



การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์
กล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบลายด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

โดย

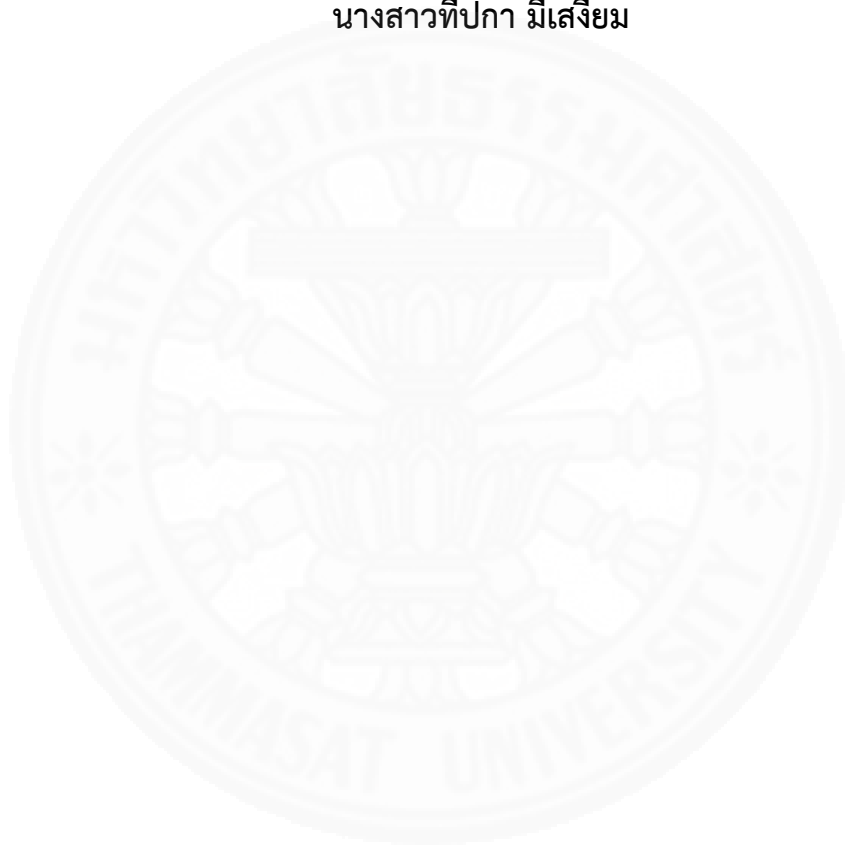
นางสาวทีปกา มีเสงี่ยม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์
กล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบลายด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

โดย

นางสาวทีปกา มีเสงี่ยม



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

GENETIC RELATIONSHIP ASSESSMENT AND IDENTIFICATION OF
MOTTLED-LEAF *PAPHIOPEDILUM* USING DNA MARKERS

BY

MISS TEEPAKA MEESANGIEM



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

THAMMASAT UNIVERSITY

ACADEMIC YEAR 2016

COPYRIGHT OF THAMMASAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

วิทยานิพนธ์

ของ

นางสาวทีปกา มีเสียม

เรื่อง

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์
กล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มโบลายด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ได้รับการตรวจสอบและอนุมัติ ให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

เมื่อ วันที่ 30 มิถุนายน พ.ศ. 2560

ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(รองศาสตราจารย์ ดร. ชีระชัย ธานันต์)

กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นฤมล ธานันต์)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมจิต ดำริห์อ่อนันต์)

คณบดี

(รองศาสตราจารย์ ปกรณ์ เสริมสุข)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบลายด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ
ชื่อผู้เขียน	นางสาวทีปกา มีเสงี่ยม
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
สาขาวิชา/คณะ/มหาวิทยาลัย	สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. ชีระชัย ธนानันต์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นฤมล ธนานันต์
ปีการศึกษา	2559

บทคัดย่อ

กล้วยไม้รองเท้านารี (Lady's slipper) เป็นกล้วยไม้ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย ปัจจุบันตลาดมีความต้องการกล้วยไม้ที่มีความหลากหลายมากขึ้น การวางแผนการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ให้มีความหลากหลายจึงจำเป็นต้องใช้ข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม อีกทั้งการจำแนกพันธุ์และการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีด้วยลักษณะสัณฐานทำได้ยาก จึงจำแนกพันธุ์และประเมินความสัมพันธ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีใช้ไพรเมอร์แบบ 72 ชนิด คัดเลือกไพรเมอร์มา 22 ชนิด เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบไพรเมอร์ 11 ชนิดที่สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เครื่องหมายสก็อตใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกมา 22 ชนิด จาก 80 ชนิด เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบไพรเมอร์ 13 ชนิด ที่สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว จากนั้นนำข้อมูลจากทั้ง 2 เครื่องหมาย มาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี เครื่องหมายสก็อต และเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีร่วมกับเครื่องหมายสก็อตให้ผลที่ไปในทางเดียวกัน คือ สามารถระบุความสัมพันธ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีได้ และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะของยีน *matK*, *rpoC1*, *rbcL* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนดังกล่าวมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ

maximum likelihood ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* มีประสิทธิภาพในการจำแนกร่องเท้านารีได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับบริเวณอื่น ๆ แต่แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถจำแนกได้เพียง 14 พันธุ์ เท่านั้น การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 2 ยีน และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 3 ยีน แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้มีประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้ร่องเท้านารีกลุ่มใบลายไม่แตกต่างกัน แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 ยีน สามารถจำแนกกล้วยไม้ร่องเท้านารีได้มากที่สุด 18 พันธุ์ จาก 22 พันธุ์ สรุปได้ว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 ยีนร่วมกันมีประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้ร่องเท้านารีกลุ่มใบลายมากกว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 1, 2 และ 3 ยีน แต่เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* มีประสิทธิภาพในการจำแนกร่องเท้านารีได้ดีที่สุด ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการวางแผนการอนุรักษ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้มีคุณค่าทางเศรษฐกิจต่อไป

คำสำคัญ: ร่องเท้านารี, ร่องเท้านารีกลุ่มใบลาย, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม, แอสตอร์เอพิดี, สก๊อต, ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ

Thesis Title	GENETIC RELATIONSHIP ASSESSMENT AND IDENTIFICATION OF MOTTLED-LEAF <i>PAPHIOPEDILUM</i> USING DNA MARKERS
Author	Miss Teepaka Meesangiem
Degree	Master of science (Biotechnology)
Major Field/Faculty/University	Department of Biotechnology Faculty of Science and Technology Thammasat University
Thesis Advisor	Associate Professor Theerachai Thanananta
Thesis Co-Advisor	Assistant Professor Narumol Thanananta
Academic Years	2016

ABSTRACT

Lady's slipper orchids are one of the most important orchid to economy in Thailand. Currently, orchid markets have expanded a demand for varieties of orchids. With similar morphology but high diversity of flowers, morphological identification of orchids becomes more difficult. Thus plans for orchid breeding program is necessary to exploit genetic relationship. This research, aim to employ DNA markers for assessment of genetic relationship and identification of 14 cultivars of *Paphiopedilum* subgenus *Brachypetalum* section *Brachypetalum*. The 72 random primers of HAT-RAPD markers were screened, and twenty-two primers were selected to create DNA fingerprinting of *Paphiopedilum*. Eleven of 22 random primers were able to identify each cultivar even using only one primer. DNA fingerprints of SCoT markers have been reported by using 22 selected SCoT primers from 80 primers. Thirteen of 22 primers can be applied to differentiate each cultivar using only one primer. Three dendrograms constructed by HAT-RAPD markers, SCoT markers, and combining both markers, have been shown a similar pattern. Both DNA markers were effectively employed for assessment of genetic relationships and identification cultivars of *Paphiopedilum*. The nucleotide sequences of specific genes were used to assess genetic relationship and

classify 22 species of mottled-leaf *Paphiopedilum*. The maximum likelihood in program MEGA 7.0 was selected to construct phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of gene *matK*, *rbcL*, *rpoC1* and intergenic *trnH-psbA* spacer. The results showed that the nucleotide sequences of intergenic *trnH-psbA* spacer can distinguish all of mottled-leaf *Paphiopedilum* but the phylogenetic tree can classify only 14 of those. Then combination of loci found that two-loci and three-loci analyses showed the same results. A combination with 4 locations increased variability and efficiency of phylogenetic tree to separate 18 species from those of 22 species. In conclusion, the phylogenetic tree of multi-loci has the efficiency to discriminate mottled-leaf *Paphiopedilum* higher than that of a single-locus. Considering the nucleotide sequences, it was found that the intergenic *trnH-psbA* spacer can distinguish all of mottled-leaf *Paphiopedilum*. Finally, this results have been suggested to lead for orchids conservation plan and breeding program in the future.

Keywords: *Paphiopedilum*, mottled-leaf *Paphiopedilum*, genetic relationship, HAT-RAPD, SCoT, nucleotide sequences specific site

กิตติกรรมประกาศ

การทำงานวิจัยครั้งนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยผู้วิจัยได้รับความกรุณาการดูแลเอาใจใส่ และคำแนะนำจากท่านคณาจารย์คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเฉพาะอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระชัย ธนานันต์ และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นฤมล ธนานันต์ ในการดูแลเอาใจใส่ การให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ การอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการวิจัย เอกสารวิชาการต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ อีกทั้งติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี และขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมจิต ดำริห์อนันต์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ ที่ให้คำแนะนำ รวมถึงข้อเสนอแนะ เพื่อแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดจนร่วมเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ได้มอบทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์เพื่อนำไปสู่การตีพิมพ์เผยแพร่ประจำปี 2559 ทุนสนับสนุนงานวิจัยประเภททุนวิจัยทั่วไปสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาประจำปี 2560 และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ได้มอบทุนบัณฑิตเรียนดีเพื่อการศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษาประจำปี 2558 และทุนนำเสนองานวิทยานิพนธ์/สารนิพนธ์ภายในประเทศประจำปี 2560 เพื่อสนับสนุนด้านค่าใช้จ่ายในด้านการเรียนของผู้วิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน รวมถึงเจ้าหน้าที่ เพื่อน ๆ พี่ ๆ โดยเฉพาะนายเกียรติชัย แซ่ไต่ นายจาตุรงค์ สัมฤทธิ์ นางสาวภัทรา หงษ์ทองดี นางสาวจุฑาทิพย์ พันธุ์รูปท้าว ที่สอนวิธีการดำเนินงานวิจัย และให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหา รวมถึงนางสาวทัศนีย์ สิงห์ศิลารักษ์ นางสาวฐิตาพร มณีเนตร นางสาวพรประภา ศิริเทพทวี และนางสาวจุฑามาศ เจียมเจือจันทร์ ที่ช่วยเหลือกันมาโดยตลอด

ท้ายที่สุดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวผู้เป็นที่รัก ที่ได้ให้โอกาสในการศึกษาอันมีค่ายิ่ง และเป็นกำลังใจเรื่อยมา เป็นแรงผลักดันให้ผู้วิจัยทำงานสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้ง จึงใคร่ขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

นางสาวทีปกา มีแสงี่ยม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญภาพ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ปัญหาที่ต้องการทราบจากการศึกษา	2
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.5 สถานที่ทำการวิจัย	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 กัญชงไม้	4
2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกัญชงไม้	4
2.2 กัญชงไม้รองเท้านารี	5
2.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกัญชงไม้รองเท้านารี	6
2.2.2 การจำแนกกัญชงไม้รองเท้านารี	7
2.2.2.1 การจำแนกโดยอาศัยลักษณะดอก	7

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.2.2 การจำแนกโดยอาศัยลักษณะการเจริญเติบโต	8
2.2.2.3 การจำแนกตามสกุลย่อย	8
2.3 กล้ายไม้รองเท้านารีสกุล <i>Paphiopedilum</i> สกุลย่อย <i>Brachypetalum</i> หมู่ <i>Brachypetalum</i> ที่ใช้ในงานวิจัย	9
2.4 กล้ายไม้รองเท้านารีสกุล <i>Paphiopedilum</i> สกุลย่อย <i>Parvisepalum</i> หมู่ <i>Parvisepalum</i> ที่ใช้ในงานวิจัย	15
2.5 กล้ายไม้รองเท้านารีสกุล <i>Paphiopedilum</i> สกุลย่อย <i>Parvisepalum</i> หมู่ <i>Emersonianum</i> ที่ใช้ในงานวิจัย	18
2.6 เครื่องหมายดีเอ็นเอ	19
2.7 เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัย	20
2.7.1 เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี	20
2.7.2 เครื่องหมายสก็อต	21
2.7.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ	25
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	29
3.1 อุปกรณ์	29
3.2 สารเคมี	29
3.2.1 สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ	29
3.2.2 สารเคมีสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	30
3.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	30
3.2.2 สารเคมีสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	30
3.3 วิธีการวิจัย	30
3.3.1 กล้ายไม้ที่ใช้ในงานวิจัย	30
3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากกล้ายไม้	32
3.3.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ	33
3.3.4 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอ	33

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.4.1 การสร้างเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี	33
3.3.4.2 การสร้างเครื่องหมายสก็อต	36
3.3.4.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ	39
3.3.5 การวิเคราะห์ผล	41
3.3.5.1 เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและเครื่องหมายสก็อต	41
3.3.5.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ	41
3.3.5.3 การเปรียบเทียบผลที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอ	42
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	43
4.1 เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี	43
4.1.1 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	43
4.1.2 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	56
4.2 เครื่องหมายสก็อต	57
4.2.1 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	57
4.2.2 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	70
4.3 การวิเคราะห์เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีร่วมกับเครื่องหมายสก็อต	72
4.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ	74
4.4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนที่ใช้เป็นตำแหน่งจำเพาะ	74
4.4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์	74
4.4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	77
4.4.3.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rpoC1</i>	77
4.4.3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcL</i>	85
4.4.3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>matK</i>	93
4.4.3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง ยีน <i>trnH</i> กับ <i>psbA</i>	111
4.4.3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 ยีนร่วมกัน	127

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4.3.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 ยีนร่วมกัน	131
4.4.3.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 ยีนร่วมกัน	134
4.5 การอภิปรายผล	135
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	139
5.1 เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี	139
5.2 เครื่องหมายสก็อต	139
5.3 การวิเคราะห์เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีร่วมกับเครื่องหมายสก็อต	140
5.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ	140
5.4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเพียงตำแหน่งเดียว	140
5.4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 2 ยีน	142
5.4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 3 ยีน	142
5.4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 4 ยีน	143
5.5 ข้อเสนอแนะ	143
รายการอ้างอิง	144
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก ดีเอ็นเอมาตรฐาน	154
ภาคผนวก ข ผลการให้ค่าคะแนนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอแต่ละไพรเมอร์	156
ประวัติผู้เขียน	181

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 กล้ายไม้รอนแก่นารีสกุล <i>Paphiopedilum</i> สกุลย่อย <i>Brachypetalum</i> หมู่ <i>Brachypetalum</i> ที่ใช้ในงานวิจัย	9
2.2 กล้ายไม้รอนแก่นารีสกุล <i>Paphiopedilum</i> สกุลย่อย <i>Parvisepalum</i> หมู่ <i>Parvisepalum</i> ที่ใช้ในงานวิจัย	15
2.3 กล้ายไม้รอนแก่นารีสกุล <i>Paphiopedilum</i> สกุลย่อย <i>Parvisepalum</i> หมู่ <i>Emersonianum</i> ที่ใช้ในงานวิจัย	18
3.1 กล้ายไม้รอนแก่นารีสกุล <i>Paphiopedilum</i> สกุลย่อย <i>Brachypetalum</i> หมู่ <i>Brachypetalum</i>	31
3.2 กล้ายไม้รอนแก่นารีสกุล <i>Paphiopedilum</i> สกุลย่อย <i>Parvisepalum</i> หมู่ <i>Parvisepalum</i>	31
3.3 กล้ายไม้รอนแก่นารีสกุล <i>Paphiopedilum</i> สกุลย่อย <i>Parvisepalum</i> หมู่ <i>Emersonianum</i>	32
3.4 ไพรเมอร์ชุด A2-F2	34
3.5 องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาลูกลูโซโพลีเมอเรสของเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดี	36
3.6 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกลูโซโพลีเมอเรสของเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟดี	36
3.7 ไพรเมอร์ SCoT1-SCoT80	37
3.8 องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาลูกลูโซโพลีเมอเรสของเครื่องหมายสก็อต	39
3.9 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกลูโซโพลีเมอเรสของเครื่องหมายสก็อต	39
3.10 ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งจำเพาะของยีน	40
3.11 องค์ประกอบของสารในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งจำเพาะ	40
3.12 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งจำเพาะ	41
4.1 หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rpoC1</i> และยีน <i>rbcL</i>	74
4.2 หมายเลขจำเพาะของยีน <i>matK</i> และซันติเอนเอที่อยู่ระหว่างยีน <i>trnH</i> กับ <i>psbA</i>	76
4.3 ตำแหน่งที่เกิดความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในยีน <i>rpoC1</i>	82
4.4 กรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปเมื่อลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงของยีน <i>rpoC1</i>	83
4.5 ตำแหน่งที่เกิดความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในยีน <i>rbcL</i>	91
4.6 ตำแหน่งที่เกิดความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในยีน <i>matK</i>	99
4.7 กรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปเมื่อลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงของยีน <i>matK</i>	106
4.8 ตำแหน่งความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในซันติเอนเอที่อยู่ระหว่างยีน <i>trnH</i> กับ <i>psbA</i>	119

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
4.27	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT13	59
4.28	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT14	59
4.29	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT35	60
4.30	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT39	60
4.31	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT40	61
4.32	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT50	61
4.33	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT51	62
4.34	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT52	62
4.35	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT58	63
4.36	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT59	63
4.37	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT61	64
4.38	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT64	64
4.39	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT65	65
4.40	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT66	65
4.41	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT67	66
4.42	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT69	66
4.43	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT70	67
4.44	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT77	67
4.45	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT79	68
4.46	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT80	68
4.47	ค่าดัชนีความเหมือนของกล้วยไม้รองเท้านารีที่ได้จากเครื่องหมายสก็อต	71
4.48	แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีที่ได้จากเครื่องหมายสก็อต	71
4.49	ค่าดัชนีความเหมือนได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีตีร่วมกับเครื่องหมายสก็อต	73
4.50	แผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีตีร่วมกับเครื่องหมายสก็อต	73
4.51	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rpoC1</i>	78
4.52	ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>rpoC1</i>	84

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.53 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>rpoC1</i> ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood	85
4.54 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>rbcl</i>	86
4.55 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>rbcl</i>	92
4.56 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>rbcl</i> ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood	93
4.57 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>matK</i>	94
4.58 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>matK</i>	110
4.59 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>matK</i> ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood	111
4.60 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน <i>trnH</i> กับ <i>psbA</i>	112
4.61 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้จากซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน <i>trnH</i> กับ <i>psbA</i>	126
4.62 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน <i>trnH</i> กับ <i>psbA</i> ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood	127
4.63 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ยีน <i>rbcl</i> ร่วมกับยีน <i>rpoC1</i> ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood	128
4.64 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>rbcl</i> ร่วมกับยีน <i>matK</i> ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood	129
4.65 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>rbcl</i> ร่วมกับซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน <i>trnH</i> กับ <i>psbA</i> ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood	129
4.66 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>rpoC1</i> ร่วมกับยีน <i>matK</i> ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood	130
4.67 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>rpoC1</i> ร่วมกับซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน <i>trnH</i> กับ <i>psbA</i> ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood	130
4.68 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>matK</i> ร่วมกับซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน <i>trnH</i> กับ <i>psbA</i> ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood	131

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.69 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>rbcL</i> , <i>rpoC1</i> และยีน <i>matK</i> ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood	132
4.70 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>rbcL</i> , <i>rpoC1</i> และชิ้นดีเอ็นเอ ที่อยู่ระหว่างยีน <i>trnH</i> กับ <i>psbA</i> ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood	132
4.71 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>rbcL</i> , <i>matK</i> และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ ระหว่างยีน <i>trnH</i> กับ <i>psbA</i> ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood	133
4.72 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>rpoC1</i> , <i>matK</i> และชิ้นดีเอ็นเอ ที่อยู่ระหว่างยีน <i>trnH</i> กับ <i>psbA</i> ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood	133
4.73 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน <i>rpoC1</i> , <i>rbcL</i> , <i>matK</i> และชิ้นดีเอ็นเอ ที่อยู่ระหว่างยีน <i>trnH</i> กับ <i>psbA</i> ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood	134

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในวงศ์ Orchidaceae เป็นไม้ตัดดอกที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศและต่างประเทศ เนื่องจากดอกกล้วยไม้มีสีสันสวยงาม มีรูปร่างของดอกและชนิดพันธุ์ที่หลากหลาย ทำให้ผู้ใช้มีโอกาสเลือกใช้ได้มาก อีกทั้งมีอายุการใช้งานนาน และให้ผลตอบแทนสูง กล้วยไม้นับเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญที่สุดของไทย ปัจจุบันอุตสาหกรรมกล้วยไม้ของประเทศไทยได้เจริญก้าวหน้ามาก จึงทำให้ประเทศไทยสามารถส่งทั้งดอกและต้นกล้วยไม้ไปจำหน่ายต่างประเทศทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท และประเทศไทยยังได้รับการยกย่องให้เป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้ที่สำคัญอีกด้วย กล้วยไม้รองเท้านารีมีแหล่งกำเนิดอยู่ในเขตอบอุ่นและเขตร้อนโดยเฉพาะแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ตั้งแต่อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ พม่า มาเลเซีย และในประเทศไทย ทั่วโลกพบกล้วยไม้รองเท้านารีแล้ว 5 สกุล รวม 137 ชนิด ประเทศไทยพบเพียงสกุลเดียวคือสกุล *Paphiopedilum* รวม 18 ชนิด จากที่พบทั่วโลกประมาณ 70 ชนิด

การจำแนกพันธุ์และการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีด้วยลักษณะสัณฐานทำได้ยาก เนื่องจากลักษณะของดอกกล้วยไม้มีความหลากหลายทางสรีระอย่างมาก แต่ลักษณะสัณฐานอื่น ๆ มีลักษณะใกล้เคียงกัน ส่งผลให้ยากต่อการจำแนกพันธุ์กล้วยไม้ในสกุลเดียวกัน อีกทั้งปัจจุบันมีการตัดไม้ทำลายป่าและการนำกล้วยไม้รองเท้านารีป่ามาจำหน่ายโดยไม่ได้รับอนุญาต ส่งผลให้กล้วยไม้รองเท้านารีมีโอกาสสูญพันธุ์ได้ง่าย ซึ่งอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่กำลังจะสูญพันธุ์ (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, CITES) ได้ระบุให้กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นพืชอนุรักษ์ในบัญชีที่ 1 เป็นชนิดพันธุ์ที่ได้มาจากป่าหรือเป็นของป่า และใกล้สูญพันธุ์ จึงห้ามทำการค้าโดยเด็ดขาด (ยกเว้นกรณีที่ได้จากการขยายพันธุ์เทียมหรือเพาะพันธุ์ หรือการศึกษาวิจัย) ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ในสกุลนี้ เนื่องมาจากปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากกล้วยไม้เพิ่มสูงขึ้น ทางด้านเศรษฐกิจและการค้า ทั้งในประเทศและต่างประเทศ จากข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการวางแผนการอนุรักษ์และวางแผนการผลิตเพื่อส่งเสริมการค้าต่อไป

ด้วยความสำคัญดังกล่าวผู้วิจัยจึงศึกษาการจำแนกพันธุ์และการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบลายด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA) เครื่องหมายสก็อต (SCoT,

start-codon targeted) และลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ (nucleotide sequences of specific site) วิเคราะห์ความน่าเชื่อถือของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 3 ชนิด ด้วยการเปรียบเทียบผลของแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) และแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree)

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อจำแนกพันธุ์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบลายโดยใช้เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี เครื่องหมายสก็อต และลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ

1.2.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี กับเครื่องหมายสก็อต และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ จากการใช้นิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ 1 ตำแหน่ง หรือมากกว่า 2 ตำแหน่ง โดยดูจากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้

1.3 ปัญหาที่ต้องการทราบจากการศึกษา

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบลาย โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 3 ชนิด

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบลาย ได้แก่ กล้วยไม้ นารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ ได้แก่ รองเท้านารี ฝายหอย รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีเหลืองอุดร รองเท้านารีเหลืองสิงขร รองเท้านารีเหลืองตรัง รองเท้านารีเหลืองพังงา รองเท้านารีขาวชุมพร รองเท้านารีช่องอ่างทอง รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีขาวพังงา รองเท้านารีเกรยี และรองเท้านารีเหลืองประจวบ ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี และเครื่องหมายสก็อต ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบลาย 22 พันธุ์ ได้แก่ กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ข้างต้น กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ *Parvisepalum* 6 ได้แก่ รองเท้านารีมาลีโปเอนเซ รองเท้านารีแจ๊คกีโอ รองเท้านารีไมแครนทุม รองเท้านารีเวียดนามเอนเซ รองเท้านารีเดเลนนตีโอ และรองเท้านารีอาร์เมเนียคัม กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum*

สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ Emersonianum 2 พันธุ์ ได้แก่ รองเท้านารีอีเมอร์โซนิโอ และรองเท้านารีฮานเกียนุมด้วยเครื่องหมายลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ

1.5 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการ B-403 ห้องปฏิบัติการ B-407 อาคารเรียนและปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี



บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอยู่ในวงศ์ Orchidaceae มีการสำรวจพบแล้วประมาณ 796 สกุล และมีมากกว่า 20,000 ชนิด ในประเทศไทยมีการสำรวจพบแล้วทั้งสิ้น 168 สกุล และมีมากกว่า 1,170 ชนิด (อุไร, 2541) กล้วยไม้เป็นพืชวงศ์ใหญ่ที่มีดอกสวยงาม มีความหลากหลายทั้งสี สันลวดลาย ขนาด รูปทรง และกลิ่น กล้วยไม้แทบทุกชนิดเป็นพืชขนาดเล็กหรือเล็กมากเมื่อเทียบกับพืชวงศ์อื่น ๆ เพราะไม่มีเนื้อไม้ จึงไม่สามารถเจริญเติบโตขึ้นเป็นไม้ยืนต้นขนาดใหญ่ได้ บางชนิดเป็นพืชล้มลุก บางชนิดมีลำต้นเป็นเหง้าหรือหัวอยู่ใต้ดิน บางชนิดเป็นไม้อิงอาศัย มีการสร้างดอกเพื่อการแพร่พันธุ์ในฤดูกาลที่เหมาะสมก่อนยุบตัวหรือลงหัวเพื่อพักตัวในฤดูแล้ง บางชนิดมีการเจริญเติบโตต่อเนื่อง อาจเจริญทางยอดหรือแตกตาใหม่จากด้านข้างจนเป็นกลุ่มกอจึงกล่าวได้ว่ากล้วยไม้เป็นไม้เนื้ออ่อนอายุยืน (อบฉันท, 2543) ประเทศไทยจัดเป็นศูนย์กลางการกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้ในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เนื่องจากมีกล้วยไม้หลากหลายชนิดที่กระจายตัวอยู่ทั่วภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วประเทศ ในปัจจุบันอุตสาหกรรมกล้วยไม้ของประเทศไทยได้เจริญก้าวหน้ามากทำให้ประเทศไทยสามารถส่งทั้งดอกและต้นกล้วยไม้ไปจำหน่ายต่างประเทศทำรายได้ปีละหลายร้อยล้านบาท และประเทศไทยยังได้รับการยกย่องให้เป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้ที่สำคัญอีกด้วย (มลิวลย์, 2539; สำอางค์, 2549)

2.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้

กล้วยไม้มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (เศรษฐมนตร์, 2554; สำอางค์, 2549) ดังนี้

ราก (root)

กล้วยไม้ไม่มีระบบรากแก้ว รากของกล้วยไม้มีหลายประเภท ได้แก่ รากดิน (terrestrial) รากมีลักษณะอวบน้ำอยู่ใต้ดิน รากกึ่งดิน (semi terrestrial) รากมีลักษณะใหญ่หยาบและแตกแขนงอย่างหนาแน่น รากกึ่งอากาศ (semi epiphyte) รากมีลักษณะเป็นแขนงใหญ่และหยาบ และรากอากาศ (epiphyte) มีลักษณะหยาบยึดเกาะกับต้นไม้หรือวัสดุปลูก บางส่วนจะพุ่งไปในอากาศ

ลำต้น (stem)

ลำต้นของกล้วยไม้มีหลายแบบ ขึ้นอยู่กับชนิดและสภาพแวดล้อม ขนาดของลำต้นกล้วยไม้มีความแตกต่างกัน บางชนิดมีลำต้นเล็กมาก บางชนิดมีขนาดลำต้นยาว สำหรับลำต้นของลำต้นกล้วยไม้ที่โผล่พ้นจากเครื่องปลูกแบ่งได้ 2 ประเภทคือ ลำต้นแท้จริงจะมีข้อปล้องเหมือนกับ

ลำต้นใบเลี้ยงเดี่ยวทั่วไป และลำต้นเทียมที่เรียกว่าลำลูกกล้วย (pseudobulb) มีลักษณะลำต้นโป่งพองทำหน้าที่สะสมอาหาร และเป็นการปรับตัวเพื่อให้ทนกับสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งได้ดี

ใบ (leaf)

ใบของกล้วยไม้ไม่มีเส้นใบที่ขนานกันไปตามความยาวของใบ ใบมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละชนิด ตั้งแต่ รูปร่าง สี สัน ขนาด ลวดลาย และการทรงตัวในธรรมชาติ ของใบส่วนมากมีสีเขียวอมเหลือง บางชนิดมีลวดลายที่สวยงาม การเรียงตัวจะมีทั้งเรียงสลับกันและเรียงซ้อนทับกัน ใบมีลักษณะอวบน้ำ ใบของกล้วยไม้ประกอบด้วย 2 ส่วนหลักคือ แผ่นใบ กล้วยไม้จะมีแผ่นใบที่มีหลายลักษณะ ได้แก่ ใบแบน ใบกลม และใบร่อง กาบใบ เป็นแผ่นบาง ๆ อยู่ต่อจากแผ่นใบทำหน้าที่คล้ายกับกำบังใบ คือเพื่อเชื่อมโคนของแผ่นใบกับลำต้น อีกทั้งยังห่อหุ้มลำต้นและตาข้าง

ดอก (flower)

ดอกกล้วยไม้เป็นดอกสมบูรณ์เพศ คือ เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน มีหน้าที่ในการสืบพันธุ์ โดยปกติแล้วดอกกล้วยไม้จะมี 6 กลีบ ประกอบด้วย กลีบเลี้ยง (sepal) จะเรียงตัวอยู่รอบนอกสุดจำนวน 3 กลีบ กล้วยไม้บางชนิดมีกลีบเลี้ยงที่คล้ายกันกับบางชนิด มีลักษณะแตกต่างกันแยกเป็นกลีบเลี้ยงบน (dorsal petal) 1 กลีบ และกลีบเลี้ยงด้านข้าง (lateral petal) 2 กลีบ กลีบดอก (petal) เป็นชั้นที่เรียงตัวอยู่ด้านในถัดจากกลีบเลี้ยง กลีบดอกมี 3 กลีบ ประกอบด้วย กลีบดอกด้านข้าง (lateral petal) 2 กลีบ ส่วนอีก 1 กลีบ เรียกว่า กลีบปาก (lip) จะมีลักษณะที่แตกต่างออกไป และเส้าเกสร (stigminal column) เป็นส่วนที่สำคัญและมีความเฉพาะของกล้วยไม้แต่ละชนิด เป็นที่รวมของวงเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียเข้าไว้ด้วยกัน

ผลหรือฝัก (fruit or pod)

ผลหรือฝักของกล้วยไม้มีลักษณะที่แตกต่างกันออกไป เมื่อแก่เต็มที่ผลหรือฝักนั้นจะแตกตามแนว ข้างในของฝักจะมีเมล็ดที่มีขนาดเล็กมาก มีลักษณะเรียวยาวหรือป่องตรงกลางคล้ายลูกธัญพืช และมีจำนวนมาก ตั้งแต่ 1,600 ถึง 4,000,000 เมล็ด เมล็ดนี้จะมีโอกาสเจริญงอกงามไปเป็นต้นใหม่ได้ในธรรมชาติ แต่จำนวนไม่มากนัก เนื่องจากต้องอาศัยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

2.2 กล้วยไม้รองเท้านารี

กล้วยไม้รองเท้านารีมีชื่อสามัญว่า Lady's slipper จัดเป็นพันธุ์ไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในเขตอบอุ่น และเขตร้อนโดยเฉพาะแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (รวมทั้งไทย) ตั้งแต่อินเดีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ พม่า มาเลเซีย และหมู่เกาะโซโลมอน แต่คนในพื้นที่นิยมปล่อยให้อยู่ตามธรรมชาติและบางชนชาติยังมีความเชื่อว่าชื่อของกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นชื่อที่ไม่เป็นมงคลก็มี จนกระทั่งปี ค.ศ. 1816 กล้วยไม้รองเท้านารีชนิดแรกจึงถูกค้นพบโดย ดร.วิลลิส ชาวอังกฤษ ที่เมือง Sylhet และนำไปทดลอง

ปลูกเลี้ยงในประเทศอังกฤษจนให้ดอกครั้งแรกในเดือนพฤศจิกายน ค.ศ. 1819 และมีการบันทึกลงใน Curtis's Botanical Magazine โดยตั้งชื่อว่า *Cypripedium venustum* ซึ่งมีการเปลี่ยนชื่อเป็น *Paphiopedilum venustum* จากนั้นดร. วิลลิซค้นพบกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดที่ 2 คือ *P. insigne* ที่เมืองเดียวกันและนำมาปลูกเลี้ยงจนออกดอกได้ที่สวนพฤกษศาสตร์ลิเวอร์พูล จากนั้นก็มีการค้นพบกล้วยไม้รองเท้านารีเรื่อยมา (อุไร, 2541; เศรษฐมณฑร์, 2551) ทั่วโลกพบกล้วยไม้รองเท้านารีแล้ว 5 สกุล รวม 137 ชนิด ได้แก่ สกุลที่ 1. *Mexipedium* 1 ชนิด สกุลที่ 2. *Selenipedium* 4 ชนิด สกุลที่ 3. *Phragmipedium* 15 ชนิด สกุลที่ 4. *Cypripedium* 47 ชนิด และสกุลที่ 5. *Paphiopedilum* 70 ชนิด ในประเทศไทยพบรองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* แล้วรวม 18 ชนิด จากทั่วโลกที่พบแล้ว 70 ชนิด (อุไร, 2541)

2.2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้รองเท้านารี

กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* เป็นกล้วยไม้ประเภทฐานร่วม (sympodium) คือเติบโตโดยแตกหน่อใหม่จากตาข้างของต้นเดิม เช่นเดียวกับหวาย แคทลียา แต่ไม่มีลำลูกกล้วย หน่อใหม่จะแตกจากตาที่โคนต้น ในธรรมชาติจะพบรองเท้านารีตามหน้าผา ตามพื้นดินที่มีใบไม้ทับถมอยู่เป็นจำนวนมาก และบางแห่งอาจอาศัยอยู่ตามต้นไม้ได้เช่นกัน รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ประเภทแตกกอ (Braem, 2014; อุไร, 2541; เศรษฐมณฑร์, 2551)

ราก (root)

รากของกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นระบบรากฝอยที่ออกจากโคนแล้วแผ่กระจายในแนวราบ มีขนาดใหญ่ รูปทรงกระบอก มีสีน้ำตาล มีชั้นเวลาเมนหุ้มคล้ายฟองน้ำช่วยเก็บ ดูดความชื้นได้ดี และมีขนรากปกคลุมอยู่ทั่วไป โดยเฉพาะที่บริเวณปลายราก

ลำต้น (stem)

ลำต้นของกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นเหง้าสั้นไม่มีลำลูกกล้วยยกเว้น *P. druryi* ที่มีความยาวของลำต้นมากกว่า 10 เซนติเมตร กล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิดเมื่อปลูกไปหลายชั่วรุ่นแล้วพบว่ามีความยาวของลำต้นเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ไม่สามารถใช้ความยาวของลำต้นมาเป็นเกณฑ์ในการกำหนดชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีได้

ใบ (leaf)

ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับหรือรูปขอบขนาน มีหลายแบบทั้งรูปขอบขนานรูปรี รูปรีแกมรูปขอบขนานหรือรูปแถบ ใบออกสลับกันทั้งสองข้าง จำนวน 2-7 ใบต่อต้น ขนาดใบพบว่าบางชนิดมีขนาดใบที่กว้างมาก ความหนาของใบของกล้วยไม้รองเท้านารีแต่ละชนิดมีความหลากหลายมาก ปลายใบมนเว้าหรือแหลม แผ่นใบเกลี้ยง ด้านบนของใบสามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1. กลุ่มใบเขียว เป็นกลุ่มที่ใบไม่มีลายมีสีเขียวเป็นมัน 2. กลุ่มมีลาย เป็นกลุ่มที่

ใบมีลายคล้ายลายหินอ่อนมีสีเขียวเข้มสลับกับสีเขียวอมเทา สีเขียวสลับกับสีเขียวอมขาว หรือสีเขียวเข้มสลับกับสีเขียวซีด ด้านล่างของใบมีสีเขียว หรือบางชนิดมีจุดสีม่วงกระจายอยู่ทั่วไป

ช่อดอก (inflorescence)

ลักษณะช่อดอกเป็นแบบช่อกระจายเป็นช่อดอกที่ดอกย่อยมีก้านดอกแยกจากแกนกลาง ก้านดอกย่อยแต่ละดอกจะมีความยาวใกล้เคียงกัน ออกดอกที่ปลายยอด โดยส่วนใหญ่แล้วจะเป็นดอกเดี่ยวเกิดที่ปลายของช่อกระจายเป็น (สกุลย่อย *Parvisepalum*, *Brachypetalum*, *Paphiopedilum* และ *Sigmatopetalum*) บางชนิดอาจจะมีมากกว่าสองดอกต่อหนึ่งช่อกระจายเป็น (สกุลย่อย *Polyantha*) บางชนิดมีช่อดอกหลายช่อดอกก็ได้ (สกุลย่อย *Cochlopetalum*) ก้านดอกอาจจะยาวหรือสั้น มีสีเขียว สีม่วงแดง หรือสีน้ำตาลแดง แตกต่างกันไป และมักมีขนปกคลุม

ดอก (flower)

ดอกมีขนาดใหญ่สะดุดตา กลีบต่าง ๆ ของดอกหนาเป็นมัน กลีบเลี้ยงด้านบนมีรูปร่างที่แตกต่างกันออกไป เช่น รูปไข่ รูปไข่กลับ หรือรูปกลมรี ส่วนกลีบเลี้ยงคู่ล่างเชื่อมติดกัน กลีบดอกมี 3 กลีบ ซึ่งมี 2 กลีบที่มีลักษณะเหมือนกันชี้ออกทางด้านข้างทั้งสองด้านอาจเรียกว่า หู กลีบดอกอีกกลีบอยู่ด้านล่างของดอกได้เปลี่ยนรูปเป็นถุงคล้ายหีบรวงเท้าแตะของชาวต่างชาติเรียกว่า กลีบกระเป่า ดอกจะทยอยบานจากโคนช่อสู่ปลายช่อ มีสีส้มที่หลากหลาย เช่น สีเหลือง ขาว เขียว ชมพู ม่วง หรือมีหลายสีในดอกเดียวกัน ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรเพศผู้ที่สมบูรณ์ 2 แห่งลักษณะเป็นก้อนเหนียวสีเหลืองติดอยู่ด้านข้างทั้งสองข้างของเส้าเกสร ถัดลงมาตรงกลางของเส้าเกสรเป็นยอดของเกสรเพศเมียซึ่งคว่ำลง

ผลหรือฝัก (fruit or pod)

ผลเป็นผลแห้งแก่แล้วแตกตามยาว (แตกตามพู) มีเมล็ดขนาดเล็กจำนวนมาก คล้ายฝู่นฝง อาศัยลมช่วยในการกระจายพันธุ์

2.2.2 การจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารี

2.2.2.1 การจำแนกโดยอาศัยลักษณะดอก

การจำแนกโดยใช้ลักษณะดอกเป็นเกณฑ์ สามารถแบ่งกล้วยไม้รองเท้านารีออกเป็น 2 ลักษณะ (อุไร, 2541) ได้แก่

(1) กลุ่มที่มีกลีบดอกแผ่กว้าง ดอกมีลักษณะกลมหรือค่อนข้างกลม มีกลีบดอกป้อม กลม และนุ่มงอมมาด้านหน้า สีพื้นดอกมักเป็นสีขาว ขาวครีม เหลืองอ่อน หรือเหลือง พบจุดประเล็ก ๆ สีเข้มกระจายบนพื้นดอก ใบสั้นและแผ่กว้างมีลายตารางหรือคล้ายหินอ่อน เช่น รองเท้านารีเหลืองปราจีนรองเท้านารีเหลืองอุดร รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีเหลืองตรัง รองเท้านารีเหลืองพังงา รองเท้านารีช่องอ่างทอง รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีฝายหอย

(2) กลุ่มที่มีกลีบดอกแคบเรียวยาว บางชนิดพบจุดไฟสีดำ หรือกลีบดอกบิดเป็นเกลียว มีความหลากหลายของรูปร่างของดอกมาก ใบยาว และแคบบางชนิดใบเขียวไม่มีลายได้แก่ รongเท้านารีเมืองกาญจน์ และรongเท้านารีเหลืองกระบี่ เป็นต้น ส่วนที่เหลือเป็นชนิดพบลายตารางหรือคล้ายหินอ่อน ได้แก่รongเท้านารีคางกบคอดแดง และรongเท้านารีคางกบ เป็นต้น

2.2.2.2 การจำแนกโดยอาศัยลักษณะการเจริญเติบโต

การจำแนกโดยใช้ลักษณะการเจริญเติบโตหรือเรียกว่า ลักษณะวิสัย (habitat) เป็นเกณฑ์ สามารถแบ่งกล้วยไม้รongเท้านารีเป็น 2 ลักษณะ (อุไร, 2541) ได้แก่

(1) พืชอาศัยบนดินและกิ่งดิน (lithophytic type หรือ semi-terrestrial type) เป็นรongเท้านารีที่ขึ้นบริเวณหินปูน หรือพื้นดิน เช่น รongเท้านารีเหลืองปราจีน รongเท้านารีขาวสตูล และรongเท้านารีฝายหอย เป็นต้น

(2) พืชอิงอาศัย (epiphytic type) เป็นกล้วยไม้รongเท้านารีที่เจริญเติบโตอยู่บนต้นไม้ใหญ่ โดยจะมีรากเกาะอยู่กับเปลือกไม้ โดยไม่ได้แย่งอาหารจากต้นไม้ที่ยึดเกาะอยู่ได้แก่ รongเท้านารีเมืองกาญจน์ และรongเท้านารีอินทนนท์

2.2.2.3 การจำแนกตามสกุลย่อย

ทั่วโลกจำแนกกล้วยไม้รongเท้านารีเป็น 7 สกุลย่อย (Braem, 2014) ได้แก่

(1) สกุลย่อย *Parvisepalum* เป็นรongเท้านารีที่ออกดอกเดี่ยวที่ปลายของช่อดอก กลีบเลี้ยงมีขนาดเล็กกว่ากลีบดอก ใบเรียกรูปขอบขนาน มีโครโมโซมคือ $2n=26$

(2) สกุลย่อย *Brachypetalum* เป็นรongเท้านารีที่ออกดอกเดี่ยวที่ปลายของช่อดอก กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีรูปร่างที่คล้ายคลึงกัน ขนาดไม่ต่างกัน ใบเรียกรูปขอบขนาน มีโครโมโซมคือ $2n=26$

(3) สกุลย่อย *Paphiopedilum* เป็นรongเท้านารีที่ออกดอกเดี่ยวที่ปลายของช่อดอก ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ มีโครโมโซมคือ $2n=26$

(4) สกุลย่อย *Sigmatopetalum* เป็นรongเท้านารีที่ออกดอกเดี่ยวที่ปลายของช่อดอก ใบเรียกรูปขอบขนาน มีโครโมโซมคือ $2n=28, 32, 34, 35, 36, 38, 40, 41, 42$

(5) สกุลย่อย *Megastaminodium* เป็นรongเท้านารีที่ออกดอกเดี่ยวที่ปลายของช่อดอก ใบเรียกรูปขอบขนาน มีโครโมโซมคือ $2n=26$

(6) สกุลย่อย *Polyantha* เป็นรongเท้านารีที่เป็นดอกมากกว่า 1 ดอกที่ปลายของช่อดอก ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ มีโครโมโซมคือ $2n=26$

(7) สกุลย่อย *Cochlopetalum* เป็นรongเท้านารีที่เป็นดอกมากกว่า 1 ดอกที่ปลายของช่อดอก ใบเรียกรูปขอบขนาน มีโครโมโซมคือ $2n=30, 32, 34, 36, 37$

2.3 กล้ายไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 2.1 กล้ายไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum*

ชื่อสามัญ/วิทยาศาสตร์	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	รูปร่างลักษณะดอก
1. รองเท้านารีฝาหอย (<i>P. bellatulum</i>)	พบเมื่อปี พ.ศ. 2431 มีถิ่นกำเนิดอยู่ตามหุบเขาในเขตพม่าต่อชายแดนไทยตอนเหนือแถบจังหวัดลำพูน ใบลายสีเขียวแก่และเขียวอ่อนใต้ท้องใบสีม่วงแดง ใบรูปรีหรือรูปขอบขนาน ก้านดอกสั้นมีขน ช่อดอกมี 1-2 ดอก กลีบดอกนอกกว้างมนกลม ปลายกลีบคู้มลงด้านหน้า กลีบดอกสีขาวนวล ประจุดสีม่วงจากโคนกลีบ (ไชยา, 2534; เศรษฐมณฑร์, 2551)	 ภาพโดย : รศ. ดร. อีระชัย ธนानันต์
2. รองเท้านารีเหลือง ปราจีน (<i>P. concolor</i> subsp. <i>reynieri</i>)	พบเมื่อปี พ.ศ. 2402 มีถิ่นกำเนิดอยู่แถบจังหวัดปราจีนบุรี และเรื่อยลงมาทางใต้แถบจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร กระจายพันธุ์ในไทย กัมพูชา พม่า และ เวียดนาม เจริญเติบโตบนดิน และอิงอาศัย ใบรูปขอบขนาน ใบมีลายมีสีเขียวสลับสีเขียวเทา ท้องใบสีม่วง ดอกเป็นช่อที่มีดอกย่อยเพียงดอกเดียวหรือเป็นช่อ มีสีเขียวอ่อนทั้งกลีบดอก กระจเป่า และโล่มีสีเหลือง และมีจุดประสีม่วงแดงกระจายอยู่ทั่ว (ไชยา, 2534; เศรษฐมณฑร์, 2551)	 ภาพโดย : รศ. ดร. อีระชัย ธนานันต์

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชื่อสามัญ/วิทยาศาสตร์	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	รูปร่างลักษณะดอก
<p>3. รองเท้านารีเหลือง ปราจีนเวียดนาม (<i>P. concolor</i> var. Tonkinese)</p>	<p>เป็นกล้วยไม้ที่มีใบ 4-6 ใบ ช่อ ดอกมี 1-3 ดอก ดอกกว้าง 5.5-7 เซนติเมตร ดอกมีสีเหลือง หรือ บางครั้งมีสีที่คล้ายกับงาช้างหรือสีขาว มีจุดสีม่วงอยู่ทั่วไป (นิรนาม2, 2011)</p>	 <p>http://www.thaipaphioclub.com/forum/viewtopic.php?f=18&t=286&start=90</p>
<p>4. รองเท้านารีเหลือง กาญจนบุรี (<i>P. concolor</i> var. Concolor)</p>	<p>พบเมื่อ พ.ศ. 2402 มีถิ่น กำเนิดในจังหวัดกาญจนบุรี และ กำแพงเพชร มีการเจริญเติบโตแบบอิง อาศัย หรืออาศัยแบบกึ่งดิน ลักษณะ คล้ายรองเท้านารีเหลืองปราจีน แต่ รองเท้านารีเหลืองกาญจนบุรีจะออกดอก เดี่ยว กลีบดอกและกระเปาะดูเรียวยาว กว่า กลีบสีเข้มกว่า และมีจุดสีม่วงแดง เรียงเป็นเส้นที่กลางกลีบนอกทั้งสาม กลีบ (ไชยา, 2534; เศรษฐมณฑร์, 2551)</p>	 <p>ภาพโดย : รศ. ดร. วีระชัย ธนานันต์</p>
<p>5. รองเท้านารีเหลืองอุดร (<i>P. concolor</i> subsp. <i>hennisianum</i>)</p>	<p>กระจายพันธุ์อยู่ในแถบภาค อีสานของประเทศไทยในจังหวัด อุดรธานี นครพนม สกลนคร ดอกอาจ มี 2-3 ดอกบนก้านเดียวกันได้ กลีบ ดอกด้านบนผายออก เมื่อดอกบานจะ ค้อมมาข้างหน้า ดอกสีเหลืองอ่อน ประ จุดเล็ก ๆ สีม่วงประปราย กระเปาะสี เดียวกับกลีบดอก (นิรนาม1, 2555)</p>	 <p>ภาพโดย : รศ. ดร. วีระชัย ธนานันต์</p>

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชื่อสามัญ/วิทยาศาสตร์	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	รูปร่างลักษณะดอก
6. รองเท้านารีเหลืองสิงขร (<i>P. concolor</i> var. <i>Longipetalum</i>)	พบที่พม่า และเข้ามาไทยทาง ด่านสิงขร จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ช่วงแรกใช้ชื่อว่า เหลืองประจวบ ต่อมามีรายงานการพบรองเท้านารี เหลืองปราจีนชนิดหนึ่ง ซึ่งให้ชื่อว่า <i>P.</i> <i>concolor</i> subsp. <i>chlorophyllum</i> เพื่อป้องกันการสับสน จึงเรียกว่า เหลืองสิงขรแทน (นิรนาม1, 2555)	 <p>ภาพโดย : รศ. ดร. ธีระชัย ธนานันต์</p>
7. รองเท้านารีเหลืองตรัง (<i>P. godefroyae</i>)	พบใน พ.ศ. 2491 มีถิ่นกำเนิด อยู่บริเวณหมู่เกาะในฝั่งทะเลด้าน ตะวันตก จังหวัดชุมพร เจริญเติบโต แบบอิงอาศัย หรืออาศัยตามซอกหิน ริมกลีบใบเป็นคลื่น นอกจากนั้นใน กระเปาะยังมีเมล็ดสีดำติดอยู่ (ไชยา, 2534; เศรษฐมนตร์, 2551)	 <p>ภาพโดย : รศ. ดร. ธีระชัย ธนานันต์</p>
8. รองเท้านารีเหลืองพังงา [<i>P. godefroyae</i> var. <i>Leucochilum</i> (yellow)]	พบเมื่อปี พ.ศ. 2435 มีถิ่น กำเนิดอยู่บนภูเขาหินปูนแถบฝั่งทะเล ในจังหวัดภาคใต้ มีลักษณะคล้ายกับ รองเท้านารีเหลืองตรัง แต่รองเท้านารี เหลืองพังงาจะมีสีครีมออกเหลือง และ ที่กระเปาะมีจุดประเล็ก ๆ สีน้ำตาล (ไชยา, 2534)	 <p>ภาพโดย : รศ. ดร. ธีระชัย ธนานันต์</p>

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชื่อสามัญ/วิทยาศาสตร์	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	รูปร่างลักษณะดอก
<p>9. รองเท้านารีขาวชุมพร [<i>P. godefroyae</i> var. <i>Leucochilum</i> (white)]</p>	<p>พบในพม่า ไทย เวียดนามใต้ ใบ รูปขอบขนานหรือรูปใบหอก ปลายใบมน แผ่นใบมีจุดสีม่วงทั่วไป ดอกสีขาว มีจุดสีม่วงทั่วไป มีขนสั้นนุ่มด้านบน กีบเลี้ยงกลีบหลังรูปไข่กว้าง ปลายกลีบมนหรือกลม กีบเลี้ยงที่เชื่อมติดกันเป็นรูปไข่ ปลายกลีบมน กลีบดอกรูปรีหรือรูปขอบขนาน ปลายกลีบกลมหรือมน (วชิรพงศ์, 2543)</p>	 <p>ภาพโดย : รศ. ดร. อีระชัย ธานันต์</p>
<p>10. รองเท้านารีช่องอ่างทอง (<i>P. godefroyae</i> var. <i>Angthong</i>)</p>	<p>กระจายพันธุ์อยู่บริเวณหมู่เกาะอ่างทอง เกาะสมุย เจริญเติบโตตามภูเขาหินปูน ลักษณะของลำต้นและใบจะคล้ายกับรองเท้านารีขาวสตูล แต่จะมีความแตกต่างกันตรงที่สีและจุด จะมีความหลากหลายมากกว่า รองเท้านารีขาวสตูล ใบมีสีเขียวอ่อนและแก่ ใต้ใบมีสีม่วงแก่ ปลายใบจะมน ดอกเป็นช่อดอกที่มีดอกย่อยเพียงดอกเดียว กลีบดอก กลีบนอกและกระเปาะมีสีขาวและจุดประสีม่วงกระจายทั่วไป (เศรษฐมนันต์, 2551)</p>	 <p>ภาพโดย : รศ. ดร. อีระชัย ธานันต์</p>

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชื่อสามัญ/วิทยาศาสตร์	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	รูปร่างลักษณะดอก
11. รองเท้านารีขาวสตูล (<i>P. niveum</i>)	กระจายพันธุ์ในไทยและมาเลเซีย เจริญเติบโตแบบอิงอาศัย ใบลายสีเขียวเข้มสลับสีเขียวเทา ใต้ใบมีจุดสีม่วงแดงกระจายอยู่ทั่วไป ดอกเป็นช่อดอกที่มีดอกย่อยเพียงอย่างเดียว ทั้งกลีบดอก กลีบนอก กระเปาะ และโล่มีสีขาว โดยมีจุดสีม่วงแกมแดงประปรายตรงกลางโล่มีสีเหลือง (เศรษฐมนันต์, 2551)	 <p>ภาพโดย : รศ. ดร. ชีระชัย รัตนันต์</p>
12. รองเท้านารีขาวพังงา (<i>P. thaianum</i>)	พบในปี พ.ศ. 2549 บริเวณเทือกเขาภูเก็ตตอนใต้แถบจังหวัดพังงา เป็นกล้วยไม้ที่เจริญเติบโตบนดินที่มีอินทรีย์วัตถุหนา และตามหินปูน ใบลายสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ด้านล่างมีจุดม่วงมากกว่า ขอบโคนใบมีขน ช่อหนึ่งมักพบ 1 ดอก หรือ 2 ดอก ดอกมีสีขาว แผ่นโล่แบนกว้างตรงกลางมีสีเขียวไปจนถึงสีเขียวอมเหลือง มีจุดม่วงด้านในที่โคนของถุงปาก (กรมวิชาการเกษตร, 2556)	 <p>ภาพโดย : รศ. ดร. ชีระชัย รัตนันต์</p>

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ชื่อสามัญ/วิทยาศาสตร์	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	รูปร่างลักษณะดอก
<p>13. รongเท้านารีเกรยี (<i>P. Greyi</i>)</p>	<p>เป็นลูกผสมในป่าธรรมชาติ ระหว่างรongเท้านารี คาดว่าเกิดจากรongเท้านารีเหลืองตรังผสมกับรongเท้านารีขาวสตูล รongเท้านารีเกรยีในธรรมชาติจะมีความแตกต่างจากรongเท้านารีช่องอ่างทอง คือดอกจะใหญ่กว่า ดอกมีสีหลากหลาย ได้แก่ ขาวสะอาดตา ขาวแบบขุ่น ๆ และขาวอมนํ้านม เป็นต้น จุดประมีสีดำหรือนํ้าตาลดำ กระจายพันธุ์บนแผ่นดินหรือบนเกาะทางฝั่งอันดามัน บริเวณที่มีทั้งเหลืองตรังกับขาวสตูล (นิรนาม3, 2552)</p>	 <p>ภาพโดย : รศ. ดร. ธีระชัย รัตนันต์</p>
<p>14. รongเท้านารีเหลืองประจวบ (<i>P. concolor</i> var. <i>Chlorophyllum</i>)</p>	<p>เป็นกล้วยไม้ที่มีใบ 4-6 ใบ ช่อดอกมี 1-3 ดอก ดอกกว้าง 5.5-7 เซนติเมตร ดอกมีสีเหลือง มีจุดสีม่วงทั่วไป (นิรนาม 2, 2011)</p>	 <p>ภาพโดย : รศ. ดร. ธีระชัย รัตนันต์</p>

2.4 กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ *Parvisepalum* ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 2.2 กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ *Parvisepalum*

ชื่อสามัญ/วิทยาศาสตร์	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	รูปร่างลักษณะดอก
1. รองเท้านารีมาลีโปเอนเซ (<i>P. malipoense</i> S. C. Chen & Z. H. Tsi)	พบในปี 1984 เป็นกล้วยไม้หายากมาก มีถิ่นกำเนิดทางตอนใต้ประเทศจีนและทางตอนใต้ของประเทศเวียดนาม อาศัยบนกิ่งดิน ใบมีสีเขียวเข้มและมีจุดสีม่วงกระจายอยู่ทั่วไป ดอกมีสีเขียว หรือสีเขียวต่างแซมด้วยสีม่วง ดอกกว้าง 3-4 นิ้ว มีขน ปัจจุบันลดลงมากกว่า 80% จัดเป็นกล้วยไม้ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ http://www.orchidspecies.com/paphiopedilummalipoense.htm	 http://idao.plantnet-project.org/orchisasia/genre/Paphiopedilum/Paphiopedilum%20malipoense/
2. รองเท้านารีแจ๊คกี้ไอ (<i>P. malipoense</i> var. <i>jackii</i> (Hua) Averyanov)	พบทางทิศตะวันออกเฉียงใต้ของจังหวัดยูนนานประเทศจีนและทางตอนเหนือของเวียดนาม ที่ระดับความสูง 550 ถึง 650 เมตร ใบด้านบนมีสีเขียวอ่อน มีจุดสีม่วงกระจายอยู่ทั่วไป ใบด้านล่างมีลายเส้นสีเขียวเข้ม ดอกมีขนาดเล็ก กลีบดอกแคบ มีสีเขียวอมเหลือง	 http://orchids.wikia.com/wiki/Paphiopedilum_malipoense?file=Paphiopedilum_jackii.jpg

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

ชื่อสามัญ/วิทยาศาสตร์	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	รูปร่างลักษณะดอก
<p>3. รองเท้านารีไมแครนทุม (<i>P. micranthum</i> Tang & Wang)</p>	<p>พบในปี 1951 เป็นกล้วยไม้ ท้องถิ่นขนาดเล็กที่หายาก พบทาง ตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศจีนและ ทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศ เวียดนาม เจริญเติบโตบริเวณหน้าผา หรือสันเขาที่เป็นหิน ใบรูปไข่ มีสี เขียวเข้มและมีจุดสีม่วงกระจายอยู่ ทั่วไป ดอกมีสีม่วงแซมด้วยสีเขียว ปัจจุบันกล้วยไม้ชนิดนี้ลดลง ประมาณ 90-95 % จัดเป็นกล้วยไม้ ที่เสี่ยงขั้นวิกฤตต่อการสูญพันธุ์</p> <p>http://www.orchidspecies.com/paphmicranthum.htm</p>	 <p>http://www.gbif.org/species/2825201</p>
<p>4. รองเท้านารีเวียดนามเอนเซ (<i>P. vietnamense</i> O.Gruss & Perner)</p>	<p>พบเฉพาะทางตอนเหนือของ เวียดนาม เป็นกล้วยไม้หายาก อยู่ใน พื้นที่ที่มีระดับความสูง 350 ถึง 550 เมตร ใบ ยาว 8 ถึง 10 เซนติเมตร ใบมีสีเขียวเทา ๆ ถึงสีเขียวเข้ม มีจุด สีแดงเข้มหรือสีม่วงกระจายอยู่ทั่วไป ดอกมีสีน้ำตาลม่วง มีขนสีขาว หนาแน่น มีขนาดกว้าง 10 ถึง 12 เซนติเมตร สูง 8 ถึง 9 เซนติเมตร เป็นกล้วยไม้ที่ลดลงถึง 95% จัดเป็น กล้วยไม้ที่เสี่ยงขั้นวิกฤตต่อการสูญ พันธุ์</p> <p>http://www.orchidspecies.com/paphvietnamensis.htm</p>	 <p>http://orchids.wikia.com/wiki/Paphiopedilum_vietnamense</p>

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

ชื่อสามัญ/วิทยาศาสตร์	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	รูปร่างลักษณะดอก
<p>5. รองเท้านารีเดเลนตีไอ (<i>P. delenatii</i> Guillaumin)</p>	<p>เป็นกล้วยไม้ท้องถิ่นหายาก พบทางตอนใต้ของประเทศเวียดนาม เจริญเติบโตในป่าดิบ ใบรูปไข่เรียงตัว สลับระนาบเดียว ใบมีสีเขียวอ่อน เส้นใบและจุดบนใบมีสีเขียวเข้ม สีม่วงต่างดอกมีขนาดประมาณ 4 นิ้ว มีขน เป็นกล้วยไม้ที่มีแนวโน้มว่าจะลดลง จึงจัดเป็นกล้วยไม้ที่เสี่ยงขั้นวิกฤตต่อการสูญพันธุ์</p> <p>http://slipperorchids.info/paphd atasheets/parvisepalum/delenat ii/index.html</p>	 <p>http://www.orchid-nord.com/p_page/Paphiopedilum_delenatii/paph_del.htm</p>
<p>6. รองเท้านารีอาร์เมเนียคุม (<i>P. armeniacum</i> S. C. Chen & F. Y. Liu)</p>	<p>พบในปี 1982 เป็นกล้วยไม้ขนาดเล็กหายากมาก พบได้ในจังหวัดยูนนาน ประเทศจีน เจริญเติบโตบริเวณโชดหิน หินปูน และบริเวณหุบเขา ใบเป็นรูปไข่ 5-7 ใบ ใบมีสีเขียวเข้มและสีเขียวสว่าง มีจุดสีม่วงกระจายอยู่ทั่วใบ ดอกเป็นดอกเดี่ยวกว้าง 3 นิ้ว ปัจจุบันลดลงของประชากร 75-80% ดังนั้นรองเท้านารีอาร์เมเนียคุมจึงถูกประเมินว่าเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์</p> <p>http://www.orchidspecies.com/papharmeniicum.htm</p>	 <p>https://orchid.unibas.ch/index.php/en/specimen/en/160708/Paphiopedilum/armeniicum</p>

2.5 กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ *Emersonianum* ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 2.3 กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ *Emersonianum*

ชื่อสามัญ/วิทยาศาสตร์	ลักษณะทางพฤกษศาสตร์	รูปร่างลักษณะดอก
1. รองเท้านารีอีเมอโซนีโอ (<i>P. emersonii</i> Koop. & P. J.)	พบในปี 1986 เป็นกล้วยไม้ขนาดเล็กหายาก พบได้ในจังหวัดยูนนาน (จีน) และทางตอนเหนือในประเทศไทยเวียดนาม เจริญเติบโตบนเนินเขาสูงชันหรือหน้าผาสูง ใบด้านบนมีสีเขียวมันวาว ด้านล่างมีสีเขียวเข้ม ออกดอกเดี่ยว มีสีขาว ขนาดกว้าง 10 เซนติเมตร ปัจจุบันมีแนวโน้มลดลง จึงจัดเป็นกล้วยไม้ที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ http://orchids.wikia.com/wiki/Paphiopedilum_emersonii	 https://orchid.unibas.ch/index.php/en/specimen/en/1016391/Paphiopedilum/emersonii/Koopowitz_Harold_Cribb_Phillip_James
2. รองเท้านารีฮานเกียนุม (<i>P. hangianum</i> Perner & Gruss)	พบในปี 1999 บริเวณพรหมแดนประเทศจีน และตอนเหนือของประเทศไทยเวียดนาม เจริญเติบโตได้ในป่าที่เขียวชอุ่มตลอดปี หรือหน้าผาหินสูง ใบสีเขียวเงา เรียงตัวเป็นลักษณะเรียงสลับระนาบเดียว ดอกมีสีเขียวสว่าง เป็นดอกเดี่ยวกว้าง 3.5 ถึง 4.75 นิ้ว เป็นกล้วยไม้ท้องถิ่นหายาก และมีแนวโน้มว่าจะลดลง จึงจัดเป็นกล้วยไม้ที่เสี่ยงขั้นวิกฤติต่อการสูญพันธุ์ http://www.orchidspecies.com/paphhangianum.htm	 http://www.orchidspecies.com/paphhangianum.htm

2.6 เครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงใดช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ถึงความแตกต่างหรือความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต และสามารถถ่ายทอดลักษณะนั้น ๆ ไปยังรุ่นลูกได้ (สุริพร, 2546) มีตำแหน่งบนโครโมโซมในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือในออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) ดีเอ็นเอสามารถใช้เป็นเครื่องหมายบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ เนื่องจากมีความผันแปร (variation) ของลำดับนิวคลีโอไทด์หรือการเกิดความหลากหลาย (polymorphisms) (สุรินทร์, 2552)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้เทคนิคไฮบริไดเซชันเป็นพื้นฐาน (hybridization-based DNA fingerprinting) เป็นการนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แล้วแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ถ่ายดีเอ็นเอลงสู่แผ่นฟิลเตอร์ (filter membrane) แล้วไฮบริไดซ์กับโพรบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีหรือสารฟลูออโรโครม ตรวจสอบผลที่เกิดขึ้นจะปรากฏแถบดีเอ็นเอหลายแถบ โดยความแตกต่างจะขึ้นกับชนิดของโพรบว่าเป็นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะซึ่งจะใช้สำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายเพียงตำแหน่งเดียวหรือโพรบที่มีลักษณะเป็นชุดซ้ำที่ใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมกันมากคืออาร์เอฟแอลพี (RFLP, restriction fragment length polymorphism) (สุริพร, 2546; สุรินทร์, 2552)

2. เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นพื้นฐาน (PCR-based DNA fingerprinting) มีทั้งแบบที่ตรวจสอบได้ครั้งละหลายตำแหน่งพร้อมกันหรือเพียงตำแหน่งเดียวขึ้นกับไพรเมอร์ที่ใช้ จะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่จำเพาะกับช่วงของดีเอ็นเอ โดยต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์ แล้วจึงใช้ไพรเมอร์นั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีข้อดีคือ ทำได้ง่ายและรวดเร็ว และสามารถนำมาใช้ได้ดีกับตัวอย่างที่มีมาก ๆ (สุรินทร์, 2552) ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) (William *et al.*, 1990) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphism) (Vos *et al.*, 1995) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) และเครื่องหมายเอสเอสอาร์ (SSR, simple sequence repeat) (Brown *et al.*, 1996, Powell *et al.*, 1996) เป็นต้น (สุริพร, 2546)

2.7 เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในงานวิจัย

2.7.1 เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี

เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA) เป็นการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ด้วยการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ขนาด 8-12 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันหรือพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) (Williams *et al.*, 1990; สุรินทร์, 2552) เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีเป็นเครื่องหมายที่ปรับปรุงมาจากเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในขั้นตอน annealing จาก 35-38 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่สูงขึ้นคือ 46-62 องศาเซลเซียส ทำให้มีความละเอียดและให้ความหลากหลายมากขึ้น (Chundet *et al.*, 2007; Anuntalabhochai *et al.*, 2000)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์แบบสุ่มจะเกิดขึ้นเมื่อตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเออยู่นั้นอยู่ห่างกันไม่มาก และเกาะในทิศทางตรงข้ามกันแบบหันปลาย 3' เข้าหากัน จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างไพรเมอร์ทั้งสอง แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส และตรวจสอบโดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ในทางปฏิบัติต้องทดลองใช้ไพรเมอร์หลาย ๆ ชนิด เพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และนำมาตรวจสอบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันย่อมมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน และสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันมากจะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายคลึงกัน

เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีมีข้อดี คือ ง่าย สะดวก รวดเร็ว ด้วยการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย และสามารถให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแต่ละพันธุ์ (วรสิรา และคณะ, 2557; สุรินทร์, 2552) อีกทั้งเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีมีประสิทธิภาพในการจำแนกพืชที่มีความคล้ายคลึงกันมาก ๆ ได้ ปัจจุบันมีการนำเอาเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีมาใช้ในการตรวจสอบความสัมพันธ์และการระบุพันธุ์ ได้แก่ พยาธิใบไม้ และพยาธิใบไม้ลำไส้ เป็นต้น (Butboonchoo and Wongsawad, 2015; Puttalakshamma *et al.*, 2014)

ปัจจุบันตลาดมีความต้องการกล้วยไม้ที่มีความหลากหลายมากขึ้น จึงมีการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้อย่างแพร่หลาย ซึ่งในการปรับปรุงพันธุ์ทำให้มีพันธุ์ลูกผสมมากมาย ส่งผลให้จำแนกด้วยลักษณะทางสัณฐานระหว่างพันธุ์แท้กับพันธุ์ลูกผสมได้ยาก จึงนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้จำแนกชนิดและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ เช่น นฤมล และคณะ (2014) จำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลกุหลาบ 15 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี พบไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 24 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจน และนำมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลกุหลาบแต่ละ

พันธุ์ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ออกจากกันได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์ นฤมล และคณะ (2014) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย 15 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายแอสตอร์เอพิดี พบไพรเมอร์ 24 ชนิดที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจน เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์พบว่าสามารถแบ่งกล้วยไม้ออกเป็น 7 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะสัณฐาน แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายแอสตอร์เอพิดีสามารถระบุชนิดของพืชได้ และสามารถใช่วางแผนการผสมพันธุ์เพื่อพัฒนาพันธุ์ใหม่ได้

ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายแอสตอร์เอพิดีมาใช้กับพืชหลากหลายชนิด นฤมล และคณะ (2555) ใช้เครื่องหมายแอสตอร์เอพิดีในการจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 31 ชนิด สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ด้วยแถบดีเอ็นเอจำเพาะ และแผนภูมิความสัมพันธ์สามารถแยกข้าวพันธุ์อยุธยา 1 ออกจากข้าวพันธุ์อื่นได้ โดยสอดคล้องกับลักษณะประจำพันธุ์ข้าวบางประการของข้าว Raktin และคณะ (2007) ศึกษาความหลากหลายของต้นแก่นตะวัน ที่รวบรวมจากประเทศเยอรมัน สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส รัสเซีย และแคนาดาด้วยเครื่องหมายแอสตอร์เอพิดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มทั้งหมด 4 ชนิด ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน พบว่าไพรเมอร์ที่คัดเลือกมานี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อสายพันธุ์ของแก่นตะวัน ซึ่งสามารถนำเอาผลการวิจัยที่ได้นี้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้อีกด้วย

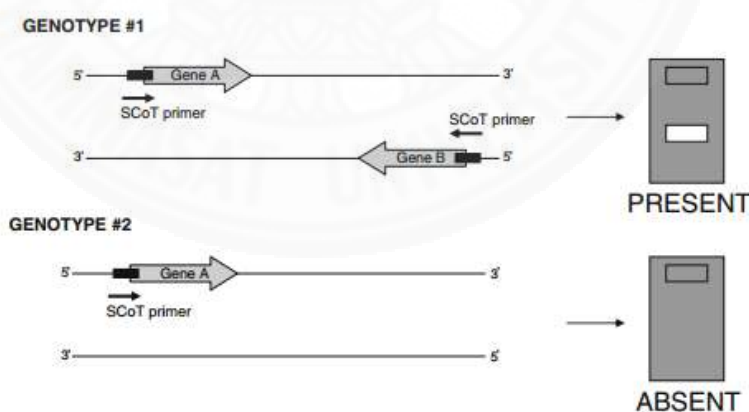
ต่อมาได้มีการประยุกต์ใช้เครื่องหมายแอสตอร์เอพิดีร่วมกับเครื่องหมายอื่น เช่น Thimmappaiah และคณะ (2009) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วงหิมพานต์ด้วยเครื่องหมายแอสตอร์เอพิดีและเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ เมื่อนำข้อมูลจากทั้งสองเครื่องหมายมาวิเคราะห์ร่วมกันพบว่ามีประสิทธิภาพในการจำแนกมะม่วงหิมพานต์มากขึ้น เช่นเดียวกับเกียรติชัย และคณะ (2557) ที่จำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตา หมูสิงโตสยามด้วยเครื่องหมายแอสตอร์เอพิดี และเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ พบว่าเครื่องหมายแอสตอร์เอพิดีให้ผลที่น่าเชื่อถือมากกว่าเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ในการจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสี (จาตุรงค์ และคณะ, 2557)

2.7.2 เครื่องหมายสก็อต

เครื่องหมายสก็อต (SCoT, start-codon targeted) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาโดย Collard และ Mackill (2009) ด้วยการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีลำดับเบสที่ขนาบข้างรหัสเริ่มการแปลรหัส (Start codon; AUG) ตำแหน่งของ AUG อาจอยู่ในตำแหน่ง +1 +2 หรือ +3 ส่วนปลาย 3' จะมีลำดับเบสที่แตกต่างกันออกไป มีขนาด 18-24 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) เพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน ซึ่งเครื่องหมายสก๊อตเป็นเครื่องหมายที่มีข้อดีเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายชนิดอื่นคือ เป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพ ง่าย รวดเร็ว และราคาถูกมากกว่าเครื่องหมายชนิดอื่น อีกทั้งยังสามารถทำซ้ำได้ผลเหมือนเดิม และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง (Wu *et al.*, 2013) หลักการของเครื่องหมายสก๊อตจะเหมือนกับเครื่องหมายอาร์เอพีดี คือใช้ไพรเมอร์เพียง 1 ชนิด ที่เป็นทั้ง forward และ reverse ซึ่งจะต่างกันที่ไพรเมอร์จะมีเป้าหมายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ATG ของดีเอ็นเอทั้ง 2 สาย ดังภาพที่ 2.1 ซึ่งไพรเมอร์ที่ออกแบบมานั้นจะสามารถจับได้กับดีเอ็นเอแม่แบบในบริเวณของยีน ยีนเทียม (pseudogenes) และ ทรานสโพซอน (transposon) ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายเกิดขึ้น (Collard and Mackill, 2009)

ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing สูงกว่า 55 องศาเซลเซียส จะทำให้จำนวนของแถบดีเอ็นเอนั้นลดลง อุณหภูมิที่เหมาะสมจึงอยู่ในช่วงประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เลือกมาใช้เนื่องจากทำซ้ำแล้วได้แถบดีเอ็นเอเหมือนเดิม แมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride; $MgCl_2$) เป็นโคแฟกเตอร์ (cofactor) ที่สำคัญสำหรับ *Taq* DNA Polymerase และการจับกันของดีเอ็นเอแม่แบบและไพรเมอร์ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ 1.5 มิลลิโมล เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะลดโอกาสการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะลง (Collard and Mackill, 2009)



ภาพที่ 2.1 แสดงผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันที่ได้จากเครื่องหมายสก๊อต (Collard and Mackill, 2009)

เนื่องจากเครื่องหมายสก็อตเป็นเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นโดย Collard และ Mackill ในปี 2009 ซึ่งจัดเป็นเครื่องหมายที่ใหม่ จึงได้นำเอาเครื่องหมายสก็อตมาใช้จำแนกกล้วยไม้แต่ละชนิด และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ เช่น Bhattacharyya และคณะ (2013) ได้ประยุกต์ใช้เครื่องหมายสก็อตในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเอื้องเก้าแก้ว (*Dendrobium nobile* Lindl.) ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่สำคัญในทางการแพทย์ที่ใกล้สูญพันธุ์ในอินเดีย พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นจำนวน 132 แถบ สามารถคำนวณหาความหลากหลายในกลุ่มประชากรเท่ากับ 0.57 จากนั้นนำข้อมูลจากจีโนมไทป์จากการเครื่องหมายสก็อตมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนระดับโมเลกุล (analysis of molecular variance ; AMOVA) พบว่ามีความแปรปรวนเกิดขึ้นภายในประชากรกล้วยไม้เท่ากับ 43.37 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้เป็นเพียงจุดเริ่มต้นในการวิจัยในอนาคตเกี่ยวกับวิวัฒนาการของกล้วยไม้ที่มีความสำคัญทางยาที่ใกล้สูญพันธุ์นี้ ต่อมาได้มีการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายในประเทศจีนด้วยเครื่องหมายสก็อตและเครื่องหมายทีอาร์เอพี (target region amplification polymorphism, TRAP) เพื่อใช้ประโยชน์สำหรับการใช้งานและอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลหวาย พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากเครื่องหมาย สก็อตและเครื่องหมายทีอาร์เอพี พบแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายจำนวน 324 และ 500 แถบ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์จากทั้ง 2 เครื่องหมาย ให้ผลที่ไปในแนวทางเดียวกัน ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพสามารถทำซ้ำได้ และเป็นเครื่องหมายที่มีประโยชน์สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย (Feng *et al.*, 2015)

นอกจากกล้วยไม้แล้วยังมีพืชอีกหลายชนิดที่นำมาศึกษาด้วยเครื่องหมายสก็อต เช่น Luo และคณะ (2010) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างมะม่วงในประเทศจีนโดยใช้เครื่องหมายสก็อต เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการบริหารแหล่งรวบรวมพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์พืช คัดเลือกไพรเมอร์ได้ 33 ชนิด ให้แถบแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายจำนวน 208 แถบ มีค่าดัชนีความเหมือน 0.531 ถึง 0.923 แผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้สามารถจำแนกมะม่วงออกจากกันได้ สรุปว่าเครื่องหมายสก็อตเป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพ ค่าใช้จ่ายน้อย Guo และคณะ (2012) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการขององุ่น (*Vitis vinifera* L.) ด้วยเครื่องหมายสก็อต คัดเลือกไพรเมอร์ได้ 17 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ให้แถบดีเอ็นเอ 131 แถบ จากนั้นวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถจำแนกองุ่นออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 27 พันธุ์ ซึ่งเป็นพันธุ์เก่าแก่ของประเทศจีนทั้งสิ้น กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 8 พันธุ์ ที่เป็นพันธุ์ลูกผสมยุโรปอเมริกัน กลุ่มที่ 3 จะประกอบด้วยองุ่นสำหรับทำไวน์ และ กลุ่มที่ 4 จะเป็นองุ่นพันธุ์ป่าทั้งที่มีกำเนิดในประเทศจีน และ

ประเทศอื่น ซึ่งการจัดกลุ่มมีความสอดคล้องกับการวิเคราะห์พีซีเอ (Principal coordinate analysis; PCA) ที่แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มเช่นเดียวกัน

ต่อมาได้มีการใช้เครื่องหมายสก็อตร่วมกับเครื่องหมายอื่นเพื่อเพิ่มความแม่นยำมากขึ้น ตัวอย่างเช่น Chen และ Liu (2014) ใช้เครื่องหมายสก็อตร่วมกับเครื่องหมายไอพีบีเอส (inter-primer binding site, iPBS) เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ของหยางเหมย เมื่อนำทั้ง 2 เครื่องหมายมาวิเคราะห์ร่วมกันพบว่าสามารถจำแนกหยางเหมยออกเป็น 3 กลุ่ม สอดคล้องกับลักษณะสัญญาณวิทยาของหยางเหมย แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายที่ทำการวิจัยมีประสิทธิภาพในการจำแนกหยางเหมย การศึกษาความหลากหลายของมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ด้วยเครื่องหมายสก็อตและเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (inter-simple sequence repeat, ISSR) พบว่าเครื่องหมายสก็อตสามารถจัดกลุ่มมะเขือเทศได้ 3 กลุ่ม ขณะที่เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สามารถจัดกลุ่มมะเขือเทศได้ 2 กลุ่ม ซึ่งสรุปได้ว่าการใช้ทั้ง 2 เครื่องหมาย ยังคงมีไพรเมอร์บางชนิดที่ไม่มีแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายซึ่งไม่เหมาะสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Shahlaei *et al.*, 2014) แต่มีหลายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายสก็อตมีประสิทธิภาพมากกว่าเครื่องหมายอื่น เช่น การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายสก็อต เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ และเครื่องหมายอาร์เอพีดีในมันฝรั่ง พบว่าเครื่องหมายสก็อตเป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกมากกว่าเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ (Gorji *et al.*, 2011) และการประเมินความหลากหลายในถั่วลูกไก่ด้วยเครื่องหมายสก็อต เครื่องหมายดีเอเอ็มดีพีซีอาร์ (directed amplification of minisatellite-region DNA polymerase chain reaction, DAMD-PCR) และเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ พบว่าเครื่องหมายสก็อตมีประสิทธิภาพในการจำแนกถั่ว คือเครื่องหมายสก็อต (Amirmoradi *et al.*, 2012)

ในประเทศไทยได้มีการนำเอาเครื่องหมายสก็อตมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของต้นรักแกนมอ (*Rhus succedanea* L.) พบไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 5 ชนิด สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายทั้งหมด 34 แถบ มีค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (Heterozygosity, H) อยู่ในช่วง 0.21 ถึง 0.39 และมีค่าพีไอซี (PIC) อยู่ในช่วง 0.299 ถึง 0.375 เมื่อจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ในช่วง 0.130 ถึง 0.923 สามารถจำแนกต้นรักแกนมอออกเป็น 10 กลุ่ม สรุปได้ว่าเครื่องหมายสก็อตสามารถตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของต้นรักแกนมอได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการวางแผนการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมและปลูกสร้างสวนป่าของต้นรักแกนมอต่อไป (กรองทอง และคณะ, 2014)

2.7.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ

ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นข้อมูลที่กำหนดลักษณะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกันมากกว่าสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน ซึ่งความคล้ายคลึงและความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ยังเชื่อมโยงกับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ อีกด้วย จึงได้มีการนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณของยีนต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้เพื่อระบุและจำแนกสิ่งมีชีวิต (Taberlet *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2015) การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือที่เรียกว่า “DNA barcode” มาช่วยในการระบุชนิดสิ่งมีชีวิตชั้นสูง มีประโยชน์มากต่อการระบุสิ่งมีชีวิตที่มีความซับซ้อน ที่ยากต่อการระบุพันธุ์ด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา อีกทั้งยังมีประโยชน์ในการศึกษาค้นคว้างานวิจัยต่าง ๆ การปรับปรุงพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต และการอนุรักษ์พันธุ์เพื่อความหลากหลายทางชีวภาพ ต่อมาในปี ค.ศ. 2003 ได้เกิดโครงการ The Barcode of life ขึ้นซึ่งมีจุดมุ่งหมายในการสร้างเครื่องมือที่เป็นสากลในการระบุสิ่งมีชีวิตพวุกยูคาริโอต โดยใช้หลักการทางชีววิทยาระดับโมเลกุล และได้รับการสนับสนุนจากหน่วยงานนานาชาติที่มีชื่อว่า Consortium for the Barcode of Life (CBOL) ในปี ค.ศ. 2004 อีกด้วย (พรณรงค์ และอรุณรัตน์ , 2554)

การศึกษารหัสแท่งดีเอ็นเอ (DNA barcode) ในสัตว์นั้นเริ่มจากการใช้บริเวณดีเอ็นเอของยีน Cytochrome c oxidase I (*COI*) ในไมโทคอนเดรียของหนู ซึ่งประสบความสำเร็จอย่างมาก โดยพบว่าบริเวณของยีน *COI* มีอัตราการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสมากในกลุ่มสัตว์ *COI* เป็น ซึ่งจัดเป็นบริเวณที่เหมาะสมและได้รับการยอมรับมากที่สุดสำหรับการสร้าง DNA barcode ของสัตว์ เพราะนอกจากจะมีความแปรผันของลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงพอที่จะใช้แยกและระบุชนิดสัตว์ได้แล้วการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนนี้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) ทำได้ค่อนข้างง่าย เนื่องจากยีนนี้มีขนาดไม่ใหญ่มากนัก (โดยเฉลี่ย 600-700 คู่เบส) (วุฒิพงศ์, 2011) อีกทั้งจีโนมไมโทคอนเดรียในสัตว์มีความหลากหลายสูง หลังจากนั้นจึงพยายามที่จะใช้รหัสแท่งดีเอ็นเอมาจำแนกสิ่งมีชีวิตจำพวกพืช แต่จากการวิจัยพบว่ายีน *COI* ในไมโทคอนเดรียของพืชมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการต่ำ (Folmer *et al.*, 1994; Hebert *et al.*, 2003 Kress *et al.* 2005; พรณรงค์ และอรุณรัตน์ , 2554) ต่อมาเริ่มมีการศึกษาในพืชมากขึ้น บริเวณของยีนในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอเป็นวงกลม ขนาดและโครงสร้างมีความคงที่สูง อีกทั้งมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการที่สูง จึงเป็นบริเวณที่น่าสนใจ (ณัฐกานต์, 2557) โดยบริเวณของยีนในคลอโรพลาสต์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในพืช ได้แก่ บริเวณของยีนจำนวน 4 ตำแหน่ง คือ *rpoB*, *rpoC1*, *rbcL* และ *matK* ขึ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีนจำนวน 3 ตำแหน่ง คือ *atpF* กับ *atpH*, *psbK* กับ *psbI* และ *trnH* กับ *psbA* ซึ่งเป็นบริเวณที่กำหนดโดยหน่วยงาน Consortium for the Barcode of Life (CBOL) (Hollingsworth *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2015) นอกจากบริเวณของยีนในคลอโรพลาสต์แล้ว ยังมีบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ในไรโบโซมที่สามารถ

ใช้ได้กับพืชหลากหลายกลุ่ม (Kress *et al.* 2005) จากนั้นมีการใช้รหัสแท่งดีเอ็นเอมาจำแนกสิ่งมีชีวิตจำพวกพืชกันอย่างแพร่หลาย

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ใช้ยีนในคลอโรพลาสต์มาใช้ในการศึกษา ได้แก่ *rbcl*, *rpoC1*, *matK* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

ยีน *rbcl* เป็นยีนที่ไม่มีอินทรอน (intron) มีขนาดประมาณ 1,400 คู่เบส ส่วนในพืชมีหลากหลายขนาด (นฤมล, 2557) ยีน *rbcl* เป็นยีนที่ลอกรหัส (transcription) และแปลรหัส (translation) ได้เป็นโปรตีนที่เป็นหน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) ของเอนไซม์ ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) ซึ่งทำหน้าที่ในการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Wolfe and dePamphilis, 1998) CBOL Plant Working Group (2009) กล่าวว่ายีน *rbcl* มีความเหมาะสมในการใช้เป็นบริเวณสากลมากที่สุด แม้ว่าประสิทธิภาพในการนำไปใช้แยกและระบุชนิดพืชจะค่อนข้างต่ำแต่เมื่อใช้ร่วมกับบริเวณอื่น เช่น *matK* จะให้ผลการแยกและระบุชนิดพืชได้ดีขึ้น ซึ่งยีน *rbcl* มีความสามารถในการจำแนกพืชระดับวงศ์หรือเหนือกว่าระดับวงศ์ได้ดีที่สุด และสามารถใช้ในระดับสกุลในพืชบางชนิดได้ (Gielly and Taberlet, 2016)

ยีน *rpoC1* เป็นยีนที่แปลรหัสได้เป็น β' subunit จัดเป็นพอลิเพปไทด์ (polypeptide) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์อาร์เอ็นเอพอลิเมอเรส (RNA polymerase) (Serino and Maliga, 1998)

ยีน *matK* มีขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส อยู่ระหว่าง *trnK* intron ซึ่งยีน *matK* เป็นยีนที่แปลรหัสได้เป็นเอนไซม์ maturase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้าง RNA ในขั้นตอนของการ splicing ยีน *matK* นี้มีอัตราการวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง มีอัตราการแทนที่เบสสูง มีการขาดหาย และเพิ่มขึ้นของชิ้นดีเอ็นเอ จึงมีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกและหาวิวัฒนาการของพืชได้ (Hilu *et al.*, 2003; Selvaraj *et al.*, 2008) Guo และคณะ (2015) แนะนำให้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* วิเคราะห์ร่วมกับบริเวณอื่น ๆ จะทำให้การจำแนกพืชมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* โดยยีน *trnH* เป็นบริเวณที่ถอดรหัสได้เป็น tRNA^{his} (GUG) ซึ่งจะจับกับกรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine, H) นำไปสู่การต่อสายพอลิเพปไทด์ (polypeptide) ในขั้นตอนการแปลรหัส (translation) ส่วนยีน *psbA* (photosystem II protein D1) เป็นยีนที่แปลรหัสได้เป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ photosystem II ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสงของพืช ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* เป็นบริเวณที่นิยมนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความผันแปรของลำดับเบสสูง อีกทั้งยังมีการขาดหาย และการเพิ่มเข้ามาของลำดับเบส ซึ่งเพียงพอที่จะนำมาใช้แยกและระบุชนิดของพืชได้ดี (Kress

et al., 2005; Kress and Erickson, 2007) อีกทั้งซันตีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* เป็นบริเวณที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ได้ดีที่สุด (CBOL Plant Working Group, 2009; Pang *et al.*, 2012)

ข้อดีของลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ คือเป็นวิธีที่ง่ายไม่ซับซ้อนทำได้โดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับสากล มีฐานข้อมูลและมีการร่วมมือกันขององค์กรระดับโลก จึงมีมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับทั่วโลก สามารถทำซ้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวก และรวดเร็ว (นฤมล และคณะ, 2558) จึงทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะเป็นที่น่าสนใจอย่างมากทางด้านการจำแนกชนิดของพืช โดยดีเอ็นเอบริเวณที่เหมาะสมสำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะของพืชนั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัด บริเวณที่เหมาะสมควรมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง ซึ่งในพืชแต่ละชนิดก็จะมีบริเวณที่เหมาะสมแตกต่างกันไป

ณัฐกานต์ และคณะ (2557) พบปัญหาการจัดจำแนกพืชวงศ์บัวสายจึงแก้ไขปัญหาโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *trnK* ร่วมกับยีน *matK* และซันตีเอ็นเอระหว่างยีน *trnL* กับ *trnF* ในคลอโรพลาสต์ พบว่าซันตีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnL* กับ *trnF* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ผันแปรตั้งแต่ 990-1090 คู่เบส ขนาดที่แตกต่างกันนี้เกิดจากการเพิ่มหรือขาดหายไปของซันตีเอ็นเอ ขณะที่บริเวณยีน *trnK* ร่วมกับยีน *matK* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ผันแปรตั้งแต่ 1180-1210 คู่เบส ขนาดที่แตกต่างกันเกิดจากการเพิ่มหรือการหายไปของซันตีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเบสซ้ำตั้งแต่ 1-6 คู่เบส และในบริเวณยีน *matK* นั้นพบการเปลี่ยนแปลงของเบสตำแหน่งของโคดอน (codon) ที่ 2 และ 3 ในหลายตำแหน่ง ซึ่งยีนนี้มีความแปรผันได้รวดเร็วมากกว่ายีน *rbcl* และ *atpB* จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Hilu and Liang, 1997; Guo *et al.*, 2015) เมื่อนำยีน *matK* มาวิเคราะห์ร่วมกับดีเอ็นเอบริเวณอื่น จะพบว่ามีประสิทธิภาพมากขึ้น (Hilu *et al.*, 2003) และทางด้านหน่วยงาน CBOL ได้แนะนำให้วิเคราะห์โดยใช้หลายบริเวณร่วมกันในพืชเนื่องจากมีประสิทธิภาพมากกว่า (CBOL Plant Working Group 2009; Kress *et al.* 2005) โดย Kress และ Erickson (2007) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณซันตีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ร่วมกับยีน *rbcl-a*, *rpoB2* หรือ *rpoC1* พบว่ามีความสามารถในการจำแนกพืชบกได้มากมาย ได้แก่ พืชเมล็ดอยู่ในผล หรือเมล็ดมีรังไข่ห่อหุ้ม (angiosperm) พืชเมล็ดเปลือย (gymnosperm) เฟิร์น (fern) มอส (moss) และลิเวอร์เวิร์ต (liverworts) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นต้น

มีการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะมีประยุกต์ใช้ในการจำแนกกล้วยไม้มากมาย ได้แก่ Lin และคณะ (2015) ระบุและจำแนกพันธุ์กล้วยไม้ในสกุลฟาแลนนอปซิสโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ พบว่าซันตีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *rps16* กับ *trnQ* เป็นบริเวณที่

ดีที่สุดที่สามารถจำแนกกล้วยไม้ 15 พันธุ์ จัดเป็นบริเวณที่มีความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุด และพบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *petN* กับ *psbM* เป็นบริเวณที่สามารถจำแนก *Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana* และ *P. amabilis* ได้ ซึ่งจัดเป็นพันธุ์ที่มักจะขึ้นทะเบียนพันธุ์ไม่ถูกต้อง โดยพบตำแหน่ง minisatellites จำนวน 2 ตำแหน่ง ขนาด 18-19 คู่เบส

Guo และคณะ (2015) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ในการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี พบว่ายีน ITS มีประสิทธิภาพในการระบุพันธุ์ได้อย่างถูกต้องมากที่สุด รองลงมาเป็นยีน *rpoC2* ยีน *matK* เป็นยีนที่มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง และเป็นบริเวณที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ดังนั้นผู้วิจัยจึงแนะนำให้ใช้บริเวณของยีน *matK* ในการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *atpF* กับ *atpH* เป็นบริเวณที่มีประสิทธิภาพเช่นกัน และพบว่าเมื่อนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* วิเคราะห์ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *atpF* กับ *atpH* และ ITS จะมีประสิทธิภาพมากขึ้น

Kim และคณะ (2015) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC2* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *atpF* กับ *atpH* ในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Cypripedium* โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *atpF* กับ *atpH* เป็นบริเวณที่สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Cypripedium* ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ๆ ได้

Hu และคณะ (2016) พบว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ (ชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnL* กับ *trnF* และยีน *matK*) สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลชาวละออ (*Goodyera*) ได้ดีกว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมในนิวเคลียส (ITS) และเมื่อนำทั้ง 3 บริเวณมาวิเคราะห์ร่วมกันแล้วพบว่าสามารถจำแนกกล้วยไม้ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ๆ ได้อีกด้วย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับงานวิจัย ได้แก่ (1) ชูตโกร่งบดตัวอย่าง (mortar และ pestle) (2) เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (high speed refrigerated centrifuge) (3) เครื่องปรับอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath) (4) เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งไฟฟ้า (electric balance) (5) เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter) (6) เครื่องผสม (vortex mixer) (7) เครื่องทำความเย็น (freezer) ได้แก่ ตู้เย็น -20 และ 4 องศาเซลเซียส (8) หม้อนึ่งความดัน (autoclave) (9) ตู้อบแห้ง (hot air oven) (10) เตาไมโครเวฟ (microwave) (11) เครื่อง วัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (12) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Perkin Elmer; Gene Amp PCR system 2400) (13) เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply; BIO-RAD, U.S.A.) (14) ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis set) (15) เครื่อง Gel documentation (16) ตู้ดูดควัน (17) เครื่องทำความสะอาดด้วยแรงสั่น (Sonicator) (18) ปิเปตอัตโนมัติ (automatic pipettes) (19) ทิปขนาดต่าง ๆ (20) หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิลิตร และ (21) กระจกบดทวง (cylinder)

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

สารที่ใช้สำหรับงานวิจัย ได้แก่ (1) ซีทิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ (cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB) (2) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ (3) โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ (sodium metabisulfite) (4) โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) (5) ไอโซโพรพานอล (isopropanol) (6) โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) pH 5.2 ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (7) พอลิไวนิลไพโรลิโดน (Polyvinyl pyrrolidone, PVP) (8) คลอโรฟอร์ม (chloroform) (9) ฟีนอล (phenol) (10) เอทิลีนไดอะมีนเตตราอะซิติก (ethylene diamine tetra acetic acid, EDTA) pH 8.0 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (11) ทริสคลอไรด์ (Tris-HCl) pH 8.0 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (12) ทริสเบส (Tris base) (13) กรดกลacial acetic acid (14) ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol) (15) เอทานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol) (16) เบต้าเมอแคปโทเอทานอล (β -mercaptoethanol) (17) ลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ (linear polyacrylamide) (18) เอนไซม์ RNase A (19) สารละลายบัฟเฟอร์ TE ความเข้มข้น 10 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรและ (20) น้ำกลั่น (distilled water)

3.2.2 สารเคมีสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

สารที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ได้แก่ (1) ดีเอ็นเอแม่แบบ ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (2) เอนไซม์ *Taq* DNA polymerases (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร (3) สารละลายบัฟเฟอร์ A ความเข้มข้น 10 เท่า (4) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (5) dNTPs (deoxyribonucleotide triphosphate) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และ (6) Double distilled water (ddH₂O)

3.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

สารที่ใช้ในการวิเคราะห์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้แก่ (1) เจลอะกาโรส (agarose gel) (2) สารละลายบัฟเฟอร์ TAE ความเข้มข้น 0.5 เท่า (3) สารละลายบัฟเฟอร์ DNA loading ความเข้มข้น 6 เท่า (4) สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และ (5) เอธิเดียมโบรมไนด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 กล้วยไม้ที่ใช้ในงานวิจัย

กล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบลายที่ใช้ในงานวิจัยมีทั้งหมด 22 พันธุ์ แบ่งเป็น กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ ดังตารางที่ 3.1 กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ *Parvisepalum* 6 พันธุ์ ดังตารางที่ 3.2 และกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ *Emersonianum* 2 พันธุ์ ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.1 กล้ายไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่
Brachypetalum

ลำดับที่	กล้ายไม้สกุลรองเท้านารี	ชื่อวิทยาศาสตร์
1	รองเท้านารีฝ้าย	<i>P. bellatulum</i> (Rchb.f) Stein
2	รองเท้านารีเหลืองปราจีน	<i>P. concolor</i> subsp. <i>reynieri</i>
3	รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม	<i>P. concolor</i> var. <i>Tonkinense</i>
4	รองเท้านารีเหลืองกาญจน์	<i>P. concolor</i> var. <i>Concolor</i>
5	รองเท้านารีเหลืองอุดร	<i>P. concolor</i> subsp. <i>hennisianum</i>
6	รองเท้านารีเหลืองสิงขร	<i>P. concolor</i> var. <i>Longipetalum</i>
7	รองเท้านารีเหลืองตรัง	<i>P. godefroyae</i> (God.-Leb.) Stein
8	รองเท้านารีเหลืองพังงา	<i>P. godefroyae</i> var. <i>Leucochilum</i> (yellow)
9	รองเท้านารีขาวชุมพร	<i>P. godefroyae</i> var. <i>Leucochilum</i> (white)
10	รองเท้านารีช่องอ่างทอง	<i>P. godefroyae</i> var. <i>Ang-thong</i>
11	รองเท้านารีขาวสตูล	<i>P. niveum</i> (Rchb.f) Stein
12	รองเท้านารีขาวพังงา	<i>P. thaianum</i> lamwir.
13	รองเท้านารีเกรย์	<i>P. Greyi</i>
14	รองเท้านารีเหลืองประจวบ	<i>P. concolor</i> var. <i>Chlorophyllum</i>

ตารางที่ 3.2 กล้ายไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่
Parvisepalum

ลำดับที่	กล้ายไม้สกุลรองเท้านารี	ชื่อวิทยาศาสตร์
1	รองเท้านารีมาลีโปเอนเซ	<i>P. malipoense</i> Chen & Tsi.
2	รองเท้านารีแจ๊คกี้ไอ	<i>P. malipoense</i> var. <i>jackii</i> (Hua) Averyanov
3	รองเท้านารีไมแคเรนทุม	<i>P. micranthum</i> Tang & Wang
4	รองเท้านารีเวียดนามเอนเซ	<i>P. vietnamense</i> O. Gruss & Perner
5	รองเท้านารีเดเลนแนตีไอ	<i>P. delenatii</i> Guillaumin
6	รองเท้านารีอาร์เมเนียคุม	<i>P. armeniacum</i> S.C. Chen & F.Y. Liu

ตารางที่ 3.3 กล้ายไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่
Emersonianum

ลำดับที่	กล้ายไม้สกุลรองเท้านารี	ชื่อวิทยาศาสตร์
1	รองเท้านารีอีเมอร์โซนิโอ	<i>P. emersonii</i> Koop. & P.J. Cribb
2	รองเท้านารีฮานเกียนุม	<i>P. hangianum</i> Perner & Oruss

3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากกล้ายไม้

สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) โดยเริ่มจากชั่งใบกล้ายไม้ 3-4 กรัม ใส่ลงในโกร่งบดตัวอย่าง เติมบัฟเฟอร์สกัด (extraction buffer ที่ประกอบด้วย 4 % CTAB 2.5M NaCl 0.6 % SDS 20 mM EDTA pH 8.0 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 0.1 % Sodium metabisulfite) ที่อุ่นไว้ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และเติมพอลิไวนิลไพโรลิโดน (Polyvinyl pyrrolidone, PVP) ปริมาณ 0.3 กรัม บดตัวอย่างให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน เทส่วนผสมทั้งหมดลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมเบต้าเมอแคปโตน (β -mercaptoethanol) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในระหว่างการบ่มทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกลับหลอดไปมาเป็นระยะ ๆ จากนั้นวางไว้ให้เย็นลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol, 24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ แล้วเติมลิเนียร์พอลิอะคริลาไมด์ (linear polyacrylamide) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (เปิดฝาหลอด) ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม RNaseA ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลงสู่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl alcohol, 25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาดูดสารละลายใสส่วนบนลงสู่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ แล้วเติม

คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกับลดไปมาเบา ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใส่ส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติมลิเนียร์พอลิอะครีลาไมด์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ที่ pH 5.2 จำนวน 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกับลดไปมาเบา ๆ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกับลดไปมาเบา ๆ แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ทำให้ตะกอนแห้งด้วยการระเหยเอทานอลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (เปิดฝาหลอด) ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยมวลต่อปริมาตร ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์ จะเข้าไปแทรกในเกลียวคู่ จากนั้นตรวจสอบด้วยเครื่อง Gel documentation ส่งด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตจะเกิดการเรืองแสง โดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอ หากมีการปนเปื้อนอาร์เอ็นเอจะเห็นเป็นปื้นเคลื่อนที่เร็วกว่าดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังสามารถดูการแตกหักของโมเลกุลของดีเอ็นเอได้อีกด้วย จากนั้นตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ทำโดยเจือจางสารละลายดีเอ็นเอ 50 เท่า แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (A_{260} และ A_{280}) ในการหาปริมาณดีเอ็นเอ โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถดูดกลืนแสงที่ A_{260} เท่ากับ 1 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบค่า A_{260} และ A_{280} สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มีค่าอัตราส่วนระหว่าง A_{260} / A_{280} ประมาณ 1.7-1.8 ถ้ามีค่าน้อยกว่า 1.7-1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอลและถ้ามีค่ามากกว่า 1.7-1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ

3.3.4 การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอ

3.3.4.1 การสร้างเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี

เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีมี 2 ขั้นตอน คือ (1) การตรวจหาไพโรเมอร์แบบสุ่มที่ตอบสนองต่อปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยนำดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* จำนวน 14 พันธุ์ มาเจือจางให้

มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นดูดสารละลายดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างที่เจือจางแล้ว ตัวอย่างละเท่า ๆ กันลงสู่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิเมตร หลอดเดียวกัน (Mixed DNA) เพื่อใช้ เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (2) เลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของ กล้วยไม้รองเท้านารีทั้งหมดอีกครั้ง โดยไพรเมอร์ที่ตรวจสอบมีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 6 ชุด ได้แก่ ชุด A2-F2 รวมทั้งหมด 72 ชนิด (Wako Company, Japan) (ตารางที่ 3.4) การเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร มี องค์ประกอบแสดงดังตารางที่ 3.5 และขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรสแสดงดังตารางที่ 3.6 จากนั้นตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ใช้แรงไฟฟ้า 100 โวลต์เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตรวจสอบด้วยเครื่อง gel documentation และถ่ายภาพเก็บไว้ ซึ่งการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์ทำ 3 ซ้ำ ก่อน จะนำไปวิเคราะห์ผล

ตารางที่ 3.4 ไพรเมอร์ชุด A2-F2

ชุด	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')	ชุด	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')
A2	A21	AGAATTGGACGA	B2	B21	AAGCCTATACCA
	A22	GCCTGCCTCACG		B22	GGTGACTGGTGG
	A23	ACTGACCTAGTT		B23	GGTGCCGGAGCA
	A24	CTCCTGCTGTTG		B24	CACACTACTTAT
	A25	CTCAGCGATACG		B25	AGCACTGAATCT
	A26	ACTGAGAAAATA		B26	ATGAGAAAGGAA
	A27	ATCGCGGAATAT		B27	GGCGGTTATGAA
	A28	ATTTGGATAGGG		B28	GTCATTAAAGCT
	A29	GGTTCGGAATG		B29	GCCATCGAAAAA
	A30	GACCTGCGATCT		B30	CTTAGGTTACGT
	A31	AAGGCGGAACG		B31	CACAAGGAACAT
	A32	TTGCCGGGACCA		B32	ATCGCGGCTTAT

ตารางที่ 3.4 (ต่อ)

ชุด	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')	ชุด	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')
C2	C21	GGAGAGCGGACG	D2	D21	GGCGATTCTGCA
	C22	GGTCACCGATCC		D22	TGCCCACTACGG
	C23	CCGTCTTTTCTG		D23	ACCATCAAACGG
	C24	CCTTGGCATCGG		D24	GTGCAATTTGGC
	C25	AGATTCTTACTG		D25	GTTTTGTCACCG
	C26	GCGTTCGAACGA		D26	GATGAGCTAAAA
	C27	GCATTGCAATCG		D27	AGAATGTCCGTA
	C28	GTCGACGCATCA		D28	ACTGAGGGGGGA
	C29	GTCGCCTTACCA		D29	ATCAAGTATCCA
	C30	TATTGGGATTGG		D30	GAGACTACCGAA
	C31	TCTGCTGACCGG		D31	GGAGGTCGACCA
	C32	TCTACACGAAGT		D32	AAGCTGGGGGGA
E2	E21	TGCTTCGTATTA	F2	F21	AACCTTTAGGGC
	E22	GGAATGGAACCG		F22	AAGAGGGTTGAC
	E23	AGGTACGCCGCA		F23	CCATCCGCACGA
	E24	CCGGAGTGGATG		F24	ACTGTTATAACG
	E25	ATCGTTACAGTA		F25	CCAGATCCGAAT
	E26	CTGCCTGTACCA		F26	CTCAGCATTGAT
	E27	CCATTGTCGGTA		F27	CAGGTGGGAGTA
	E28	CGCCCTGCAGTA		F28	CCAAGATCCATT
	E29	GTTATGCAAGGG		F29	GCCGCTAATATG
	E30	TACCTGGTTGAT		F30	ACTTTGCGCCGAA
	E31	GAGGACAGCAA		F31	ATCGTGACCCG
	E32	CAGGAACAGCAA		F32	TTCAACATCGAC

ตารางที่ 3.5 องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของเครื่องหมายแอสตาร์ทเอพีดี

สารที่ใช้	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาณในปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอกล้วยไม้	100 ng/μl	1.000
บัฟเฟอร์	10X	2.000
MgCl ₂	25 mM	2.000
dNTP	2 mM	2.000
ไพรเมอร์	5 μM	1.000
Taq DNA polymerase	5 unit/μl	0.125
ddH ₂ O	-	11.875
รวม	-	20.000

ตารางที่ 3.6 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของเครื่องหมายแอสตาร์ทเอพีดี

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา	หมายเหตุ
Initiation Denaturation	94	3 นาที	-
Denaturation	94	30 วินาที	จำนวน 40 รอบ
Annealing	46	40 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	5 นาที	-

3.3.4.2 การสร้างเครื่องหมายสกัด

เครื่องหมายสกัดมี 2 ขั้นตอน คือ (1) การตรวจหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท่านั้นได้ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยรวมดีเอ็นเออย่างละเท่า ๆ กันของกล้วยไม้รองเท่านั้นสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ทั้ง 14 พันธุ์ ลงสู่หลอดเดียวกันเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (2) เลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจน มาตรวจสอบกับดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท่านั้นทั้งหมดอีกครั้ง โดยไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาด 18 นิวคลีโอไทด์

จำนวน 80 ชนิด ได้แก่ ไพรเมอร์ SCoT1 ถึง SCoT46 อ้างอิงจากงานวิจัยของ Wu และคณะ (2013) และไพรเมอร์ SCoT47 ถึง SCoT80 อ้างอิงจากงานวิจัยของ Luo และคณะ (2010) ซึ่งไพรเมอร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังตารางที่ 3.7 จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันรวม 20 ไมโครลิตรซึ่งมีองค์ประกอบแสดงดังตารางที่ 3.8 และขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันแสดงดังตารางที่ 3.9 จากนั้นตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ใช้แรงไฟฟ้า 100 โวลต์เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตรวจสอบด้วยเครื่อง gel documentation และถ่ายภาพเก็บไว้ ซึ่งการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์ทำ 3 ซ้ำ ก่อนจะนำไปวิเคราะห์ผล

ตารางที่ 3.7 ไพรเมอร์ SCoT1-SCoT80

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')
SCoT1	CAACAATGGCTACCACCA	SCoT17	ACCATGGCTACCACCGAG
SCoT2	CAACAATGGCTACCACCC	SCoT18	ACCATGGCTACCACCGCC
SCoT3	CAACAATGGCTACCACCG	SCoT19	ACCATGGCTACCACCGGC
SCoT4	CAACAATGGCTACCACCT	SCoT20	ACCATGGCTACCACCGCG
SCoT5	CAACAATGGCTACCACGA	SCoT21	ACGACATGGCGACCCACA
SCoT6	CAACAATGGCTACCACGC	SCoT22	AACCATGGCTACCACCAC
SCoT7	CAACAATGGCTACCACGG	SCoT23	CACCATGGCTACCACCAG
SCoT8	CAACAATGGCTACCACGT	SCoT24	CACCATGGCTACCACCAT
SCoT9	CAACAATGGCTACCAGCA	SCoT25	ACCATGGCTACCACCGGG
SCoT10	CAACAATGGCTACCAGCC	SCoT26	ACCATGGCTACCACCGTC
SCoT11	AAGCAATGGCTACCACCA	SCoT27	ACCATGGCTACCACCGTG
SCoT12	ACGACATGGCGACCAACG	SCoT28	CCATGGCTACCACCGCCA
SCoT13	ACGACATGGCGACCATCG	SCoT29	CCATGGCTACCACCGGCC
SCoT14	ACGACATGGCGACCACGC	SCoT30	CCATGGCTACCACCGGCG
SCoT15	ACGACATGGCGACCGCGA	SCoT31	CCATGGCTACCACCGCCT
SCoT16	ACCATGGCTACCACCGAC	SCoT32	CCATGGCTACCACCGCAC

ตารางที่ 3.7 (ต่อ)

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')
SCoT33	CCATGGCTACCACCGCAG	SCoT57	ACAATGGCTACCACTACG
SCoT34	ACCATGGCTACCACCGCA	SCoT58	ACAATGGCTACCACTAGG
SCoT35	CATGGCTACCACCGGCC	SCoT59	ACAATGGCTACCACCATC
SCoT36	GCAACAATGGCTACCACC	SCoT60	ACAATGGCTACCACCACA
SCoT37	CAACAATGGCTACCAGCG	SCoT61	CAACAATGGCTACCACCG
SCoT38	AAGCAATGGCTACCACCG	SCoT62	ACCATGGCTACCACGGAG
SCoT39	ACGACATGGCGACCAGCG	SCoT63	ACCATGGCTACCACGGGC
SCoT40	ACGACATGGCGACCACGT	SCoT64	ACCATGGCTACCACGGTC
SCoT41	ACGACATGGCGACCGCGG	SCoT65	ACCATGGCTACCACGGCA
SCoT42	ACCATGGCTACCACCGAT	SCoT66	ACCATGGCTACCAGCGAG
SCoT43	ACCATGGCTACCACCGGT	SCoT67	ACCATGGCTACCAGCGGC
SCoT44	GCAACAATGGCTACCACG	SCoT68	ACCATGGCTACCAGCGTC
SCoT45	CATGGCTACCACCGGCC	SCoT69	ACCATGGCTACCAGCGCA
SCoT46	CCATGGCTACCACCGGCA	SCoT70	ACCATGGCTACCAGCGCG
SCoT47	ACAATGGCTACCACTGCC	SCoT71	CCATGGCTACCACCGCCG
SCoT48	ACAATGGCTACCACTGGC	SCoT72	CCATGGCTACCACCGCCC
SCoT49	ACAATGGCTACCACTGCG	SCoT73	CCATGGCTACCACCGGCT
SCoT50	ACAATGGCTACCACTGGG	SCoT74	CCATGGCTACCACCGGCA
SCoT51	ACAATGGCTACCACTGTC	SCoT75	CCATGGCTACCACCGGAG
SCoT52	ACAATGGCTACCACTGCA	SCoT76	CCATGGCTACCACTACCG
SCoT53	ACAATGGCTACCACCGAC	SCoT77	CCATGGCTACCACTACCC
SCoT54	ACAATGGCTACCACCGAGC	SCoT78	CCATGGCTACCACTAGCA
SCoT55	ACAATGGCTACCACTACC	SCoT79	CCATGGCTACCACTAGCT
SCoT56	ACAATGGCTACCACTAGC	SCoT80	CCATGGCTACCACTAGCG

ตารางที่ 3.8 องค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ของเครื่องหมายสกัด

สารที่ใช้	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาณในปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอของกล้วยไม้	100 ng/μl	1.000
บัฟเฟอร์	10X	2.000
MgCl ₂	25 mM	2.000
dNTP	2 mM	2.000
ไพรเมอร์	5 μM	1.000
Taq DNA polymerase	5 unit/μl	0.125
ddH ₂ O	-	11.875
รวม	-	20.000

ตารางที่ 3.9 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ของเครื่องหมายสกัด

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา	หมายเหตุ
Initiation Denaturation	94	3 นาที	-
Denaturation	94	30 วินาที	จำนวน 40 รอบ
Annealing	50	40 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	5 นาที	-

3.3.4.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ

นำดีเอ็นเอกล้วยไม้ร่องแท่นารี 22 พันธุ์ มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณยีน *matK*, *rpoC 1*, *rbcL* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับสากล (universal primer) ดังตารางที่ 3.10 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ร่องแท่นารี ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอร์ ปริมาตรรวม 40 ไมโครลิตร มีองค์ประกอบของความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้แสดงดังตารางที่ 3.11 และขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แสดงดังตารางที่ 3.12 จากนั้น

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ใช้แรงไฟฟ้า 100 โวลต์ และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นตรวจสอบด้วยเครื่อง Gel documentation

ตารางที่ 3.10 ไพรมเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งจำเพาะของยีน

ยีน	ชื่อไพรมเมอร์	ลำดับเบส (5' → 3')	อ้างอิง
<i>matK</i>	<i>matKf_1</i>	TAATTTACGATCAATTCATTC	CBOL, 2005
	<i>matKr_2</i>	GTTCTAGCACAAAGAAAGTCG	CBOL, 2005
<i>rpoC 1</i>	<i>rpoC1_f</i>	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	CBOL, 2009
	<i>rpoC1_r</i>	TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC	CBOL, 2009
<i>rbcL</i>	<i>rbcL_f</i>	TCACCACAAACAGAAACTAAAGC	CBOL, 2009
	<i>rbcL_r</i>	GGCACAAAATAAGAAACGATCTC	CBOL, 2009
<i>trnH-psbA</i>	<i>psbA3_f</i>	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Shaw <i>et al.</i> , 2005
	<i>trnHf_05</i>	CGCGCATGGTGGATTACAATCC	Shaw <i>et al.</i> , 2005

ตารางที่ 3.11 องค์ประกอบของสารในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งจำเพาะ

สารที่ใช้	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา	ปริมาตรในปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอของกล้วยไม้	100 ng/μl	2.00
บัฟเฟอร์	10X	4.00
MgCl ₂	25 mM	4.00
dNTP	2 mM	4.00
forward primer	5 μM	2.00
reverse primer	5 μM	2.00
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 unit/μl	0.25
ddH ₂ O	-	21.75
รวม	-	40.00

ตารางที่ 3.12 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งจำเพาะ

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ระยะเวลา	หมายเหตุ
Initiation Denaturation	94	1 นาที	-
Denaturation	94	30 วินาที	จำนวน 35 รอบ
Annealing	52-57	30 วินาที	
Extension	72	1 นาที	
Final extension	72	5 นาที	-

3.3.5 การวิเคราะห์ผล

3.3.5.1 เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและเครื่องหมายสก็อต

(1) เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 14 พันธุ์ ตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งจะให้สัญลักษณ์เป็น 1 ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นจะให้สัญลักษณ์เป็น 0 บันทึกแบบแผนของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์แต่ละชนิดและผลรวมที่ได้จากไพรเมอร์ทั้งหมดเพื่อใช้แยกพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารี โดยจะเปรียบเทียบทั้ง 3 ซ้ำ และนับแถบดีเอ็นเอที่มีในทุกซ้ำ

(2) หาความสัมพันธ์ระหว่างกล้วยไม้รองเท้านารี 14 พันธุ์ โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc 2.01e โดยแบ่งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ออกเป็นการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี เครื่องหมายสก็อต และทั้งสองเครื่องหมายร่วมกัน

3.3.5.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งจำเพาะ

(1) การหาและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) โดยบริษัท Bioneer (ประเทศเกาหลี) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละยีนของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 22 พันธุ์ มาตรวจสอบความถูกต้องโดยนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) ด้วยเครื่องมือ Blast และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเทียบเรียงกลุ่มลำดับข้อมูล (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างทาง

พันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีแต่ละพันธุ์ และฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ใน GenBank ของฐานข้อมูล NCBI (National center for biotechnology information)

(2) การวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยนำผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์มาหาค่าดัชนีความแตกต่างและนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ neighbor-joining (NJ), maximum likelihood (ML) และ maximum parsimony (MP) กำหนดค่า Bootstrap เท่ากับ 1000 ด้วยโปรแกรม MEGA (molecular evolutionary genetics analysis)

3.3.5.3 การเปรียบเทียบผลที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีของแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเครื่องหมายแฮตตอร์เอพีดี เครื่องหมายสก็อต และเครื่องหมายแฮตตอร์เอพีดี ร่วมกับเครื่องหมายสก็อต และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีของแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ยีน 1, 2, 3 และ 4 ตำแหน่ง

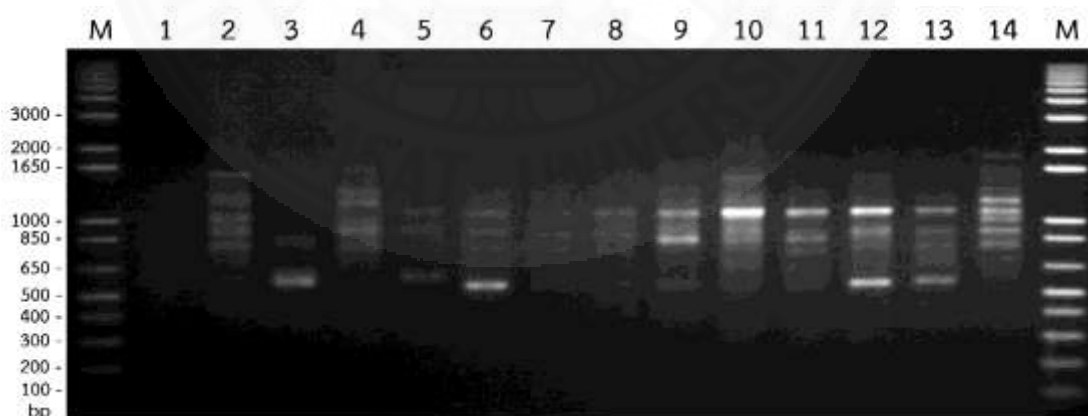
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

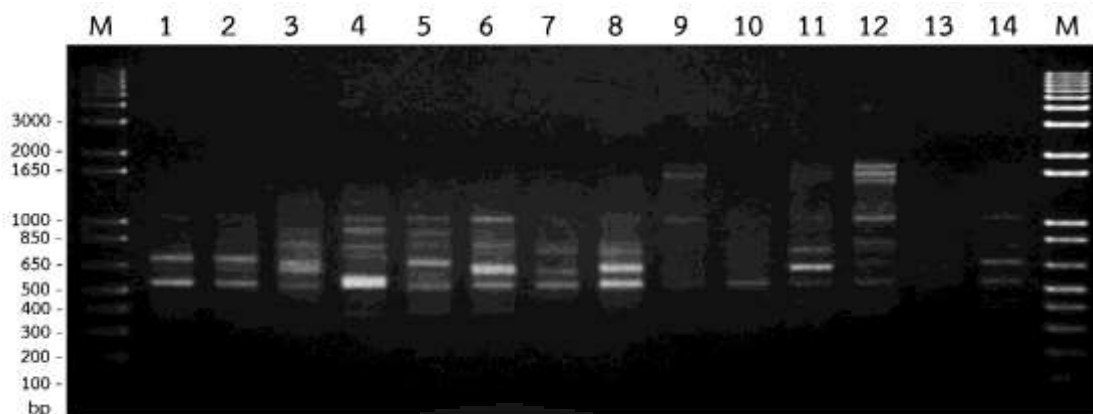
4.1 เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี

4.1.1 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

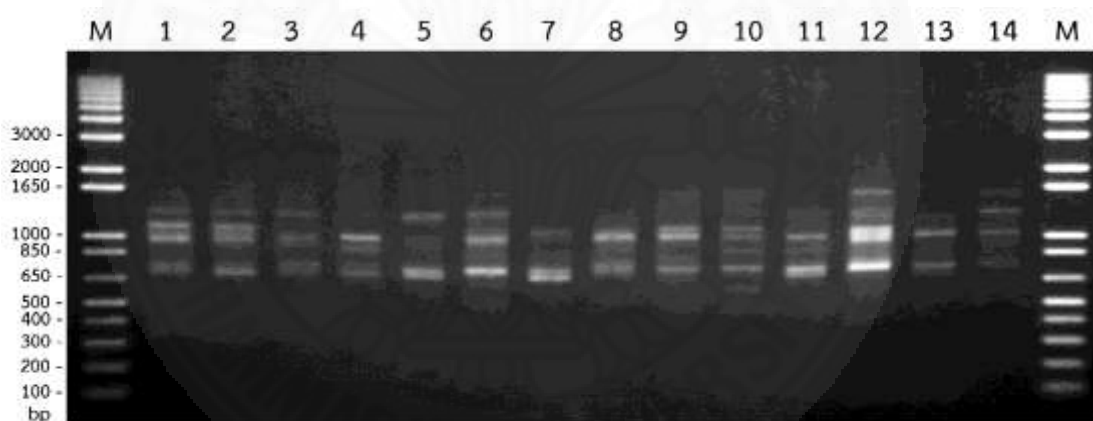
จากการตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 72 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ พบไพรเมอร์ 29 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ (40.28 %) หลังจากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ปริมาณสูงอย่างชัดเจนและให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ คัดเลือกได้ 22 ชนิด ได้แก่ A22, A24, A30, A32, B22, B23, B25, B27, B32, C21, C22, C28, C29, C31, D23, E23, E24, E31, E32, F23, F29 และ F31 จากนั้นนำมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 14 พันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 22 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีได้แถบดีเอ็นเอรวม 293 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 300 ถึง 2,900 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย (polymorphisms) 275 แถบ (คิดเป็น 94 %) และแถบดีเอ็นเอที่ไม่มี ความหลากหลาย (monomorphic band) จำนวน 18 แถบ (คิดเป็น 6 %) โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีแสดงดังภาพที่ 4.1-4.22



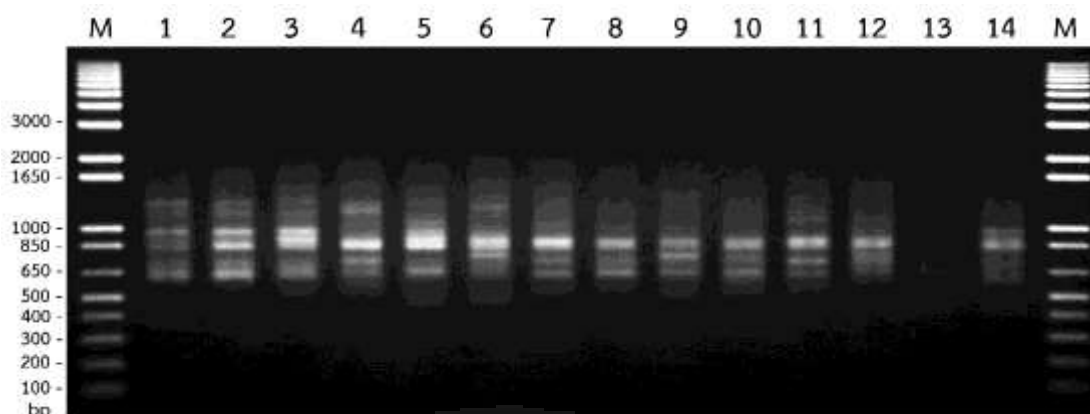
ภาพที่ 4.1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ A22 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้านารีตามลำดับในตารางที่ 3.1]



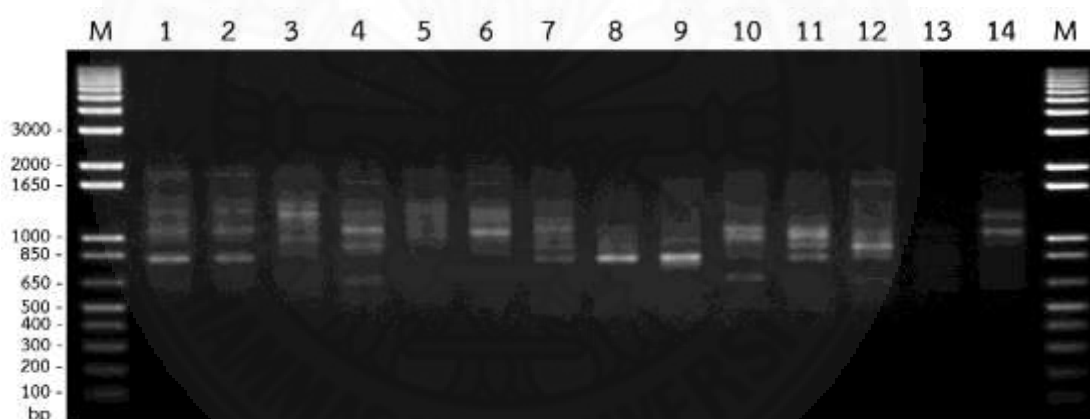
ภาพที่ 4.2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ A24 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



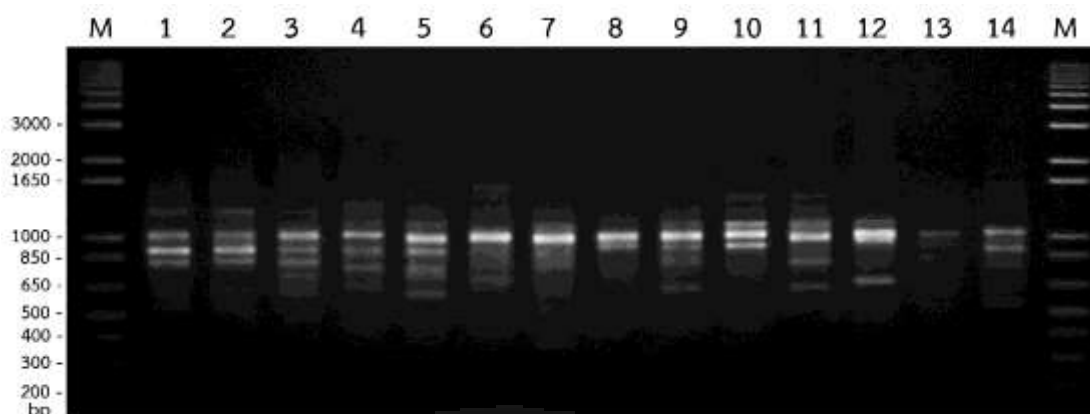
ภาพที่ 4.3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ A30 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



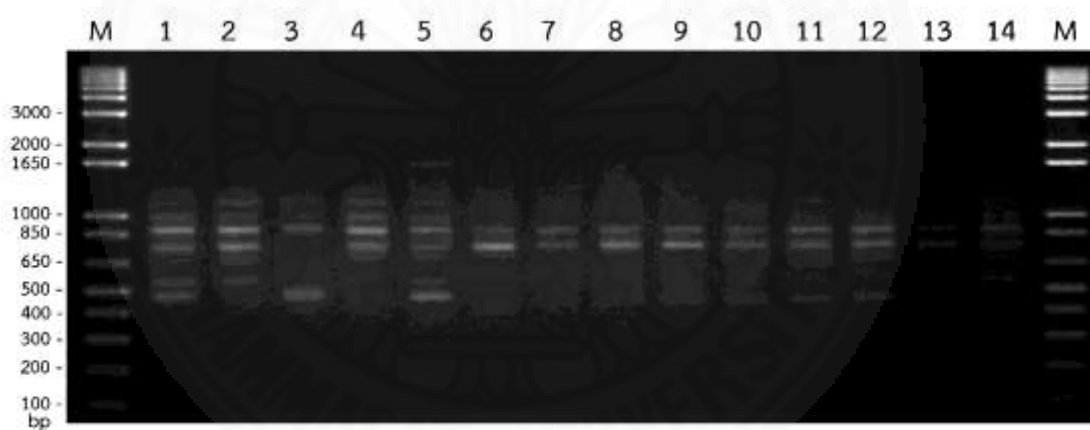
ภาพที่ 4.4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ A32 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



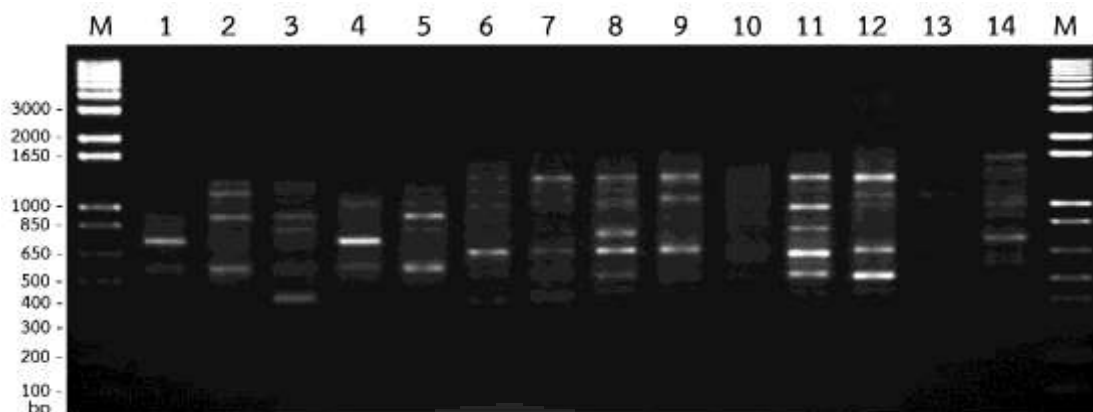
ภาพที่ 4.5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ B22 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



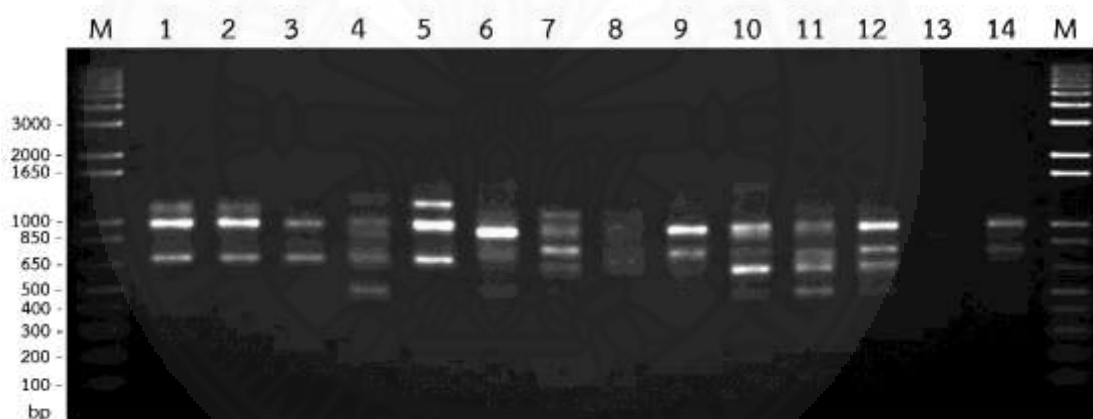
ภาพที่ 4.6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ B23 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้านารีตามลำดับในตารางที่ 3.1]



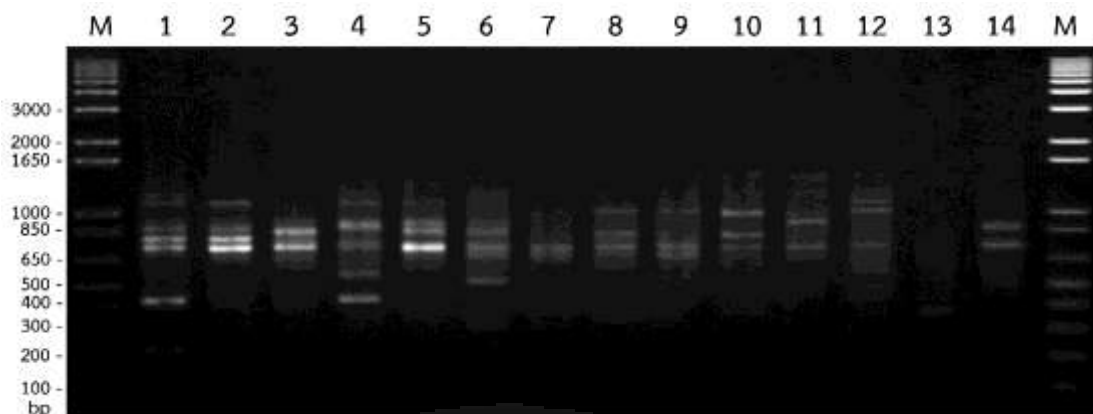
ภาพที่ 4.7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ B25 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้านารีตามลำดับในตารางที่ 3.1]



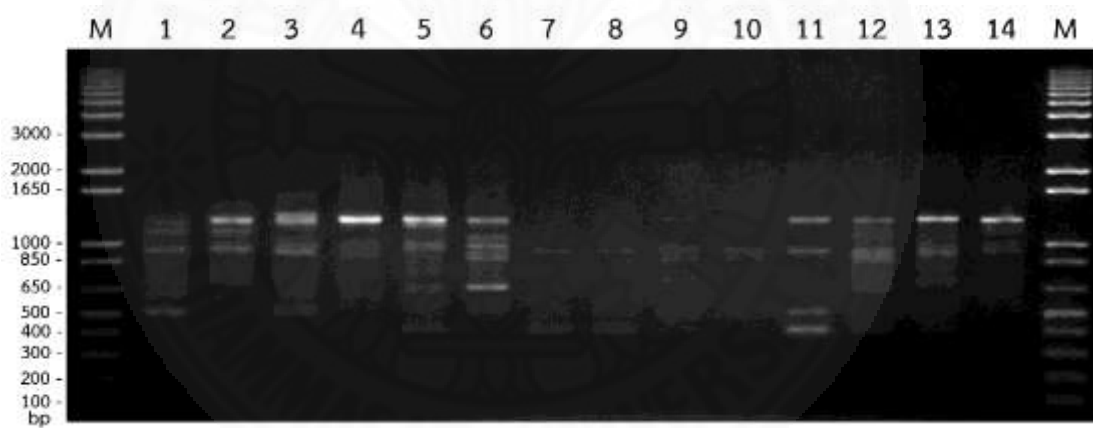
ภาพที่ 4.8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ B27 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้านารีตามลำดับในตารางที่ 3.1]



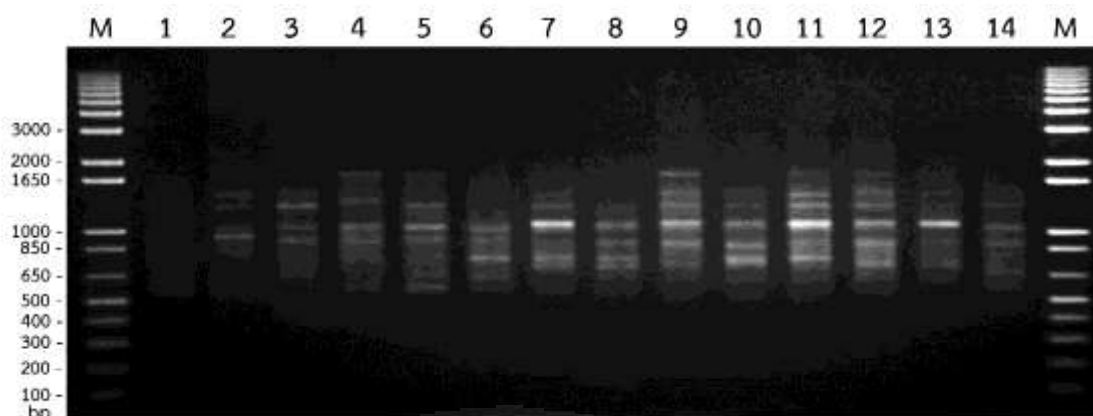
ภาพที่ 4.9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ B32 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้านารีตามลำดับในตารางที่ 3.1]



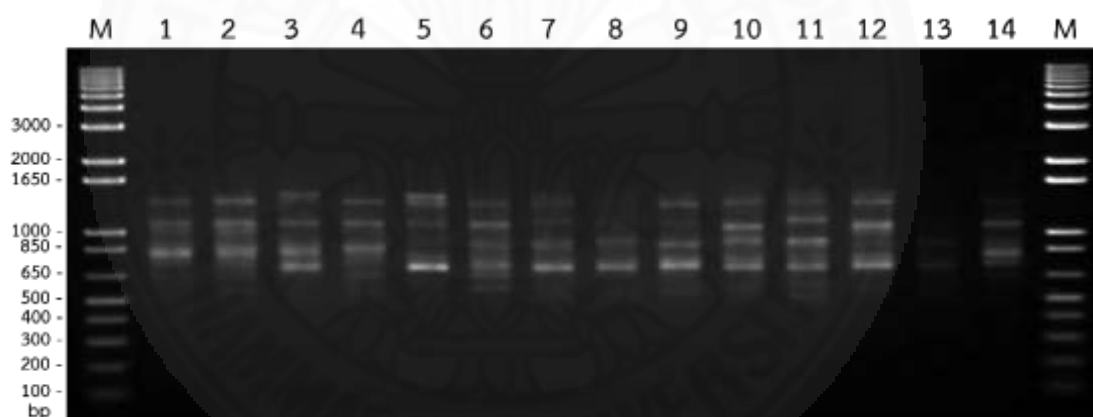
ภาพที่ 4.10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ C21 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



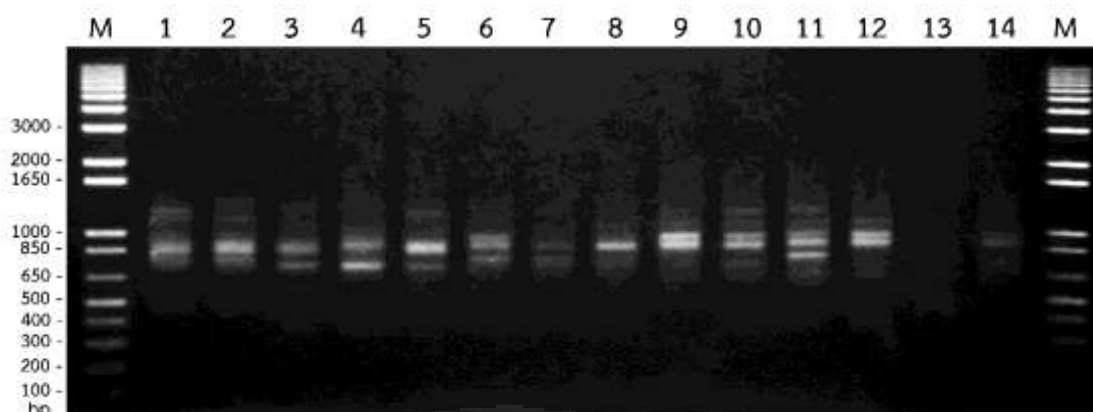
ภาพที่ 4.11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ C22 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



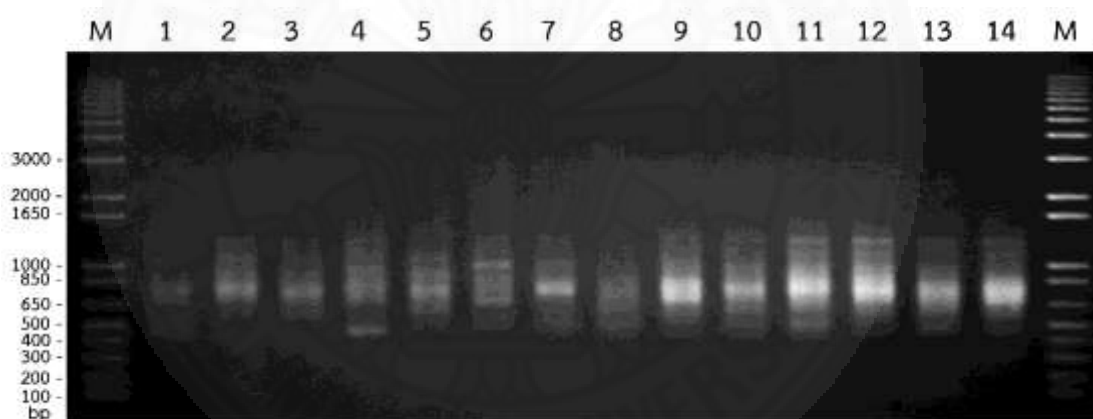
ภาพที่ 4.12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ C28 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



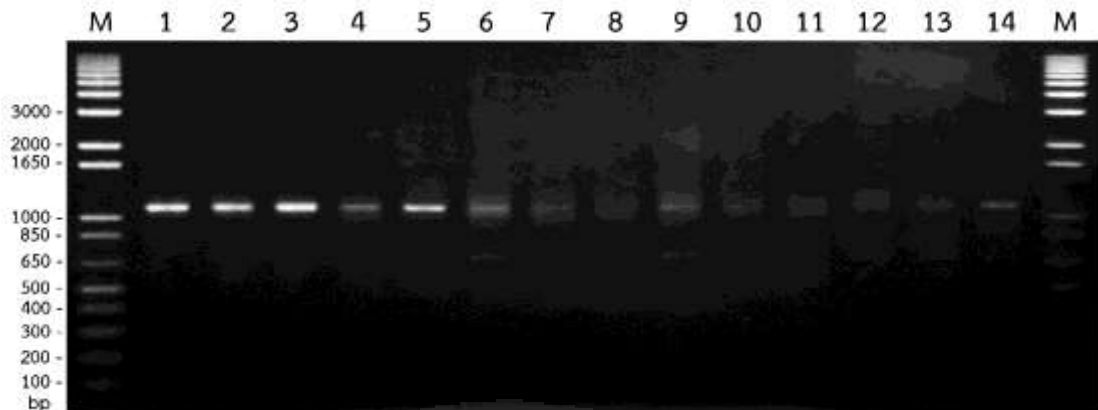
ภาพที่ 4.13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ C29 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



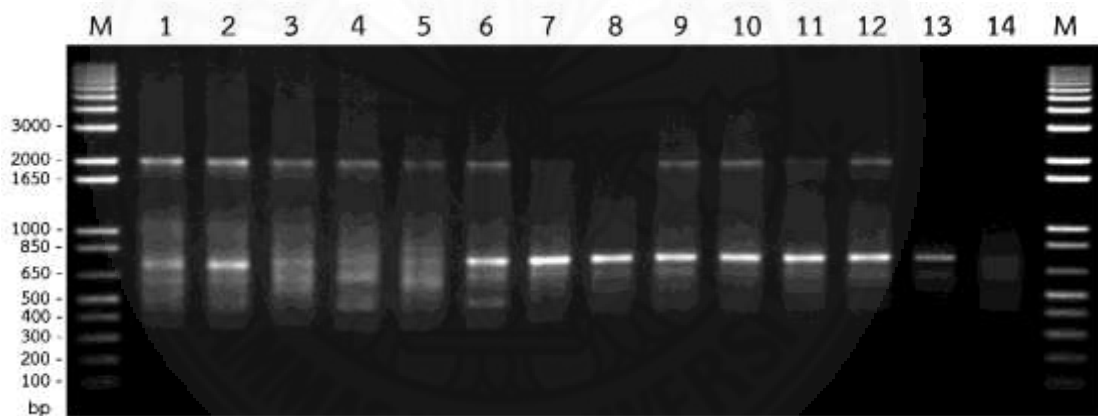
ภาพที่ 4.14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ C31 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้าตามลำดับในตารางที่ 3.1]



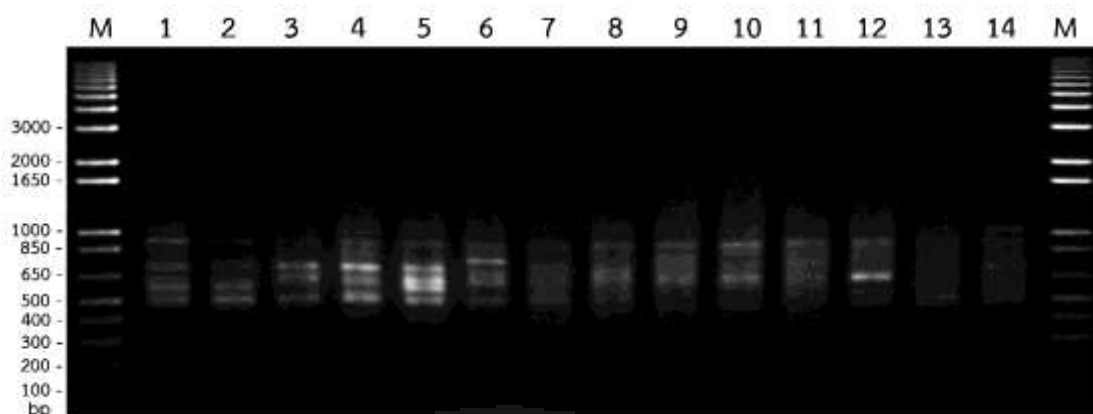
ภาพที่ 4.15 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ D31 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้าตามลำดับในตารางที่ 3.1]



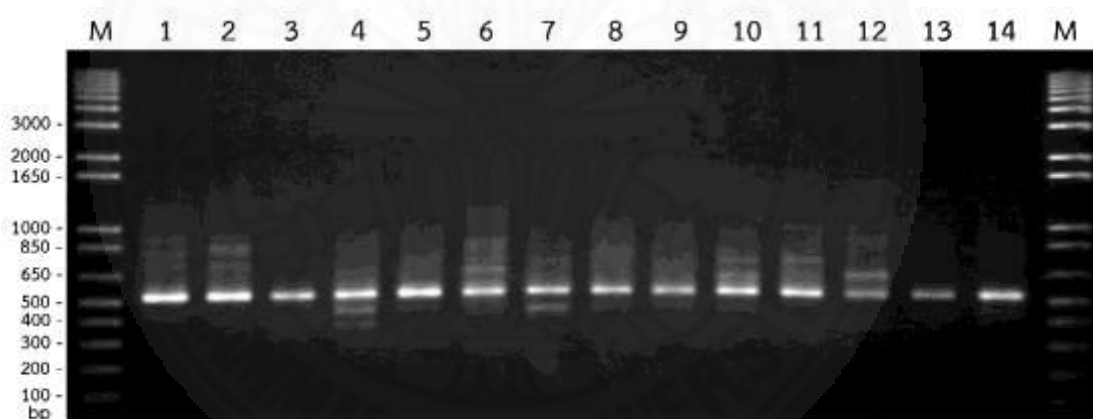
ภาพที่ 4.16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ E23 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



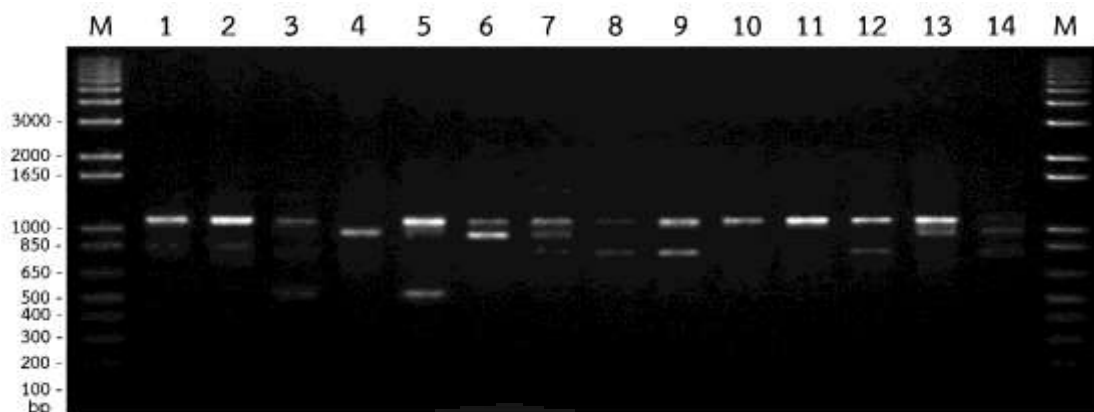
ภาพที่ 4.17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ E24 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



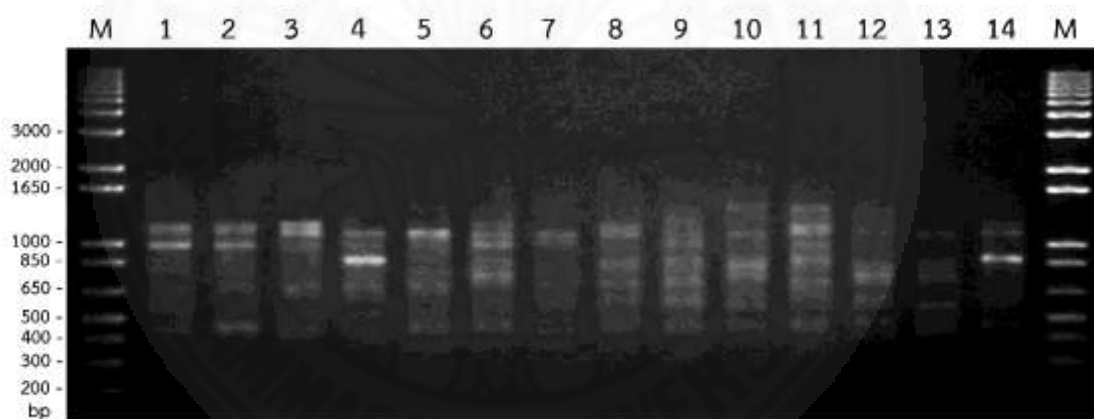
ภาพที่ 4.18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ E31 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้านารีตามลำดับในตารางที่ 3.1]



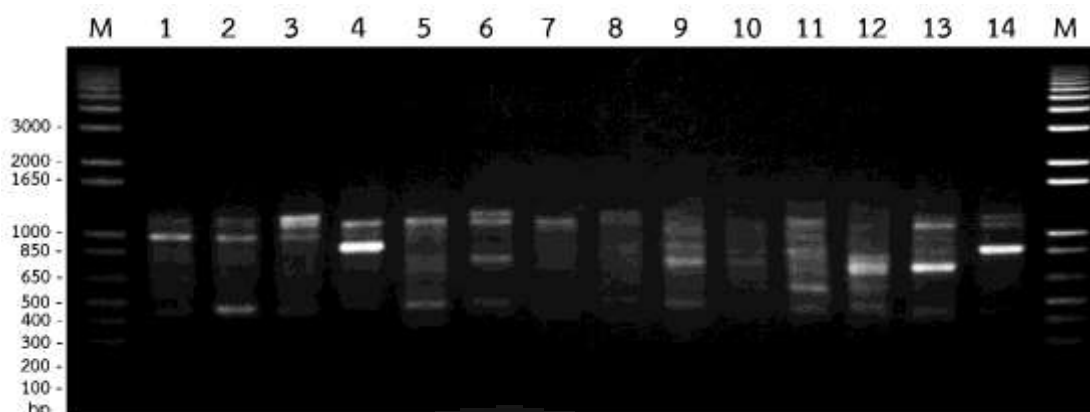
ภาพที่ 4.19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ E32 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้านารีตามลำดับในตารางที่ 3.1]



ภาพที่ 4.20 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ F23 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



ภาพที่ 4.21 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ F29 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



ภาพที่ 4.22 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแอสตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ F31 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA), 1-14 คือ กล้ายไม้รองเท้านารีตามลำดับในตารางที่ 3.1]

ผลการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายแอสตอาร์เอพีดีพบว่ากล้ายไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ สามารถแยกออกจากกันได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวจำนวน 11 ชนิด ได้แก่ A24, B22, B23, B27, C21, C23, C28, C29, C31, E31 และ F29 ไพรเมอร์ที่สามารถแยกกล้ายไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ได้ 13 พันธุ์ มี 6 ชนิด ได้แก่ A30, B32, D23, E24, E32 และ F31 นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อกล้ายไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ในแต่ละพันธุ์ดังต่อไปนี้

ไพรเมอร์ A22 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบส ที่จำเพาะกับรองเท้านารีเหลืองปราจีน

ไพรเมอร์ A24 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,500 และ 650 คู่เบส ที่จำเพาะกับรองเท้านารีขาวพังงา และรองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม ตามลำดับ

ไพรเมอร์ A30 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,650, 950 และ 550 คู่เบส ที่จำเพาะกับรองเท้านารีเหลืองสิงขร รองเท้านารีช่องอ่างทอง และรองเท้านารีเหลืองประจวบ ตามลำดับ

ไพรเมอร์ A32 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 และ 600 คู่เบส ที่จำเพาะกับรองเท้านารีเหลืองอุตร และรองเท้านารีเหลืองประจวบ ตามลำดับ

ไพรเมอร์ B22 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,450 และ 1,300 คู่เบส ที่จำเพาะกับรองเท้านารีช่องอ่างทอง และรองเท้านารีเหลืองตรัง ตามลำดับ

โปรแกรมเมอร์ B23 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 1,600 และ 850 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเหลืองสิงขร และร่องเท้านารีเกรยี ตามลำดับ

โปรแกรมเมอร์ B32 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 850 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเกรยี

โปรแกรมเมอร์ C21 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 520, 500, 350 และ 250 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเหลืองสิงขร ร่องเท้านารีขาวพังงา ร่องเท้านารีเกรยี และร่องเท้านารีฝายหอย ตามลำดับ

โปรแกรมเมอร์ C22 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 2,300 และ 670 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเกรยี แถบตีเอ็นเอขนาด 1,800 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเหลืองกาญจน์ แถบตีเอ็นเอขนาด 1,400 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีขาวสตูล และแถบตีเอ็นเอขนาด 850 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเหลืองพังงา

โปรแกรมเมอร์ C28 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 1,600, 1,500 และ 660 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีฝายหอย ร่องเท้านารีเหลืองกาญจน์ และร่องเท้านารีเหลืองประจวบ ตามลำดับ

โปรแกรมเมอร์ C31 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีขาวพังงา ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 650 และ 530 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเกรยี

โปรแกรมเมอร์ D23 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 700, 600 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีขาวสตูล และร่องเท้านารีเหลืองปราจีน ตามลำดับ

โปรแกรมเมอร์ E23 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 800, 750, 550 และ 500 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีขาวสตูล ร่องเท้านารีขาวพังงา ร่องเท้านารีช่องอ่างทอง และร่องเท้านารีเกรยี ตามลำดับ

โปรแกรมเมอร์ E24 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 1,200 และ 850 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีฝายหอย และร่องเท้านารีเหลืองอุดร ตามลำดับ

โปรแกรมเมอร์ E31 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 850 และ 300 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเหลืองสิงขร และร่องเท้านารีขาวสตูล ตามลำดับ

โปรแกรมเมอร์ E32 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 1,400 และ 400 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเหลืองสิงขร และร่องเท้านารีเหลืองกาญจน์ ตามลำดับ

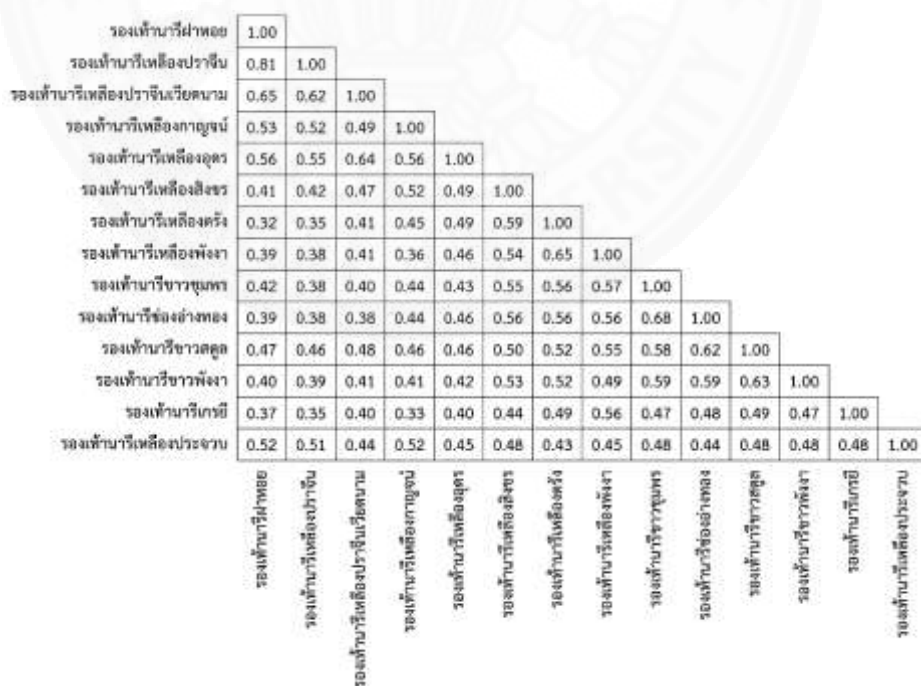
โปรแกรมเมอร์ F23 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 1,500 450 และ 400 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเหลืองตรัง ร่องเท้านารีฝายหอย และร่องเท้านารีเหลืองปราจีน ตามลำดับ

โปรแกรมเมอร์ F29 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 390 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเหลืองอุดร

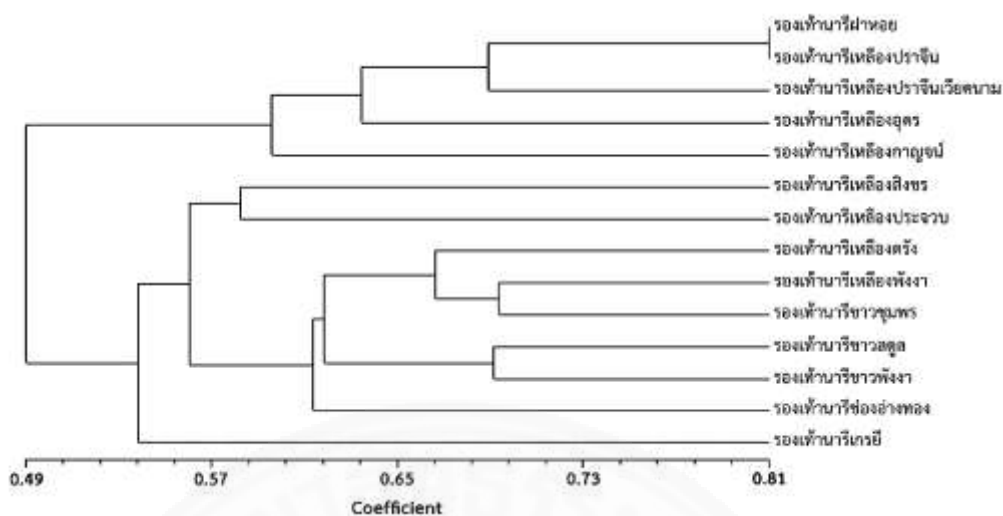
โปรแกรมเมอร์ F31 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีฝายหอย

4.1.2 การวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การตรวจสอบดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ 22 ชนิด พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 293 แถบ เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc 2.01e เลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ค่าพหุคูณค่าดัชนีความเหมือนและแสดงผลในรูปแบบ dendrogram ซึ่งมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.32-0.81 ดังภาพที่ 4.23 เมื่อพิจารณาที่ดัชนีความเหมือน 0.57 สามารถจัดกลุ่มรองเท้านารีออกเป็น 4 กลุ่ม ดังภาพที่ 4.24 กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รองเท้านารีฝ้ายหอย รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม รองเท้านารีเหลืองอุดร และรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองสิงขร และรองเท้านารีเหลืองประจวบ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองตรง รองเท้านารีเหลืองพังงา รองเท้านารีขาวชุมพร รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีขาวพังงา และรองเท้านารีช่องอ่างทอง และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ รองเท้านารีเกรยี โดยรองเท้านารีฝ้ายหอยและรองเท้านารีเหลืองปราจีนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.81 ในขณะที่รองเท้านารีฝ้ายหอยกับรองเท้านารีเหลืองตรงแตกต่างกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.32 และพบว่ารองเท้านารีเกรยีแตกต่างจากรองเท้านารีพันธุ์อื่นมากที่สุด เนื่องจากมีค่าดัชนีความเหมือนเฉลี่ยน้อยที่สุด



ภาพที่ 4.23 ค่าดัชนีความเหมือนของกล้วยไม้รองเท้านารีที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี

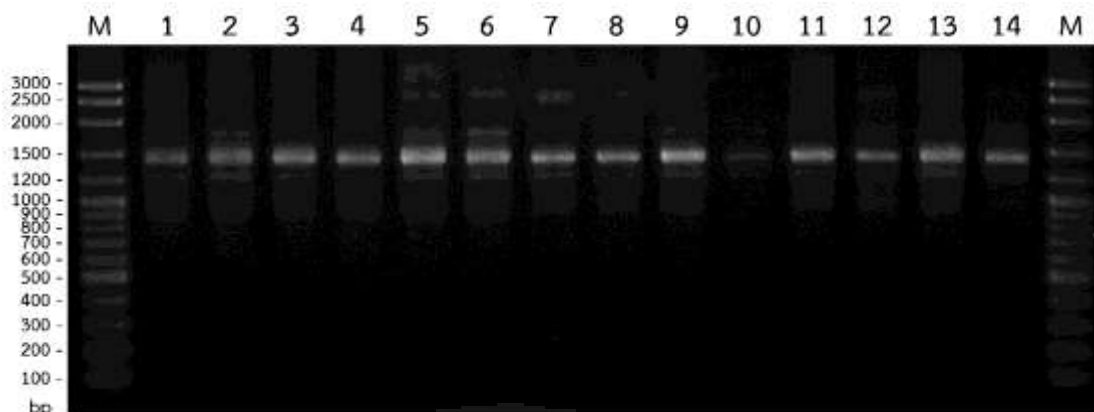


ภาพที่ 4.24 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี

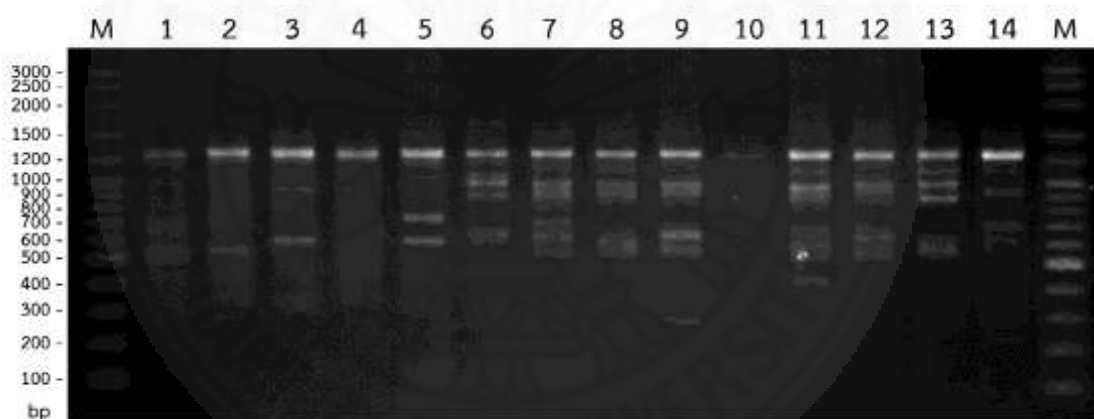
4.2 เครื่องหมายสกัด

4.2.1 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

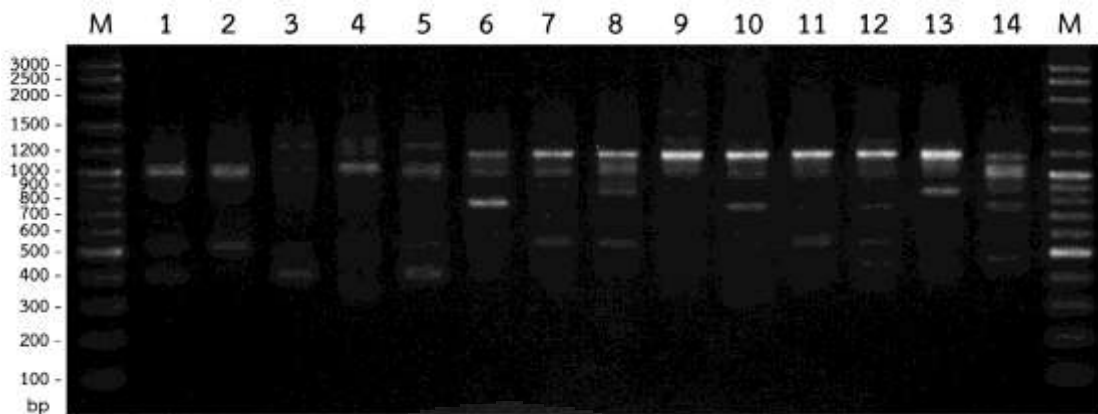
การตรวจสอบดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายสกัดโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 80 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 48 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หรือคิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ปริมาณสูงอย่างชัดเจนและให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบได้ 22 ชนิด ได้แก่ SCoT1, SCoT12, SCoT13, SCoT14, SCoT35, SCoT39, SCoT40, SCoT50, SCoT51, SCoT52, SCoT58, SCoT59, SCoT61, SCoT64, SCoT65, SCoT66, SCoT67, SCoT69, SCoT70, SCoT77, SCoT79 และ SCoT80 อีกทั้งพบไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายสูง (คิดเป็น 100 %) จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ SCoT13, SCoT14, SCoT39, SCoT61, SCoT64, SCoT66, SCoT67 และ SCoT80 จากนั้นนำไพรเมอร์ทั้ง 22 ชนิดมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 14 ชนิด พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 332 แถบ มีขนาด 250 ถึง 3,100 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มี ความหลากหลาย (monomorphic band) 19 แถบ (คิดเป็น 5.72 %) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย (polymorphic band) 313 แถบ (คิดเป็น 94.28 %) โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ ที่ได้จากเครื่องหมายสกัด แสดงดังภาพที่ 4.25-4.46



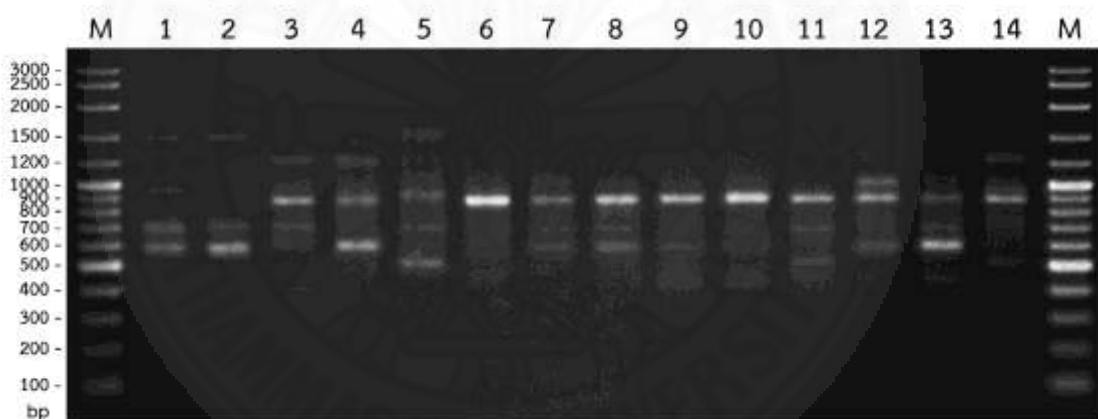
ภาพที่ 4.25 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT1 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



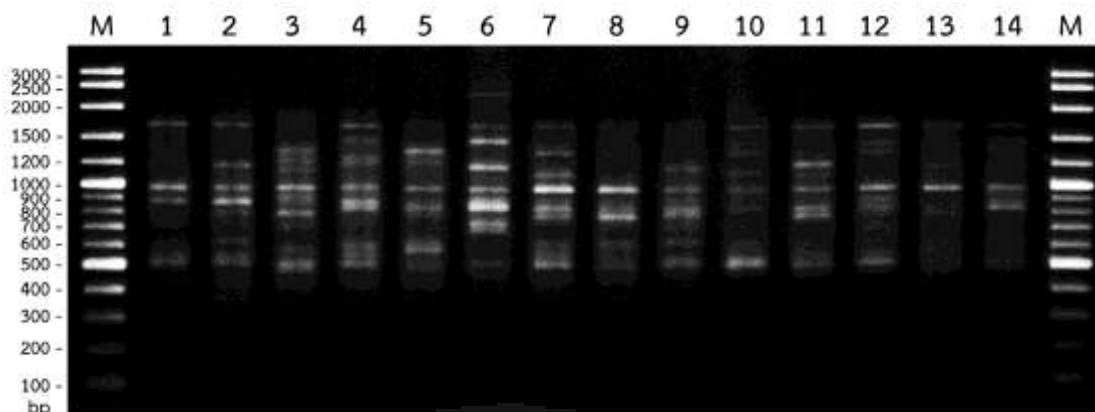
ภาพที่ 4.26 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT12 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



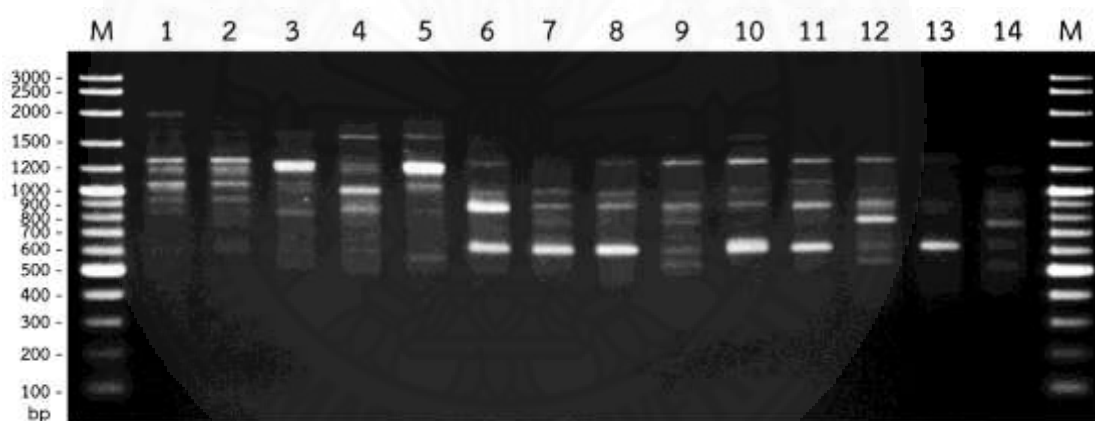
ภาพที่ 4.27 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT13 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



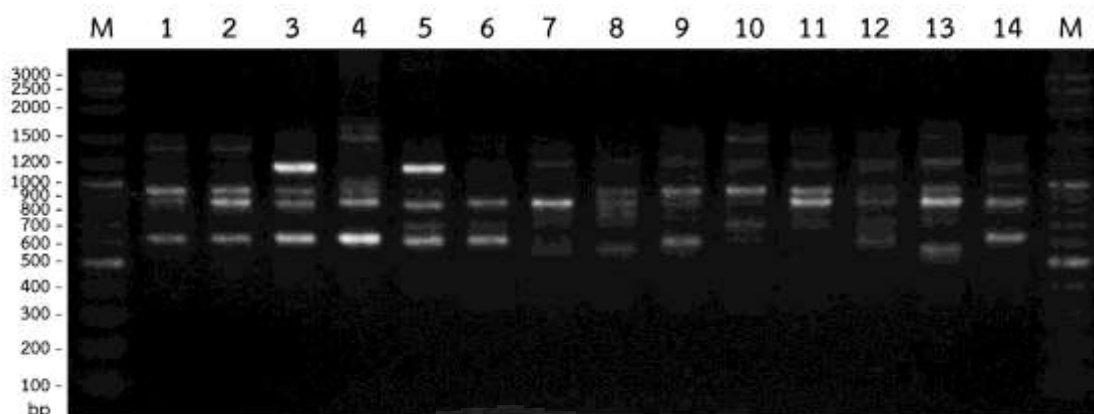
ภาพที่ 4.28 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT14 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



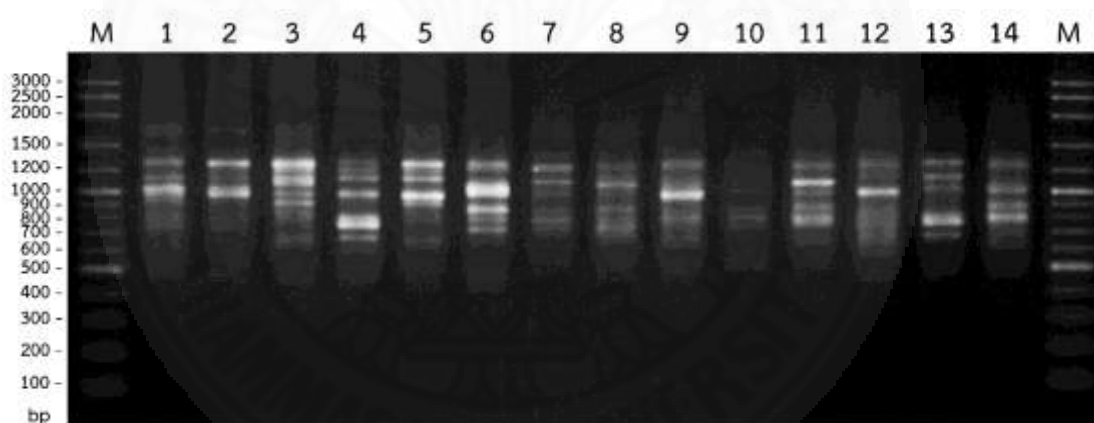
ภาพที่ 4.29 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT35 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



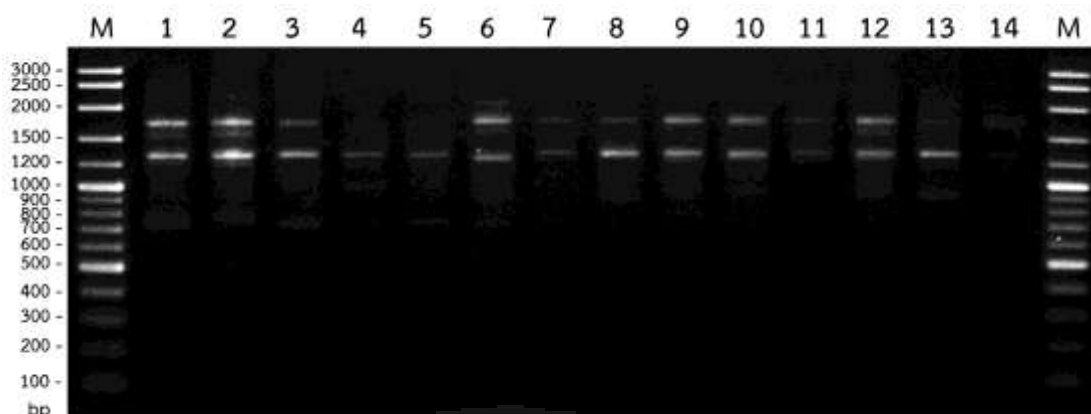
ภาพที่ 4.30 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT39 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



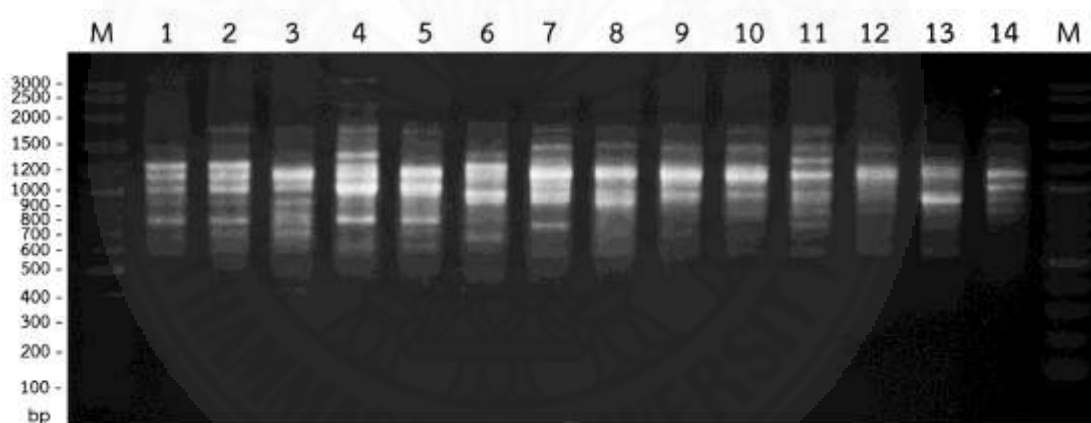
ภาพที่ 4.31 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT40 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้านารีตามลำดับในตารางที่ 3.1]



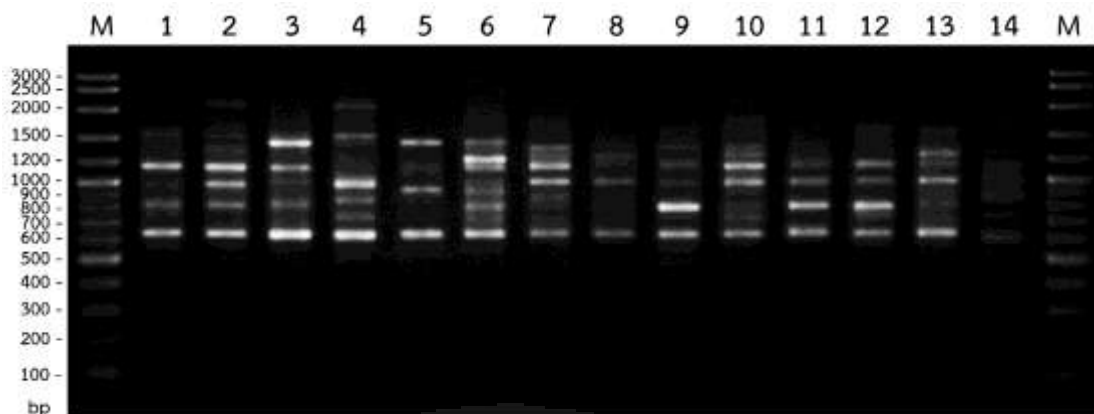
ภาพที่ 4.32 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT50 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้านารีตามลำดับในตารางที่ 3.1]



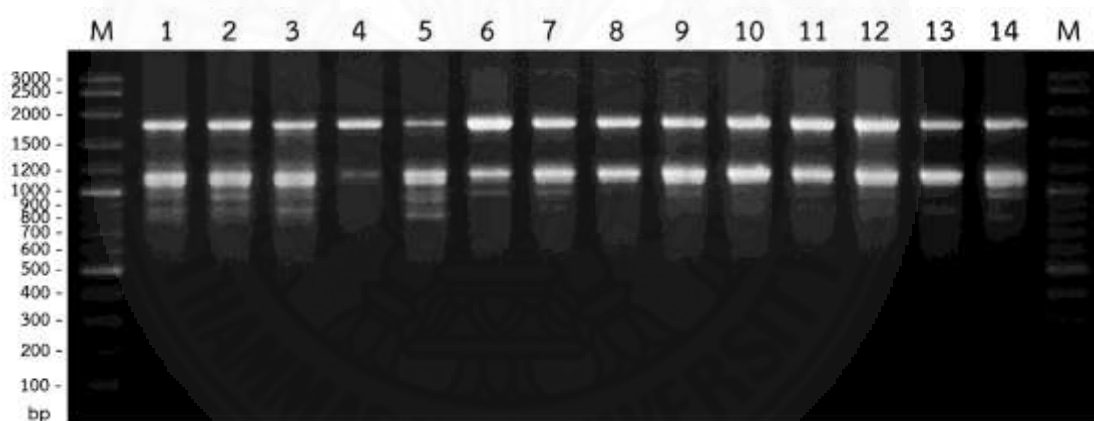
ภาพที่ 4.33 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT51 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้านารีตามลำดับในตารางที่ 3.1]



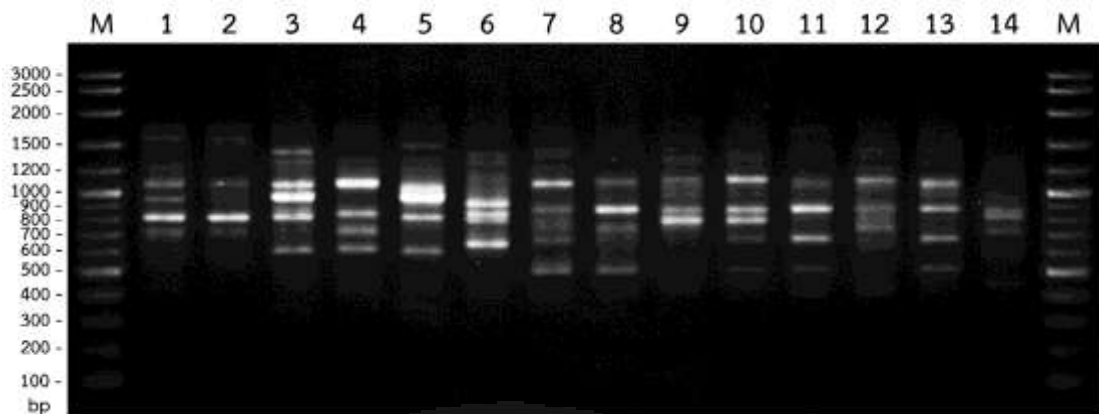
ภาพที่ 4.34 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT52 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้านารีตามลำดับในตารางที่ 3.1]



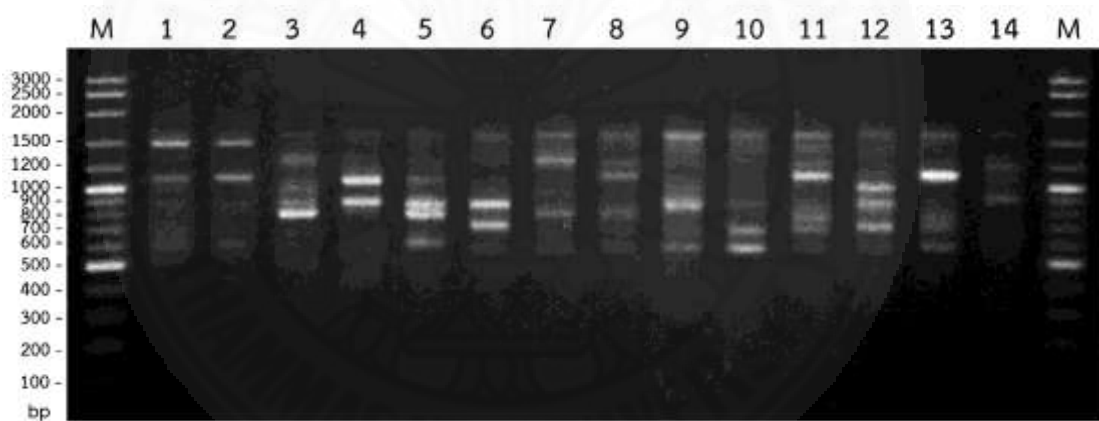
ภาพที่ 4.35 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT58 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



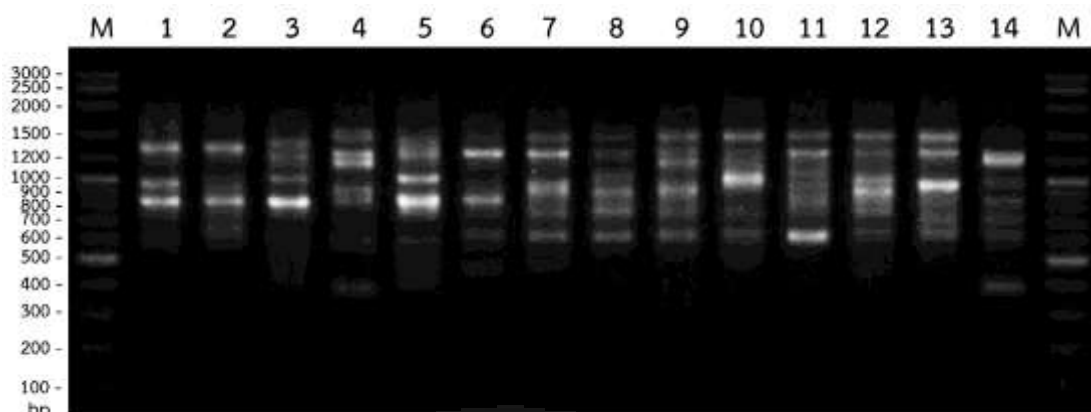
ภาพที่ 4.36 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT59 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



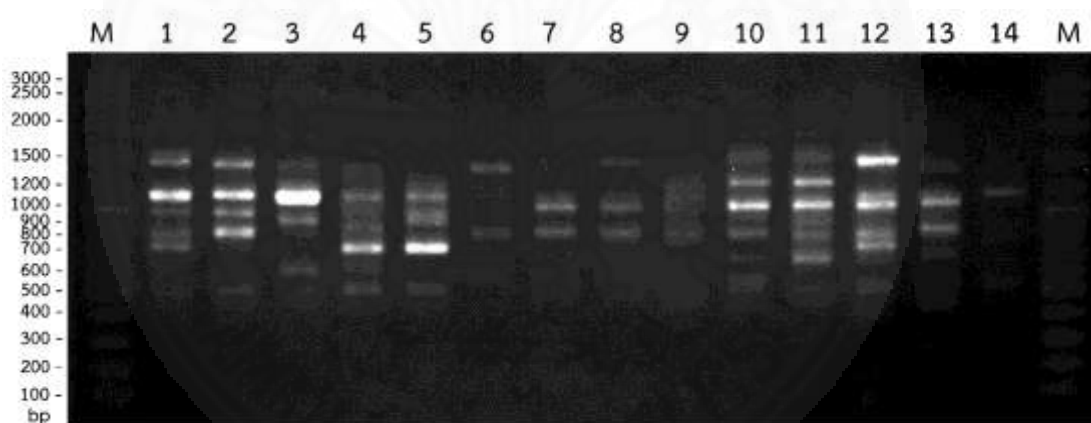
ภาพที่ 4.37 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT61 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



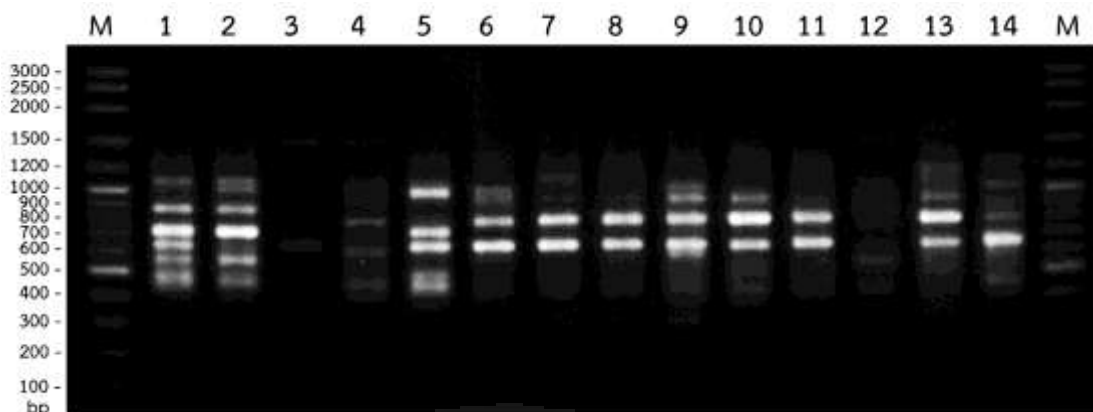
ภาพที่ 4.38 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT64 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



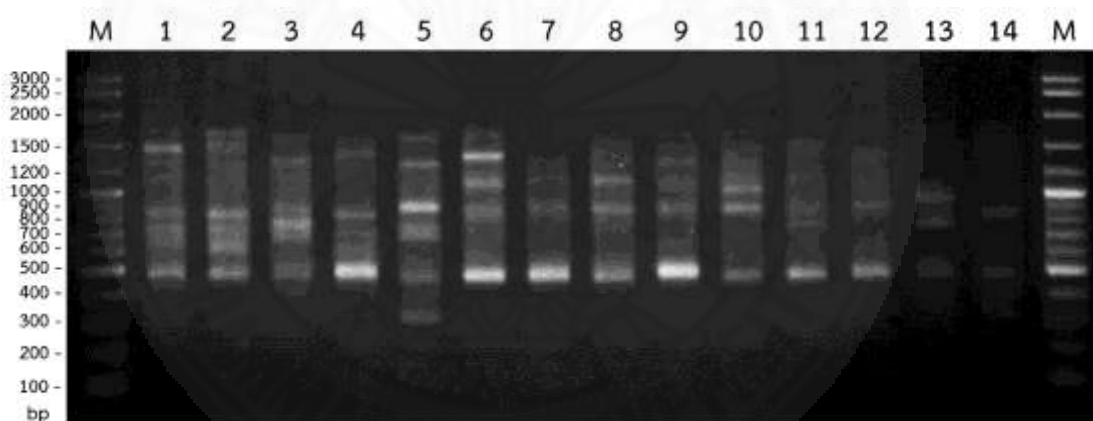
ภาพที่ 4.39 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT65 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



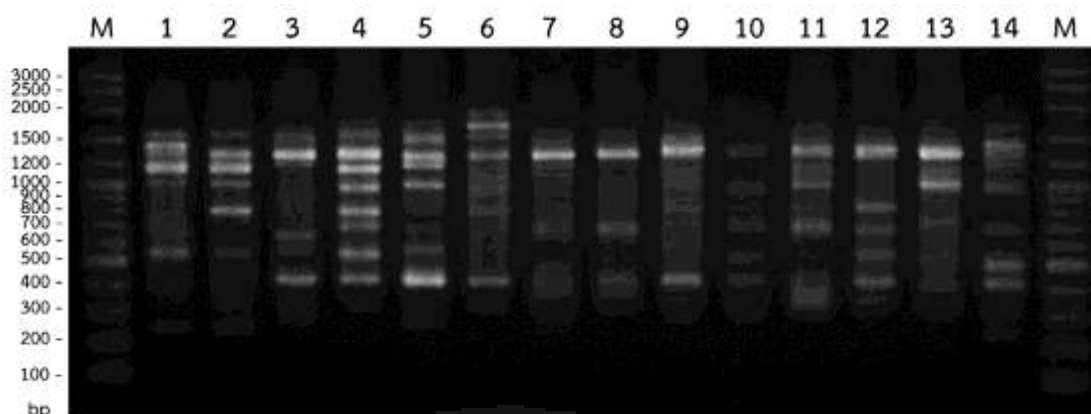
ภาพที่ 4.40 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT66 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



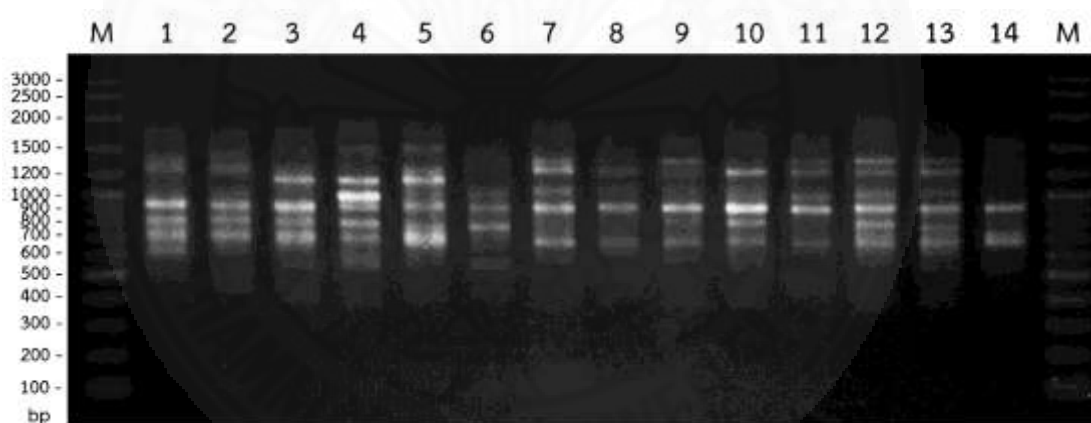
ภาพที่ 4.41 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT67 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



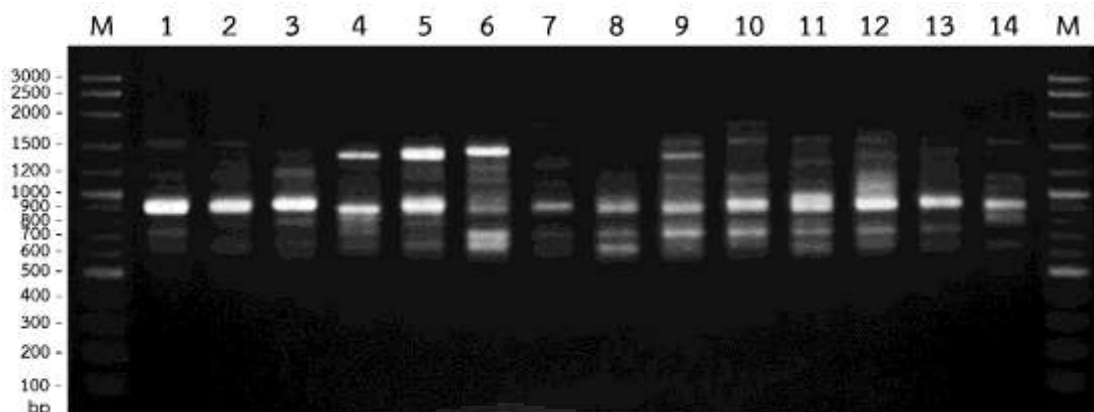
ภาพที่ 4.42 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT69 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



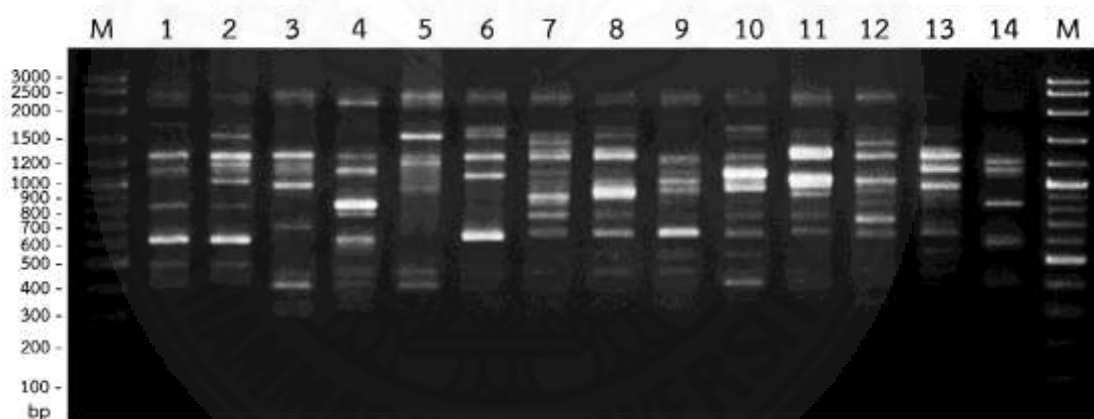
ภาพที่ 4.43 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT70 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



ภาพที่ 4.44 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT77 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท่านั้นาริตตามลำดับในตารางที่ 3.1]



ภาพที่ 4.45 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT79 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้านารีตามลำดับในตารางที่ 3.1]



ภาพที่ 4.46 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT80 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia), 1-14 คือ กล้วยไม้รองเท้านารีตามลำดับในตารางที่ 3.1]

ผลจากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบว่าเครื่องหมายสก็อตสามารถแยกกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* จำนวน 14 พันธุ์ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวจำนวน 13 ชนิด คือ SCoT12, SCoT35, SCoT39, SCoT50, SCoT52, SCoT58, SCoT61, SCoT64, SCoT66, SCoT67, SCoT70, SCoT79 และ SCoT80 ไพรเมอร์ที่สามารถแยกรองเท้านารีได้ 13 พันธุ์ มีจำนวน 3 ชนิด คือ SCoT40, SCoT65 และ SCoT69

ไพร์เมอร์ที่สามารถแยกกรองเท่านั้นได้ 12 พันธุ์ มี 3 ชนิด คือ SCoT13, SCoT14 และ SCoT77 นอกจากนี้พบว่ามีการเติบโตที่จำเพาะต่อกลิ้วไม้แต่ละพันธุ์ ดังนี้

ไพร์เมอร์ SCoT12 ให้การเติบโตในขนาด 1,050 และ 400 คู่เบส ที่จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา และให้การเติบโตในขนาด 290 คู่เบส ที่จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา

ไพร์เมอร์ SCoT13 ให้การเติบโตในขนาด 1,750 และ 1,350 คู่เบส ที่จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อราและกรองเท่านั้นเชื้อรา

ไพร์เมอร์ SCoT14 ให้การเติบโตในขนาด 1,020 คู่เบส จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา

ไพร์เมอร์ SCoT35 ให้การเติบโตในขนาด 2,400, 900, 690 และ 610 คู่เบส ที่จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา เชื้อรา เชื้อรา และกรองเท่านั้นเชื้อรา ตามลำดับ

ไพร์เมอร์ SCoT39 ให้การเติบโตในขนาด 1,350, 800 และ 700 คู่เบส ที่จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา เชื้อรา และกรองเท่านั้นเชื้อรา ตามลำดับ

ไพร์เมอร์ SCoT40 ให้การเติบโตในขนาด 750 และ 390 คู่เบส ที่จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา และกรองเท่านั้นเชื้อรา ตามลำดับ

ไพร์เมอร์ SCoT50 ให้การเติบโตในขนาด 1,600, 1,500 และ 500 คู่เบส ที่จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา เชื้อรา และกรองเท่านั้นเชื้อรา ตามลำดับ

ไพร์เมอร์ SCoT51 ให้การเติบโตในขนาด 2,200 และ 800 คู่เบส ที่จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา

ไพร์เมอร์ SCoT52 ให้การเติบโตในขนาด 1,900 และ 650 คู่เบส ที่จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา เชื้อรา การเติบโตในขนาด 1,600 คู่เบส ที่จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา และการเติบโตในขนาด 500 และ 400 คู่เบส ที่จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา

ไพร์เมอร์ SCoT58 ให้การเติบโตในขนาด 2,00, 700 และ 510 คู่เบส ที่จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา เชื้อรา และกรองเท่านั้นเชื้อรา ตามลำดับ

ไพร์เมอร์ SCoT59 ให้การเติบโตในขนาด 950 คู่เบส จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา

ไพร์เมอร์ SCoT61 ให้การเติบโตในขนาด 1,500, 1,200, 1,000 และ 900 คู่เบส ที่จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา เชื้อรา เชื้อรา และกรองเท่านั้นเชื้อรา

ไพร์เมอร์ SCoT64 ให้การเติบโตในขนาด 950 คู่เบส ที่จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา

ไพร์เมอร์ SCoT65 ให้การเติบโตในขนาด 1,490 และ 1,050 คู่เบส ที่จำเพาะกับกรองเท่านั้นเชื้อรา และกรองเท่านั้นเชื้อรา ตามลำดับ

ไพรมอร์ SCoT66 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 1,600 และ 600 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีฝ้าย และร่องเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม ตามลำดับ

ไพรมอร์ SCoT67 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 1,300, 1,200, 850 และ 600 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีช่องอ่างทอง ร่องเท้านารีเกรยี่ ร่องเท้านารีชาวพังงา และร่องเท้านารีเหลืองกาญจน์ ตามลำดับ

ไพรมอร์ SCoT69 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 1,000 และ 600 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเกรยี่ และร่องเท้านารีเหลืองปราจีน ตามลำดับ

ไพรมอร์ SCoT70 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 2,000, 900 และ 810 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเหลืองสิงขร ร่องเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม และร่องเท้านารีชาวพังงา และให้แถบตีเอ็นเอขนาด 1,400 และ 500 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเหลืองประจวบ

ไพรมอร์ SCoT77 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 710 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเหลืองประจวบ

ไพรมอร์ SCoT79 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 1,200 และ 1,000 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม และร่องเท้านารีช่องอ่างทอง ตามลำดับ

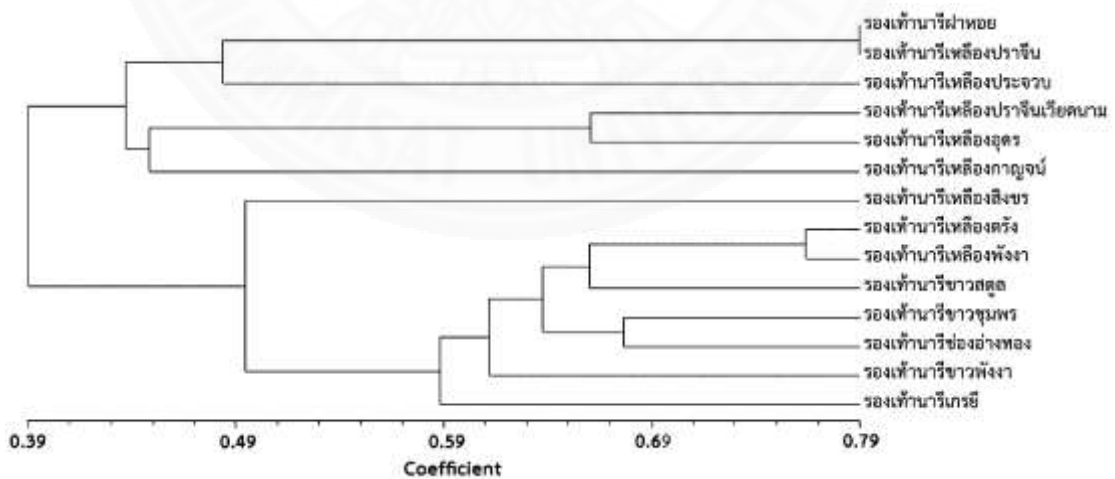
ไพรมอร์ SCoT80 ให้แถบตีเอ็นเอขนาด 1,400, 700 และ 350 คู่เบส ที่จำเพาะกับร่องเท้านารีเหลืองตรัง ร่องเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม และร่องเท้านารีชาวพังงาตามลำดับ

4.2.2 การวิเคราะห์หลายพิมพ์ตีเอ็นเอ

เมื่อวิเคราะห์แถบตีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรมอร์ทั้ง 22 ชนิด สามารถคำนวณค่าดัชนีความเหมือนซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.30-0.79 ดังภาพที่ 4.47 สามารถสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ได้ ดังภาพที่ 4.48 เมื่อพิจารณาที่ดัชนีความเหมือนที่ 0.445 สามารถแบ่งกล้วยไม้ร่องเท้านารี ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ร่องเท้านารีฝ้าย ร่องเท้านารีเหลืองปราจีน และร่องเท้านารีเหลืองประจวบ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ร่องเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม ร่องเท้านารีเหลืองอุดร และร่องเท้านารีเหลืองกาญจน์ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ร่องเท้านารีเหลืองสิงขร ร่องเท้านารีเหลืองตรัง ร่องเท้านารีเหลืองพังงา ร่องเท้านารีชาวสตูล ร่องเท้านารีชาวชุมพร ร่องเท้านารีช่องอ่างทอง ร่องเท้านารีชาวพังงา และร่องเท้านารีเกรยี่ ซึ่งพบว่าร่องเท้านารีฝ้ายและร่องเท้านารีเหลืองปราจีนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.79 ในขณะที่ร่องเท้านารีฝ้ายกับร่องเท้านารีเหลืองสิงขร และร่องเท้านารีเหลืองอุดรกับร่องเท้านารีเกรยี่แตกต่างกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.30

รองเท้านารีฝ่าหอย	1.00																		
รองเท้านารีเหลืองปราจีน	0.79	1.00																	
รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม	0.45	0.48	1.00																
รองเท้านารีเหลืองกาญจน์	0.40	0.44	0.45	1.00															
รองเท้านารีเหลืองอุดร	0.42	0.49	0.66	0.44	1.00														
รองเท้านารีเหลืองสิงขร	0.30	0.39	0.33	0.37	0.38	1.00													
รองเท้านารีเหลืองศรีง	0.35	0.42	0.37	0.41	0.40	0.48	1.00												
รองเท้านารีเหลืองพงา	0.36	0.42	0.39	0.40	0.40	0.46	0.76	1.00											
รองเท้านารีขาวชุมพร	0.35	0.45	0.40	0.45	0.44	0.52	0.64	0.66	1.00										
รองเท้านารีช่องอ่างทอง	0.34	0.43	0.40	0.45	0.36	0.55	0.60	0.66	0.67	1.00									
รองเท้านารีขาวสตูล	0.36	0.41	0.43	0.35	0.39	0.50	0.64	0.68	0.60	0.64	1.00								
รองเท้านารีขาวพงา	0.40	0.48	0.35	0.46	0.36	0.50	0.55	0.63	0.61	0.63	0.62	1.00							
รองเท้านารีภริ	0.42	0.42	0.38	0.39	0.30	0.45	0.57	0.62	0.59	0.57	0.61	0.55	1.00						
รองเท้านารีเหลืองประจวบ	0.48	0.49	0.41	0.44	0.39	0.38	0.36	0.35	0.39	0.38	0.44	0.40	0.37	1.00					

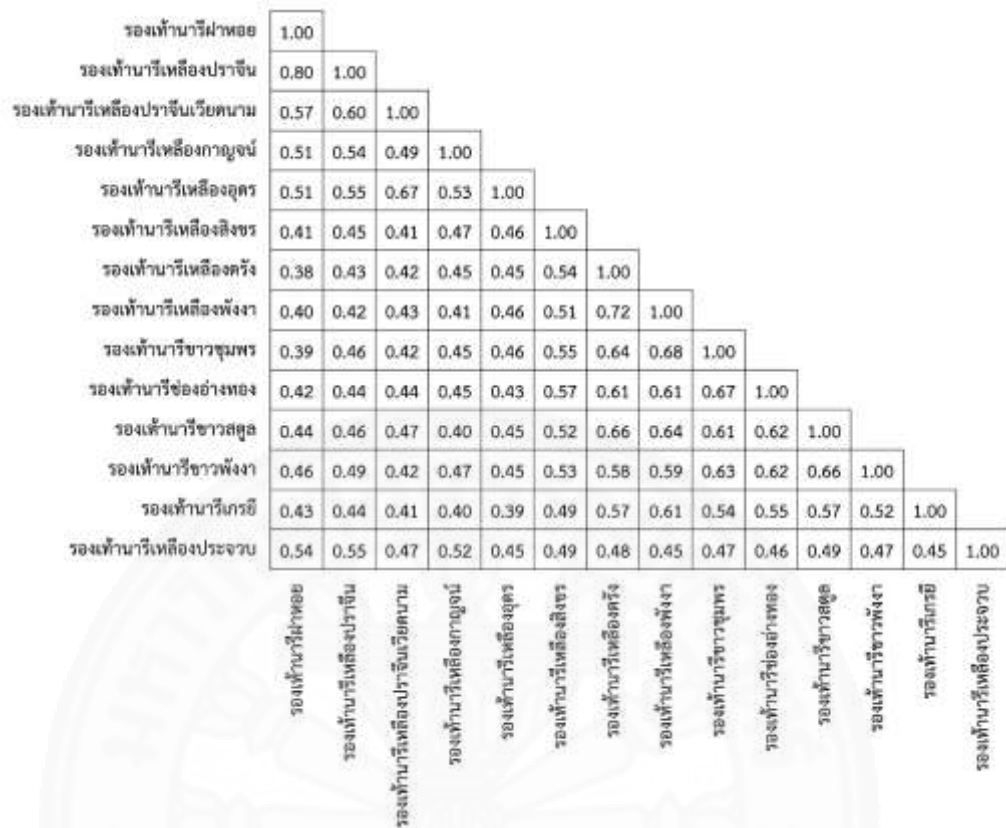
ภาพที่ 4.47 ค่าดัชนีความเหมือนของกล้วยไม้รองเท้านารีที่ได้จากเครื่องหมายสก็อต



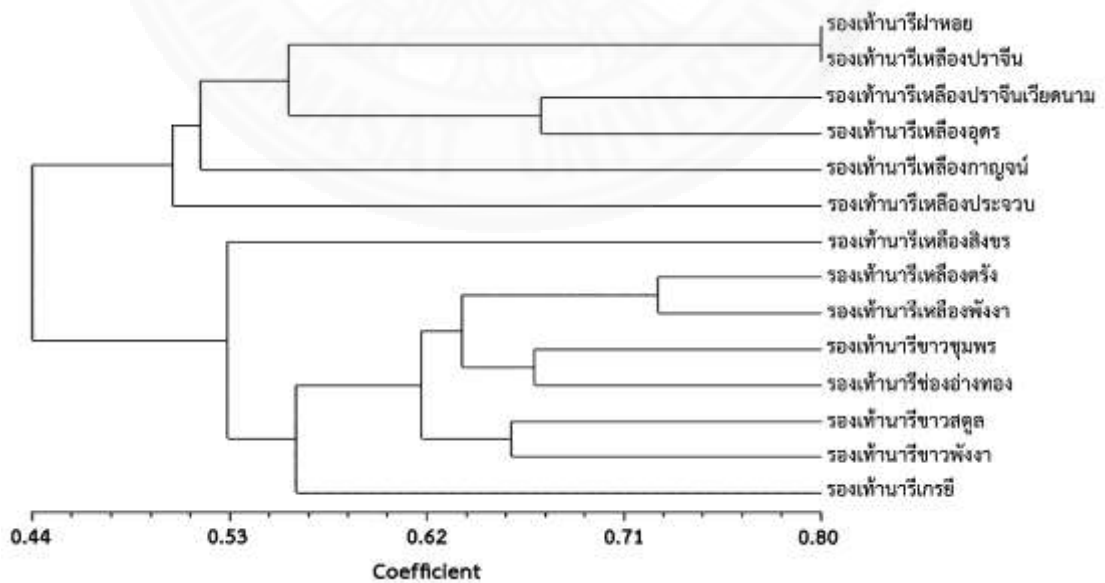
ภาพที่ 4.48 แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีที่ได้จากเครื่องหมายสก็อต

4.3 การวิเคราะห์เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีร่วมกับเครื่องหมายสก็อต

นำข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและเครื่องหมายสก็อตมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ สามารถคำนวณค่าดัชนีความเหมือนได้ระหว่าง 0.38-0.80 ดังภาพที่ 4.49 สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ได้ดังภาพที่ 4.50 เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือนที่ 0.49 สามารถแบ่งกลุ่มรองเท้านารีออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รองเท้านารีฝายหอย รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม รองเท้านารีเหลืองอุดร รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ และรองเท้านารีเหลืองประจวบ กลุ่มที่ 2 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองสิงขร รองเท้านารีเหลืองตรัง รองเท้านารีเหลืองพังงา รองเท้านารีขาวชุมพร รองเท้านารีช่องอ่างทอง รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีขาวพังงา และรองเท้านารีเกรย์ เมื่อวิเคราะห์แผนภูมิที่ได้พบว่ารองเท้านารีฝายหอยและรองเท้านารีเหลืองปราจีนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.80 ในขณะที่รองเท้านารีฝายหอยแตกต่างจากรองเท้านารีเหลืองตรังมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.38 ผลการจัดกลุ่มที่ได้นี้คล้ายคลึงกับเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและเครื่องหมายสก็อต



ภาพที่ 4.49 ค่าดัชนีความเหมือนได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟพีตีร่วมกับเครื่องหมายสก็อต



ภาพที่ 4.50 แผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอฟพีตีร่วมกับเครื่องหมายสก็อต

4.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ

4.4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีนที่ใช้เป็นตำแหน่งจำเพาะ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *rpoC1*, *rbcl*, *matK* และ ซีนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ของกล้วยไม้รองเท้านารี 22 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์จำเพาะพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 22 พันธุ์ โดยแถบที่ได้มีความชัดเจนและมีขนาดที่ถูกต้องตามที่ต้องการ ยีน *rpoC1* มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส ยีน *rbcl* มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส ยีน *matK* มีขนาดประมาณ 850 คู่เบส และซีนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส

4.4.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*, *rbcl*, *matK* และซีนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ของกล้วยไม้รองเท้านารีจำนวน 22 พันธุ์ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในแต่ละพันธุ์ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณยีนนั้น ๆ ของพืช จากนั้นฝากเก็บข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*, *rbcl*, *matK* และ ซีนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 22 พันธุ์ ไว้ที่ฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI และมีหมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ (accession number) แสดงดังตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 หมายเลขจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และยีน *rbcl*

พันธุ์ของกล้วยไม้	หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ (คู่เบส)	
	<i>rpoC1</i>	<i>rbcl</i>
รองเท้านารีฝ้ายหอย	KU201366 (554)	KU183624 (663)
รองเท้านารีเหลืองปราจีน	KU201367 (554)	KU183625 (663)
รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม	KU201368 (554)	KU183626 (663)
รองเท้านารีเหลืองกาญจน์	KU201369 (554)	KU183627 (663)
รองเท้านารีเหลืองอุดร	KU201370 (554)	KU183628 (663)
รองเท้านารีเหลืองสิงขร	KU201371 (554)	KU183629 (663)
รองเท้านารีเหลืองตรัง	KU201372 (554)	KU183630 (663)

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

พันธุ์ของกล้วยไม้	หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ (คู่เบส)	
	<i>rpoC1</i>	<i>rbcL</i>
รองเท้านารีเหลืองพังงา	KU201373 (554)	KU183631 (663)
รองเท้านารีขาวชุมพร	KU201374 (554)	KU183632 (663)
รองเท้านารีช่องอ่างทอง	KU201375 (554)	KU183633 (663)
รองเท้านารีขาวสตูล	KU201376 (554)	KU183634 (663)
รองเท้านารีขาวพังงา	KU201377 (554)	KU183635 (663)
รองเท้านารีเกรยี	KU201378 (554)	KU183636 (663)
รองเท้านารีเหลืองประจวบ	KU201379 (554)	KU183637 (663)
รองเท้านารีมาลีโปเอนเซ	KX265000 (554)	KX264992 (663)
รองเท้านารีแจ้คกิโอ	KX265001 (554)	KX264993 (663)
รองเท้านารีไมแครนทุม	KX265002 (554)	KX264994 (663)
รองเท้านารีเวียดนามเอนเซ	KX265003 (554)	KX264995 (663)
รองเท้านารีเดแลนต์ไอ	KX265004 (554)	KX264996 (663)
รองเท้านารีอาร์เมเนียคุม	KX265005 (554)	KX264997 (663)
รองเท้านารีอีเมอร์โซนิโอ	KX265006 (554)	KX264998 (663)
รองเท้านารีฮานเกียนุม	KX265007 (554)	KX264999 (663)

ตารางที่ 4.2 หมายเลขจำเพาะของยีน *matK* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

พันธุ์ของกล้วยไม้	หมายเลขเฉพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ (คู่เบส)	
	<i>matK</i>	<i>trnH-psbA</i>
รองเท้านารีฝ้ายหอย	KU201380 (850)	KU201394 (931)
รองเท้านารีเหลืองปราจีน	KU201381 (849)	KU201395 (940)
รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม	KU201382 (850)	KU201396 (939)
รองเท้านารีเหลืองกาญจน์	KU201383 (849)	KU201397 (941)
รองเท้านารีเหลืองอุดร	KU201384 (849)	KU201398 (947)
รองเท้านารีเหลืองสิงขร	KU201385 (847)	KU201399 (939)
รองเท้านารีเหลืองตรัง	KU201386 (849)	KU201400 (937)
รองเท้านารีเหลืองพังงา	KU201387 (850)	KU201401 (937)
รองเท้านารีขาวชุมพร	KU201388 (850)	KU201402 (935)
รองเท้านารีช่องอ่างทอง	KU201389 (851)	KU201403 (938)
รองเท้านารีขาวสตูล	KU201390 (850)	KU201404 (938)
รองเท้านารีขาวพังงา	KU201391 (849)	KU201405 (937)
รองเท้านารีเกรยี	KU201392 (849)	KU201406 (941)
รองเท้านารีเหลืองประจวบ	KU201393 (849)	KU201407 (932)
รองเท้านารีมาลีโปเอนเซ	KX352824 (857)	KX265008 (922)
รองเท้านารีแจ๊คกี้ไอ	KX352829 (857)	KX265009 (919)
รองเท้านารีไมแครนทุม	KX352825 (855)	KX265010 (910)
รองเท้านารีเวียดนามเอนเซ	KX352830 (858)	KX265011 (927)
รองเท้านารีเตเลนแต้ไอ	KX352831 (856)	KX265012 (915)
รองเท้านารีอาร์เมเนียคุม	KX352826 (856)	KX265013 (913)
รองเท้านารีอีเมอร์โซนิโอ	KX352827 (829)	KX265014 (922)
รองเท้านารีฮานเกียนุม	KX352828 (830)	KX265015 (919)

4.4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

4.4.3.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 22 พันธุ์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* จำนวน 554 เบส (base) แตกต่างกัน 16 ตำแหน่ง คิดเป็น 2.89 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.51) โดยความแตกต่างในแต่ละตำแหน่งแสดงดังตารางที่ 4.3 การกลายที่เกิดขึ้นมีเพียง 2 รูปแบบ คือ พิวรีนทรานสิชัน (purine transition) 11 ตำแหน่ง คิดเป็น 68.75 เปอร์เซ็นต์ และไพริมิดินทรานสิชัน (pyrimidine transition) 5 ตำแหน่ง คิดเป็น 31.25 เปอร์เซ็นต์ จากการกลายที่เกิดขึ้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน ดังตาราง 4.4

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 22 พันธุ์ มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood สามารถจำแนกรองเท้านารีออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นรองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ ดังตารางที่ 3.1 กลุ่มที่ 2 เป็นรองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ *Parvisepalum* และ หมู่ *Emersonianum* จำนวน 8 พันธุ์ ดังตารางที่ 3.2 และ 3.3 (ภาพที่ 4.53) ซึ่งมีค่าดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรม 0.000-0.018 (ภาพที่ 4.52) จะเห็นได้ว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rpoC1* สามารถจำแนกรองเท้านารีได้ 7 พันธุ์ ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองสิงขร รองเท้านารีเตลเนตไอโอ รองเท้านารีเวียดนามเอนเซ รองเท้านารีอาร์เมเนียคุม รองเท้านารีไมแครนทุม รองเท้านารีอีเมอร์โซเนียนไอ และ รองเท้านารีฮานเกียนุม


```

.....|.....|.....
554
4 CTTATGTTTTCTCA
5 CTTATGTTTTCTCA
2 CTTATGTTTTCTCA
3 CTTATGTTTTCTCA
6 CTTATGTTTTCTCA
7 CTTATGTTTTCTCA
8 CTTATGTTTTCTCA
9 CTTATGTTTTCTCA
10 CTTATGTTTTCTCA
11 CTTATGTTTTCTCA
12 CTTATGTTTTCTCA
13 CTTATGTTTTCTCA
14 CTTATGTTTTCTCA
17 CTTATGTTTTCTCA
18 CTTATGTTTTCTCA
15 CTTATGTTTTCTCA
16 CTTATGTTTTCTCA
20 CTTATGTTTTCTCA
19 CTTATGTTTTCTCA
21 CTTATGTTTTCTCA
22 CTTATGTTTTCTCA
1 CTTATGTTTTCTCA
*****

```

ภาพที่ 4.51 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rhoC1* [1-22 คือ กล้วยไม้รองเท้านารี ได้แก่ (1) รองเท้านารีฝายหอย (2) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (3) รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม (4) รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (5) รองเท้านารีเหลืองอุดร (6) รองเท้านารีเหลืองสิงขร (7) รองเท้านารีเหลืองตรัง (8) รองเท้านารีเหลือง (9) รองเท้านารีขาวชุมพร (10) รองเท้านารีช่องอ่างทอง (11) รองเท้านารีขาวสตูล (12) รองเท้านารีขาวพังงา (13) รองเท้านารีเกรยี (14) รองเท้านารีเหลืองประจวบ (15) รองเท้านารีมาลีโปเอนเซ (16) รองเท้านารีแจ้คกิโอ (17) รองเท้านารีไมแครนทุม (18) รองเท้านารีเวียดนามเอนเซ (19) รองเท้านารีเตลแลนดิโอ (20) รองเท้านารีอาร์เมเนียคุม (21) รองเท้านารีอีเมอร์โซนิโอ และ (22) รองเท้านารีฮานเกียนุม (รูปแบบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ ■ คือ ไพริมิตินทรานสิชัน ■ คือ พิวรีนทรานสิชัน)]

ตารางที่ 4.3 ตำแหน่งที่เกิดความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในยีน *rpoC1*

ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์	พันธุกรรม *	รูปแบบการเปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
93	15-22	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
110	17	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
144	15, 16	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
147	19	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
201	22	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
310	6, 19	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
322	15-22	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
354	15, 16	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
363	18	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
386	22	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
425	21	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
428	15-22	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
472	22	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
474	15, 16, 17, 21, 22	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
528	15-22	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
529	22	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน

ตารางที่ 4.4 กรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปเมื่อลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงของยีน *rpoC1*

ตำแหน่ง	พันธู์กล้วยไม้ *	ลักษณะการกลาย	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน
110	17	G เป็น A	Arg / His
310	6, 19	C เป็น T	Pro / Ser
322	15-22	A เป็น G	Lys / Glu
386	22	G เป็น A	Arg / Lys
425	21	G เป็น A	Gly / Glu
428	15-22	A เป็น G	His / Arg
472	22	G เป็น A	Asp / Asn
529	22	G เป็น A	Glu / Lys

*1-22 คือ (1) รองเท้านารีฝ้ายหอย (2) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (3) รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม (4) รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (5) รองเท้านารีเหลืองอุดร (6) รองเท้านารีเหลืองสิงขร (7) รองเท้านารีเหลืองตรัง (8) รองเท้านารีเหลือง (9) รองเท้านารีขาวชุมพร (10) รองเท้านารีช่องอ่างทอง (11) รองเท้านารีขาวสตูล (12) รองเท้านารีขาวพังงา (13) รองเท้านารีเกรยี (14) รองเท้านารีเหลืองประจวบ (15) รองเท้านารีมาลีโปเอนเซ (16) รองเท้านารีแจ๊คกี้ไอ (17) รองเท้านารีไมแครนทุม (18) รองเท้านารีเวียดนามเอนเซ (19) รองเท้านารีเตเลนตีไอ (20) รองเท้านารีอาร์เมเนียคุม (21) รองเท้านารีอีเมอร์โซนิไอ และ (22) รองเท้านารีฮานเกียนุม

รองเท่านั้นผ่าทอย	0.000																			
รองเท่านั้นเหลืองปราจีน	0.000	0.000																		
รองเท่านั้นเหลืองปราจีนเวียงคานาม	0.000	0.000	0.000																	
รองเท่านั้นเหลืองกาญจน์	0.000	0.000	0.000	0.000																
รองเท่านั้นเหลืองอุดร	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000															
รองเท่านั้นเหลืองสิงขร	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000														
รองเท่านั้นเหลืองห้วย	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000													
รองเท่านั้นเหลืองพิงา	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000												
รองเท่านั้นราชวสุพร	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000											
รองเท่านั้นช่องอำพลอง	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000										
รองเท่านั้นราชวสุดล	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
รองเท่านั้นราชวพิงา	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
รองเท่านั้นกรรณิ	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000							
รองเท่านั้นเหลืองประจวบ	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
รองเท่านั้นรชกสิปโฆนเส	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.015	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.000					
รองเท่านั้นแจคกีโ	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.015	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.000	0.000				
รองเท่านั้นไมแครนตุม	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.013	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.005	0.005	0.000			
รองเท่านั้นรียคตนาแอนเส	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.011	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.007	0.007	0.005	0.000		
รองเท่านั้นสเตนคิโอ	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.009	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.009	0.009	0.007	0.005	0.000	
รองเท่านั้นอานเนียม	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.009	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.005	0.005	0.004	0.002	0.004	0.000
รองเท่านั้นอิมอริไซโน	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.013	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.005	0.005	0.004	0.005	0.007	0.004
รองเท่านั้นฮานเกียนุม	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.018	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.011	0.011	0.009	0.011	0.013
รองเท่านั้นผ่าทอย																				
รองเท่านั้นเหลืองปราจีน																				
รองเท่านั้นเหลืองปราจีนเวียงคานาม																				
รองเท่านั้นเหลืองกาญจน์																				
รองเท่านั้นเหลืองอุดร																				
รองเท่านั้นเหลืองสิงขร																				
รองเท่านั้นเหลืองห้วย																				
รองเท่านั้นเหลืองพิงา																				
รองเท่านั้นราชวสุพร																				
รองเท่านั้นช่องอำพลอง																				
รองเท่านั้นราชวสุดล																				
รองเท่านั้นราชวพิงา																				
รองเท่านั้นกรรณิ																				
รองเท่านั้นเหลืองประจวบ																				
รองเท่านั้นรชกสิปโฆนเส																				
รองเท่านั้นแจคกีโ																				
รองเท่านั้นไมแครนตุม																				
รองเท่านั้นรียคตนาแอนเส																				
รองเท่านั้นสเตนคิโอ																				
รองเท่านั้นอานเนียม																				
รองเท่านั้นอิมอริไซโน																				
รองเท่านั้นฮานเกียนุม																				
รองเท่านั้นผ่าทอย																				

ภาพที่ 4.52 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน rpoC1



ภาพที่ 4.53 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rpoC1* ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

4.4.3.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl*

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของกล้วยไม้รองเท้านารี ทั้ง 22 พันธุ์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* จำนวน 663 เบส (base) แตกต่างกัน 6 ตำแหน่ง คิดเป็น 0.90 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.54) โดยความแตกต่างในแต่ละตำแหน่งแสดงดังตารางที่ 4.5 รูปแบบการกลายที่เกิดขึ้น ได้แก่ ทรานสเวอร์ชัน (transversion) 3 ตำแหน่ง คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) 2 ตำแหน่ง คิดเป็น 33.33 เปอร์เซ็นต์ และพิวรีนทรานสิชัน (purine transition) 1 ตำแหน่ง คิดเป็น 16.67 เปอร์เซ็นต์ และพบการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนเพียง 1 ชนิดคือตำแหน่งที่ 456 ของรองเท้านารีฝ้ายหอย รองเท้านารีเหลืองตรัง รองเท้านารีมาลีโปเอนเซ รองเท้านารีโมแคร์นทุม รองเท้านารีเวียดนามเอนเซ รองเท้านารีฮีมอไซนีโอ และรองเท้านารีฮานเกียนุม ลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนจาก T เป็น G ทำให้กรดอะมิโนฮิสทีดีน (histidine; His) เปลี่ยนเป็นกลูตามีน (glutamine; Gln)

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 22 พันธุ์ มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood สามารถจำแนกรองเท้านารีออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นรองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum*

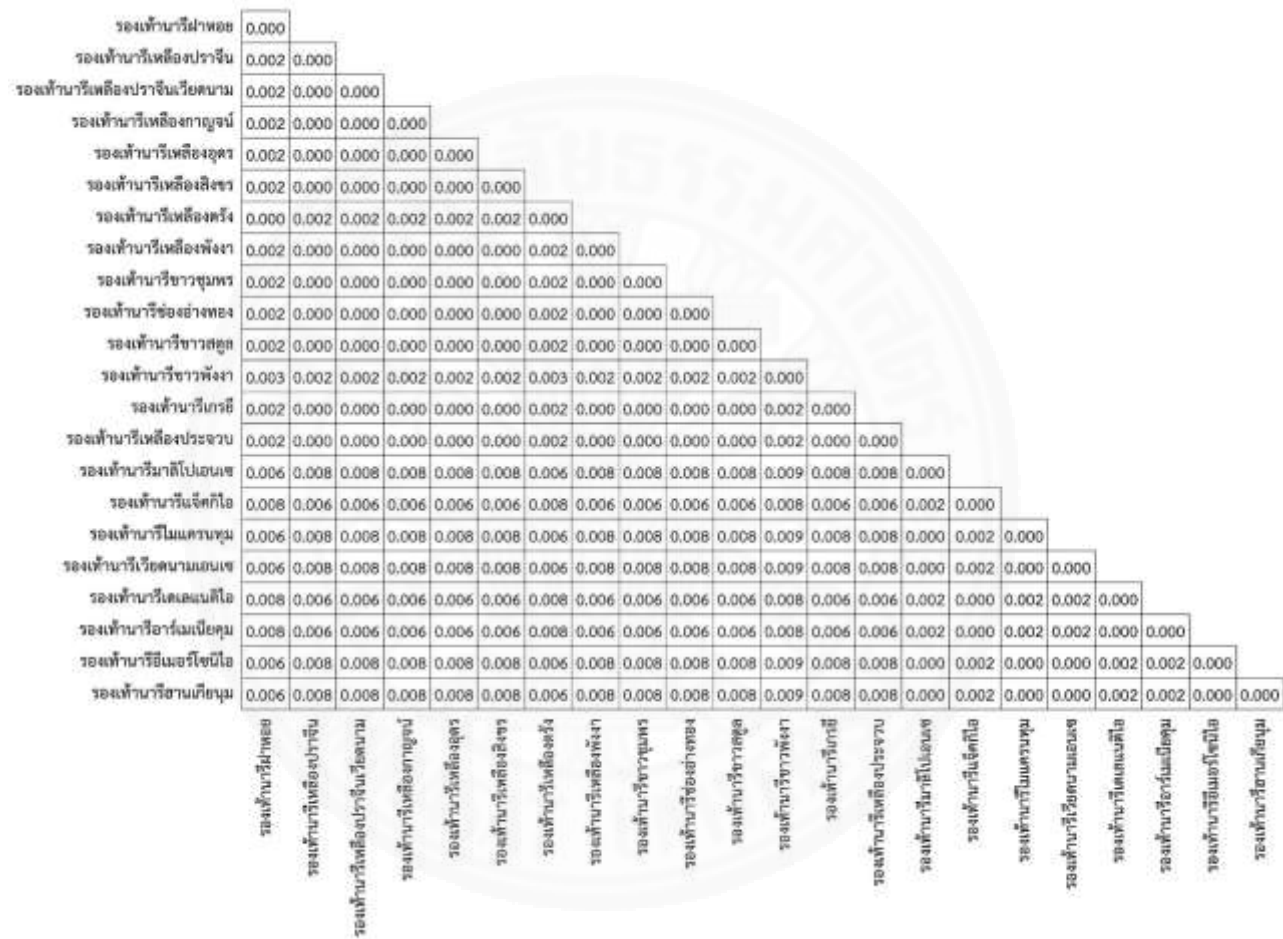
	...
	663
19	GCC
21	GCC
15	GCC
16	GCC
17	GCC
18	GCC
20	GCC
22	GCC
2	GCC
13	GCC
14	GCC
11	GCC
8	GCC
10	GCC
9	GCC
12	GCC
6	GCC
5	GCC
4	GCC
3	GCC
7	GCC
1	GCC

ภาพที่ 4.54 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* [1-22 คือ กล้วยไม้รองเท้านารี ได้แก่ (1) รองเท้านารีฝ้ายหอย (2) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (3) รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม (4) รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (5) รองเท้านารีเหลืองอุดร (6) รองเท้านารีเหลืองสิงขร (7) รองเท้านารีเหลืองตรัง (8) รองเท้านารีเหลือง (9) รองเท้านารีขาวชุมพร (10) รองเท้านารีช่องอ่างทอง (11) รองเท้านารีขาวสตูล (12) รองเท้านารีขาวพังงา (13) รองเท้านารีเกรยี (14) รองเท้านารีเหลืองประจวบ (15) รองเท้านารีมาลีโปเอนเซ (16) รองเท้านารีแจ้คกิโอ (17) รองเท้านารีไมแครนทุม (18) รองเท้านารีเวียดนามเอนเซ (19) รองเท้านารีเคเลแนติโอ (20) รองเท้านารีอาร์เมเนียคุม (21) รองเท้านารีอีเมอร์โซนิโอ และ (22) รองเท้านารีฮานเกียนุม รูปแบบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ ■ คือ ทรานสเวอร์ชัน ■ คือ ไพรมิตินทรานสิชัน ■ คือ พิวรีนทรานสิชัน]

ตารางที่ 4.5 ตำแหน่งที่เกิดความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในยีน *rbCL*

ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์	พันธุ์กล้วยไม้ *	รูปแบบการเปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
162	15-22	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
174	12	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
261	15-22	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
432	15-22	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
447	15-22	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
456	1, 7, 15, 17, 18, 21, 22	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน

*1-22 คือ (1) รองเท้านารีฝาทอย (2) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (3) รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม (4) รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (5) รองเท้านารีเหลืองอุดร (6) รองเท้านารีเหลืองสิงขร (7) รองเท้านารีเหลืองตรัง (8) รองเท้านารีเหลือง (9) รองเท้านารีขาวชุมพร (10) รองเท้านารีช่องอ่างทอง (11) รองเท้านารีขาวสตูล (12) รองเท้านารีขาวพังงา (13) รองเท้านารีเกรยี (14) รองเท้านารีเหลืองประจวบ (15) รองเท้านารีมาลีโปเอนเซ (16) รองเท้านารีแจ้คกิโอ (17) รองเท้านารีไม้แคระนทุม (18) รองเท้านารีเวียดนามเอนเซ (19) รองเท้านารีเดเลนตีโอ (20) รองเท้านารีอาร์เมเนียคุม (21) รองเท้านารีอีเมอร์โซนิโอ และ (22) รองเท้านารีฮานเกียนุม



ภาพที่ 4.55 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rbcl*



ภาพที่ 4.56 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rbcL* ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

4.4.3.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK*

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้รองเท้านารี 22 พันธุ์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* จำนวน 863 เบส แตกต่างกัน 173 ตำแหน่ง คิดเป็น 20.05 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.57) ความแตกต่างในแต่ละตำแหน่งแสดงดังตารางที่ 4.6 โดยรูปแบบการกลายที่เกิดขึ้น ได้แก่ โดยเป็นการกลายแบบทรานสเวอร์ชัน (transversion) 73 ตำแหน่ง คิดเป็น 42.20 เปอร์เซ็นต์ อินเดล (indel) 50 ตำแหน่ง คิดเป็น 28.90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นการกลายแบบเพิ่มเข้ามา (insertion) 13 ตำแหน่ง และเป็นการกลายแบบขาดหายไป (deletion) 37 ตำแหน่ง ไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) 25 ตำแหน่ง คิดเป็น 14.45 เปอร์เซ็นต์ และพิวรีนทรานสิชัน (purine transition) 25 ตำแหน่ง คิดเป็น 14.45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเกิดการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนแสดงดังตารางที่ 4.7

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ของกล้วยไม้รองเท้านารี 22 พันธุ์ มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood สามารถจำแนกรองเท้านารีออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นรองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ ดังตารางที่ 3.1 กลุ่มที่ 2 เป็นรองเท้านารีสกุล

Paphiopedilum สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ *Parvisepalum* และ หมู่ *Emersonianum* ทั้งหมด 8 พันธุ์ตามตารางที่ 3.2 และ 3.3 (ภาพที่ 4.59) มีค่าดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.000-0.050 (ภาพที่ 4.58) แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สามารถจำแนกรองเท่านั้นได้บางพันธุ์เท่านั้น โดยจำแนกรองเท่านั้นได้ 10 พันธุ์จาก 22 พันธุ์ จะเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท่านั้นได้ดีกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *rbcl*

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      10      20      30      40      50      60
17 TAATTTACGATCAATTCATTCAATAT---TTCCCTTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
22 TAATTTACGATCAATTCATTCAATAT---TTCCCTTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
15 TAATTTACGATCAATTCATTCAATAT---TTCCCTTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
16 TAATTTACGATCAATTCATTCA-TAT---TTCCCTTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
1 TAATTTACGATCAATTCATTCC-----CC-TTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
3 TAATTTACGATCAATTCATTCC-----CC-TTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
8 TAATTTACGATCAATTCATTCC-----CC-TTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
11 TAATTTACGATCAATTCATTCC-----CC-TTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
9 TAATTTACGATCAATTCATTCC-----CC-TTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
10 TAATTTACGATCAATTCATTCC-----CC-TTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
6 TAATTTACGATCAATTCATTCC-----CT---TTTAGAG-ACAAATTTTACATTT
2 TAATTTACGATCAATTCATTCC-----CC-TTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
4 TAATTTACGATCAATTCATTCC-----CC-TTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
5 TAATTTACGATCAATTCATTCC-----CC-TTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
12 TAATTTACGATCAATTCATTCC-----CC-TTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
13 TAATTTACGATCAATTCATTCC-----CC-TTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
14 TAATTTACGATCAATTCATTCC-----CT---TTTAGAGGACAAATTTTACATTT
7 TAATTTACGATCAATTCATTCC-----CT---TTTAGAGGACAAATTTTACATTT
18 TAATTTACGATCAATTCATTCAATAT---TTCCCTTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
19 TAATTTACGATCAATTCATTCCATAT---TTCC-CTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
21 TAATTTACGATCAATTCATTCAATAT---TTCC-CTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
20 TAATTTACGATCAATTCATTCAATCAATTTCCCTTTTGTAGAGGACAAATTTTACATTT
*****
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      70      80      90      100     110     120
17 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
22 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
15 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
16 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
1 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
3 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
8 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
11 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
9 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
10 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
6 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
2 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
4 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
5 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
12 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
13 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
14 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
7 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
18 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
19 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
21 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
20 GAATTATGTTGTCAGATCTACTAATACCTCATCCCATACATCTGGAAATCTGGTTCAAGT
*****

```



```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      670      680      690      700      710      720
17 AGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
22 AGTGAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
15 AGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
16 AGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
1  AGTAAGAAATAAAATGCTAGAGAATTCATTTATAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
3  AGTAAGAAATAAAATGCTAGAGAATTCATTTATAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
8  AGTAAGAAATAAAATGCTAGAGAATTCATTTATAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
11 AGTAAGAAATAAAATGCTAGAGAATTCATTTATAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
9  AGTAAGAAATAAAATGCTAGAGAATTCATTTATAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
10 AGTAAGAAATAAAATGCTAGAGAATTCATTTATAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
6  AGTAAGAAATAAAATGCTAGAGAATTCATTTATAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
2  AGTAAGAAATAAAATGCTAGAGAATTCATTTATAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
4  AGTAAGAAATAAAATGCTAGAGAATTCATTTATAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
5  AGTAAGAAATAAAATGCTAGAGAATTCATTTATAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
12 AGTAAGAAATAAAATGCTAGAGAATTCATTTATAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
13 AGTAAGAAATAAAATGCTAGAGAATTCATTTATAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
14 AGTAAGAAATAAAATGCTAGAGAATTCATTTATAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
7  AGTAAGAAATAAAATGCTAGAGAATTCATTTATAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
18 AGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
19 AGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAATATTATGACTCATAAAATTATA
21 FTTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAATATTTTACTCATAAAATTATA
20 TGGTAAGAAATCAAATGCTAGAGAATTCATTTCTAATAAATATTTTCTCATAAAATTATA
      *****

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      730      740      750      760      770      780
17 TACCATAGCACCAGTCTTTCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAACCAAATTTTGTGG-G
22 TACCATAGCACCAGTCTTTCTCTTATTGGATCATTGTC-AAAACCAAATTTTGGGGTG
15 TACCATAGCTCCAGTCTTTCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-AAATTTTGTACTG
16 TACCATAGCTCCAGTCTTTCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-AAATTTTGTACTG
1  TACCATAGTCCCAGTCTGCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-CAATTTTGTACTG
3  TACCATAGTCCCAGTCTGCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-CAATTTTGTACTG
8  TACCATAGTCCCAGTCTGCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-CAATTTTGTACTG
11 TACCATAGTCCCAGTCTGCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-AAATTTTGTACTG
9  TACCATAGTCCCAGTCTGCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-AAATTTTGTACTG
10 TACCATAGTCCCAGTCTGCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-AAATTTTGTACTG
6  TACCATAGTCCCAGTCTGCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-AAATTTTGTACTG
2  TACCATAGTCCCAGTCTGCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-CAATTTTGTACTG
4  TACCATAGTCCCAGTCTGCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-CAATTTTGTACTG
5  TACCATAGTCCCAGTCTGCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-CAATTTTGTACTG
12 TACCATAGTCCCAGTCTGCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-AAATTTTGTACTG
13 TACCATAGTCCCAGTCTGCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-AAATTTTGTACTG
14 TACCATAGTCCCAGTCTGCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-AAATTTTGTACTG
7  TACCATAGTCCCAGTCTGCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-AAATTTTGTACTG
18 TACCATAGTCCCAGTCTTTCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-CAATTTTGTACTG
19 TACCATAGTCCCAGTCTTTCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-CAATTTTGTACTG
21 TACCATAGTCCCAGTCTTTCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-AAATTTTGTACTG
20 TACCATAGTCCCAGTCTTTCTCTTATTGGATCATTGTCGAAAGCT-AAATTTTGTACTG
      **** *

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      790      800      810      820      830      840
17 AAATGGGTCAGCCTATTAGAAA--CAGAC--CGACCGAGTCCCAGGATCGGATTTTATA
22 AAATGGGTCAGCCTATAAGAA-----AC--CGAAC-----TG
15 TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
16 TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
1  TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
3  TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
8  TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
11 TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
9  TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
10 TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
6  TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
2  TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
4  TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
5  TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
12 TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
13 TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
14 TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
7  TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
18 TATTGGGTCATCCTATTAGTAAACCGATC-TGGACCGATTTATCGGATTCGATATTATT
19 AAATGGGTCAGCCTATTAGAAAACAGAGC-CGGACCGACCCATCGGATTCGATATTATA
21 AAATGGGTCATCCTATTACAAA-----C--CGAGAC-----CC
20 AAAAGGGCCCGCGGATATCTAAACAGACCTCAGACCGATTCAGCGTATTTCGA----TATT
      *  *** *  ** ** *

```

```

      ....|....|....|....|...
      850                863
17  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
22  GACCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
15  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
16  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
1  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
3  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
8  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
11  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
9  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
10  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
6  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
2  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
4  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
5  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
12  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
13  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
14  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
7  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
18  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
19  GATCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
21  CACCGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
20  AA-CGACTTTCCTTGTGCTAGAAC
      * *****

```

ภาพที่ 4.57 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* [1-22 คือ กล้วยไม้รองเท้านารี ได้แก่ (1) รองเท้านารีฝ้ายหอย (2) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (3) รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม (4) รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (5) รองเท้านารีเหลืองอุดร (6) รองเท้านารีเหลืองสิงขร (7) รองเท้านารีเหลืองตรัง (8) รองเท้านารีเหลือง (9) รองเท้านารีขาวชุมพร (10) รองเท้านารีช่องอ่างทอง (11) รองเท้านารีขาวสตูล (12) รองเท้านารีขาวพังงา (13) รองเท้านารีเกรยี (14) รองเท้านารีเหลืองประจวบ (15) รองเท้านารีมาลีโปเอนเซ (16) รองเท้านารีแจ้คกิโอ (17) รองเท้านารีไมแครนทุม (18) รองเท้านารีเวียดนามเอนเซ (19) รองเท้านารีเคเลแนติโอ (20) รองเท้านารีอาร์เมเนียคุม (21) รองเท้านารีอีเมอร์โซนิโอ และ (22) รองเท้านารีฮานเกียนุม (รูปแบบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ คือ อินเดล คือ ทรานสเวอร์ชัน คือ ไพรมิตินทรานสชัน คือ พิวรินทรานสชัน คือ การกลายหลายรูปแบบ)]

ตารางที่ 4.6 ตำแหน่งที่เกิดความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในยีน *matK*

ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์	พันธุกรรมกล้วยไม้ *	รูปแบบการเปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
22	15-22	Gap (insertion)	อินเดล
23	15, 17, 18, 19, 20, 21, 22	Gap (insertion)	อินเดล
24-26	15-22	Gap (insertion)	อินเดล

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

ตำแหน่งลำดับ นิวคลีโอไทด์	พันธู์กล้วยไม้ *	รูปแบบการ เปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
27-29	20	Gap (insertion)	อินเดล
30-31	15-22	Gap (insertion)	อินเดล
32	20	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
33	6, 7, 14	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
34	10, 15, 16, 17, 18, 20, 22	Gap (insertion)	อินเดล
35	2, 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14	Gap (deletion)	อินเดล
	19, 20, 21	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
36	6	Gap (deletion)	อินเดล
44	6	Gap (deletion)	อินเดล
47	19	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
54	15, 19, 20	Gap (deletion)	อินเดล
69	20	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
110	15, 16	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
122	3, 5	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
150	17	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
151	17	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
154	22	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
155	18	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
163	21	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
176	18	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
203	15-22	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
214	15, 16, 17, 19, 20, 21, 22	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
	18	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
215	15-22	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
249	19	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
253	15, 16, 17, 21, 22	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

ตำแหน่งลำดับ นิวคลีโอไทด์	พันธู์กล้วยไม้ *	รูปแบบการ เปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
325	15, 16, 17, 21, 22	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
334	15, 16, 17, 21, 22	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
344	8, 10, 11	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
360	20	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
421	20	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
472	15, 16, 17, 21, 22	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
496	16	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
529	17	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
539	15-22	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
559	15, 16	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
583	15, 16	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
585	21	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
586	15-22	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
	9	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
595	21	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
626	20	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
628	15, 16, 18-22	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
629	19, 21	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
637	19, 20	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
638	20, 21	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
642	20	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
647	21, 22	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
652	19, 20	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
	21	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
653	17	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
654	15, 16, 18, 22	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

ตำแหน่งลำดับ นิวคลีโอไทด์	พันธู์กล้วยไม้ *	รูปแบบการ เปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
655	22	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
656	20	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
661	20, 21	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
662	21	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
663	20	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
664	19, 22	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
671	15, 16, 17, 19, 20, 21, 22	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
678	21	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
679	20	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
692	15-22	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
704	20, 21	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
707	20	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
714	19	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
715	20, 21	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
725	20	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
728	20	G เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
729	15-22	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
730	15, 16, 18, 19, 21	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
	17, 22	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
733	20	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
734	20	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
736	21	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
737	17, 19, 21	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
	20	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
739	15-22	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
751	20	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

ตำแหน่งลำดับ นิวคลีโอไทด์	พันธุ์กล้วยไม้ *	รูปแบบการ เปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
752	19	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
	20	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
755	20	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
760	22	Gap (deletion)	อินเดล
764	17, 20	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
765	20	C เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
766	17, 19, 20, 22	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
767	17, 20, 22	Gap (insertion)	อินเดล
768	1-5, 14, 18-20	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
774	20	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
776	22	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
777	17, 21, 22	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
	20	Gap (deletion)	อินเดล
778	17	C เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
779	17	Gap (deletion)	อินเดล
781	17, 19, 20, 21, 22	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
783	17, 20, 21, 22	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
784	20	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
788	20	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
790	22	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
	20	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
791	17, 19, 20, 22	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
794	20	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
797	20	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
798	20	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
799	20, 21	G เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

ตำแหน่งลำดับ นิวคลีโอไทด์	พันธุ์กล้วยไม้ *	รูปแบบการ เปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
800	17, 19, 21, 22	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
802	22	Gap (deletion)	อินเดล
803	17, 21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
804	17, 21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
805	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
	19, 20	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
806	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
	17	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
807	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
	17	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
808	21	Gap (deletion)	อินเดล
	17, 22	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
	19	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
	20	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
810	20	Gap (insertion)	อินเดล
811	17, 19, 20, 21, 22	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
812	20	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
813	21, 22	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
	17	G เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
814	21	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
815	21	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
817	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
818	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
819	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
	17	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
	19	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

ตำแหน่งลำดับ นิวคลีโอไทด์	พันธุ์กล้วยไม้ *	รูปแบบการ เปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
820	4, 22	Gap (deletion)	อินเดล
	19	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
821	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
	17, 19, 20	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
822	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
	17	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
823	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
	17	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
	20	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
824	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
825	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
826	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
	20	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
827	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
828	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
829	17, 21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
830	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
831	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
	17, 20	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
832	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
833	20, 21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
834	20, 21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
835	20, 21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
	17	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
836	20, 21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
837	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

ตำแหน่งลำดับ นิวคลีโอไทด์	พันธุกรรม * พันธุกรรม	รูปแบบการ เปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
838	21, 22	Gap (deletion)	อินเดล
839	21	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
840	17, 19	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
	21	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
	22	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
841	20	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
	22	G เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
843	20	Gap (deletion)	อินเดล
	21, 22	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน

ตารางที่ 4.7 กรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปเมื่อลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงของยีน *matK*

ตำแหน่ง	พันธุกรรม * พันธุกรรม	ลักษณะการกลาย	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน
69	20	T เป็น C	Val / Ala
122	3, 5	C เป็น A	Leu / Ile
150	17	C เป็น T	Ser / Phe
154	22	G เป็น T	Leu / Phe
155	18	C เป็น A	His / Asn
163	21	G เป็น T	Leu / Phe
176	18	C เป็น T	His / Tyr
203	15-22	G เป็น A	Val / Ile
214	18	A เป็น T	Lys / Asn
215	15-22	A เป็น G	Lys / Glu
249	19	A เป็น G	Lys / Arg
253	15, 16, 17, 21, 22	C เป็น A	Phe / Leu

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

ตำแหน่ง	พันธู์กล้วยไม้ *	ลักษณะการกลาย	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน
344	8, 10, 11	T เป็น C	Ser / Pro
360	20	A เป็น C	Glu / Ala
421	20	G เป็น T	Gln / His
529	17	T เป็น G	Phe / Leu
539	15-22	A เป็น C	Asn / His
559	15, 16	T เป็น G	Phe / Leu
585	21	T เป็น G	Ile / Ser
626	20	G เป็น T	Gly / Trp
629	19, 21	T เป็น G	Tyr / Asp
642	20	T เป็น A	Val / Glu
647	21, 22	G เป็น A	Glu / Lys
652	19, 20	T เป็น A	Asn / Lys
	21	T เป็น G	Asn / Lys
653	17	C เป็น A	His / Asn
	19	C เป็น A	His / Lys
654	15, 16, 18, 22	A เป็น G	His / Arg
655	19	T เป็น A	His / Lys
656	20	T เป็น A	Leu / Met
662	21	G เป็น T	Val / Leu
663	20	T เป็น G	Val / Gly
671	15-17, 19-22	A เป็น C	Lys / Gln
678	21	T เป็น G	Leu / Arg
692	15-22	A เป็น C	Ile / Leu
704	20, 21	A เป็น T	Met / Leu
707	20	A เป็น T	Thr / Ser
714	19	A เป็น T	Lys / Ile

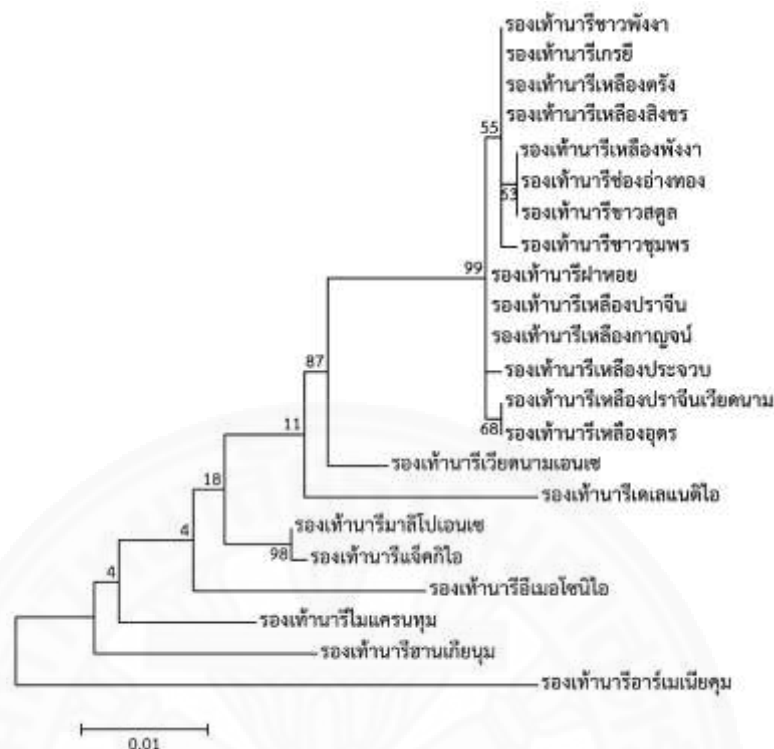
ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

ตำแหน่ง	พันธู์กล้วยไม้ *	ลักษณะการกลาย	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน
715	20, 21	A เป็น T	Lys / Asn
725	20	A เป็น G	Ile / Val
728	20	G เป็น C	Val / Pro
729	20	T เป็น C	Val / Pro
	15-19, 21, 22	T เป็น C	Val / Ala
730	15-19, 21, 22	C เป็น T	Val / Ala
734	20	G เป็น T	Val / Phe
737	17, 19, 21	A เป็น C	Met / Leu
	20	A เป็น T	Met / Phe
739	15, 16, 18, 22	G เป็น T	Met / Ile
	17, 19, 21	G เป็น T	Met / Leu
	20	G เป็น T	Met / Phe
752	19	T เป็น G	Ser / Ala
	20	T เป็น A	Ser / Thr
764	17	G เป็น A	Ala / Thr
	20	G เป็น A	Ala / Arg
	22	G เป็น C	Ala / Gln
765	20	C เป็น G	Ala / Arg
	22	C เป็น A	Ala / Gln
766	17	T เป็น A	Ala / Thr
	20	T เป็น A	Ala / Arg
766	22	T เป็น A	Ala / Gln
774	22	T เป็น G	Leu / Trp
776	20	T เป็น G	Tyr / Val
	22	T เป็น G	Tyr / Ala
777	17	A เป็น G	Tyr / Trp
	20	A เป็น T	Tyr / Val

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

ตำแหน่ง	พันธู์กล้วยไม้ *	ลักษณะการกลาย	การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน
777	21	A เป็น G	Tyr / Cys
	22	A เป็น C	Tyr / Ala
778	17	C เป็น G	Tyr / Trp
	22	C เป็น T	Tyr / Ala
783	17, 21	T เป็น A	Ile / Asn
	20	T เป็น A	Ile / Lys
	22	T เป็น A	Ile / Met
784	20	T เป็น A	Ile / Lys
788	20	T เป็น C	Ser / Pro
790	20	A เป็น C	Ser / Pro
791	17, 19, 20	T เป็น G	Ser / Ala
794	20	T เป็น G	Tyr / Asp

*1-22 คือ (1) รองเท้านารีฟาหอย (2) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (3) รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม (4) รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (5) รองเท้านารีเหลืองอุดร (6) รองเท้านารีเหลืองสิงขร (7) รองเท้านารีเหลืองตรัง (8) รองเท้านารีเหลือง (9) รองเท้านารีขาวชุมพร (10) รองเท้านารีช่องอ่างทอง (11) รองเท้านารีขาวสตูล (12) รองเท้านารีขาวพังงา (13) รองเท้านารีเกรยี (14) รองเท้านารีเหลืองประจวบ (15) รองเท้านารีมาลีโปเอนเซ (16) รองเท้านารีแจ้คกิโอ (17) รองเท้านารีไมแครนทุม (18) รองเท้านารีเวียดนามเอนเซ (19) รองเท้านารีเดแลนติโอ (20) รองเท้านารีอาร์เมเนียคุม (21) รองเท้านารีอีเมอร์โซนิโอ และ (22) รองเท้านารีฮานเกียนุม



ภาพที่ 4.59 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *matK* ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

4.4.3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันติเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้รองเท้านารี 22 พันธุ์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* จำนวน 1004 เบส แตกต่างกัน 235 ตำแหน่ง คิดเป็น 23.41 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.60) โดยความแตกต่างในแต่ละตำแหน่งแสดงดังตารางที่ 4.8 รูปแบบการกลายที่เกิดขึ้น ได้แก่ อินเดล (indel) 161 ตำแหน่ง คิดเป็น 59.63 เปอร์เซ็นต์ แบ่งเป็นการกลายแบบเพิ่มเข้ามา (insertion) 63 ตำแหน่ง และขาดหายไป (deletion) 98 ตำแหน่ง ทรานสเวอร์ชัน (transversion) 67 ตำแหน่ง คิดเป็น 24.81 เปอร์เซ็นต์ พิวรีนทรานสิชัน (purine transition) 22 ตำแหน่ง คิดเป็น 8.15 เปอร์เซ็นต์ และไพริมิดีนทรานสิชัน (pyrimidine transition) 20 ตำแหน่ง คิดเป็น 7.41 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 22 พันธุ์ มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้สามารถจำแนกรองเท้านารีออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 เป็นรองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum*


```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      790      800      810      820      830      840
1  ATATATGTATGTATGCTGTTTTCAAAGCACGACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
3  ATATATGTATGTATGCTGTTTTCAAAGCACGACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
14 ATATATGTATGTATGCTGTTTTCAAAGCACGACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
8  ATATATGTATGTATGCTGTTTTCAAAGCACGACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
11 ATATATGTATGTATGCTGTTTTCAAAGCACGACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
6  ATATATGTATGTATGCTGTTTTCAAAGCACGACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
12 ATATATGTATGTATGCTGTTTTCAAAGCACGACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
4  ATATATGTATGTATGCTGTTTTCAAAGCACGACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
5  ATATATGTATGTATGCTGTTTTCAAAGCACGACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
13 ATATATGTATGTATGCTGTTTTCAAAGCACGACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
9  ATATATGTATGTATGCTGTTTTCAAAGCACGACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
10 ATATATGTATGTATGCTGTTTTCAAAGCACGACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
7  ATATATGTATGAATGCTGTTTTCAAAGCACGACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
2  ATATATGTATGTATGCTGTTTTCAAAGCACGACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
19 ATACTG-----GACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
20 ATACTG-----GACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
16 ATACTG-----GACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
17 ATACTG-----GACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
22 ATACTG-----GACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
15 ATACTG-----GACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
18 ATACTG-----GACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
21 ATATATGTATGTAT-----GTACCCCTGAATCCTGAATTGAATCCTTACA
*** ***** * ***** * ***** *

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      850      860      870      880      890      900
1  AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
3  AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
14 AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
8  AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
11 AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
6  AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
12 AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
4  AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
5  AG--GTA A AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
13 AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
9  AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
10 AG--GTA A AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
7  AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
2  AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
19 AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
20 AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
16 AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
17 AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
22 AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
15 AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
18 AGG-TAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
21 AGGGTAAA AATACCCATATCTTGTAAAGATATGGG-ATTTTACCTTCAAAAATT-CA
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      910      920      930      940      950      960
1  TATACATATAAATGTATACAAAAATATATCCATTG-----
3  TATACTTATAAAG-TATACAAAAATATATCCATTG-----
14 TATACATATAAATGTATACAAAAATATATCCATTG-----
8  TATACATATAAATGTATACAAAAATATATCCATTG-----
11 TATACGTATAAATGTATACAAAAATATATCCATTG-----
6  TATACTTATAAATGTATACAAAAATATATCCATTG-----
12 TATACATATAAATGTATACAAAAATATATCCATTG-----
4  TATACATATAAATGTATACAAAAATATATCCATTG-----
5  TATACATATATG-TATACAAAAATATATCCATTG-----
13 TATACATATAAATGTATACAAAAATATATCCATTG-----
9  TATACATATAAATGTATACAAAAATATATCCATTG-----
10 TATACATATAAATGTATACAAAAATATATCCATTG-----
7  TATACGTATAAATGTATACAAAAATATATCCATTG-----
2  TATACATATAAATGTATACAAAAATATATCCATTG-----
19 TATACATATAAATGTATACA-GAGTATATCCATTG-TAGAGGTAGCTTCTACAGAAGC
20 TATACATATAAATGTATACA-AAG-TATATCCATTG-TAGAGGTAGCTTCTACAGAAGC
16 TATACATATAAATGTATACAGAAGTATATCCATTG-TAGAGGTAGCTTCTACAGAAGC
17 TATACATATAAATGTATACAAAAGTATATCCATTG-TAGAGGTAGCTTCTACAGAAGC
22 TATACATATAAATGTATACAAAAG-TATATCCATTG-TAGAGGTAGCTTCTACAGAAGC
15 TATACATATAAATGTATACAAAAGTATATCCATTTGTAGAGGTAGCTTCTACAGAAGC
18 TATACATATAAATGTATACAAAAG-TATATCCATTGTAGAGGTAGCTTCTACAGAAGC
21 TATACATATAAATGTATACAAAAGTATATCCATTGT--AGAGGTAACTTCTCG-GAGC
***** * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
          970      980      990      1004
1  -----TAGAGGGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
3  -----TAGAGGGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
14 -----TAGAGGGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
8  -----TAGAG-----CATTACGTTTCATGCATAAC
11 -----TAGAGGGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
6  -----TAGAGGGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
12 -----TAGAGGGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
4  -----TAGAGGGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
5  -----TAGAGGGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
13 -----TAGAGGGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
9  -----TAGAGGGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
10 -----TAGAGGGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
7  -----TAGAGGGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
2  -----TAGAGGGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
19 TAG-ATCCAGAGG-GAAGTTGTGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
20 TAG-ATCCAGAGG-GAAGTGTGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
16 TAG-ATCCAGAGG-GAAGTTGTGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
17 TAG-ATCCAGAGG-GAG-TTGTGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
22 TAG-ATCCAGAGG-GAAGTGTGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
15 TAGGATCCAGAGGGGAAGTTGTGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
18 TAG-ATCCAGAGG-GAAGTTGTGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
21 TAG-ATCCAGAGG-GAATGGTGTGAGCATTACGTTTCATGCATAAC
*****

```

ภาพที่ 4.60 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของซันตีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* [1-22 คือ กล้วยไม้รองเท้านารี ได้แก่ (1) รองเท้านารีฝ้ายหอย (2) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (3) รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม (4) รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (5) รองเท้านารีเหลืองอุดร (6) รองเท้านารีเหลืองสิงขร (7) รองเท้านารีเหลืองตรัง (8) รองเท้านารีเหลือง (9) รองเท้านารีขาวขุ่มพร (10) รองเท้านารีช่องอ่างทอง (11) รองเท้านารีขาวสตูล (12) รองเท้านารีขาวพังงา (13) รองเท้านารีเกรยี (14) รองเท้านารีเหลืองประจวบ (15) รองเท้านารีมาลีโปเอนเซ (16) รองเท้านารีแจ้คกิโอ (17) รองเท้านารีไมแครนทุม (18) รองเท้านารีเวียดนามเอนเซ (19) รองเท้านารีเดเลนแตโอ (20) รองเท้านารีอาร์เมเนียคุม (21) รองเท้านารีอีเมอร์โซนิโอ และ (22) รองเท้านารีฮานเกียนุม (รูปแบบการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ คือ อินเดล คือ ทรานสเวอร์ชัน คือ ไพริมิดีนทรานสิชัน) คือ พิวรีนทรานสิชัน คือ การกลายหลายรูปแบบ)]

ตารางที่ 4.8 ตำแหน่งความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ในซีดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์	พันธู์กล้วยไม้ *	รูปแบบการเปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
24	1, 3, 14	Gap (deletion)	อินเดล
25	22	Gap (insertion)	อินเดล
26	1, 2, 3, 7, 9, 10, 14, 15, 18, 21	Gap (deletion)	อินเดล
27	1, 3, 14, 21	Gap (deletion)	อินเดล
28	1, 3, 14	Gap (deletion)	อินเดล
29	1, 3, 14	Gap (deletion)	อินเดล
	12	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
30	1, 3, 14	Gap (deletion)	อินเดล
	15, 18, 21	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
31	1, 3, 6, 12, 14	Gap (deletion)	อินเดล
	21, 22	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
32	1, 3, 14	Gap (deletion)	อินเดล
33	1, 3, 14	Gap (deletion)	อินเดล
34	9, 19	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
35	12, 21	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
36	9, 19	Gap (deletion)	อินเดล
	16, 22	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
49	1, 7, 9, 10, 21	Gap (deletion)	อินเดล
50	1, 7, 9, 10, 21	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
51	1, 7, 9, 10, 21	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
54	11	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
	6, 12	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
55	11	Gap (deletion)	อินเดล
	6, 12	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
56	6, 11, 12	Gap (deletion)	อินเดล

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

ตำแหน่งลำดับ นิวคลีโอไทด์	พันธุ์กล้วยไม้ *	รูปแบบการ เปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
57	12	Gap (deletion)	อินเดล
	11	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
58	11, 12, 15, 16, 17, 21, 22	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
63	7	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
	9	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
65	7, 9	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
66	7, 9	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
67	7, 9	Gap (deletion)	อินเดล
71	7, 9, 11	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
74	7, 11	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
78	9	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
81	9	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
83	9	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
84	9	Gap (deletion)	อินเดล
85	9	Gap (deletion)	อินเดล
86	7, 9	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
88	7	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
89	7, 9	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
92	7, 9	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
95	11	Gap (deletion)	อินเดล
142	14, 20	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
143	5, 21, 22	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
158	21	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
159	18	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
160	21	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
161	18	Gap (insertion)	อินเดล

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

ตำแหน่งลำดับ นิวคลีโอไทด์	พันธุ์กล้วยไม้ *	รูปแบบการ เปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
162	21	Gap (deletion)	อินเดล
494-528	15-22	Gap (deletion)	อินเดล
534	18	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
559	15, 16	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
565	19	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
571	15, 16, 17, 21, 22	G เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
572-579	3, 5	Gap (insertion)	อินเดล
585	16	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
586	15, 16	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
587	15, 16	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
588	15, 16	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
591	15, 16	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
	17	Gap (deletion)	อินเดล
592	15, 16	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
	17	Gap (deletion)	อินเดล
593	17, 22	Gap (deletion)	อินเดล
	18	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
594	17, 22	Gap (deletion)	อินเดล
	15, 16, 18	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
595-602	18	Gap (insertion)	อินเดล
603-604	15, 16, 18, 19, 20, 22	Gap (insertion)	อินเดล
605	17, 19, 20	Gap (deletion)	อินเดล
	15, 16	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
606	19, 20	Gap (deletion)	อินเดล
607	18	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
612	15, 16, 17, 19, 20	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

ตำแหน่งลำดับ นิวคลีโอไทด์	พันธุ์กล้วยไม้ *	รูปแบบการ เปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
618	15, 16, 17, 18, 22	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
627	15-21	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
	22	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
643	21	Gap (insertion)	อินเดล
663	21	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
677	15-22	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
718	15-22	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
743	18	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
784	15-20, 22	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
785	15-20, 22	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
786	15-20, 22	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
787-791	15-20, 22	Gap (deletion)	อินเดล
792	15-20, 22	Gap (deletion)	อินเดล
	3	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
	7	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
793-794	15-20, 22	Gap (deletion)	อินเดล
795	15-22	Gap (deletion)	อินเดล
796	15-22	Gap (deletion)	อินเดล
	9	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
797-810	15-22	Gap (deletion)	อินเดล
811	15-20, 22	Gap (deletion)	อินเดล
	21	C เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
812	21	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
824	21, 22	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
826	19	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
833	17	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

ตำแหน่งลำดับ นิวคลีโอไทด์	พันธุ์กล้วยไม้ *	รูปแบบการ เปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
836	15, 16, 17, 21, 22	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
843	5, 10	Gap (deletion)	อินเดล
844	21	Gap (insertion)	อินเดล
845	5, 10	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
846	10	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
849	1, 2, 3, 4, 5, 14	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
864	7, 8, 10, 13, 17, 19, 20	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
865	7, 8, 10, 13, 17, 19, 20	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
868	20	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
873	18	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
876	3, 5	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
877	15, 22	Gap (insertion)	อินเดล
881	15-22	T เป็น C	ไพริมิดีนทรานสิชัน
890	20	Gap (deletion)	อินเดล
	19	C เป็น T	ไพริมิดีนทรานสิชัน
	15, 16, 17, 22	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
	21	C เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
891	18, 20	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
	21	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
894	21	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
895	17	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
897	17	Gap (deletion)	อินเดล
898	22	Gap (insertion)	อินเดล
906	3	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
	7	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน

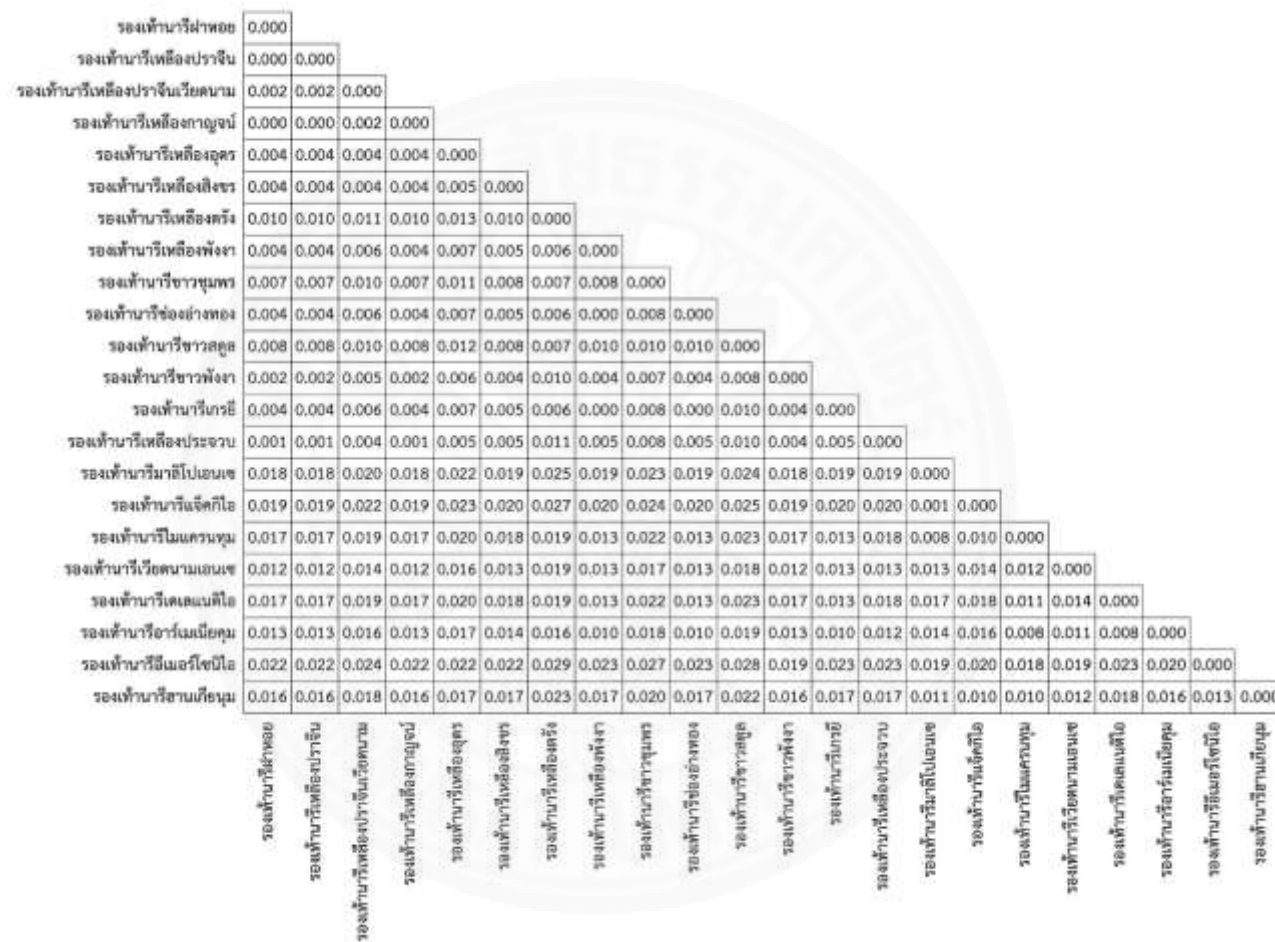
ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

ตำแหน่งลำดับ นิวคลีโอไทด์	พันธุกรรม * พันธุกรรม	รูปแบบการ เปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
910	6	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
	21	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
912	5	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
913	3, 5	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
914	3, 5	Gap (deletion)	อินเดล
918	11	A เป็น C	ทรานสเวอร์ชัน
921	19, 20	Gap (deletion)	อินเดล
	16	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
922	19	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
923	21, 22	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
924	15-20	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
	21	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
	22	Gap (deletion)	อินเดล
925	18, 20	Gap (deletion)	อินเดล
	21	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
926	18, 20, 21	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
927	18, 20	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
932	21	C เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
933	21	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
936	21	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
937	19	G เป็น A	พิวรีนทรานสิชัน
	15, 21	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
938	15, 18	Gap (insertion)	อินเดล
939	15-20, 22	Gap (insertion)	อินเดล
940-955	15-22	Gap (insertion)	อินเดล
956	15-20, 22	Gap (insertion)	อินเดล

ตารางที่ 4.8 (ต่อ)

ตำแหน่งลำดับ นิวคลีโอไทด์	พันธุ์กล้วยไม้ *	รูปแบบการ เปลี่ยนแปลง	รูปแบบการกลาย
957-963	15-22	Gap (insertion)	อินเดล
964	15	Gap (insertion)	อินเดล
965-973	15-22	Gap (insertion)	อินเดล
974	15	Gap (insertion)	อินเดล
975-976	15-22	Gap (insertion)	อินเดล
977	15, 16, 18-22	T เป็น A	ทรานสเวอร์ชัน
	17	T เป็น G	ทรานสเวอร์ชัน
978	15, 16, 18, 19, 20, 22	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
	17	Gap (deletion)	อินเดล
	21	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
979	15-22	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
980	15, 16, 17, 18, 19, 22	A เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
	20, 21	A เป็น G	พิวรีนทรานสิชัน
981	20	Gap (deletion)	อินเดล
982	8	Gap (deletion)	อินเดล
	15-22	G เป็น T	ทรานสเวอร์ชัน
983-985	8	Gap (deletion)	อินเดล

*1-22 คือ (1) รองเท้านารีฝาทอย (2) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (3) รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม (4) รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (5) รองเท้านารีเหลืองอุดร (6) รองเท้านารีเหลืองสิงขร (7) รองเท้านารีเหลืองตรัง (8) รองเท้านารีเหลือง (9) รองเท้านารีขาวชุมพร (10) รองเท้านารีช่องอ่างทอง (11) รองเท้านารีขาวสตูล (12) รองเท้านารีขาวพังงา (13) รองเท้านารีเกรย์ (14) รองเท้านารีเหลืองประจวบ (15) รองเท้านารีมาลีโปเอนเซ (16) รองเท้านารีแจ้คักไอ (17) รองเท้านารีไมแคเรนทุม (18) รองเท้านารีเวียดนามเอนเซ (19) รองเท้านารีเดเลนตีไอ (20) รองเท้านารีอาร์เมเนียคุม (21) รองเท้านารีอีเมอร์โซนิไอ และ (22) รองเท้านารีฮานเกียนุม



ภาพที่ 4.61 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้จากซินดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA*



ภาพที่ 4.62 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

4.4.3.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 ยีนร่วมกัน

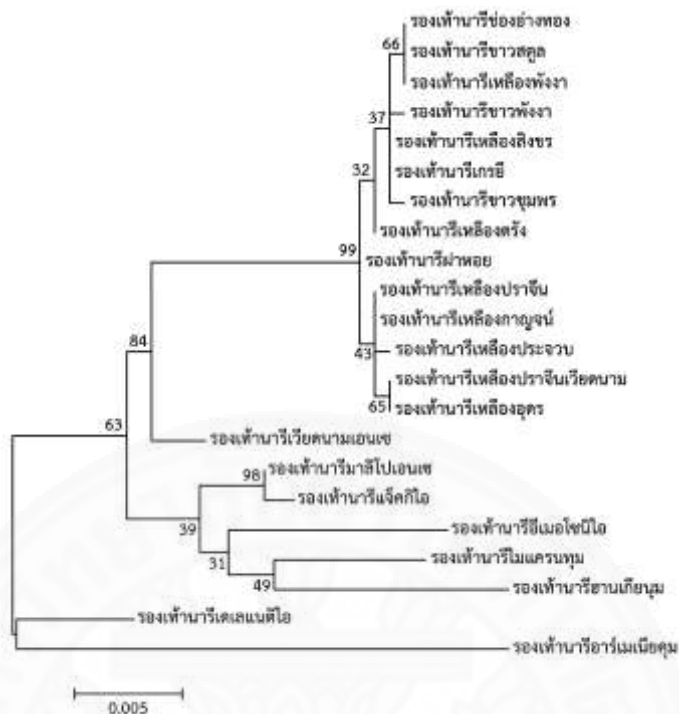
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละยีนจะถูกนำมาวิเคราะห์ร่วมกันเพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาวิเคราะห์ร่วมกัน 2 ยีน ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ร่วมกับยีน *rpoC1* (ภาพที่ 4.63) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ร่วมกับยีน *matK* (ภาพที่ 4.64) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* (ภาพที่ 4.65) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ร่วมกับยีน *matK* (ภาพที่ 4.66) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* (ภาพที่ 4.67) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* (ภาพที่ 4.68)

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 2 ยีน พบว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* มีประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีได้ 17 พันธุ์ ซึ่งจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีได้ดีที่สุด เนื่องจากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย

Brachypetalum หมู่ *Brachypetalum* ทั้ง 14 พันธุ์ได้ ยกเว้นรองเท้านารีเหลืองพังงา รองเท้านารีช่องอ่างทอง และรองเท้านารีเกรยี่ และไม่สามารถจำแนกรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ และรองเท้านารีเหลืองปราจีนได้ ในขณะที่แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *matK* ร่วมกับซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* สามารถจำแนกรองเท้านารีเกรยี่ออกจากรองเท้านารีเหลืองพังงา และรองเท้านารีช่องอ่างทอง แต่ไม่สามารถจำแนกรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีฝายหอยและรองเท้านารีเหลืองปราจีนออกจากกันได้ เมื่อเปรียบเทียบแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์เพียงยีนเดียวมีประสิทธิภาพในการจำแนกน้อยกว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 2 ยีน พบว่าการใช้ยีนเพียงยีนเดียว ไม่ว่าจะเป็แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rpoC1*, *rbcl*, *matK* และซันดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ก็สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีได้บางพันธุ์เท่านั้น ส่วนแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอื่น ๆ ที่ได้จากยีนอื่นร่วมกัน ไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีสกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ทั้ง 14 พันธุ์ได้ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนขนาดเล็กร่วมกัน พบว่ามีประสิทธิภาพในการจำแนกน้อยกว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนขนาดใหญ่ร่วมกัน



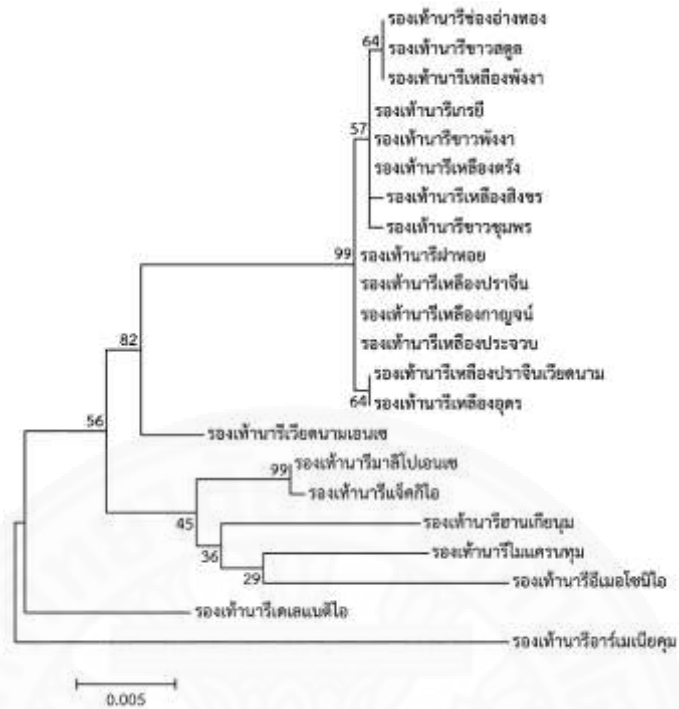
ภาพที่ 4.63 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rbcl* ร่วมกับยีน *rpoC1* ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood



ภาพที่ 4.64 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rbcL* ร่วมกับยีน *matK* ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood



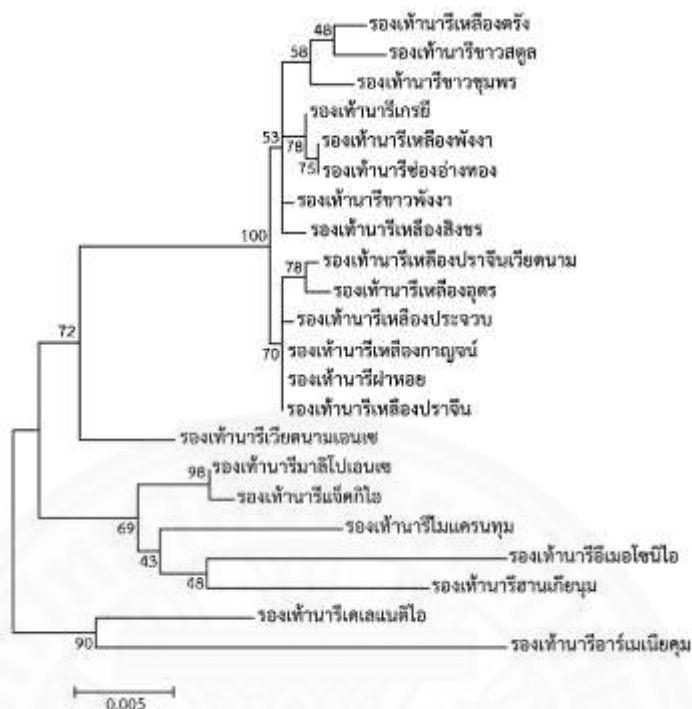
ภาพที่ 4.65 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rbcL* ร่วมกับยีน *psbA* ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood



ภาพที่ 4.66 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rpoC1* ร่วมกับยีน *matK* ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood



ภาพที่ 4.67 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rpoC1* ร่วมกับยีน *psbA* ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

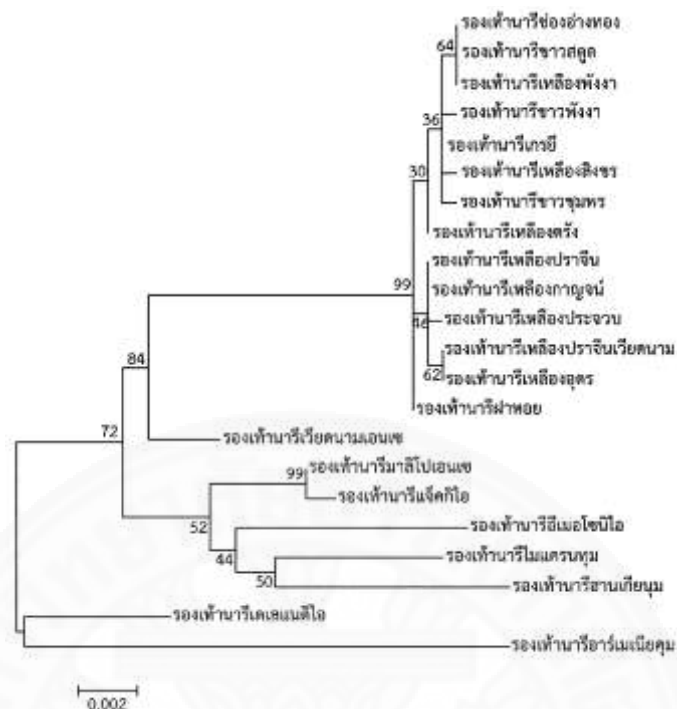


ภาพที่ 4.68 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *matK* ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

4.4.3.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 ยีนร่วมกัน

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 3 ยีนมาวิเคราะห์ร่วมกัน สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาวิเคราะห์ร่วมกัน 3 ยีน ได้แก่ ยีน *rbcL*, *rpoC1* และยีน *matK* (ภาพที่ 4.69) ยีน *rbcL*, *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* (ภาพที่ 4.70) ยีน *rbcL*, *matK* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* (ภาพที่ 4.71) และยีน *rpoC1*, *matK* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* (ภาพที่ 4.72)

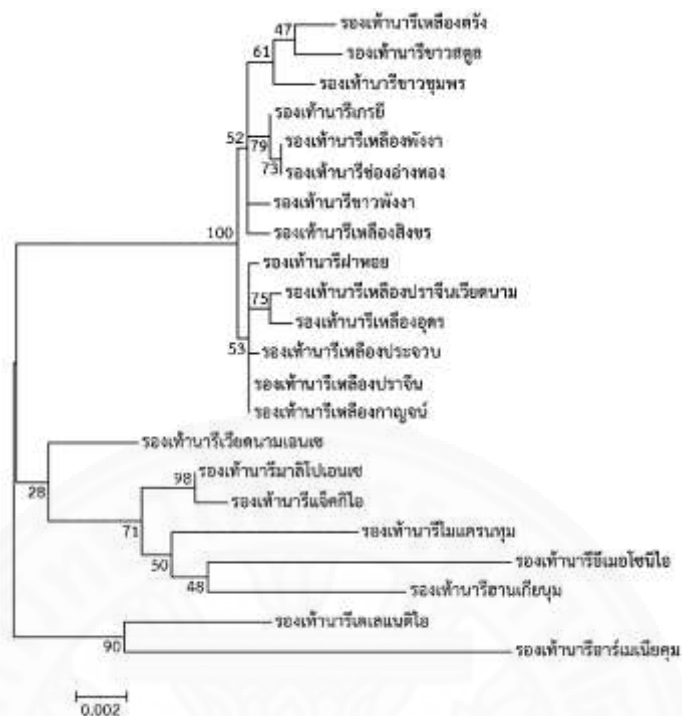
จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 3 ยีน พบว่าทุกแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จะเหมือนกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 2 ยีน ตัวอย่างเช่น การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ร่วมกับยีน *matK* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ผลที่ได้จะเหมือนกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ร่วมกับยีน *rpoC1* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ผลที่ได้จะเหมือนกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*



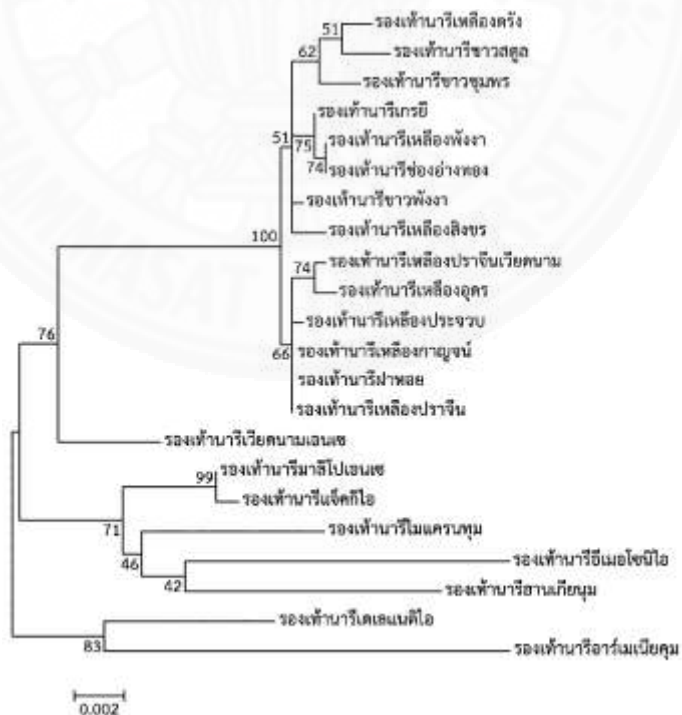
ภาพที่ 4.69 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rbcl*, *rpoC1* และยีน *matK* ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood



ภาพที่ 4.70 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rbcl*, *rpoC1* และยีน *trnH* กับ *psbA* ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood



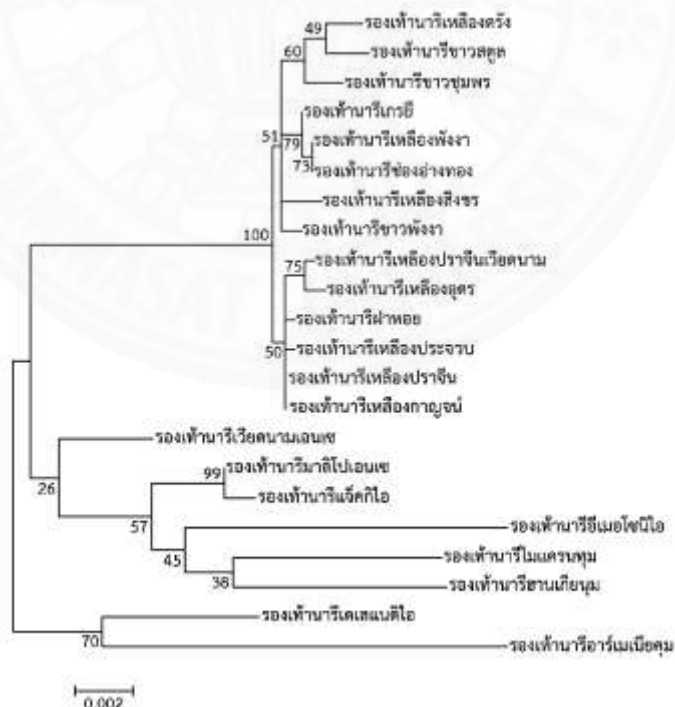
ภาพที่ 4.71 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rbcL*, *matK* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood



ภาพที่ 4.72 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rpoC1*, *matK* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

4.4.3.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 ยีนร่วมกัน

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*, *rbcL*, *matK* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* จะถูกนำมาวิเคราะห์ร่วมกัน เพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 จากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ยีน (ภาพที่ 4.73) สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รองเท้านารีในสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ ซึ่งไม่สามารถจำแนก รองเท้านารีเหลืองพังกาบรองเท้านารีช่องอ่างทอง และรองเท้านารีเหลืองปราจีนกับรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ออกจากกันได้ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ *Parvisepalum* และหมู่ *Emersonianum* 8 พันธุ์ โดยเมื่อเปรียบเทียบการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกันระหว่าง 1, 2, 3 และ 4 ยีน พบว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 4 ยีน สามารถจำแนกรองเท้านารีเกรยี ออกจากรองเท้านารีเหลืองพังกาบรองเท้านารีช่องอ่างทอง และสามารถจำแนกรองเท้านารีเหลืองประจวบ ออกจากรองเท้านารีเหลืองปราจีนกับรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ได้ ซึ่งพบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 4 ยีนนี้ มีประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีมากกว่าการใช้เพียง 1, 2 และ 3 ยีน



ภาพที่ 4.73 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rpoC1*, *rbcL*, *matK* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood

4.5 การอภิปรายผล

การตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายแอสตอร์เอพิติโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม พบแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายซึ่งความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเกิดจากตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์ที่แตกต่างกันที่แตกต่างกันออกไป จึงได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างแต่ละชนิดแตกต่างกัน (สุรินทร์, 2552) จากแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่าสามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้รองเท้านารีได้ตรงตามชนิดพันธุ์ และถิ่นกำเนิดของรองเท้านารี ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม รองเท้านารีเหลืองอุตร รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีเหลืองสิงขร และรองเท้านารีเหลืองประจวบ เป็นรองเท้านารีในกลุ่ม *P. concolor* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน พบว่ามีถิ่นกำเนิดในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันตก และรองเท้านารีในกลุ่ม *P. godefroyae* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยมีถิ่นกำเนิดในแถบภาคใต้ ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองตรัง รองเท้านารีเหลืองพังงา รองเท้านารีขาวชุมพร และรองเท้านารีช่องอ่างทอง เช่นเดียวกับนิสามณี (2555) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารี 15 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ พบว่ารองเท้านารีขาวชุมพร และรองเท้านารีขาวสตูลจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเนื่องจากเป็นรองเท้านารีที่มีถิ่นกำเนิดในแถบภาคใต้ ศุภลักษณ์ (2554) ศึกษาลักษณะสัญญาณบางประการและความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีขาวพังงา รองเท้านารีขาวสตูล และรองเท้านารีเหลืองตรังด้วยเครื่องหมายอาร์เอพิติ พบว่ารองเท้านารีขาวพังงาและรองเท้านารีขาวสตูล มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่ารองเท้านารีเหลืองตรัง เนื่องจากดอกของรองเท้านารีเหลืองตรังมีสีเหลืองครีมซึ่งแตกต่างจากรองเท้านารีขาวพังงาและรองเท้านารีขาวสตูลที่มีสีขาวอย่างชัดเจน นอกจากนี้พบว่ารองเท้านารีฝ้ายหอยและรองเท้านารีเหลืองปราจีนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุดมีค่าดัชนีความเหมือน 0.81 ประเดิม (2543) พบว่ารองเท้านารีฝ้ายหอยและรองเท้านารีเหลืองปราจีนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุดเช่นกันจากการเครื่องหมายอาร์เอพิติ (RAPD, random amplified polymorphic DNA)

การตรวจสอบดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายสก็อตโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาดบางรหัสเริ่มการแปลรหัส (Collard and Mackill, 2009) พบไพรเมอร์ 22 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ปริมาณสูงและให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบ พบแถบดีเอ็นเอ 332 แถบ โดยความหลากหลายที่เกิดขึ้นเกิดจากตำแหน่งการเข้าจับของไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน จากแผนภูมิความสัมพันธ์สามารถจัดกลุ่มรองเท้านารีได้ตรงตามลักษณะสัญญาณของดอก กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่กลับ

ดอกไม่หยัก ได้แก่ ร่องเท่านั้นารีฝาย หอย ร่องเท่านั้นารีเหลืองปราจีน ร่องเท่านั้นารีเหลืองประจวบ ร่องเท่านั้นารีเหลืองปราจีนเวียดนาม ร่องเท่านั้นารีเหลืองอุดร และร่องเท่านั้นารีเหลืองกาญจน์ กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่กลีบดอกไม่หยักหรือเป็นคลื่น ได้แก่ ร่องเท่านั้นารีเหลืองตรัง ร่องเท่านั้นารีเหลืองพังงา ร่องเท่านั้นารีขาวสตูล ร่องเท่านั้นารีขาวชุมพร ร่องเท่านั้นารีช่องอ่างทอง และร่องเท่านั้นารีขาวพังงา พบว่าร่องเท่านั้นารีฝายและร่องเท่านั้นารีเหลืองปราจีนมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.79 (ประเดิม, 2543) ซึ่งให้ผลที่เหมือนกับเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี อีกทั้งยังสามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้ร่องเท่านั้นารีเหลืองตรัง ร่องเท่านั้นารีขาวสตูล และร่องเท่านั้นารีขาวพังงา (ศุภลักษณ์, 2554) ร่องเท่านั้นารีเหลืองพังงา ร่องเท่านั้นารีขาวชุมพร และร่องเท่านั้นารีช่องอ่างทอง อยู่ในกลุ่มเดียวกัน (อรุณรัศมีและคณะ, 2555)

การวิเคราะห์เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีร่วมกับเครื่องหมายสก็อต พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ที่ได้คล้ายคลึงกับทั้งเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและเครื่องหมายสก็อต ซึ่งการประเมินความสัมพันธ์โดยการใช้เครื่องหมายหลายเครื่องหมายร่วมกัน เป็นการยืนยันความถูกต้องของความสัมพันธ์ที่ได้จากทั้งสองเครื่องหมาย (ฐิติพร และคณะ, 2557) อีกทั้งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการประเมินความสัมพันธ์ให้ดีขึ้นอีกด้วย (เกียรติชัย และคณะ, 2557)

ดังนั้นเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีสามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์กล้วยไม้ได้ เช่นเดียวกับกล้วยไม้อื่น ๆ ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย (ฐิติพร และคณะ, 2557) กล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม (เกียรติชัย และคณะ, 2557) และกล้วยไม้ช้าง (นฤมล และคณะ, 2556) เครื่องหมายสก็อตถือเป็นเครื่องหมายใหม่ที่พัฒนาขึ้นมาในปี 2009 แต่ก็ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วง (Luo *et al.*, 2010) หรือศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพีช ได้แก่ กล้วยไม้สกุลหวาย (Feng *et al.*, 2015), อุ่น (Guo *et al.*, 2012) และปาล์ม (Qurainy *et al.*, 2015) เป็นต้น ในประเทศไทยได้มีการนำเครื่องหมายสก็อตมาประยุกต์ใช้แล้วในการวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ของต้นรักแกนมอ (กรองทองและคณะ, 2014) นอกจากนี้ยังมีเครื่องหมายดีเอ็นเออื่น ๆ ที่สามารถประเมินความสัมพันธ์กล้วยไม้ได้ เช่น เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ในการประเมินความสัมพันธ์กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (วริศรา และคณะ, 2557), กล้วยไม้สิงโตกลอกตา (เกียรติชัย และคณะ, 2557) และกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (ภัทราและคณะ, 2558)

จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี และเครื่องหมายสก็อตมีความสามารถในการจำแนกกล้วยไม้ร่องเท่านั้นารีได้อย่างชัดเจน ทั้งสองเครื่องหมายสามารถจำแนกกล้วยไม้ร่องเท่านั้นารี 14 พันธุ์ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของทั้งสอง

เครื่องหมาย อีกทั้งเป็นเครื่องหมายที่ทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย และสามารถให้เครื่องหมาย ดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแต่ละพันธุ์ได้ (วริศรา และคณะ, 2557; สุรินทร์, 2552) อนาคตสามารถนำผล จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีหรือเครื่องหมายสก็อตมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายสการ์ (sequence characterized amplified region; SCAR) ต่อได้ จะทำให้ได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับพันธุ์นั้น ๆ ซึ่งจะ ทำให้ง่ายต่อการระบุพันธุ์มากยิ่งขึ้น (Anuntalabhochai *et al.*, 2008, Suksathan *et al.*, 2014)

การตรวจสอบกล้วยไม้รองเท้านารี 22 พันธุ์ ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ ของยีน *rpoC1*, *rbcL*, *matK* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* มีประสิทธิภาพในการจำแนกรองเท้านารีได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับบริเวณอื่น ๆ เมื่อพิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าสามารถจำแนกรองเท้านารีได้ 22 พันธุ์ แต่เมื่อสร้าง แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถจำแนกได้เพียง 14 พันธุ์เท่านั้น โดยชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* มีตำแหน่งการกลายของลำดับนิวคลีโอไทด์มากที่สุดในบรรดา 4 บริเวณ ที่ศึกษา พบการกลาย 270 ตำแหน่ง เป็นการกลายแบบอินเดิลมากที่สุด 59.63 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา เป็นทรานสเวอร์ชัน พิวรีนทรานสิชัน และไพริมิดีนทรานสิชัน คิดเป็น 24.81, 8.15 และ 7.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* เป็นบริเวณที่มีการผันแปรของ ลำดับนิวคลีโอไทด์สูง ดังนั้นจึงมีความสามารถเพียงพอที่จะนำมาเป็นบริเวณพื้นฐานในการระบุพันธุ์ ของพืช (Kress *et al.*, 2005; Kress and Erickson, 2007) อย่างไรก็ตามลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* มีประสิทธิภาพในการจำแนกพืชได้ดีเช่นกัน (Theodoridis *et al.*, 2012) โดยยีน *matK* เป็น บริเวณที่มีการแทนที่เบสสูงจัดเป็นบริเวณพื้นฐานที่ใช้ในการจำแนกพืชที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน มาก (Parveen *et al.*, 2012) ในขณะที่ Guo และคณะ (2015) กล่าวว่ายีน ITS มีประสิทธิภาพใน การจำแนกรองเท้านารีมากที่สุด ซึ่งเป็นยีนในนิวเคลียสจีโนม (nuclear genome) รองลงมาเป็นยีน *matK* ส่วนยีน *rbcL* มีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำเช่นเดียวกับบริเวณอื่น ๆ ในคลอโรพลาสต์จีโนม ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะของยีน *rpoC1* และยีน *rbcL* มีประสิทธิภาพในการจำแนกต่ำที่สุด (นฤมล และคณะ, 2557; จินต์ และคณะ, 2558)

CBOL ได้แนะนำให้วิเคราะห์หลายบริเวณร่วมกัน เนื่องจากมีประสิทธิภาพมากกว่า ได้แก่ บริเวณของยีน *matK* ร่วมกับ *rbcL* เป็นบริเวณที่วิเคราะห์ร่วมกันแล้วให้ผลดีที่สุดสำหรับพืช บก (CBOL Plant Working Group 2009; Kress *et al.* 2005) บริเวณของยีน *matK* ร่วมกับชิ้น ดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* (Lahaye *et al.*, 2008; Newmaster *et al.*, 2008) และ บริเวณยีน *rbcL* ร่วมกับชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* (Kress & Erickson, 2007) เป็น

ต้น จึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 ยีนร่วมกัน พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ร่วมกับซันตีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ร่วมกับซันตีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* มีประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีได้ 17 พันธุ์ นฤมล และคณะ (2557) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* ร่วมกับยีน *rbcl* จำแนกกล้วยไม้สิ่งโตสกุลกลอกตาหมู่สิ่งโตสยามได้ และการระบุพันธุ์กล้วยไม้ลูกผสมควรใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างน้อย 2 บริเวณร่วมกัน (ธีระชัย และคณะ, 2560)

เมื่อวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 3 ยีนร่วมกัน พบว่าผลที่ได้เหมือนกับแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 ยีนร่วมกัน และแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 ยีนร่วมกัน สามารถจำแนกรองเท้านารีที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันได้ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์หลายบริเวณร่วมกัน จะทำให้มีประสิทธิภาพในการจำแนกพันธุ์มากขึ้น (Hilu *et al.*, 2003) จึงมีการเสนอการวิเคราะห์หลายบริเวณร่วมกันให้เป็นบริเวณของดีเอ็นเอมาตรฐานในการระบุพันธุ์ของพืช Fazekas และคณะ (2008) แนะนำให้ใช้ 3-4 บริเวณร่วมกัน โดยเลือกระหว่างยีน *rbcl*, *rpoB*, *matK*, ซันตีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* และซันตีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *atpF* กับ *atpH* Hollingsworth และคณะ (2009) แนะนำให้ใช้ 3 บริเวณร่วมกัน โดยเลือกระหว่าง *rpoC1*, *rbcl*, *matK* และ ซันตีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*

ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะเป็นวิธีที่ง่าย ทำได้โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับสากล มีฐานข้อมูลและมีการร่วมมือกันขององค์กรระดับโลก จึงมีมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับทั่วโลก (Hebert *et al.*, 2003) สามารถทำซ้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวก และรวดเร็ว (นฤมล และคณะ, 2558) อนาคตสามารถนำลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะไปประยุกต์ใช้กับศาสตร์สาขาอื่นได้ เช่น นิติวิทยาศาสตร์ การศึกษาทางนิเวศวิทยา และการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพและเภสัชภัณฑ์ (วุฒิพงศ์, 2554; Liu *et al.*, 2010)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี

จากการตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 72 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้ รองเท้านารีสกุล *paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ พบว่ามีไพรเมอร์ 29 ชนิดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเออย่างชัดเจนได้ 22 ชนิด ได้แถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 293 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย 275 แถบ (คิดเป็น 94 %) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มี ความหลากหลาย 18 แถบ (คิดเป็น 6 %) นำแถบดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc 2.01e เลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA คำนวณค่าดัชนีความเหมือนได้ 0.32-0.81 เมื่อพิจารณาที่ดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.57 สามารถจัดกลุ่มกล้วยไม้ รองเท้านารีออกเป็น 4 กลุ่ม ตรงตามชนิดพันธุ์ และถิ่นกำเนิดของรองเท้านารี กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รองเท้านารีฟายอย รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียดนาม รองเท้านารีเหลืองอุดร และรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองสิงขร และรองเท้านารีเหลืองประจวบ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองตรัง รองเท้านารีเหลืองพังงา รองเท้านารีขาวชุมพร รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีขาวพังงา และรองเท้านารีช่องอ่างทอง และกลุ่มที่ 4 ได้แก่ รองเท้านารีเกรยี โดยรองเท้านารีฟายอยและรองเท้านารีเหลืองปราจีนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.81 ในขณะที่รองเท้านารีฟายอยกับรองเท้านารีเหลืองตรังแตกต่างกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.32 และรองเท้านารีเกรยีแตกต่างจากรองเท้านารีพันธุ์อื่นมากที่สุด เนื่องจากมีค่าดัชนีความเหมือนเฉลี่ยน้อยที่สุด

5.2 เครื่องหมายสก็อต

การใช้เครื่องหมายสก็อตตรวจสอบดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 80 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 48 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หรือคิดเป็น 60 เปอร์เซ็นต์ คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเออย่างชัดเจนได้ 22 ชนิด อีกทั้งพบไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายสูง (คิดเป็น 100 %) จำนวน 8 ชนิด จากนั้นนำไพรเมอร์ทั้ง 22 ชนิดมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารี 14 พันธุ์ พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 332 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 250 ถึง 3,100 คู่เบส เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มี ความหลากหลาย 19 แถบ (คิดเป็น 5.72 %) และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย 313

แถบ (คิดเป็น 94.28 %) นำแถบดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc 2.01e เลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA คำนวณค่าดัชนีความเหมือนได้ 0.30 - 0.79 เมื่อพิจารณาที่ดัชนีความเหมือนที่ 0.445 สามารถแบ่งกล้วยไม้รองเท้านารีออกเป็น 3 กลุ่ม ตรงตามลักษณะสัญญาณของดอก กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รองเท้านารีฝายหอย รองเท้านารีเหลืองปราจีน และรองเท้านารีเหลืองประจวบ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียงดาม รองเท้านารีเหลืองอุดร และรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองสิงขร รองเท้านารีเหลืองตรัง รองเท้านารีเหลืองพังงา รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีขาวชุมพร รองเท้านารีช่องอ่างทอง รองเท้านารีขาวพังงา และรองเท้านารีเกรยี่ ซึ่งพบว่ารองเท้านารีฝายหอยและรองเท้านารีเหลืองปราจีนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.79 ในขณะที่รองเท้านารีฝายหอยกับรองเท้านารีเหลืองสิงขร และรองเท้านารีเหลืองอุดรกับรองเท้านารีเกรยี่แตกต่างกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือน 0.30

5.3 การวิเคราะห์เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีร่วมกับเครื่องหมายสก็อต

นำข้อมูลที่ได้จากเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี และเครื่องหมายสก็อตมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม NTSYS pc 2.01e เลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA สามารถคำนวณค่าดัชนีความเหมือนได้ 0.80-0.38 เมื่อพิจารณาที่ค่าดัชนีความเหมือนที่ 0.49 สามารถแบ่งกลุ่มรองเท้านารีออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รองเท้านารีฝายหอย รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองปราจีนเวียงดาม รองเท้านารีเหลืองอุดร รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ และรองเท้านารีเหลืองประจวบ กลุ่มที่ 2 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองสิงขร รองเท้านารีเหลืองตรัง รองเท้านารีเหลืองพังงา รองเท้านารีขาวชุมพร รองเท้านารีช่องอ่างทอง รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีขาวพังงา และรองเท้านารีเกรยี่ เมื่อวิเคราะห์แผนภูมิที่ได้พบว่ารองเท้านารีฝายหอยและรองเท้านารีเหลืองปราจีนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.80 ในขณะที่รองเท้านารีฝายหอยแตกต่างจากรองเท้านารีเหลืองตรังมากที่สุด มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.38 ผลการจัดกลุ่มที่ได้นี้คล้ายคลึงกับเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและเครื่องหมายสก็อต

5.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ

5.4.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเพียงตำแหน่งเดียว

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *rpoC1*, *rbcl*, *matK* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* ของกล้วยไม้รองเท้านารี 22 พันธุ์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

ทั้งหมด แถบที่ได้มีความชัดเจนและมีขนาดที่ถูกต้องตามที่ต้องการ โดยยีน *rpoC1* มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส ยีน *rbcL* มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส ยีน *matK* มีขนาดประมาณ 850 คู่เบส และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* มีขนาดประมาณ 900 คู่เบส

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* ทั้ง 22 พันธุ์ พบตำแหน่งที่แตกต่างกัน 16 ตำแหน่ง การกลายที่เกิดขึ้นมีเพียง 2 รูปแบบ คือ ไพริมิตินทรานสิชัน 5 ตำแหน่ง และพิวรีนทรานสิชัน 11 ตำแหน่ง จากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood สามารถจำแนกรองเท้าনারีออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นรองเท้าনারีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ทั้งหมด กลุ่มที่ 2 เป็นรองเท้าনারีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ *Parvisepalum* และ หมู่ *Emersonianum* รวม 8 พันธุ์ ซึ่งมีค่าดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรม 0.000-0.018 โดยแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน *rpoC1* สามารถจำแนกรองเท้าনারีได้ 7 พันธุ์

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* 22 พันธุ์ พบตำแหน่งที่แตกต่างกัน 6 ตำแหน่ง รูปแบบการกลายที่เกิดขึ้น ได้แก่ ทรานสเวอร์ชัน 3 ตำแหน่ง พิวรีนทรานสิชัน 1 ตำแหน่ง และไพริมิตินทรานสิชัน 3 ตำแหน่ง เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood พบว่าสามารถจำแนกรองเท้าনারีออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 มี 14 พันธุ์ ซึ่งเป็นรองเท้าনারีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ทั้งหมด กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 เป็นรองเท้าনারีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ *Parvisepalum* และ หมู่ *Emersonianum* ทั้งหมด 8 พันธุ์ ค่าดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.000-0.009 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้แสดงให้เห็นว่ายีน *rbcL* สามารถจำแนกรองเท้าনারีสกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ได้เพียง 1 พันธุ์คือ รองเท้าনারีชาวพังงา

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* 22 พันธุ์ พบตำแหน่งที่แตกต่างกัน 139 ตำแหน่ง รูปแบบการกลายที่เกิดขึ้น ได้แก่ อินเดล ทรานสเวอร์ชัน พิวรีนทรานสิชัน และไพริมิตินทรานสิชัน เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood สามารถจำแนกรองเท้าনারีออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 เป็นรองเท้าনারีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ กลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 เป็นรองเท้าনারีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ *Parvisepalum* และ หมู่ *Emersonianum* จำนวน 8 พันธุ์ มีค่าดัชนีความ

แตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.000-0.050 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้แสดงให้เห็นว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* สามารถจำแนกรองเท้าনারีได้ 10 พันธุ์จาก 22 พันธุ์

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *trnH* กับ *psbA* 22 พันธุ์ พบว่ามีตำแหน่งที่แตกต่างกัน 235 ตำแหน่ง รูปแบบการกลายที่เกิดขึ้น ได้แก่ อินเดล ทรานสเวอร์ชัน พิวรีนทรานสิชัน และไพริมิดีนทรานสิชัน เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *trnH* กับ *psbA* มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood สามารถจำแนกรองเท้าনারีออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 มี 14 พันธุ์ ซึ่งเป็นรองเท้าনারีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ทั้งหมด และกลุ่มที่ 2 เป็นรองเท้าনারีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ *Parvisepalum* และ หมู่ *Emersonianum* จำนวน 8 พันธุ์ ซึ่งมีค่าดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรม 0.000-0.028 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้าনারีได้ 14 พันธุ์ แต่เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของรองเท้าনারีทั้ง 22 พันธุ์ สามารถจำแนกรองเท้าনারีทั้ง 22 พันธุ์ออกจากกันได้ จะเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *trnH* และ *psbA* สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้าনারีได้ดีกว่ายีน *rpoC1*, *rbcl* และ *matK*

5.4.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 2 ยีน

นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากทั้ง 2 ยีน มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood พบว่ายีน *rbcl* ร่วมกับ ยีน *trnH* กับ *psbA* และยีน *matK* ร่วมกับยีน *trnH* กับ *psbA* มีประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้าনারีมากที่สุด ส่วนการวิเคราะห์ยีนอื่น ๆ ร่วมกันไม่สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้าনারีในสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* บางพันธุ์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงยีนเดียว พบว่า แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 2 ยีน มีประสิทธิภาพในการจำแนกมากกว่าการใช้ยีนเพียงยีนเดียว อีกทั้งการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนขนาดเล็กจะร่วมกัน จะมีประสิทธิภาพในการจำแนกน้อยกว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนขนาดใหญ่ร่วมกัน

5.4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 3 ยีน

นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากทั้ง 3 ยีน มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood พบว่าผลที่ได้ไม่แตกต่างจากแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 2 ยีน

5.4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 4 ยีน

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกัน 4 ยีน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1*, *rbcl*, *matK* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA* จะถูกนำมาวิเคราะห์ร่วมกันเพื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA 7.0 โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ maximum likelihood สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีออกเป็น 2 กลุ่มชัดเจน กลุ่มที่ 1 ได้แก่ รองเท้านารีในสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* 14 พันธุ์ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Parvisepalum* หมู่ *Parvisepalum* และหมู่ *Emersonianum* 8 พันธุ์ และพบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมีประสิทธิภาพในการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีมากขึ้น ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่าการวิเคราะห์เพียง 1, 2 หรือ 3 ยีน

5.5 ข้อเสนอแนะ

การใช้เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและเครื่องหมายสก็อตเป็นเครื่องหมายที่สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ อาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสหรือพีซีอาร์ ซึ่งพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ไวต่อปัจจัยภายนอกมาก ทำให้บางครั้งอาจได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่คงที่ ดังนั้นในการวิจัยควรทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อตรวจสอบความคงที่ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ควรควบคุมปัจจัยที่อาจจะส่งผลต่อปฏิกิริยาให้มีความคงที่ ได้แก่ เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม การใช้ปิเปตอัตโนมัติ เป็นต้น อีกทั้งในการเตรียมปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส เมื่อเติมเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase แล้วควรรีบนาลงเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทันที เนื่องจากเอนไซม์สามารถทำงานได้ในอุณหภูมิห้อง อาจทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่ถูกต้องได้

แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งจำเพาะ ต้องมีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกันถึง 4 ยีน จึงจะสามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใดกลุ่มใดได้ หากต้องการนำไปใช้ประโยชน์คาดว่าจะมีค่าใช้จ่ายสูง จึงควรหาบริเวณของยีนอื่นที่มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มากพอที่จะมีประสิทธิภาพในการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่สามารถจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใดกลุ่มใดได้ด้วยการใช้บริเวณของยีนเพียงตำแหน่งเดียว

รายการอ้างอิง

1. กรมวิชาการเกษตร. (2556). สำนักงานการประชุมกล้วยไม้เอเชียแปซิฟิกครั้งที่ 12. แหล่งที่มา: <http://www.apoc12.com/2014/04/30/paph-thaianum/>. วันที่ค้นข้อมูล 11 มกราคม 2558.
2. กรองทอง ใจแก้วแดง วิชาญ เอียดทอง และสุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2556). การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของต้นรักแกนมอในประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมาย Start Codon Targeted (SCoT). *Thai J. For.* 33(2): 19-27.
3. เกียรติชัย แซ่ไต่, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. (2557). การจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์. *Thai J. Sci. Technol.* 3: 92-101.
4. จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. (2557). การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวมีสีด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์. *Thai J. Sci. Technol.* 3: 113-122.
5. จินต์ ทองสม, ภัทรพร คุ่มภัย, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. (2558). การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcL* และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trnH* กับ *psbA*. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 6: 994-1005.
6. ไชยา ลาวัลย์. 2534. *กล้วยไม้รองเท้านารี (Paphiopedilum)*. พิมพ์ครั้งที่ 1.
7. ฐิติพร โทมัสโสภา, ชีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. (2557). การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์. *Thai J. Sci. Technol.*, 2: 82-91.
8. อนุรักษ์ โกเสนตอ สุณิสสา อนุรักษ์ชกุล และมลิวรรณ นาคขุนทด. (2557). การจัดจำแนกพืชวงศ์บัวสายโดยใช้คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. ฉบับพิเศษ. การประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์วิจัย. ครั้งที่ 6.
9. ชีระชัย ธนานันต์, จุฑาทิพย์ พันธุ์รูปท้าว และนฤมล ธนานันต์. (2560). การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย หมู่ไนโกรเฮอร์ชูเช และลูกผสมด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rbcL*. *Thai J. Sci. Technol.* 4: 579-590.

10. นฤมล ธนานันต์, เกียรติชัย แซ่ใต้ และธีระชัย ธนานันต์. (2557). การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจำเพาะ. *Thai J. Sci. Technol.* 4: 523-530.
11. นฤมล ธนานันต์, ฐิติพร โทมัสโสภา และธีระชัย ธนานันต์. (2557). การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 22(1): 99-108.
12. นฤมล ธนานันต์, ฐิติพร โทมัสโสภา และธีระชัย ธนานันต์. (2558). การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *matK* และ *rpoC1*. *Thai J. Sci. Technol.* 1:1-10.
13. นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์. (2555). การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี. *Thai J. Sci. Technol.* 1:169-179.
14. นฤมล ธนานันต์, วริศรา แทนสง่า และธีระชัย ธนานันต์. (2557). การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.* 22(3), 317-326.
15. นฤมล ธนานันต์, สุรีย์พร พุ่มเอี่ยม และธีระชัย ธนานันต์. (2556). การจำแนกพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี. *Thai J. Sci. Technol.* 4: 360-370.
16. นิสามณี ภูซังค์ และภคพร ทายะมหา. (2555). การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารี 15 ชนิด โดยใช้เทคนิค ISSR. สาขาเทคโนโลยีการผลิตพืช. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.
17. นิรนาม1. 2555. กล้วยไม้รองเท้านารี. แหล่งที่มา: <http://www.bloggang.com/viewdiary.php?id=jummaip&month=02-2006&date=06&group=1&gblog=12>. วันที่ค้นข้อมูล 8 มกราคม 2558.
18. นิรนาม2. 2011. แหล่งที่มา: <http://www.thaipaphioclub.com/forum/viewtopic.php?f=18&t=286&start=90>. วันที่ค้นข้อมูล 11 มกราคม 2558.

19. นิรนาม3. 2552. รongเท้านารีขาวสตูล (*paphiopedilum niveum*). แหล่งที่มา: <http://www.bloggang.com/mainblog.php?id=tpaphio&month=26-05-2009&group=3&gblog=5>. วันที่ค้นข้อมูล 19 กุมภาพันธ์ 2558.
20. ประเดิม วณิชชานานันท์. (2543). การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกล้วยไม้รongเท้านารีหมวด *Brachypetalum* ด้วยเทคนิค RAPD. ภาควิชาพืชไร่, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
21. พรณรงค์ สิริปิยะสิงห์ และอรุณรัตน์ ฉวีรา. (2554). ดีเอ็นเอบาร์โค้ดเพื่อการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตกรณีศึกษา: จิน Cytochrome c Oxidase I (COI) ในสัตว์. *วารสารมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม*: ว.มร. ปีที่ 5. ฉบับที่ 2.
22. ภัทรา หงษ์ทองดี, อีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. (2558). ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของชนิดกล้วยไม้ในสกุลเอื้องเทียนด้วยไอเอสเอสอาร์. *Thai J. Sci. Technol.* 2: 342-350.
23. มลิวัลย์ พรหมรักษา. (2539). *กล้วยไม้*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ห้างหุ้นส่วนจำกัดยูนิเวอร์แซลกราฟฟิค.
24. วชิรพงศ์ หวลบุตตา. (2543). *กล้วยไม้ไทย*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่งจำกัด (มหาชน).
25. วริสรา แทนสง่า, อีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. (2014). การจาแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบ (*Aerides*) ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์. *Thai J. Sci. Technol.* 2: 102-112.
26. วุฒิพงศ์ มหาคำ. (2554). DNA barcodes ของพืช: หลักการพื้นฐาน การประยุกต์ใช้ และข้อจำกัด. *Thai Journal of Botany.* 1: 1-30.
27. ศุภลักษณ์ ภูมิคง. (2554). ลักษณะสัณฐานบางประการและความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รongเท้านารีขาวพังงา รongเท้านารีขาวสตูล และรongเท้านารีเหลืองตรังในบางพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย. สาขาวิชาชีววิทยา. มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา.
28. เศรษฐมนตร์ กาญจนกุล. (2551). *ร้อยพรรณพฤกษา กล้วยไม้รongเท้านารี*. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์เศรษฐศิลป์.
29. เศรษฐมนตร์ กาญจนกุล. (2554). *ร้อยพรรณพฤกษา กล้วยไม้*. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์เศรษฐศิลป์.
30. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2552). *เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์*. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

31. สุรีพร เกตุงาม. (2546). เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. ภาควิชาพืชไร่. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. *วารสารวิชาการ*. ปีที่ 5 ฉบับที่ 2.
32. สำอางค์ เนตรนารี. (2549). *กล้วยไม้*. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพมหานคร: เกษตรสยามบุ๊คส์.
33. อบฉันท ไทยทอง. (2543). *กล้วยไม้เมืองไทย*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: บมจ.อมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง.
34. อรุณรัศมี วณิชชานนท์, อุบลวรรณ อุโพธิ์, ศุภลักษณ์ ภูมิคง, ชัยพฤกษ์ วีระวงศ์, ประพจน์ สัตถาภรณ์, วรพจน์ ล้อมลิ้ม และบุญทัน บุญชูดา. (2555). ลักษณะสัณฐานบางประการ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของรองเท้านารีขาวพังกา รองเท้านารีขาวสตูล และรองเท้านารีเหลืองตรังในบางพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย. สาขาวิชาชีววิทยา. มหาวิทยาลัยทักษิณ. จังหวัดสงขลา.
35. อุไร จิรมงคลการ. (2541). *กล้วยไม้รองเท้านารี*. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่งจำกัด (มหาชน).
36. Amirmoradi, B., Talebi, R. and Karami, E. (2012). Comparison of genetic variation and differentiation among annual *Cicer* species using start codon targeted (SCoT) polymorphism, DAMD-PCR, and ISSR markers. *Plant Syst. Evol.* 298: 1679–1688.
37. Anuntalabhochai, S., Chandet, R., Chiangda, J. and Apavatjirut, P. (2000). Genetic diversity within Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) based on RAPD analysis. *Acta Hort.* 575: 253-259.
38. Bhattacharyya, P., Kumaria, S., Kumar, S. and Tandon, P. (2013). Start Codon Targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of *Dendrobium nobile* Lindl. an endangered medicinal orchid species. *Gene.* 529: 21–26.
39. Braem, J.G., Chiron, M. and Öhlund, I. (2014). *Paphiopedilum*. 2nd edition. United States of America. BookBaby.
40. Brown, S.M., Szewc-McFadden, A.K., and Kresovich, S. (1996). Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis. In *Methods of plant genome analysis: Their merits and pitfalls*. Jauhar, P. P. (Ed.). CRS Press. Boca Roton. FL. U.S.A. p. 147-159.

41. Butboonchoo, P. and Wongsawad, C. (2017). Occurrence and HAT-RAPD analysis of gastrointestinal helminths in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*) in Phayao province, northern Thailand. *Saudi J. Biol. Sci.* 1: 30–35.
42. CBOL Plant working Group. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 12794-12797.
43. Chen, F.Y. and Liu, J.H. (2014). Germplasm genetic diversity of *Myrica rubra* in Zhejiang Province studied using inter-primer binding site and start codon targeted polymorphism markers. *Sci. Hort.* 170: 169-175.
44. Chundet, R., Cutler, R.W., Tasanon, M. and Anuntalabhochai, S. (2007). Hybrid Detection in Lychee (*Litchee chinensis* Sonn.) Cultivars Using HAT-RAPD Markers. *ScienceAsia.* 33: 307-311.
45. Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J. (2009). Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating Gene-targeted marker in plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 27: 86-93.
46. Doyle, J.J. and Dolye, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
47. Fazekas, A.J., Burgess, K.S., Kesanakurti, P.R., Graham, S.W., Newmaster, S.G., Husband, B.C., Percy, D.M., Hajibabaei, M. and Barrett, S.C.H. (2008). Multiple multilocus DNA barcodes from the plastid genome discriminate plant species equally well. *PLoS One.* 3: e2802.
48. Feng, S., He R., Yang, S., Chen, Z., Jiang, M., Lu, J. and Wang, H. (2015). Start codon targeted (SCoT) and target region amplification polymorphism (TRAP) for evaluating the genetic relationship of *Dendrobium* species. *Gene.* 567: 182-188.
49. Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. and Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 294–299.
50. Gielly, L. and Taberlet, P. (1994). The Use of Chloroplast DNA to Resolve Plant Phylogenies: Noncoding versus *rbcl* Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 5: 769-777.

51. Gorji, A.M., Poczai, P., Polgar, Z. and Taller, J. (2011). Efficiency of amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting. *Am. J. Bot.* 88: 226-237.
52. Guo, D.L., Zhang, J.Y. and Liu, C.H. (2012). Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT. *Mol. Biol. Rep.* 39: 5307-5313.
53. Guo, Y.Y., Huang, L.Q., Liu, H.J. and Wang, X.Q. (2015). Promise and Challenge of DNA Barcoding in Venus Slipper (*Paphiopedilum*). *PLoS One*. 11(1): 1-13.
54. Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. and deWaard, J.R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 270: 96–S99.
55. Hilu, K.W. and Liang, H. (1997). The matK gene: sequence variation and application in plant systematics. *Am. J. Bot.* 84(6): 830–839.
56. Hilu, K.W., Borsch, T., Muller, K., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Savolainen, V., Chase, M.W., Powell, M.P., Alice, L.A., Evans, R., Saquet, H., Neinhuis, C., Slot, T.A.B., Rohwer, J.G., Campbell, C.S. and Chatrou, L.W. (2003). Angiosperm phylogeny based matK sequence information. *Am. J. Bot.* 90(12): 1758–1776.
57. Hollingsworth, P.M., Graham, S.W. and Little, D.P. (2011). Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLoS One*. 6(5): e19254.
58. Hu, C., Tian, H., Li, H., Hu, A., Xing, F., Bhattacharjee, A., Hsu, T., Kumar, P. and Chung, S. (2016). Phylogenetic Analysis of a ‘Jewel Orchid’ Genus *Goodyera* (Orchidaceae) Based on DNA Sequence Data from Nuclear and Plastid Regions. *PLoS ONE*. 11(2): 1-13.
59. Kim, J.S., Kim, H.T., Son, S.W. and Kim, J.H. (2015). Molecular identification of endangered Korean lady’s slipper orchids (*Cypripedium*, Orchidaceae) and related taxa. *Bot.* 93(9): 603-610.
60. Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A. and Janzen, D.H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 23: 8369–8374.

61. Kress, W.J. and Erickson, D.L. (2007). A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLoS ONE*. 2(6): e508.
62. Lahaye, R., van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Papulin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T.G. and Savolainen, V. (2008). DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105: 2923-2928.
63. Lin, J.Y., Lin, B.Y., Chang, C.D., Liao, S.C., Liu, Y.C., Wu, W.L. and Chang, C.C. 2015. Evaluation of chloroplast DNA markers for distinguishing *Phalaenopsis* species. *Sci. Hort.*, 192: 302-310.
64. Liu, Y., Yan, H.F., Cao, T. and Ge, X.J. (2010). Evaluation of 10 plant barcodes in Bryophyta (Mosses). *J. Syst. Evol.* 48: 36–46.
65. Luo, C., He, X.H., Chen, H., Ou, S.J. and Gao, M.P. (2010). Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using start codon targeted (SCoT) markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 38: 1176-1184.
66. Pang, X., Song, J., Zhu, Y., Xu, H., Huang, L. and Chen, S. (2010). Applying plant DNA barcodes for Rosaceae species identification. *Cladistics*. 27: 165–170.
67. Parveen, I., Singh, H.K., Raguvanshi, S., Pradhan, U.C. and Babbar, S.B. (2012). DNA barcoding of endangered Indian *Paphiopedilum* species. *Mol. Ecol. Resour.* 12: 82–90.
68. Powell, W., Machray, C., and Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Sci.* 1: 215-222.
69. Puttalakshamma, G., Ramani, U., Singh, K., Patel, A., Patel, A. and Joshi C. (2014). Genetic characterization of paramphistomes of buffalo by HAT-RAPD analysis. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 38: 7-13.
70. Quriny, F.A., Khan, S., Nadeem, M. and Tarroum, M. (2015). SCoT marker for the assessment of genetic diversity in Saudi Arabian date Palm cultivars. *Pak. J. Bot.* 2: 637-643.

71. Raktin, U., Khampa, S., Wangsomnuk, P.P., Wangsomnuk, P. and Jogloy, S. (2007). The molecular diversity of *Helianthus tuberosus* germplasm as assessed by HAT-RAPD and selected characterized DNA markers. *Asia Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.* 18(1): 99-101.
72. Selvaraj, D., Sarma, R.K. and Sathishkumar, R. (2008). Phylogenetic analysis of chloroplast *matK* gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. *Bioinformation.* 3(1): 24-27.
73. Serino, G. and Maliga, P. (1998). RNA polymerase subunits encoded by the plastid *rpo* genes are not shared with the nucleus-encoded plastid enzyme1. *Plant Physiol.* 117: 1165–1170.
74. Shahlae, A., Torabi, S. and Khosroshahli, M. (2014). Efficiency of SCoT and ISSR markers in assessment of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) genetic diversity. *Int. J. Biosci.* 2: 14-22.
75. Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K. C., Winder, C. T., Schilling, E. E. and Small, R. L. (2005). The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am J Bot.* 92: 142-166.
76. Singh, H.K., Parveen, I., Raghuvanshi, S. and Babbar, S.B. (2012). The loci recommended as universal barcodes for plants on the basis of floristic studies may not work with congeneric species as exemplified by DNA barcoding of *Dendrobium* species. *BMC Res. Notes.* 5: 1-11.
77. Suksathan, R., Anuntalabhochai, S., Jampeetong, A., Sookkhee, S. and Chansakaow, S. (2014). A Phylogenetic Analysis of Thai *Hedychium* (Zingiberaceae) and Development of SCAR Marker for *Hedychium flavescens* Carey ex Roscoe. *Chiang Mai J. Sci.* 2: 286-297.
78. Taberlet, P., Coissa, E., Pompano, F., Gielly, L., Miquel, C., Valentin, A., Vermet, T., Corthie, G., Brochmann, C. and Willerslev, E. (2006). Power and limitations of the chloroplast *trnL* (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Res.* 35(3): 1-8.

79. Theodoridis, S., Steefanaki, A., Tezcan, Z., Akis, C., Kokkini, S., and Vlachonasios, K.E. (2012). DNA barcoding in native plants of the Labiatae (Lamiaceae) family from Chios Island (Greece) and the adjacent Cesme-Karaburun Peninsula (Turkey). *Mol. Ecol. Resour.*, 12: 620–633.
80. Thimmappaiah, Santhosh, W. G., Shobha, D., and Melwyn, G. S. (2009). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers. *Sci. Hort.* 120(3): 411-417.
81. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.U. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 22: 6531-6535.
82. Wolfe, A.D. and dePamphilis, C.W. (2016). The Effect of Relaxed Functional Constraints on the Photosynthetic Gene *rbcL* in Photosynthetic and Nonphotosynthetic Parasitic Plants. *Mol. Biol. Evol.* 15(10): 1243–1258.
83. Wu, J.M., Li, Y.R., Yang, L.T., Fang, F.X., Song, H.Z., Tang, G.Q., Wang, M. and Weng, M.L. (2013). cDNA-SCoT: A novel rapid method for analysis of gene differential expression in sugarcane and other plants. *Aust. J. Crop Sci.* 7(5): 659-664.
84. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M. and Zebeau, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprintings. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.

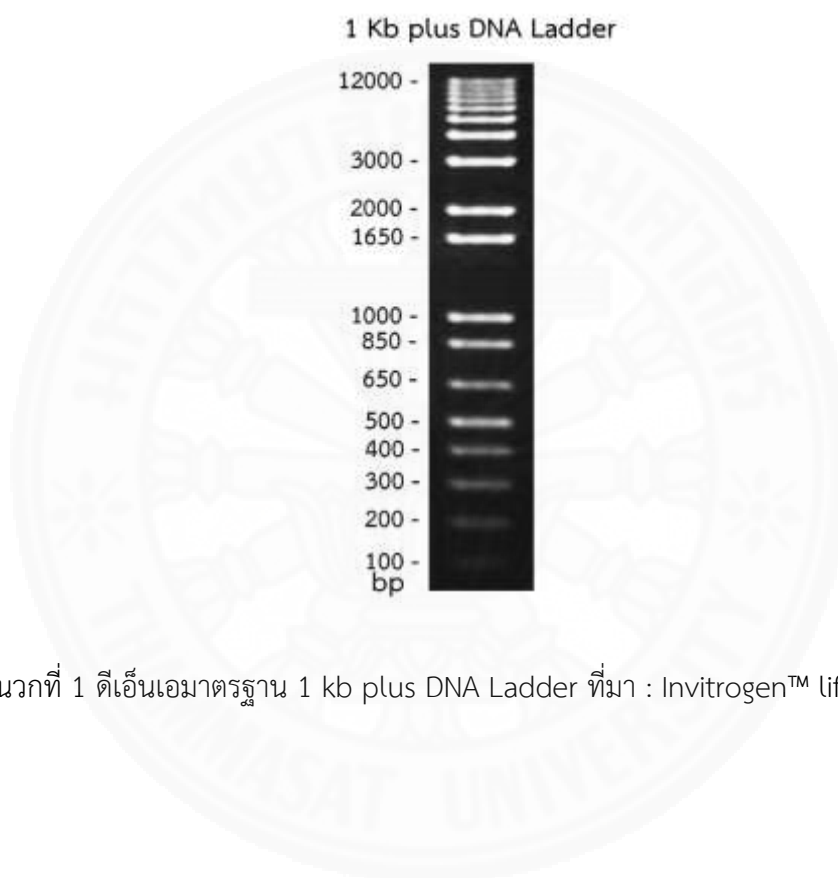


ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ดีเอ็นเอมาตรฐาน

ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™ life Technology, USA)

แสดงขนาดดีเอ็นเอตั้งแต่ 100-12,000 คู่เบส

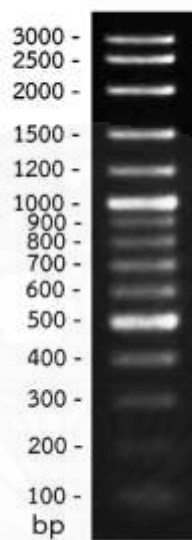


ภาพผนวกที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb plus DNA Ladder ที่มา : Invitrogen™ life Technology

ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Vivantis, Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia)

แสดงขนาดดีเอ็นเอตั้งแต่ 100-3,000 คู่เบส

100 bp plus DNA Ladder



ภาพผนวกที่ 2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder ที่มา : Vivantis technologies Sdn. Bhd.

ภาคผนวก ข

ผลการให้ค่าคะแนนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอแต่ละไพรเมอร์

ตารางภาคที่ 1 การให้ค่าคะแนนแต่ละไพรเมอร์ของเครื่องหมายแฮตซ์เอพีดี

ขนาดของแถบดีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบดีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ไพรเมอร์ A22														
1900	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1650	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
1500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
1400	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
1300	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
1100	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
950	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
850	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
800	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
670	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
640	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
550	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1900	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ไพรเมอร์ A24														
1800	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
1650	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
1500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1300	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1100	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1
950	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
850	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
800	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
750	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0

ตารางภาคที่ 1 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
700	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
650	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
640	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
400	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ไพรเมอร์ A30														
1650	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1600	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
1500	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1
1400	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
1200	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
850	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
750	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
690	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
650	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
ไพรเมอร์ A32														
1600	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0
1500	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1400	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
1300	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1100	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
990	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
750	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1

ตารางภาคที่ 1 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
550	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
500	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ไพรเมอร์ B22														
1800	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1
1650	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
1600	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
1450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1400	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
1300	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1100	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1
1000	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
950	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
850	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
650	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
500	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
ไพรเมอร์ B23														
1600	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
1400	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1300	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
1200	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0
1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
950	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
900	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

ตารางภาคที่ 1 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
830	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
800	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
690	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
650	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
600	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
550	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
500	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
ไพรเมอร์ B25														
1650	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
1000	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
650	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
550	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
490	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ไพรเมอร์ B27														
1650	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1
1600	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
1500	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1400	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
1200	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
1100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
1000	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1
950	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1
850	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
840	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
700	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

ตารางภาคที่ 1 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
670	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
650	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
600	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
500	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
450	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
400	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
350	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
ไพรเมอร์ B32														
1600	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1
1400	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1200	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1
1100	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1
1000	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1
950	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0
850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
800	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1
670	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
650	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0
500	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
ไพรเมอร์ C21														
1500	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
1300	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
1200	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1000	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
950	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0
850	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1
800	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

ตารางภาคที่ 1 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
650	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
640	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
600	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
520	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
450	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
400	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ไพรมอร์ C22														
2300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1800	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1650	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1600	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1300	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
1100	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1050	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0
990	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
850	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
750	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
670	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
650	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1
500	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
400	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0

ตารางภาคที่ 1 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ไพรมอร์ C28														
1700	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0
1600	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1550	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
1500	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1400	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1
1100	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
1050	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
990	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
950	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
840	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
800	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
700	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
660	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
650	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0
550	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
ไพรมอร์ C29														
1600	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0
1500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
1200	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
1100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
950	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
850	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
800	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
700	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
650	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
550	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0
500	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0

ตารางภาคที่ 1 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ไพรเมอร์ C31														
1650	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
1550	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
1300	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0
1200	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
1000	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
950	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
750	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
550	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1
530	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
480	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ไพรเมอร์ D23														
2200	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1650	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
1500	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1400	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
1100	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
1000	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
750	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1

ตารางภาคที่ 1 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
700	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
600	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
550	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
ไพรเมอร์ E23														
2900	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
2100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
1400	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
1200	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
900	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
750	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
690	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
ไพรเมอร์ E24														
2000	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0
1700	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
1200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1100	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
850	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
550	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
500	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

ตารางภาคที่ 1 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
480	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1
450	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0
ไพรเมอร์ E31														
1200	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0
1100	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1000	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
950	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
850	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
800	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
750	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1
650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
550	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
400	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
ไพรเมอร์ E32														
1300	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0
900	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
850	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
800	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
750	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
700	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
650	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
550	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0
490	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1

ตารางภาคที่ 1 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
400	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ไพรเมอร์ F23														
1500	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1100	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
850	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
800	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1
500	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
450	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ไพรเมอร์ F29														
1500	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
1300	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
850	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
840	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
800	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
750	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0
680	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
650	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
550	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0
450	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
390	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ไพรเมอร์ F31														
1600	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
1400	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0

ตารางภาคที่ 1 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1300	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1200	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
950	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
900	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1
850	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
800	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
700	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0
650	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
550	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
450	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
400	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0

ตารางภาคที่ 2 การให้ค่าคะแนนแต่ละไพรเมอร์ของเครื่องหมายสก็อต

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ไพรเมอร์ SCoT1														
2750	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
1900	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
1400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
ไพรเมอร์ SCoT12														
1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1100	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0
1050	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
950	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

ตารางภาคที่ 2 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
900	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
750	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
650	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
600	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1
550	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0
450	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
400	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
310	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
290	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
ไพรมอร์ SCoT13														
1750	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1350	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1300	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1050	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1
1000	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
900	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0
750	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1
600	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
550	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0
490	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
400	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ไพรมอร์ SCoT14														
1600	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1250	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
990	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1

ตารางภาคที่ 2 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
900	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
700	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0
650	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0
500	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
450	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
ไพรมอร์ SCoT35														
2400	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1750	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1400	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0
1300	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0
1150	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
1100	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1000	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
900	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
850	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
810	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
800	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
710	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
690	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
610	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
450	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ไพรมอร์ SCoT39														
2000	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1800	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางภาคที่ 2 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1700	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1600	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0
1400	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1300	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
1200	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1150	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1000	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1
950	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1
850	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
800	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
750	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
700	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
600	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
550	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
ไพรมเมอร์ SCoT40														
1600	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
1500	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
1400	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1200	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
1100	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
1000	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
950	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
850	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
750	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
700	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0

ตารางภาคที่ 2 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
650	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1
550	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
390	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ไพรมเมอร์ SCoT50														
1800	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
1600	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1400	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1200	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1150	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
1050	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
1000	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0
990	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
900	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
850	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
800	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1
750	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
700	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
650	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
ไพรมเมอร์ SCoT51														
2400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
2200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2100	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
1800	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1550	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0

ตารางภาคที่ 2 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
950	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
800	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
750	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ไพรเมอร์ SCoT51														
2400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
2200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2100	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
1800	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1550	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
950	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
800	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
750	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
ไพรเมอร์ SCoT52														
3100	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0
2300	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
1900	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1800	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
1600	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1400	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1300	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
950	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0

ตารางภาคที่ 2 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
900	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1
850	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
790	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
750	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
700	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
650	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
600	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
500	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ไพรมเมอร์ SCoT58														
2100	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2000	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1700	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
1600	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
1450	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1400	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0
1300	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0
1190	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
950	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
850	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
810	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
750	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
700	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
510	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ไพรมเมอร์ SCoT59														
3000	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0

ตารางภาคที่ 2 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1600	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1200	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1000	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1
950	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
850	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
800	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ไพรมอร์ SCoT61														
1800	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1600	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1400	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0
1300	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
1200	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1100	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
1050	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
990	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
900	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
890	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
850	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
800	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1
750	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1
690	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0
600	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0

ตารางภาคที่ 2 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ไพรมอร์ SCoT64														
1600	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1500	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1400	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
1300	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1
1190	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0
1100	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1000	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
950	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
900	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
800	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
700	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
600	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
450	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
ไพรมอร์ SCoT65														
1700	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1490	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1400	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1300	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1250	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1200	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1190	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
1000	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
990	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
950	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
850	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1

ตารางภาคที่ 2 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
750	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0
700	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
500	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
400	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ไพรเมอร์ SCoT66														
1600	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1500	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0
1400	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
1300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
1100	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1
1050	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
990	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
950	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
800	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
700	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
650	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
600	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
ไพรเมอร์ SCoT67														
1500	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
1300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1250	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
1100	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1000	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
950	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0

ตารางภาคที่ 2 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
900	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
850	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
800	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1
700	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
650	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
550	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
490	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
450	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
300	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0
ไพร์เมอร์ SCoT69														
1700	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
1600	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1500	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
1400	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1
1300	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
1100	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
1050	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
900	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
850	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
750	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
710	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
300	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางภาคที่ 2 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
ไพรมเมอร์ SCoT70														
2000	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1800	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
1600	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
1400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1200	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1100	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1000	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1
950	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
900	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
810	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
800	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
650	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
550	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
350	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0
290	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ไพรมเมอร์ SCoT77														
1500	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
1400	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1300	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
1100	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1050	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
1000	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0

ตารางภาคที่ 2 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0
710	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
700	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
600	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
550	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
ไพรมเมอร์ SCoT79														
1900	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
1700	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
1600	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
1450	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
1400	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
1300	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
1250	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1200	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1190	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1
1050	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
800	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1
750	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
650	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ไพรมเมอร์ SCoT80														
2400	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
2300	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
1700	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0
1600	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0
1400	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

ตารางภาคที่ 2 (ต่อ)

ขนาดของแถบตีเอ็นเอ โดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบตีเอ็นเอที่พบ													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1300	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0
1250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
1200	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
1150	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1100	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0
1050	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
1000	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
950	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0
910	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
900	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
850	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
750	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
700	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
650	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
600	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
550	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0
500	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
450	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
400	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1
350	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
300	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวทีปกา มีเสงี่ยม
วันเดือนปีเกิด	20 กันยายน 2535
ทุนการศึกษา	พ.ศ. 2558 : ทุนบัณฑิตเรียนดีเพื่อศึกษาต่อระดับ บัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พ.ศ. 2559 : ทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์เพื่อนำไปสู่ การตีพิมพ์เผยแพร่ พ.ศ. 2560 : ทุนสนับสนุนงานวิจัย ประเภททุนวิจัย ทั่วไป สำหรับนักศึกษาบัณฑิตศึกษา พ.ศ. 2560 : ทุนนำเสนอผลงานวิทยานิพนธ์/สารนิพนธ์ ภายในประเทศ

ผลงานทางวิชาการ

- ทีปกา มีเสงี่ยม, อีระชัย ธนานันต์ และ นฤมล ธนานันต์. 2560. การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีกลุ่มใบลายด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpoC1* และ *ซันดีเอ็นเอ* ที่อยู่ระหว่างยีน *tmH* กับ *psbA*. *Thai J. Sci. Technol.* 6(4): 348-357.
- อีระชัย ธนานันต์, ทีปกา มีเสงี่ยม และสุพัตรา โพธิ์เยี่ยม. 2560. การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกระท้อนด้วยเครื่องหมายสก็อต. *Thai J. Sci. Technol.* 25(6): 1015-1024.
- ทีปกา มีเสงี่ยม, เปรมณัช ขุนปักษี, อีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. 2560. การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกพริกด้วยเครื่องหมายสก็อต. *Thai J. Sci. Technol.* 6(3): 262-270.
- อีระชัย ธนานันต์, ทีปกา มีเสงี่ยม และนฤมล ธนานันต์. 2560. การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* สกุลย่อย *Brachypetalum* หมู่ *Brachypetalum* ด้วยเครื่องหมายสก็อต. *Thai J. Sci. Technol.* 6(2): 161-170.