

รายงานเรื่องเต็ม ผลการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

1. แผนงานวิจัย

2. โครงการวิจัย

กิจกรรมที่

กิจกรรมย่อย.....

3. ชื่อการทดลองที่ (ภาษาไทย) การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจ เอกลักษณ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีในประเทศไทย

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) DNA Fingerprinting and Molecular Markers for *Paphiopedilum* sp.
In Thailand

4. คณะผู้ดำเนินงาน

นางสาวอรุณทัย ชาววา

นางสาวศิริลักษณ์ อินทวงค์

นายอนุกุล อ่อนนิม

นางบุญเรือนรัตน์ แก้ววิเศษ

นายประสาน สืบสุข

5. บทคัดย่อ

กล้วยไม้รองเท้านารีมีจำนวนประชากรในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็ว จัดเป็นพืชที่มีสถานภาพที่ใกล้สูญพันธุ์อีกชนิดของโลก ความรู้พื้นฐานทางพันธุกรรมและเครื่องหมายโมเลกุลในแต่ละสายพันธุ์มีความจำเป็นมากในการบ่งชี้สายพันธุ์และความหลากหลาย งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีที่เก็บรวบรวมไว้ โดยการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้ากับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี เพื่อลดค่าใช้จ่าย ศึกษาไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 101 คู่สาย กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 25 ตัวอย่าง จาก 12 สายพันธุ์ พบว่ามี 61 คู่สายไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และคัดเลือกจำนวน 10 คู่ ที่ให้ลักษณะแถบดีเอ็นเอต่าง การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์จำนวน 16 เส้น พบว่า ให้แถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 250-1200 เบส แบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ได้ 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รองเท้านารีขาวพันงา รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีเหลืองตรัง รองเท้านารีเกรย์ รองเท้านารีเหลืองปราจีน และรองเท้านารีฝายหอย กลุ่มที่ 2 ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ภูเก็ตอมตะ ภรณ์เรศ เจ็กเขียน กฤษโศกสละ สะพานหิน53 ดลวิสุทธิ สุนทรีย์ ชำนาญสินธุ์ ไตรมาส และไม้ป่าเกาะพนัง การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้ด้วยยีน *matK* ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 13 ตัวอย่าง ได้ผลผลิตพีซีอาร์ประมาณ 945 เบส แบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รองเท้านารีขาวพันงา รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเกรย์ และรองเท้านารีฝายหอย กลุ่มที่ 2 ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองกระบี่ และไม้ป่าเกาะพนัง เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล BLAST พบว่า มีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity อยู่ระหว่าง 98-99

เปอร์เซ็นต์ พบมีความเหมือนกับ *P. niveum* *P. appletonianum* *P. bullenianum* และ *P. glaucophyllum* ดังนั้นยีน *matK* ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีในประเทศไทยจะถูกนำไปลงในฐานข้อมูล BLAST ต่อไป

Paphiopedilum sp. is an endangered orchid in the world. The basic information about genetic and DNA fingerprinting is necessary for identification and diversity of species. This research aims to study molecular markers and DNA fingerprints in collecting *Paphiopedilum* orchids. Application of Vanda's developed SSR markers for characterization of *Paphiopedilum* in a cost and time effective way. The initial screenings of 101 primer pairs from *Vanda* were amplified to 25 samples from 12 varieties of *Paphiopedilum* orchids. The results showed that 61 primer pairs gave positive amplified to *Paphiopedilum* DNA by PCR technique. Then, 10 polymorphic primer pairs were selected. Sixteen ISSR primers were selected and amplified ranging in size from 250 to 1200 bp. DNA fingerprinting showed that 2 groups of related. First group are *P. thaianum* Khao-Pang-nga, *P. niveum* 'Khao-Satoon', *P. godefroyae* 'Laung-Trang', *P. niveum*+ *godefroyae* 'Krayee', *P. concolor* 'Laung-Prajin' and *P. bellatulum*. And second group are *P. exul* Laung Krabi, Puket Amata, Pornaret, Ngekzean, Kritkoson, Sapanhin53, Donvisit, Suntaree, Chamnansin, Trimas and *P. godefroyae*. The *matK* gene from 13 samples approximately 945 bp used for analyzing. Results showed that 2 groups of related. First group are *P. thaianum* Khao-Pang-nga, *P. niveum* 'Khao-Satoon', *P. niveum*+ *godefroyae* 'Krayee', *P. concolor* 'Laung-Prajin' and *P. bellatulum*. And second group are *P. exul* Laung Krabi, and *P. godefroyae*. The use of *matK* sequences with BLAST searching showed 98-99 percentage identities with *P. niveum* *P. appletonianum* *P. bullenianum* และ *P. glaucophyllum*. Consequently, *matK* gene of these *Paphiopedilum* orchids will submit to BLAST database.

6. คำนำ

การสำรวจรวบรวมพันธุ์พืชตามพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช กรมวิชาการเกษตร พบว่า มีพืชหายากและใกล้สูญพันธุ์ทั้งหมดในประเทศไทยประเมินได้มากกว่าร้อยละ 30 เป็นพืชที่จัดให้อยู่ในกลุ่มพืชหายากและใกล้สูญพันธุ์ ถึงแม้ว่าจากการประเมินในพืชหายากที่ขึ้นบัญชีไว้มีเพียง 1,407 ชนิด สาเหตุหลักได้แก่พื้นที่แหล่งอาศัยหรือแหล่งกระจายพันธุ์ถูกบุกรุกทำลายจากมนุษย์ และถูกจำกัดการกระจายพันธุ์จากปัจจัยธรรมชาติเอง (วินัยและคณะ, 2550) ดังนั้น การเก็บข้อมูลพื้นฐานหรือลงลึกในกลุ่มพืชถิ่นเดียว (Endemic plant) และพืชหายาก (Rare) จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อเก็บรักษาพรรณพืชที่หายาก และพืชที่ใกล้จะสูญพันธุ์ เพราะอาจมีศักยภาพในเชิงเศรษฐกิจในอนาคต และเก็บรักษาประชากรพืชที่มีคุณลักษณะพิเศษ สำหรับการปรับปรุงพัฒนาพันธุ์พืชต่อไป

กล้วยไม้รองเท้านารีในสกุล *Paphiopedilum* sp. ในโลกที่ค้นพบแล้วมีอยู่ประมาณ 70 ชนิด สำหรับประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนพบกล้วยไม้รองเท้านารีพื้นเมืองเพียงสกุลเดียว คือสกุล *Paphiopedilum* โดยพบแล้ว

17 ชนิด (อุไร, 2550) กล้วยไม้รองเท้านารีมีจำนวนประชากรในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็ว จัดเป็นพืชที่มีสถานภาพที่ใกล้สูญพันธุ์อีกชนิดของโลก ในขณะที่ข้อมูลทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ชนิดนี้ยังมีอยู่น้อยและไม่มีความชัดเจน กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นพืชที่พบทั้งเฉพาะถิ่น และบางพันธุ์พบว่า มีความหลากหลาย สามารถเจริญเติบโตได้ในหลายภาคของประเทศไทย และบางชนิดยังไม่มีผู้ศึกษา (เศรษฐมนตร์, 2551) กล้วยไม้รองเท้านารีได้รับความสนใจในการนำมาปลูกเลี้ยง เนื่องจากเป็นพืชที่มีความสวยงามทั้งดอกและใบ ดอกจะบานทน ในบางพันธุ์หรือบางต้นที่มีลักษณะเด่นจะมีการซื้อขายกันในราคาที่สูงมาก จึงมีความเสี่ยงในการสูญหาย/สูญพันธุ์ค่อนข้างสูงทั้งเนื่องจากการบุกรุกพื้นที่ป่าเพื่อเก็บนำมาจำหน่าย และการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมเพื่อทำประโยชน์อย่างอื่น ความจำเป็นในการเก็บรักษาทรัพยากรพืชเหล่านี้และศึกษาวิจัยในองค์ความรู้พื้นฐานก็มีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง ไม่ว่าจะเป็นเรื่องของสายพันธุ์ รายละเอียดทางพันธุกรรม และความแตกต่าง หรือความหลากหลาย ปัจจุบันมีการปรับปรุงพันธุ์ คัดเลือกพันธุ์ และขยายพันธุ์เพื่อการค้ากันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศและต่างประเทศ (อบฉันท, 2543) แต่การศึกษารายละเอียดทางพันธุกรรมยังคงมีอยู่อย่างจำกัด ซึ่งยังต้องการข้อมูลทางด้านความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมาสนับสนุนสมมติฐานทางวิวัฒนาการอีกมาก รวมไปถึงการที่จะรักษาลักษณะพิเศษของชาติ ผ่านการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืชเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างจริงจัง (จักรพันธ์, 2549) ปัจจุบันมีวิธีการทางวิทยาศาสตร์อยู่หลายวิธีที่ประสบความสำเร็จในการพัฒนาการตรวจสอบ และสามารถจำแนกชนิดพันธุ์พืช เพื่อศึกษาความหลากหลาย และความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ซึ่งจะช่วยให้ทราบข้อมูลพื้นฐาน ที่จะเป็นประโยชน์ในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคต เพื่อเพิ่มศักยภาพการพัฒนาคุณภาพ และมาตรฐานสินค้าเกษตร วิธีการดังกล่าว เป็นช่องทางใหม่อีกทางหนึ่งที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนาเทคโนโลยีร่วมกับวิธีการจำแนกพืชออกจากกัน อีกทั้งยังเป็นการรักษาลักษณะพิเศษของชาติ ผ่านการจดอนุสิทธิบัตรพันธุ์พืช และวิธีการตรวจสอบเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างจริงจังต่อไป

การพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์เครื่องหมายระดับโมเลกุลขึ้นมาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและสายพันธุ์ มีข้อได้เปรียบมากเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานเพียงอย่างเดียว เทคนิคในการหาความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยความแตกต่างในระดับยีน (Gene) ในรูปเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) จึงมีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์ความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต การตรวจสอบชนิดของสิ่งมีชีวิตอยู่บนพื้นฐานของการตรวจการปนของดีเอ็นเอเฉพาะที่จำเพาะต่อชนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ อาศัยหลักการพัฒนาเทคนิคเพื่อตรวจสอบเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีนที่จำเพาะต่อชนิดของสิ่งมีชีวิตให้ได้จำนวนมากและการตรวจวิเคราะห์ลักษณะดีเอ็นเอ ปัจจุบันการสกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้หลายชนิดนิยมใช้เทคนิค CTAB (Lodhi *et al.*, 1994) สามารถทำได้โดยง่าย การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสามารถทำได้โดยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งทำให้ปริมาณดีเอ็นเอที่มีอยู่น้อยเพิ่มปริมาณมากขึ้น

เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หรือ SSR (Simple Sequence Repeat) หมายถึง ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ (repetitive DNA) เรียงอยู่ต่อเนื่องกันบนจีโนม แต่ละชุดประกอบด้วยเบสซ้ำตั้งแต่ 1-6 เบส กระจายตัวทั้งจีโนมแต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ ทำให้เกิดความหลากหลาย จึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์พืช ในการเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การวางแผนตำแหน่งยีน (QTL mapping) การสร้างแผนที่ยีน (gene mapping) การทำแผนที่โครโมโซม

การศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอ (อรรถน์, 2548) SSR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะ ตรวจสอบได้ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single-locus marker) โดยลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วนไมโครแซทเทลไลต์ มักเป็นลำดับเบสจำเพาะ มีเพียงชุดเดียว (unique sequence) ดังนั้น ถ้าหาลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วนไมโครแซทเทลไลต์ได้ แล้วนำมาออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) จะเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว และเนื่องจากส่วนไมโครแซทเทลไลต์มีการกลายพันธุ์โดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย การตรวจสอบดีเอ็นเอตำแหน่งที่รวมเอาส่วนไมโครแซทเทลไลต์ไว้ภายใน จึงมีโอกาสด้านขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic) เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ไม่เท่ากัน จึงพบพอลิมอร์ฟิซึมค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (codominance) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ (สุรินทร์, 2552)

ปัจจุบันกล้วยไม้รองเท้านารีในธรรมชาติลดลง เนื่องจากมีความสวยงามและบางชนิดมีราคาสูง บางชนิดยังไม่มีผู้ศึกษา พบได้เฉพาะถิ่นและบางพันธุ์สามารถเจริญเติบโตในหลายภาคของประเทศไทย ในขณะที่ข้อมูลทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ชนิดนี้ยังมีอยู่น้อย (เศรษฐมนตร์, 2551) ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคอาร์เอฟพีดี (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) ระหว่างกล้วยไม้รองเท้านารี 6 ชนิด พบว่ารองเท้านารีเหลืองปราจีนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับรองเท้านารีฟ้ายอยมากที่สุด และเมื่อตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีเพื่อเป็นตัวแทนในการจำแนกปรากฏว่าไม่พบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์จากการใช้ไพรเมอร์อาร์เอฟพีดี (ประเดิม, 2543) สำหรับใน *Paphiopedilum micranthum* ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ พบว่า ค่า genetic differentiation ระหว่างประชากรมีความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ในประชากรสูงถึง 79.69 % ในขณะที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรมีค่าเท่ากับ 20.13 % (Li et al., 2002) และระหว่าง *Paphiopedilum* และ *Phragmipedium* พบว่า สามารถแยกความแตกต่างทั้ง 2 สกุลได้อย่างชัดเจน และผลการวิเคราะห์ยังสอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Chung et al., 2006) อย่างไรก็ตามเทคนิคอาร์เอฟพีดียังมีความเสถียรต่ำในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง อาจทำให้เกิดคลาดเคลื่อนได้ง่าย เมื่อเทียบกับการใช้เทคนิค SSR ซึ่งถูกนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์มากขึ้น เนื่องจาก SSR เป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบ codominant ให้ลักษณะพอลิมอร์ฟิซึมสูง มีความเสถียรและขั้นตอนที่ง่ายกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP) หรือ เอเอฟแอลพี (AFLP) นอกจากนี้ SSR สามารถตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์และเครื่องรันดีเอ็นเออัตโนมัติ (automated DNA sequencer) จึงง่ายและรวดเร็วต่อการวิเคราะห์กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีจำนวนมากในการคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช (Yu et al., 2000; Sajib et al., 2012) แต่เครื่องหมาย SSR มีข้อจำกัด คือ การพัฒนาเครื่องหมายมีความยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากต้องทราบลำดับเบสที่อยู่ข้างเคียงของตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา เพื่อให้ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ จึงจะสามารถนำมาใช้ได้ (Hayden and Sharp, 2001) นอกจากนี้ปัจจุบันได้มีการนำดีเอ็นเอบาร์โค้ด (DNA barcode) หรือส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนมาตรฐานที่ใช้ในการจำแนกชนิดของพืช เช่น ยีนในส่วน coding ได้แก่ *matK* *rbcL* *rpoB* และ *rpoC1* หรือส่วน noncoding ได้แก่ *atpF-atpH* *trnH-psbA* และ *psbK-psbI* มาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทาง

พันธุ์กรรมมากขึ้น เนื่องจากงานต่อการเพิ่มปริมาณและการวิเคราะห์ และยีน *rbcL + matK* เป็นยีนที่ได้รับการแนะนำมากที่สุด (Janzen et al., 2009) ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ศึกษาเครื่องหมายโมเลกุล และนำดีเอ็นเอบาร์โค้ด มาศึกษาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีในประเทศไทย

7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. สารเคมีที่ใช้ในงานทางชีววิทยาโมเลกุล
2. เครื่อง spectrophotometer (PARKIN ELMER MBA2000)
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)
4. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
5. ชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)
6. เครื่องตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนพีซีอาร์ (QIAxcel Advanced System)
7. เครื่องตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนพีซีอาร์ (ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer)
8. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส

วิธีดำเนินการ

1. การประยุกต์เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้าใช้กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี

1.1 การเตรียมตัวอย่างกล้วยไม้และการสกัดดีเอ็นเอ

นำใบกล้วยไม้รองเท้านารี จำนวน 25 ตัวอย่าง จาก 12 สายพันธุ์ ได้แก่ รองเท้านารีขาวชุมพร รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะหน้าแดง รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะพนัง รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะไก่อ รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะนกยูง รองเท้านารีอ่างทอง รองเท้านารีเหลืองปราจีนอุตรดิตถ์ รองเท้านารีเหลืองสิงขร รองเท้านารีเหลืองประจวบ รองเท้านารีเหลืองปราจีนสระบุรี รองเท้านารีเหลืองอุดร และรองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Lodhi *et al.*, (1994)

1.2. การคัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้ามาใช้กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี

นำไพรเมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้งหมดจำนวน 101 คู่สาย มาทดสอบกับดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารี โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl_2 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (5 uM) อย่างละ 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 52-57 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกา

โรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (Biorad) และนำผลผลิตพีซีอาร์อีก 4 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบและบันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System

1.3. การติดฉลากและการวิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้มาเพิ่มลำดับเบสของ senseM13 จำนวน 18 เบส ทางด้านปลาย 5' Forward ดังนี้ 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3' เพื่อจับกับ antisenseM13 ที่ติดด้วยฉลากสฟลูออเรสเซนต์ด้วยวิธีพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer((NH₄)₂SO₄) 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2.0 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (5uM) อย่างละ 2.0 ไมโครลิตร, antisenseM13 ที่ติดฉลากสฟลูออเรสเซนต์ (5uM) 1 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 เช่นเดียวกับข้อที่ 2 แล้วตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเครื่อง ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer ซึ่งขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ได้จากเครื่องจะถูกนำมาลบส่วนของ M13 ออกจำนวน 18 เบส

2. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลด้วยเทคนิค ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

2.1 การเตรียมตัวอย่างกล้วยไม้และการสกัดดีเอ็นเอ

นำใบกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี จำนวน 34 ตัวอย่าง จาก 7 ชนิด ที่เก็บรวบรวมไว้ที่สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 ได้แก่ รองเท้านารีขาวพังงา รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองกระบี่ รองเท้านารีเกรย์ รองเท้านารีฝ้ายหอม รองเท้านารีเหลืองตรัง ภูเก็ตอมตะ วรรณเรศ แจ็กเซียน กฤษโกล สพานหิน 53 คลวิสุทธิ สุนทรีย์ ชำนาญสินธุ์ ไตรมาส ไม้ป่าเกาะพนัก มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Lodhi *et al.*, (1994)

2.2. การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ISSR เพื่อจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ทดสอบไพรเมอร์ ISSR จำนวนทั้งหมด 60 ไพรเมอร์ โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร 10x PCR buffer((NH₄)₂SO₄) 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (5 uM) 2 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 50-55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (Biorad)

นำภาพที่ได้ไปวิเคราะห์ผล โดยไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้คะแนน 0 และปรากฏแถบดีเอ็นเอให้คะแนน 1 แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธี unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.1

3. การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้รองเท้านารีในประเทศไทย

3.1. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน *Maturase K (matK)*

นำดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีจำนวน 13 ตัวอย่าง จาก 7 ชนิด ได้แก่ รองเท้านารีขาวพังงา (*P. thaianum*) รองเท้านารีขาวสตูล (*P. niveum*) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*P. concolor*) รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*P. exul*) รองเท้านารีเกรย์ (*P. niveum + godefroyae*) รองเท้านารีฝ้าย (*P. bellatulum*) ไม้ป่าเกาะพนัก (*P. godefroyae*) มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *Maturase K (matK)* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ตามรายงานของ Parveen และคณะ (2011) คือ matKForward 5'-ATCCATATGGAAATCTTGTTTC-3' และ matKReverse 5'-GTTCTAGCACACGAAAGTCG-3' เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 4 ไมโครลิตร 10x PCR buffer((NH₄)₂SO₄) 8 ไมโครลิตร 25 mM MgCl₂ 8 ไมโครลิตร 2mM dNTP 8 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (10 uM) อย่างละ 4 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.5 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 100 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD)

3.2. การทำชิ้นส่วนพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3.1. มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink® PCR Purification Kit ยี่ห้อ Invitrogen ดังนี้ นำพีซีอาร์ 100 ไมโครลิตร มาเติม PureLink® Binding Buffer (B2) จำนวน 1 เท่า คือ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดของเหลวใส่ลงใน PureLink® Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ทั้งส่วนใส ล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 xg นาน 1 นาที ทั้งส่วนใส แล้วปั่นคอลัมน์ให้แห้งอีกรอบนาน 2 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นชะผลผลิตพีซีอาร์ด้วย Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 2 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators (BIORAD) แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA6

ระยะเวลาการทดลอง (เริ่มต้น – สิ้นสุด)

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2556 สิ้นสุด กันยายน 2558 รวม 2 ปี

สถานที่ดำเนินการทดลอง

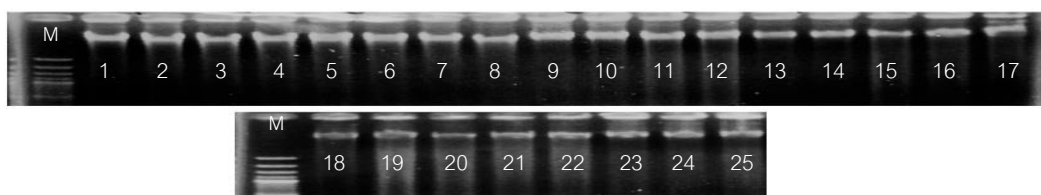
ห้องปฏิบัติการด้านชีวโมเลกุล สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ จังหวัดปทุมธานี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การประยุกต์เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้า ใช้กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี

1.1 การสกัดดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารี

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Lodhi *et al.*, (1994) พบว่า การวัดค่า (O.D) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น A260/A280 จะอยู่ในช่วง 1.8-2.0 ซึ่งจัดอยู่ในช่วงมาตรฐาน จึงนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เมื่อนำไปตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยหดยดีเอ็นเอ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ จะได้ดีเอ็นเอดังภาพที่ 1 เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไป



ภาพที่ 1 ตัวอย่างดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (เลนส์ M คือ 1kb ladder)

- | | | |
|--|--|--|
| 1. รองเท้านารีขาวชุมพร (<i>P. godefroyae</i>) No.1 | 10. รองเท้านารีอ่างทอง (<i>P. godefroyae</i>) No.1 | 19. รองเท้านารีเหลืองปราจีนสระบุรี (<i>P. concolor</i>) No.1 |
| 2. รองเท้านารีขาวชุมพร (<i>P. godefroyae</i>) No.2 | 11. รองเท้านารีอ่างทอง (<i>P. godefroyae</i>) No.2 | 20. รองเท้านารีเหลืองปราจีนสระบุรี (<i>P. concolor</i>) No.2 |
| 3. รองเท้านารีขาวชุมพร (<i>P. godefroyae</i>) No.3 | 12. รองเท้านารีอ่างทอง (<i>P. godefroyae</i>) No.3 | 21. รองเท้านารีเหลืองปราจีนสระบุรี (<i>P. concolor</i>) No.3 |
| 4. รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะหน้าแดง (<i>P. godefroyae</i>) | 13. รองเท้านารีเหลืองปราจีนอุตรดิตถ์ (<i>P. concolor</i>) No.1 | 22. รองเท้านารีเหลืองอุดร (<i>P. concolor</i>) No.1 |
| 5. รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะพนัง (<i>P. godefroyae</i>) No.1 | 14. รองเท้านารีเหลืองปราจีนอุตรดิตถ์ (<i>P. concolor</i>) No.2 | 23. รองเท้านารีเหลืองอุดร (<i>P. concolor</i>) No.2 |
| 6. รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะพนัง (<i>P. godefroyae</i>) No.2 | 15. รองเท้านารีเหลืองปราจีนอุตรดิตถ์ (<i>P. concolor</i>) No.3 | 24. รองเท้านารีเหลืองอุดร (<i>P. concolor</i>) No.3 |
| 7. รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะไผ่ (<i>P. godefroyae</i>) No.1 | 16. รองเท้านารีเหลืองสิงขร (<i>P. concolor</i>) No.1 | 25. รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียงคานาม (<i>P. concolor</i>) |
| 8. รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะไผ่ (<i>P. godefroyae</i>) No.2 | 17. รองเท้านารีเหลืองสิงขร (<i>P. concolor</i>) No.2 | |
| 9. รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะนกยูง (<i>P. godefroyae</i>) | 18. รองเท้านารีเหลืองประจวบ (<i>P. concolor</i>) | |

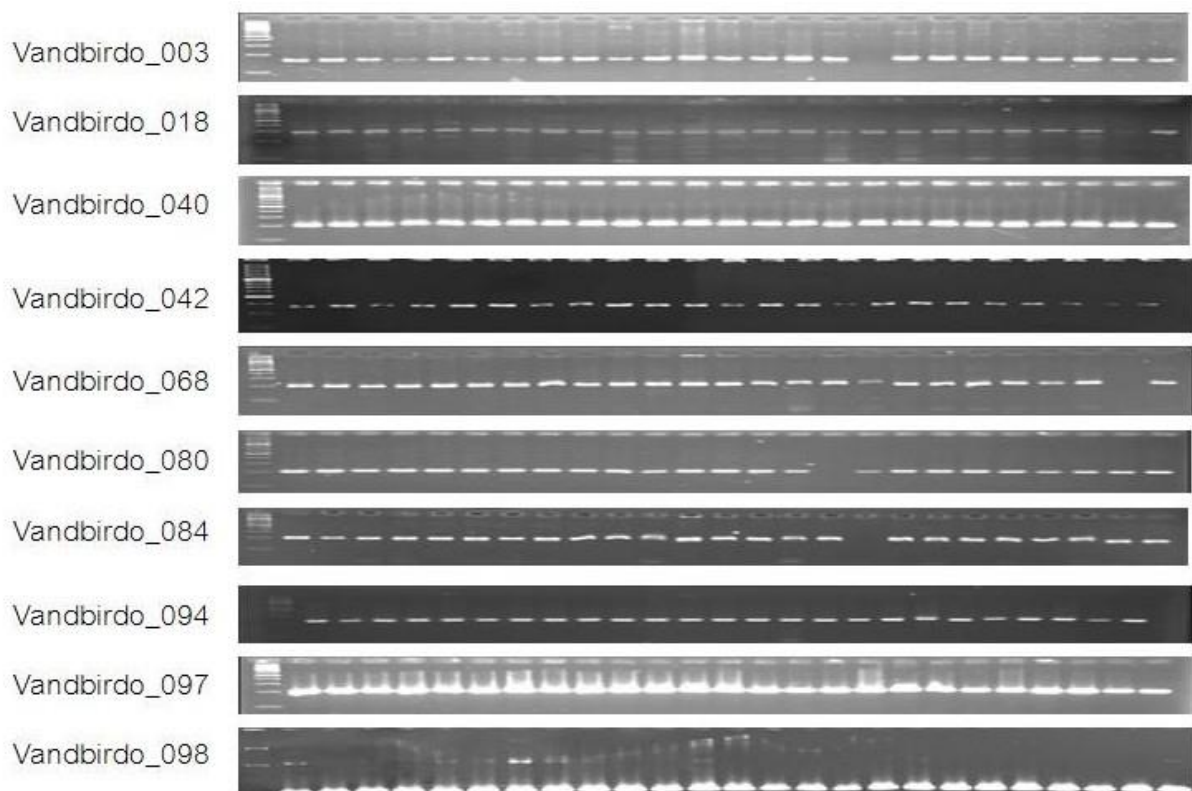
1.2 การคัดเลือกไพรเมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้ามาใช้กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี

การทดสอบไพรเมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้งหมดจำนวน 101 คู่สาย กับดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารี พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 61 คู่สายไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่ตั้งแต่ 1-6 แถบ ซึ่งการเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นหลายแถบอาจเนื่องมาจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ขณะนั้นยังไม่เหมาะสมกับคู่ไพรเมอร์นั้นๆ แต่อย่างไรก็ตามเครื่องหมาย SSR ที่ดีต้องมีเพียง 1 ตำแหน่ง ดังนั้น จึงได้คัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 10 คู่สาย ได้แก่ Vandbirdo_003, Vandbirdo_018, Vandbirdo_040, Vandbirdo_042, Vandbirdo_068, Vandbirdo_080, Vandbirdo_084, Vandbirdo_094, Vandbirdo_097 แ ล ะ

Vandbirdo_098 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ที่แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ บนอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 2 การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอต่างของเครื่องหมาย SSR บนแผ่นเจลอะกาโรสนั้นทำได้ยาก หากมีลำดับเบสซ้ำอยู่ในช่วง 3 – 10 เบส จะไม่สามารถมองเห็นความแตกต่าง แต่การบันทึกผลด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System แสดงให้เห็นลักษณะแถบดีเอ็นเอต่างได้ในทุกไพรเมอร์ โดยลักษณะแถบดีเอ็นเอต่างของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้แสดงเช่นเดียวกันกับไพรเมอร์ Vandbirdo_097 ดังภาพที่ 3 ทั้งนี้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมดจะถูกนำไปติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์เพื่อศึกษาขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอต่อไป

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ SSR จำนวน 10 คู่ คัดเลือกจากไพรเมอร์ 101 คู่ ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้า

ลำดับ ที่	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Forward 5'-3'	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Reverse 5'-3'	Tm (°C)	ขนาดอัลลีลในกล้วยไม้ สกุลแวนด้า(เบส)
1.	Vandbirdo_003	TGCACTCCCCCTTAGGTGAT	CGAGGCATTTTTGTCCTGGC	57	378
2.	Vandbirdo_018	CGAGGTAGATGTGACGCAAA	GCCTTAATCGACAGCTCCAG	55	217
3.	Vandbirdo_040	CGGAGACCTGTGTTTTGGT	TCGAACGACCTTCAACAAGA	52	213
4.	Vandbirdo_042	CGTGCACGTCTTACACACCT	TTACAACCTTCGCCCTCGAC	53	206
5.	Vandbirdo_068	TTCGGATCCTCCTTCGTAGA	CTCGCACAACAGAAGCTTGA	53	203
6.	Vandbirdo_080	GTGCCACCCTCTTTTGTTGT	ATCCACGACAGAAATCATTTTC	52	197
7.	Vandbirdo_084	AGGGCGTGCTGTAGGAGTAA	CCCAAGCTTCGAATACCAAA	53	201
8.	Vandbirdo_094	TCGAACCGTAGACCTTCTCG	CCAAGCTTCGGATCAGGATA	53	221
9.	Vandbirdo_097	GGCGCTTTCTCATAGCTCAC	GCCTACATACCTCGCTCTGC	55	207
10.	Vandbirdo_098	GGCGCTTTCTCATAGCTCAC	GCTACATACCTCGCTCTGC	53	205



ภาพที่ 2 ผลผลิตพีซีอาร์จากไพรเมอร์ SSR 10 คู่ (ตารางที่ 1) ในเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 3 ผลผลิตพีซีอาร์ที่เพิ่มด้วยไพรเมอร์ Vandbirdo_097 ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System

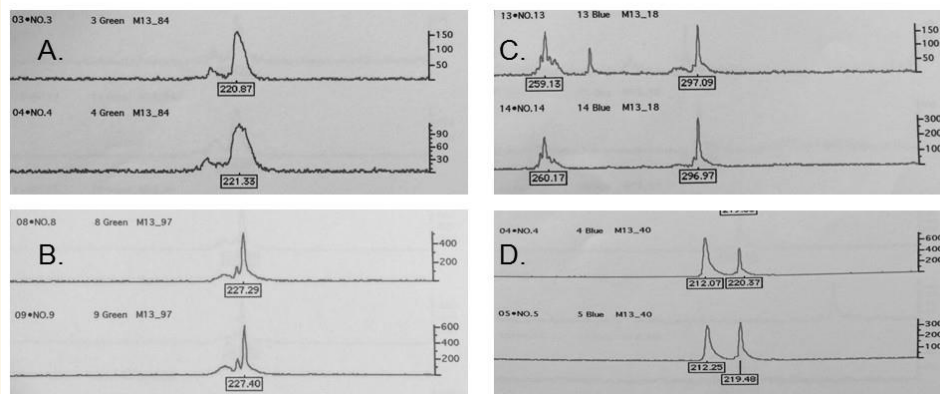
1.3 การวิเคราะห์ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์

การบันทึกผลจากเครื่อง QIAxcel Advanced System ของไพรเมอร์ทั้ง 10 คู่ แสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอต่างได้แต่ไม่สามารถบอกขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ จึงได้คัดเลือกคู่ไพรเมอร์มาทดสอบลากซีฟลูออเรสเซนส์จำนวน 4 คู่ ได้แก่ Vandbirdo_018, Vandbirdo_040, Vandbirdo_084 และ Vandbirdo_097 เพื่อวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer พบว่า ทั้ง 4 คู่ไพรเมอร์ แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอต่าง

แบบโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกต(ภาพที่ 4) ที่น่าสนใจ คือ ไพรมเมอร์ Vandbirdo_018 แสดงขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันแบบโฮโมไซโกตใน รองเท้าหนังอ่างทอง (*P. godefroyae*) และ รองเท้าหนังเหลืองประจวบ (*P. concolor*) คือ 252 และ 222 เบส ตามลำดับ และแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบบเฮเทอโรไซโกตใน รองเท้าหนังเหลืองปราจีนอุตรดิตถ์ (*P. concolor*) คือ 241/278 เบส (ตารางที่ 2) สำหรับไพรมเมอร์ Vandbirdo_040, Vandbirdo_084, และ Vandbirdo_097 แสดงชิ้นส่วนแบบโฮโมไซโกต 202, 202 และ 209 เบส และแบบเฮเทอโรไซโกต 194/202, 198/202 และ 206/209 เบส ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ขนาดชิ้นส่วนพีซีอาร์ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีที่ได้จากไพรมเมอร์ SSR

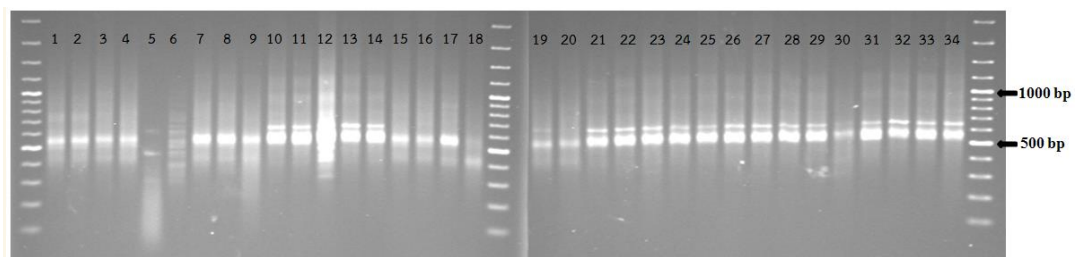
ลำดับ ที่	สายพันธุ์กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี	ขนาดของอัลลีล (เบส)			
		M13Vandbirdo_018	M13Vandbirdo_040	M13Vandbirdo_084	M13Vandbirdo_097
1.	รองเท้านารีขาวชุมพร (<i>P. godefroyae</i>)	278	194/202	202	206/209
2.	รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะหน้าแดง (<i>P. godefroyae</i>)	278	194/202	202	206/209
3.	รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะพังก (<i>P. godefroyae</i>)	278	194/202	202	206/209
4.	รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะไก่ (<i>P. godefroyae</i>)	278	194/202	202	209
5.	รองเท้านารีเหลืองตรังเกาะนกยูง (<i>P. godefroyae</i>)	278	202	198/202	209
6.	รองเท้านารีอ่างทอง (<i>P. godefroyae</i>)	252	194/202	202	209
7.	รองเท้านารีเหลืองปราจีนอุตรดิตถ์ (<i>P. concolor</i>)	241/278	202	202	206/209
8.	รองเท้านารีเหลืองสิงขร (<i>P. concolor</i>)	278	202	202	209
9.	รองเท้านารีเหลืองประจวบ (<i>P. concolor</i>)	222	202	198/202	209
10.	รองเท้านารีเหลืองปราจีนสระบุรี (<i>P. concolor</i>)	278	202	198/202	209
11.	รองเท้านารีเหลืองอุดร (<i>P. concolor</i>)	278	202	202	209
12.	รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียงดาม (<i>P. concolor</i>)	278	202	198/202	206/209



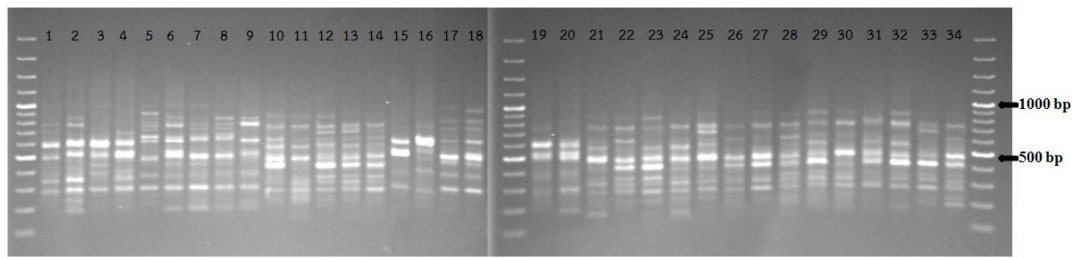
ภาพที่ 4 แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเครื่อง ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer โดยภาพ A. และ B. แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบบโฮโมไซโกตที่ได้จากไพรมเมอร์ Vandbirdo_084 and Vandbirdo_097 ส่วนภาพ C. และ D. แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอแบบเฮเทอโรไซโกตที่ได้จากไพรมเมอร์ Vandbirdo_018 and Vandbirdo_040.

2. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลด้วยเทคนิค ISSR

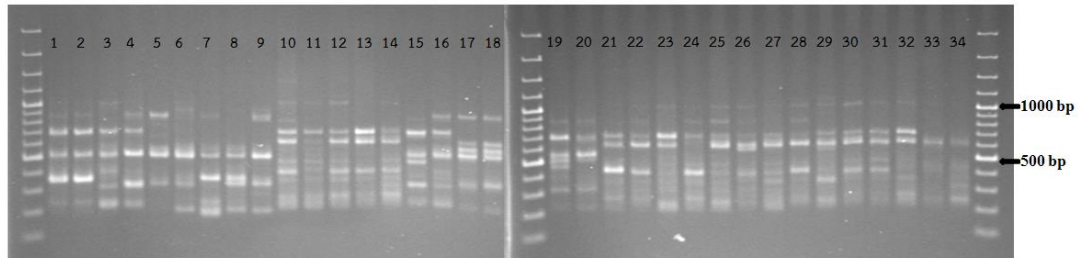
จากการทดสอบไพรเมอร์ชนิด ISSR จำนวน 60 เส้น ได้คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลักษณะต่างมาจำนวน 16 เส้น ได้แก่ UBC807 UBC818 UBC827 UBC841 UBC844 UBC846 UBC848 UBC850 UBC856 UBC857 UBC864 UBC868 UBC887 (AGC)5AY (ACGA)8 และ CT(CCT)₃CAC (ตารางที่ 3) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้เมื่อนำไปวิเคราะห์และสร้าง phylogenetic tree พบว่า ให้แถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 250-1200 เบส แสดงแถบดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 7 แถบ ในไพรเมอร์ (ACGA)8 และแสดงแถบดีเอ็นเอสูงสุด 12 แถบ ในไพรเมอร์ UBC841 UBC844 และ UBC857 อย่างไรก็ตามแถบดีเอ็นเอที่พบจาก 16 ไพรเมอร์ ยังไม่พบแถบดีเอ็นเอที่สามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีได้ อีกทั้งการที่กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตช้ามีการปรับปรุงพันธุ์ค่อนข้างยาก เนื่องจากมีข้อจำกัดหลายอย่างจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้ผลผลิตที่ได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการ การขยายพันธุ์ส่วนใหญ่จึงได้มาจากการแยกหน่อและการเพาะเมล็ด จะเห็นได้ว่าตัวอย่างรองเท้านารีเหลืองปราจีนจำนวน 5 ตัวอย่าง ที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ UBC827 ในหลอดที่ 5-9 ซึ่งเป็นพันธุ์แท้และเก็บตัวอย่างในพื้นที่เดียวกัน แต่ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่เป็นไปในทางเดียวกัน (ภาพที่ 5) ทั้งนี้ต้นที่เก็บมาอาจได้มาจากเมล็ดคนละเมล็ด ดังนั้นการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกกลุ่มความสัมพันธ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีจากเทคนิค ISSR จึงยังไม่เหมาะสมและไม่คุ้มค่า แต่การใช้เทคนิค SSR อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เนื่องจากเป็นเครื่องหมายโมเลกุลแบบ codominant ให้ลักษณะพอลิมอร์ฟิซึมสูง สามารถตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์และเครื่องรันดีเอ็นเออัตโนมัติ จึงง่ายและรวดเร็วต่อการวิเคราะห์กับตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีจำนวนมากในการคัดเลือกเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช (Sajib et al., 2012) หรือการศึกษาความสัมพันธ์ของตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีที่เก็บมาไม่พร้อมกัน การจัดทำ phylogenetic tree ของกล้วยไม้รองเท้านารีจากเทคนิค ISSR สามารถแบ่งความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รองเท้านารีขาวพังกา รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีเหลืองตรัง รองเท้านารีเกรย์ รองเท้านารีเหลืองปราจีน และรองเท้านารีฝายหอย กลุ่มที่ 2 ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ภูเก็ตอมตะ ภรณ์เรศ แจ็กเซียน กฤษโศกสล สะพานหิน53 ดลวิสิทิ สุนทรีย์ ชำนาญสินธุ์ ไตรมาศ และไม้ป่าเกาะพนัง มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของ phylogenetic tree อยู่ในช่วง 0.57-1.00 (ภาพที่ 6) ให้ค่าดัชนีความเหมือนกันมากที่สุดเท่ากับ 0.995 ในรองเท้านารีเหลืองปราจีน กับรองเท้านารีฝายหอย ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ ประเดิม (2543) ที่ใช้เทคนิค RAPD และค่าดัชนีความเหมือนต่ำสุดเท่ากับ 0.512 ในรองเท้านารีขาวสตูลกับรองเท้านารีสุนทรีย์



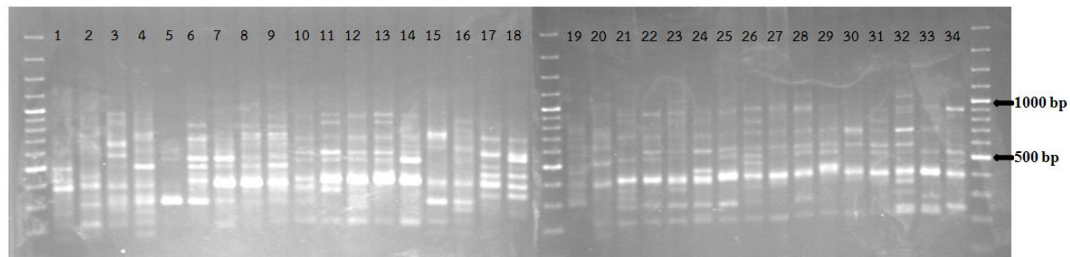
(ACGA)8



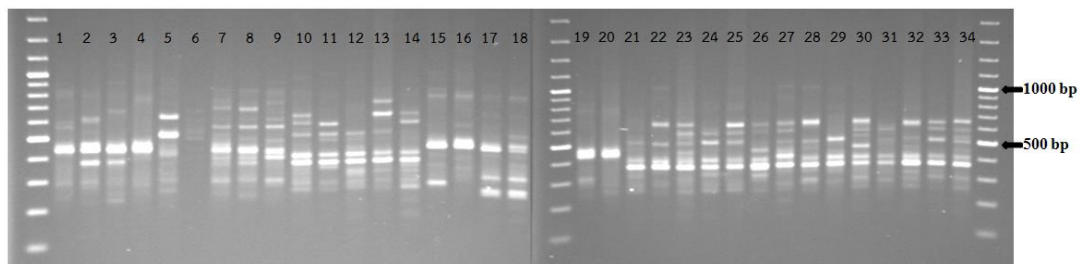
UBC841



UBC844



UBC857



UBC827

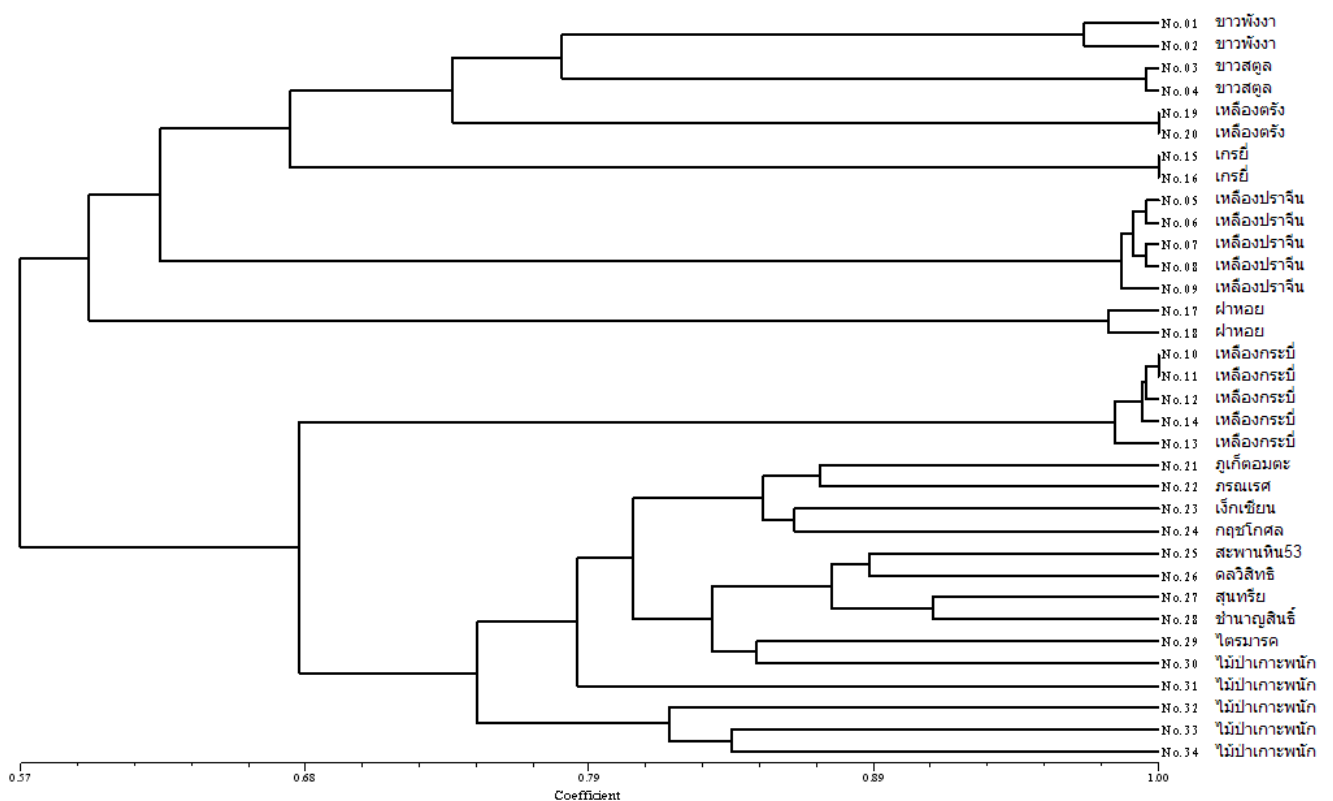
ภาพที่ 5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ISSR ได้แก่ (ACGA)₈ UBC841 UBC844 UBC857 และ UBC827 ตามลำดับ บนเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์

- | | | | |
|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------|
| 1. รองเท้านารีขาวพังงา | 10. รองเท้านารีเหลืองกระบี่ | 19. รองเท้านารีเหลืองตรัง | 28. ชำนาญสินธุ์ |
| 2. รองเท้านารีขาวพังงา | 11. รองเท้านารีเหลืองกระบี่ | 20. รองเท้านารีเหลืองตรัง | 29. ไตรมาส |
| 3. รองเท้านารีขาวสตูล | 12. รองเท้านารีเหลืองกระบี่ | 21. ภูเก็ตอมตะ | 30. ไม่ป่าเกาะพนัง |
| 4. รองเท้านารีขาวสตูล | 13. รองเท้านารีเหลืองกระบี่ | 22. ภรณ์เรศ | 31. ไม่ป่าเกาะพนัง |
| 5. รองเท้านารีเหลืองปราจีน | 14. รองเท้านารีเหลืองกระบี่ | 23. แจ็กเซียน | 32. ไม่ป่าเกาะพนัง |
| 6. รองเท้านารีเหลืองปราจีน | 15. รองเท้านารีเกรย์ | 24. กฤษโศก | 33. ไม่ป่าเกาะพนัง |
| 7. รองเท้านารีเหลืองปราจีน | 16. รองเท้านารีเกรย์ | 25. สะพานหิน 53 | 34. ไม่ป่าเกาะพนัง |
| 8. รองเท้านารีเหลืองปราจีน | 17. รองเท้านารีฝ้ายหยอ | 26. คลวิสัย | |
| 9. รองเท้านารีเหลืองปราจีน | 18. รองเท้านารีฝ้ายหยอ | 27. สุนทรีย | |

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ชนิด ISSR ที่คัดเลือกมาจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี

ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (5' - 3')	Annealing
1.	UBC807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	50
2.	UBC818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	55
3.	UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	50
4.	UBC841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	55

5.	UBC844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	50
6.	UBC846	CAC ACA CAC ACA CAC ART	50
7.	UBC848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	55
8.	UBC850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC	55
9.	UBC856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	55
10.	UBC857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	50
11.	UBC864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	50
12.	UBC868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA	50
13.	UBC887	DVD TCT CTCTCTCTC TC	55
14.	(AGC)5AY	AGC AGC AGC AGC AGC Y	55
15.	(ACGA)8	VHV GTG TGT GTG TGT GT	55
16.	CT(CCT) ₃ CAC	CTC CTC CTC CTC AC	50

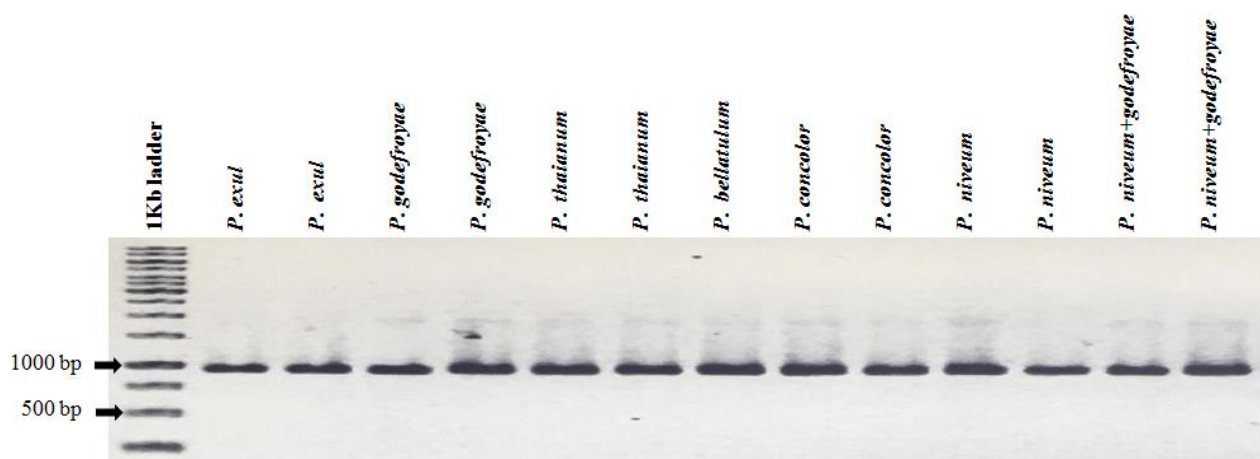


ภาพที่ 6 Phylogenetic Tree ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีที่เก็บรวบรวมไว้ที่สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 จังหวัดพิษณุโลก ทั้งหมด 7 ชนิด จำนวน 34 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค ISSR ใช้วิธีวิเคราะห์แบบ UPGMA โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.1

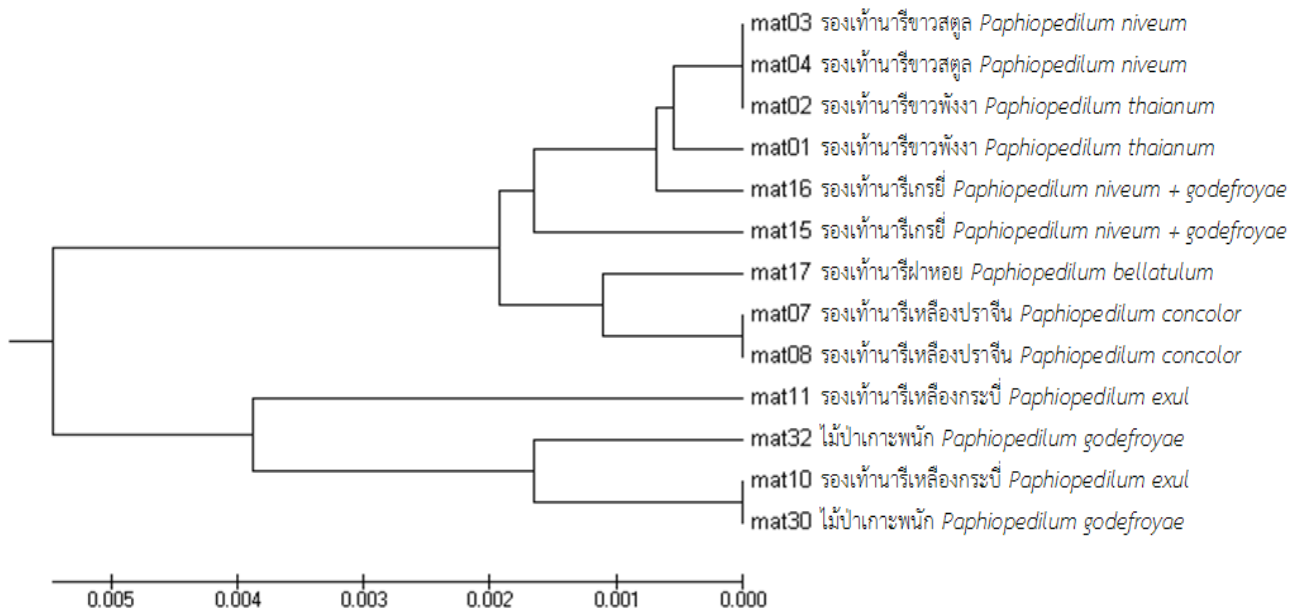
3. การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี

การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีสามารถใช้ยีน *matK* *rpoB* *rpoC1* *rbcL* และส่วนของ ITS เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละสายพันธุ์มาเปรียบเทียบกับกันโดยใช้โปรแกรม alignment ต่างๆ อย่างไรก็ตามยีน *matK* สามารถแสดงความหลากหลายระหว่างกลุ่มชนิดของ

กล้วยไม้รองเท้านารีมากที่สุดเท่ากับ 0.07 เพอร์เซ็นต์และให้เปอร์เซ็นต์ความชัดเจนในระหว่างชนิดเท่ากับ 100 เพอร์เซ็นต์ ซึ่ง ITS มีความชัดเจนอยู่แค่ 50 เพอร์เซ็นต์ (Parween et al., 2011) ดังนั้น การทดลองนี้จึงได้เลือก ยีน *matK* ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 13 ตัวอย่าง จากตัวแทน 7 ชนิด ที่เป็นตัวอย่างเดียวกันกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR ได้แก่ รองเท้านารีขาวพังงา (*P. thianum*) รองเท้านารีขาวสตูล (*P. niveum*) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*P. concolor*) รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*P. exul*) รองเท้านารีเกรย์ (*P. niveum*+ *godefroyae*) รองเท้านารีฝายหอย (*P. bellatulum*) และไม้ป่าเกาะพนัง (*P. godefroyae*) ได้ผลิตฟิสิกซ์อาร์ประมาณ 945 เบส (ภาพที่ 7) เมื่อนำไปวิเคราะห์และสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA6 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รองเท้านารีขาวพังงา รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเกรย์ และรองเท้านารีฝายหอย กลุ่มที่ 2 ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองกระบี่ และไม้ป่าเกาะพนัง มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของ phylogenetic tree อยู่ในช่วง 0-0.005 (ภาพที่ 8) จะเห็นได้ว่าการจัดกลุ่มด้วยดีเอ็นบาร์โค้ดของยีน *matK* สอดคล้องกับการใช้เทคนิค ISSR แต่ให้ค่าระยะความห่างมากที่สุดเท่ากับ 0.017 ในรองเท้านารีเหลืองกระบี่กับรองเท้านารีขาวพังงา และรองเท้านารีเหลืองกระบี่กับรองเท้านารีเกรย์ ค่าระยะความห่างมากที่สุดเท่ากับ 0.000 ในรองเท้านารีขาวสตูลกับรองเท้านารีขาวพังงา (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 7 ผลผลิตฟิสิกซ์อาร์ของยีน *matK* ขนาด 945 เบส ในเจลอะกาโรส 1 เพอร์เซ็นต์



ภาพที่ 8 Phylogenetic Tree ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีที่เก็บรวบรวมไว้ที่สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2 จังหวัดพิษณุโลก จาก 7 ชนิด จำนวน 13 ตัวอย่าง ด้วยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน *matK* และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA6

	[	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13]
1. รองเท้านารีขาวพังงา	[1]													
2. รองเท้านารีขาวพังงา	[2]	0.001												
3. รองเท้านารีขาวสตูล	[3]	0.001	0.000											
4. รองเท้านารีขาวสตูล	[4]	0.001	0.000	0.000										
7. รองเท้านารีเหลืองปราจีน	[5]	0.003	0.002	0.002	0.002									
8. รองเท้านารีเหลืองปราจีน	[6]	0.003	0.002	0.002	0.002	0.000								
10. รองเท้านารีเหลืองกระบี่	[7]	0.010	0.009	0.009	0.009	0.007	0.007							
11. รองเท้านารีเหลืองกระบี่	[8]	0.017	0.016	0.016	0.016	0.013	0.013	0.007						
15. รองเท้านารีเกรย์	[9]	0.004	0.003	0.003	0.003	0.006	0.006	0.010	0.017					
16. รองเท้านารีเกรย์	[10]	0.002	0.001	0.001	0.001	0.003	0.003	0.008	0.014	0.002				
17. รองเท้านารีฝ้ายหยอ	[11]	0.006	0.004	0.004	0.004	0.002	0.002	0.009	0.016	0.008	0.006			
30. ไม้ป่าเกาะพนัง	[12]	0.010	0.009	0.009	0.009	0.007	0.007	0.000	0.007	0.010	0.008	0.009		
32. ไม้ป่าเกาะพนัง	[13]	0.011	0.012	0.012	0.012	0.010	0.010	0.003	0.010	0.013	0.011	0.012	0.003	

ภาพที่ 9 ค่าเปรียบเทียบระยะห่าง (distance) ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA6

การนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 13 ตัวอย่าง จากตัวแทนชนิดจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ รองเท้านารีขาวพังงา (*P. thaianum*) รองเท้านารีขาวสตูล (*P. niveum*) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*P. concolor*) รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*P. exul*) รองเท้านารีเกรย์ (*P. niveum + godefroyae*) รองเท้านารีฝ้ายหยอ (*P. bellatulum*) และไม้ป่าเกาะพนัง (*P. godefroyae*) (ภาพภาคผนวกที่ 1) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

BLAST พบว่า มีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity อยู่ระหว่าง 98-99 เปอร์เซ็นต์ โดยคัดเลือกความเหมือนที่สุด 3 อันดับแรก ซึ่งพบมีความเหมือนกับ *P. niveum* *P. appletonianum* *P. bullenianum* และ *P. glaucophyllum* ในฐานข้อมูล ดังแสดงในตารางที่ 4 อย่างไรก็ตามชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีที่พบในประเทศไทยนั้นตรงกับอีกหลายชนิดที่พบในโลก เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลเพิ่มเติมข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดของยีน *matK* กับชนิดกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีที่พบในฐานข้อมูล จึงทำให้ชนิดที่มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมากที่สุดอาจจะไม่ตรงกันกับตัวอย่างที่ทำการทดลอง ดังนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวควรนำไปลงในฐานข้อมูล BLAST ต่อไป

ตารางที่ 4 ค่าความเหมือน (%Identity) 3 อันดับแรกของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีที่พบในประเทศไทยเทียบกับฐานข้อมูล BLAST

ชนิดกล้วยไม้รองเท้านารี	ค่าความเหมือน (%Identity) จากฐานข้อมูล BLAST			
	<i>P. niveum</i>	<i>P. appletonianum</i>	<i>P. bullenianum</i>	<i>P. glaucophyllum</i>
1. รองเท้านารีขาวพังงา <i>P. thaianum</i>	99	99	98	-
2. รองเท้านารีขาวพังงา <i>P. thaianum</i>	99	99	98	-
3. รองเท้านารีขาวสตูล <i>P. niveum</i>	99	99	-	99
4. รองเท้านารีขาวสตูล <i>P. niveum</i>	99	99	-	99
7. รองเท้านารีเหลืองปราจีน <i>P. concolor</i>	99	99	-	99
8. รองเท้านารีเหลืองปราจีน <i>P. concolor</i>	99	99	-	99
10. รองเท้านารีเหลืองกระบี่ <i>P. exul</i>	-	99	99	99
11. รองเท้านารีเหลืองกระบี่ <i>P. exul</i>	-	99	99	99
15. รองเท้านารีเกรย์ <i>P. niveum</i> + <i>godefroyae</i>	99	99	-	99
16. รองเท้านารีเกรย์ <i>P. niveum</i> + <i>godefroyae</i>	99	98	-	99
17. รองเท้านารีฝ้ายหยก <i>P. bellatulum</i>	99	99	-	99
30. ไม้ป่าเกาะพนัก <i>P. godefroyae</i>	-	99	99	99
32. ไม้ป่าเกาะพนัก <i>P. godefroyae</i>	-	99	99	99

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การประยุกต์เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้า ใช้กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 25 ตัวอย่าง จาก 12 สายพันธุ์ พบว่า จากไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 101 คู่สาย สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ 61 คู่สาย สามารถคัดเลือกไพรเมอร์จากผลการแสดงแถบดีเอ็นเอแถบเดียวหรือ 1 ตำแหน่ง บนเจลอะกาโรสได้จำนวน 10 คู่สาย ได้แก่ Vandbirdo_003, Vandbirdo_018, Vandbirdo_040, Vandbirdo_042, Vandbirdo_068, Vandbirdo_080, Vandbirdo_084, Vandbirdo_094, Vandbirdo_097 และ Vandbirdo_098 ตามลำดับ เมื่อบันทึกผลด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System แสดงให้เห็นลักษณะแถบดีเอ็นเอต่าง (polymorphic) ได้ในทุกไพรเมอร์ จากนั้นไพรเมอร์ Vandbirdo_018, Vandbirdo_040, Vandbirdo_084, และ Vandbirdo_097 ถูกนำไปติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ เพื่อนำไปศึกษาขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พบว่า แสดงผลชิ้นส่วนดีเอ็นเอต่างแบบโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกต ที่น่าสนใจคือไพรเมอร์

Vandbirdo_018 แสดงขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันแบบโฮโมไซโกตใน ร่องเท่านั้นาริอ่างทอง (*P. godefroyae*) และ ร่องเท่านั้นาริเหลืองประจวบ (*P. concolor*) คือ 252 และ 222 เบส ตามลำดับ และแสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอต่างแบบเฮเทโรไซโกตใน ร่องเท่านั้นาริเหลืองปราจีนอุตรดิตถ์ (*P. concolor*) คือ 241/278 เบส จากการศึกษาไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ทั้งหมด 10 คู่สาย จะถูกนำไปศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ร่องเท่านั้นาริต่อไป

2. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลด้วยเทคนิคไอเอสเอสอาร์ จากการทดสอบไพรเมอร์ชนิด ISSR จำนวน 60 เส้น ได้คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลักษณะต่างมาจำนวน 16 เส้น ได้แก่ UBC807 UBC818 UBC827 UBC841 UBC844 UBC846 UBC848 UBC850 UBC856 UBC857 UBC864 UBC868 UBC887 (AGC)5AY (ACGA)8 และ CT(CCT)₃CAC พบว่า ให้แถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 250-1200 เบส แสดงแถบดีเอ็นเอต่ำสุดเท่ากับ 7 แถบ ในไพรเมอร์ (ACGA)8 และแสดงแถบดีเอ็นเอสูงสุด 12 แถบ ในไพรเมอร์ UBC841 UBC844 และ UBC857 และไม่พบแถบดีเอ็นเอที่สามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลร่องเท่านั้นาริ จึงไม่ได้พัฒนาเป็นเครื่องหมายโมกุลที่ใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ ทั้งนี้การจัดทำ phylogenetic tree ของกล้วยไม้ร่องเท่านั้นาริ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ร่องเท่านั้นาริขาวพังงา ร่องเท่านั้นาริขาวสตูล ร่องเท่านั้นาริเหลืองตรัง ร่องเท่านั้นาริเกรยี ร่องเท่านั้นาริเหลืองปราจีน และร่องเท่านั้นาริฝายหอย กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ร่องเท่านั้นาริเหลืองกระบี่ ภูเก็ตอมตะ ภรณ์เรศ แจ็กเซียน กฤษโกลล สะพานหิน53 ดลวิสิทธิ สุนทรีย ชำนาญสินธุ์ ไตรมาส และไม้ป่าเกาะพนั มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของ phylogenetic tree อยู่ในช่วง 0.57-1.00 ให้ค่าดัชนีความเหมือนกันมากที่สุดเท่ากับ 0.995 ในร่องเท่านั้นาริเหลืองปราจีน กับร่องเท่านั้นาริฝายหอย ซึ่งเป็นไปตามรายงานของประเดิม (2543) ที่ใช้เทคนิค RAPD และค่าดัชนีความเหมือนต่ำสุดเท่ากับ 0.512 ในร่องเท่านั้นาริขาวสตูลกับร่องเท่านั้นาริสุนทรีย

3. การทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดของกล้วยไม้ร่องเท่านั้นาริสามารถใช้ยีน *matK* ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลร่องเท่านั้นาริ 13 ตัวอย่าง จากตัวแทนชนิดจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ ร่องเท่านั้นาริขาวพังงา (*P. thainum*) ร่องเท่านั้นาริขาวสตูล (*P. niveum*) ร่องเท่านั้นาริเหลืองปราจีน (*P. concolor*) ร่องเท่านั้นาริเหลืองกระบี่ (*P. exul*) ร่องเท่านั้นาริเกรยี (*P. niveum + godefroyae*) ร่องเท่านั้นาริฝายหอย (*P. bellatulum*) และไม้ป่าเกาะพนั (*P. godefroyae*) ได้ผลผลิตพีซีอาร์ประมาณ 945 เบส นำไปวิเคราะห์และสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA6 พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ร่องเท่านั้นาริขาวพังงา ร่องเท่านั้นาริขาวสตูล ร่องเท่านั้นาริเหลืองปราจีน ร่องเท่านั้นาริเกรยี และร่องเท่านั้นาริฝายหอย กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ร่องเท่านั้นาริเหลืองกระบี่ และไม้ป่าเกาะพนั ซึ่งสอดคล้องกับผลของเทคนิค ISSR มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของ phylogenetic tree อยู่ในช่วง 0-0.005 (ภาพที่ 8) ให้ค่าระยะความห่างมากที่สุดเท่ากับ 0.017 ในร่องเท่านั้นาริเหลืองกระบี่กับร่องเท่านั้นาริขาวพังงา และร่องเท่านั้นาริเหลืองกระบี่กับร่องเท่านั้นาริเกรยี ค่าระยะความห่างมากที่สุดเท่ากับ 0.000 ในร่องเท่านั้นาริขาวสตูลกับร่องเท่านั้นาริขาวพังงา เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล BLAST พบว่า มีค่าเปอร์เซ็นต์ Identity อยู่ระหว่าง 98-99 เปอร์เซ็นต์ โดยคัดเลือกความเหมือนที่สุด 3 อันดับแรก ซึ่งพบมีความเหมือนกับ *P. niveum* *P. appletonianum* *P. bullenianum* และ *P. glaucophyllum* อย่างไรก็ตามชนิดของกล้วยไม้ร่องเท่านั้นาริที่พบในประเทศไทยอาจจะตรงกับอีกหลายชนิดที่พบในโลก ชนิดที่พบความเหมือนที่สุดอาจจะไม่ตรงกัน เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลเพิ่มเติมดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ของยีน *matK* กับชนิดกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีที่พบในไทยในฐานะข้อมูล ดังนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวควรนำไปลงในฐานข้อมูล BLAST ต่อไป นอกจากนี้การนำเอาดีเอ็นเอบาร์โค้ดมาศึกษาความสัมพันธ์นั้น มีขั้นตอนที่ง่ายและไม่ซับซ้อน จึงเป็นทางเลือกที่ดีในการนำมาใช้กับกล้วยไม้รองเท้านารีเมื่อเทียบกับเทคนิค ISSR

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์:

สามารถนำไพรเมอร์ที่ได้จากการทดลองนี้ รวมถึงเทคนิค SSR ISSR และดีเอ็นเอบาร์โค้ด ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีที่เก็บรวบรวมไว้ตามหน่วยงานต่างๆ ได้ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* จากกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีสามารถนำไปลงในฐานข้อมูล BLAST เพื่อเป็นฐานข้อมูลของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีของประเทศไทยต่อไป

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณชมรมกล้วยไม้รองเท้านารีแห่งประเทศไทยที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีจำนวน 25 ตัวอย่าง ในการศึกษาการประยุกต์เครื่องหมายโมเลกุล SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้า ใช้กับกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี และให้คำปรึกษาร่วมกับคำแนะนำสำหรับการทดลองนี้

12. เอกสารอ้างอิง

จักรพันธ์ วณิชกุล. 2549. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี และการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิดในประเทศไทยโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งไอทีเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประเดิม วณิชชนานันท์. 2543. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีหมวด *Brachypetalum* ด้วยเทคนิค RAPD. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วินัย สมประสงค์, พงษ์ศักดิ์ พลตรี, ปราโมทย์ ไตรบุญ, กาญจนา พฤษพันธ์, วิลาสินี ปานอินทร์, บดินทร์ สอนสุภาพ และประนัย เพ็ญจิตร. 2550. พรรณไม้แห่งแผ่นดิน เฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เนื่องในโอกาสสมโภชฉลองพระชนมพรรษา 80 พรรษา 5 ธันวาคม 2550. เอกสารเผยแพร่พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ ลำดับที่ 2, กรมวิชาการเกษตร. 133 หน้า

เศรษฐมนันต์ กาญจนกุล. 2551. ร้อยพรรณพฤกษา กล้วยไม้รองเท้านารี. สำนักพิมพ์เศรษฐศิลป์. กรุงเทพฯ. 112 น.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ถนนพหลโยธิน จตุจักร กรุงเทพฯ. 269 หน้า

อบฉันท ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้ไทย. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. กรุงเทพฯ. 461 หน้า

อรรถน มงคลพร. 2548. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์. ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม. 95 หน้า.

- อุไร จิรมงคลการ. 2550. กล้วยไม้รองเท้านารี ฉบับปรับปรุงใหม่. พิมพ์ครั้งที่ 5. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. กรุงเทพฯ. 224 หน้า
- Chung, S.Y., S. H. Choi, M. J. Kim, K. E. Yoon, G. P. Lee, J. S. Lee and K. H. Rye. 2006. Genetic relationship and differentiation of *Paphiopedilum* and *Phragmepedium* based on RAPD analysis. Sci. Hort. 130: 117-123.
- Hayden, M.J. and P.J. Sharp. 2001. Targeted development of informative microsatellite (SSR) markers. Nucleic Acids Research, 29(8) e44 : 1-6.
- Janzen H. Danniell. 2009. A DNA barcode for land plants. PNAS, vol. 106, no. 31: 12794-12797.
- Li, A., Y. Luo and S. Ge. 2002. A preliminary study on Conservation genetics of an endangered orchid (*Paphiopedilum micranthum*) from southwestern china. Biochemical Genetics. 17: 360-366.
- Lodhi, M.A., Guang-NingYe, Norman F.Weeden and Bruce I.Reisch.1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine Cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis*. Plant Molecular Biology Reporter 12(1) : 6-13.
- Parveen, I., H.K. Signh., S. Raghuvanshi and U.C. Pradhan. 2011. DNA barcoding of endangered Indian *Paphiopedilum* species. Molecular Ecology Resources. Doi:10.1111/j.1775-0998.2011.03071.x. 9 pages.
- Sajib, A.M., Md.M. Hossain, A.T.M.J Mosnaz, H. Hossain, Md.M. Islam, Md.S. Ali and S.H. Prodhan. 2012. SSR marker-based molecular characterization and genetic diversity analysis of aromatic landraces of rice (*Oryza sativa* L.). J.BioSci. Biotech, 1(2) : 107-116.
- Yu, K., S.J. Park, V. Poysa and P.Gepts. 2000. Integration of Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Into a Molecular Linkage Map of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). The American Genetic Association 91: 429-434.

13. ภาคผนวก

ภาพผนวกที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 7 ชนิด ได้แก่ รองเท้านารีขาวพังงา (*Paphiopedilum thaianum*) รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum*) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor*) รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphiopedilum exul*) รองเท้านารีเกรย์ (*Paphiopedilum niveum + godefroyae*) รองเท้านารีเหลืองตรัง (*Paphiopedilum godefroyae*) และรองเท้านารีฟากหอย (*Paphiopedilum bellatulum*) มีลักษณะดังต่อไปนี้

>matK01 *Paphiopedilum thalianum*

CGAGTCGAAGTATATACTTTTATACGATACAAAACCTGTTTTTTTGAGGATCCACTGTGATAACGACAAAGATTT
CTACATATCCGGCAAAATCGATCAATAATATCAGAATCCGATAAAATCGGTCCAGATCGGTTTACTAATAGGATG
ACCCAATACAGTACAAAATTTAGCTTTCGACAATGATCCAATAAGAGACATGACTGGGACTATGGTATATAATT
TATGAGTCATAATATTTATTATAAATGAATTCTCTAGCATTTTATTTCTTACTACCAAATGATTTTCTAGTACA
CTTGAAAAATATCCCAGAAAAGAGAAGGAATAGTTGGATAATTGCTTTTATATGGATCCTATACGGTTGAGCCCA
AAAGTGAAAAATAAGATTGCCAAAAATTCACAAGATGAAATTTCCATTTATTCATCAGAATAAGAGTTCCCTTTG
AAGCCAGAATTGCCTTTCCCTTGATATCGAACATAATGCATGAAAGTATCCTTGAGAAAGCATAGGATCTTCTGA
AAAGAATTACAACACACTACTATAAGATGCTCTATTTTTTACATAGAAATGTGTTTCGCTCAAGAAAGACTCCAGG
GGATGTTGATCGTAAATAAGAAGACTGTTTACGAATAAACAGGAATAAATATTCGCATTTCATATACATAAGAAT
TATATAGGAACCAAAGGAATTTTTTCTTTCTTTTGGAAAGGCGTAAATGAATTTCTTTGAAGTAACGAGACTA
TTCAAATTATGATATTCGTGGAAAAGAAATCGCAATAAATGCAAAGAAGGAACATCCTTGATCCAGCATTGAAG
TACTTGAACCAAGATTTCCAGATGTATGGGATGAGGTATTAAGTAGATCTGACACATAAATTCAAATGTAAAAAT
TTGTCTCTAAAAAGGGAATATTGATGGAATAGATCG

>matK02 *Paphiopedilum thalianum*

TTCTAGCACCACGAAGTCGAAGTATATACTTTTATACGATACAAAACCTGTTTTTTTGAGGATCCACTGTGATAA
CGACAAAGATTTCTACATATCCGGCAAAATCGATCAATAATATCAGAATCCGATAAAATCGGTCCAGATCGGTTT
ACTAATAGGATGACCCAATACAGTACAAAATTTAGCTTTCGACAATGATCCAATAAGAGACATGACTGGGACTA
TGGTATATAATTTATGAGTCATAATATTTATTATAAATGAATTCTCTAGCATTTTATTTCTTACTACCAAATGA
TTTTCTAGTACACTTGAAAAATATCCCAGAAAAGAGAAGGAATAGTTGGATAATTGCTTTTATATGGATCCTATA
CGGTTGAGCCCAAAAGTGAAAAATAAGATTGCCAAAAATTCACAAGATGAAATTTCCATTTATTCATCAGAATAA
GAGTTCCCTTTGAAGCCAGAATTGCCTTTCCCTTGATATCGAACATAATGCATGAAAGTATCCTTGAGAAAGCAT
AGGATCTTCTGAAAAGAATTACAACACACTACTATAAGATGCTCTATTTTTTACATAGAAATGTGTTTCGCTCAAG
AAAGACTCCAGGGGATGTTGATCGTAAATAAGAAGACTGTTTACGAATAAACAGGAATAAATATTCGCATTTCAT
ATACATAAGAATTATATAGGAACCAAAGGAATTTTTTCTTTCTTTTGGAAAGGCGTAAATGAATTTCTTTGAA
GTAACGAGACTATTCAAATTATGATATTCGTGGAAAAGAAATCGCAATAAATGCAAAGAAGGAACATCCTTGAT
CCAGCATTGAAGTACTTGAACCAAGATTTCCAGATGTATGGGATGAGGTATTAGTAGATCTGACACATAAATTC
AATGTAAAAATTTGTCTCTAAAAAGGGAATATTGAATGAAATAGA

>matK03 *Paphiopedilum niveum*

TTCTAGCCCCCCCCGAAGTCGAAGTATATACTTTTATACGATACAAAACCTGTTTTTTTGAGGATCCACTGTGATA
ACGACAAAGATTTCTACATATCCGGCAAAATCGATCAATAATATCAGAATCCGATAAAATCGGTCCAGATCGGTT
TACTAATAGGATGACCCAATACAGTACAAAATTTAGCTTTCGACAATGATCCAATAAGAGACATGACTGGGACT
ATGGTATATAATTTATGAGTCATAATATTTATTATAAATGAATTCTCTAGCATTTTATTTCTTACTACCAAATG
ATTTTCTAGTACACTTGAAAAATATCCCAGAAAAGAGAAGGAATAGTTGGATAATTGCTTTTATATGGATCCTAT
ACGGTTGAGCCCAAAAGTGAAAAATAAGATTGCCAAAAATTCACAAGATGAAATTTCCATTTATTCATCAGAATA
AGAGTTCCCTTTGAAGCCAGAATTGCCTTTCCCTTGATATCGAACATAATGCATGAAAGTATCCTTGAGAAAGCA
TAGGATCTTCTGAAAAGAATTACAACACACTACTATAAGATGCTCTATTTTTTACATAGAAATGTGTTTCGCTCAA
GAAAGACTCCAGGGGATGTTGATCGTAAATAAGAAGACTGTTTACGAATAAACAGGAATAAATATTCGCATTCA
TATACATAAGAATTATATAGGAACCAAAGGAATTTTTTCTTTCTTTTGGAAAGGCGTAAATGAATTTCTTTGA
AGTAACGAGACTATTCAAATTATGATATTCGTGGAAAAGAAATCGCAATAAATGCAAAGAAGGAACATCCTTGA
TCCAGCATTGAAGTACTTGAACCAAGATTTCCAGATGTATGGGATGAGGTATTAAGTAGATCTGACACATAAAT
CAAATGTAAAAATTTGTCTCTAAAAAGGGAATATTGATGGAATAGATCGG

>matK04 *Paphiopedilum niveum*

TCTAGCACACGAAAGTCGAAGTATATACTTTTATACGATACAAAACCTGTTTTTTTGAGGATCCACTGTGATAAC
GACAAAGATTTCTACATATCCGGCAAAATCGATCAATAATATCAGAATCCGATAAAATCGGTCCAGATCGGTTTA
CTAATAGGATGACCCAATACAGTACAAAATTTAGCTTTCGACAATGATCCAATAAGAGACATGACTGGGACTAT
GGTATATAATTTATGAGTCATAATATTTATTATAAATGAATTCTCTAGCATTTTATTTCTTACTACCAAATGAT
TTTCTAGTACACTTGAAAAATATCCCAGAAAAGAGAAGGAATAGTTGGATAATTGCTTTTATATGGATCCTATAC
GGTTGAGCCCAAAAGTGAAAAATAAGATTGCCAAAAATTCACAAGATGAAATTTCCATTTATTCATCAGAATAAG
AGTTCCCTTTGAAGCCAGAATTGCCTTTCCCTTGATATCGAACATAATGCATGAAAGTATCCTTGAGAAAGCATA
GGATCTTCTGAAAAGAATTACAACACACTACTATAAGATGCTCTATTTTTTACATAGAAATGTGTTTCGCTCAAGA
AAGACTCCAGGGGATGTTGATCGTAAATAAGAAGACTGTTTACGAATAAACAGGAATAAATATTCGCATTTCATA
TACATAAGAATTATATAGGAACCAAAGGAATTTTTTCTTTCTTTTGGAAAGGCGTAAATGAATTTCTTTGAAG
TAACGAGACTATTCAAATTATGATATTCGTGGAAAAGAAATCGCAATAAATGCAAAGAAGGAACATCCTTGATC

CAGCATTGAAGTACTTGAACCAAGATTTCCAGATGTATGGGATGAGGTATTAGTAGATCTGACACATAATTCAA
ATGTAAAAATTTGTCCTCTAAAAAGGGAAATATTGAATGAAAAGATCGGA

>matK07 *Paphiopedilum concolor*

TTTCTAGCCCCCGAAGTCGAAGTATATACTTTATACGATACAAAACCTGTTTTTTTGAGGATCCACTGTGAT
AACGACAAAGATTTCTACATATCCGGCAAAATCGATCAATAATATCAGAATCCGATAAAATCGGTCCAGATCGGT
TTACTAATAGGATGACCCAATACAGTACAAAATTGAGCTTTCGACAATGATCCAATAAGAGACATGACTGGGAC
TATGGTATATAATTTATGAGTCATAATATTTATTATAAATGAATTCTCTAGCATTTTATTTCTTACTACCAAAT
GATTTTCTAGTACACTTGAAAAATATCCCAGAAAAGAGAAGGAATAGTTGGATAAATTGCTTTATATGGATCCTA
TACGGTTGAGCCCAAAAGTGAAAATAAGATTGCCAAAATTCACAAGATGAAATTTCCATTTATTCATCAGAAT
AAGAGTTCCCTTTGAAGCCAGAATTGCCTTTTCCTTGATATCGAACATAATGCATGAAAGTATCCTTGAGAAAGC
ATAGGATCTTCTGAAAAGAATTACAACACACTACTATAAGATGCTCTATTTTTTACATAGAAATGTGTTTCGCTCA
AGAAAGACTCCAGAGGATGTTGATCGTAAATAAGAAGACTGTTTACGAATAAACAGGAATAAATATTCGCATTC
ATATACATAAGAATTATATAGGAACCAAAGGAATTTTTTCTTTCTTTTTGAAAAGGCGTAAATGAATTTCTTTG
AAGTAACGAGACTATTCAAATTATGATATTCGTGGAAAAGAAATCGCAATAAATGCAAAGAAGGAACATCCTTG
ATCCAGCATTGAAGTACTTGAACCAAGATTTCCAGATGTATGGGATGAGGTATTAGTAGATCTGACACATAATT
CAAATGTAAAAATTTGTCCTCTAAAAAGGGAAATATTGAG

>matK08 *Paphiopedilum concolor*

TTTCTAGCACCCCGAAAGTCGAAGTATATACTTTATACGATACAAAACCTGTTTTTTTGAGGATCCACTGTGAT
AACGACAAAGATTTCTACATATCCGGCAAAATCGATCAATAATATCAGAATCCGATAAAATCGGTCCAGATCGGT
TTACTAATAGGATGACCCAATACAGTACAAAATTGAGCTTTCGACAATGATCCAATAAGAGACATGACTGGGAC
TATGGTATATAATTTATGAGTCATAATATTTATTATAAATGAATTCTCTAGCATTTTATTTCTTACTACCAAAT
GATTTTCTAGTACACTTGAAAAATATCCCAGAAAAGAGAAGGAATAGTTGGATAAATTGCTTTATATGGATCCTA
TACGGTTGAGCCCAAAAGTGAAAATAAGATTGCCAAAATTCACAAGATGAAATTTCCATTTATTCATCAGAAT
AAGAGTTCCCTTTGAAGCCAGAATTGCCTTTTCCTTGATATCGAACATAATGCATGAAAGTATCCTTGAGAAAGC
ATAGGATCTTCTGAAAAGAATTACAACACACTACTATAAGATGCTCTATTTTTTACATAGAAATGTGTTTCGCTCA
AGAAAGACTCCAGAGGATGTTGATCGTAAATAAGAAGACTGTTTACGAATAAACAGGAATAAATATTCGCATTC
ATATACATAAGAATTATATAGGAACCAAAGGAATTTTTTCTTTCTTTTTGAAAAGGCGTAAATGAATTTCTTTG
AAGTAACGAGACTATTCAAATTATGATATTCGTGGAAAAGAAATCGCAATAAATGCAAAGAAGGAACATCCTTG
ATCCAGCATTGAAGTACTTGAACCAAGATTTCCAGATGTATGGGATGAGGTATTAGTAGATCTGACACATAATT
CAAATGTAAAAATTTGTCCTCTAAAAAGGGAAATATTGAGGAAA

>matK10 *Paphiopedilum exul*

TTCTAGCACACGAAGTCGAAGTATATACTTTATACGATACAAAACCTGTTTTTTTGAGGATCCACTGTGATAA
CGACAAAGATTTCTACATATCCGGCAAAATCGATCAATAATATCAGAATCCGATAAAATCGGTCCAGATCGGTTT
ACTAATAGGATGACCCAATACAGTACAAAATTGAGCTTTCGACAATGATCCAATAAGAGACATGACTGGGACTA
TGGTATATAATCTATGAGTCATAATATTTATTATAAATGAATTCTCTAGCATTTTATTTCTTACTACCAAATGA
TTTTCTAGTACACTTGAAAAATACCCCAGAAAAGAGAAGGAATAGTTGGATAAATTGCTTTATATGGATCCTATA
CGGTTGAGACCAAAAGTGAAAATAAGATTGCCAAAATTCACAAGATGAAATTTCCATTTATTCATCAGAATAA
GAGTTCCCTTTGAAGCCAGAATTGCCTTTTCCTTGATATCGAACATAATGCATGAAAGTATCCTTGAGAAAGCAT
AGGATCTTCTGAAAAGAATTACAACACACTACTATAAGATGCTCTATTTTTTACATAGAAATGTGTTTCGCTCAAG
AAAGACTCCAGAGGATGTTGATCGTAAATAAGAAGATTGTTTACGAATAAATAGGAATAAATATTCGCATTTCAT
ATACATAAGAATTATATAGGAACCAAAGGAATTTTTTCTTTCTTTTTGAAAAGGCGTAAATGAATTTCTTTGAA
GTAACGAGACTATTCAAATTATGATATTCGTGGAAAAGAAATCGCAATAAATGCAAAGAAGGAACATCCTTGAT
CCAGCATTGAAGTACTTGAACCAAGATTTCCAGATGTATGGGATGAGGTAATTAGTAGATCTGACACATAATTC
AAATGTAAAAATTTGTCCTCTAAAAAGGGAAATATTGATGGAATAGATCG

>matK11 *Paphiopedilum exul*

AAATAAAAGTATATACTTTATAGGATACGATAACGTGTTTTTTTTTGAGGATCCACTGTGATAACGACAAAGATTT
CTACATATCCGGCAAAATCGATCAATAATATCAGAATCCGATAAAATCGGTCCAGATCGGTTTACTAATAGGATG
ACCAATACAGTACAAAATTGAGCTTTCGACAATGATCCAATAAGAGACATGACTGGGACTATGGTATATAATC
TATGAGTCATAATATTTATTATAAATGAATTCTCTAGCATTTTATTTCTTACTACCAAATGATTTTCTAGTACA
CTTGAAAAATACCCCAGAAAAGAGAAGGAATAGTTGGATAAATTGCTTTATATGGATCCTATACGGTTGAGACCA
AAAGTGAAAAATAAGATTGCCAAAATTCACAAGATGAAATTTCCATTTATTCATCAGAATAAGAGTTCCCTTTG
AAGCCAGAATTGCCTTTTCCTTGATATCGAACATAATGCATGAAAGTATCCTTGAGAAAGCATAGGATCTTCTGA
AAAGAATTACAACACACTACTATAAGATGCTCTATTTTTTACATAGAAATGTGTTTCGCTCAAGAAAGACTCCAGA
GGATGTTGATCGTAAATAAGAAGATTGTTTACGAATAAATAGGAATAAATATTCGCATTTCATATACATAAGAAT

TATATAGGAACCAAAGGAATTTTTCTTTCTTTTGGAAAAGGCGTAAATGAATTTCTTTGAAGTAACGAGACTA
TTCAAATTATGATATTCGTGGAAAAGAAATCGCAATAAATGCAAAGAAGGAACATCCTTGATCCAGCATTGAAG
TACTTGAACCAAGATTTCCAGATGTATGGGATGAGGTATTAGTAGATCTGACACATAATTCAAATGTAAAAATT
TGTCCTCTAAAAAGGGAAATATTGA

>matK15 *Paphiopedilum niveum* + *godefroyae*

TCTAGCCCCCCCCGAAGTCGAAGTATATACCTTTATACGATACAAAACCTGTTTTTTTGAGGATCCACTGTGATAA
CGACAAAGATTTCTACATATCCGGCAAAATCGATCAATAATATCAGAATCCGATAAAATCGGTCCAGATCGGTTT
ACTAATAGGATGACCCAATACAGTACAAAATTTAGCTTTTCGACAATGATCCAATAAGAGACATGACTGGGACTA
TGGTATATAAATTTATGAGTCATAATATTTATTATAAATGAATTCTCTAGCATTTTATTTCTTACTACCAAATGA
TTTTCTAGTACACTTGAAAAATATCCCAGAAAAGAGAAGGAATAGTTGGATAATTGCTTTTATATGGATCCTATA
CGGTTGAGCCCCAAAAGTGAAAATAAGATTGCCAAAATTCACAAGATGAAATTTCCATTTATTCATCAGAATAA
GAGTTCCCTTTGAAGCCAGAATTGCCTTTCCTTGATATCGAACATAATGCATGAAAGTATCCTTGAGAAAGCAT
AGGATCTTCTGAAAAGAATTACAACACACTACTATAAGATGCTCTATTTTTTACATAGAAAATGTGTTTCGCTCAAG
AAAGACTCCAGGGGATGTTGATCGTAAATAAGAAGACTGTTTACGAATAAACAGGAATAAATATTTCGCATTCAT
ATACATAAGAATTATATAGGAACCAAAGGAATTTTTTCTTTCTTTTGGAAAAGGCGTAAATGAATTTCTTTGAA
GTAACGAGACTATTCAAATTATGATATTCGTGGAAAAGAAATCGCAATAAATGCAAAGAAGGAACATCCTTGAT
CCAGCATTGAAGTACTTGAACCAAGATTTCCAGATGTATGGGATGAGGTATTAGTAGATCTGACACATAATTC
AAATGTAAAAATTTGTCTCTAAAAAGGGAAATATTGATGAAATTAGAT

>matK16 *Paphiopedilum niveum* + *godefroyae*

TTCTAGCCCCCCCCGAAGTCGAAGTATATACCTTTATACGATACAAAACCTGTTTTTTTGAGGATCCACTGTGAT
AACGACAAAGATTTCTACATATCCGGCAAAATCGATCAATAATATCAGAATCCGATAAAATCGGTCCAGATCGGT
TTACTAATAGGATGACCCAATACAGTACAAAATTTAGCTTTTCGACAATGATCCAATAAGAGACATGACTGGGAC
TATGGTATATAAATTTATGAGTCATAATATTTATTATAAATGAATTCTCTAGCATTTTATTTCTTACTACCAAAT
GATTTTCTAGTACACTTGAAAAATATCCCAGAAAAGAGAAGGAATAGTTGGATAATTGCTTTTATATGGATCCTA
TACGGTTGAGCCCCAAAAGTGAAAATAAGATTGCCAAAATTCACAAGATGAAATTTCCATTTATTCATCAGAAT
AAGAGTTCCCTTTGAAGCCAGAATTGCCTTTCCTTGATATCGAACATAATGCATGAAAGTATCCTTGAGAAAGC
ATAGGATCTTCTGAAAAGAATTACAACACACTACTATAAGATGCTCTATTTTTTACATAGAAAATGTGTTTCGCTCA
AGAAAGACTCCAGGGGATGTTGATCGTAAATAAGAAGACTGTTTACGAATAAACAGGAATAAATATTTCGCATTC
ATATACATAAGAATTATATAGGAACCAAAGGAATTTTTTCTTTCTTTTGGAAAAGGCGTAAATGAATTTCTTTG
AAGTAACGAGACTATTCAAATTATGATATTCGTGGAAAAGAAATCGCAATAAATGCAAAGAAGGAACATCCTTG
ATCCAGCATTGAAGTACTTGAACCAAGATTTCCAGATGTATGGGATGAGGTAAATTAGTAGATCTGACACATAAT
TCAAATGTAAAAATTTGTCTCTAAAAAGGGAAATATTGAAGGAAATTAGATCG

>matK17 *Paphiopedilum bellatulum*

TCTAGCACCACGAAGTCGAAGTATATACCTTTATACGATACAAAACCTGTTTTTTTGAGGATCCACTGTGATAAC
GACAAAGATTTCTACATATCCGGCAAAATCGATCAATAATATCAGAATCCGATAAAATCGGTCCAGATCGGTTTA
CTAATAGGATGACCCAATACAGTACAAAATTTAGCTTTTCGACAATGATCCAATAAGAGACATGACTGGGACTAT
GGTATATAAATTTATGAGTCATAATATTTATTATAAATGAATTCTCTAGCATTTTATTTCTTACTACCAAATGAT
TTTCTAGTACACTTGAAAAATATCCCAGAAAAGAGAAGGAATAGTTGGATAATTGCTTTTATATGGATCCTATAC
GGTTGAGCCCCAAAAGTGAAAATAAGATTGCCAAAATTCACAAGATGAAATTTCCATTTATTCATCAGAATAAG
AGTTCCCTTTGAAGCCAGAATTGCCTTTCCTTGATATCGAACATAATGCATGAAAGTATCCTTGAAAAAGCATA
GGATCTTCTGAAAAGAATTACAACACACTACTATAAGATGCTCTATTTTTTACATAGAAAATGTGTTTCGCTCAAGA
AAGACTCCAGAGGATGTTGATCGTAAATAAGAAGACTGTTTACGAATAAACAGGAATAAATATTTCGCATTCATA
TACATAAGAATTATATAGGAACCAAAGGAATTTTTTCTTTCTTTTGGAAAAGGCGTAAATGAATTTCTTTGAAG
TAACGAGACTATTCAAATTATGATATTCGTGGAAAATAAATCGCAATAAATGCAAAGAAGGAACATCCTTGATC
CAGCATTGAAGTACTTGAACCAAGATTTCCAGATGTATGGGATGAGGTATTAGTAGATCTGACACATAATTCAA
ATGTAAAAATTTGTCTCTAAAAAGGGAAATATTGAATGAAATAGATG

>matK30 *Paphiopedilum godefroyae*

TTCTAGCCCCCCCCGAAGTCGAAGTATATACCTTTATACGATACAAAACCTGTTTTTTTGAGGATCCACTGTGATA
ACGACAAAGATTTCTACATATCCGGCAAAATCGATCAATAATATCAGAATCCGATAAAATCGGTCCAGATCGGTT
TACTAATAGGATGACCCAATACAGTACAAAATTTAGCTTTTCGACAATGATCCAATAAGAGACATGACTGGGACT
ATGGTATATAATCTATGAGTCATAATATTTATTATAAATGAATTCTCTAGCATTTTATTTCTTACTACCAAATG
ATTTTCTAGTACACTTGAAAAATACCCAGAAAAGAGAAGGAATAGTTGGATAATTGCTTTTATATGGATCCTAT
ACGGTTGAGACCAAAGTGAAAATAAGATTGCCAAAATTCACAAGATGAAATTTCCATTTATTCATCAGAATA
AGAGTTCCCTTTGAAGCCAGAATTGCCTTTCCTTGATATCGAACATAATGCATGAAAGTATCCTTGAGAAAGCA

TAGGATCTTCTGAAAAGAATTACAACACACTACTATAAGATGCTCTATTTTTACATAGAAATGTGTTTCGCTCAA
GAAAGACTCCAGAGGATGTTGATCGTAAATAAGAAGATTGTTTACGAATAAATAGGAATAAATATTCGCATTCA
TATACATAAGAATTATATAGGAACCAAAGGAATTTTTCTTTCTTTTGGAAAAGGCGTAAATGAATTTCTTTGA
AGTAACGAGACTATTCAAATTATGATATTCGTGGAAAAGAAATCGCAATAAATGCAAAGAAGGAACATCCTTGA
TCCAGCATTGAAGTACTTGAACCAAGATTTCCAGATGTATGGGATGAGGTATTAGTAGATCTGACACATAATTC
AAATGTAAAAATTTGTCCTCTAAAAAGGGAAATATTGAATGAAATAGATCGA

>matK32 *Paphiopedilum godefroyae*

TTTTAACCCCCCCCAGAGTCGAAGTATATACTTTTATACGATACAAAACCTGTTTTTTTGGAGGATCCACTGTGAT
AACGACAAAGATTTCTACATATCCGGCAAATCGATCAATAATATCAGAATCCGATAAATCGGTCCAGATCGGT
TTACTAATAGGATGACCCAATACAGTACAAAATTGAGCTTTCGACAATGATCCAATAAGAGACATGACTGGGAC
TATGGTATATAATCTATGAGTCATAATTTTATTATAAATGAATTCTCTAGCATTTTATTTCTTACTACCAAAT
GATTTTCTAGTACACTTGAAAAATACCCCAGAAAAGAGAAGGAATAGTTGGATAATTGCTTTTATATGGATCCTA
TACGGTTGAGACCAAAAGTGAAAATAAGATTGCCAAAAATTCACAAGATGAAATTTCCATTTATTCATCAGAAT
AAGAGTTCCCTTTGAAGCCAGAATTGCCTTTCCTTGATATCGAACATAATGCATGAAAGTATCCTTGAGAAAGC
ATAGGATCTTCTGAAAAGAATTACAACACACTACTATAAGATGCTCTATTTTTTACATAGAAATGTGTTTCGCTCA
AGAAAGACTCCAGAGGATGTTGATCGTAAATAAGAAGATTGTTTACGAATAAATAGGAATAAATATTCGCATTTC
ATATACATAAGAATTATATAGGAACCAAAGGAATTTTTCTTTCTTTTGGAAAAGGCGTAAATGAATTTCTTTG
AAGTAACGAGACTATTCAAATTATGATATTCGTGGAAAAGAAATCGCAATAAATGCAAAGAAGGAACATCCTTG
ATCCAGCATTGAAGTACTTGAACCAAGATTTCCAGATGTATGGGATGAGGTAATTAGTAAGATTCTGACACATA
ATTCAAATGTAAAAATTTGTCCTCTAAAAAGGGAAATATTGATGGAAATAGAATGGA



Paphiopedilum thaianum



Paphiopedilum niveum



Paphiopedilum concolor



Paphiopedilum exul



P. niveum + godefroyae



Paphiopedilum godefroyae



Paphiopedilum bellatulum

ภาพผนวกที่ 2 ลักษณะดอกของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี 7 ชนิด ดังนี้ รองเท้านารีขาวพังงา (*Paphiopedilum thaianum*) รองเท้านารีขาวสตูล (*Paphiopedilum niveum*) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor*) รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphiopedilum exul*) รองเท้านารีเกรย์ (*Paphiopedilum niveum + godefroyae*) รองเท้านารีเหลืองตรัง (*Paphiopedilum godefroyae*) และรองเท้านารีฝายหอย (*Paphiopedilum bellatulum*)

^{1/} สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

^{2/} สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1

^{3/} สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 2