รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

2. **โครงการวิจัย** : การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกและปรับปรุงพันธุ์พืช

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSRs

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) **Destruction of DNA printing of Dendrobium orchid using SSR molecular markers.**

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง : นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน :

นางสาวอรุโณทัย ซาววา สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นางสุภาวดี ง้อเหรียญ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **บทคัดย่อ**

จากการสุ่มนำไพร์เมอร์ชนิด SSr ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้งหมดจำนวน 70 คู่สาย มาทำ PCR กับตัวอย่างกล้วยไม้สายพันธุ์สกุลหวาย ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียงไพร์เมอร์ 3 คู่สายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างได้ คือ ไพร์เมอร์ Vandbirdo_022, Vandbirdo_026, และ Vandbirdo_094 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ขนาดแถบแบน จาก ไพร์เมอร์ Vandbirdo_022 ≈ 200 bp Vandbirdo_026 ≈ 280 bp และ Vandbirdo_094 ≈ 240 bp เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนโดยใช้ไพรเมอร์ติดสีฟลูออเรสเซนต์ที่จำเพาะ 3 ไพร์เมอร์ กับ DNA กล้วยไม้ 96 สายพันธุ์ หลังจากเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR แล้ว ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis พบว่า ไพร์เมอร์ Vandbirdo_026 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอกับตัวอย่างสายพันธุ์

กล้วยไม้ได้ 74 ตัวอย่าง ขนาดแถบแบน ≈ 280 bp และไพร์เมอร์ Vandbirdo_094 สามารถเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอกับตัวอย่างสายพันธุ์กล้วยไม้ได้ 80 ตัวอย่าง ขนาดแถบแบน ≈ 240 bp แต่จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้ยังไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายได้จึงปรับใช้เทคนิคอื่นได้แก่ การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการอ่านข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค๊ด จากการรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้จากฟาร์มเกษตรกรที่นำพันธุ์พืชมาจดทะเบียนพันธุ์ที่กรมวิชาการเกษตร กล้วยไม้สกุลหวายพื้นเมืองที่เก็บรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จำนวน 30 สายพันธุ์เพื่อนำมาทดสอบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดบาร์โค๊ด โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนต่าง ๆ จำนวน 4 ยีนได้แก่ matK, ITS, trnH-psbA และ rbcL แล้วนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติโดยบริษัทเอกชนและเปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูล GenBank ได้ชื่อกล้วยไม้พร้อมทั้งสามารถจัดกลุ่มชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายได้ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูล phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม ClustalWII Phylogenyผลการวิเคราะห์พบว่า สามารถจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 30 สายพันธุ์ ด้วยไพร์เมอร์ rbcL + matK ซึ่งจะนำไปใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายชนิดต่าง ๆ ต่อไป

6. คำนำ

เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หรือ SSR (Simple Sequence Repeat) หมายถึง ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ (repetitive DNA) เรียงอยู่ต่อเนื่องกันบนจีโนม แต่ละชุดประกอบด้วยเบสซ้ำตั้งแต่ 1-6 เบส กระจายตัวทั้งจีโนมแต่การกระจายไม่สม่ำเสมอ ทำให้เกิดความหลากหลาย จึงถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์พืช ในการเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยในการคัดเลือก (marker-assisted selection) การวางตำแหน่งยีน (QTL mapping) การสร้างแผนที่ยีน (gene mapping) การทำแผนที่โครโมโซม การศึกษาวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับดีเอ็นเอ (อรรัตน์, 2548) SSR เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบจำเพาะ ตรวจสอบได้ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single-locus marker) โดยลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วนไมโครแซทเทลไลท์ มักเป็นลำดับเบสจำเพาะ มีเพียงชุดเดียว (unique sequence) ดังนั้น ถ้าหาลำดับเบสที่อยู่สองข้างของส่วนไมโครแซทเทลไลท์ได้ แล้วนำมาออกแบบไพร์เมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) จะเป็นการเพิ่มประมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่จำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว และเนื่องจากส่วนไมโครแซทเทลไลท์มีการกลายพันธุ์โดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของจำนวนชุดซ้ำได้ง่าย การตรวจสอบดีเอ็นเอตำแหน่งที่รวมเอาส่วนไมโครแซทเทลไลท์ไว้ภายใน

จึงมีโอกาสได้ขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic) เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่ไม่เท่ากัน จึงพบพอลิมอร์ฟิซึมค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังแสดงแถบดีเอ็นเอแบบข่มร่วมกัน (codominance) จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ (สุรินทร์, 2552) การหาความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตนั้นมีหลายเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น Restriction fragment length polymorphism (RFLP) , random amplified polymorphic DNA (RAPD) amplified fragment length polymorphism (AFLP) single nucleotide polymorphism (SNP) และ DNA repeat variation analysis ซึ่งรวมถึงไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเออยู่ด้วย เครื่องหมายโมเลกุลที่จำแนกได้จากส่วนที่มีความผันแปรเหล่านี้ ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาไฟโลจีนี อนุกรมวิธาน นิเวศน์วิทยา พันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ (McCouch และคณะ ,1997 ; Duborg และคณะ ,1999 ; Luo และคณะ , 2001 ; Bussell และคณะ , 2005 ; Wang และคณะ , 2006) อ้างอิงโดย Agyeman และคณะ (2008) เครื่องหมายเหล่านี้สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับความผันแปรของอัลลีลและให้แถบดีเอ็นเอที่เป็นประโยชน์ในการทำความเข้าใจวิวัฒนาการของประชากรสิ่งมีชีวิตตามภูมิศาสตร์และสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ (Zwettler และคณะ , 2002)

ไมโครแซทเทลไลท์ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีการใช้อย่างกว้างขวางสำหรับการตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน ในการพัฒนาครั้งแรกเพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมนุษย์ มีองค์ประกอบเบสซ้ำ 1-6 เบส กระจายอยู่ทั่วจีโนมของสิ่งมีชีวิต (Tautz และ Renze , 1984 ; Litt และ Luty, 1989) อ้างอิงโดย Agyeman และคณะ (2008)

กล้วยไม้เป็นพืชที่มีความสำคัญในการส่งออกไม้ดอกของไทยโดยสามารถส่งหวายตัดดอกเป็นอันดับหนึ่งของโลก กล้วยไม้สกุลหวาย (Dendrobium) เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุด มีการแพร่กระจายพันธุ์ออกไปในบริเวณกว้างทั้งในทวีปเอเชียและหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก นักพฤกษศาสตร์ได้จำแนกออกเป็นหมู่ประมาณ 20 หมู่ และรวบรวมกล้วยไม้ชนิดนี้ที่ค้นพบแล้วได้ประมาณ 1,000 ชนิดพันธุ์ กล้วยไม้สกุลหวาย มีลักษณะการเจริญเติบโตแบบซิมโพเดียล คือ มีลำลูกกล้วย เมื่อลำต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะแตกหน่อเป็นลำต้นใหม่และเป็นกอ ใบแข็งหนาสีเขียว ดอกมีลักษณะทั่วไปของกลีบชั้นนอกคู่บนและคู่ล่างขนาดยาวพอๆ กันโดยกลีบชั้นนอกบนจะอยู่อย่างอิสระเดี่ยวๆ ส่วนกลีบชั้นนอกคู่ล่างจะมีส่วนโคน ซึ่งมีลักษณะยื่นออกไปทางด้านหลังของส่วนล่างของดอกประสานเชื่อมติดกับฐานหรือสันหลังของเส้าเกสร และส่วนโคนของกลีบชั้นนอกคู่ล่างและส่วนฐานของเส้าเกสรซึ่งประกอบกันจะปูดออกมา มีลักษณะคล้ายเดือยที่เรียกว่า “เดือยดอก” สำหรับกลีบชั้นในทั้งสองกลีบมีลักษณะต่างๆ กันแล้วแต่ชนิดพันธุ์ของกล้วยไม้นั้นๆกล้วยไม้หวายป่าของไทยมีสีสวยงาม ก้านช่อสั้น สำหรับกล้วยไม้สกุลหวายที่เป็นกล้วยไม้อยู่ในป่าของไทย มีหลายชนิดอันได้แก่พวก “เอื้อง” ต่างๆ เช่น เอื้องผึ้ง เอื้องคำ เอื้งเงินหลวง

เอื้องปากนกแก้ว เอื้องเค้ากิ่ว เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีพวกที่มีลำเป็นสายห้อยลงมา เช่นเอื้องสายน้ำผึ้ง เอื้องสายหลวง เอื้องสายมรกต เอื้องสายนกกระจิบ เป็นต้น สำหรับหวายที่พัฒนาจนสามารถตัดดอกได้นั้น มีมากมายในเมืองไทย เช่น แอนนา ทับทิมสยาม โซเนีย ไดมอนสตาร์ เป็นต้น การคุ้มครองพันธุ์พืชเหล่านี้จึงนับมีความสำคัญ

7. วิธีดำเนินการ :

การทดลองที่ 1.1 การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSRs

-สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. การรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้และการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายจากแหล่งต่าง ๆ เช่นฟาร์มเกษตรกรศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย และศูนย์วิจัยพืชสวนศรีษะเกษ จำนวนอย่างน้อย 100 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Lodhi et al., (1994) หรือการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป วัดคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ค่าดูดกลืนแสง 260/280 nm นำมาเจือจางให้มีปริมาณเหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์

-วิธีปฏิบัติการทดลอง

2. การคัดเลือกไพร์เมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนดามาใช้กับกล้วยไม้สกุลหวาย

2.1 นำไพร์เมอร์ชนิด SSR ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้งหมดจำนวน 101 คู่สาย มาทดสอบกับดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวาย

2.2 ทำพีซีอาร์โดยเตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer((NH4)2SO4) 2 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl2 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP 2 ไมโครลิตร, ไพร์เมอร์ (5 uM) อย่างละ 2 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ยี่ห้อ Fermentas (0.5 unit) 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง themal 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 หรือการใช้พีซีอาร์มาสเตอร์มิกซ์คิท

2.3 ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส (electropholesis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ 4 ไมโครลิตร ลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 2 เปอร์เซ็นต์ใน 1xTBE buffer ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ บันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV

Transilluminators (BIORAD) และนำผลผลิตพีซีอาร์อีก 4 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบและบันทึกแถบดีเอ็นด้วยเครื่อง QIAxcel Advanced System และการนำไปอ่านค่าแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องอัตโนมัติ

3. การติดฉลากสีฟลูเรสซีนและการอ่านแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องอัตโนมัติ

3.1 คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวนอย่างน้อย 10 คู่ มาทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้ดังกล่าว ด้วยการนำไปติดสีฟลูโอเรสซีน ทำพีซีอาร์ แล้วตามอ่านขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่องอัตโนมัติ

3.2 อ่านค่าอัลลีลที่ได้และตรวจสอบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่ปรากฏ

4. การทดสอบและค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะสำหรับการทำบาร์โค๊ด และการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคดีเอ็นเอบาร์โค๊ดดิ้ง โดยการใช้ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนต่าง ๆ เช่น นิวเคลียร์เมมเบรน แล้วคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและ นำไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลบาร์โคดใน GenBank และนำไปหาความสัมพันธ์แบบวงศ์วานว่านเครือต่อไป

-การบันทึกข้อมูล

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้แต่ละสกุลและการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1 การคัดเลือกกล้วยไม้สายพันธุ์ที่มีความสำคัญ

2 การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้แต่ละสายพันธุ์

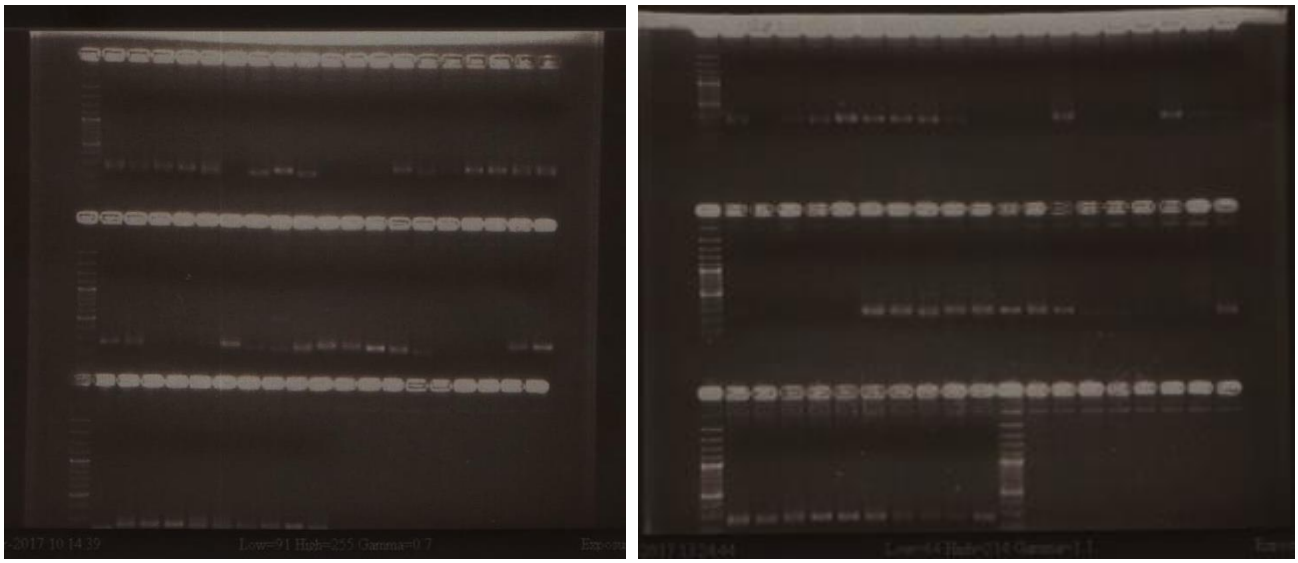
3 วิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏโดยใช้โปรแกรม SPSS หรือ NTSys หรือ TREECON เพื่อหาความสัมพันธ์แบบวงวานว่านเครือหรือแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree)

- เวลาและสถานที่
- ระบุเวลา (เริ่มต้น 2559 -สิ้นสุด 2560)
- สถานที่ทำการทดลองสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

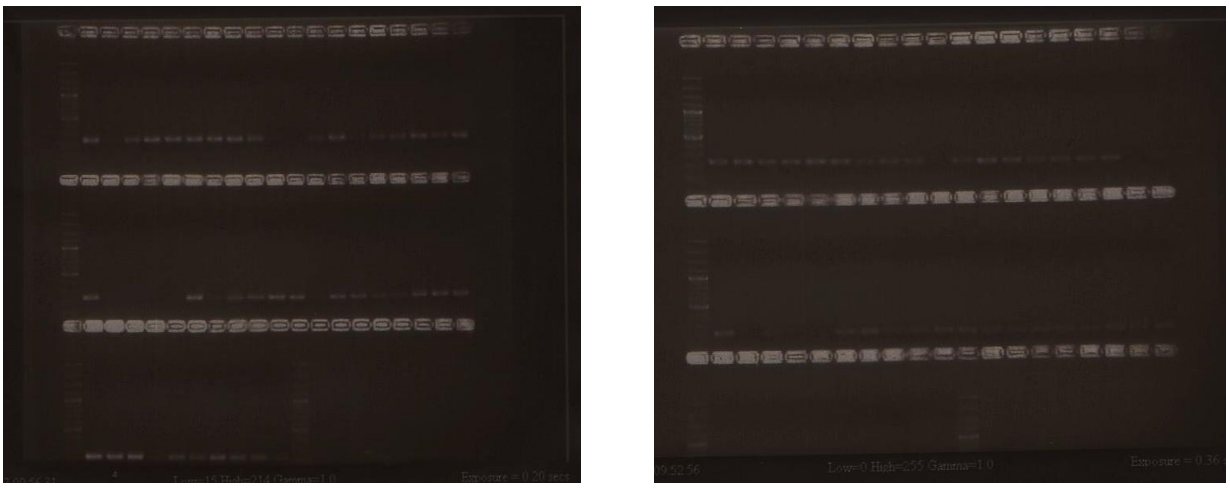
8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการสุ่มนำไพร์เมอร์ชนิด SSr ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้งหมดจำนวน 70 คู่สาย มาทำ PCR กับตัวอย่างกล้วยไม้สายพันธุ์สกุลหวาย ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ โดพบว่ามีเพียงไพร์เมอร์ 3 คู่สายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างได้ คือ ไพร์เมอร์ Vandbirdo_022, Vandbirdo_026, และ Vandbirdo_094 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ขนาดแถบแบน จาก ไพร์เมอร์ Vandbirdo_022 ≈ 200 bp Vandbirdo_026 ≈ 280 bp และ Vandbirdo_094 ≈ 240 bp

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนโดยใช้ไพรเมอร์ติดสีฟลูออเรสเซนต์ที่จำเพาะ 3 ไพร์เมอร์ กับ DNA กล้วยไม้ 96 สายพันธุ์ หลังจากเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR แล้ว ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis พบว่า ไพร์เมอร์ Vandbirdo_026 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอกับตัวอย่างสายพันธุ์กล้วยไม้ได้ 74 ตัวอย่าง ขนาดแถบแบน ≈ 280 bp และไพร์เมอร์ Vandbirdo_094 สามารถเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอกับตัวอย่างสายพันธุ์กล้วยไม้ได้ 80 ตัวอย่าง ขนาดแถบแบน ≈ 240 bp



รูปภาพที่ 1 แสดง ผลการรัน PCR product 1 % agarose gel electrophoresis ของไพร์เมอร์ Vandbirdo_026 กับตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 97 สายพันธุ์ , lane(1) = 100 bp dna ladder marker



รูปภาพที่ 2 แสดง ผลการรัน PCR product 1 % agarose gel electrophoresis ของไพร์เมอร์ Vandbirdo_094 กับตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 97 สายพันธุ์ , lane(1) = 100 bp dna ladder marker

การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการอ่านข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค๊ด

จากการรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้จากฟาร์มเกษตรกรที่นำพันธุ์พืชมาจดทะเบียนพันธุ์ที่กรมวิชาการเกษตร กล้วยไม้สกุลหวายพื้นเมืองที่เก็บรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จำนวน 30 สายพันธุ์เพื่อนำมาทดสอบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดบาร์โค๊ด โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนต่าง ๆ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Dream Taq PCR Green Master mix kit ไพรเมอร์ 10 พิโคโมล โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะได้แก่ matK, ITS, trnH-psbA และ rbcL หลังจากเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ในข้างต้นแล้ว ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาด 800-1000 คู่เบส ดังภาพที่ 2

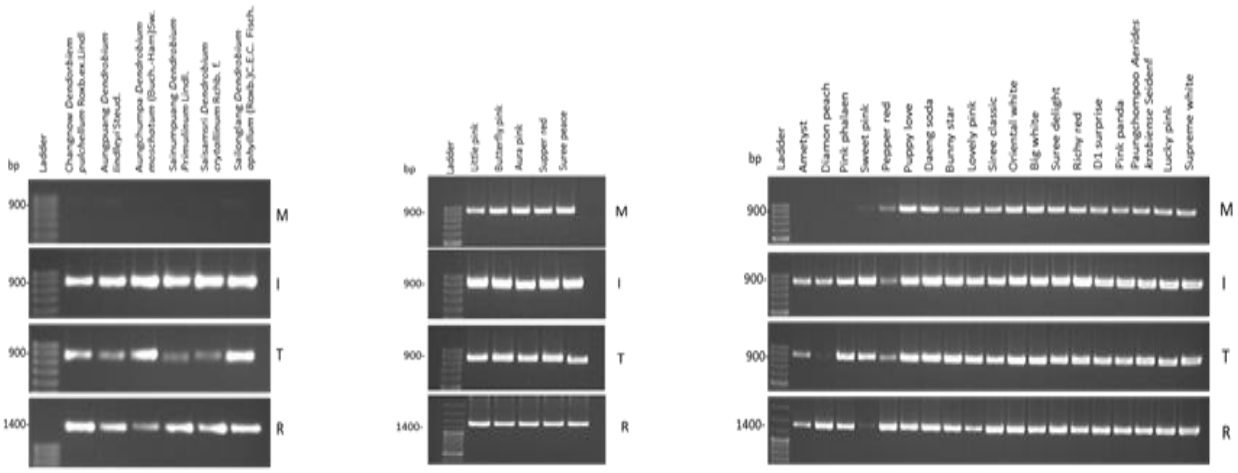


Figure 1. DNA barcode fragments of all 30 *Dendrobium* spp. In standard Regions M ; *matK*, I ; ITS, T; *trnH-psbA* and R ; *rbcL* .

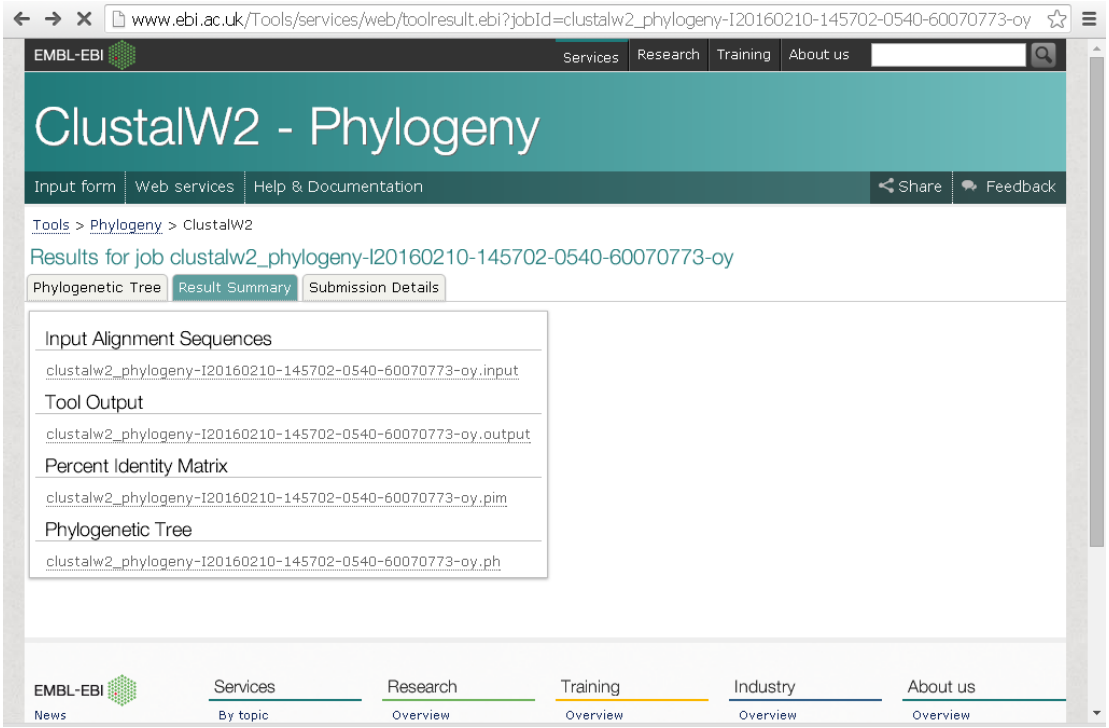
นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติโดยบริษัทเอกชนและเปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูล GenBank ได้ชื่อกล้วยไม้ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการเปรียบเทียบข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank (NCBI)

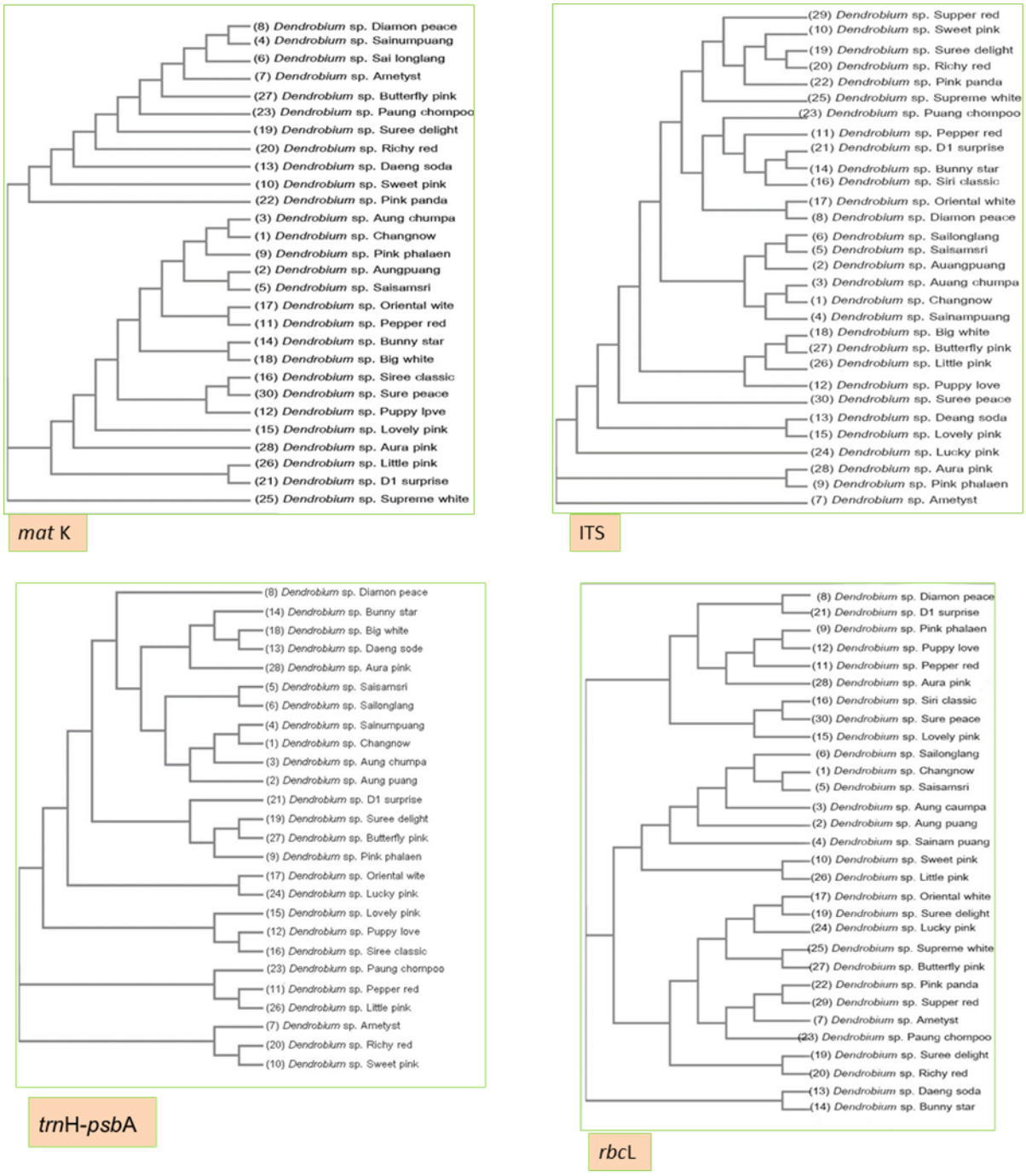
Primer	Description	Max score	Total score	Query cover	Ident	Accession
2125515_1M_M	*Dendrobium pulchellum voucher*	1334	1334	89%	97%	KF1437121
2125516_2M_M	*Dendrobium aggregatum voucher*	1585	1585	96%	99%	KF143639.1
2125517_3M_M	*Dendrobium pendulum voucher*	723	723	96%	87%	KF143705.1
2125518_4M_M	*Dendrobium williamsonii*	268	268	77%	77%	KP762104.1
2125519_5M_M	*Dendrobium crystallinum*	1177	1177	96%	99%	AB847735.1
2125520_6M_M	*Dendrobium aphyllum*	1280	1280	95%	98%	AB847736.1
2125521_7M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1177	1177	95%	97%	EF079344.1
2125523_9M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	867	867	95%	94%	EF079344.1
2125524_10M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1572	1572	97%	99%	EF079344.1
2125525_11M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1609	1609	99%	99%	EF079344.1
2125526_12M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1594	1594	97%	99%	EF079344.1
2125527_13M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1568	1568	97%	99%	EF079344.1
2125528_14M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1587	1587	97%	99%	EF079344.1
2125529_15M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1594	1594	97%	99%	EF079344.1
2125530_16M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1596	1596	98%	99%	EF079344.1
2125531_17M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1594	1594	99%	99%	EF079344.1
2125532_18M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1594	1594	97%	99%	EF079344.1
2125533_19M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1570	1570	97%	99%	EF079344.1
2125534_20M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1572	1572	97%	99%	EF079344.1
2125535_21M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1572	1572	97%	99%	EF079344.1
2125536_22M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1546	1546	98%	98%	EF079344.1
2125537_23M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1572	1572	98%	98%	EF079344.1
2125538_24M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1592	1592	97%	99%	EF079344.1
2125539_25M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1576	1576	99%	98%	EF079344.1
2125540_26M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1567	1567	97%	99%	EF079344.1
2125541_27M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1570	1570	97%	99%	EF079344.1
2125542_28M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1572	1572	98%	98%	EF079344.1
2125543_29M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1576	1576	99%	98%	EF079344.1
2125544_30M_M	*Diplocaulobium aureicolor*	1607	1607	99%	99%	EF079344.1

ผลการวิเคราะห์ phylo-genetic tree

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้มาจัดเรียงตามรูปแบบของโปรแกรมในรูปแบบ FASTA Format เรียงลำดับโดยมีชื่อสายพันธุ์แทรก นำไฟล์ที่ได้ส่งเข้าไปวิเคราะห์ข้อมูล phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม ClustalWII Phylogeny ในเวปไซต์ www.ebi.ac.uk ดังภาพที่ 3 และภาพที่ 4



ภาพที่ 3 แสดงการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Clustal W II Phylogeny



ภาพที่ 4 แสดงผลการใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทดีของชิ้นส่วนจากยีนต่าง ๆ ในการสร้าง Phylogenic tree กับกล้วยไม้ 30 สายพันธุ์

ผลการวิเคราะห์พบว่า สามารถจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 30 สายพันธุ์ ด้วยไพร์เมอร์ rbcL + matK ซึ่งจะนำไปใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายชนิดต่าง ๆ ต่อไป

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการสุ่มนำไพร์เมอร์ชนิด SSr ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้าทั้งหมดจำนวน 70 คู่สาย มาทำ PCR กับตัวอย่างกล้วยไม้สายพันธุ์สกุลหวาย ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ โดพบว่ามีเพียงไพร์เมอร์ 3 คู่สายที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างได้ คือ ไพร์เมอร์ Vandbirdo_022, Vandbirdo_026, และ Vandbirdo_094 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ขนาดแถบแบน จาก ไพร์เมอร์ Vandbirdo_022 ≈ 200 bp Vandbirdo_026 ≈ 280 bp และ Vandbirdo_094 ≈ 240 bp

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนโดยใช้ไพรเมอร์ติดสีฟลูออเรสเซนต์ที่จำเพาะ 3 ไพร์เมอร์ กับ DNA กล้วยไม้ 96 สายพันธุ์ หลังจากเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR แล้ว ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis พบว่า ไพร์เมอร์ Vandbirdo_026 สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอกับตัวอย่างสายพันธุ์กล้วยไม้ได้ 74 ตัวอย่าง ขนาดแถบแบน ≈ 280 bp และไพร์เมอร์ Vandbirdo_094 สามารถเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอกับตัวอย่างสายพันธุ์กล้วยไม้ได้ 80 ตัวอย่าง ขนาดแถบแบน ≈ 240 bp

การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการอ่านข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค๊ด

จากการรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้จากฟาร์มเกษตรกรที่นำพันธุ์พืชมาจดทะเบียนพันธุ์ที่กรมวิชาการเกษตร กล้วยไม้สกุลหวายพื้นเมืองที่เก็บรวบรวมไว้ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จำนวน 30 สายพันธุ์เพื่อนำมาทดสอบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดบาร์โค๊ด โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนต่าง ๆ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Dream Taq PCR Green Master mix kit ไพรเมอร์ 10 พิโคโมล โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะได้แก่ matK, ITS, trnH-psbA และ rbcL หลังจากเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ในข้างต้นแล้ว ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาด 800-1000 คู่เบส

นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติโดยบริษัทเอกชนและเปรียบเทียบข้อมูลกับฐานข้อมูล GenBank ได้ชื่อกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้มาจัดเรียงตามรูปแบบของโปรแกรมในรูปแบบ FASTA Format เรียงลำดับโดยมีชื่อสายพันธุ์แทรก นำไฟล์ที่ได้ส่งเข้าไปวิเคราะห์ข้อมูล phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม ClustalWII Phylogenyผลการวิเคราะห์พบว่า สามารถจำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุล

หวายทั้ง 30 สายพันธุ์ ด้วยไพร์เมอร์ rbcL + matK ซึ่งจะนำไปใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายชนิดต่าง ๆ ต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำไปใช้จำแนกชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสมได้
2. นำข้อมูลไปช่วยเหลือเกษตรกรผู้ปรับปรุงพันธุ์ ต่าง ๆ ต่อไป

12. เอกสารอ้างอิง

Ahmad R, Ferguson L, Southwick SM (2003). Identification of Pistachio *(Pistachio vera* L.) Nuts with microsatellite markers. *Amer Soc Hort Sci*. 128: 898-903.

Edwards KJ, Barker JH, Daly A, Jones C, Karp A (1996). Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques.* 20: 758-760

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002). Strategies for microsatellite isolation: A Review. *Mol Ecol*.

Zhao W, Miao X, Jia S, Pan Y, Huang Y (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci from the mulberry, *Morus* L. *Plant Sci.* 168: 519-525.

2. ภาคผนวก

ตารางที่ 2 ไพร์เมอร์ SSr Vandbirdo ที่พัฒนาจากกล้วยไม้สกุลแวนด้า

Primer	Forward primer	Reverse primer	Tm (•c)
Vandbirdo_002	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	55
Vandbirdo_003	TGCACTCCCCCTTAGGTGAT	CGAGGCATTTTTGTCCTGGC	60
Vandbirdo_005	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	ACGAACCGAACAGGCTTATG	55
Vandbirdo_006	ATTCGAAGCTTGGGGTCTCT	GATTTTAGACACGGGCCAGA	55
Vandbirdo_007	CAAGCTTCGGATCAACCCTA	GAGGTGCTTGGCATATTCGT	60
Vandbirdo_008	CTGGGTCCAAAAACCTTTGA	CTTGGCTTCCCAATAAACCA	59
Vandbirdo_011	CCCAGTGGACATAAGCCTGT	CCAGGGAGTAACGAGCTTGA	60
Vandbirdo_013	TACTCGAAGCTTGGGGTCTC	TAGAGACACGGGCCAGAGAT	59
Vandbirdo_015	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60
Vandbirdo_016	TTGGAATCAGAGCCTGCATA	CCAAGAAACCTGCGACAAAT	60
Vandbirdo_020	AGAGTGTGGGGCAAGAGAGA	CTTCGGATCCTCATCACACA	60
Vandbirdo_022	GCAACTGGTCCAGAACCTTG	CTTTGTTTTAGGGCGACTGC	60
Vandbirdo_023	CGAAGAGATCCTCCTGTTGC	TTTGTCCGGTCATTCAGTCA	60
Vandbirdo_026	TCGCCGAGCTTTAGGTAGAA	TCATCACCTCCATCCTCCTC	60
Vandbirdo_030	TCTCAAAATCCTGCGACTCC	CCTGGCAGCAGAAAAGGTTA	60
Vandbirdo_031	GAGAGAGAAAGGGAGCAGGAG	GGTCCCAACCTCTTCCAATC	60

Vandbirdo_041	CATGCTTTGAGTTGGGAGGT	ACCTGGACGGCAAATAATGA	60
Vandbirdo_046	TGTTGCAACGAACAGGTCAC	TGTCCTGGCTGGTTTAGAGG	60
Vandbirdo_049	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60
Vandbirdo_055	CTCATATGCAAGGGGGAGAA	CCAAGCTTCGATCGTCTCTC	60
Vandbirdo_059	ATTTGGCGTCCAGGTGATAG	ATCCGTTTCCACGGTATGAG	60
Vandbirdo_063	GGTTGTTTGGGAGACACCAC	CATCCCCATCAGCTCATTCT	60
Vandbirdo_064	ATGGCCATAGCTGTTTCCTG	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60
Vandbirdo_094	TCGAACCGTAGACCTTCTCG	CCAAGCTTCGGATCAGGATA	60

ตารางที่ 3 ไพร์เมอร์ SSr Vandbirdo ติดสีฟลูออเรสเซนต์

Primer	Forward primer	Reverse primer	Tm (•c)
Vandbirdo_022	GCAACTGGTCCAGAACCTTG	CTTTGTTTTAGGGCGACTGC	60
Vandbirdo_026	TCGCCGAGCTTTAGGTAGAA	TCATCACCTCCATCCTCCTC	60
Vandbirdo_094	TCGAACCGTAGACCTTCTCG	CCAAGCTTCGGATCAGGATA	60