



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากฐานข้อมูล EST
และการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุล *Doritis*

โดย ผศ. ดร.ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์

สิงหาคม พ.ศ. 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์จากฐานข้อมูล EST
และการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุล *Doritis*

ผู้วิจัย:

ผศ. ดร.ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่ปรึกษา:

รศ. ดร.พัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

“ม้าวี้ง” เป็นกล้วยไม้ป่าที่มีถิ่นกำเนิดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โครงสร้างของดอกและความหลากหลายของสีดอก ทำให้กล้วยไม้ชนิดนี้มีศักยภาพสูงในการพัฒนาเพื่อเป็นไม้ตัดดอกในการส่งออก แต่การศึกษาและพัฒนาม้าวี้งให้มีค่าทางเศรษฐกิจยังไม่มีมากนัก ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์จากฐานข้อมูล EST (Expressed Sequence Tag) จากกล้วยไม้สกุลอื่นๆ เพื่อประโยชน์ในการใช้ปรับปรุงพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลม้าวี้ง โดยได้รวบรวม EST ของกล้วยไม้ชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลจำนวน 8,009 EST จากนั้นค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์จากกลุ่มข้อมูลดังกล่าวได้จำนวนทั้งสิ้น 177 EST-SSR โดย 23 เครื่องหมาย EST-SSR และ 7 เครื่องหมาย EST จากจีโนมิกดีเอ็นเอ จาก *Dendrobium* และ *Serapias* ถูกนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายของกล้วยไม้ม้าวี้ง ซึ่งผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 142 แอลลีล โดย 92 แอลลีล ที่แสดงความแตกต่างภายในกลุ่มกล้วยไม้ม้าวี้ง 30 ตัวอย่าง ค่าความหลากหลายที่คำนวณได้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.6076 โดยอยู่ในช่วง 0.1244 ถึง 0.8439 เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาสร้างต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม UPGMA พบว่าสามารถแยกตัวอย่างกล้วยไม้ออกเป็น 3 กลุ่มตัวอย่างซึ่งสอดคล้องกับอนุกรมวิธานของกล้วยไม้ จากผลการทดลองนี้แสดงว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นนี้สามารถนำมาใช้เพื่อจัดจำแนก อนุรักษ์ และคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลม้าวี้งได้

(คำหลัก) : Doritis; เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์; การถ่ายโอนเครื่องหมาย; ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Abstract

Doritis is a wild terrestrial orchid, originated in the Northeastern part of Thailand. With its good floral structure and very diverse color, it has high potential to develop into commercial ornamental plant or to use as a hybridizer with other orchid species. Unfortunately it has not been studied in detail for its potential of development. In this study we developed SSR markers from EST database and examined the transferability of genomic SSR markers from other orchids in *Doritis*. 8009 ESTs belonged to family Orchidaceae were collected and analyzed for microsatellite. A total of 177 EST-SSR were identified. Twenty three EST-SSR and seven genomic SSR primers (from *Dendrobium* and *Serapias*) were used for genetic diversity assessment of *Doritis* germplasms. 142 alleles were generated in which, 92 alleles (64.8%) showed polymorphism among 30 *Doritis* accessions (*Doritis regnieriana*, *Doritis pulcherrima* and *D. pulcherrima* var. *buyssoniana*). The polymorphic information content (PIC) average at 0.6076 and ranged from 0.1244 to 0.8439. The phylogenetic tree based on UPGMA showed three major clades based on their taxonomy indicating that SSR markers developed in this study can be used for identification, conservation and selection of appropriate parents for the *Doritis* hybrid production in future.

Keywords : *Doritis*; microsatellite marker; transferability; genetic diversity

Executive Summary

กล้วยไม้สกุลม้าวิง (*Doritis*) เป็นกล้วยไม้ดิน มักขึ้นเป็นกอใหญ่บนลานหิน ซอกผาหิน หรือลานดิน กว้างบนเขาสูง ที่ค่อนข้างแห้งแล้ง หรือผิวดินร่วนในบริเวณที่มีต้นไม้เตี้ยๆ และโปร่ง บักร่มเล็กน้อย กล้วยไม้สกุลม้าวิงกระจายพันธุ์อยู่ในพม่า ไทย ลาว กัมพูชา มาเลเซีย อินโดนีเซีย โครงสร้างของดอกและความหลากหลายของสีดอก ทำให้กล้วยไม้ชนิดนี้มีศักยภาพสูงในการพัฒนาเพื่อเป็นไม้ตัดดอกในการส่งออก แต่การศึกษาและพัฒนาพันธุ์ให้มีค่าทางเศรษฐกิจยังไม่มีมากนัก วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้ เพื่อพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับกล้วยไม้สกุลม้าวิง และตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิงในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในการผสมปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลนี้ในอนาคต โดยได้เก็บรวบรวมตัวอย่างของกล้วยไม้สกุล *Doritis* จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะบริเวณจังหวัดอุบลราชธานี และจังหวัดใกล้เคียง โดยนำมาเพาะเลี้ยงไว้ที่โรงเพาะเลี้ยงของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี จำนวนทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง จากนั้นทำการทดลองหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ โดยทดลองทั้งหมด 4 วิธี คือ 1) การสกัดแยก DNA จากกล้วยไม้โดยวิธีประยุกต์ของ *Dellaporta et al.*, 1983 2) ชุดสกัด DNA Sabai Kit โดย Plant Molecular Biology Laboratory ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล 3) ชุดสกัด DNA Nucleic Acid Extraction Kit โดยบริษัท Vivantis และ 4) การสกัด DNA โดยใช้ 2X CTAB (*Lodhi et al.* 1994, with minor modification) ซึ่งพบว่าวิธี 2X CTAB สามารถที่จะสกัดดีเอ็นเอได้ดีที่สุด

ในขณะเดียวกันได้รวบรวมข้อมูล EST จากฐานข้อมูลต่าง ๆ และพัฒนาออกแบบไพรเมอร์เครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR โดยได้ค้นหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจากสมาชิกวงศ์ Orchidaceae ในฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI โดยพยายามรวบรวมข้อมูล EST และ mRNA ให้ได้มากที่สุดสำหรับนำไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในกล้วยไม้สกุล *Doritis* ต่อไป จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าสามารถสืบค้นข้อมูลที่เป็นลำดับเบสของ EST ในกล้วยไม้ ได้ทั้งหมด 8,009 ลำดับเบส ข้อมูล mRNA ของกล้วยไม้สกุล *Doritis* 14 ลำดับเบส และ mRNA ของกล้วยไม้สายพันธุ์อื่น ๆ อีก 88 ลำดับเบส จากนั้นนำข้อมูล EST ที่ได้ไปทำการจัดกลุ่มข้อมูลและคัดเลือกคุณภาพของข้อมูลโดยใช้โปรแกรม cap3 โดยข้อมูลที่จะนำไปวิเคราะห์จะต้องอยู่ในรูปแบบของ FASTA พบว่าหลังจากวิเคราะห์ข้อมูล คงเหลือข้อมูลที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานต่อไปทั้งหมด 1,261 ข้อมูล แล้วจึงนำข้อมูลเหล่านี้ไปหาส่วนของไมโครแซทเทลไลต์ต่อไป โดยใช้โปรแกรมสำหรับการค้นหาลำดับเบสซ้ำ Websat (<http://wsmartins.net/websat/>) กำหนดค่า repeat แบบ mono di tri tetra penta และ hexa ให้มีลำดับเบสนั้นๆซ้ำกัน 10, 6, 5, 4, 4 และ 4 ตามลำดับ ซึ่งค่าเหล่านี้เป็นค่าอย่างต่ำในการค้นหา

บริเวณไมโครแซเทลไลต์ของโปรแกรมและเมื่อพบบริเวณที่มีไมโครแซเทลไลต์ก็สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้เลยในโปรแกรมนี้ โดยสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 177 คู่ไพรเมอร์ แบ่งเป็นแบบซ้ำ 1 เบส จำนวน 60 คู่ (33.90%) แบบซ้ำ 2 เบส 68 คู่ (38.42%) แบบซ้ำ 3 เบส 37 คู่ (22.03%) แบบซ้ำ 4 เบส 5 คู่ (2.82%) แบบซ้ำ 5 เบส 1 คู่ (0.56%) และซ้ำ 6 เบส 6 คู่ (3.39%) และพบว่ารูปแบบของ SSR motif ที่พบมากที่สุดคือ A/T โดยคิดเป็น 32.20% รูปแบบที่มีมากลำดับที่สอง คือ TC/GA คิดเป็น 15.1% และรูปแบบที่มีมากเป็นลำดับที่สามคือ AG/CT คิดเป็น 11.24% จากนั้นทำการสุ่มเลือกไพรเมอร์เพื่อทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยมีเกณฑ์ในการเลือก คือ ผลผลิตที่ได้ควรมีขนาดระหว่าง 100 – 400 คู่เบส โดยสุ่มเลือกมาทั้งหมด 100 คู่ไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการทดสอบเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในกล้วยไม้สกุล *Doritis* นอกจากนี้ได้มีการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ในกล้วยไม้สกุลอื่น ๆ อีกทั้งหมด 35 คู่ไพรเมอร์ โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของทิพวัลย์และคณะในปี 2549 Pellegrino *et al.*, 2001 และ Yue *et al.*, 2006

ผลการทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์พบว่า มีไพรเมอร์ทั้งหมด 30 คู่ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างกล้วยไม้สกุลมารีงที่นำมาศึกษาได้ โดยมาจากการ EST ไพรเมอร์ 23 คู่ และ genomic SSR ของกล้วยไม้ชนิดอื่นๆ อีก 7 คู่ ต่อจากนี้ทำการตรวจสอบไพรเมอร์ทั้ง 30 คู่ว่าสามารถสร้างความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างกล้วยไม้ได้หรือไม่ โดยทั่วไปขั้นตอนนี้สามารถตรวจสอบได้โดยการใช้ Polyacrylamide Gel Electrophoresis ซึ่งมีความสามารถในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันได้กัน 2-3 คู่เบสได้ แต่เนื่องจาก polyacrylamide gel นั้นเป็นเจลที่ค่อนข้างอันตรายต่อตัวผู้ทดลอง มีความยุ่งยากในการเตรียมและใช้ระยะเวลานานต่อการทดลองหนึ่งครั้ง รวมไปถึงต้องการพื้นที่การทดลองที่จำเพาะ ทางผู้ทดลองจึงได้เลือกทำการตรวจสอบโดยใช้ HAD-GT12TM capillary gel electrophoresis system (Qiagen, Germany) ซึ่งมีความปลอดภัยต่อผู้ทดลองมากกว่า รวมไปถึงมีความรวดเร็วในการตรวจสอบผลและการอ่านวิเคราะห์เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ polyacrylamide gel ผลจากการตรวจสอบพบว่า จากไพรเมอร์ทั้งหมด 30 คู่ มี 20 คู่ที่แสดงความหลากหลาย (polymorphism) ในตัวอย่างกล้วยไม้ที่ศึกษา ส่วนอีก 10 คู่ นั้นไม่สามารถสร้างความหลากหลายได้ในตัวอย่างที่ศึกษา (monomorphic) โดยไพรเมอร์ที่แสดงความหลากหลายมาจาก EST ไพรเมอร์ 13 คู่ และ genomic SSR ไพรเมอร์จากกล้วยไม้ชนิดอื่น 7 คู่

เมื่อวิเคราะห์ phylogenetic ของตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม NTSYS pc version 2.1 software package (Rohlf, 2000) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของตัวอย่างที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ดังกล่าว ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าสามารถจัดกลุ่มของข้อมูลได้ 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามสปีชีส์ของตัวอย่างที่นำมาศึกษา ได้แก่ *D. pulcherrima* (มารีง), *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* (แดงอุบล) และ *D. regnieriana* (ม้า

ว้างแกระ) ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไฟรเมอร์ที่ออกแบบมานั้นสามารถที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องหมายในการจัดจำแนกสปีชีส์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิงที่นำมาศึกษาได้ ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิงที่ใช้ในการทดลองว่ามีค่าสูง จึงสามารถใช้ประกอบในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ได้ และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้สามารถนำมาใช้ในการพัฒนากล้วยไม้สกุลนี้ได้ เช่นการตรวจสอบพันธุ์ผสม และการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในการผสม เป็นต้น งานวิจัยในครั้งนี้จึงบรรลุวัตถุประสงค์ต่างๆที่ได้ตั้งไว้ทั้งหมด และเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ม้าวิงให้มีคุณค่าต่อไปได้ในอนาคต

Project Code : MRG5380008

Project Title : การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จากฐานข้อมูล EST และการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุล *Doritis*

EST-SSR marker development and genetic diversity assessment for *Doritis* family

Investigator : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

50 ถ.งามวงศ์วาน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กทม. 10900

โทร 081-627-4635 แฟกซ์ 02-579-5528

E-mail Address : chatchawan.j@ku.ac.th

Project Period : 1 พฤษภาคม พ.ศ. 2553 ถึงวันที่ 30 กันยายน พ.ศ. 2555

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

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

เหมาะสมอย่างยิ่งต่อการผลิตกล้วยไม้จึงมีความเป็นไปได้สูงที่ประเทศไทยจะกลายเป็นศูนย์กลางความรู้และการผลิตกล้วยไม้ที่สำคัญของโลกในอนาคต

กล้วยไม้แดงอุบลจัดอยู่ในกลุ่มกล้วยไม้สกุลม้าวัง เป็นกล้วยไม้พื้นเมืองของจังหวัดอุบลราชธานี ลักษณะเด่นคือสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมที่ค่อนข้างแห้งแล้ง ซึ่งแตกต่างจากกล้วยไม้จำพวกหวายที่ชอบอากาศแบบร้อนชื้นมากกว่า ลักษณะของทรงต้นและดอกเหมาะสำหรับนำมาพัฒนาเป็นกล้วยไม้กระถาง ปัจจุบันยังไม่มีการพัฒนาเพื่อการส่งออกต่างประเทศ จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่ากล้วยไม้แดงอุบลมีศักยภาพสำหรับการผลิตในเชิงการค้าระดับอุตสาหกรรมของประเทศหรือระหว่างประเทศได้ ถ้าสามารถพัฒนาได้ประเทศไทยจะมีกล้วยไม้ส่งออกเพิ่มขึ้นใหม่ที่เป็นไม้กระถาง นอกจากนี้ยังเป็นการพัฒนาพืชท้องถิ่นให้มีศักยภาพในระดับประเทศและระดับโลกอีกด้วย การพัฒนาพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้แดงอุบลจึงถือเป็นอีกบทบาทหนึ่งที่สำคัญของการพัฒนาเป็นไม้กระถาง โดยในปัจจุบันลักษณะที่นักปรับปรุงพันธุ์ต้องการคือ ความหลากหลายของสีดอก และทรงต้นที่มีขนาดเล็กลงกะทัดรัดเหมาะสมกับการเป็นกล้วยไม้กระถาง จึงได้ริเริ่มโครงการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้แดงอุบล โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาพันธุ์ใหม่ให้เหมาะสมต่อการเป็นกล้วยไม้กระถาง แต่การพัฒนาพันธุ์ต้องใช้เวลาอันยาวนาน จึงต้องอาศัยเครื่องมือทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาเสริม เพื่อสามารถคัดเลือกลูกผสมที่ต้องการได้ในระยะแรกของการเจริญเติบโต ลดระยะเวลาในการพัฒนาพันธุ์ และเพิ่มประสิทธิภาพของการสร้างพันธุ์ใหม่

ปัจจุบันเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลมีบทบาทมากกับการปรับปรุงพันธุ์พืช นักปรับปรุงพันธุ์นิยมนำเครื่องมือเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในหลากหลายรูปแบบ เพื่อประสิทธิภาพการพัฒนาพันธุ์ เช่น นำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรที่นักปรับปรุงพันธุ์รวบรวมพันธุ์ไว้สำหรับคัดเลือกพ่อแม่ที่จะใช้ในการสร้างประชากรรุ่นต่อไป ซึ่งโดยทั่วไปนิยมผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง เพื่อให้เกิดความหลากหลายของลูกผสมในรุ่นต่อไป ดังนั้นการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวังที่มีอยู่ในประเทศไทยจึงมีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลม้าวังเป็นอย่างมาก โดยข้อมูลที่ได้จะถูกใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสมในการปรับปรุงต่อไป โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูงเหมาะในการใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม ได้แก่ เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite marker) หรือ simple sequence repeat (SSR marker) ซึ่งใช้วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะและมีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่แน่นอน นิยมใช้ในการตรวจสอบสิ่งที่มีชีวิตที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันเพราะเป็นเครื่องหมายที่มีความแม่นยำสูง สามารถบ่งบอกสภาพพันธุกรรมแบบโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ และเหมาะสำหรับการตรวจสอบเพื่อจดทะเบียนและรับรองพันธุ์ ในพืชมีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เพื่อใช้ในการตรวจสอบและการพัฒนาพันธุ์หลายชนิด เช่น พืชตระกูลถั่ว (Hüttel *et al.*, 1999; He *et al.*, 2003) วัชพืชบางชนิด (Juillet *et al.*, 2003) *Arabidopsis*

และ *Arabis* (Clauss *et al.*, 2002) กล้วยไม้สกุล *Ophyrus* (Soliva *et al.*, 2000) และกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* (Boonsrangsom *et al.*, 2008) เป็นต้น โดยการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในปัจจุบันสามารถพัฒนาขึ้นมาจากฐานข้อมูล EST ของกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ ได้ ซึ่งวิธีนี้จะช่วยให้ลดต้นทุนในการพัฒนาเครื่องหมาย SSR และยังได้เครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนของยีนโดยตรงอีกด้วย

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์สำหรับกล้วยไม้สกุลม้าวัง และตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวังในประเทศไทย

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ข้อมูลทั่วไปของกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (Subclass Monocotyledoneae) อยู่ในวงศ์กล้วยไม้ (Family Orchidaceae) ซึ่งนับเป็นวงศ์ที่ใหญ่ที่สุดวงศ์หนึ่งของพืชมีดอก (Class angiosperm) กล้วยไม้เป็นพืชที่มีวิวัฒนาการและการปรับตัวสูงในหลายรูปแบบ จึงสามารถกระจายพันธุ์อยู่ได้ในทุกภูมิภาคของโลก รูปแบบการเจริญเติบโตของกล้วยไม้มีหลายแบบ จากการสำรวจพบกล้วยไม้ที่ขึ้นบนต้นไม้ (epiphyte) 73% ที่เหลือพบขึ้นตามพื้นป่า (terrestrial) เช่น พื้นดิน พื้นหิน และที่ชื้นแฉะ ความหลากหลายของกล้วยไม้จะพบมากในเขตร้อน (tropic) และมักจะเป็นกล้วยไม้อากาศ (epiphyte) ส่วนกล้วยไม้ที่อยู่ในเขตอบอุ่น (temperate) มักเป็นพวกกล้วยไม้ดิน (terrestrial) (ครรรชิต, 2547) คาดว่าในโลก มีกล้วยไม้ประมาณ 17,000-35,000 ชนิด ปัจจุบันสำรวจและจำแนกได้ 796 สกุล ประมาณ 19,500 ชนิด (Dressler, 1993) สำหรับในประเทศไทยมีจำนวน 178 สกุล รวม 1,128 ชนิด (วีรชัย, 2548)

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

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวัง

กล้วยไม้สกุลม้าวัง (*Doritis*) เป็นกล้วยไม้ดิน มักขึ้นเป็นกอใหญ่บนลานหิน ซอกผาหิน หรือลานดิน กว้างบนเขาสูง ที่ค่อนข้างแห้งแล้ง หรือผิวดินร่วนในบริเวณที่มีต้นไม้เตี้ยๆและโปร่ง บ้างมีลำต้นน้อย ลำต้นรูปทรงกระบอกสูงประมาณ 5-12 ซม. มีหลายข้อ ใบเป็นรูปรีแกมขอบขนานกว้าง 2-4 ซม. ยาว 7-12 ซม.

ออกที่ข้อ มีหลายใบ เรียงสลับระนาบเดียว ใบหนาและค่อนข้างแข็ง ใบอ่อนพับออกตามยาว มีอายุหลายฤดู กาบใบติดคาคัน สีเขียวถึงสีแดงคล้ำ ดอกมีลักษณะเป็นช่อยาวและตั้งตรง ก้านช่อดอกยาว 20-50 ซม. แต่ละช่อประกอบด้วยดอกย่อยจำนวนมาก เรียงเวียน กลีบเลี้ยง และกลีบดอกเป็นสีม่วงอ่อน หรือสีม่วงแดง ใบประดับไม่หลุดร่วง ช่อดอก ก้านดอก และรังไข่เกลี้ยง กลีบเลี้ยงและกลีบดอกแยกเป็นอิสระ กลีบเลี้ยงจะลู่ไปทางด้านหลัง ทำให้เวลาดอกบานแล้วดูคล้ายหัวม้ากำลังวิ่งตะปิ้ง จึงถูกเรียกชื่อตามลักษณะดังกล่าวว่า “ม้าวิ่ง” กลีบปากเป็นสีขาวแซมขึ้นจากโคนกลีบ บางชนิด พันธุ์สีจะแตกต่างกันเห็นได้ชัดเจน มีด้วยกันหลายสี เช่น สีขาว สีเหลือง สีแดง และ สีม่วง

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่งกระจายพันธุ์อยู่ในพม่า ไทย ลาว กัมพูชา มาเลเซีย อินโดนีเซีย พบในธรรมชาติ มีเพียงชนิดเดียวคือ โดไรติส พูลเคอไรมา (*Doritis pulcherrima*) หรือเรียกว่า ม้าวิ่ง และมีอีกชนิดหนึ่งซึ่งเป็นสายพันธุ์ย่อย (variety) มีดอกใหญ่กว่าธรรมดา พบทางภาคเหนือและภาคอีสานของไทย คือ ม้าบิน (*Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis*) และแดงอุบล แยกเป็นพันธุ์ ปีสโซเนียนา (*Doritis pulcherrima* var. *buyssoniana*) ซึ่งแดงอุบลนี้ พบว่ามีโครโมโซมเป็น 2 เท่าของม้าวิ่งทั่วไป กล้วยไม้ในสกุลม้าวิ่งส่วนใหญ่นิยมนำไปผสมกับสกุลฟาเลนออปซิส ได้สกุลใหม่ว่า โดไรเทนออปซิส (*Doritaenopsis*) นอกจากนี้ยังมีการนำไปผสมกับสกุลอื่นอีก เช่น สกุลเข็ม แวนด้า และช้าง เป็นต้น

เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, Polymerase chain reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction) หรือพีซีอาร์ เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่น โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจโดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน การทำพีซีอาร์ คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสซ้ำกันหลาย ๆ รอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ด้วย ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสาย และมีปลาย 3' ในทิศทางเข้าหากัน ดังนั้นข้อกำหนดในการทำพีซีอาร์ คือต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมดหรือทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อการออกแบบสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้นจะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5' ของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลาย 5' ของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง (สุรินทร์, 2545)

ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีทำคือสกัดดีเอ็นเอออกจากเซลล์ นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ความร้อน แล้วลดอุณหภูมิลง

อย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายและมีปริมาณมากกว่าชิ้นดีเอ็นเออื่น ๆ มากมายเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสที่ใส่ลงในปฏิกิริยา เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลายๆ รอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นจนถึง 2^n เท่า เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ (สุรินทร์, 2545)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (Microsatellite marker)

ไมโครแซทเทลไลต์ (Microsatellite) หมายถึง ลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงอยู่ต่อเนื่องกันที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยเบส 1-6 เบส ชุดที่ซ้ำกันนี้จะอยู่ติดกันแบบหัวต่อหาง เช่น $(A)_n$, $(CA)_n$, $(TCC)_n$ และ $(GATA)_n$ เป็นต้น เมื่อ n คือจำนวนชุดซ้ำ พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดที่ศึกษา มีวิธีเรียกแบบอื่น ได้แก่ simple sequence repeat (SSR) หรือ short tandem repeat (STR) ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์นี้มีการกระจายตัวทั้งจีโนม แต่ไม่สม่ำเสมอ บางบริเวณก็พบมาก บางบริเวณก็พบน้อยกว่า ตามแต่ชนิดของสิ่งมีชีวิต การกระจายตัวของไมโครแซทเทลไลต์ส่วนใหญ่อยู่ในบริเวณที่ไม่ใช่ยีนหรือส่วนนำรหัสของยีน (noncoding region) (สุรินทร์, 2549)

ลักษณะของไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ สามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภท (Weber and May, 1990) ดังนี้

1. Perfect repeat เป็นไมโครแซทเทลไลต์ที่มีลำดับเบส 2 ตัว หรือมากกว่า เรียงซ้ำกันไปเรื่อยๆ เช่น $(CA)_n$
2. Compound repeat เป็นไมโครแซทเทลไลต์ที่มีลำดับเบสหลายชนิดเรียงต่อกัน เช่น $(CA)_n(GT)_n$
3. Imperfect repeat เป็นไมโครแซทเทลไลต์ที่มีเบสอื่นเข้ามาแทรกในลำดับเบสซ้ำ ซึ่งเกิดจากการกลาย เช่น $(CA)_n(N)_n(CA)_n$

หน้าที่ของไมโครแซทเทลไลต์ ยังไม่ทราบแน่ชัด มีไมโครแซทเทลไลต์บางส่วนที่มีการอนุรักษ์ (conserved) โดยพบอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด บางส่วนทำหน้าที่ได้เนื่องจากอยู่ในส่วนนำรหัสของยีน นอกจากนี้ยังพบว่าไมโครแซทเทลไลต์บางชนิด สามารถจับกับโปรตีนที่จำเพาะ และทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน (enhancer) โดยความแปรปรวนของจำนวนซ้ำ มีผลต่อการทำงานของยีน ลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลต์บางแบบยังมีผลต่อโครงสร้างของโครมาติน ด้วย (Godldstein and Schlötterer, 1999)

ลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์เป็นลำดับเบสที่ไม่เสถียร มีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่าลำดับเบสทั่วไป โดยการกลายพันธุ์ของไมโครแซทเทลไลต์มักเกิดจากการขาดหายไปของลำดับเบสซ้ำ (deletion) หรือการเพิ่มขึ้นของลำดับเบสซ้ำ (insertion) ต่างจากลำดับเบสทั่วไปที่มักเกิดการกลายแบบการแทนที่เบส โดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของชุดซ้ำมีกลไก 2 แบบคือการเลื่อนของสายดีเอ็นเอที่จับคู่กันขณะเกิดการจำลองโมเลกุล (Slip-strand mispairing) หรือที่เรียกว่าเกิด slippage (Levinson and Gutman, 1987) และการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ไม่เท่ากัน (unequal crossing over) (Richard and Pâques, 2000)

เนื่องจากลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ มีอัตราการกลายพันธุ์สูงประกอบกับการกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม จึงมีการนำดีเอ็นเอในส่วนนี้มาใช้ศึกษาในทางพันธุกรรมกันอย่างกว้างขวาง ทั้งในด้านการใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการทำแผนที่โครโมโซม การศึกษาวิวัฒนาการ และความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่มีความแปรปรวนในระดับ

ดีเอ็นเอต่ำ (Areshchenkova and Ganai, 2002)

การตรวจสอบดีเอ็นเอส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลต์ทำได้หลายวิธี ได้แก่ การทำ Southern blot hybridization โดยตัดจีโนมมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกขนาดดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้ายแถบดีเอ็นเอไปบนแผ่นเมมเบรน แล้วไฮบริไดซ์กับโพรบที่เป็นส่วนของไมโครแซทเทลไลต์ เช่น (CA)₁₀ วิธีนี้จะตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซทเทลไลต์แบบใดแบบหนึ่งตามชนิดของโพรบจากหลายตำแหน่งพร้อมๆ กัน (multi-locus marker) หรืออาจดัดแปลงมาใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลต์ นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว โดยไพรเมอร์จะไปจับกับลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลต์ชนิดเดียวกันได้หลายตำแหน่ง และเกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากหลายบริเวณ วิธีนี้เรียกว่า microsatellite primed PCR (MP-PCR) จากวิธีนี้มีการประยุกต์ใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสอื่นที่ไม่ได้เป็นส่วนหนึ่งของชุดซ้ำเข้าไปปลายของไพรเมอร์เดิมอีก 1-3 เบส เพื่อให้การจับตัวของไพรเมอร์กับตำแหน่งไมโครแซทเทลไลต์ในจีโนมมีความจำเพาะมากขึ้น โดยส่วนของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ คือ บริเวณที่อยู่ระหว่างส่วนของไมโครแซทเทลไลต์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์ จึงมีชื่อเรียกใหม่ว่า inter simple sequence repeat (ISSR) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสใดๆ ในจีโนมมาก่อน (สุรินทร์, 2549)

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน เป็นการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ชนิดใดชนิดหนึ่งที่ตำแหน่งจำเพาะ ครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single-locus marker) โดยเทคนิคพีซีอาร์ จึงต้องใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับลำดับเบสที่อยู่ขนาบข้างของ

ไมโครแซทเทลไลท์ (flanking DNA) ที่ตำแหน่งดังกล่าว และจำเป็นต้องมีข้อมูลลำดับเบสที่ต้องการ ดังนั้นจึงต้องพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์สำหรับสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษาก่อน (สุรินทร์, 2549)

วิธีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ แบบดั้งเดิมนั้น จะใช้เทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล เตรียมห้องสมุดจีโนม (genome library) โดยการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แล้วเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวกับดีเอ็นเอพาหะ (DNA vector) ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียเพื่อเพิ่มจำนวน จากนั้นคัดเลือกโคลนโดยการไฮบริดซ์กับโพรบที่เป็น ไมโครแซทเทลไลท์ (SSR probe) แล้วแยกดีเอ็นเอออกจากแบคทีเรียเพื่อหาลำดับเบสที่อยู่บนขาងกับไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ และออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งเป็นวิธีการที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน (He *et al.*, 2003) ในปัจจุบันการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์นิยมใช้วิธี enrichment โดยการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอร่วมกับการไฮบริดซ์ชิ้นดีเอ็นเอกับโพรบที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ที่ติดปลายด้วย ไบโอติน (biotin) และแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการด้วย magnetic bead ที่หุ้มด้วย streptavidin (Edwards *et al.*, 1996) ซึ่งหลังจากกำจัดดีเอ็นเอส่วนเกินออกไปแล้วจะมีชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสแบบไมโครแซทเทลไลท์ 50-90 เบสก่อนจะเชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะต่อไป (Butcher *et al.*, 2000) วิธีการ enrichment นี้มีประสิทธิภาพสูง และใช้เวลาในการพัฒนาน้อยกว่าวิธีดั้งเดิม (Billotte *et al.*, 2001) จากข้อดีของวิธี enrichment จึงมีผู้ใช้วิธีนี้พัฒนาการหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เพื่อตรวจสอบสิ่งมีชีวิตกันอย่างกว้างขวาง อาทิเช่น การพัฒนาเครื่องหมาย SSR ของเมลอน โดยทำการโคลนลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลท์ได้มากถึง 700 โคลน จาก *Tsp*-AG/TG microsatellite enriched library และสามารถสร้างไพรเมอร์ได้ถึง 144 ไพรเมอร์ ในจำนวนนี้สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพได้ 67 ไพรเมอร์ ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเมลอน (Ritschell *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคดังกล่าวมาใช้ในอ้อย (Pinto *et al.*, 2004) ฝ้าย (Qureshi *et al.*, 2004) ข้าว ข้าวสาลี และบาร์เลย์ (Rota *et al.*, 2005) สำหรับในกล้วยไม้ *Dendrobium* มีรายงานการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยวิธี enrichment เช่นเดียวกัน และประสบความสำเร็จเป็นอย่างดี โดยสามารถสร้างเครื่องหมาย SSR ได้จำนวน 8 เครื่องหมาย (Boonsrangsom *et al.*, 2008) การพัฒนาเครื่องหมาย SSR จำนวน 4 เครื่องหมายในกล้วยไม้ *Gynadenia conopsea* (L.) R. Brown (Campbell *et al.*, 2002) การพัฒนาเครื่องหมาย SSR จำนวน 8 เครื่องหมายใน กล้วยไม้ *Ophrys fusca* (Cotrim *et al.*, 2008)

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์มีวิธีการที่ยุ่งยาก และเสียค่าใช้จ่ายสูง แต่หลังจากการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ได้แล้ว สามารถนำไปใช้ได้ง่าย เนื่องจากเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้วิธีการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์จึงต้องการดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย และชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ

ตรวจสอบก็มีขนาดเล็ก จึงใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ไม่ต้องมีคุณภาพมากนัก นอกจากนี้ผลการตรวจสอบยังมีความแม่นยำ สามารถส่งข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์เพื่อนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการได้ มีโพลีมอร์ฟิซึมสูง และยังมีการข้ามแบบ codominance จึงสามารถแยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้ มีการกระจายทั่วทั้งจีโนม เหมาะสำหรับการใช้ในการทำแผนที่จีโนม ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ตรวจสอบความ สัมพันธ์ทางพันธุกรรม และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ อีกมากมาย (สุรินทร์, 2549) เช่น การจำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวด้วยเครื่องหมาย ISSR (Joshi *et al.*, 2000) การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและพิสูจน์ความหลากหลายทางพันธุกรรมลูกผสมของมันฝรั่งด้วยเครื่องหมาย SSR (Hwang *et al.*, 2002) การใช้เครื่องหมาย RAPD และ ISSR ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกล้วยพันธุ์ต่างๆ (Venkatachalam *et al.*, 2008) การนำเครื่องหมาย SSR จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างลูกผสมของส้ม (Oliveira *et al.*, 2002) การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้พันธุ์ต่างๆ ในกลุ่ม *Dendrobium* (Boonsrangsom *et al.*, 2008)

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ขึ้นมาจากฐานข้อมูล EST ของกล้วยไม้ชนิดต่าง ๆ ซึ่งวิธีนี้จะช่วยลดต้นทุนในการพัฒนาเครื่องหมาย SSR และยังได้เครื่องหมายโมเลกุลที่เป็นส่วนของยีนโดยตรง มีการใช้เทคนิคนี้ศึกษาสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น การพัฒนาและการทำแผนที่โครโมโซมของข้าวสาลีโดยใช้เครื่องหมาย EST-SSR และการประยุกต์เพื่อค้นหาโครโมโซม Rye ในข้าวสาลี (Li-Fang *et al.*, 2008) การประเมินผลทางพันธุกรรมของ EST-SST ที่ได้มาจากฝ้าย (Yu *et al.*, 2008) การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในหญ้าสายพันธุ์ gramineous (Linzhi *et al.*, 2008) และการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างประชากรของเอลมอนด์ป่าโดยใช้เครื่องหมาย EST-SSR (Omirshat *et al.*, 2009) เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- จุลภาค คำนวณศ์, ทิพวัลย์ อยู่ธา, พนิดา ฐาตุจิราภักกุล และฉัฐพร คำนวณศ์. 2548. การสร้างดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด SLP ของกล้วยไม้สกุลหวาย. ใน การประชุมประจำปี สวทช. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, ปทุมธานี.
- ปฐพีชล วายุอัคคี. 2547. คู่มือกล้วยไม้. ครั้งที่ 1. เพ็ท-แพล้น พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.
- วีรชัย ณ นคร. 2548. ศักยภาพของกล้วยไม้ไทยเพื่อการพัฒนาเชิงการค้า, น. 1-2. ใน การประชุมประจำปี สวทช. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, ปทุมธานี.

สมศักดิ์ อภิสทรวานิช. 2551. เอกสารประกอบการฝึกอบรม การพัฒนาและประยุกต์ใช้เครื่องหมาย
ไมโครแซทเทลไลท์. วันที่ 12-14 พฤษภาคม 2551 ณ ภาควิชาพันธุศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. ดอกกล้วยไม้สด. สถิตินำเข้า-ส่งออก. แหล่งที่มา:

<http://www.oae.go.th/statistic/export/1301OC.xls>, 19 กันยายน 2550.

Billotte, N., A.M. Risterucci, E. Barcelos, J.L. Noyer, P. Amblard and F.C. Baurens. 2001.

Development, characterization, and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq)
microsatellite markers. Genome. 44: 413-425.

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

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

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

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

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

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

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

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

- Hwang, S.Y., Y.T. Tseng and H.F. Lo. 2002. Application of simple sequence repeats in determining the genetic relationship of cultivars used in sweet potato polycross breeding in Taiwan. *Scientia Horticulturae* 93: 215-224.
- Joshi, S.P., V.S. Gupta, R.K. Aggarwal, P.K. Ranjekar and D.S. Brar. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1311-1320.
- Juillet, N., H. Freymond, L. Degen and J. Goudet. 2003. Isolation and characterization of highly polymorphic microsatellite loci in the bladder campion, *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae) *Mol. Ecol. Notes.* 3: 358-359.
- Li-Fang, Z., L. Feng, B. Qian, H. Xu, Z. Pei and Z. Qi. 2008. Development and Chromosome Mapping of New Wheat EST-SSR Markers and Application for Characterizing Rye Chromosome Added in Wheat. *Acta Agromonica Sinica* Volume 34, Issue 6.
- Linzhi, L., J. Wang, Y. Guo, f. Jiang, Y. Xu, Y. wang, H. Pan, G. Han, R. Li and S. Li. 2008. Development of SSR markers from EST of graminous species and their chromosome location on wheat. *Progress in Natural Science* 18(2008) 1485-1490.
- Oliveira, A.C., A.N. Garcia, M. Cristofani and M.A. Machado. 2002. Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. *Euphytica* 128: 397-403.
- Omirshat, T., Y. Geng, L. Zeng, S. Dong, F. Chen, J. Chen, Z. Song, Y. Zhong. 2009. Assessment of genetic diversity and population structure of Chinese wild almond, *Amygdalus nana*, using EST- and genomic SSRs. *Biochemical Systematics and Ecology* 37(2009) 146-153.
- Paterson, A.H., Tanksley, S.D., and Sorrells, M.E. 1991. DNA markers in plant improvement. *Adv. Agron.* 46: 39-90.
- Pinto, L.R., K.M. Oliveira, E.C. Ulian, A.A.F. Garcia and A.P. de Souza. 2004. Survey in the sugarcane expressed sequence tag database (SUCEST) for simple sequence repeats. *Genome* 47: 795-804.
- 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.

- Ritschel, P.S., T.C.L. Lins, R.L. Tristan, G.S.C. Buso, J.A. Buso and M.E. Ferreira. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for genetic analysis of melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant Biology* 4: 1471-1485
- Rivera, M.A.J., G.C. Graham and G.K. Roderick. 2003. Isolation and characterization of nine microsatellite loci from the Hawaiian geauper *Epinephelus quernus* (Serranidae) for population genetic analyses. *Mar. Biotechnol.* 5: 126-129.
- Rota, M.L., R.V. Kantety, J.K. Yu and M.E. Sorrells. 2005. Nonrandom distribution and frequencies of genomic and EST-derived microsatellite markers in rice, wheat and barley. *BMC Genomics* 6: 1-12.
- Shuttleworth, F.S., H.S. Zim and G.W. Dillon. 1970. *Orchids*. Golden Press. New York.
- Soliva, M., B. Gautshi, C. Salzmann, I. Tenzer and A. Widmer. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the orchid *Ophrys araneola* (Orchidaceae) and a test cross-species amplification. *Mol. Ecol.* 9: 2178-2179.
- Sue, P., L.G. Bailey and B.R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol component. *Plant Mol. Biol. Rept.* 15 (1): 8-15.
- Yu, Y., Z. Wang, C. Feng, Y. Zhang, Z. Lin, and X. Zhang. 2008. Genetic Evaluation of EST-SSRs Derived from *Gossypium herbaceum*. *Acta Agronomica silica*. 34(12) : 2085.2091.

วิธีทดลอง

การเก็บรวบรวมกล้วยไม้สกุลม้าวิง

รวบรวมกล้วยไม้สกุลม้าวิงในเขตจังหวัดอุบลราชธานี ในจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือแล้วนำมาขยายพันธุ์ในเรือนเพาะชำ ที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

การสกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบของตัวอย่างกล้วยไม้สกุลม้าวิง 4 วิธี ดังนี้

1. การสกัดแยก DNA จากกล้วยไม้โดยวิธีประยุกต์ของ Dellaporta et al., 1983

นำใบพืชประมาณ 2 กรัม ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ลงในโกร่ง เติมนิโตรเจนเหลวให้ท่วมแล้วบดให้ละเอียด จากนั้นถ่ายใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มี extraction buffer (100mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 300

ไมโครลิตร ที่บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติม 20% SDS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าแรง ๆ บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที กลับหลอดไปมาเป็นครั้งคราว เติมโปแตสเซียมอะซิเตทความเข้มข้น 5 M ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดย เขย่าแรง ๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ในขั้นนี้โปรตีนและโพลีแซคคาไรด์จะตกตะกอน ร่วมกับโปแตสเซียมโดเดซิลซัลเฟต เหลือกรดนิวคลีอิกอยู่ในสารละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 20,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดสารละลายใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) 1 เท่าของสารละลายที่ดูดมา กลับหลอดไปมาเบา ๆ เพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส่ในหลอดเซ้นตริฟิวจ์ขนาด 15 มิลลิลิตร เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 12 มิลลิลิตร หรือ 0.7 เท่าของสารละลายที่ดูดมา ผสมให้เข้ากันเบา ๆ นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือเป็นเวลานานข้ามคืนกรณีที่ไม่เห็นตะกอน เกียวตะกอนดีเอ็นเอด้วยแท่งแก้วปลายงอใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หรือนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วฝั่งตะกอนให้แห้งในตู้ 37 องศาเซลเซียส เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 M ปริมาตร 300 ไมโครลิตร อุณหภูมิห้อง 60 องศาเซลเซียส จนตะกอนละลายหมด เติม absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลายที่ดูดมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอลซ้ำอีกครั้ง จากนั้นฝั่งตะกอนให้แห้งในตู้ 37 องศาเซลเซียส แล้วเติม RNase buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 15 mM NaCl) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วเติม RNase A 10 ไมโครลิตร (10 mg/ml) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน ที่ 4 องศาเซลเซียส เติม RNase buffer เพิ่มจนปริมาตรรวมเป็น 500 ไมโครลิตร สกัดเอนไซม์ RNase A และโปรตีนที่อาจหลงเหลืออยู่ออกไปด้วย ฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ เพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส่ส่วนบนในหลอดใหม่ สกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย เนื่องจากฟีนอลมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด เช่น เอนไซม์ตัดจำเพาะ DNA polymerase เป็นต้น ดูดสารละลายส่วนบนออกแล้วใส่ในหลอดใหม่ เติมโซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 3 M pH 5.2 ปริมาตร 1 ใน 10 เท่าของสารละลายที่ดูดมา และเติมเอทานอลปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ดูดมา เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอซ้ำ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (หรือเก็บไว้ที่ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เทสารละลายทิ้งไป ฝั่งตะกอนให้แห้งโดยคว่ำ

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

2. ชุดสกัด DNA Sabai Kit โดย Plant Molecular Biology Laboratory ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

3. ชุดสกัด DNA Nucleic Acid Extraction Kit โดยบริษัท Vivantis

4. การสกัด DNA โดยใช้ 2X CTAB (Lodhi *et al.* 1994, with minor modification)

บดตัวอย่างประมาณ 0.3-0.5 กรัม ในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว แล้วนำตัวอย่างใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 2X CTAB extraction buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาจนสารในหลอดเป็นเนื้อเดียวกัน และบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม chloroform : isoamylalcohol 24:1 ปริมาตร 840 ไมโครลิตร ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน บั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดเอาส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตรเท่ากับส่วนที่ดูดมา ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอน DNA ด้วย 95% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนอีกครั้งด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นจึงตะกอน DNA ให้แห้ง แล้วจึงละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตรกำจัด RNA ด้วย RNase A (10 ng/μl) 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นเก็บรักษา DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

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

- ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยดูอัตราส่วนของค่า A_{260} / A_{280} ถ้าค่าที่ได้มีค่าระหว่าง 1.8 – 2.0 แสดงว่าดีเอ็นเอที่ได้เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่บริสุทธิ์ ถ้าค่าที่ได้มากกว่า 2.0 แสดงว่าดีเอ็นเอมีอาร์เอ็นเอปนอยู่ ถ้าค่าที่ได้น้อยกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนเจือปน

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

- สืบค้นหาลำดับเบสของเครื่องหมาย EST จากฐานข้อมูลของกล้วยไม้สกุลต่างๆ และรวบรวมข้อมูล โดยเฉพาะจากฐานข้อมูลใน GenBank Database จากนั้นนำมาทำการ cluster ด้วยโปรแกรม MetaGenomeGAMBLER (<http://www.insilicobiology.co.jp>)

- นำข้อมูลที่ได้มาหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป WebTROLL (Castelo et al., 2002) โดยกำหนดค่าการค้นหา mono-, di-, tri- tetra-, penta- และ hexa-nucleotide motifs ให้มีจำนวนซ้ำน้อยที่สุดเป็น 10, 5, 5, 3, 3 และ 3 ซ้ำตามลำดับ หลังจากนั้นจะต้องนำ EST-SSR ที่วิเคราะห์ได้มาคัดกรอง low complexity sequence โดยการใช้โปรแกรม RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>)

- ทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่วิเคราะห์มาได้ โดยใช้โปรแกรม WebTROLL เพื่อใช้ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิง

- ตรวจสอบความสามารถของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิง

- ทำการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิง ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ โดยการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากกล้วยไม้และตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิสในโพลีอะครีลาไมด์เจล

- ตรวจสอบผลและวิเคราะห์ผล เพื่อสร้างภาพแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิงที่รวบรวมมาได้

- สรุปและวิเคราะห์ผลการวิจัย เพื่อเตรียมตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

ผลการทดลอง

การเก็บรวบรวมกล้วยไม้สกุลม้าวิง

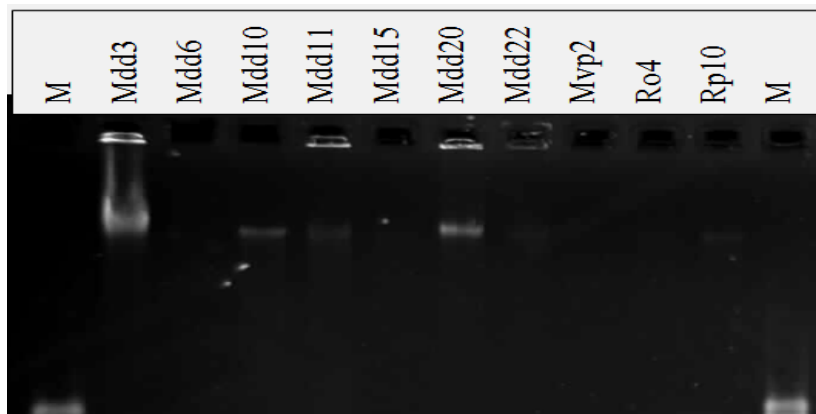
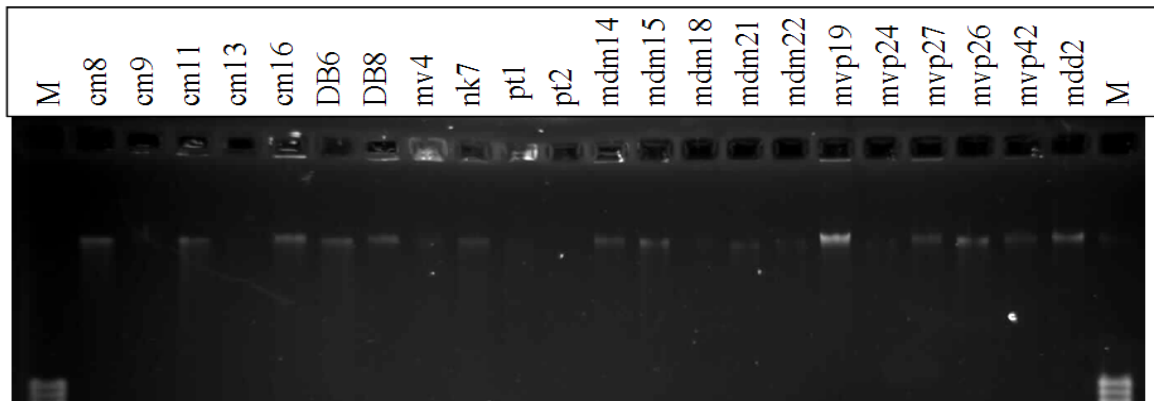
เก็บรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้ในสกุล *Doritis* ทั้งหมด 30 ตัวอย่าง จากเรือนเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ซึ่งได้มีการเก็บรวบรวมตัวอย่างของกล้วยไม้ในสกุล *Doritis* จากสถานที่ต่างๆ มาเพาะเลี้ยงไว้แล้ว โดยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายชื่อสายพันธุ์และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างกล้วยไม้จำนวน 32 ตัวอย่าง

No.	ID.	ชื่อ	ลักษณะใบและจุด	ดอก	สีดอก	สีกลีบปาก	สีก้านดอก	แหล่งที่มา
1	S2	<i>D. regnieriana</i>	เรียวเล็ก/ม่วง	-	-	-	-	สระบุรี
2	S3	<i>D. regnieriana</i>	เรียวเล็ก/ม่วง	-	-	-	-	สระบุรี
3	S4	<i>D. regnieriana</i>	เรียวเล็ก/เขียวแก่	-	-	-	-	สระบุรี
4	M2	<i>D. pulcherrima</i>	เรียวยาว/ม่วง	-	-	-	-	สระบุรี
5	M5	<i>D. pulcherrima</i>	เรียวยาว/ม่วง	-	-	-	-	สระบุรี
6	Mah	<i>D. pulcherrima</i>	เรียวยาว/เขียวแก่	-	-	-	-	สระบุรี
7	RO4	<i>D. pulcherrima</i> var. <i>buyssoniana</i>	เรียวยาว/น้ำตาล	-	-	-	-	ร้อยเอ็ด
8	RO10	<i>D. pulcherrima</i> var. <i>buyssoniana</i>	เรียวยาว/ม่วง	-	-	-	-	ร้อยเอ็ด
9	DB6	<i>D. pulcherrima</i> var. <i>buyssoniana</i>	เรียวยาว/น้ำตาล	-	-	-	-	ช่องแม็ก อุบลราชธานี
10	DB8	<i>D. pulcherrima</i> var. <i>buyssoniana</i>	เรียวยาว/น้ำตาล	ฝั่ง	ม่วงอ่อน	ส้มอ่อน	เขียว	ช่องแม็ก อุบลราชธานี
11	MDD2	<i>D. pulcherrima</i> var. <i>buyssoniana</i>	เรียวยาว/เขียวแก่	-	-	-	-	ตลาดอินโดจีน มุกดาหาร
12	MDD3	<i>D. pulcherrima</i> var. <i>buyssoniana</i>	เรียวยาว/น้ำตาล	-	-	-	-	ตลาดอินโดจีน มุกดาหาร
13	MDD6	<i>D. pulcherrima</i> var. <i>buyssoniana</i>	เรียวยาว/น้ำตาล	-	-	-	-	ตลาดอินโดจีน มุกดาหาร
14	MDD10	<i>D. pulcherrima</i> var. <i>buyssoniana</i>	เรียวยาว/น้ำตาล	-	-	-	-	ตลาดอินโดจีน มุกดาหาร
15	MDD11	<i>D. pulcherrima</i> var. <i>buyssoniana</i>	เรียวยาว/น้ำตาล	-	-	-	-	ตลาดอินโดจีน มุกดาหาร
16	MDD15	<i>D. pulcherrima</i> var. <i>buyssoniana</i>	ยาวมน/เขียวแก่	-	-	-	-	ตลาดอินโดจีน มุกดาหาร
17	MDD20	<i>D. pulcherrima</i>	เรียวยาว/น้ำตาล	-	-	-	-	ตลาดอินโดจีน มุกดาหาร
18	MDD22	<i>D. pulcherrima</i> var.	ยาวมน/เขียวแก่	ฝั่ง	ม่วงอ่อน	ส้มอม	เขียว	ตลาดอินโดจีน

19	CM8	<i>buyssoniana</i> <i>D. pulcherrima</i> var.	เรียวยาว/น้ำตาล	-	-	เหลือง	-	มูกอาหาร ช่องแม็ก
20	CM11	<i>buyssoniana</i> <i>D. pulcherrima</i> var.	เรียวยาว/น้ำตาล	-	ม่วงเข้ม	ม่วงเข้ม	เขียวอม	อุบลราชธานี ช่องแม็ก
21	CM16	<i>buyssoniana</i> <i>D. pulcherrima</i> var.	เรียวยาว/น้ำตาล	ลู่	ม่วง	เหลือง	เขียว	อุบลราชธานี ช่องแม็ก
22	MV4	<i>buyssoniana</i> <i>D. pulcherrima</i>	เรียวยาว/-	ลู่	ม่วง	ส้มเข้ม	เขียวอม	อุบลราชธานี ช่องแม็ก
23	MVP2	<i>D. pulcherrima</i>	เรียวยาว/น้ำตาล	ลู่	ขาว	ส้มเข้ม	เขียวอม	อุบลราชธานี โพธิ์ไส
24	MVP26	<i>D. pulcherrima</i>	เรียวยาว/น้ำตาล	ลู่	ม่วง	ม่วงเข้ม	เขียวอม	อุบลราชธานี โพธิ์ไส
25	MVP27	<i>D. pulcherrima</i>	เรียวยาว/น้ำตาล	-	-	-	-	อุบลราชธานี โพธิ์ไส
26	PT1	<i>D. pulcherrima</i>	เรียวยาว/น้ำตาล	ลู่	-	เหลืองเข้ม	เขียวอม	อุบลราชธานี ภูผาเทิบ
27	PT2	<i>D. pulcherrima</i>	เรียวยาว/น้ำตาล	ลู่	ม่วง	ส้มเข้ม	เขียวอม	มุกอาหาร ภูผาเทิบ
28	MDM14	<i>D. pulcherrima</i>	เรียวยาว/-	ลู่	ม่วง	ม่วงเข้ม	เขียวม่วง	มุกอาหาร ตลาดอินโดจีน
29	MDM18	<i>D. pulcherrima</i>	เรียวยาว/น้ำตาล	-	-	-	-	มุกอาหาร ตลาดอินโดจีน
30	MDM21	<i>D. pulcherrima</i>	เรียวยาว/-	-	-	-	-	มุกอาหาร ตลาดอินโดจีน

เมื่อนำตัวอย่างกล้วยไม้ทั้ง 30 ตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพโดยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าสามารถที่จะสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างได้ ดังแสดงในภาพที่ 1

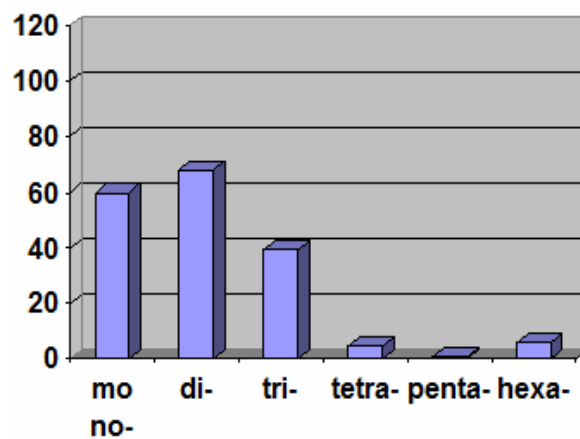


ภาพที่ 1 ผลการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธี agarose gel electrophoresis ของตัวอย่างกล้วยไม้ทั้ง 30 ตัวอย่าง โดย M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

การพัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

รวบรวมข้อมูล EST จากฐานข้อมูลต่าง ๆ และพัฒนาออกแบบไพรเมอร์เครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR เมื่อเริ่มต้นทำการศึกษาได้ค้นหาข้อมูลลำดับเบสของสมาชิกวงศ์ Orchidaceae จากฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI โดยพยายามรวบรวมข้อมูล EST และ mRNA ให้ได้มากที่สุดสำหรับนำไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลในกล้วยไม้สกุล *Doritis* ต่อไป จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าสามารถสืบค้นข้อมูลที่เป็นลำดับเบสของ EST ในกล้วยไม้ ได้ทั้งหมด 8009 ลำดับเบส ข้อมูล mRNA ของกล้วยไม้สกุล *Doritis* 14 ลำดับเบส และ mRNA ของกล้วยไม้สายพันธุ์อื่น ๆ อีก 88 ลำดับเบส จากนั้นนำข้อมูล EST ที่ได้ไปทำการจัดกลุ่มข้อมูลและคัดเลือกคุณภาพของข้อมูลโดยใช้โปรแกรม cap3 โดยข้อมูลที่จะนำไปวิเคราะห์จะต้องอยู่ในรูปแบบของ FASTA พบว่าหลังจากวิเคราะห์ข้อมูล คงเหลือข้อมูลที่มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้งานต่อไปทั้งหมด 1261 ข้อมูล แล้วจึงนำข้อมูลเหล่านี้ไปหาส่วนของไมโครแซทเทลไลต์ต่อไป โดยใช้โปรแกรมสำหรับการค้นหาลำดับเบสซ้ำ Websat (<http://wsmartins.net/websat/>) กำหนดค่า repeat แบบ mono di tri tetra penta และ hexa ให้มีลำดับ

เบสนั้นๆซ้ำกัน 10, 6, 5, 4, 4 และ 4 ตามลำดับ ซึ่งค่าเหล่านี้เป็นค่าอย่างต่ำในการค้นหาบริเวณไมโครแซลเทลไลต์ของโปรแกรมและเมื่อพบบริเวณที่มีไมโครแซลเทลไลต์ก็สามารถออกแบบไพรเมอร์ได้เลยในโปรแกรมนี้ โดยสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 177 คู่ไพรเมอร์ แบ่งเป็นแบบซ้ำ 1 เบส จำนวน 60 คู่ (33.90%) แบบซ้ำ 2 เบส 68 คู่ (38.42%) แบบซ้ำ 3 เบส 37 คู่ (22.03%) แบบซ้ำ 4 เบส 5 คู่ (2.82%) แบบซ้ำ 5 เบส 1 คู่ (0.56%) และซ้ำ 6 เบส 6 คู่ (3.39%) ดังภาพที่ 1 นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์รูปแบบของ SSR motif พบว่ารูปแบบที่พบมากที่สุดคือ A/T โดยคิดเป็น 32.20% รูปแบบที่มีมากลำดับที่สอง คือ TC/GA คิดเป็น 15.1% และรูปแบบที่มีมากเป็นลำดับที่สามคือ AG/CT คิดเป็น 11.24% ดังแสดงในภาพที่ 2 และ ตารางที่ 2



ภาพที่ 2 จำนวน EST-SSR แบ่งตามชนิดลำดับเบสซ้ำ

ตารางที่ 2 รูปแบบและจำนวนของ SSR motif

SSR motif	Number	Frequency
A/T	57	32.02247
G/C	3	1.685393
AT	10	5.617978
TA	8	4.494382
CA	1	0.561798
AC/GT	2	1.123596
AG/CT	20	11.23596
TC/GA	27	15.16854
AAG/CTT	3	1.685393

AGG/CCT	2	1.123596
ATC/GAT	2	1.123596
AGA/TCT	1	0.561798
ATA/TAT	1	0.561798
CAA/TTG	3	1.685393
CGG/CCG	8	4.494382
GAC/GTC	1	0.561798
GCC/GGC	7	3.932584
GCG/CGC	3	1.685393
GTG/CAC	3	1.685393
TGA/TCA	1	0.561798
TGG/CCA	1	3.571429
TTC/GAA	2	1.123596
AAAC/GTTT	5	2.808989
TTGGT/ACCAA	1	0.561798
CCCAAA/TTTGGG	2	1.123596
CGGCAG/CTGCCG	3	1.685393
TAACCC/GGGTTA	1	0.561798

จากนั้นทำการสุ่มเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ แล้วสามารถที่ให้ผลผลิตที่มีขนาด 100 – 400 คู่เบส มาทั้งหมด 100 คู่ไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการทดสอบเครื่องหมายไมโครแซเทลไลท์ในกล้วยไม้สกุล *Doritis* ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ 100 คู่ไพรเมอร์

ลำดับ	ชื่อ	ลำดับเบส
1	ORVDM1-F	CCACGGTTGTATGTTCTGTTT
2	ORVDM1-R	AACAAAGCACTAGGCAAAGGC
3	ORESTM5-F	CAAACCATAGAGCGGTGGAT
4	ORESTM5-R	CCTTAGCCCAATTTATCGAA
5	ORESTM17-F	TTTCCATCTCTACTTCGTGCG
6	ORESTM17-R	ATTCTACCTCAACTGCTGCCAT
7	ORESTM32-F	GGTGGATGTAACTTTGGTTGC
8	ORESTM32-R	CACGTTTAAACCCGCCAA
9	ORESTM45-F	CTTTCAATGGGGATAAAAGCAC
10	ORESTM45-R	AAACCAGAAACATTTACCCC
11	ORESTM49-F	TTTGTTGGTGTTTTGCAGTAGG
12	ORESTM49-R	TGGGATTTGATACAGTGAGAGC
13	ORESTM59-F	TTCTTCTGTGCATCTTTTGCTC
14	ORESTM59-R	CACAAACCCAATTTAACACCCT
15	ORESTM94-F	CTGCTTCCCAAGTGATTCTTCT
16	ORESTM94-R	GGTCAGGCATTTCAACAAAAC
17	ORESTM109-F	CGGTCTTCTTCTATCGCATTTTC
18	ORESTM109-R	AATTCCCTTGTCATGTTGGTCT
19	ORESTM115-F	AGGAGGAGATGGAAGAGTTGAT
20	ORESTM115-R	GGCAAGAAACAAAGCAAAAG
21	ORESTM127-F	CTTGATGAATGTGAGGAAACCA
22	ORESTM127-R	AAACCTTACTGTTGGGCACACT
23	ORESTM129-F	CAGAACCCTCTTTCCCCTACTT
24	ORESTM129-R	AAACTGCATAACTCCCACACAA
25	ORESTM130-F	GAGGCCTCGTGCCGAATT
26	ORESTM130-R	CGAGAATGTACCGGAAAACCTG

27	ORESTM133-F	AAGCGAGAGAGAGAGAGAACGA
28	ORESTM133-R	ATGAGGAGAAGGTAATGGGGAA
29	ORESTM136-F	ACCCTTTTCTTGGCTTCTAACC
30	ORESTM136-R	ATGGAGTGGATCTCTTGCTCTC
31	ORESTM140-F	CACTGAGAGGAAGAAAGGTACAAAG
32	ORESTM140-R	ATAACAGAGGAGGATTGCGAGA
33	ORVAESTM2-F	AATTCGATTAGTCAGCCACCAA
34	ORVAESTM2-R	ATTTGAGCGTCCGTTGAAGTC
35	ORVAESTM1-F	CATGGGCAACAAGAGTGAAAC
36	ORVAESTM1-R	AAATAGGCAAACACTGGCCTT
37	ORDBM5-F	AAAAGAAGCTGAGAGAGAAGTGG
38	ORDBM5-R	GAGTGGAGAAGACAATTAGGGC
39	ORPHESTM1-F	TCTTCCATCATCGCACATACTC
40	ORPHESTM1-R	GCACAAGACCAATAAGGAAAGG
41	ORPHESTM3-F	GCGGTATCGAACTTGAATGG
42	ORPHESTM3-R	AAGAATAACAAGCAGTCGAGCC
43	ORPHESTM9-F	CATTGCAATGCCTCCACTATAA
44	ORPHESTM9-R	CCTTTAAGCCCATTACCCCTA
45	ORPHESTM12-F	CTAGCCTGCAAGAAGGGC
46	ORPHESTM12-R	CAAGAGGCACTAAATCCAGACA
47	ORPHESTM13-F	CACGAGGAACAAAAGAAGGAA
48	ORPHESTM13-R	CTAAATCTCAACAAAGCCCTGC
49	ORPHESTM14-F	CCCACCGACAAATTCATACTT
50	ORPHESTM14-R	TAAGAGAGGTTGGAGAGAAGGG
51	ORPHESTM16-F	TGGAAATGACAAGGTTTCTGTG
52	ORPHESTM16-R	TTGAGCTTAGGAGGCAAATAGG
53	ORPHESTM23-F	CTAGCCTGCAAGAAGGGC
54	ORPHESTM23-R	CGGTACAACAAGAGGCACTAAA
55	ORPHESTM27-F	AGTGAAGGTTTTGAGGAAAGGC

56	ORPHESTM27-R	CATAGGGATTGGTCCGGC
57	ORPHESTM30-F	TTTCCATCTCTACTTCGTGCG
58	ORPHESTM30-R	GTGGGGTTTCTAGGGTTTCTTC
59	ORPHESTM44-F	TCTACTGGATTTTGGATGGGCA
60	ORPHESTM44-R	GGGTTCAAGGGAAGCCCC
61	ORDBM8-F	GCCTCTCTCTTTCTCTCACTGC
62	ORDBM8-R	GAAGAATCCCCAGTTCTCACAG
63	ORESTM8-F	GTCTTGGTCTGATGAACATGGA
64	ORESTM8-R	TTGTTGTTGTTATTGCTACCGC
65	ORESTM19-F	GACTAAGACTGAAGAAGGCAGCA
66	ORESTM19-R	ATTTCCAGAAGCCAATACTCCA
67	ORESTM24-F	TAAAACCAGATCCTCGTCCATA
68	ORESTM24-R	CCCCAACATTAAGGGAAT
69	ORESTM28-F	CTAACCATGCCAAACGATGATA
70	ORESTM28-R	AACGTCCTTCCCAATAGCATAA
71	ORESTM30-F	CGAATTCGGCACGAGGAG
72	ORESTM30-R	GAAGAAGAACCTTGTAATGGCG
73	ORONM1-F	AGTAACATCAGGCGCTTCAACT
74	ORONM1-R	GCTTGGGAAATGACTAACTGG
75	ORCAM1-F	CGACCATTCTAAGCAGCAACTA
76	ORCAM1-R	GCCGGTAATTTTCTTTGTTAC
77	ORDBM2-F	CTTATTGTCGGCATCATCCTTT
78	ORDBM2-R	ATCATTTGACACCGCTAAACCT
79	ORDBM3-F	AAGTTAGCGGGGATGCTGAT
80	ORDBM3-R	GCCTTAGCTGTTCAAATTCTTCC
81	ORDBM4-F	CCTTACTTGTCCCGACTCCTTA
82	ORDBM4-R	GGAAGAGAAGACACAGCCAAAG
83	ORDBM7-F	AGATAAATTGCTCCCTTCCCC
84	ORDBM7-R	GAGGTCGTCTTCTTCCTCTGAA

85	ORESTM4-F	CCATGAGATCCCCATAGTTGTT
86	ORESTM4-R	CCGGGTAACCAGGGTTTT
87	ORESTM7-F	ATGAGTTTATGCTTCATCGGGT
88	ORESTM7-R	GCGGCCAGTAATTGTATAGCTC
89	ORESTM22-F	TCAGTTGGTTCCTTAATTGGCT
90	ORESTM22-R	GCAAGGTATGCCAGAGACTTTT
91	ORESTM26-F	CACTGGATCACCTATCACGGTA
92	ORESTM26-R	TAGTTCCAAATAAAAGGCCCC
93	ORESTM27-F	ATTGACGATGAAACCATGACTG
94	ORESTM27-R	AGAAATACTCACCCTGCCCTG
95	ORESTM35-F	TCTTTTCTCCCTCTCCATTCAG
96	ORESTM35-R	AGAAGCAGCAGAACTAGAACCG
97	ORESTM38-F	AGATTTCCCAAGACATGCAGTT
98	ORESTM39-R	CGGGATAAATTCCTACATCCAC
99	ORESTM42-F	GGTCTTCAACAATAGGCAGTGA
100	ORESTM42-R	TGGTAGCTCGCATTTAAGGAAT
101	>CL244CONTIG1-R	TCTCTGAAACGAAAAGCGAAG
102	>CL244CONTIG1-F	CATCGGTGGAGAAAACAGAAG
103	>CL296CONTIG1-R	AGACGGGCTTAATGATGTCATT
104	>CL296CONTIG1-F	TGGTATGTATGTAAATGCCCCA
105	>GI 110664761-R	CCCCAAAATCTGGGATCTC
106	>GI 110664761-F	GGTTGAACGGAACCTTGATAAGC
107	>GI 110663516-R	ATCTGAAGCCATTGATAACCGA
108	>GI 110663516-F	AGAAATACTCACCCTGCCCTG
109	>GI 110664470-R	TACGAGTCATTTTGCCCTTTG
110	>GI 110664470-F	TTCGGATAAAAGCGAAGGAA
111	>GI 109154407-R	TCAGATTCTTCTTGGTCGTGAG
112	>GI 109154407-F	GCTGGTGGAGACCCTGAA
113	>GI 109151992-R	CCAGGATCAAATCTTCCTTGAG

114	>GI 109151992-F	CAACACATAGACGAACTCCATCA
115	>GI 109151206-R	GCAAATGAACTGAAGTGGGTTA
116	>GI 109151206-F	CAAGCATATAGCACACCACACA
117	>CL195CONTIG1-R	AAGTCGTTGCTTCTCCCTCTC
118	>CL195CONTIG1-F	AAAGGAATTGGAAGAGTTGCTG
119	>CL141CONTIG1-R	TCGAGATATGTTCTGGGGTCTT
120	>CL141CONTIG1-F	AGACTGCCCTCATATATAACAGCA
121	>CL491CONTIG1-R	AGGTGAAGGCTGGATTCTTGT
122	>CL491CONTIG1-F	GTACTCCACTCCGAACGAAAAC
123	>GI 109154284-R	GTCTGCAACATACTCAAGCATAGC
124	>GI 109154284-F	CTTTTGGTCTTTCCCATCCTTT
125	>GI 109152173-R	ATCACGGTCTTTGGCGAT
126	>GI 109152173-F	GGAAGTCCAGAAAGGAAGAACA
127	>GI 109153360-R	AAAGGAACTATTATTGGCGGCT
128	>GI 109153360-F	ATATGGCTTGGACTGATCGC
129	>GI 109152185-R	AGCTGAGGTGGTAGAGACGAAG
130	>GI 109152185-F	CCAGGACAACCCATTTGATAAC
131	>CL140CONTIG1-R	TGAGGAATTCCGCACGAG
132	>CL140CONTIG1-F	CAAATAGGCGGCGATTTATTAG
133	>CL201CONTIG1-R	GCAAATGAACTGAAGTGGGTAG
134	>CL201CONTIG1-F	GCATAACAGTCGGAAGCATACA
135	>CL258CONTIG1-R	GGAGCATCTAGGAGTTGGAAGA
136	>CL258CONTIG1-F	AGACGAGTTCATTTGCATTGG
137	>GI 110663306-R	GAAGCAGCAGCAGAAGAGGT
138	>GI 110663306-F	GACTCCATTACTCTGAAACCGTG
139	>GI 110663752-R	TGGCGGGTCTTCAACAATA
140	>GI 110663752-F	GCCCTGTTTGGATCACTTTCTA
141	>CL11CONTIG3-R	GATTTGGTTTTGCTGATAAGGC
142	>CL11CONTIG3-F	TTTACTCGCCAGAGAGAGCAG

143	>CL128CONTIG1-R	GCATACCCAGAATGAAGAGGAC
144	>CL128CONTIG1-F	ACACATCAGCAACAAGGTCAAT
145	>CL163CONTIG1-R	TTTGAGAGGAAGTTTGTGTCCC
146	>CL163CONTIG1-F	GGTTTGAAGAACAGCAACATGA
147	>CL186CONTIG1-R	CCATCACGGTCACGATCTAAT
148	>CL186CONTIG1-F	GGAAGTCCAGAAAGGAAGAACA
149	>CL295CONTIG1-R	TAAAAGGAGCAAGGCGAGATAG
150	>CL295CONTIG1-F	GGCTGTAGATGACTGGGAGAAG
151	>CL340CONTIG1-R	CAAATCTTAAC TTCTGTCCCCG
152	>CL340CONTIG1-F	CATGCTATCCACTCCACCATTA
153	>CL455CONTIG1-R	CATTCCATT CATCTCTCATCCA
154	>CL455CONTIG1-F	TACAAATCAAAGTCATCGTCGG
155	>GI 109151933-R	GAAGCAGCAGCAGAAGAGGT
156	>GI 109151933-F	GCTTTCGACTCCATTACTCTGAA
157	>GI 109153057-R	AGCACAGAAAACAAAGCATGAG
158	>GI 109153057-F	AACGGAAATCCTTGAACCACT
159	>GI 109152891-R	GGACCTTCGTCACTCACTCTTT
160	>GI 109152891-F	TCTTCCCCTGTACCTTCTTTGA
161	>GI 110663257-R	GAAGCAGCAGCAGAAGAGGT
162	>GI 110663257-F	GACTCCATTACTCTGAAACCGTG
163	>GI 110663905-R	CGGGTCTTCAACAATAGGCA
164	>GI 110663905-F	GCCCTGTTTGGATCACTTTCTA
165	>GI 109153889-R	CCCCAACTCATCTCCACCT
166	>GI 109153889-F	TAATAACTGGGCAGCAAGTCG
167	>GI 109154341-R	AATCCAAATCCAACACCAACTC
168	>GI 109154341-F	TAATTCCAGCCACAGTCTCCTT
169	>CL106CONTIG1-R	TTTCCATCCTCCTCACTTCATT
170	>CL106CONTIG1-F	AGTATCGTCAAAGCCAGGGATA
171	>CL275CONTIG1-R	AGTCCCTCTCCGTCCTATGATT

172	>CL275CONTIG1-F	CTTCTTTCCAGTCATGTCCAGC
173	>CL10CONTIG1-R	ATGGCAGCAGTTGAGGTAGAAT
174	>CL10CONTIG1-F	TCCATTACTCTGAAACCGTGCT
175	>CL96CONTIG1-R	TGAAACCCTAACTAGCCGCC
176	>CL96CONTIG1-F	TATACCGCCTACCAATCAATCG
177	>CL106CONTIG1-R	GCACGAGGATCAATTTAGCATA
178	>CL106CONTIG1-F	GGAAGATGATGGGTACGTCATT
179	>CL117CONTIG1-R	TGCAAGAAACCTTAGAAGCTCA
180	>CL117CONTIG1-F	CTAGGAGAACAAAAGGGGAGGT
181	>CL4CONTIG1-R	ATGGCAGCAGTTGAGGTAGAAT
182	>CL4CONTIG1-F	TGCCTTCTTCGGTCTTAGTCTC
183	>CL32CONTIG1-R	CTCTCTCCTAACCCTCTCCCTC
184	>CL32CONTIG1-F	AGCAATGGGAAGAAACACATCT
185	>CL39CONTIG2-R	CGCTGAGGAGAAGCACTATTTT
186	>CL39CONTIG2-F	GTGGACGGTGTGGTCATAATC
187	>CL61CONTIG1-R	AATCCAAATCCAACACCAACTC
188	>CL61CONTIG1-F	AGCACACAGAACGAAAGAAACA
189	>CL62CONTIG1-R	CAGCACAGAAAAGAAAGCATGA
190	>CL62CONTIG1-F	TTCGGTCCACAGTATAGATTCGT
191	>CL138CONTIG1-R	AATTCAGTACCATTGCGATCC
192	>CL138CONTIG1-F	TCCGTATTTTGAGCCTTCAGTT
193	>CL295CONTIG1-R	CGCCAATCGTCTCTCTTCTATT
194	>CL295CONTIG1-F	GTTTTCTCTTCTTGCCTCTCC
195	>GI 110663752-R	TGGCGGGTCTTCAACAATA
196	>GI 110663752-F	TGGTAGCTCGCATTTAAGGAAT
197	>CL17CONTIG3-R	GTGAGGAAACCACCATGTATGA
198	>CL17CONTIG3-F	AAACCATCCAGCAAAGACAAAC
199	>GI 109154809-R	CCTCGTGCCGAATTCGGC
200	>GI 109154809-F	AAACTTGGGCTTCGCCTTTTCC

นอกจากนี้ได้มีการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในกล้วยไม้สกุลอื่น ๆ อีกทั้งหมด 35 คู่ไพรเมอร์ โดยอ้างอิงจากงานวิจัยของทิพวัลย์และคณะในปี 2549 Pellegrino *et al.*, 2001 และ Yue *et al.*, 2006 ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 รายชื่อไพรเมอร์ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ได้ในกล้วยไม้สกุลอื่น ๆ
ทั้งหมด 35 คู่ไพรเมอร์ โดย F คือ Forward primer และ R คือ Reverse primer

ลำดับ	ชื่อ	ลำดับเบส
1	ORCA40-F	CAAGCTACTTCAGACTCATC
2	ORCA40-R	GAAGACACTGCTCATATTTTC
3	ORCA63-F	TCTTGTAATTCAAAGCGGGC
4	ORCA63-R	GGCAAAGATCCATCACCAAC
5	ORCA84-F	TGCTCTTGCATTCCTTACGACT
6	ORCA84-R	CACGAGGAAGAAATGCACACTC
7	ORCA165-F	GAAGGAGAACCTTGTGTGCAAC
8	ORCA165-R	TGTCACTATGTGTTGGCTTGCT
9	ORCT6-F	CTCCTTGCTTGGATTTGCTTC
10	ORCT6-R	CACCTCATCACATCTTGCCAT
11	ORCT8-F	GAGGTGGGGATGAGGAATAGA
12	ORCT8-R	ATCTAGCCACCAGTGCTGCCA
13	ORCT11-F	AGCAGCACTTGGGTTTATGTC
14	ORCT11-R	GAATCTGAACTGCATGGCTCT
15	ORCT33-F	TGCATCTGGGAATGTGAGAG
16	ORCT33-R	ACCCATTGCCTATGATGGAA
17	ORCT35-F	AATCCTACACTTTGGCAACAAA
18	ORCT35-R	TTTGAATCCTCTTGGACGTTCT
19	ORCT40-F	GGCTCTGGAGATAACTAGGTTC
20	ORCT40-R	CGTTCTCCAGCTCTTCTCTCT

21	ORCT52-F	GGCAACCCCATCTATAGCAA
22	ORCT52-R	ATGGCTATCGACTCCTCGAA
23	ORCT58-F	ATGGAGAGGGATGAAGAGTGT
24	ORCT58-R	ATCCCATTACCTTTGGAGTCTC
25	ORCT59-F	TGGAAGTTTCGGCATTACAC
26	ORCT59-R	GTAGGGTAATAGTAGCCTACCT
27	ORCT69-F	AAGAGGAAGGATCTACTC
28	ORCT69-R	ATAATGTGGCTTAGTCAG
29	sv01-F	TTTAGATGGCTGTGTGTGTTAGG
30	sv01-R	CAGCACATCCCATCCCTCTAAATCC
31	sv02-F	GTGTGAGGTGTAGTTGAGGAGA
32	sv02-R	TTTTGCTCACCTCCATCAGC
33	sv03-F	TAATAGGTTGGGATGTCTTAGAGGC
34	sv03-R	ACAGCACTCACACTCTGAACTCTCC
35	sv04-F	CTGGTCTCTTCTTTCTGGAT
36	sv04-R	AACACCAACACACATATACAT
37	sv05-F	GTCAACCACCTCTTTGCATG
38	sv05-R	GGTTGAACACTGCTCGTCTACCGA
39	sv06-F	CATTACAACAAGTTTAGAGCGG
40	sv06-R	GATATAGTTGCCGACTAATCC
41	ORCT72-F	GCTTCACCAACTTCCGAGAC
42	ORCT72-R	GGCCATGCTTTCCTTCACTA
43	OA07-F	CCTATCCGAGGAGAACCATAA
44	OA07-R	AAGCTTTGAGATTCTTTTGTGACT
45	OA08-F	AGGCAAAATATAACATACCTCAAT
46	OA08-R	AATCAAGCCATTTATCTCCTCT
47	OA12-F	GCATTCTTTTGCCTAATTCAGGAA
48	OA12-R	TCCACCCTTTCATCCAAATACTTC
49	OA15-F	ACAGCGTTAACATAAACCATAAGC

50	OA15-R	CTGCCCCGCAGATTCAGC
51	OA18-F	GGAACGGAGAAGATTAAGACAACC
52	OA18-R	TGCCCTCACATGCCGTATT
53	OA19-F	TAAGGCAAACCTTGAGTGCTTTATT
54	OA19-R	CTTGTGATTTCTTTGCCTTTCTT
55	OA20-F	CATATATTAGCCACTTCACTCTC
56	OA20-R	ATGTCCACCTCCCTAAAATAGTA
57	OA21-F	AAATGGGGAAAAAGGAAAGGAC
58	OA21-R	ATCCCTCCCCTCGCTCTCTC
59	OA23-F	CATCCCAGCCCTTTTTTCAC
60	OA23-R	GAGAGCAAGAGGAGGATGGAA
61	OA24-F	GAGCAACGGGAGGGATAGAGATAT
62	OA24-R	ACCTCTGTCTCCCTCTTGTCCATC
63	OA25-F	GGAAGGGCCTAAGTGGATG
64	OA25-R	GCGTACCATGCTTAACATTCA
65	S122-F	GTGACTCGAGCCTTGGAATACG
66	S122-R	ACGCCGGTGAAAGAAGAAGAG
67	S130-F	CTCATGCATAAATTTAGGGTAGA
68	S130-R	ACAACACGAACAAGTAGTCATC
69	S136-F	AGGGGACAAGCAATTGAGTTGAAT
70	s136-R	TCGGCTAGTAGCAAGGCATCTTC

การตรวจสอบความสามารถของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิง

จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอของกล้วยไม้ที่สกัดมาทดลองเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 135 คู่โดยเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบเอง 100 คู่และไพรเมอร์จากกล้วยไม้อื่น 35 คู่ เพื่อทดสอบว่าไพรเมอร์คู่ใดบ้างที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ นำไพรเมอร์ดังกล่าวมาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยการใช้อุณหภูมิในการ annealing ที่แตกต่างกัน ซึ่งสภาวะการทำพีซีอาร์ เป็นดังนี้

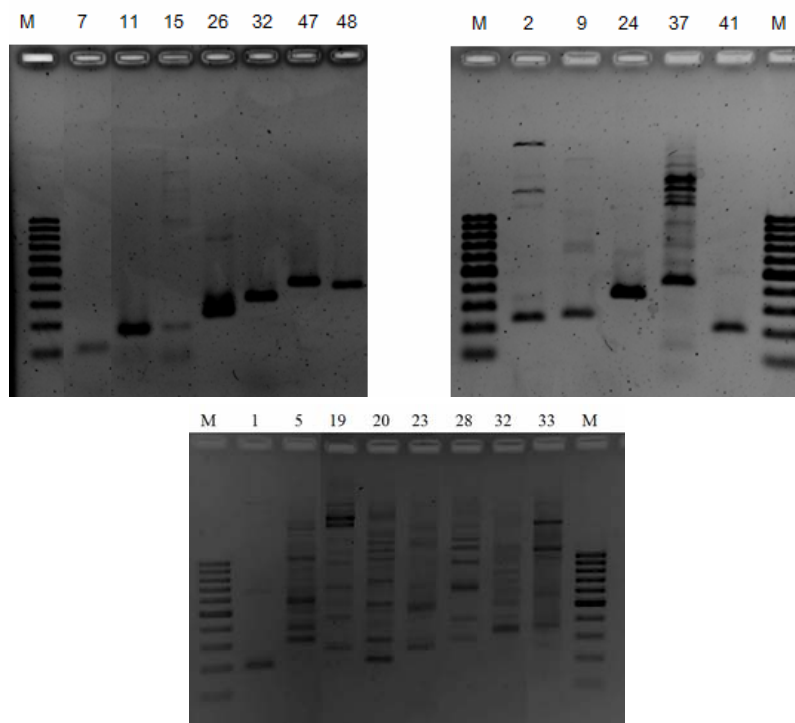
dNTP (2.5 mM)	2 µl
10X Buffer with Mg 2+	2 µl
Primer F & R	5 µM each
DNA template (30 µg)	1 µl
Taq (5 unit/µl)	0.2 µl
Water	9.8 µl

ผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ ตามสภาวะที่กำหนดข้างต้น พบว่ามี 20 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และนำไปใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในกล้วยไม้สายพันธุ์ม้าวิงได้ โดยเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบเอง 12 คู่และไพรเมอร์ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในกล้วยไม้อื่นๆ อีก 8 คู่ดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 3

ตารางที่ 5 รายชื่อไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มดีเอ็นเอได้โดยโดยเป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบเอง 12 คู่และไพรเมอร์ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในกล้วยไม้อื่นๆ อีก 8 คู่

Name	Forward	Reward	Temp.	Product Size
ORESTM127 (11)	CTTGATGAATGTGAGGAAACCA	AAACCTTACTGTTGGGCACACT	62	~200bp
ORESTM136 (15)	ACCCTTTTCTTGGCTTCTAACC	ATGGAGTGGATCTCTTGCTCTC	58	~150bp
ORPHESTM16 (26)	TGGAAATGACAAGGTTTCTGTG	TTGAGCTTAGGAGGCAAATAGG	62	~230bp
ORESTM8(32)	GTCTTGGTCTGATGAACATGGA	TTGTTGTTGTTATTGCTACCGC	58	~250bp
ORESTM27 (47)	ATTGACGATGAAACCATGACTG	AGAAATACTACCACTGCCCTG	62	~400bp
ORESTM35 (48)	TCTTTTCTCCCTCTCCATTCAAG	AGAAGCAGCAGAACTAGAACCG	58	~350bp
ORESTM59(7)	TTCTTCTGTGCATCTTTTGCTC	CACAAACCCAATTTAACACCCCT	54	120bp
CL296CONTIG1-(2)	TGGTATGTATGTAAATGCCCA	AGACGGGCTTAATGATGTCATT	56	250

CL195CONTIG1-(9)	AAAGGAATTGGAAGAGTTGCTG	AAGTCGTTGCTTCTCCCTCTC	58	250
CL186CONTIG1-(24)	GGAAGTCCAGAAAGGAAGAACA	CCATCACGGTCACGATCTAAT	56	350
CL10CONTIG1-(37)	TCCATTACTCTGAAACCGTGCT	ATGGCAGCAGTTGAGGTAGAAT	48	400
CL4CONTIG1-(41)	TGCCTTCTTCGGTCTTAGTCTC	ATGGCAGCAGTTGAGGTAGAAT	58	180
ORCA40(1)	CAAGCTACTTCAGACTCATC	GAAGACACTGCTCATATTTTC	46	230
ORCT6(5)	CTCCTTGCTTGGATTTGCTTC	CACCTCATCACATCTTGCCAT	42	300,350
OA20(19)	CATATATTAGCCACTTCACTCTC	ATGTCCACCTCCCTAAAATAGTA	42	200,300
sv04(20)	CTGGTCTCTTCTTTCTGGAT	AACACCAACACACATATACAT	42	250
OA08(23)	AGGCAAAATATAACATACCTCAAT	AATCAAGCCATTATCTCCTCT	42	250,400
S130(28)	CTCATGCATAAATTTAGGGTAGA	ACAACACGAACAAGTAGTCATC	38	350
S122(32)	GTGACTCGAGCCTTGGAATACG	ACGCCGGTGAAAGAAGAAGAG	42	350
OA19(33)	AAGGCAAACCTTGAGTGCTTTATT	CTTGTGATTTCTTTGCCTTTCTT	42	250



ภาพที่ 3 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ทั้ง 20 คู่

จากนั้นได้ทดลองทำพีซีอาร์อีกครั้งโดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในครั้งแรก ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของ Mg^{2+} ลงไปในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งทำให้การทำปฏิกิริยามีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิงได้อีก 10 คู่ ดังตารางที่ 6 สรุปผลการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลม้าวิง ด้วย SSR ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากฐานข้อมูล EST ของกล้วยไม้ และจากเครื่องหมาย SSR ที่เคยมีการรายงาน พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้ม้าวิงได้ทั้งหมด 30 คู่ไพรเมอร์ จากทั้งหมด 135 คู่ไพรเมอร์ ที่ทำการทดสอบ คิดเป็น 23 % โดยสามารถนำเครื่องหมาย SSR เหล่ามาตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของตัวอย่างกล้วยไม้ม้าวิงต่อไป

ตารางที่ 6 รายชื่อไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิงได้ เมื่อเพิ่มปริมาณ Mg^{2+}

Name	Forward	Reward	Temp.	Product size
CL491CONTIG1-(11)	GTACTCCACTCCGAACGAAAAC	AGGTGAAGGCTGGATTCTTGT	52	230
GI 109152185-(15)	CCAGGACAACCCATTTGATAAC	AGCTGAGGTGGTAGAGACGAAG	56	350
CL455CONTIG1-(27)	TACAAATCAAAGTCATCGTCGG	CATTCCATTCTCTCATCCA	56	150
GI 109151933-(28)	GCTTTCGACTCCATTACTCTGAA	GAAGCAGCAGCAGAAGAGGT	56	150
GI 109153057-(29)	AACGGAAATCCTTGAACCACT	AGCACAGAAAACAAAGCATGAG	58	130
GI 109153889-(33)	TAATAACTGGGCAGCAAGTCG	CCCCAACTCATCTCCACCT	56	200
GI 109154341-(34)	TAATTCCAGCCACAGTCTCCTT	AATCCAAATCCAACCAACTC	58	180
CL106CONTIG1-(35)	AGTATCGTCAAAGCCAGGGATA	TTTCCATCCTCCTCACTTCATT	50	180,250
CL275CONTIG1-(36)	CTTCTTTCCAGTCATGTCCAGC	AGTCCCTCTCCGTCCTATGATT	52	150
CL106CONTIG1-(39)	GGAAGATGATGGGTACGTCATT	GCACGAGGATCAATTTAGCATA	48	150,200
CL32CONTIG1-(42)	AGCAATGGGAAGAAACACATCT	CTCTCTCCTAACCCCTCTCCCTC	48	230

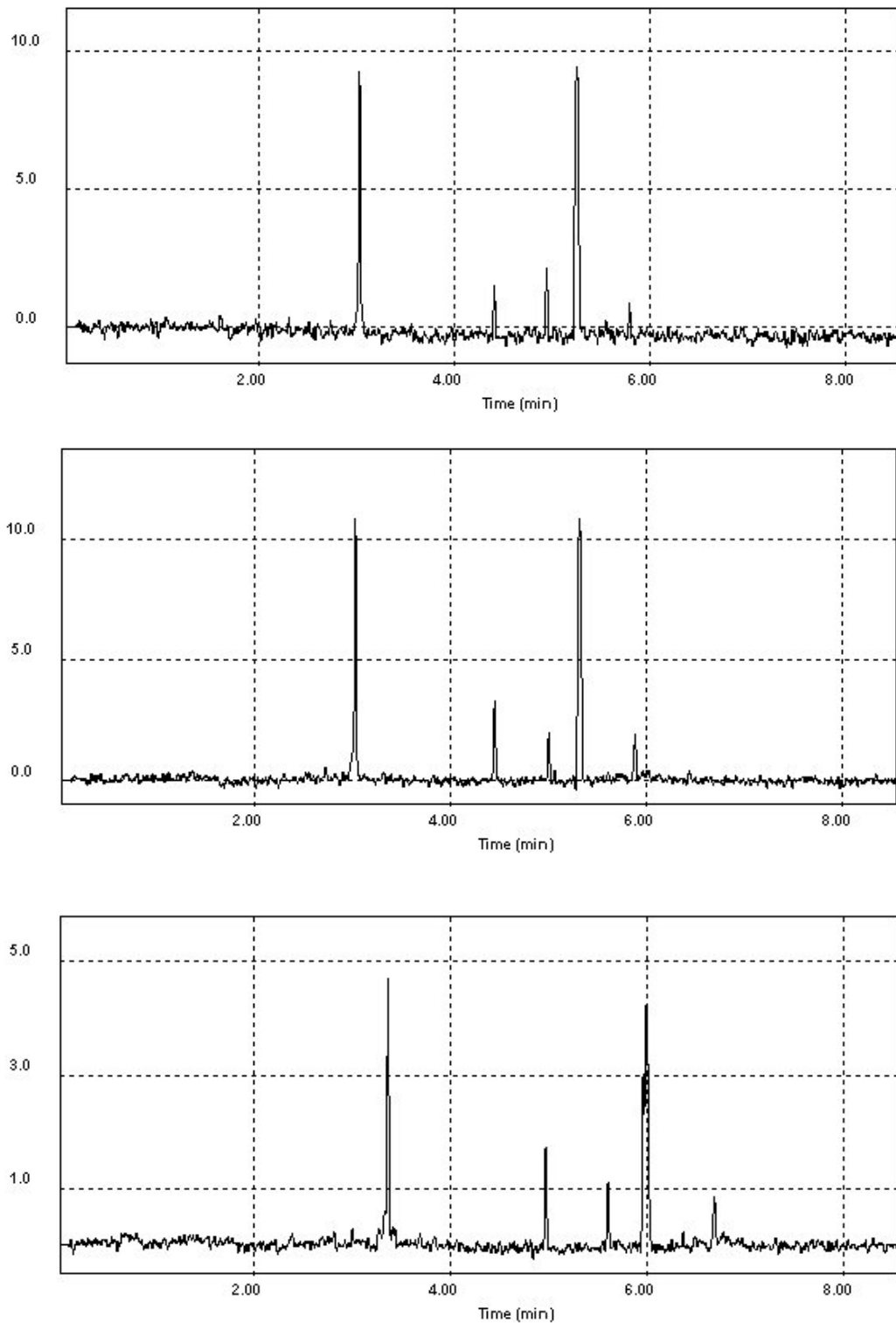
การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิง

จากผลการศึกษาข้างต้นพบว่า มีไพรเมอร์ทั้งหมด 30 คู่ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างกล้วยไม้สกุลม้าวิงที่นำมาศึกษาได้ โดยมาจากการ EST ไพรเมอร์ 23 คู่ และ genomic SSR ของกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ อีก 7 คู่ ต่อจากนี้ทำการตรวจสอบไพรเมอร์ทั้ง 30 คู่ว่าสามารถสร้างความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างกล้วยไม้ได้หรือไม่ โดยทั่วไปขั้นตอนนี้สามารถตรวจสอบได้โดยการใช้ Polyacrylamide Gel Electrophoresis ซึ่งมีความสามารถในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันได้กัน 2-3 คู่เบสได้ แต่เนื่องจาก polyacrylamide gel นั้นเป็นเจลที่ค่อนข้างอันตรายต่อตัวผู้ทดลอง มีความยุ่งยากในการเตรียมและใช้ระยะเวลานานต่อการทดลองหนึ่งครั้ง รวมไปถึงต้องการพื้นที่การทดลองที่จำเพาะ ทางผู้ทดลองจึงได้เลือกทำการตรวจสอบโดยใช้ HAD-GT12TM capillary gel electrophoresis system (Qiagene, Germany) ซึ่งมีความปลอดภัยต่อผู้ทดลองมากกว่า รวมไปถึงมีความรวดเร็วในการตรวจสอบผลและการอ่านวิเคราะห์เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ polyacrylamide gel ดังแสดงในภาพที่ 4

ผลจากการตรวจสอบพบว่า จากไพรเมอร์ทั้งหมด 30 คู่ มี 20 คู่ที่แสดงความหลากหลาย (polymorphism) ในตัวอย่างกล้วยไม้ที่ศึกษา ส่วนอีก 10 คู่ นั้นไม่สามารถสร้างความหลากหลายได้ในตัวอย่างที่ศึกษา (monomorphic) โดยไพรเมอร์ที่แสดงความหลากหลายมาจาก EST ไพรเมอร์ 13 คู่ และ genomic SSR ไพรเมอร์จากกล้วยไม้ชนิดอื่น 7 คู่ ดังแสดงในตารางที่ 7

ต่อจากนั้นทำการบันทึกผลจากการทดสอบข้างต้น โดยกำหนดให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็น (1) และ แถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏเป็น (0) ตารางที่ 8 เพื่อนำไปวิเคราะห์ phylogenetic ของตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม NTSYS pc version 2.1 software package (Rohlf, 2000) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของตัวอย่างที่เกิดจากการใช้ไพรเมอร์ดังกล่าว ผลจากการบันทึกผลเพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูล ดังแสดงในตารางที่ 9 จากนั้นเลือกใช้พารามิเตอร์ Dice genetic similarity coefficient และเลือกการจัดกลุ่มของข้อมูลโดย UPGMA ผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าสามารถจัดกลุ่มของข้อมูลได้ 3 กลุ่มใหญ่ๆ ตามสปีชีส์ของตัวอย่างที่นำมาศึกษา ภาพที่ 5 ได้แก่ *D. pulcherrima* (ม้าวิง), *D. pulcherrima* var. *buyssoniana* (แดงอุบล) และ *D. regnieriana* (ม้าวิงแคะ) ซึ่งผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมานั้นสามารถที่จะนำมาใช้เป็นเครื่องหมายในการจัดจำแนกสปีชีส์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิงที่นำมาศึกษาได้

ภาพที่ 4 ผลจากการตรวจสอบความหลากหลาย (polymorphism) ของไพเมอร์โดยใช้ HAD-GT12™ capillary gel electrophoresis system (Qiagene, Germany) ของ ตัวอย่าง S1, S2, S3 จากไพเมอร์ 20C ตามลำดับ



ตารางที่ 7 ลำดับเบส และรายละเอียดต่างๆ ของไพรเมอร์ทั้งหมด 20 คู่ ที่แสดงความหลากหลาย (polymorphism) ในตัวอย่างกล้วยไม้ที่นำมาตรวจสอบได้

Name	Genbank accession no.	Forward	Repeat motif	Ta	size range	no. of alleles	PIC	protein description
		Reword						
7A	CB034531.1	TTCTTCTGTGCATCTTTTGCTC	(A)11	54	74-85	5	0.6794	Fiber protein Fb11 AAN77150.1
		CACAAACCCAATTTAACACCCT						
11A	CB032260	CTTGATGAATGTGAGGAAACCA	(CAA)5	62	116-119	2	0.495	Not hit
		AAACCTTACTGTTGGGCACACT						
26A	C0742605.1	TGGAAATGACAAGGTTTCTGTG	(GGAGCA)4	62	183-189	2	0.4528	Not hit
		TTGAGCTTAGGAGGCCAAATAGG						
2B	CK859111.1	AGACGGGCTTAATGATGTCATT	(TGG)5	56	244-247	2	0.1244	Unknown protein ACR34461.1
		TGGTATGTATGTAAATGCCCCA						
27B	CB031838.1	CATTCCATTCTCTCATCCA	(CGG)5	56	127-183	6	0.6672	Absciscic stress ripening ACZ50749.1
		TACAAATCAAAGTCATCGTCGG						
28B	CK857691.1	GAAGCAGCAGCAGAAGAGGT	(CGC)5	56	122-129	3	0.6128	Not hit
		GCTTTCGACTCCATTACTCTGAA						

29B	CB0343051	AGCACAGAAAACAAAGCATGAG	(CAC)5	58	89-98	4	0.6397	Stress responsive protein NP001149550.1
		AACGGAAATCCTTGAACCAGT						
34B	CK855825.1	AATCCAAATCCAACACCAACTC	(GGC)5	58	136-165	7	0.8278	Unnamed protein product NP001174118.1
		TAATTCCAGCCACAGTCTCCTT						
35B	CB855825.1	TTTCCATCCTCCTCACTTCATT	(AC)7	50	157-178	7	0.7836	LLA-115 ABI4885901
		AGTATCGTCAAAGCCAGGGATA						
36B	CK856598.1	AGTCCCTCTCCGTCCTATGATT	(GAA)6	52	100-114	6	0.7511	Hypothetical protein XP002443940.1
		CTTCTTTCCAGTCATGTCCAGC						
37B	CK859137	ATGGCAGCAGTTGAGGTAGAAT	(TC)6	48	393-402	4	0.63	Not hit
		TCCATTACTCTGAAACCGTGCT						
39B	CK857960.1	GCACGAGGATCAATTTAGCATA	(AC)7	48	145-212	6	0.7328	Cleavage dioxygenase Q48K96.1
		GGAAGATGATGGGTACGTCATT						
41B	CB034609	ATGGCAGCAGTTGAGGTAGAAT	(CCG)6	58	194-200	3	0.6039	Not hit
		TGCCTTCTTCGGTCTTAGTCTC						

1C	ORCA40 (Yoocha et al., 2006)	CAAGCTACTTCAGACTCATC	F(TG)8CA(TGCG)1 ,R(TG)10(TGCG)6	46	200-209	4	0.6639	
		GAAGACACTGCTCATATTTTC						
5C	ORCT6 (Yoocha et al., 2006)	CTCCTTGCTTGGATTTGCTTC	(TC)5(GT)18	42	250-262	6	0.6533	
		CACCTCATCACATCTTGCCAT						
19C	OA20 (Yue et al., 2006)	CATATATTAGCCACTTCACTCTC	data not shown	42	321-419	4	0.5828	
		ATGTCCACCTCCCTAAAATAGTA						
20C	sv04 (Pellegrino et al., 2001)	CTGGTCTCTTCTTTCTGGAT	(CT)8AC(CT)5	42	284-305	8	0.8439	
		AACACCAACACACATATACAT						
23C	OA08 (Yue et al., 2006)	AGGCAAAATATAACATACCTCAAT	data not shown	42	200-289	3	0.2886	
		AATCAAGCCATTTATCTCCTCT						
32C	S122 (Yue et al., 2006)	GTGACTCGAGCCTTGGAATACG	F(TC)9(AC)4 ,RAT(AC)8	42	333-358	6	0.7889	
		ACGCCGGTGAAAGAAGAAGAG						
33C	OA19 (Yue et al., 2006)	AAGGCAAACCTTGAGTGCTTTATT	(GA)31	42	260-374	4	0.5672	
		CTTGTGATTTCTTTGCCTTTCTT						

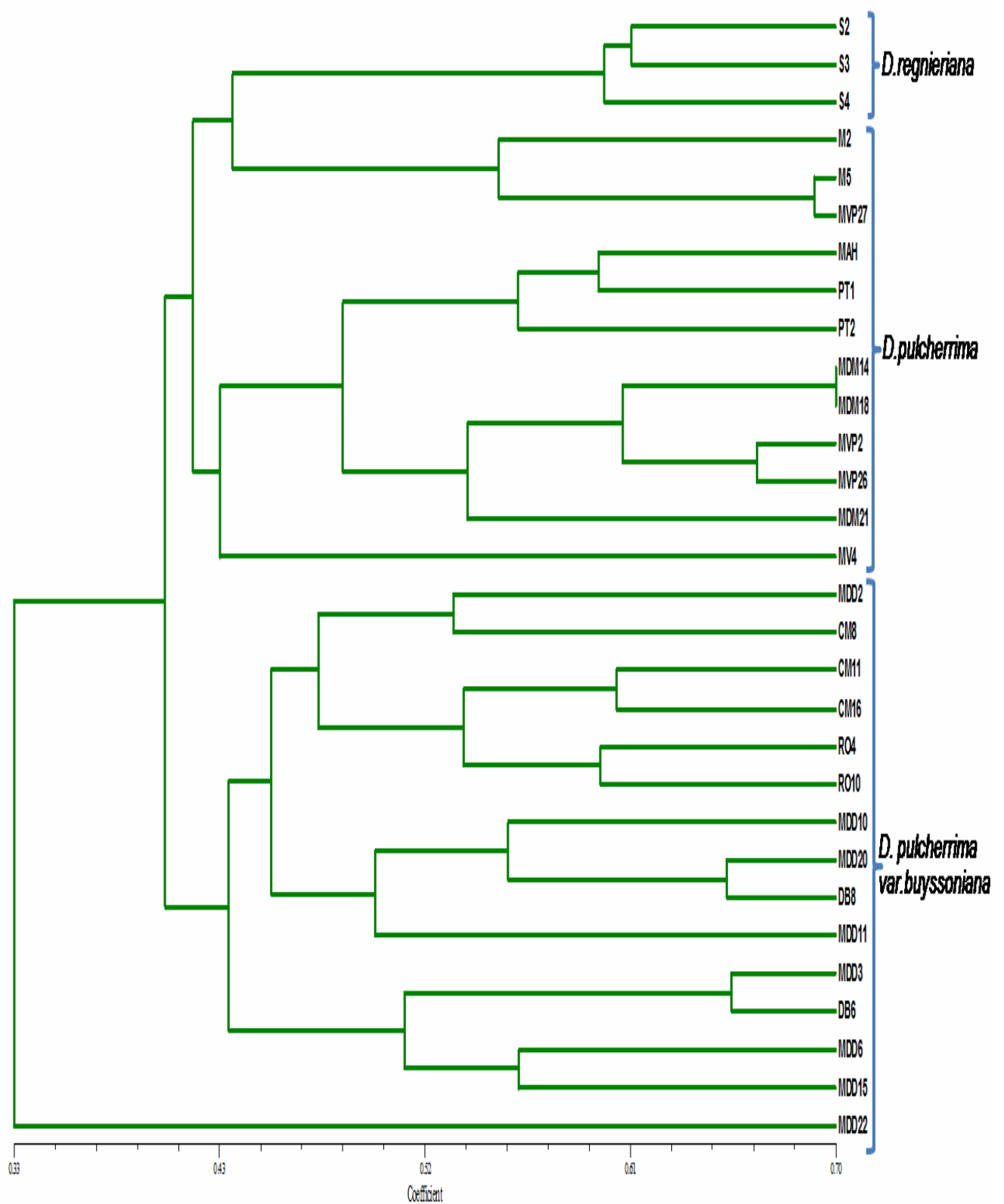
36	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	
37	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
38	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
39	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	
40	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	
41	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
42	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	
43	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	
45	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	
46	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	
47	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
49	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	
50	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
51	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
52	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	
53	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	
54	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
56	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
57	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
58	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
60	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
61	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	
62	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
63	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
64	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	
65	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
66	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
67	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
68	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	

69	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1
71	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0
72	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
74	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
75	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
77	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
78	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1
79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
80	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
81	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
82	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
84	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
85	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
86	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
89	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1
90	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
92	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 9 แสดงค่า genetic similarity coefficient

	S2	S3	S4	MAH	M2	M5	MDM14	MDM18	MDM21	PT1m	PT2m	MVP2	MVP26	MVP27	MDD2	MDD3	MDD6	MDD10	MDD11	MDD15	MDD20	MDD22	CM8d	CM11d	CM16d	MV4m	DB8d	DB8d	RO4	RO10
S2	1.00																													
S3	0.61	1.00																												
S4	0.59	0.61	1.00																											
MAH	0.41	0.40	0.37	1.00																										
M2	0.38	0.30	0.35	0.46	1.00																									
M5	0.55	0.57	0.40	0.27	0.53	1.00																								
MDM14	0.45	0.44	0.45	0.59	0.58	0.51	1.00																							
MDM18	0.42	0.45	0.56	0.49	0.43	0.48	0.70	1.00																						
MDM21	0.38	0.42	0.50	0.38	0.22	0.29	0.54	0.51	1.00																					
PT1m	0.39	0.35	0.39	0.60	0.44	0.33	0.47	0.48	0.40	1.00																				
PT2m	0.38	0.53	0.35	0.54	0.35	0.41	0.42	0.39	0.43	0.58	1.00																			
MVP2	0.37	0.33	0.41	0.64	0.46	0.39	0.67	0.60	0.54	0.60	0.58	1.00																		
MVP26	0.33	0.36	0.53	0.44	0.42	0.35	0.57	0.58	0.56	0.48	0.42	0.67	1.00																	
MVP27	0.47	0.54	0.33	0.39	0.57	0.69	0.62	0.48	0.41	0.46	0.53	0.51	0.48	1.00																
MDD2	0.38	0.38	0.54	0.38	0.30	0.45	0.35	0.35	0.26	0.31	0.30	0.33	0.37	0.37	1.00															
MDD3	0.41	0.37	0.52	0.37	0.46	0.40	0.48	0.42	0.42	0.35	0.35	0.41	0.53	0.55	0.50	1.00														
MDD6	0.33	0.32	0.33	0.31	0.37	0.35	0.36	0.41	0.41	0.42	0.49	0.39	0.43	0.42	0.37	0.51	1.00													
MDD10	0.30	0.44	0.34	0.49	0.47	0.36	0.49	0.42	0.38	0.48	0.51	0.49	0.36	0.52	0.43	0.45	0.52	1.00												
MDD11	0.33	0.36	0.24	0.36	0.28	0.22	0.24	0.29	0.51	0.48	0.33	0.31	0.25	0.30	0.19	0.24	0.43	0.50	1.00											
MDD15	0.30	0.44	0.30	0.33	0.26	0.44	0.38	0.31	0.43	0.39	0.55	0.57	0.45	0.48	0.51	0.45	0.56	0.46	0.27	1.00										
MDD20	0.27	0.42	0.38	0.38	0.39	0.33	0.42	0.47	0.35	0.40	0.48	0.42	0.33	0.49	0.43	0.50	0.37	0.51	0.47	0.38	1.00									
MDD22	0.26	0.33	0.37	0.28	0.25	0.20	0.37	0.42	0.46	0.21	0.25	0.40	0.36	0.35	0.38	0.44	0.35	0.41	0.22	0.33	0.33	1.00								
CM8d	0.25	0.43	0.47	0.47	0.37	0.35	0.51	0.44	0.29	0.50	0.49	0.51	0.48	0.54	0.53	0.44	0.27	0.52	0.26	0.40	0.57	0.47	1.00							
CM11d	0.48	0.44	0.52	0.48	0.38	0.35	0.37	0.34	0.25	0.43	0.38	0.32	0.31	0.39	0.46	0.52	0.43	0.49	0.44	0.24	0.46	0.28	0.43	1.00						
CM16d	0.53	0.52	0.46	0.45	0.51	0.52	0.46	0.50	0.31	0.56	0.47	0.38	0.42	0.56	0.51	0.53	0.48	0.54	0.42	0.35	0.47	0.34	0.48	0.60	1.00					
MV4m	0.38	0.29	0.30	0.42	0.44	0.41	0.38	0.39	0.39	0.50	0.34	0.51	0.47	0.32	0.34	0.34	0.41	0.24	0.32	0.38	0.24	0.28	0.27	0.28	0.43	1.00				
DB8d	0.38	0.44	0.34	0.41	0.35	0.44	0.45	0.49	0.50	0.39	0.42	0.41	0.41	0.55	0.42	0.66	0.55	0.49	0.33	0.53	0.42	0.48	0.40	0.41	0.56	0.38	1.00			
DB8d	0.33	0.46	0.44	0.55	0.37	0.31	0.44	0.44	0.49	0.50	0.57	0.47	0.48	0.46	0.41	0.58	0.50	0.60	0.52	0.40	0.65	0.35	0.46	0.59	0.52	0.27	0.51	1.00		
RO4d	0.41	0.40	0.41	0.51	0.38	0.43	0.41	0.34	0.30	0.50	0.42	0.40	0.48	0.46	0.53	0.51	0.46	0.41	0.40	0.44	0.34	0.25	0.54	0.55	0.59	0.46	0.51	0.57	1.00	
RO10d	0.32	0.32	0.39	0.38	0.40	0.30	0.39	0.29	0.52	0.41	0.44	0.35	0.38	0.38	0.44	0.46	0.38	0.47	0.51	0.35	0.32	0.27	0.38	0.50	0.51	0.27	0.39	0.57	0.60	1.00

ภาพที่ 5 phylogenetic tree ของตัวอย่างกล้วยไม้สกุลม้าวิงที่นำมาศึกษา



สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

คณะผู้วิจัยได้ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างของกล้วยไม้สกุล *Doritis* ที่ต้องการศึกษาจากพื้นที่ในเขตจังหวัดอุบลราชธานี และบริเวณจังหวัดใกล้เคียง แล้วนำมาเพาะเลี้ยงที่โรงเรือนคณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีจำนวนทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง จากนั้นทำการทดลองหาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้ โดยทดลองทั้งหมด 4 วิธี และพบว่าวิธี 2X CTAB สามารถที่จะสกัดดีเอ็นเอได้ดีที่สุด ในระหว่างนั้นได้มีการสืบค้นข้อมูลและรวบรวมข้อมูล EST จากฐานข้อมูล นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์คุณภาพและตรวจสอบหาบริเวณที่มีลำดับเบสชุดซ้ำเพื่อออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Cap3 และ Websat ตามลำดับ พบว่าสามารถสืบค้นข้อมูลได้ทั้งหมด 8018 ลำดับเบส หลังจากวิเคราะห์ข้อมูล คงเหลือข้อมูลที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้งานทั้งหมด 1,765 ลำดับเบส นำข้อมูลเหล่านี้ตรวจสอบหาชุดซ้ำและออกแบบไพรเมอร์ พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ทั้งหมด 177 คู่ไพรเมอร์ แบ่งเป็นแบบซ้ำ 1 เบส จำนวน 60 คู่ (33.90%) แบบซ้ำ 2 เบส 68 คู่ (38.42%) แบบซ้ำ 3 เบส 37 คู่ (22.03%) แบบซ้ำ 4 เบส 5 คู่ (2.82%) แบบซ้ำ 5 เบส 1 คู่ (0.56%) และซ้ำ 6 เบส 6 คู่ (3.39%) ตามลำดับ จากนั้นจึงคัดเลือกไพรเมอร์มาทั้งหมด 100 คู่และไพรเมอร์ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในกล้วยไม้ชนิดอื่นๆ อีก 35 คู่ มาใช้ในการทดสอบไพรเมอร์เพื่อค้นหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลม้าวิงได้ ผลจากการทดสอบพบว่า มีทั้งหมด 30 คู่ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และสามารถใช้ตรวจสอบความหลากหลายในกล้วยไม้สกุลม้าวิง โดยมาจากไพรเมอร์ที่สุ่มเลือกจากการออกแบบ 23 คู่และไพรเมอร์อื่นๆ อีก 7 คู่ จากนั้นจึงทดสอบความหลากหลายของตัวอย่างโดยดูความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากแต่ละไพรเมอร์โดยใช้ HAD-GT12TM capillary gel electrophoresis system (Qiagene, Germany) และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยใช้ NTSYS pc version 2.1 software package (Rohlf, 2000) ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูล และสร้าง phylogenetic tree พบว่า จากการใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถที่จะจัดกลุ่มของตัวอย่างออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ตามสปีชีส์ของตัวอย่าง นั้นแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์เหล่านี้สามารถที่จะใช้ในการจำแนกชนิดของกล้วยไม้ในสกุลม้าวิงที่นำมาศึกษาได้ ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวิงที่ใช้ในการทดลองว่ามีค่าสูง จึงสามารถใช้ประกอบในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ได้ และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้สามารถนำมาใช้ในการพัฒนากล้วยไม้สกุลนี้ได้ เช่นการตรวจสอบพันธุ์ลูกผสม และการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในการผสม เป็นต้น งานวิจัยในครั้งนี้จึงบรรลุมิติวัตถุประสงค์ต่างๆที่ได้ตั้งไว้ทั้งหมด และเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ม้าวิงให้มีคุณค่าต่อไปได้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. ในการทดลองครั้งนี้ใช้ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลม้าวิงจำนวน 30 ตัวอย่าง ซึ่งถ้าต้องการทราบข้อมูลที่ครอบคลุมทั้งประเทศไทย ควรเพิ่มการเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยให้ครบถ้วนมากขึ้น นอกจากนี้ในการทดลองครั้งนี้ยังขาดข้อมูลทางด้านรูปร่าง สัณฐาน และลักษณะต่าง ๆ ของกล้วยไม้แต่ละตัวอย่าง เช่น สีดอก สีใบ รูปร่างใบ ขนาด และความยาวของต้นและช่อดอก เป็นต้น ซึ่งควรมีการเก็บข้อมูลให้ครบถ้วนก็จะมีประโยชน์ต่อการเปรียบเทียบระหว่างข้อมูลทางดีเอ็นเอ และข้อมูลภายนอกของกล้วยไม้ได้

2. เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาหลายเครื่องหมาย เมื่อนำมาตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วปรากฏว่าไม่สามารถเห็นความแตกต่างระหว่างตัวอย่างกล้วยไม้ที่นำมาทดสอบได้ แต่เครื่องหมายเหล่านี้ยังคงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาครั้งต่อไปในอนาคตได้ จึงไม่ควรละเลยเครื่องหมายเหล่านี้เสีย นอกจากนี้ยังควรศึกษาพัฒนาเครื่องหมายที่ไม่มีความแตกต่างเหล่านี้ โดยพัฒนาต่อให้เป็นเครื่องหมายที่มีความแตกต่างได้ โดยการพัฒนาเป็นเครื่องหมาย CAPS ด้วยการทดสอบตัดชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่าง ๆ ซึ่งสามารถก่อให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างกล้วยไม้ได้ ตามที่ได้มีรายงานมาแล้วในพืชอื่น ๆ

Keywords : Doritis; Microsatellite marker; Transferability; Genetic diversity

(คำหลัก) : Doritis; เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์; การถ่ายโอนเครื่องหมาย; ความหลากหลายทางพันธุกรรม

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง

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

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงพาณิชย์: ไม่มี
- เชิงนโยบาย: ไม่มี
- เชิงสาธารณะ: ไม่มี
- เชิงวิชาการ:
 1. นำมาใช้เป็นตัวอย่างในการเรียนการสอนวิชา DNA Markers and Application ระดับปริญญาโท-เอก
 2. มีการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท จำนวน 1 คน
 3. ได้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะต่อกล้วยไม้สกุลม้าวี่ง ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้
 4. ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลม้าวี่ง ในเขตจังหวัดอุบลราชธานี และเขตอีสานใต้ ของประเทศไทย

3. อื่น ๆ เช่น การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ จำนวน 1 ครั้ง

1. Ritchuay S, **Jantasuriyarat C** and Kate-Ngam S. Development of EST-SSR markers for orchid in *Doritis* family. **The 3rd International Agricultural Students Symposium (IASS)**. February 19-28, 2012. University of Putra Malaysia, Malaysia. (oral presentation)

ภาคผนวก



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical Systematics and Ecology

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



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

Chatchawan Jantasuriyarat^{a,b,*}, Savitree Ritchuay^a, Pawat Pattarawat^a,
Pattana Srifah Huehne^a, Sureeporn Kate-Engam^c

^a Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

^b Center for Advanced Studies in Tropical Natural Resources, National Research University-Kasetsart University (CASTNAR, NRU-KU), Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

^c Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Warin Chamrap, Ubon Ratchathani 34190, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 January 2012

Accepted 1 July 2012

Available online xxx

Keywords:

Doritis

Microsatellite

Transferability

Genetic diversity

ABSTRACT

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

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

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

* Corresponding author. Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand. Tel.: +66 2562 5555; fax: +66 2579 5528.

E-mail address: fscicwj@ku.ac.th (C. Jantasuriyarat).

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

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

2. Materials and methods

2.1. Plant materials and DNA extraction

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

2.2. Development of EST-SSR markers

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

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

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



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

2.3. EST-SSR amplification

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

2.4. Transferability of genomic SSR

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

2.5. Genetic diversity and phylogenetic analysis

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

3. Results

3.1. EST-SSR identification, development and characterization

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

3.2. Genomic SSR marker transferability

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

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

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

Table 3

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

Name	GenBank accession no.	Forward Reverse	Repeat motif	T _a	Size range	No. of alleles	PIC	Protein description and reference
7A	CB034531.1	TTCCTCTGTGCACTCTTTGCTC CACAAACCCATTTACACCCCT	(A) ₁₁	54	74–85	5	0.6794	Fiber protein Fb11 AAN77150.1
11A	CB032260	CTTGATGAAATGTGAGGAACCA AAACCTTACTGTTGGGCACT	(CA) ₅	62	116–119	2	0.495	Not hit
26A	CO742605.1	TGGAAATGACAGGTTTCTGTG TTGAGCTTAGGAGGCAATAGG	(GGAGCA) ₄	62	183–189	2	0.4528	Not hit
2B	CK859111.1	AGAGGGGCTTAATGATGTCAAT TGGTATGTATGTAATGCCCA	(TGG) ₅	56	244–247	2	0.1244	Unknown protein ACR34461.1
27B	CB031838.1	CATTCCATTGATCTCTATCCA TACAAATCAAGTCATCGTCGG	(CGG) ₅	56	127–183	6	0.6672	Abiotic stress opening ACZ50749.1
28B	CK857691.1	GAGGCGCAGCAGAGAGGT GCTTCGACTCCATTACTCTGAA	(CGC) ₅	56	122–129	3	0.6128	Not hit
29B	CB0343051	AGCAGAGAAACAAAGCATGAG ACGGGAATCTCTGACACGT	(CAC) ₅	58	89–98	4	0.6397	Stress responsive protein NP_001149550.1
34B	CK855825.1	AATCCAAATCCAAACCAACTC TAATTCAGCCACAGTCTCCTT	(GCC) ₅	58	136–165	7	0.8278	Un-named protein product NP_001174118.1
35B	CB855825.1	TTTCCATCTCTCACTTCATT AGTATCGTCAGAGCCAGGATA	(AC) ₇	50	157–178	7	0.7836	IIA-115 ABI4885901
36B	CK856598.1	AGTCCCTCTCCGTCTATGATT CTTCTTCCAGTCAATGTCAGC	(CAA) ₆	52	100–114	6	0.7511	Hypothetical protein XP_002443940.1
37B	CK859137	ATGGCAGCAGTTGAGGTAGAAT TCCATTACTCTGAACCGTCT	(TC) ₆	48	393–402	4	0.63	Not hit
39B	CK857960.1	GCAGGAGATCAATTTAGCATA GGAAAGATGATGGGTACGTCATT	(AC) ₇	48	145–212	6	0.7328	Cleavage dioxigenase Q48K96.1
41B	CB034609	ATGGCAGCAGTTGAGGTAGAAT TGCCTTCTCGGTCTTAGCTC	(CCG) ₆	58	194–200	3	0.6039	Not hit
1C	ORCA40	CAAGCTACTACAGACTATC GAAGACACTGCTCATATTTT	F(TG)8C(A)(TGG)12, R(TG)10(TGG)6	46	200–209	4	0.6639	(Yoocha et al., 2006)
5C	ORCT6	CTCCTTGTCTGATTGCTTC CACCTCATCATCTTGCCAT	(TC)5(GT)18	42	250–262	6	0.6533	(Yoocha et al., 2006)
19C	OA20	CATATATTAGCCACTTCACTTC ATGTCCACCTCCCTAAATAGTA	Data not shown	42	321–419	4	0.5828	(Yue et al., 2006)
20C	sv04	CTGGCTCTCTCTTCTGGAT AACCAACACACATATACAT	(CT)8AC(CT)5	42	284–305	8	0.8439	(Pellegrino et al., 2001)
23C	OA08	AGGCAAAATATACATACCTCAAT AATCAAGCCATTATCTCTCT	Data not shown	42	200–289	3	0.2886	(Yue et al., 2006)
32C	S122	GTGACTCGAGCTTGGGAATACG ACGCCGGTGAAGAGAGAGAG	F(TC)9(AC)4, RAT(AC)8	42	333–358	6	0.7889	(Yue et al., 2006)
33C	OA19	ACGGCAACTTGAAGTCTTTATT CTTGATTTCTTGGCTTTCTT	(CA)31	42	260–374	4	0.5672	(Yue et al., 2006)

3.3. Polymorphism of SSR markers

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

3.4. Genetic diversity and phylogenetic analysis

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

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

Species	No. of SSR locus	No. of PB ^a	PPB ^b	A _o ^c	A _e ^d	H _e ^e	H _i ^f
<i>D. regnieriana</i>	20	18	90%	2.25	1.9227	0.5233	0.35
<i>D. pulcherrima</i>	20	19	95%	3.6	2.4675	0.5317	0.225
<i>D. pulcherrima</i> var. <i>buyssoniana</i>	20	20	100%	4.15	3.0805	0.6144	0.3036

^a (PB), number of polymorphic band.

^b (PPB), percentage of polymorphic band.

^c (A_o), observed number of alleles per locus.

^d (A_e), effective number of alleles per locus.

^e (H_e), expected heterozygosity.

^f (H_i), Shannon's information index.

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

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

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

4. Discussion

4.1. EST-SSR development and polymorphism

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

4.2. SSR transferability

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

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

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

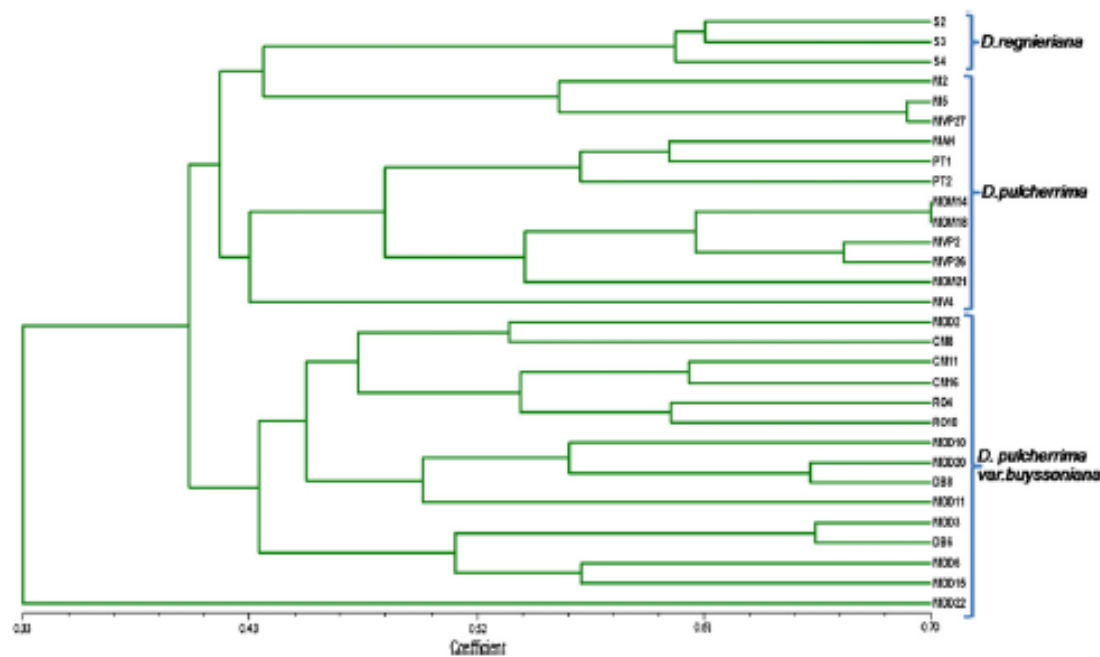


Fig. 2. The genetic relationship between 30 accessions, based on Dice's similarity coefficient.

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

4.3. Genetic diversity of *Doritis*

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

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

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

Species	<i>D. regneriana</i>	<i>D. pulcherrima</i>	<i>D. pulcherrima</i> var. <i>buyssoniana</i>
<i>D. regneriana</i>	0.0000		
<i>D. pulcherrima</i>	0.3036	0.0000	
<i>D. pulcherrima</i> var. <i>buyssoniana</i>	0.2623	0.1739	0.0000

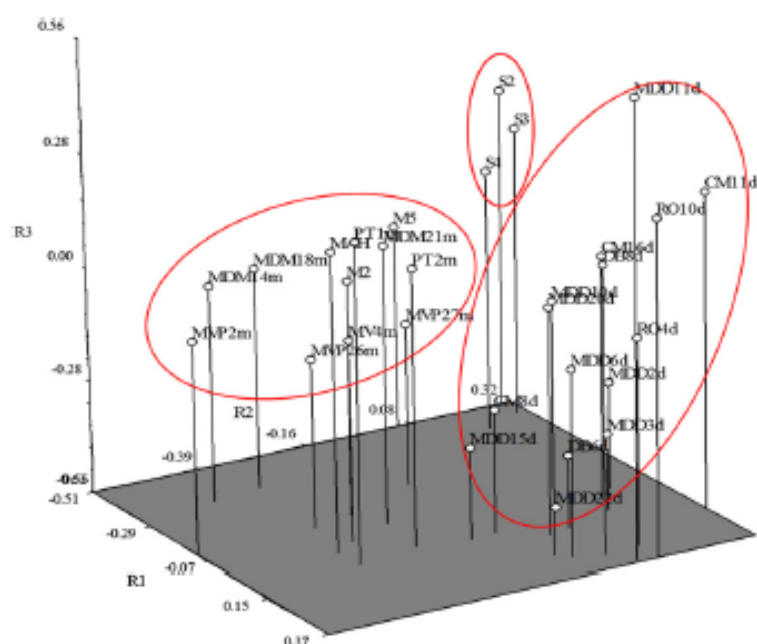


Fig. 3. Principles coordinate analysis for SSR markers using the genetic similarity matrix for 30 *Dactylis* accessions.

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

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

Acknowledgments

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

References

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

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



IASS

THE 3RD INTERNATIONAL AGRICULTURE STUDENTS SYMPOSIUM

19-28 FEBRUARY 2012



Agriculture: Sharing and Collaborating For The Future

Organized By:



In Collaboration With:



Principal Sponsor:



Gold Sponsor:



Corporate Sponsor:



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

Savitree Ritchuay¹, Chatchawan Jantasuriyarat² and Sureeporn Kate-ngam³

^{1,2} Department of Genetics, Faculty of Science, Bangkok Campus Kasetsart University, Bangkok and

³ Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani

¹g521440208@ku.ac.th, ²fscicwj@ku.ac.th, ³katengas@agri.ubu.ac.th

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

Keywords: EST, microsatellite markers, Doritis sp.