. การจำแนกตามลักษณะการหาอาหาร (สลิล และนฤมล, 2545)

5.1 กล้วยไม้ที่สามารถสังเคราะห์อาหารได้ (autophytic orchid) เป็นกล้วยไม้กลุ่มใหญ่ที่พบในโลก เป็นกล้วยไม้ที่มีคลอโรฟิลล์ และสามารถสร้างอาหารเองได้จากการสังเคราะห์แสง

5.2 กล้วยไม้กินซาก (saprophytic orchid) เป็นกล้วยไม้กลุ่มเล็กที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้เนื่องจากไม่มีคลอโรฟิลล์ แต่จะอาศัยอาหารจากจุลินทรีย์บางชนิด และสามารถพบได้เฉพาะช่วงที่ออกดอกเท่านั้น กล้วยไม้ในกลุ่มนี้ เช่น เอื้องแฝง กล้วยปลวก กล้วยส้มสยาม เป็นต้น

เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, Polymerase chain reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction) หรือพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่น โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน การทำพีซีอาร์คือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ซ้ำกันหลาย ๆ รอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้ จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ด้วย ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3' ในทิศทางเข้าหากัน ดังนั้นข้อกำหนดในการทำพีซีอาร์คือต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมดหรือทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์มาใช้ในปฏิกิริยาต่อไป บริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้นจะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5' ของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลาย 5' ของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง

ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีทำคือสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ ไดออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ความร้อนแล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายและมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเออื่น ๆ มากมายเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสพร้อมทั้งใส่เอนไซม์ลงในปฏิกิริยา เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เช่น จากเดิมมี 1 โมเลกุลจะเพิ่มเป็น 2 โมเลกุล ดังนั้นถ้าทำปฏิกิริยาซ้ำกัน (denaturation-annealing-extension) หลาย ๆ รอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 2, 4, 8, ... เท่าไปเรื่อย ๆ จนถึง 2^n เท่า เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ (สุรินทร์, 2545)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บน โครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ใน โมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนั่นเอง

วิธีตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) ทำได้โดยการหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) หรือตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ วิธีการตรวจสอบอาจทำได้โดยใช้วิธีไฮบริไดเซชันหรือวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์เป็นหลัก

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีไฮบริไดเซชัน (Hybridization-based DNA fingerprinting) ทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์นำมาตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ถ่ายดีเอ็นเอลงสู่แผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ แล้วไฮบริไดซ์กับโพรบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารฟลูออเรสเซนต์ ตรวจสอบผลที่เกิดขึ้น จะปรากฏแถบดีเอ็นเอหลายแถบมีลักษณะจำเพาะกับแต่ละพันธุ์

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ (PCR-based DNA fingerprinting) โดยทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการเพิ่มปริมาณในหลอดทดลอง เพื่อใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอ ซึ่งถ้าเป็นการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเฉพาะเพียงตำแหน่งเดียว (single locus) จะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่จำเพาะกับช่วงของดีเอ็นเอหรือยีนหนึ่ง ๆ โดยต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายก่อนเพื่อเป็นข้อมูลในการสังเคราะห์ไพรเมอร์ แล้วจึงใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อตรวจสอบยืนยันว่ามียีนดังกล่าว เช่น ในการถ่ายยีนหรือตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมระหว่างพันธุ์พืชหรือสัตว์ ในกรณีที่ตรวจสอบดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่ง (multi-locus) ไพรเมอร์ที่ใช้มักจะเป็นชนิดสุ่มรหัสเพียงชนิดเดียวมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นในบางแห่งเท่านั้น เมื่อดีเอ็นเอมีมากขึ้นก็สามารถนำมาวิเคราะห์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสและย้อมแถบดีเอ็นเอบางแถบได้

การวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) นอกจากจะใช้เพื่อศึกษาการจัดเรียงตัวของดีเอ็นเอส่วนต่าง ๆ ในจีโนม หรือการทำแผนที่ของยีนแล้ว ยังสามารถใช้ตรวจสอบความหลากหลาย (polymorphism) ของพันธุ์ ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ ตรวจสอบพันธุ์พ่อแม่และทดสอบลูกผสม ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต หาเครื่องหมายทางโมเลกุลที่ใช้ตรวจสอบหรือบ่งชี้ลักษณะจำเพาะ เช่น ความต้านทานต่อโรค ความต้านทานต่อสภาพแวดล้อมบางอย่าง ซึ่งจะนำไปสู่การโคลนนิ่ง โดยอาศัยแผนที่ (map-based cloning) ได้ด้วย (สุรินทร์, 2545; Joshi *et al.*, 2004)

การจำแนกพันธุ์กล้วยไม้โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาและหาวิธีในการจำแนกกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ โดยได้มีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่าง ๆ ขึ้นมาใช้ร่วมกับการจำแนกกล้วยไม้ตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เพื่อให้การจำแนกมีความเหมาะสมและถูกต้องมากยิ่งขึ้น เทคนิคที่เป็นที่นิยม ได้แก่ เทคนิค RAPD โดยดวงพร (2543) ใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้าฟ้ามุ่ย แวนด้าแซนเดอร์เรียน่า และลูกผสมจำนวน 23 ต้น โดยใช้ไพรเมอร์ 9 ชนิด ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ 126 แถบ มีดัชนีความเหมือนระหว่างชนิดของแวนด้าฟ้ามุ่ยและแวนด้าแซนเดอร์เรียน่าเพียง 0.28 ขณะที่ดัชนีความเหมือนภายในชนิดแวนด้าฟ้ามุ่ย และแซนเดอร์เรียน่ามีค่า 0.62 และ 0.48 ตามลำดับ ในปีเดียวกัน ประเดิม (2543) ใช้เทคนิค RAPD ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารี หมวด *Brachypetalum* จำนวน 6 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ 520 ชนิด พบว่าไพรเมอร์จำนวน 8 ชนิด ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวน 122 แถบ และมีค่าดัชนีความเหมือนภายในชนิดอยู่ในช่วง 0.29-0.55 สำหรับกล้วยไม้สกุลแคทลียา Benner *et al.* (1995) จำแนกหาค่าโพลีมอร์ฟิซึมในกล้วยไม้สกุลแคทลียา (*Cattleya*) ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด พบว่าไพรเมอร์จำนวน 9 ชนิด ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ โดยมีดัชนีความเหมือนระหว่างชนิดอยู่ในช่วง 0.22 – 0.61 ในปี 1998 Dubouzet *et al.* ใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนก *Alstroemeria* 7 ชนิด กล้วยไม้ 5 ชนิด Carmen 2 ชนิด Butterfly 3 ชนิด และลูกผสม 5 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 ชนิด ผลการวิเคราะห์สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลัก คือ (a) กลุ่ม *Alstroemeria* 6 ชนิด (b) กล้วยไม้ Carmen และลูกผสม และ (c) Butterfly และ *Alstroemeria* 1 ชนิด และในปี 1999 Lim *et al.* ศึกษาค่า genetic distance ของกล้วยไม้สกุลแวนด้า *Ascocentrum* และ *Euanthe* โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่า terete-leaved *Vanda* ควรจัดอยู่ในสกุล *Papilionanthe* ส่วน *Ascocentrum* และ *Euanthe* จัดอยู่ใน strap-leaved *Vanda* ได้

นอกจากนี้มีการใช้เทคนิค RAPD ร่วมกับ allozyme ในการตรวจหาความแปรผันทางพันธุกรรมและรูปแบบโครงสร้างของประชากรในกล้วยไม้ 3 ชนิด พบว่าไม่มีความผันแปรทาง allozyme ที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวของกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด ส่วนเครื่องหมาย RAPD พบว่ามีความผันแปรทางพันธุกรรมภายในประชากรของ *Zeuxine garacilis* และ *Eulophia sinensis* แต่ประชากรของ *Z. stratum* มีความผันแปรน้อย และรูปแบบความผันแปรทางพันธุกรรมมีความสัมพันธ์กับความแตกต่างในระบบการผสมพันธุ์อย่างเห็นได้ชัด (Sun and Wong, 2001) และในปีเดียวกัน Sharma *et al.* (2001) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ *Pterostylis* 6 ชนิดด้วย allozyme และวิเคราะห์ phylogenetic relationship พบว่าเครื่องหมาย allozyme สามารถแยกข้อแตกต่างระหว่างประชากรได้อย่างชัดเจน จากการวิเคราะห์ด้วย Nei's genetic distance (Nei, 1978) พบว่าค่าดัชนีความเหมือนภายในประชากรอยู่ในช่วง 0.859-0.877

เทคนิค AFLP เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเออีกชนิดหนึ่งที่มีผู้นำมาใช้ในการจำแนกกล้วยไม้สกุลแวนด้า โดยตรวจสอบดีเอ็นเอจาก (1) เนื้อเยื่อบริเวณต่าง ๆ เช่น ใบ และดอก และ (2) ดอกกล้วยไม้ที่เก็บในเวลาแตกต่างกัน พบว่าไพรเมอร์ *EcoRI*+4 และ *MseI*+3 ทำให้เกิดรูปแบบ AFLP ดีที่สุด โดยพบ polymorphic band มากกว่า 10 เฟอร์เซ็นต์ในลูกผสมคู่เดียวกัน แต่พบรูปแบบ AFLP ที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมในพันธุ์ที่เกิดจากการกลายของโคลนเดียวกันเพียง 0.3-0.7 เฟอร์เซ็นต์ (Chen *et al.*, 1999)

ในกล้วยไม้สกุลหวายมีการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยโคลนส่วนของ ITS (internal transcribed spacer) จากกล้วยไม้ หาลำดับเบส และออกแบบไพรเมอร์ นำไพรเมอร์ที่ได้มาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ 47 ตัวอย่าง และนำผลผลิตมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 6 ชนิด พบว่าได้แบบของดีเอ็นเอทั้งหมด 41 แบบ สามารถแยกตัวอย่างทั้งพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์การค้าได้เกือบทั้งหมด ยกเว้นตัวอย่างที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกัน (สุรินทร์ และคณะ, 2548) และได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย 12 ชนิดในได้หวั่น โดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS ของ ribosomal DNA แล้วนำมาหาค่า genetic distance และ phylogenetic tree พบว่าสามารถจัดแบ่งกลุ่มได้ 4 กลุ่มหลัก และเสนอว่าควรจัด *D. furcatopedicellatum* และ *D. somai* ออกจากกล้วยไม้สกุลหวาย (Tsai *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังมีการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายโดยเทคนิค AFLP (Xiang *et al.*, 2003) และเทคนิค suppression subtractive hybridization (SSH) และ DNA array พบว่าเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกกล้วยไม้ด้วยโพรบที่จำเพาะกับกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ (species-specific probe) (Li *et al.*, 2004)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (Microsatellite DNA) เป็นกลุ่มของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ (repetitive) เรียงตัวกันประมาณ 1-6 นิวคลีโอไทด์ โดยการซ้ำติดต่อกันไปเรื่อย ๆ เป็นช่วงยาว เช่น $(A)_n$, $(GT)_n$, $(GAT)_n$ และ $(ATGT)_n$ เป็นต้น เมื่อ n คือจำนวนชุดซ้ำ มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 2 ซ้ำขึ้นไป และไม่เกิน 100 ซ้ำ พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั้งในจีโนมของโพรแคริโอต (Gur-Arie *et al.*, 2000) และยูแคริโอต (Morgante *et al.*, 2002) มีการกระจายอยู่ทั่วจีโนม และถูกขนานบ้างด้วยลำดับเบสอนุรักษ์ (highly conserved sequence) (Chambers and MacAvoy, 2000) เนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำขนาดสั้น ๆ ไม่ซับซ้อน จึงมีชื่อเรียกอื่น ๆ อีกว่า simple sequence repeats (SSR), short tandem repeats (STR), simple sequence length polymorphism (SSLP) และ variable number of tandem repeats (VNTR)

ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจะพบได้ทั้งบริเวณที่ไม่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสการสังเคราะห์โปรตีน (noncoding regions) และบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสการสังเคราะห์โปรตีน (coding regions) ความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเกิดจากการขาดหายไปของลำดับเบสซ้ำ (deletion) หรือการสอดแทรกของลำดับเบสซ้ำ (insertion) การกลายนี้เกิดจากกระบวนการเข้าสู่ผิดตำแหน่งของลำดับเบส (slipped-strand mispairing) ในขณะที่มีการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ (Litt and Luty, 1989)

ลักษณะของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสามารถจำแนกชนิดได้ 3 ประเภท (Weber, 1990) ดังนี้

1. Perfect repeat เป็นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่มีเบส 2 หรือมากกว่า 2 ตัวเรียงตัวซ้ำกันไปเรื่อย ๆ เช่น $(CA)_n$
2. Compound repeat เป็นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำหลายชนิดติดต่อกัน เช่น $(CA)_n(GT)_n$
3. Imperfect repeat เป็นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่มีเบสชนิดอื่นแทรกในลำดับเบสซ้ำ ซึ่งเกิดจากการกลาย เช่น $(GA)_n(N)_n(GA)_n$

การวิเคราะห์ความหลากหลายของจำนวนชุดที่ปรากฏบนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งสามารถใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณส่วนของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ โดยจะต้องออกแบบไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเข้าคู่กันกับลำดับเบสที่จันทับข้างไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (flanking DNA) เมื่อเพิ่มปริมาณส่วนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอแล้วสามารถตรวจสอบความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ โดยแยกขนาดของโมเลกุลดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสในโพลีอะครีลาไมด์เจล ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี หรือการย้อมด้วยสารเคมี (Weber and May, 1989)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูง แต่มีข้อจำกัดอันเนื่องมาจากขั้นตอนในการพัฒนาที่มีหลายขั้นตอน วิธีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์มี 2 วิธี (Rakoczy-Trojanowska and Bolibok, 2004) ได้แก่

1. การหาลำดับเบสที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจากฐานข้อมูล (EMBL, GenBank) ซึ่งวิธีนี้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และราคาไม่แพง โดยทั่วไปจะพบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอในส่วนของดีเอ็นเอบริเวณที่ไม่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสการสังเคราะห์โปรตีนของจีโนม แต่วิธีนี้จะมีข้อจำกัดกับพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหรือพืชที่น่าสนใจทางวิทยาศาสตร์ที่แสดงในฐานข้อมูล เช่น อ้อย (Pinto *et al.*, 2004) ฝ้าย (Qureshi *et al.*, 2004) ข้าว ข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์ (Rota *et al.*, 2005)

2. การสร้างห้องสมุดจีโนม (genomic library) ซึ่งวิธีเดิมนั้นจะทำโดยการตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้มีขนาด 300-1,000 คู่เบส แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะก่อนทำการเพิ่มปริมาณในแบคทีเรีย แล้วคัดเลือกโคโลนีที่มีเบสซ้ำที่ต้องการ (positive clone) โดยการนำโคลนที่ได้มาไฮบริดซ์กับโพรบโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสซ้ำและติดฉลาก จากนั้นสกัดพลาสมิดจากโคลนที่ให้ผลบวกเพื่อหาลำดับเบสที่จันทับข้างไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ และออกแบบคู่ไพรเมอร์ แต่วิธีนี้มีประสิทธิภาพต่ำ เนื่องจากได้โคลนที่ให้ผลบวกจำนวนน้อย ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากห้องสมุดจีโนมแบบ enrichment ขึ้นมา โดยการตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วนำชิ้นดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกับ adapter และแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำโดยนำไปไฮบริดซ์กับโพรบที่มีลำดับเบสซ้ำ (microsatellite oligoprobe) ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ streptavidin ที่เคลือบอยู่บน magnetic bead ทำพีซีอาร์แล้วโคลนเข้าไปในเวกเตอร์ ตรวจสอบด้วยเทคนิค colony hybridization เลือกโคลนที่ให้ผลบวกมา

สัปดาห์สามสิบ หาลำดับเบส และออกแบบไพรเมอร์ วิธีนี้มีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีดั้งเดิม เพราะสามารถเพิ่มจำนวนโคลนที่ให้ผลบวกได้เป็นจำนวนมาก Tang *et al.* (2003) ทำการแยกเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากนกกระจอกเทศ พบว่าการสร้างห้องสมุดจีโนมแบบ enrichment นั้นให้โคลนที่มีลำดับเบสซ้ำแบบ CA สูงถึง 78.8% เมื่อเปรียบเทียบกับแบบ non enrichment ที่ให้เพียง 0.4% เท่านั้น และในปี 2004 Wang *et al.* พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในถั่ว azuki พบว่าวิธีการสร้างห้องสมุดจีโนมแบบ enrichment สามารถเพิ่มปริมาณโคลนที่มีลำดับเบสซ้ำได้สูงกว่าวิธี non enrichment ถึง 116 เท่า

การตรวจสอบกล้วยไม้โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

มีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เพื่อตรวจสอบกล้วยไม้แล้วหลายชนิด เช่น กล้วยไม้ *Gymnadenia conopsea* (Gustafsson and Thorén, 2001) พบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 6 ตำแหน่งที่แสดงความผันแปรสูง โดยมีจำนวน 4-10 แอลลีลต่อตำแหน่ง และมีค่า degree of polymorphism สูง ($H_o = 0.40-0.90$; $H_e = 0.54-0.88$) กล้วยไม้ *Serapias vomeracea* (Pellegrino *et al.*, 2001) มีเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 6 ตำแหน่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และมีค่าความผันแปรทางพันธุกรรมสูง โดยให้จำนวนแอลลีล 3-6 แอลลีลต่อตำแหน่ง และค่า H_o อยู่ในช่วง 0.35-0.86 สำหรับกล้วยไม้ *Gymnadenia conopsea* มีรายงานอีกในปี 2002 (Compbell *et al.*, 2002) ซึ่งจากการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 7 ตำแหน่ง พบว่า 4 ตำแหน่งมีโพลิมอร์ฟิซึมสูง โดยมีจำนวนแอลลีลทั้งหมดที่พบในแต่ละตำแหน่งอยู่ระหว่าง 16 ถึง 25 มีค่า H_o และ H_e อยู่ระหว่าง 0.36-0.67 และ 0.37-0.82 ตามลำดับ และในปี 2006 ได้มีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับกล้วยไม้สกุลแวนด้า โดย Lim *et al.* พบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 13 ตำแหน่งมีโพลิมอร์ฟิซึมในกล้วยไม้สกุลแวนด้า 4 ชนิด แวนด้าลูกผสม 11 ชนิด และกล้วยไม้ *Aranda* 1 ชนิด โดยให้จำนวนแอลลีลอยู่ในช่วง 2-19 แอลลีลต่อตำแหน่ง สำหรับประชากร *V. sumatrana* มีค่า H_o และ H_e อยู่ระหว่าง 0-0.76 (เฉลี่ย 0.31) และ 0-1 (เฉลี่ย 0.36) ตามลำดับ

สำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย จุลภาค และคณะ (2548) พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์โดยการสร้างห้องสมุดจีโนมแบบ enrichment ของ dinucleotide repeat และนำดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ได้ไปใช้ในการหาความสัมพันธ์ และตรวจสอบพันธุ์ประวัติของกล้วยไม้สกุลหวายต่าง ๆ พบว่ามีจำนวนแอลลีลทั้งหมด 92 แอลลีล และมีค่าเฉลี่ยจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งเท่ากับ 5.75 และในปี 2006 Yue *et al.* พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย

แบบ enrichment พบว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 14 ตำแหน่งมีโพลิมอร์ฟิซึมเมื่อทำการตรวจสอบกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมจำนวน 42 พันธุ์ โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่งเท่ากับ 12.0 ± 1.9 และมีค่า H_o โดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.70

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity/Genetic variation) ในพืช

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม รายงานส่วนใหญ่จะใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดที่เป็นแบบสุ่ม และตรวจสอบได้ครั้งละหลายตำแหน่ง แต่เมื่อมีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในพืชชนิดต่าง ๆ มากขึ้นจึงมีการนำมาใช้ในวัตถุประสงค์นี้ด้วย เช่น ในมันเทศ (sweet potato) (Zhang *et al.*, 1999) ฝ้าย (Reddy *et al.*, 2001) ถั่วลิสง (He *et al.*, 2002) ดอกทานตะวัน (Paniego *et al.*, 2002) *Arabidopsis* (Symonds and Lloyd, 2003) อ้อย (Cordeiro *et al.*, 2003) มะพร้าว (Meerow *et al.*, 2003) กาแฟ (Baruah *et al.*, 2003) สตรอเบอรี่ (Sargent *et al.*, 2003) ถั่วลิสง (Moretzsohn *et al.*, 2004) แดงไทย (Ritschel *et al.*, 2004) ชา (Freeman *et al.*, 2004) ยางพารา (Roy *et al.*, 2004) ถั่วฝักยาว (Phansak *et al.*, 2005) สอพ (Stajner *et al.*, 2005) *Picea asperata* (Wang *et al.*, 2005) โกโก้ (Serenio *et al.*, 2006) ลิ้นจี่ (Li *et al.*, 2006) ฝ้าย (Bertini *et al.*, 2006) และลูกพีช (Bouhadida *et al.*, 2007) เป็นต้น

ในประเทศไทยมีการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศลูกผสม จำนวน 8 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 16 คู่ พบว่าไพรเมอร์ 9 คู่ สามารถบอกความแตกต่างในระดับจีโนมได้ระหว่างพ่อและแม่ได้ (ณัญญา, 2545) และใช้จำแนกพันธุ์ข้าวที่มีความหอม (ข้าวดอกมะลิ 105 กข 15 และ กข 6) และไม่มีความหอม (ชัยนาท 1) (ปรีชา และปิยวรา, 2548) ผลการศึกษาพบว่าสามารถแยกข้าวหอม และไม่หอมได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลท์แบบ CT ของเครื่องหมาย RM17 โดยข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 มีจำนวนซ้ำ 6 ซ้ำ ในขณะที่ข้าวขาวดอกมะลิ 105 กข 15 และ กข 6 มีจำนวนซ้ำ 14, 12 และ 13 ซ้ำ ตามลำดับ

2. การติดตามยีนและการทำแผนที่จีโนม

การติดตามยีนสามารถทำได้โดยการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับยีนเป้าหมาย โดยใช้ร่วมกับวิธีการ Bulk Segregant Analysis (BSA) การใช้ NILs การแสดงตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณ (QTLs) และการใช้ฐานข้อมูลคอมพิวเตอร์ (Masojc, 2002)

เนื่องจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์เป็นเครื่องหมายที่มีพอลิมอร์ฟิซึมสูง แสดงให้เห็นความแตกต่างของความยาวที่ขึ้นอยู่กับจำนวนซ้ำของหน่วยซ้ำ สะดวก และรวดเร็วจึงมีการนำเครื่องหมายชนิดนี้มาใช้ในการติดตามยีน โดยมีการศึกษามากในข้าวสาลี ยีนที่ทำการศึกษาล้วนใหญ่เป็นยีนต้านทานโรค เช่น ยีนต้านทานโรค stripe rust หรือ yellow rust ในข้าวสาลี (Fahima *et al.*, 1998; Chagué *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2002) ยีนต้านทานโรค leaf rust ในข้าวสาลี (Suenaga *et al.*, 2001; Schnurbusch *et al.*, 2004; Vikal *et al.*, 2004; McCartney *et al.*, 2005; Obert *et al.*, 2005) ยีนต้านทานโรค *Fusarium* head blight (FHB) ในข้าวสาลี (Wei *et al.*, 2005) ยีนต้านทานแมลง Russian wheat aphid (RWA) ในข้าวสาลี (Miller *et al.*, 2001) ยีนที่ทำให้แคระแกร็น (dwarfing gene) ในข้าวสาลี (Korzun *et al.*, 1997; 1998) ยีนต้านทานเชื้อรา (powdery mildew) ในข้าวสาลี (Chen *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005) ยีน thermo-sensitive genic male-sterile ในข้าวสาลี (Xing *et al.*, 2003) การศึกษาติดตามยีนในข้าว เช่น ยีนต้านทานโรค sheath blight (Che *et al.*, 2003) ยีนต้านทานโรค bacterial leaf blight (BB) (Rao *et al.*, 2003) ยีน fertility-restoring (*Rf*) ในระบบ CMS (Tan *et al.*, 2004) ยีนต้านทานแมลง whitebacked planthopper (WBPH) (Kadirvel *et al.*, 2003) และยีน premature senescence gene (*Pse(t)*) ในข้าวกลายพันธุ์ เพื่อศึกษาการทำงานของระดับโมเลกุลของการเสื่อมที่เกิดขึ้นก่อนเวลาอันควรในข้าวลูกผสม (Li *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาติดตามยีนในพืชชนิดอื่น เช่น ในพริก เพื่อทำการปรับปรุงพันธุ์พริกให้มีลักษณะต้านทานโรค (อรรัตน์, 2543) ยีนควบคุมสีของเมล็ดใน *Brassica juncea* เพื่อปรับปรุงคุณภาพของน้ำมันในเมล็ดให้ดีขึ้น (Padmaja *et al.*, 2005) ยีนต้านทาน *fusarium* vascular wilt ในถั่ว lentil (Hamwieh *et al.*, 2005) คัดเลือกพืชที่ต้านทานต่อโรคใบจุด (angular leaf spot) ในถั่ว *Phaseolus vulgaris* (Silva *et al.*, 2003) ยีนต้านทานโรค phytophthora root rot (Demirbas *et al.*, 2001) และยีนต้านทานโรค frog-eye leaf spot (FLS) ในถั่วเหลือง (Yang *et al.*, 2001) ยีนต้านทานโรค leaf scald ในข้าวบาร์เลย์ (Genger *et al.*, 2003) และยีนทนต่อดินที่มีอลูมิเนียมสูงในข้าวบาร์เลย์ (Raman *et al.*, 2003) ในข้าวไรย์ (Matos *et al.*, 2005) เป็นต้น ซึ่งจะประกอบเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์และการคัดเลือกพันธุ์ที่ดี

นอกจากการติดตามยีนยังสามารถนำไปใช้ในการทำแผนที่จีโนม (Genetic linkage map และ QTL mapping) ในพืชหลายชนิด เช่น ในข้าวสาลี (Röder *et al.*, 1998) ข้าวบาร์เลย์ (Ramsay *et al.*, 2000) ข้าวฟ่าง (Bhatramakki *et al.*, 2000) กุหลาบ tetraploid (Rajapakse *et al.*, 2001) มันสำปะหลัง (Mba *et al.*, 2001) ข้าว (McCouch *et al.*, 2002) ข้าวโอ๊ต (Pal *et al.*, 2002) ถั่วแดง (Gaitán-Solis *et al.*, 2002) ข้าวสาลี (Gupta *et al.*, 2002) และ alfalfa (Julier *et al.*, 2003) เป็นต้น

การใช้ไมโครแซทเทลไลต์เป็นเครื่องหมายมีข้อดี เนื่องจากเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีพอลิมอร์ฟิซึมสูง มีการกระจายทั่วจีโนม ทั้งระหว่างยีนและภายในยีน แสดงการข้ามแบบข่มร่วมกัน และการวิเคราะห์สามารถทำได้ง่าย และรวดเร็วโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งต้องการปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อย (Weber, 1990) นิยมใช้ตรวจสอบสิ่งมีชีวิตที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก ๆ เช่น ตัวอย่างภายใน species เดียวกัน ใช้ได้ทั้งในคน (Litt and Luty, 1989; Weber and May, 1989; Mitas, 1997; Kimpara *et al.*, 1997) สัตว์ เช่น ในกิ้งกูดดำ (Pongsomboon *et al.*, 2000) ช้าง (Archie *et al.*, 2003) ฉลาม (Keeney and Heist, 2003) เต่าทะเล (Aggarwal *et al.*, 2004) แพะ (Iamartino *et al.*, 2005) และพืชดัดแปลงแล้ว

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

กล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ต่าง ๆ แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่	ชื่อตัวอย่าง	ตัวอย่างที่	ชื่อตัวอย่าง
1	รินนภา	21	แมงมุมดำ
2	ขาว 5 N	22	<i>Den. Reha Zehorn</i>
3	ขาวสนาน	23	เบ็ตตี้
4	มิสทีน	24	ซารูเรีย
5	บอม 17 แดง	25	ชั้นเกี้ยว
6	บอม K หวาน	26	ชมพูกลม
7	ขาวประวิทย์	27	บุรณะชั้นชาย
8	โจแดง	28	บุรณะกรีน
9	เอริกา	29	บุรณะเจด
10	ฟิกาซัส มก.	30	เจ้าพระยาบลู
11	<i>Den. Jaquelyn Thomas</i>	31	ใจฮาน
12	อโนชา x กลูคิอาย	32	พานาวี
13	หวายเจียตโกลส์	33	เอเมร่อน
14	มาดาม	34	วอเตอร์ลูไรวรรณ
15	มิสสิงคโปร์	35	หอม 16
16	บุญหลง	36	บางกอกเฟนซี
17	ชีซ่าบางกอก	37	คานาเคซีโอ
18	ฟิกาซัส	38	ขาวกลม
19	แดงไคล่า	39	สะเก็ดดาว
20	เอียสกุล	40	<i>Den. Jaquelyn Concert</i>

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ชื่อตัวอย่าง	ตัวอย่างที่	ชื่อตัวอย่าง
41	สกลบลู	46	ชูโทน
42	เรเย็นพราว	47	มีแสงนิล
43	มิดไนท์ลิปสติก	48	ประพิน
44	เก๋ตติงบลู	49	ชีซ่าแกระ
45	บุญชูโกลด์		

วิธีการ

1. การสกัดแยกดีเอ็นเอจากกล้วยไม้

สกัดแยกดีเอ็นเอจากกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้วิธีที่ประยุกต์จาก Dellaporta *et al.* (1983) (ภาคผนวก 1)

2. การโคลนไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอโดยวิธี SSR enrichment

แยกโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์ตามวิธีการที่ประยุกต์จาก Yaish and Vega (2003) โดยนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* หรือ *TaqI* แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับ adapter ตรวจสอบและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปไฮบริดซ์กับ โอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 6 ชนิด คือ $(CA)_{15}$, $(GA)_{15}$, $(ACC)_{10}$, $(CCT)_{10}$, $(GAT)_{10}$ และ $(ATCT)_7$ สำหรับดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* และ โอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 4 ชนิด คือ $(CA)_{15}$, $(GA)_{15}$, $(ACC)_{10}$ และ $(CCT)_{10}$ สำหรับดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* ซึ่งแต่ละชนิดติดฉลากที่ปลาย 5' ด้วยไบโอติน (Biotinylated oligo) เพื่อแยกชิ้นดีเอ็นเอที่เกาะกับโพรบเมื่อทำปฏิกิริยากับ streptavidin ที่เคลือบอยู่บน magnetic beads ล้างดีเอ็นเอเป้าหมายออกจาก beads และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธีพีซีอาร์ จากนั้นเชื่อมต่อดีเอ็นเอ

เข้ากับพลาสมิด pGEM-T และถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีทรานสฟอร์เมชัน (ดูรายละเอียดในภาคผนวก 2)

3. การคัดเลือกโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอจากห้องสมุดจีโนม

คัดเลือกโคลนนี้สีขาว โดยใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเข้ามาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่นนิ่งเข้าปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ในการตรวจสอบด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดคล้องมาตรฐานตรวจสอบว่ามีไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอหรือไม่ด้วยวิธี dot blot hybridization โดยนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากแต่ละโคลนหยดลงบนแผ่นเมมเบรน ทำการไฮบริไดเซชันกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบที่มีลำดับไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยไบโอติน และตรวจสอบโดยชุดตรวจสอบ North2South Chemiluminescent Hybridization and Detection Kit (Pierce Biotechnology) (ภาคผนวก 3)

4. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์และออกแบบไพรเมอร์

4.1 คัดเลือกโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอมาสกัดพลาสมิดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN) แล้วส่งพลาสมิดไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) หรือบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

4.2 ออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ (Forward และ Reverse) จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ขนาบข้างไมโครแซทเทลไลต์ (flanking region) ให้มีความยาวประมาณ 20 เบส และมีค่า T_m ของไพรเมอร์ใกล้เคียงกัน

ทดสอบไพรเมอร์โดยนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับจีโนมดีเอ็นเอที่สกัดไว้ เพื่อหาสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่จะทำให้เกิดผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ (25 ng/μl) 1.0 ไมโครลิตร Forward primer (5 pmol/μl) 1.0 ไมโครลิตร Reverse primer (5 pmol/μl) 1.0 ไมโครลิตร dNTP mix (2 mM) 1.5 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 1.5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50 mM) 0.75 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 U/μl) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 15.0 ไมโครลิตร ปรับโปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจนได้สถานะที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์

5. การตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

นำดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์ต่าง ๆ มาเพิ่มปริมาณโดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่เลือกไว้ และตรวจสอบผลด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสบนเจลโพลีอะครีลาไมด์ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (สุรินทร์, 2545)

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

6.1 นำข้อมูลแอลลีลที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้คู่ไพรเมอร์ต่าง ๆ มาบันทึกเป็นข้อมูลไบนารี (binary) เพื่อทำการเปรียบเทียบการเกิดแอลลีลขนาดต่าง ๆ กันบนเจลโพลีอะครีลาไมด์ โดยให้คะแนนตำแหน่งที่เกิดแอลลีลเป็น 1 และให้คะแนนตำแหน่งที่ไม่เกิดแอลลีลเป็น 0 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.1m

6.2 นำข้อมูลแอลลีลที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณความถี่ของแอลลีล (allele frequency) และจำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง (number of allele per locus)

6.3 นำข้อมูลแอลลีลที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณค่า Polymorphic Information Content (PIC) จากสูตร

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

โดย p_i คือ ความถี่ของแอลลีลที่ i , k คือ จำนวนแอลลีล (Hedrick, 1985) ค่า PIC หรือค่า expected heterozygosity (H_e) เป็นค่าที่บ่งชี้โอกาสที่จะพบตัวอย่างที่คัดเลือกมีการเกิดโพลิมอร์ฟิซึม

6.4 นำข้อมูลแอลลีลที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณค่า observed heterozygosity (H_o)

$$H_o = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}}$$

6.5 นำข้อมูลแอลลีลที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณค่า effective number of allele (n_e)

$$n_e = 1 / \sum p_i^2$$

7. สถานที่ทำการทดลอง

สถานที่ทำการวิจัย คือห้องปฏิบัติการวิจัยและเรือนเพาะชำของภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ

8. ระยะเวลาในการทดลอง

ระยะเวลาทำการวิจัย คือ ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2547 ถึงเดือนมีนาคม 2550

ผลและวิจารณ์

1. การแยกไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์ต่าง ๆ แล้วเลือกเพียง 1 ตัวอย่างนำมาทำการโคลนไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอโดยวิธี SSR enrichment โดยตัดดีเอ็นเอกล้วยไม้พันธุ์รินภาด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ชนิด คือ เอนไซม์ *MseI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส (5'-TTAA-3') หรือเอนไซม์ *TaqI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส (5'-TGCA-3') จากนั้นเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ตัดแล้วกับ adapter และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ แยกลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์โดยนำสารละลายดีเอ็นเอมาทำไฮบริดเซชันกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 6 ชนิด คือ (CA)₁₅, (GA)₁₅, (ACC)₁₀, (CCT)₁₀, (GAT)₁₀ และ (ATCT)₇ สำหรับดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* และโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 4 ชนิด คือ (CA)₁₅, (GA)₁₅, (ACC)₁₀ และ (CCT)₁₀ สำหรับดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* โพรบแต่ละชนิดติดฉลากที่ปลาย 5' ด้วยไบโอติน (Biotinylated oligo) จึงสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่เกาะกับโพรบได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ streptavidin ที่เคลือบอยู่บน magnetic beads นำลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ที่แยกได้มาทำให้เป็นสายคู่ โดยเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ จากนั้นเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับพลาสติก และถ่ายภาพพลาสติกถูกผสมเข้าสู่เซลล์เบคทีเรียด้วยวิธีทรานสฟอร์มเมชัน พบว่าจำนวนโคลนที่ได้จากห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* มีจำนวน 292 โคลน คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอสอดแทรกโดยวิธีพีซีอาร์ ได้จำนวน 168 โคลน จากนั้นตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอด้วยวิธี dot blot hybridization พบว่าได้โคลนที่ให้ผลบวกจำนวน 43 โคลน คิดเป็น 26 เปอร์เซ็นต์

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในครั้งแรกได้โคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอจำนวนน้อย อาจเนื่องมาจากการจับกันเองของโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์ในขั้นตอนการทำไฮบริดเซชันเพื่อทำการแยกลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ โดยในขั้นตอนนี้จะใส่โพรบไปจำนวน 6 ชนิด และพบว่าโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบชนิด (ACC)₁₀ สามารถจับกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบชนิด (GAT)₁₀ ได้ และโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบชนิด (GA)₁₅ สามารถจับกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบชนิด (ATCT)₇ ได้ ทำให้การแยกลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์มีประสิทธิภาพต่ำ ส่งผลให้ได้โคลนที่ให้ผลบวกจำนวน

น้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์โดยวิธีเดียวกันนี้ในพืชชนิดอื่น เช่น *Neobalanocarpus heimii* (Iwata *et al.*, 2000) ยูคาลิปตัส (Steane *et al.*, 2001) white clover (*Trifolium repens* L.) (Kölliker *et al.*, 2001) *Kandelia candel* (Sugaya *et al.*, 2002) และลูกพลัม (Mnejja *et al.*, 2004) ได้โคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอถึง 94, 63, 70.6, 90 และ 72.1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

จากผลการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ *MseI* ดังกล่าว จึงทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนเอนไซม์ตัดจำเพาะเป็น *TaqI* และลดจำนวนชนิดของโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบเหลือ 4 ชนิด โดยตัดชนิดที่สามารถจับตัวกันได้ ออก พบว่าจากห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* ได้จำนวนโคลนหลังจากการทรานสฟอร์มเมชันจำนวน 539 โคลน หลังจากทำพีซีอาร์คัดเลือกโคลนที่มีขนาดดีเอ็นเอสอดคล้องได้จำนวน 469 โคลน สุ่มโคลนจำนวน 169 โคลนมาตรวจสอบด้วยวิธี dot blot hybridization พบว่าได้โคลนที่ให้ผลบวกจำนวน 152 โคลน คิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าที่สูงสอดคล้องกับการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในพืชชนิดอื่นดังที่กล่าวมาแล้ว จากลำดับเบสที่มีไมโครแซทเทลล์สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ 73 คู่ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบจำนวนโคลนที่ได้ระหว่างการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด

ขั้นตอนการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์	ห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	
	<i>MseI</i>	<i>TaqI</i>
1. จำนวนโคลนจากการทำทรานสฟอร์มเมชัน	292	539
2. จำนวนโคลนที่คัดเลือกได้จากการทำพีซีอาร์	168	469
3. จำนวนโคลนที่นำมาตรวจสอบด้วยวิธี dot blot hybridization	168	169
4. จำนวนโคลนที่ให้ผลบวกจากการทำ dot blot hybridization	43	152
5. เปอร์เซ็นต์โคลนที่ให้ผลบวก	26	90
6. จำนวนโคลนที่นำไปหาลำดับเบส	43	152
7. จำนวนไพรเมอร์ที่ออกแบบได้	10	63

จากการหาลำดับเบส เมื่อนำมาตรวจสอบสามารถจำแนกลำดับเบสในโคลนต่าง ๆ ออกเป็น 4 กลุ่มได้ดังนี้

1. กลุ่มที่ลำดับเบสมีขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์และมีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์อยู่บริเวณตรงกลาง
2. กลุ่มที่ลำดับเบสมีขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์และมีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์อยู่บริเวณส่วนต้นหรือส่วนปลาย ทำให้ไม่มีที่สำหรับออกแบบไพรเมอร์
3. กลุ่มที่ลำดับเบสมีขึ้นดีเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์แต่ไม่มีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์
4. กลุ่มที่ลำดับเบสไม่สมบูรณ์โดยมีความบกพร่องของการอ่านลำดับเบส

จากการนำโคลนที่ให้ผลบวกในการทำ dot blot hybridization จากห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* จำนวน 43 โคลนมาหาลำดับเบส พบว่ามีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์เพียง 27 โคลน (คิดเป็น 62.8 เปอร์เซ็นต์) และ 17 โคลนไม่เหมาะสมสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ เนื่องจากลำดับเบสที่ขนานข้างลำดับเบสซ้ำบริเวณ 5' หรือ 3' สั้นเกินไป (น้อยกว่า 10 คู่เบส) หรือไม่มีเลย ส่วนโคลนที่เหลือ 3 โคลนมีลำดับเบสซ้ำแบบอื่น ๆ และไม่มีลำดับเบสซ้ำเลย และอีก 13 โคลนมีลำดับเบสไม่สมบูรณ์โดยมีความบกพร่องของการอ่านลำดับเบส สำหรับห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* พบว่าจาก 152 โคลนที่ทำการหาลำดับเบส พบว่า 135 โคลน (คิดเป็น 88.8 เปอร์เซ็นต์) มีลำดับเบสซ้ำ และพบว่า 72 โคลนมีลำดับเบสบริเวณปลาย 5' หรือ 3' สั้นเกินไป หรือไม่มีเลย และโคลน 1 โคลนไม่มีลำดับเบสซ้ำ อีก 16 โคลนไม่สามารถอ่านลำดับเบสได้ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบความถี่ของลำดับเบสแต่ละชนิดที่พบระหว่างการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด

ลักษณะของลำดับเบส	ห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	
	<i>MseI</i>	<i>TaqI</i>
1. ลำดับเบสมีซันดิเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์ (กลุ่มที่ 1)	10	63
2. ลำดับเบสที่ไม่มีส่วนหัวหรือท้ายให้ออกแบบไพรเมอร์ (กลุ่มที่ 2)	17	72
3. ลำดับเบสที่ไม่มีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์ (กลุ่มที่ 3)	3	1
4. ลำดับเบสไม่สมบูรณ์โดยมีความบกพร่องของการอ่านลำดับเบส (กลุ่มที่ 4)	13	16
จำนวนรวม	43	152

สาเหตุที่โคลนส่วนใหญ่มีลำดับเบสบริเวณปลาย 5' หรือ 3' สั้นเกินไป หรือไม่มีเลยนั้น อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ตัดจำเพาะที่นำมาใช้ไม่เหมาะสม ลำดับเบสที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* จะมีเบสชนิด A และ T เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ ทำให้บริเวณที่ขนาบข้างไมโครแซทเทลไลต์มีค่า T_m ต่ำไม่เหมาะสำหรับออกแบบไพรเมอร์ ส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* นั้นมีบริเวณจดจำบางส่วนเป็นลำดับเบสซ้ำ Hamilton *et al.* (1999) กล่าวว่าสามารถแก้ปัญหานี้ได้โดยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลาย ๆ ชนิด ซึ่งจะเพิ่มโอกาสให้ได้ลำดับเบสที่ยาวขึ้น

นำโคลนทั้งหมดที่มีลำดับเบสซ้ำมาจำแนกออกเป็นกลุ่ม ๆ ได้แก่ dinucleotide repeat, trinucleotide repeat, short tandem repeat และ compound repeat (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ลำดับเบสชนิดต่าง ๆ ที่พบในการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

ลำดับเบสซ้ำ	ห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	
	<i>MseI</i>	<i>TaqI</i>
Dinucleotide Repeats		
GA/TC	9	72
CA/TG	-	1
Trinucleotide Repeats		
CCT/AGG	1	36
GAT/ATC	1	-
Short Tandem Repeats		
(GGGTTTA) _n /(TAAACCC) _n	9	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ลำดับเบสซ้ำ	ห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	
	<i>MseI</i>	<i>TaqI</i>
Compound Repeats		
(GT) _n และ (GA) _n	-	2
(GA) _n และ (GT) _n (GA) _n /(CT) _n และ (CT) _n (CA) _n	2	4
(AGG) _n และ (GA) _n /(CT) _n และ (CCT) _n	1	2
(GT) _n (GA) _n /(GA) _n (GT) _n /(CT) _n (CA) _n	1	6
(CA) _n (CT) _n และ	1	-
(CCT) _n (CCA) _n (CCT) _n (CCA) _n		
(CCT) _n (CCA) _n (CCT) _n	-	4
(GA) _n และ (GA) _n (TAGA) _n	1	-
(CT) _n (CA) _n (TA) _n	-	1
(CCT) _n (CCA) _n	-	2
(CCT) _n (CCA) _n (CCT) _n (CA) _n (CT) _n	-	1
(GA) _n (GT) _n (GA) _n (GT) _n	-	1
(GA) _n (GT) _n (GA) _n	-	1
(CT) _n GAA(ATCT) _n (CT) _n	1	-
(GGT) _n AAT(GGA) _n	-	1
(AAG) _n (AGG) _n	-	1
รวม	27	135

เมื่อนำโคลนทั้งหมดที่มีลำดับเบสซ้ำมาจำแนกออกเป็นกลุ่ม ๆ พบว่าบางโคลนมีลำดับเบสซ้ำมากกว่า 1 ชนิดในลำดับเบสเส้นเดียวกัน (ภาพที่ 1) และพบว่ากลุ่มที่มีลำดับเบสซ้ำ 2 เบสติดต่อกัน (dinucleotide repeats) มี 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีการเรียงตัวซ้ำกันของเบสชนิด(GA)_n พบมากที่สุดถึง 50% และ (CA)_n ที่พบเพียง 0.6% การเรียงตัวซ้ำกันของเบสชนิด GA/TC มากกว่าเบสชนิด CA/TG นี้สอดคล้องกับที่พบในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วลิสง (He *et al.*, 2003) ขางพารา (Roy *et al.*, 2004) อะโวคาโด (Ashwort *et al.*, 2004) และ chickpea (Sethy *et al.*, 2006) จากการสำรวจลำดับ

CGAGAGAGAGGGAGGAAGCAAGAGGGGATGGAGAGATTGAGAGAGGGATAGAGAGAG
AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAGAAAGAGAGAGCAAGGGGAGAGATGGGGAGATC
 GAGAGATGGAGCAAGGGAAAAGAGAGATT**GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG**
TGTGTGTGTGTGTGTGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAATGCTTGGGGA
 GGTTTGGAGAGAGTGAAAGAGAGAGAGAGAACATNGGGAGGGATGGACAAATCANG
 GGAGAGGGAGTGAGAGAGAGGGAGAATACATGTGGAGGGATGGTTAGAGTGAATAA
 AAGAATGAGAGAGT

ภาพที่ 1 ลำดับเบสของโคลนที่มีลำดับเบสยาวมากกว่า 1 ชนิด คือ $(GA)_n$ และ $(GT)_n(GA)_n$

นอกจากนี้ยังพบลำดับเบสซ้ำชนิดอื่น ซึ่งมีเบส 7 เบสเรียงตัวซ้ำติดต่อกัน คือ (GGGTTTA)_n/(TAAACCC)_n คิดเป็น 5.6% แต่ไม่สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ เนื่องจากมีลำดับเบสที่ปลาย 5' และ 3' สั้นเกินไป

2. เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

นำลำดับเบสที่มีลักษณะดังกลุ่มที่ 1 คือ ลำดับเบสมีซีนดีเอ็นเอสอดแทรกสมบูรณ์และมีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์ที่อยู่บริเวณตรงกลางมาออกแบบไพรเมอร์ และคัดเลือกลำดับเบสที่มีลักษณะดังกลุ่มที่ 4 คือลำดับเบสไม่สมบูรณ์โดยมีความบกพร่องของการอ่านลำดับเบสมาสกัดพลาสมิดเพื่อหาลำดับเบสจากด้าน 3' (reverse) เพื่อให้ได้ลำดับเบสจากบริเวณส่วนหลังย้อนขึ้นมาด้านหน้าเพื่อออกแบบไพรเมอร์บริเวณส่วนหลังได้ ออกแบบไพรเมอร์จากโคลนที่มีบริเวณของลำดับเบสซ้ำมากกว่าหรือเท่ากับ 10 ซ้ำโดยใช้โปรแกรม Primer 3 จาก

<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3> www.cgi

แต่ละลำดับเบสจะออกแบบไพรเมอร์ 2 เส้น คือ Forward primer (F) 1 เส้น และ Reverse primer (R) 1 เส้น โดยให้ครอบคลุมส่วนที่เป็นลำดับไมโครแซทเทลไลต์ โดยไพรเมอร์แต่ละเส้นมีความยาวประมาณ 18-27 คู่เบส มีค่า melting temperature (T_m) ใกล้เคียงกัน ซึ่งคำนวณได้จากสูตร $T_m = [4 \times (G+C)] + [2 \times (A+T)]$ โดย G, C, A และ T คือจำนวนเบสแต่ละชนิดที่มีในสายโอลิโกนิวคลีโอไทด์นั้น (สุรินทร์, 2545) ไพรเมอร์แต่ละเส้นมี GC content ระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์ และมีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหวังประมาณ 100-350 คู่เบส

จากการออกแบบไพรเมอร์ได้ไพรเมอร์ทั้งหมด 73 คู่ โดย 10 คู่แรกได้จากห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* อีก 63 คู่ได้จากห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* (ตารางที่ 2) นำไพรเมอร์ทั้ง 73 คู่ มาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากกล้วยไม้ตัวอย่างจำนวนหนึ่ง ส่วนใหญ่ได้ผลไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ หรือเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากคล้ายกับการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม จึงทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ โดยนำลำดับเบสที่ออกแบบไพรเมอร์ไปแล้วมาออกแบบไพรเมอร์เพิ่มเติม บางลำดับเบสออกแบบไพรเมอร์ใหม่ทั้ง Forward primer และ Reverse primer บางลำดับเบสออกแบบ Forward primer หรือ Reverse primer ใหม่เพียงเส้นเดียว และนำไพรเมอร์ใหม่และเก่าที่ออกแบบได้มาจับคู่กัน และคำนวณขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่คาดหวัง พบว่าได้ไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 189 คู่ และพบว่าไม่มีไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ที่ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดเป็นไปตามที่คาดหวัง

คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดเป็นไปตามที่คาดหวังและทำให้เกิดโพลิเมอร์ฟิซึมจำนวน 8 คู่ (ตารางที่ 5) ประกอบด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ได้จากห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* จำนวน 2 คู่ ได้แก่ DR02 และ DR06 และไพรเมอร์ที่ได้จากห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* จำนวน 6 คู่ ได้แก่ DR12, DR26, DR30, DR31, DR49 และ DR67 มาตรวจสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่างด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำอิเล็กโตรโฟเรซิสใน denaturing polyacrylamide gel (ภาพที่ 2 – ภาพที่ 9)

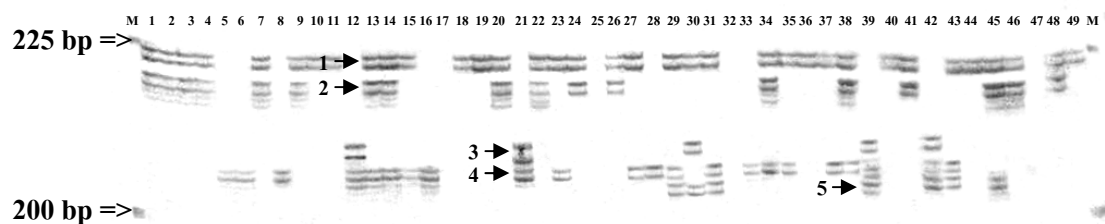
ตารางที่ 5 ชื่อไพรเมอร์ ลำดับเบสของไพรเมอร์ จำนวนเบส ชนิดและลักษณะของลำดับเบสซ้ำ ค่า GC content และค่า T_a

No.	ชื่อ	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'-3')	จำนวนเบส (คู่เบส)	ชนิด	ลำดับเบสซ้ำ	%GC	T_a (°C)
1.	DR02	F: GGACATAAAGAGAGCAGGG	19	imperfect	(GAGT) ₄ GT(GA) ₁₂ (TAGA) ₆	53.0	50
		R: ATATCCCACCTCCCCCTATC	20	compound repeat		59.0	
2.	DR06	F: GGCCAAAGACTCCTAGCTGA	20	perfect repeat	(AGG) ₂₅	55.0	45*
		R: CATCTCTCCCCATGCAACTT	20			50.0	
3.	DR12	F: AAGGCGGCATCGGCGAATG	19	imperfect	(AGG) ₁₃ GATA(GA) ₃	63.2	45
		R: CCTCCCCTTTCTCTCTATTCC	21	compound repeat	GT(GA) ₂ AAA(GA) ₄	52.4	
4.	DR26	F: CGATCTTTCACTCTCTCCATCAC	23	perfect repeat	(CT) ₁₈	47.8	57
		R: ACAAAGGGGAGAGAGCATGAG	22			50.0	

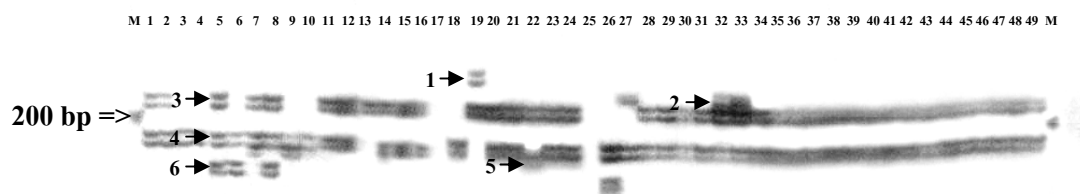
ตารางที่ 5 (ต่อ)

No.	ชื่อ	ลำดับเบสของไพรเมอร์ (5'-3')	จำนวนเบส (คู่เบส)	ชนิด	ลำดับเบสซ้ำ	%GC	T _a (°C)
5.	DR30	F: CTCTCCATCTTGCCATCCTC R: AGCTTGTGGGAAGGCTGG	20 19	imperfect repeat	(CT) ₃ TA(TC) ₃ TA(TC) ₃	55.0 63.2	57
6.	DR31	F: AGAGGGAGAGTGCAAGAG R: CGCTATTTCCATCCCTCC	18 18	perfect repeat	(GA) ₁₀	55.6 55.6	58*
7.	DR49	F: ACTTGGTGGTCGACGAGGTC R: GAGCAAGGGGAGGGATAGAG	20 20	imperfect compound repeat	(CCT) ₅ (CCA) ₂ (CCT) ₄ (CA) ₃ (CT) ₆ , (CT) ₇ , (CT) ₆ ATCTCA(CT) ₄	60.0 60.0	45
8.	DR67	F:CGATAACTATCTATATCCCCCTATCTC R: AGAGAGCAACAGGAGGAATG	27 20	imperfect repeat	(TC) ₃ T ₃ (CT) ₂ CATTCA (CT) ₆ AGA(TC) ₃	40.7 50.0	56

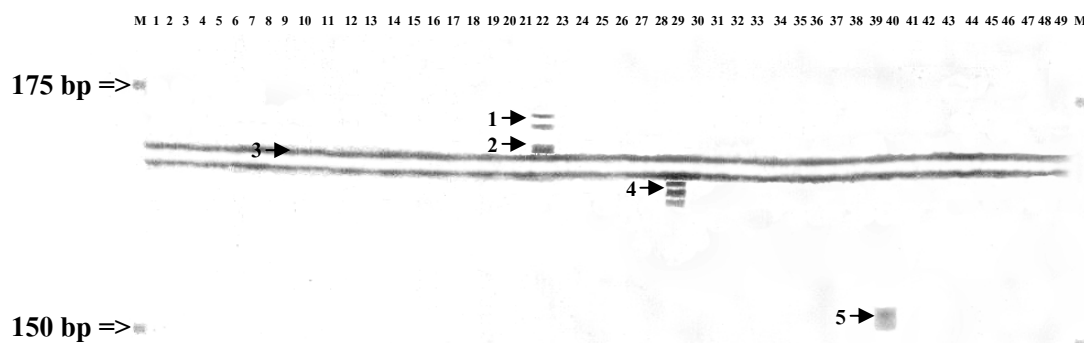
* หมายถึง การทำพีซีอาร์โดยใช้โปรแกรม touchdown PCR



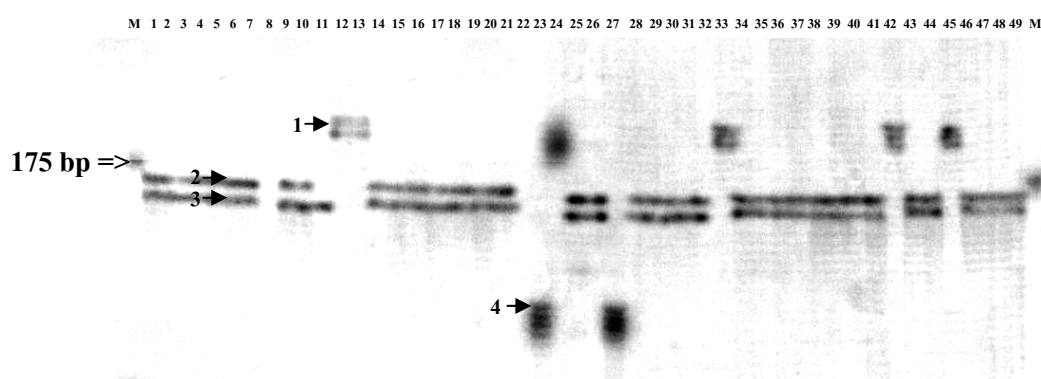
ภาพที่ 2 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR02 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 203-224 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ถูกศรชี้ คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 5 แอลลีล



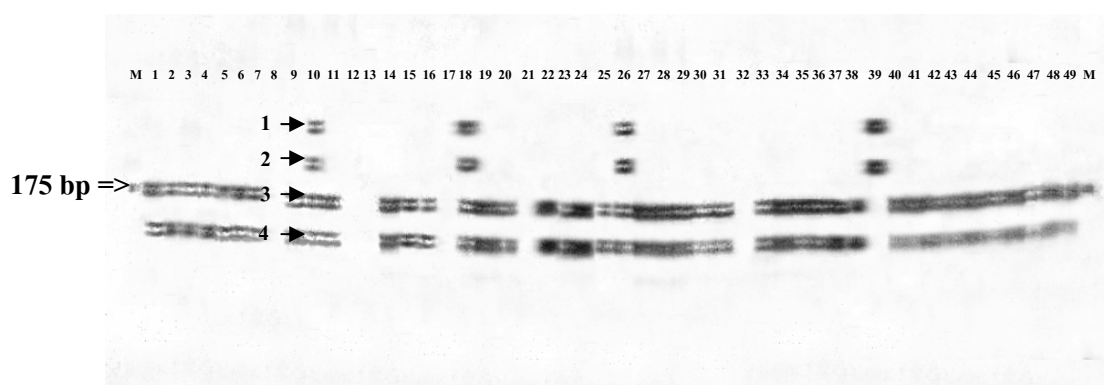
ภาพที่ 3 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR06 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 195-208 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ถูกศรชี้ คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 6 แอลลีล



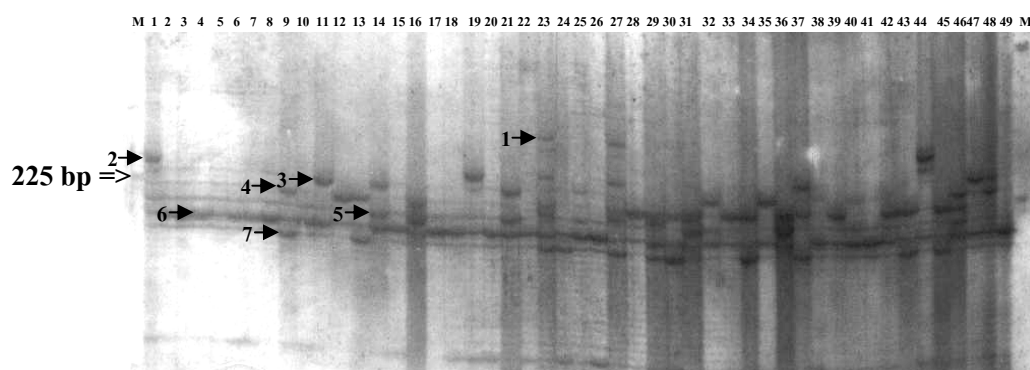
ภาพที่ 4 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR12 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 152-172 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ถูกครีชี คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 5 แอลลีล



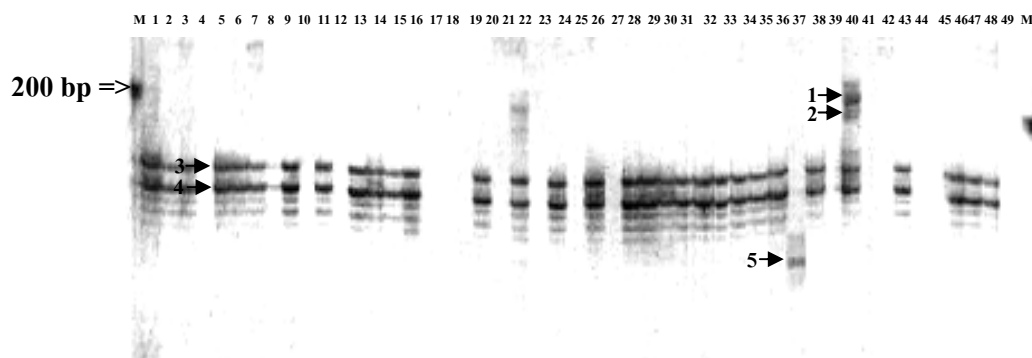
ภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR26 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 169-182 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ถูกครีชี คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 4 แอลลีล



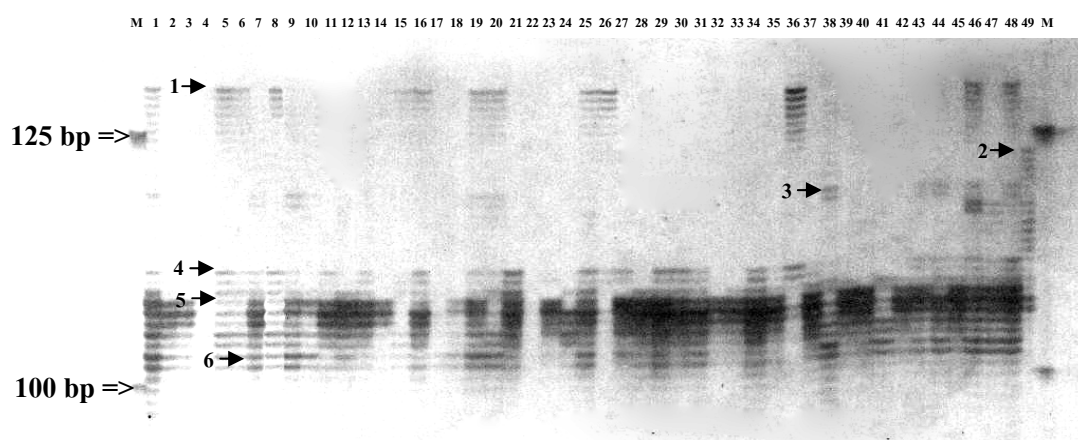
ภาพที่ 6 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR30 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 171-183 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ลูกศรชี้ คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 4 แอลลีล



ภาพที่ 7 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR31 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 219-230 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ลูกศรชี้ คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 7 แอลลีล



ภาพที่ 8 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR49 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 190-200 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ถูกครี คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 5 แอลลีล



ภาพที่ 9 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้โดยใช้ไพรเมอร์ DR67 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 104-129 คู่เบส [M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder, 1-49 คือ ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง] บริเวณที่ถูกครี คือ แอลลีลที่แตกต่างกันจำนวน 6 แอลลีล

จากไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 189 คู่ ที่นำมาทดสอบกับ genomic DNA ด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ โดยใช้อุณหภูมิ annealing อยู่ในช่วง 45-60 องศาเซลเซียส รวมถึงมีการปรับปริมาณ $MgCl_2$ เพื่อให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดเป็นไปตามที่คาดหมาย และให้ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอ สาเหตุที่ทำให้ไม่เกิดผลผลิตพีซีอาร์อาจเนื่องมาจากสภาวะในการทำปฏิกิริยาไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิและเวลาในการ annealing หรือปริมาณ $MgCl_2$ ไม่เหมาะสม ทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีจำนวนแถบดีเอ็นเอมากหรือมีลักษณะเป็น smear นอกจากการแก้ไขสภาวะในการทำพีซีอาร์แล้วยังพบว่าสามารถปรับปรุงปฏิกิริยาให้ดีขึ้นได้โดยการออกแบบไพรเมอร์ใหม่

จากการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ พบว่าแต่ละคู่ไพรเมอร์มีจำนวนแอลลีลแตกต่างกัน (ตารางที่ 6) โดยมีขนาดของแอลลีลอยู่ระหว่าง 104-230 คู่เบส มีจำนวนแอลลีลอยู่ระหว่าง 4-7 แอลลีล และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.25 แอลลีลต่อตำแหน่ง โดยไพรเมอร์ DR31 สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้จำนวนแอลลีลมากที่สุด 7 แอลลีล มีขนาดระหว่าง 219-230 คู่เบส และไพรเมอร์ DR26 และ DR30 ให้จำนวนแอลลีลได้น้อยที่สุดจำนวน 4 แอลลีล มีขนาดประมาณ 169-183 คู่เบส และพบว่ามีเกิด null alleles ในบางคู่ไพรเมอร์

ขนาดของแอลลีลที่ต่างกันอาจมีสาเหตุมาจากการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับเบสในบริเวณซ้ำและ/หรือบริเวณที่ขนานข้างไมโครแซทเทลไลต์ โดยมีกลไกที่ทำให้เกิดการกลายของลำดับเบสซ้ำ 2 กลไก คือ 1.) เกิด DNA slippage ระหว่างที่มีการจำลองดีเอ็นเอ (Tachida and Iizuka, 1992) 2.) เกิด recombination ระหว่างสายดีเอ็นเอ (DNA strands) โดย unequal crossing over หรือโดย gene conversion ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความยาวของลำดับเบสซ้ำ (Richard and Pâques, 2000) ประสิทธิภาพของกลไกที่ทำให้เกิดการกลายนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม และปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออัตราการกลายของลำดับเบสซ้ำ ได้แก่ ชนิดของลำดับเบสซ้ำ ขนาดของแอลลีล ตำแหน่งบนโครโมโซม ปริมาณของเบส G และ C ในบริเวณที่ขนานข้างไมโครแซทเทลไลต์ แบบของการแบ่งเซลล์ (ไมโทซิส หรือ ไมโอซิส) เพศ และจีโนไทป์ (Li *et al.*, 2002) ซึ่งจะส่งผลให้ขนาดขึ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำมีขนาดแตกต่างกัน ทำให้เกิดโพลิมอร์ฟิซึมของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

นอกจากนี้การกลายยังส่งผลให้ไม่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หรือเกิด null alleles อันเนื่องมาจาก 1.) การขาดหายไปของไมโครแซทเทลไลต์ที่ตำแหน่งดังกล่าว (Callen *et al.*, 1993) 2.) การกลายที่เกิดจากการเพิ่มขึ้น การขาดหายไป หรือการแทนที่คู่เบสในบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าไปจับ (Lehman *et al.*, 1996) ซึ่งพบในพืชหลายชนิด เช่น ในแอปเปิ้ล (Gianfranceschi *et al.*, 1998) ข้าว (Cho *et al.*, 2000) สตรอเบอรี่ (Sargent *et al.*, 2003) และอะโวคาโด (Ashwort *et al.*, 2004) เป็นต้น

จากการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ด้วยคู่ไพรเมอร์ทั้ง 8 คู่ นำผลที่ได้มาคำนวณค่า observed heterozygosity (H_o) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.0612-1.0000 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.7398 ส่วนค่า expected heterozygosity (H_e) หรือค่า Polymorphic Information Content (PIC) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.0788 ที่ตำแหน่ง DR12 ถึง 0.7323 ที่ตำแหน่ง DR06 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.5871 แสดงให้เห็นว่ายีนบนโครโมโซมอยู่ในสภาพ heterozygous ที่สูง อาจเนื่องมาจากการผสมข้ามภายในชนิดของกล้วยไม้สกุลหวาย ทำให้กล้วยไม้สกุลหวายมีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระหว่างต้นค่อนข้างสูง และส่วนใหญ่มีจำนวนชุดโครโมโซมมากกว่า 2 ชุด เมื่อทำการผสมเกสรจึงได้ต้นลูกผสมที่มีลักษณะแตกต่างกันออกไป และยังพบว่าในการทดลองนี้ค่า observed heterozygosity (H_o) ส่วนใหญ่สูงกว่าค่า expected heterozygosity (H_e) แสดงว่าสัดส่วนของ heterozygosity สูงกว่าที่ควร อาจเกิดจากการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าที่เป็นลูกผสมทั้งหมดจึงทำให้มีค่า observed heterozygosity (H_o) สูง และไม่สามารถนำไปเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นได้อย่างชัดเจน เนื่องจากใช้ตัวอย่างจำนวนน้อย และศึกษาเครื่องหมายเพียง 8 ตำแหน่งเท่านั้น

จำนวนแอลลีลที่พบมีค่าอยู่ระหว่าง 4-7 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.25 แอลลีลต่อตำแหน่ง ส่วนค่า effective number of allele (n_e) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 1.0855-3.7355 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.7850 แสดงให้เห็นว่าจำนวนแอลลีลที่มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างได้ดีมีน้อยกว่าจำนวนแอลลีลที่พบจริงค่อนข้างมาก ซึ่งจะสังเกตได้จากผลการตรวจสอบ มีตัวอย่างกล้วยไม้จำนวนมากที่มีจีโนไทป์ที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งเหมือนกัน อย่างไรก็ตามเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาได้จากการทดลองในครั้งนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบพันธุ์ ตรวจสอบลูกผสม จดทะเบียนพันธุ์ นำไปใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของกล้วยไม้สกุลหวาย และเป็นข้อมูลสำหรับการอนุรักษ์พันธุ์กรรมกล้วยไม้สกุลหวายต่อไป

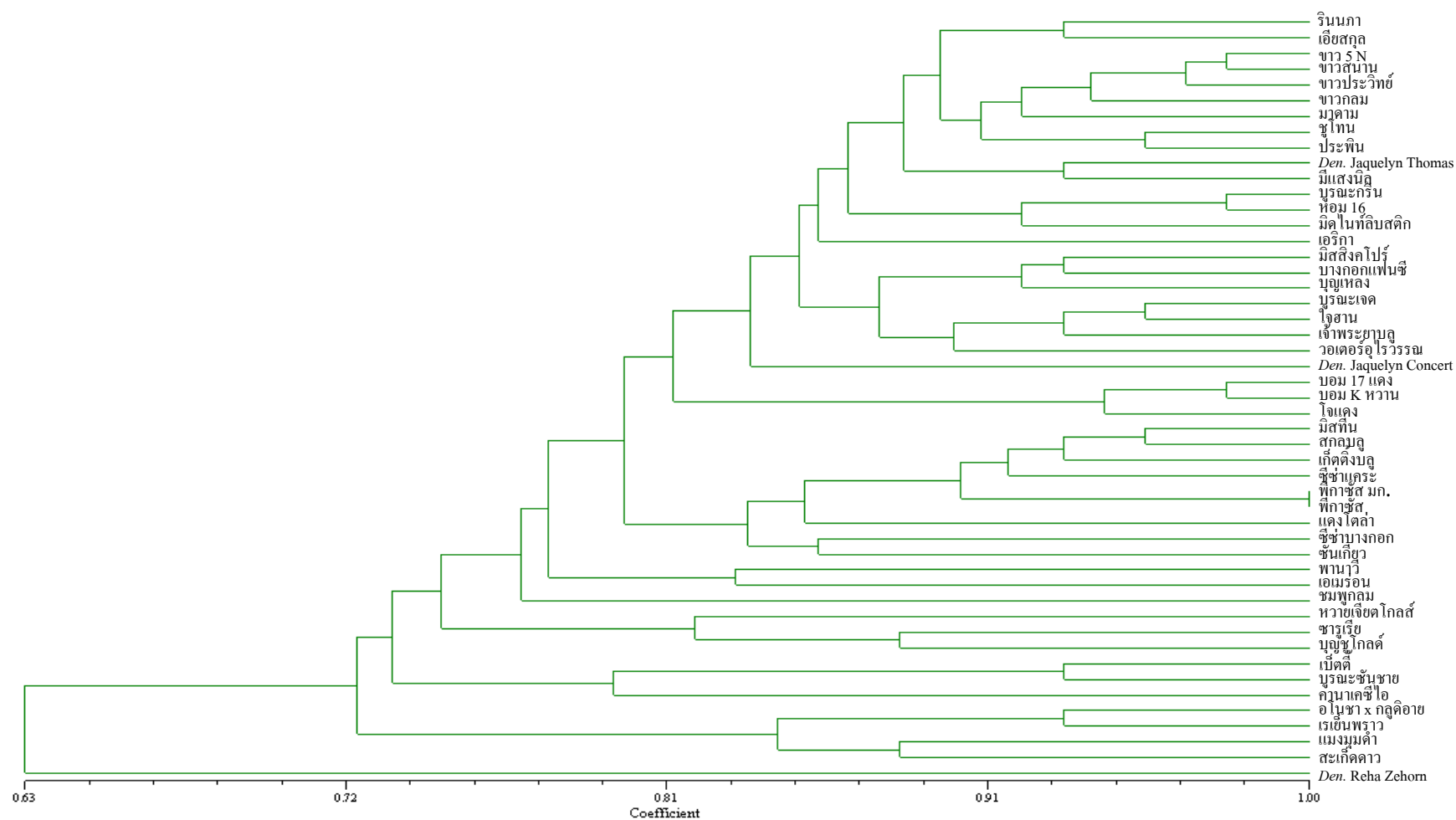
ตารางที่ 6 จำนวนแอลลีลต่อตำแหน่ง observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) และค่า effective number of allele (n_e) ที่ได้จากการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ต่าง ๆ

ตำแหน่งที่	ไพรเมอร์	ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส)	จำนวนแอลลีล	observed heterozygosity (H_o)	expected heterozygosity (H_e)	effective number of allele (n_e)
1	DR02	203-224	5	0.7045	0.7030	3.3664
2	DR06	195-208	6	0.8478	0.7323	3.7355
3	DR12	152-172	5	0.0612	0.0788	1.0855
4	DR26	169-182	4	0.8125	0.6351	2.7408
5	DR30	171-183	4	1.0000	0.5794	2.3777
6	DR31	219-230	7	0.7143	0.6680	3.0120
7	DR49	190-200	5	0.9697	0.5795	2.3781
8	DR67	104-129	6	0.8085	0.7209	3.5842
รวม			42	5.9185	4.6970	22.2802
เฉลี่ย			5.25	0.7398	0.5871	2.7850

3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.1m

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่างที่ตรวจสอบด้วยโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นจำนวน 8 กลุ่ม โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.1m (Rohlf, 1997) ใช้สูตรของ Nei and Li (1979) คำนวณค่าดัชนีความเหมือนและความแตกต่างของตัวอย่างที่ละคู่สลับกัน (similarity index) จนครบทุกตัวอย่าง (ตารางผนวกที่ 1) จากนั้นนำค่าที่ได้มาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA (Sokal and Sneath, 1973) พบว่าสามารถจัดกลุ่มแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในรูปแบบของ phylogenetic tree (ภาพที่ 10) แต่ไม่สามารถแบ่งกลุ่มกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าที่นำมาใช้ในการศึกษาได้อย่างชัดเจน โดยกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากประกอบด้วยรณินา เอียสกุล ขาว 5 N ขาวสนาน ขาวประวิทย์ ขาวกลม มาดาม ชูโตน ประพิน Den. Jaquelyn Thomas มีแสงนิล บุรณะกรีน หอม 16 มิดไนท์ลิสติก เอริกา มิสสิงคโปร์ บางกอก แฟนซี บุญหลง บุรณะเจด ใจฮาน เจ้าพระยาบลู วอเตอร์ลูไรวรรณ Den. Jaquelyn Concert บอม 17 แดง บอม K หวาน และโจแดง ส่วนพันธุ์ที่เหลือ คือ มิสทิน สกลบลู เกิดดิงบลู ซิซ่าแกระ พิกาชัส มก. พิกาชัส แดงโตล่า ซิซ่าบางกอก ชันเกี้ยว พานาวิ เอเมรอน ชมพูกลม หวายเจ็ดโกลด์ ชารูเรีย บุญชูโกลด์ เบ็ตตี้ บุรณะชันชาย คานาเคซีโอ อโนชา x กลุคิอาเย เรเย่นพราว แมงมุมดำ และสะเก็ด ดาวมีความสัมพันธ์น้อยลงเป็นลำดับ โดยมีพันธุ์ Den. Reha Zehorn ซึ่งเป็นลูกผสมพันธุ์ใหม่เกิดจากคู่ผสมระหว่าง Den. Circe กับ Den. Blue Pacific (จิตราพรรณ, ติดต่อกับการส่วนตัว) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับพันธุ์อื่นน้อยที่สุด

ส่วนพันธุ์ที่เป็นพันธุ์เดียวกัน แต่มาจากแหล่งปลูกที่ต่างกัน เช่น พันธุ์พิกาชัส มก. และพันธุ์พิกาชัส พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน อาจเป็นเพราะใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในการตรวจสอบจำนวนน้อยเพียง 8 ตำแหน่งเท่านั้น ต้องทำการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพิ่มเติม



ภาพที่ 10 การจัดกลุ่มของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าจำนวน 49 ตัวอย่าง เพื่อแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในรูปแบบของ phylogenetic tree โดยการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.1m

สรุปผลการทดลอง

1. จากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับกล้วยไม้สกุลหวายด้วยวิธี SSR enrichment โดยสร้างห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ *MseI* หรือ *TaqI* จากนั้นเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ตัดแล้วกับ adapter และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ แยกลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์โดยนำสารละลายดีเอ็นเอมาทำไฮบริไดเซชันกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์ที่ติดฉลากที่ปลาย 5' ด้วยไบโอติน (Biotinylated oligo) จึงสามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่เกาะกับโพรบได้เมื่อทำปฏิกิริยากับ streptavidin ที่เคลือบอยู่บน magnetic beads นำลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ที่แยกได้มาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ จากนั้นเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับพลาสติก และถ่ายพลาสติก ถูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีทรานสฟอร์มเมชัน พบว่าห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* สามารถตรวจสอบโคลนที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 43 โคลนจาก 168 โคลน คิดเป็น 26 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* สามารถตรวจสอบโคลนที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 152 โคลนจาก 169 โคลน คิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์

2. เมื่อนำโคลนทั้งหมดที่มีลำดับเบสซ้ำมาจำแนกออกเป็นกลุ่ม ๆ พบกลุ่มที่มีลำดับเบสซ้ำ 2 เบสติดต่อกัน (dinucleotide repeats) มี 2 ชนิด คือ การเรียงตัวซ้ำกันของเบสชนิด (GA)_n (50%) และ (CA)_n (0.6%) ส่วนกลุ่มที่มีลำดับเบสซ้ำ 3 เบสซ้ำติดต่อกัน (trinucleotide repeats) พบเพียง 2 ชนิด คือ CCT/AGG (22.8%) และ GAT/ATC (0.6%) ส่วนการเรียงตัวซ้ำกันของเบสชนิด ACC/GGT และ ATCT/AGAT จะปรากฏร่วมกับการเรียงตัวซ้ำกันของเบสชนิดอื่นใน compound repeat

3. สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 73 คู่ โดย 10 คู่แรกได้จากห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* อีก 63 คู่ได้จากห้องสมุดจีโนมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดเป็นไปตามที่คาดหมายและทำให้เกิดโพลิมอร์ฟิซึมจำนวน 8 คู่ ได้แก่ DR02, DR06, DR12, DR26, DR30, DR31, DR49 และ DR67 โดยมีขนาดของแอลลีลระหว่าง 104-230 คู่เบส มีจำนวนแอลลีลอยู่ระหว่าง 4-7 แอลลีล และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.25 แอลลีลต่อตำแหน่ง

4. เมื่อนำข้อมูลจากการตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้ทั้งหมดมาคำนวณค่า observed heterozygosity (H_o) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.0612-1.0000 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.7398 ค่า expected heterozygosity (H_e) มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0788-0.7323 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.5871 ส่วนค่า effective number of allele (n_e) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 1.0855-3.7355 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.7850

5. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.1m พบว่าไม่สามารถแบ่งกลุ่มกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์การค้าที่นำมาใช้ในการศึกษาได้อย่างชัดเจน และพบว่า *Den. Reha Zehorn* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับพันธุ์อื่นน้อยที่สุด

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมศุลกากร. 2547. ข้อมูลส่งออกดอกและต้นกล้วยไม้. กระทรวงพาณิชย์, กรุงเทพฯ.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2546. ข้อมูลการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ครรชิต ธรรมศิริ. 2547. เทคโนโลยีการผลิตกล้วยไม้. บมจ. อัมรินทร์พรินต์ติ้งเอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

จุลภาค คุ่นวงศ์, ทิพวัลย์ อยู่ชา, พนิดา ฐาตุจิรางค์กุล และ นิฐพร คุ่นวงศ์. 2548. การสร้างดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SSLP ของกล้วยไม้สกุลหวาย, น. 1-7. ใน การประชุมประจำปี สวทช. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, ปทุมธานี.

ณัฏยา ศรีสวัสดิ์. 2545. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมะเขือเทศโดยการใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เต็ม สมิตินันท์. 2510. วงศ์กล้วยไม้. พิมพ์เป็นอนุสรณ์ในงานพระราชทานเพลิงศพอำมาตย์โท พระวิจารณ์ธนากร (ต่วน สมิตินันท์). โรงพิมพ์ท่าพระจันทร์, กรุงเทพฯ.

บรรณ บุรณะชนบท. 2534. กล้วยไม้สกุลหวาย. ฐานเกษตรกรรม, กรุงเทพฯ.

ประเดิม วนิชชนานันท์. 2543. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีหมวด *Brachypetalum* ด้วยเทคนิค RAPD. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปรีชา ประเทพา และ ปิยะวรา มีชัยโย. 2548. ลักษณะโมเลกุลของไมโครแซทเทลไลต์อาร์เอ็ม 17 ในพันธุ์ข้าวหอมและไม้อ่อนของไทย, น. 387-392. ใน การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 14. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

มาลินี อนุพันธ์สกุล. 2542. กล้วยไม้. สำนักพิมพ์เกษตรบุ๊คพับลิเคชั่น, นนทบุรี.

ระพี ศาคริก. 2530. กล้วยไม้. สำนักพิมพ์ช่อนนทรี, กรุงเทพฯ.

วิชัย บุญแสง, อัญชลี ทัศนาวจร, ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์, นุสรา สิทธิคิดรัตน์ และ สกกล พันธุ์ยิ้ม. 2541. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ...จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

สถาบันพัฒนาวิสาหกิจขนาดกลางและขนาดย่อม. 2548. ธุรกิจกล้วยไม้ส่งออก. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, ปทุมธานี.

สลิล สิทธิสังขธรรม และ นฤมล กฤษณชาญดี. 2545. คู่มือกล้วยไม้. สำนักพิมพ์สารคดี, กรุงเทพฯ.

ลำอานงค์ เนตรนารี. 2548. กล้วยไม้. อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์. 2543. สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 6 กล้วยไม้ไทย. องค์การสวนพฤกษศาสตร์ สำนักนายกรัฐมนตรี, เชียงใหม่.

สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, จีรัตน์ มงคลศิริวัฒนา, พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์, นิสารัตน์ ลิ้มสลักเพชร, ศิรินรัตน์ วรรณภินพงศ์ และ เอกรัฐ หิตโกเมท. 2548. การตรวจดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายโดย PCR-RFLP, น. 408-413. ใน การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 14. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ.

อรรรัตน์ มงคลพร. 2543. การสร้าง **microsatellite marker** สำหรับพริก. สถาบันวิจัยและพัฒนา
แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Aggarwal, R. K., T. P. Velavan, D. Udaykumar, P.S. Hendre, K. Shanker, B. C. Choudhury and
L. Singh. 2004. Development and characterization of novel microsatellite markers from
the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*). **Mol. Ecol. Notes** 4: 77-79.

Archie, E.A., C.J. Moss, and S.C. Alberts. 2003. Characterization of tetranucleotide
microsatellite loci in the African savannah elephant (*Loxodonta africana africana*). **Mol.
Ecol. Notes** 3: 244-246.

Ashwort, V.E.T.M., M.C. Kobayashi, M.D.L. Cruz and M.T. Clegg. 2004. Microsatellite
markers in avocado (*Persea Americana* Mill.): development of dinucleotide and
trinucleotide markers. **Scientia Hort.** 101: 255-267.

Baruah, A., V. Naik, P. S. Hendre, R. Rajkumar, P. Rajendrakumar and R.K. Aggarwal. 2003.
Isolation and characterization of nine microsatellites markers from *Coffea arabica* L.,
showing wide cross-species amplification. **Mol. Ecol. Notes** 3: 647-650.

Benner, M.S., M.D. Braunstein and M.U. Weisberg. 1995. Detection of DNA polymorphisms
within the genus *Cattleya* (Orchidaceae). **Plant Mol. Biol. Rept.** 13: 147-155.

Bertini, C.H.C.M., I. Schuster, T. Sedyama, E.G. Barros and M.A. Moreira. 2006.
Characterization and genetic diversity analysis of cotton cultivars using microsatellites.
Genet. Mol. Biol. 29: 321-329.

Bhatramakki, D., J. Dong, A.K. Chhabra and G.E. Hart. 2000. An integrated SSR and RFLP
linkage map of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Genome** 43: 988-1002.

- Bouhadida, M., A.M. Casas, M.A. Moreno and Y. Gogorcena. 2007. Molecular characterization of miraflores peach variety and relatives using SSRs. **Scientia Hort.** 111: 140-145.
- Callen, D.F., A.D. Thompson, Y. Shen, H. A. Phillips, R. I. Richards, J. C. Mulley and G. R. Sutherland. 1993. Incidence and origin of null alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **Am. J. Hum. Genet.** 52: 922-927.
- Chagué, V., T. Fahima, A. Dahan, G.L. Sun, A.B. Korol, Y.I. Ronin, A. Grama, M.S. Röder, and E. Nevo. 1999. Isolation of microsatellite and RAPD markers flanking the *Yr15* gene of wheat using NILs and bulked segregant analysis. **Genome** 42: 1050-1056.
- Chambers, G.K. and E.S. MacAvoy. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. **Comp. Biochem. Physiol.** 126: 455-476.
- Che, K.P., Q.C. Zhan, Q.H. Xing, Z.P. Wang, D.M. Jin, D.J. He and B. Wang. 2003. Tagging and mapping of rice sheath blight resistant gene. **Theor. Appl. Genet.** 106: 293-297.
- Chen, X., S.H. Lim, S.M. Wong, Y.H. Lee, J. Kuo, T.W. Yam and J.J. Lin. 1999. Amplified fragment length polymorphism analysis of Vandaceous orchids. **Plant Sci.** 141: 183-189.
- Chen, X.M., Y.H. Lou, X.C. Xai, L.Q. Xai, X. Chen, Z.L. Ren and J.Z. Jia. 2005. Chromosomal location of powdery mildew resistance gene *Pm16* in wheat using SSR marker analysis. **Plant Breed.** 124: 225-228.
- Cho, Y.G., S. Temnykh, X. Chen, L. Lipovich, S.R. McCouch, N. Ayres and S. Cartinhour. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). **Theor. Appl. Genet.** 100: 713-722.

- Compbell, 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). **Cons. Genet.** 3: 209-210.
- Cordeiro, G.M., Y.B. Pan and R.J. Henry. 2003. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. **Plant Sci.** 165: 181-189.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Mol. Biol. Rept.** 1: 19-21.
- Demirbas, A., B.G. Rector, D.G. Lohnes, R.J. Fioritto, G.L. Graef, P.B. Cregan, R.C. Shoemaker and J.E. Specht. 2001. Simple sequence repeat markers linked to the soybean *Rps* genes for phytophthora resistance. **Crop Sci.** 41: 1220-1227.
- Dubouzet, J.G., N. Murata and K. Shinada. 1998. Relationships among some cultivated species and varieties of *Alstroemeria* L. base on RAPD analysis. **Scientia Hort.** 73: 37-44.
- Dressler, R.L. 1981. **The Orchids, Natural History and Classification.** Harward Univ. Press, Massachusetts.
- Fahima, T., M.S. Röder, A. Grama and E. Nevo. 1998. Microsatellite DNA polymorphism divergence in *Triticum dicoccoides* accessions highly resistant to yellow rust. **Theor. Appl. Genet.** 96: 187-195.
- Freeman, S., J. West, C. James, V. Lea and S. Mayes. 2004. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellites in tea (*Camellia sinensis*). **Mol. Ecol. Notes** 4: 324-326.

- Gaitán-Solís, E., M.C. Duque, K.J. Edwards and J. Tohme. 2002. Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* spp. **Crop Sci.** 42: 2128-2136.
- Genger, R.K., K.J. Williams, H. Raman, B.J. Read, H. Wallwork, J.J. Burdon and A.H.D. Brown. 2003. Leaf scald resistance genes in *Hordeum vulgare* and *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*: parallels between cultivated and wild barley. **Aus. J. Agr. Res.** 54: 1335-1342.
- Gianfranceschi, L., N. Seglias, R. Tarchini, M. Komjanc and C. Gessler. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. **Theor. Appl. Genet.** 96: 1069-1076.
- Gupta, P.K., H.S. Balyan, K.J. Edwards, P. Isaac, V. Korzum, M. Röder, M.-F. Gautier, P. Joudrier, A.R. Schlatter, S. Dubcovsky, R.C. De la Pena, M. Khairallah, G. Penner, M.J. Hayden, P. Sharp, B. Keller, R.C.C. Wang, J.P. Hardouin, P. Jack and P. Leroy. 2002. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. **Theor. Appl. Genet.** 105: 413-422.
- Gur-Arie, R., C.J. Cohen, Y. Eitan, L. Shelef, E.M. Hallerman and Y. Kashi. 2000. Simple sequence repeats in *Escherichia coli*: abundance, distribution, composition, and polymorphism. **Genome Res.** 10: 62-71.
- Gustafsson S. and P.A. Thorén. 2001. Microsatellite loci in *Gymnadenia conopsea*, the fragrant orchid. **Mol. Ecol. Notes** 1: 81-82.
- Hamilton, M.B., E.L. Pincus, A. Di-Fiore and R.C. Fleischer. 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. **Biotechniques** 27: 500-507.

- Hamwieh, A., S.M. Udupa, W. Choumane, A. Sarker, F. Dreyer, C. Jung and M. Baum. 2005. A genetic linkage map of *Lens* sp. based on microsatellite and AFLP markers and the localization of fusarium vascular wilt resistance. **Theor. Appl. Genet.** 110: 669-677.
- He, G., R. Meng, M. Newman, G. Gao, R.N. Pittman and C.S. Prakash. 2003. Microsatellite as DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). **BMC Plant Biol.** 3(3): 1-6.
- Hedrick, P.W. 1985. **Genetics of populations.** Jones and Bartlett Publ Inc, Boston, Massachusetts.
- Iamartino, D., A. Bruzzone, A. Lanza, M. Blasi and F. Pilla. 2005. Genetic diversity of southern italian goat populations assessed by microsatellite markers. **Small Ruminant Res.** 57: 249-255.
- Iwata H., A. Konuma and Y. Tsumura. 2000. Development of microsatellite markers in the tropical tree *Neobalanocarpus heimii* (Dipterocarpaceae). **Mol. Ecol.** 9: 1684-1685.
- Joshi, K., P. Chavan, D. Warude and B. Patwardhan. 2004. Molecular markers in herbal drug technology. **Curr. Sci.** 87: 159-165.
- Julier, B., S. Flajoulot, P. Barre, G. Cardinet, S. Santoni, T. Huguet and C. Huyghe. 2003. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. **BMC Plant Biol.** 3(9): 1-19.
- Kadirvel, P., M. Maheswaran and K. Gunathilagaraj. 2003. Detection of simple sequence repeat markers associated with resistance to whitebacked planthopper, *Sogatella furcifera* (Horvath), in rice. **Plant Breed.** 28: 22-23.

- Keeney, D.B. and E.J. Heist. 2003. Characterization of microsatellite loci isolated from the blacktip shark and their utility in requiem and hammerhead sharks. **Mol. Ecol. Notes** 3: 501-504.
- Kimpara, T., A. Takeda, K. Watanabe, Y. Itoyama, S. Ikawa, M.W.H. Arai, H. Sasaki, S. Higuchi, N. Okita, S. Takase, H. Saito, K. Takahashi and S. Shibahara. 1997. Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with alzheimer and parkinson disease. **Hum. Genet.** 100: 145-147.
- Köllicker, R., E.S. Jones, M.C. Drayton, M.P. Dupal and J.W. Forster. 2001. Development and characterisation of simple sequence repeat (SSR) markers for white clover (*Trifolium repens* L.). **Theor. Appl. Genet.** 102: 416-424.
- Korzun, V., M.S. Röder, A.J. Warland and A. Börner. 1997. Intrachromosomal mapping of the genes for dwarfing (*Rht12*) and vernalisation response (*Vrn1*) in wheat by using RFLP and microsatellite markers. **Plant Breed.** 116: 227-232.
- _____, _____, _____, M.W. Ganal and C.N. Law. 1998. Genetic analysis of the dwarfing gene *Rht8* in wheat. Part1. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theor. Appl. Genet.** 96: 1104-1109.
- Lavarack, B., W. Harris and G. Stocker. 2000. **Dendrobium and Its Relatives**. Timber Press, Portland.
- Laws, N. 1995. Cut orchids in the world market. **Floraculture Int.** 5(12): 12-15.
- Lehman, T., W.A. Hawley and F.H. Collins. 1996. An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. **Genetics** 144: 1155-1163.

- Li, F., G. Hu, Y. Fu, H. Si, X. Bai and Z. Sun. 2005. Genetic analysis and high-resolution mapping of a premature senescence gene *Pse(t)* in rice (*Oryza sativa* L.). **Genome** 48: 738-746.
- Li, M., X. Zheng, Y. Zhu, X. Wang, S. Liang, L. Li and X. Wu. 2006. Development and characterization of SSR markers in lychee (*Litchi chinensis*). **Mol. Ecol. Notes** 6: 1205-1207.
- Li, T.X., J.K. Wang, Y.F. Bai, X.D. Sun and Z. Lu. 2004. A novel method for screening species-specific gDNA probes for species identification. **Nucl. Acid Res.** 32: 1-8.
- Li, Y.C., A.B. Korol, T. Fahima, A. Beiles and E. Nevo. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Mol. Ecol.** 11: 2453-2465.
- Lim, A., G.H. Yue, C.L. Lim-Ho and Y. Hong. 2006. **Development and characterization of microsatellite in *Vanda* varieties.** Mol. Ecol. Notes. Available Source: <http://www.Blackwell-synergy.com/doi/pdf/10.1111/j.1471.8286.2006.0618.x>, January 20, 2007.
- Lim, S.H., P.C.P. Teng, Y.H. Lee and C.J. Goh. 1999. RAPD Analysis of some species in the Genus *Vanda* (Orchidaceae). **Ann. Bot.** 83: 193-196.
- Litt, M. and J.A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.** 44: 397-401.
- Masojc, P. 2002. The application of molecular markers in the process of selection. **Cell. Mol. Biol. Lett.** 7: 499-509.

- Matos, M., M.V. Camacho, V. Pérez-Flores, B. Pernaute, O. Pinto-Carnide and C. Benito. 2005. A new aluminum tolerance gene located on rye chromosome arm 7RS. **Theor. Appl. Genet.** 111: 360-369.
- Mba, R.E.C., P. Stephenson, K. Edwards, S. Melzer, J. Nkumbira, U. Gullberg, K. Apel, M. Gale, J. Tohme and M. Fregene. 2001. Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. **Theor. Appl. Genet.** 102: 21-31.
- McCartney, C.A., D.J. Somers, B.D. McCallum, J. Thomas, D.G. Humphreys, J.G. Menzies and P.D. Brown. 2005. Microsatellite tagging of the leaf rust resistance gene *Lr16* on wheat chromosome 2BSc. **Mol. Breed.** 15: 329-337.
- McCouch, S.R., L. Teytelman, Y. Xu, K.B. Lobos, K. Clare, M. Walton, B. Fu, R. Maghirang, Z. Li, Y. Xing, O. Zhang, I. Kono, M. Yano, R. Fjellstrom, G. DeClerck, D. Schneider, S. Cartinhour, D. Ware and L. Stein. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). **DNA Res.** 9: 199-207.
- Meerow, A.W., R.J. Wissner, J.S. Brown, D.N. Kuhn, R.J. Schnell and T.K. Broschat. 2003. Analysis of genetic diversity and population structure within Florida coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm using microsatellite DNA, with special emphasis on the Fiji Dwarf cultivar. **Theor. Appl. Genet.** 106: 715-726.
- Milbourne, D. and J. Russell. 1998. **Comparison of molecular marker assays in inbreeding (barley) and outbreeding (potato) species.** Molecular tools for screening biodiversity. Chapman and Hall, London, England.
- Miller, C.A., A. Altinkut and N.L.V. Lapitan. 2001. A microsatellite marker for tagging *Dn2*, a wheat gene conferring resistance to the russian wheat aphid. **Crop Sci.** 41: 1584-1589.

- Mitas, M. 1997. Trinucleotide repeats associated with human disease. **Nucl. Acid Res.** 25: 2245-2253.
- Mnejja, M., J. Garcia-Mas, W. Howad, M.L. Badenes and P. Arús. 2004. Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond. **Mol. Ecol. Notes** 4: 163-166.
- Moretzsohn, M.C., M.S. Hopkins, S.E. Mitchell, S. Kresovich, J.F.M. Valls and M.E. Ferreira. 2004. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. **BMC Plant Biol.** 4(11): 1-10.
- Morgante, M., M. Hanafer and W. Powell. 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nat. Genet.** 30: 194-200.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics** 89: 583-590.
- Obert, D.E., A.K. Fritz and J.L. Moran. 2005. Identification and molecular tagging of a gene from PI 289824 conferring resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*) in wheat. **Theor. Appl. Genet.** 110: 1439-1444.
- Padmaja, K.L., N. Arumugam, V. Gupta, A. Mukhopadhyay, Y.S. Sodhi, D. Pental and A.K. Pradhan. 2005. Mapping and tagging of seed coat colour and the identification of microsatellite markers for marker-assisted manipulation of the trait in *Brassica juncea*. **Theor. Appl. Genet.** 111: 8-14.
- Pal, N., J.S. Sandhu, L.L. Domier and F.L. Kolb. 2002. Development and characterization of microsatellite and RFLP-derived PCR markers in oat. **Crop Sci.** 42: 912-918.

- Paniego, N., M. Echaide, M. Muñoz, L. Fernández, S. Torales, P. Faccio, I. Fuxan, M. Carrera, R. Zandomeni, E.Y. Suárez and H.E. Hopp. 2002. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Genome** 45: 34-43.
- Pellegrino, G., D.Cafasso, A. Widmer, M. Solina, 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.
- Peng, J.H., T. Fahima, M.S. Röder, Y.C. Li, A. Dahan, A. Grama, Y.I. Ronin, A.B. Korol and E. Nevo. 1999. Microsatellite tagging of the stripe-rust resistance gene *YrH52* derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, and suggestive negative crossover interference on chromosome 1B. **Theor. Appl. Genet.** 98: 862-872
- Phansak, P., P.W.J. Taylor and O. Mongkolporn. 2005. Genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) and related *Vigna* species using sequence tagged microsatellite site analysis. **Scientia Hort.** 106: 137-146.
- 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.
- Pongsomboon, S., V. Whan, S.S. Moore and A. Tassanakajon. 2000. Characterization of tri- and tetranucleotide microsatellites in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. **Sci. Asia** 26: 1-8.
- Pridgeon, A.M., P.J. Cribb, M.A. Chase and F. Rasmussen. 1999. **Genera Orchidacearum 1 - Apostasioideae and Cypripedioideae**. Oxford Univ. Press. Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Taxonomy_of_the_Orchid_family, Dec 11, 2006.

_____, _____, _____ and _____. 2003. **Genera Orchidacearum 3 - Orchidoideae (Part 2), Vanilloideae**. Oxford Univ. Press. Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Taxonomy_of_the_Orchid_family, Dec 11, 2006.

_____, _____, _____ and _____. 2006. **Genera Orchidacearum 4 - Epidendroideae (Part 1)**. Oxford Univ. Press. Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Taxonomy_of_the_Orchid_family, Dec 11, 2006.

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.

Rajapakse, S., D.H. Byrne, L. Zhang, N. Anderson, K. Arumuganathan and R.E. Ballard. 2001. Two genetic linkage maps of tetraploid roses. **Theor. Appl. Genet.** 103: 575-583.

Rakoczy-Trojanowska, M. and H. Bolibok. 2004. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cell. Mol. Biol. Lett.** 9(2): 221-238.

Raman, H., A. Karakousis, J.S. Moroni, R. Raman, B.J. Read, D.F. Garvin, L.V. Kochian and M.E. Sorrells. 2003. Development and allele diversity of microsatellite markers linked to the aluminium tolerance gene *Alp* in barley. **Aust. J. Agr. Res.** 54: 1315-1321.

Ramsay, L., M. Macaulay, S. Ivanissevich, K. MacLean, L. Cardle, J. Fuller, K.J. Edwards, S. Tuveesson, M. Morgante, A. Massari, E. Maestri, N. Marmioli, T. Sjakste, M. Ganai, W. Powell and R. Waugh. 2000. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. **Genetics** 156: 1997-2005.

Rao, K.K., K.K. Jena and M.L. Narasu. 2003. Molecular tagging of a new bacterial blight resistance gene in rice using RAPD and SSR markers. **Plant Breed.** 28: 16-17.

- Rasmussen, F.N., A.M. Pridgeon, P.J. Cribb and M.A. Chase. 2001. **Genera Orchidacearum 2 - Orchidoideae (Part 1)**. Oxford Univ. Press. Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/Taxonomy_of_the_Orchid_family, Dec 11, 2006.
- Reddy, O.U.K., A.E. Pepper, I. Abdurakhmonov, S. Saha, J.N. Jenkins, T. Brooks, Y. Bolek and K.M. El-Zik. 2001. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research. **J. Cotton Sci.** 5: 103-113.
- Richard G.F. and F. Pâques. 2000. Mini- and microsatellite expansions: the recombination connection. **EMBO Rept.** 11: 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 Biol.** 4(9): 1-14.
- Röder, M.S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy and M.W. Ganal. 1998. A microsatellite map of wheat. **Genetics** 149: 2007-2023.
- 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(23): 1-12.
- Roy, C. B., M. A. Nazeer and T. Saha. 2004. Identification of simple sequence repeats in rubber (*Hevea brasiliensis*). **Curr. Sci.** 87: 807-811.
- Sargent, D.J., A.M. Hadonou and D.W. Simpson. 2003. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers from *Fragaria viridis*, a wild diploid strawberry. **Mol. Ecol. Notes** 3: 550-552.

- Schnurbusch, T., E. Bossolini, M. Messmer and B. Keller. 2004. Tagging and validation of a major quantitative trait locus for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in winter wheat cultivar Forno. **Phytopathology** 94: 1036-1041.
- Sharma, I.K., D.L. Jones, A.G. Young and C.J. French. 2001. Genetic diversity and phylogenetic relatedness among six endemic *Pterosylis* species (Orchidaceae: series *Grandiflorae*) of Western Australia, as revealed by allozyme polymorphisms. **Biochem. Syst. Ecol.** 29: 697-710.
- Sereno, M.L., P.S.B. Albuquerque, R. Vencovsky and A. Figueira. 2006. Genetic diversity and natural population structure of cacao (*Theobroma cacao* L.) from the Brazilian Amazon evaluated by microsatellite markers. **Cons. Genet.** 7: 13-24.
- Sethy, N.K., B. Shokeen, K.J. Edwards and S. Bhatia. 2006. Development of microsatellite markers and analysis of intraspecific genetic variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Theor. Appl. Genet.** 112: 1416-1428.
- Shuttleworth, F.S., H.S. Zim and G.W. Dillon. 1970. **Orchids**. Golden Press. New York.
- Silva, G.F., J.B. Santos and M.A.P. Ramalho. 2003. Identification of SSR and RAPD markers linked to a resistance allele for angular leaf spot in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) line ESAL 550. **Genet. Mol. Biol.** 26: 459-463.
- Squirrell, J., P.M. Hollingsworth, M. Woodhead, J. Russell, A.J. Lowe, M. Gibby and W. Powell. 2003. How much effort is required to isolate nuclear microsatellites from plants?. **Mol. Ecol.** 12: 1339-1348.
- Stajner, N., J. Jakse, P. Kozjak and B. Javornik. 2005. The isolation and characterisation of microsatellites in hop (*Humulus lupulus* L.). **Plant Sci.** 168: 213-221.

- Steane, D.A., R.E. Vallincourt, J. Russell, W. Powell, D.F. Marshall and B.M. Potts. 2001. Development and characterization of microsatellite loci in *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). **Silvae Genet.** 50: 89-91.
- Suenaga, K., R.P. Singh and H.M. Manilal. 2001. **Tagging of slow rusting genes for leaf rust, *Lr34* and *Lr46*, using microsatellite markers in wheat.** Available Source: <http://ss.jircas.affrc.go.jp/english/publication/highlights/2001/pdf/2001-04.pdf>, Feb 1, 2007.
- Sugaya, T., T. Takeuchi, H. Yoshimaru and M. Katsuta. 2002. Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Kandelia candel* (L.) Druce. **Mol. Ecol. Notes** 2: 65-66.
- Sun, M. and K.C. Wong. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using RAPD and allozyme markers. **Am. J. Bot.** 88: 2180-2188.
- Sun, Q., Y. Wei, Z. Ni, C. Xie and T. Yang. 2002. Microsatellite marker for yellow rust resistance gene *Yr5* in wheat introgressed from spelt wheat. **Plant Breed.** 121: 539-541.
- Symonds, V.V. and A.M. Lloyd. 2003. An Analysis of microsatellite loci in *Arabidopsis thaliana*: mutational dynamics and application. **Genetics** 165: 1475-1488.
- Tachida, H. and M. Iizuka. 1992. Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. **Genetics** 131: 471-478.
- Tan, X.L., Y.L. Tan, Y.H. Zhao, X.M. Zhang, R.K. Hong, S.L. Jin, X.R. Liu, and D.J. Huang. 2004. Identification of the *Rf* gene conferring fertility restoration of the CMS Dian-type 1 in rice by using simple sequence repeat markers and advanced inbred lines of restorer and maintainer. **Plant Breed.** 123: 338-341.

- Tang, B., Y.H. Huang, L. Lin, X.X. Hu, J.D. Feng, P. Yao, L. Zhang and N. Li. 2003. Isolation and characterization of 70 novel microsatellite markers from ostrich (*Struthio camelus*) genome. **Genome** 46: 833-840.
- Tsai, C.C., C.I. Peng, S.C. Huang, P.L. Huang and C.H. Chou. 2004. Determination of the genetic relationship of *Dendrobium* species (Orchidaceae) in Taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. **Scientia Hort.** 101: 315-325.
- Vikal, Y., P. Chhuneja, R. Singh and H.S. Dhaliwal. 2004. Tagging of an *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr* 28 with a microsatellite marker in wheat. **J. Plant Biochem. Biotechnol.** 13: 47-49.
- Wang, X.W., A. Kaga, N. Tomooka and D.A. Vaughan. 2004. The development of SSR markers by a new method in plants and their application to gene flow studies in azuki bean [*Vigna angularis* (Willd) Ohwi & Ohashi]. **Theor. Appl. Genet.** 109: 352-360.
- Wang, Y., J. Luo, X. Xue, H. Korpelainen and C. Li. 2005. Diversity of microsatellite markers in the populations of *Picea asperata* originating from the mountains of china. **Plant Sci.** 168: 707-714.
- Wang, Z., J.L. Weber, G. Zhong and S.D. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. **Theor. Appl. Genet.** 88: 1-6.
- Weber, J.L. and P.E. May. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms with can be types using polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.** 44: 388-396.
- _____. 1990. Informativeness of human (dC-dA)_n(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomic** 7: 524-530.

- Wei, Y.M., Y.C. Hou, Z.H. Yan, W. Wu, Z.O. Zhang, D.C. Liu and Y.L. Zheng. 2005. Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat (*Triticum aestivum* L.) landraces highly resistant to *Fusarium* head blight. **J. Appl. Genet.** 46(1): 3-9.
- Xiang, N., Y. Hong and L.T. Lam-Chan. 2003. Genetic analysis of tropical orchid hybrids (*Dendrobium*) with fluorescence amplified fragment-length polymorphism (AFLP). **J. Am. Hort. Sci.** 128: 731-735.
- Xing, Q.H., Z.G. Ru, C.J. Zhou, X. Xue, C.Y. Liang, D.E. Yang, D.M. Jin and B. Wang. 2003. Genetic analysis, molecular tagging and mapping of the thermo-sensitive genic male-sterile gene (wtms1) in wheat. **Theor. Appl. Genet.** 107: 1500-1504.
- Yaish, M.W.F. and M. Pérez de la Vega. 2003. Isolation of (GA)_n microsatellite sequences and description of a predicted MADS-box sequence isolated from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Genet. Mol. Biol.** 3: 337-342.
- Yang, W., D.B. Weaver, B.L. Nielsen and J. Qiu. 2001. Molecular mapping of a new gene for resistance to frogeye leaf spot of soya bean in 'Peking'. **Plant Breed.** 120: 73-78.
- Yue, G.H., L.T. Lam-Chan and Y. Hong. 2006. Development of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in identification of *Dendrobium* varieties. **Mol. Ecol. Notes** 6(3): 832-834.
- Zane, L., L. Bargelloni and T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Mol. Ecol.** 11: 1-16.
- Zhang, D.P., D. Carbajulca, L. Ojeda, G. Rossel, S. Milla, C. Herrera and M. Ghislain. 1999. Microsatellite analysis of genetic diversity in sweet potato varieties from Latin America. **CIP program rept.** 295-301.

Zhu, Z., R. Zhou, X. Kong, Y. Dong and J. Jia. 2005. Microsatellite markers linked to 2 powdery mildew resistance genes introgressed from *Triticum carthlicum* accession PS5 into common wheat. **Genome** 48: 585-590.

ภาคผนวก

1. การสกัดแยกดีเอ็นเอจากกล้วยไม้

1.1 นำใบพืชประมาณ 2 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในโกร่ง เติมน้ำไตรเจนเหลวให้ท่วม แล้วบดให้ละเอียด จากนั้นถ่ายใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มี extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

1.2 เติมน้ำ 20% SDS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยเขย่าแรง ๆ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที กลับหลอดไปมาเป็นครั้งคราว

1.3 เติมน้ำโปแตสเซียมอะซิเตทความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยเขย่าแรง ๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ในขั้นตอนนี้โปรตีนและโพลีแซคคาไรด์จะตกตะกอนร่วมกับโปแตสเซียมอะซิเตทที่เหลือ กรดนิวคลีอิกอยู่ในสารละลาย

1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 20,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.5 ดูดสารละลายใสไว้ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร เติมน้ำคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) 1 เท่าของสารละลายที่ดูดมา กลับหลอดไปมาเบา ๆ เพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

1.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

1.7 ดูดสารละลายใสไว้ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร เติมน้ำไอโซโพรพานอล ปริมาตร 12 มิลลิลิตร หรือ 0.7 เท่าของสารละลายที่ดูดมา ผสมให้เข้ากันเบา ๆ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือเป็นเวลานานข้ามคืนกรณีที่ไม่เห็นตะกอน

1.8 เก็บตะกอนดีเอ็นเอด้วยแท่งแก้วปลายอวบน้ำในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หรือนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างตะกอนให้แห้งในตู้ 37 องศาเซลเซียส

1.9 เดิมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร อุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนตะกอนละลายหมด

1.10 เดิม absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลายที่ดูดยมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

1.11 เทส่วนน้ำทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

1.12 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

1.13 ทำตามข้อ 1.11-1.12 ซ้ำอีก 1 ครั้ง

1.14 ผึ่งตะกอนให้แห้งในตู้ 37 องศาเซลเซียส แล้วเติม RNase buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 15 mM NaCl) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ละลายตะกอนให้หมด (อาจนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตะกอนละลายเร็วขึ้น)

1.15 เดิม RNase A 10 ไมโครลิตร (10 mg/ml) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานข้ามคืน

1.16 เดิม RNase buffer เพิ่มจนปริมาตรรวมเป็น 500 ไมโครลิตร

1.17 สกัดเอนไซม์ RNase A และโปรตีนที่อาจหลงเหลืออยู่ออกไปด้วย ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25 : 24 : 1) 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ เพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

1.18 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

1.19 ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ สกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย โดยทำเหมือนข้อ 1.5-1.6 เพื่อกำจัดฟีนอลที่อาจ

ติดอยู่ออกไป เนื่องจากฟีนอลมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด เช่น เอนไซม์ตัดจำเพาะ DNA polymerase เป็นต้น

1.20 ทำตามข้อ 1.19 ซ้ำอีก 1 ครั้ง

1.21 คัดสารละลายส่วนบนออกแล้วใส่ในหลอดใหม่ เติมโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 3 โมลาร์ pH 5.2 ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของสารละลายที่ดูคมา และเติมเอทานอลปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ดูคมา เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอเข้า เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (หรือเก็บไว้ที่ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที)

1.22 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

1.23 เทส่วนน้ำทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

1.24 เทสารละลายทิ้งไป ผึ่งตะกอนให้แห้งโดยคว่ำหลอดบนกระดาษซับ หรือปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วละลายตะกอนใน TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ต่อไป

2. การโคลนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอโดยวิธี SSR enrichment

2.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

2.1.1 ทำการเลือกสารละลายดีเอ็นเอที่จะนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะอย่างสุ่ม ในการทดลองนี้เลือกใช้สารละลายดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์รินภา โดยนำสารละลายดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* หรือ *TaqI* ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอพันธุ์รินภา (200 ng/μl) 5.0 ไมโครลิตร 10X Reaction Buffer 5.0 ไมโครลิตร *MseI* (4,000 U/ml) 2.5 ไมโครลิตร (หรือ *TaqI* (20,000 U/ml) 1.0 ไมโครลิตร) BSA (100 μg/ml) 0.5 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 50.0 ไมโครลิตร

2.1.2 นำสารละลายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* มาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานข้ามคืน (1X Reaction Buffer 2 ประกอบด้วย 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) และนำสารละลายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *TaqI* มาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (1X Reaction Buffer 3 ประกอบด้วย 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT)

2.1.3 ตรวจสอบผลการตัดของเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ โดยโหลดสี (6X loading buffer) 1 ไมโครลิตร และสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร

2.2 การเชื่อมต่อสารละลายดีเอ็นเอกับ adapter

2.2.1 นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 2.1.2 มาเติมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 20.0 ไมโครลิตร *MseI* adapter หรือ *TaqI* adapter (12.5 pmole/μl) 8.0 ไมโครลิตร 5X T₄ ligase buffer 20.0 ไมโครลิตร T₄ DNA ligase (400,000 U/ml) 2.0 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 100.0 ไมโครลิตร

2.2.2 นำมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (1X T₄ DNA ligase Reaction Buffer ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 μg/ml BSA)
ลำดับเบสของ adapter มีดังนี้

<i>MseI</i> adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCAT-5'
<i>TaqI</i> adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' 3'-TACTCAGGACTCGC-5'

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์

2.3.1 นำสารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 2.2.2 มาเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ M1 (M1 primer 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3')

โดยเตรียมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร ใส่สารละลายดีเอ็นเอ 5.0 ไมโครลิตร M1 primer (5 pmol/μl) 2.0 ไมโครลิตร dNTP mix (2 mM) 3.0 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 3.0 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 U/μl) 0.2 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 30.0 ไมโครลิตร

2.3.2 ตรวจสอบผลการทำพีซีอาร์โดยแบ่งสารละลายดีเอ็นเอมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารละลายดีเอ็นเอที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบผลโดยย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์จะพบรอยยาว (smear) ของดีเอ็นเอ

2.4 ทำการแยกลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่เหลือจากข้อ 3.3.2 มาทำไฮบริดเชชันกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 6 ชนิด คือ (CA)₁₅, (GA)₁₅, (ACC)₁₀, (CCT)₁₀, (GAT)₁₀ และ (ATCT)₇ สำหรับดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse*I และโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 4 ชนิด คือ (CA)₁₅, (GA)₁₅, (ACC)₁₀ และ (CCT)₁₀ สำหรับดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Taq*I ซึ่งแต่ละชนิดติดฉลากที่ปลาย 5' ด้วยไบโอติน (Biotinylated oligo) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ streptavidin ที่เคลือบอยู่บน magnetic beads

2.4.1 นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์มาเติมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาไฮบริดเชชันกับโอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบชนิดต่าง ๆ โดยเติมสารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 2.3.2 40.0 ไมโครลิตร Biotinylated oligo (5 pmol/μl) ซึ่งประกอบด้วย B-(CA)₁₅, B-(GA)₁₅, B-(ACC)₁₀, B-(CCT)₁₀, B-(GAT)₁₀ และ B-(ATCT)₇ อย่างละ 2.0 ไมโครลิตร และเติม Hybridization buffer (6X SSC, 0.1% SDS) 48 ไมโครลิตรให้มีปริมาตรรวม 100.0 ไมโครลิตร

กรณีที่ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *TaqI* จะใส่โอลิโกนิวคลีโอไทด์โพรบสายเดี่ยวที่มีลำดับเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 4 ชนิด คือ (CA)₁₅, (GA)₁₅, (ACC)₁₀ และ (CCT)₁₀ ความเข้มข้น 5 pmol/μl อย่างละ 2 ไมโครลิตร และเติม Hybridization buffer เพิ่มขึ้น 52 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร

2.4.2 พันหลอดด้วยพาราฟิล์มเพื่อป้องกันการระเหย

2.4.3 นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 – 15 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพเป็นสายเดี่ยว (denature genomic DNA)

2.4.4 นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลานานข้ามคืน ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการไฮบริไดเซชัน

2.5 การเตรียม magnetic beads

2.5.1 คุด magnetic beads ปริมาตร 40 ไมโครลิตรใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.5.2 เติม 2X Binding and Washing buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในหลอด และผสมให้เข้ากัน

2.5.3 ใส่หลอดลงในแท่นแม่เหล็ก magnet 50 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงดูดสารละลายออก (ระวังอย่าให้ magnetic beads ติดออกไปด้วย)

2.5.4 เติม 2X Binding and Washing buffer ลงไปใหม่ ผสมให้เข้ากัน นำไปใส่ในแท่นแม่เหล็ก magnet 50 แล้วดูดสารละลายทิ้งไป ทำตามข้อ 2.5.2 และ ข้อ 2.5.3 ซ้ำอีก 3-4 ครั้ง

2.5.5 หลังจากคุด 2X Binding and Washing buffer ครั้งสุดท้ายออกหมดแล้วจึงเติม Hybridization buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตรลงไปในหลอดผสมให้เข้ากันกับ magnetic beads

2.6 การทำไฮบริไดเซชันกับ magnetic beads

2.6.1 นำสารละลายดีเอ็นเอมาทำไฮบริไดเซชันกับ magnetic beads โดยเติมสารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 2.4.4 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีสารละลาย beads และ Hybridization buffer จากข้อ 2.5.5 ผสมให้เข้ากัน

2.6.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง ผสมให้เข้ากันทุก ๆ 30 นาที

2.7 การล้างดีเอ็นเอออกจาก beads

2.7.1 นำหลอดจากข้อ 3.6.2 ใส่ลงในแท่นแม่เหล็ก magnet 50 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที จากนั้นดูดสารละลายทิ้งไป

2.7.2 ล้าง beads โดยเติมสารละลาย 2X SSC, 0.1%SDS ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

2.7.3 นำหลอดใส่ลงในแท่นแม่เหล็ก magnet 50 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที แล้วดูดสารละลายทิ้งไป

2.7.4 ทำตามข้อ 2.7.2 และ 2.7.3 ซ้ำอีก 1 ครั้ง

2.7.5 เติม 1X SSC, 0.1%SDS ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 5 นาที

2.7.6 นำหลอดใส่ลงในแท่นแม่เหล็ก magnet 50 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที แล้วดูดสารละลายออก

2.7.7 ทำตามข้อ 2.7.5 และ 2.7.6 ซ้ำอีก 1 ครั้ง

2.7.8 เติม 1X SSC, 0.1%SDS ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 5 นาที

2.7.9 นำหลอดใส่ลงในแท่นแม่เหล็ก magnet 50 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที แล้วดูดสารละลายออก

2.7.10 ทำตามข้อ 2.7.8 และ 2.7.9 ซ้ำอีก 1 ครั้ง

2.7.11 ล้างดีเอ็นเอที่ต้องการออกจาก beads โดยเติม TE ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ปริมาตร 60 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ใน heat box เป็นเวลา 10 นาที

2.7.12 นำหลอดใส่ลงในแท่นแม่เหล็ก magnet 50 ดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ลงในหลอดใหม่อย่างรวดเร็ว

2.7.13 เติม TE buffer ปริมาตร 60 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอดที่มี magnetic beads แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.8 การทำให้ดีเอ็นเอเป็นสายคู่และการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์

เตรียมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยใส่สารละลายดีเอ็นเอ จากข้อ 2.7.12 ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร M1 primer (5 pmol/ μ l) 2.0 ไมโครลิตร dNTP mix (2 mM) 2.0 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ l) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

ขั้นตอนที่ 1

Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที	จำนวน 1 รอบ
--------------	---	-------------

ขั้นตอนที่ 2

Denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที	} จำนวน 30 รอบ
Annealing	ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	
Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที	

ขั้นตอนที่ 3

Extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที	จำนวน 1 รอบ
-----------	---	-------------

2.9 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิด

2.9.1 ทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิด pGEM[®]T vector (Promega, USA) โดยเตรียมสารที่ใช้ในปฏิกิริยาในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร โดยใส่สารละลายดีเอ็นเอจากข้อ 2.8 ปริมาตร 3.0 ไมโครลิตร 2X Rapid Ligation Buffer 5.0 ไมโครลิตร pGEM[®]T vector 1.0 ไมโครลิตร และ T₄ DNA ligase (400,000 U/ml) 1.0 ไมโครลิตร เพื่อให้มีปริมาตรรวม 10.0 ไมโครลิตร

2.9.2 นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

2.10 การถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีทรานสฟอร์มชัน

2.10.1 นำเอาซูเปอร์คอมพีเทนต์เซลล์ (Promega, USA) ออกจากตู้ -80 องศาเซลเซียส มาแช่ในกระดิกน้ำแข็งเพื่อให้ละลาย

2.10.2 เติมสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีซูเปอร์คอมพีเทนต์เซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

2.10.3 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (heat shock) โดยนำหลอดที่มีสารละลายดีเอ็นเอและซูเปอร์คอมพิเทนต์เซลล์จากข้อ 2.10.2 ไปจุ่มลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วย้ายกลับมาแช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็วเป็นเวลา 2 นาที

2.10.4 เติมหอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย SOC (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ และ 20 mM glucose ปรับ pH 6.8-7.0) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา

2.10.5 นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เพื่อให้แบคทีเรียเจริญเติบโตและอยู่ในช่วง log phase

2.10.6 ผสม X-gal ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ IPTG ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.10.7 คู่ออาหารที่เลี้ยงแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายที่ผสมไว้ในข้อ 2.10.6 ปริมาตร 60 ไมโครลิตร มาเกลี่ย (spread) ลงบนผิวหน้าอาหาร LB agar (อาหาร LB broth ที่เติม agar 1.5%) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 10 plate โดยใช้แท่งแก้วปลายอ (glass spreader)

2.10.8 นำ plate ใส่ในถุงพลาสติก และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง ตรวจสอบโคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีขาวและสีฟ้าที่เจริญบนอาหาร คัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาวมาทำการทดลองต่อไป

3. การคัดเลือกโคลนที่มีไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอจากห้องสมุดจีโนม

3.1 การเตรียมแผ่นเมมเบรน

3.1.1 ตัดแผ่นไนล่อนเมมเบรนให้มีขนาด 8x12 ตารางเซนติเมตร

3.1.2 ตัดแผ่นกระดาษกรอง Whatman ให้มีขนาดใหญ่กว่าแผ่นไนล่อนเมมเบรน เล็กน้อย

3.1.3 นำ plate ขนาดใหญ่มา 1 คู่ เติมน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว 1 plate และ 20X SSC อีก 1 plate จุ่มแผ่นไนล่อนเมมเบรนลงในน้ำกลั่น และ 20X SSC ตามลำดับ

3.1.4 วางแผ่นไนล่อนเมมเบรนลงบนแผ่นกระดาษกรอง Whatman เพื่อซับน้ำออกจนแห้งดี จากนั้นจึงวางแผ่นไนล่อนเมมเบรนลงบนพลาสติกใสที่มีตำแหน่งของจุดที่จะทำการหยดดีเอ็นเอ

3.1.5 นำผลผลิตพีซีอาร์มาปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ดีเอ็นเอรวมกันที่ก้นหลอด แล้วจึงนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพเป็นสายเดี่ยว แล้วย้ายลงในน้ำแข็งทันที เพื่อป้องกันการกลับมาจับกันของดีเอ็นเอเป็นสายคู่อีก

3.1.6 ดูดผลผลิตพีซีอาร์จากข้อ 3.1.5 ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตรด้วยปิเปต แล้วหยดลงบนแผ่นไนล่อนเมมเบรนที่เตรียมไว้แล้ว

3.1.7 ห่อแผ่นไนล่อนเมมเบรนด้วยแผ่นใสห่ออาหาร แล้วนำไปฉายรังสี UV เป็นเวลา 10 นาที

3.2 การทำไฮบริไดเซชันและตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบ North2South Chemiluminescent Hybridization and Detection Kit (Pierce Biotechnology)

3.2.1 ทำ Pre-hybridization โดยนำแผ่นไนล่อนเมมเบรนมาใส่ในถุงพลาสติกและเติม Hybridization Buffer ลงไป 10 มิลลิลิตร ปิดปากถุงให้สนิท นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที

3.2.2 ขณะที่ทำ Pre-hybridization นำ Biotinylated DNA probe ที่มีลำดับเบสซ้ำแบบ ไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 6 ชนิดหรือ 4 ชนิด ความเข้มข้น 30 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างละ 10 ไมโครลิตรมาผสมกันในหลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที คูคโพรบใส่ในถุงเมมเบรน ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

3.2.3 ล้างแผ่นไนล่อนเมมเบรนด้วย 1X Hybridization Stringency Wash Buffer (2X SSC, 0.1%SDS) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที และทำซ้ำอีก 2 ครั้ง

3.2.4 ค่อย ๆ ริน 1X Hybridization Stringency Wash Buffer ออก แล้วเติม Blocking Buffer ปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปบ่มและเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

3.2.5 เติม Streptavidin-HRP ลงใน Blocking Buffer ในอัตราส่วน 1:300 (อย่าใส่ให้ถูกแผ่นไนล่อนเมมเบรนโดยตรง) ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มและเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที

3.2.6 ล้างแผ่นไนล่อนเมมเบรนด้วย 1X Wash Buffer ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำอีก 3 ครั้ง แล้วย้ายแผ่นไนล่อนเมมเบรนไปใส่ในถุงพลาสติกใหม่

3.2.7 ใส่ Substrate Equilibration Buffer ปริมาตร 25 มิลลิลิตรลงไป นำไปบ่มและเขย่าที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

3.2.8 เตรียม Substrate Working Solution โดยผสม Luminol/Enhancer Solution กับ Peroxide Solution อย่างละ 5 มิลลิลิตรในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร (เตรียมก่อนใช้และระวังอย่าให้ถูกแสง)

3.2.9 ย้ายแผ่นในล่อนเมมเบรนลงในกล่องพลาสติก แล้วใส่ Substrate Working Solution ให้ท่วมผิวเมมเบรน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 5 นาที

3.2.10 เทสารละลายทิ้ง ห่อแผ่นในล่อนเมมเบรนด้วยแผ่นใสห่ออาหารหรือถุงพลาสติกให้สนิท ระวังอย่าให้มีฟองอากาศและรอยขุ่น

3.2.11 Expose บนฟิล์มเอ็กซ์เรย์เป็นเวลา 30-60 วินาที

3.2.12 จุ่มฟิล์มลงในน้ำยาสร้างภาพ (developer) ถ้างน้ำยาสร้างภาพออกด้วยน้ำประปา

3.2.13 จุ่มฟิล์มลงในน้ำยาคงสภาพ (fixer) ถ้างฟิล์มด้วยน้ำประปา แล้วผึ่งฟิล์มให้แห้ง

ตารางผนวกที่ 1 ค่า similarity index ที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงของแถบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย

	รินนภา	ขาว 5 N	ขาว สนาน	มิสทีน	บอม 17 แดง	บอม K หวาน	ขาว ประวิทย์	โจแดง	เอริกา	พีกาซัส มก.	Den. Jaquelyn Thomas	อโนชา x กลูดีอาย	หวาย เจียต โกลส์
รินนภา	1.0000000												
ขาว 5 N	0.9285714	1.0000000											
ขาวสนาน	0.9047619	0.9761905	1.0000000										
มิสทีน	0.8333333	0.9047619	0.9285714	1.0000000									
บอม 17 แดง	0.8571429	0.8333333	0.8095238	0.7857143	1.0000000								
บอม K หวาน	0.8333333	0.8095238	0.8333333	0.8095238	0.9761905	1.0000000							
ขาวประวิทย์	0.9523810	0.9761905	0.9523810	0.8809524	0.8571429	0.8333333	1.0000000						
โจแดง	0.8095238	0.7857143	0.7619048	0.7380952	0.9523810	0.9285714	0.8095238	1.0000000					
เอริกา	0.8571429	0.8809524	0.9047619	0.8333333	0.7619048	0.7857143	0.9047619	0.7142857	1.0000000				
พีกาซัส มก.	0.7857143	0.8571429	0.8809524	0.9047619	0.7380952	0.7619048	0.8333333	0.6904762	0.7857143	1.0000000			
Den. Jaquelyn Thomas	0.8809524	0.9047619	0.8809524	0.8095238	0.8333333	0.8095238	0.9285714	0.7857143	0.8333333	0.8095238	1.0000000		
อโนชา x กลูดีอาย	0.6428571	0.7142857	0.6904762	0.7142857	0.6904762	0.6666667	0.6904762	0.7380952	0.6428571	0.7142857	0.7142857	1.0000000	
หวายเจียตโกลส์	0.7380952	0.7619048	0.7380952	0.6666667	0.6904762	0.6666667	0.7857143	0.7380952	0.7857143	0.6190476	0.7619048	0.8095238	1.0000000
มาดาม	0.8571429	0.9285714	0.9047619	0.8333333	0.8095238	0.7857143	0.9047619	0.7619048	0.8095238	0.7857143	0.8809524	0.6904762	0.7380952
มิสติงคโพร	0.8571429	0.8809524	0.8571429	0.8333333	0.9047619	0.8809524	0.8571429	0.8571429	0.7619048	0.7857143	0.8333333	0.6904762	0.6904762
บุญเหลง	0.8571429	0.8333333	0.8095238	0.7380952	0.9047619	0.8809524	0.8571429	0.8571429	0.8095238	0.7380952	0.8333333	0.7380952	0.7380952

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	รินนภา	ขาว 5 N	ขาว สนาน	มัสทีน	บอม 17 แดง	บอม K หวาน	ขาว ประวิทย์	โจแดง	เอริกา	ฟีกาซัส มก.	Den. Jaquelyn Thomas	อโนชา x กลุติอาย	หวาย เจียต โกลด์
ชีซ่าบางกอก	0.7142857	0.7857143	0.8095238	0.8809524	0.7619048	0.7857143	0.7619048	0.8095238	0.7142857	0.8333333	0.7380952	0.7857143	0.6904762
ฟีกาซัส	0.7857143	0.8571429	0.8809524	0.9047619	0.7380952	0.7619048	0.8333333	0.6904762	0.7857143	1.0000000	0.8095238	0.7142857	0.6190476
แดงโตล่า	0.8095238	0.8333333	0.8095238	0.8333333	0.7619048	0.7380952	0.8095238	0.7142857	0.7142857	0.8333333	0.8333333	0.6904762	0.6428571
เอียสกูล	0.9285714	0.9047619	0.8809524	0.8571429	0.9285714	0.9047619	0.9285714	0.8809524	0.8333333	0.7619048	0.8571429	0.6190476	0.7142857
แมงมุมดำ	0.7142857	0.7380952	0.7142857	0.7380952	0.7619048	0.7380952	0.7619048	0.8095238	0.7142857	0.7380952	0.7380952	0.8809524	0.7380952
Den. Reha Zehorn	0.6666667	0.7380952	0.7142857	0.6904762	0.6190476	0.5952381	0.7142857	0.5714286	0.6190476	0.5952381	0.6904762	0.5476190	0.6428571
เบ็ตตี้	0.6904762	0.7619048	0.7380952	0.7619048	0.6904762	0.6666667	0.7380952	0.6428571	0.6904762	0.7619048	0.8095238	0.7619048	0.7142857
ซารูเรีย	0.8333333	0.9047619	0.8809524	0.8095238	0.7380952	0.7142857	0.8809524	0.6904762	0.8333333	0.7619048	0.8571429	0.7619048	0.8571429
ชั้นเกี้ยว	0.8095238	0.7857143	0.8095238	0.8333333	0.8095238	0.8333333	0.8095238	0.7619048	0.8095238	0.8333333	0.7857143	0.6904762	0.6904762
ชมพูกลม	0.8095238	0.8333333	0.8571429	0.8333333	0.8095238	0.8333333	0.8095238	0.7619048	0.8095238	0.8333333	0.7380952	0.5476190	0.6428571
บุรณะชั้นชาย	0.6666667	0.6904762	0.7142857	0.7380952	0.6666667	0.6904762	0.7142857	0.6190476	0.7142857	0.7380952	0.7857143	0.6904762	0.6904762
บุรณะกรีน	0.8333333	0.9047619	0.8809524	0.8095238	0.8809524	0.8571429	0.8809524	0.8333333	0.8333333	0.8095238	0.8571429	0.8095238	0.7619048
บุรณะเจด	0.8095238	0.8333333	0.8095238	0.7380952	0.8095238	0.7857143	0.8571429	0.7619048	0.8095238	0.7380952	0.8333333	0.6428571	0.7380952
เจ้าพระยาบลู	0.8333333	0.8571429	0.8333333	0.7619048	0.7857143	0.7619048	0.8809524	0.7380952	0.8333333	0.7619048	0.8571429	0.6666667	0.7142857
ไจฮาน	0.8571429	0.8809524	0.8571429	0.7857143	0.8571429	0.8333333	0.9047619	0.8095238	0.8095238	0.7857143	0.8809524	0.6904762	0.7380952
พานาวี	0.7619048	0.8333333	0.8095238	0.7380952	0.7619048	0.7380952	0.8095238	0.8095238	0.7619048	0.7380952	0.7857143	0.7857143	0.7380952

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	รินนภา	ขาว 5 N	ขาว สนาน	มิสทีน	บอม 17 แดง	บอม K หวาน	ขาว ประวิทย์	โจแดง	เอริกา	พีกาซัส มก.	Den. Jaquelyn Thomas	อโนชา x กลุ่ดอาย	หวาย เจียต โกลด์
เอเมร่อน	0.7380952	0.8095238	0.7857143	0.7142857	0.7857143	0.7619048	0.7857143	0.7380952	0.6904762	0.7142857	0.8095238	0.8095238	0.7619048
วอร์เตอร์รูไรวรรณ	0.8571429	0.8809524	0.8571429	0.7857143	0.8095238	0.7857143	0.9047619	0.7619048	0.8571429	0.7380952	0.8333333	0.6428571	0.7857143
หอม 16	0.8571429	0.9285714	0.9047619	0.8333333	0.8571429	0.8333333	0.9047619	0.8095238	0.8571429	0.8333333	0.8809524	0.7857143	0.7857143
บางกอกแฟนซี	0.9285714	0.9047619	0.8809524	0.8095238	0.8809524	0.8571429	0.9285714	0.8333333	0.8333333	0.8095238	0.9047619	0.6666667	0.7142857
คานาเคซีโอ	0.7142857	0.7857143	0.7619048	0.7857143	0.7142857	0.6904762	0.7619048	0.6666667	0.7142857	0.7857143	0.7857143	0.6904762	0.6428571
ขาวกลม	0.8809524	0.9523810	0.9285714	0.8571429	0.8333333	0.8095238	0.9285714	0.7857143	0.8809524	0.8095238	0.8571429	0.7142857	0.7619048
สะกิดดาว	0.6428571	0.7142857	0.6904762	0.7142857	0.6904762	0.6666667	0.6904762	0.7380952	0.6428571	0.8095238	0.6666667	0.8571429	0.6666667
Den. Jaquelyn Concert	0.8333333	0.9047619	0.8809524	0.8095238	0.7857143	0.7619048	0.8809524	0.7380952	0.7857143	0.8095238	0.8571429	0.6666667	0.6666667
สกลบลู	0.8809524	0.9523810	0.9285714	0.9523810	0.7857143	0.7619048	0.9285714	0.7380952	0.8333333	0.9047619	0.8571429	0.7619048	0.7142857
เรย์นพราว	0.6666667	0.7380952	0.7142857	0.7380952	0.7142857	0.6904762	0.7142857	0.6666667	0.6666667	0.7380952	0.7380952	0.9285714	0.7380952
มิดไนท์ลิปสติก	0.7857143	0.8571429	0.8333333	0.7619048	0.7857143	0.7619048	0.8333333	0.7380952	0.8333333	0.7619048	0.8095238	0.7142857	0.7619048
เก็ดติ้งบลู	0.8809524	0.9047619	0.8809524	0.9047619	0.7857143	0.7619048	0.8809524	0.7380952	0.7857143	0.9047619	0.8571429	0.7619048	0.6666667
บุญชูโกลด์	0.7142857	0.7857143	0.7619048	0.7857143	0.6190476	0.5952381	0.7619048	0.5714286	0.7619048	0.7380952	0.7380952	0.7857143	0.7857143
ชูโทน	0.9047619	0.9285714	0.9047619	0.8333333	0.8095238	0.7857143	0.9047619	0.7619048	0.9047619	0.7857143	0.8333333	0.6904762	0.7380952
มีแสงนิล	0.8571429	0.9285714	0.9047619	0.8333333	0.8571429	0.8333333	0.9047619	0.8095238	0.8095238	0.8333333	0.9285714	0.7380952	0.6904762
ประพิน	0.9047619	0.9285714	0.9047619	0.8333333	0.8095238	0.7857143	0.9047619	0.7619048	0.8571429	0.7857143	0.8809524	0.6904762	0.7380952
ชีซ่าแกระ	0.8571429	0.8809524	0.8571429	0.8809524	0.8095238	0.7857143	0.9047619	0.7619048	0.8095238	0.8809524	0.8809524	0.7380952	0.6904762

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	มกราคม	มิถุนายน	พฤษภาคม	สิงหาคม	พฤศจิกายน	ธันวาคม	มกราคม	พฤษภาคม	สิงหาคม	พฤศจิกายน	ธันวาคม	รวม
		สิงคโปร์		บาหลี		ลันเต		ลันเต		Reha		รวม
										Zehorn		
รายนาม												
ชาว 5 N												
ชาวสวน												
มิสทิน												
บอม 17 แดง												
บอม K หวาน												
ชาวประมง												
โจแดง												
เอริกา												
ฟิลาซัส มก.												
Den. Jaquelyn Thomas												
อินชาน x กลุ่ดอ												
ห้วยเจ็ดโกลด์												
มกราคม	1.0000000											
มิสสิงคโปร์	0.9047619	1.0000000										
พฤษภาคม	0.8571429	0.9047619	1.0000000									

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	มกราคม	มีนาคม	พฤษภาคม	สิงหาคม	พฤศจิกายน	ธันวาคม	มกราคม	มีนาคม	พฤษภาคม	สิงหาคม	พฤศจิกายน	ธันวาคม	มกราคม	มีนาคม	พฤษภาคม	สิงหาคม	พฤศจิกายน	ธันวาคม
	สิงคโปร์	มาเลเซีย	ไทย	อินโดนีเซีย	ฟิลิปปินส์	เวียดนาม	สิงคโปร์	มาเลเซีย	ไทย	อินโดนีเซีย	ฟิลิปปินส์	เวียดนาม	สิงคโปร์	มาเลเซีย	ไทย	อินโดนีเซีย	ฟิลิปปินส์	เวียดนาม
จีน	0.7142857	0.7619048	0.7142857	1.0000000														
ฟิลิปปินส์	0.7857143	0.7857143	0.7380952	0.8333333	1.0000000													
มาเลเซีย	0.8095238	0.8095238	0.7619048	0.8095238	0.8333333	1.0000000												
อินโดนีเซีย	0.8333333	0.8809524	0.8333333	0.7380952	0.7619048	0.7857143	1.0000000											
เวียดนาม	0.7619048	0.7619048	0.8571429	0.8095238	0.7380952	0.7142857	0.6904762	1.0000000										
Den. Reha Zehorn	0.6666667	0.6666667	0.5714286	0.6190476	0.5952381	0.6190476	0.6904762	0.4761905	1.0000000									
เบ็ตตี้	0.7857143	0.7380952	0.6904762	0.6904762	0.7619048	0.7857143	0.6666667	0.6904762	0.5952381	1.0000000								
ซารูเรีย	0.8333333	0.7857143	0.7380952	0.6904762	0.7619048	0.7380952	0.8095238	0.6428571	0.7380952	0.8095238	1.0000000							
ซันเกีย	0.7142857	0.7619048	0.8095238	0.8571429	0.8333333	0.8571429	0.7857143	0.7619048	0.5714286	0.7380952	0.7380952	1.0000000						
ซมพูกลม	0.7619048	0.8095238	0.7142857	0.7142857	0.8333333	0.7142857	0.8809524	0.5714286	0.6190476	0.6428571	0.7857143	0.7619048	1.0000000					
บุรณะซันซาย	0.7142857	0.6666667	0.6666667	0.6666667	0.7380952	0.7142857	0.6428571	0.6666667	0.5238095	0.9285714	0.7380952	0.7619048	0.6190476					
บุรณะกรีน	0.8809524	0.8809524	0.9285714	0.7857143	0.8095238	0.7857143	0.8095238	0.8333333	0.6428571	0.7619048	0.8095238	0.7857143	0.7380952					
บุรณะเจด	0.8571429	0.8571429	0.8571429	0.6666667	0.7380952	0.7142857	0.7857143	0.7619048	0.5714286	0.7380952	0.7857143	0.7619048	0.7142857					
เจ้าพระยาบถ	0.8333333	0.8333333	0.8333333	0.6904762	0.7619048	0.7380952	0.8095238	0.7857143	0.5952381	0.7142857	0.8095238	0.7857143	0.7380952					
โจฮาน	0.9047619	0.9047619	0.9047619	0.7142857	0.7857143	0.7619048	0.8333333	0.8095238	0.6190476	0.7380952	0.7857143	0.7619048	0.7142857					
พานาวี	0.8095238	0.8095238	0.8571429	0.8095238	0.7380952	0.7142857	0.7380952	0.8571429	0.5714286	0.6428571	0.7380952	0.7142857	0.6666667					

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	มกราคม	มิถุนายน	พฤษภาคม	สิงหาคม	พฤศจิกายน	ธันวาคม	มกราคม	กุมภาพันธ์	มีนาคม	เมษายน	พฤษภาคม	มิถุนายน	กรกฎาคม
	สิงคโปร์	สิงคโปร์	สิงคโปร์	สิงคโปร์	สิงคโปร์	สิงคโปร์	สิงคโปร์	สิงคโปร์	สิงคโปร์	สิงคโปร์	สิงคโปร์	สิงคโปร์	สิงคโปร์
เอมร่อน	0.8333333	0.8333333	0.8333333	0.6904762	0.7142857	0.6904762	0.7142857	0.7380952	0.6428571	0.7619048	0.8571429	0.6904762	0.6428571
วอร์เตอร์ไรววรรณ	0.9047619	0.8571429	0.8571429	0.6666667	0.7380952	0.7142857	0.8333333	0.7619048	0.6190476	0.7380952	0.8333333	0.7619048	0.7619048
หอม 16	0.9047619	0.9047619	0.9047619	0.7619048	0.8333333	0.8095238	0.8333333	0.8095238	0.6666667	0.7857143	0.8333333	0.7619048	0.7619048
บางกอกแฟนซี	0.8809524	0.9285714	0.9285714	0.7380952	0.8095238	0.8333333	0.9047619	0.7857143	0.6428571	0.7142857	0.8095238	0.8333333	0.7857143
คานาเคชิโอ	0.8571429	0.8095238	0.7619048	0.7142857	0.7857143	0.8095238	0.6904762	0.7619048	0.5238095	0.8333333	0.7380952	0.7619048	0.6666667
ชาวกลม	0.9285714	0.8809524	0.8333333	0.7380952	0.8095238	0.7857143	0.8571429	0.7380952	0.6904762	0.7619048	0.8571429	0.7380952	0.7857143
สะกิดดาว	0.6904762	0.6904762	0.7380952	0.7857143	0.8095238	0.6904762	0.6190476	0.8809524	0.4523810	0.6666667	0.6190476	0.6904762	0.6428571
Den. Jaquelyn Concert	0.8333333	0.8333333	0.7857143	0.7380952	0.8095238	0.7857143	0.8095238	0.6904762	0.7380952	0.7142857	0.8095238	0.7380952	0.7380952
สกลบลู	0.8809524	0.8333333	0.7857143	0.8333333	0.9047619	0.8809524	0.8571429	0.7857143	0.6904762	0.8095238	0.8571429	0.8333333	0.7857143
เรย์นพราว	0.7142857	0.7142857	0.7619048	0.7142857	0.7380952	0.7142857	0.6428571	0.8095238	0.5714286	0.7857143	0.7857143	0.7142857	0.5714286
มิดไนท์ลิปติก	0.8333333	0.8333333	0.8333333	0.6904762	0.7619048	0.7380952	0.7619048	0.7380952	0.5952381	0.7619048	0.8095238	0.7380952	0.7380952
เก็ดติงบลู	0.8333333	0.8333333	0.7857143	0.8333333	0.9047619	0.8809524	0.8095238	0.7857143	0.6428571	0.8095238	0.8095238	0.8333333	0.7380952
บุญชูโกลด์	0.7142857	0.6666667	0.6666667	0.6666667	0.7380952	0.7142857	0.6904762	0.6666667	0.6190476	0.7857143	0.8809524	0.7142857	0.6666667
ชูโทน	0.8571429	0.8571429	0.8571429	0.7142857	0.7857143	0.8095238	0.8809524	0.7142857	0.6666667	0.6904762	0.8333333	0.7619048	0.8095238
มีแสงนิล	0.9047619	0.8571429	0.8571429	0.8095238	0.8333333	0.8571429	0.8333333	0.7619048	0.6666667	0.7857143	0.8333333	0.8095238	0.7619048
ประพิน	0.9047619	0.8571429	0.8571429	0.7142857	0.7857143	0.8571429	0.8809524	0.7142857	0.6666667	0.7380952	0.8333333	0.7619048	0.8095238
ซีซ่าแกระ	0.8095238	0.8095238	0.8095238	0.8095238	0.8809524	0.8571429	0.8333333	0.8095238	0.6190476	0.7857143	0.7857143	0.8571429	0.7142857

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	บุรณะ ชั้นชาย	บุรณะ กรีน	บุรณะ เจด	เจ้าพระ ยาบลู	ใจฮาน	พานวี	เอมร่อน	วอเตอร์ อุไร วรรณ	หอม 16	บางกอก แฟนซี	กานาเค ซีไอ	ขาวกลม	สะเก็ด ดาว
ซีซ่าบางกอก													
ฟิกาซัส													
แดงโตล่า													
เอียสกุล													
แมงมุมดำ													
Den. Reha Zehorn													
เบ็คตี้													
ซารูเรีย													
ชั้นเกียว													
ชมพูกลม													
บุรณะชั้นชาย	1.0000000												
บุรณะกรีน	0.6904762	1.0000000											
บุรณะเจด	0.7142857	0.8333333	1.0000000										
เจ้าพระยาบลู	0.6904762	0.8095238	0.9285714	1.0000000									
ใจฮาน	0.7142857	0.8809524	0.9523810	0.9285714	1.0000000								
พานวี	0.6190476	0.8809524	0.7619048	0.7857143	0.8095238	1.0000000							

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	บุรณะ ชั้นชาย	บุรณะ กรีน	บุรณะ เจด	เจ้าพระ ยาบลู	ใจसान	พานาวี	เอเมร่อน	วอเคอร์ อุไร วรรณ	หอม 16	บางกอก แฟนซี	กานาเค ชีไอ	ขาวกลม	สะเก็ด ดาว
เอเมร่อน	0.7380952	0.8571429	0.7857143	0.7619048	0.8333333	0.8333333	1.0000000						
วอเคอร์อุไรวรรณ	0.7142857	0.8333333	0.9047619	0.8809524	0.9047619	0.7619048	0.7857143	1.0000000					
หอม 16	0.7142857	0.9761905	0.8571429	0.8333333	0.9047619	0.8571429	0.8333333	0.8571429	1.0000000				
บางกอกแฟนซี	0.6904762	0.8571429	0.8809524	0.9047619	0.9285714	0.8333333	0.8095238	0.8809524	0.8809524	1.0000000			
กานาเคชีไอ	0.7619048	0.7857143	0.8095238	0.7857143	0.8095238	0.7142857	0.7380952	0.8571429	0.8095238	0.7857143	1.0000000		
ขาวกลม	0.6904762	0.9047619	0.8333333	0.8095238	0.8809524	0.7857143	0.8095238	0.8809524	0.9285714	0.8571429	0.7857143	1.0000000	
สะเก็ดดาว	0.5952381	0.8095238	0.6904762	0.7142857	0.7380952	0.7857143	0.6666667	0.6428571	0.7857143	0.6666667	0.6904762	0.7142857	1.0000000
Den. Jaquelyn Concert	0.6428571	0.8571429	0.7857143	0.8095238	0.8333333	0.7857143	0.7619048	0.7857143	0.8809524	0.8571429	0.7380952	0.8571429	0.6666667
สกลบลู	0.7380952	0.8571429	0.7857143	0.8095238	0.8333333	0.7857143	0.7619048	0.8333333	0.8809524	0.8571429	0.8333333	0.9047619	0.7619048
เรย์นพราว	0.7142857	0.8333333	0.7142857	0.7380952	0.7619048	0.7142857	0.8333333	0.6666667	0.8095238	0.6904762	0.7142857	0.7380952	0.8333333
มิดไนท์ลิปติก	0.6904762	0.9047619	0.8809524	0.8571429	0.8809524	0.7857143	0.7619048	0.8809524	0.9285714	0.8095238	0.8333333	0.8571429	0.7619048
เก็ดติงบลู	0.7380952	0.8571429	0.7857143	0.8095238	0.8333333	0.7857143	0.7619048	0.7857143	0.8809524	0.8571429	0.8333333	0.8571429	0.7619048
บุญชูโกลด์	0.7142857	0.7380952	0.7142857	0.7380952	0.7142857	0.6666667	0.7380952	0.7619048	0.7619048	0.6904762	0.7619048	0.7380952	0.6904762
ชูโทน	0.6190476	0.8809524	0.7619048	0.7857143	0.8095238	0.8095238	0.7380952	0.8095238	0.9047619	0.8809524	0.7142857	0.9285714	0.6904762
มีแสงนิล	0.7142857	0.9285714	0.8095238	0.8333333	0.8571429	0.8571429	0.8333333	0.8095238	0.9047619	0.8809524	0.8095238	0.8809524	0.7380952
ประพิน	0.6666667	0.8809524	0.7619048	0.7857143	0.8095238	0.8095238	0.7380952	0.8095238	0.9047619	0.8809524	0.7619048	0.8809524	0.6904762
ชีซ่าแกระ	0.7619048	0.8333333	0.8095238	0.8333333	0.8571429	0.7619048	0.7380952	0.8095238	0.8571429	0.8809524	0.8095238	0.8333333	0.7380952

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

	Den.	สกลบลู	เรเย็น	มิดไนท์	เก็ดติง	บุญชู	ชูโตน	มีแสงนิล	ประพิน	ชีซ่าแกระ
	Jaquelyn		พราว	ลิปสติก	บลู	โกลด์				
Concert										
เอเมร่อน										
วอร์เตอร์รูไรวรรณ										
หอม 16										
บางกอกแฟนซี										
คานาเคชีโอ										
ขาวกลม										
สะเก็ดดาว										
Den. Jacquelyn Concert	1.0000000									
สกลบลู	0.8571429	1.0000000								
เรเย็นพราว	0.6904762	0.7857143	1.0000000							
มิดไนท์ลิปสติก	0.8095238	0.8095238	0.7857143	1.0000000						
เก็ดติงบลู	0.8571429	0.9523810	0.7857143	0.8095238	1.0000000					
บุญชูโกลด์	0.6904762	0.8333333	0.8571429	0.8333333	0.7857143	1.0000000				
ชูโตน	0.8333333	0.8809524	0.7142857	0.8333333	0.8333333	0.7619048	1.0000000			
มีแสงนิล	0.8809524	0.8809524	0.7619048	0.8333333	0.8809524	0.7142857	0.8571429	1.0000000		
ประพิน	0.8333333	0.8809524	0.7142857	0.8333333	0.8333333	0.7619048	0.9523810	0.9047619	1.0000000	
ชีซ่าแกระ	0.8333333	0.9285714	0.7619048	0.7857143	0.9285714	0.7619048	0.8095238	0.8571429	0.8095238	1.0000000

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวจุนิตา บุญสร้างสม
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 17 มกราคม 2524
สถานที่เกิด	จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการศึกษา	ระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-