



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อระบุพันธุ์ของรองเท้านารีเหลืองปราจีน
ระยะที่ 1

Molecular identification of *Paphiopedilum concolor* varieties

Phase I

โดย

ดร.สุรีย์พร นนทชัยภูมิ

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ดร.ประภัสสร ดำรงกุล อึ้งวิชัยพันธ์

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ดร.สันติ วัฒนฐานะ

องค์การสวนพฤกษศาสตร์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ประจำปี พ.ศ.2554

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัย “การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อระบุพันธุ์ของรองเท้านารีเหลืองปราจีน
ระยะที่ 1” ไม่สามารถเกิดขึ้นได้หากไม่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จึง
ขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณอาจารย์ธีรพันธ์ โตธิรกุล มุลนิธิแม่ฟ้าหลวง โครงการพัฒนาคอยดุง อำเภอแม่
ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย คุณจรรยาพร ถาวรสถิตย์สกุล สวนกล้วยไม้พร้าว อำเภอพร้าว จังหวัด
เชียงใหม่ และคุณสายทอง หลวงสุภา ที่กรุณาให้ใบรองเท้านารีเหลืองกาญจน์และเหลืองสังขร
สำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณนายณัฐดนัย เอี้ยวสกุลและนายอรรถพลตลิ่งจิตร ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการ
รวบรวมตัวอย่างพืช และขอขอบคุณนายณัฐดนัย เอี้ยวสกุลที่มีส่วนช่วยเหลือด้านการสกัดดีเอ็นเอ
และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

คณะผู้วิจัย

พฤษภาคม 2554

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

1. ความสำคัญของปัญหาในการวิจัย

กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน [*Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer] มีความสำคัญทั้งในฐานะที่เป็นพืชเศรษฐกิจ เพราะเป็นที่นิยมของผู้ปลูกเลี้ยงและนักพัฒนาสายพันธุ์กล้วยไม้และในฐานะเป็นพืชที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ รองเท้านารีเหลืองปราจีนที่พบในประเทศไทย มีความแปรผันทางสัณฐานวิทยา และชื่อเรียกแตกต่างกันไป ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองอุดร รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ และรองเท้านารีเหลืองสังขร อย่างไรก็ตาม ชื่อเหล่านี้อาจมิได้บ่งบอกถึงหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานที่แท้จริง เพราะยังไม่เคยมีการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของรองเท้านารีเหลืองปราจีนจากหลายกลุ่มประชากรหรือหลายตัวอย่างว่ามีความต่อเนื่องกันหรือไม่ การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมจำเป็นต้องมีเครื่องมือที่เหมาะสม การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ เพราะรองเท้านารีเหลืองปราจีนที่พบในแหล่งต่าง ๆ อาจมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงระหว่างสายพันธุ์ นอกจากนี้กล้วยไม้ชนิดนี้ออกดอกเพียงปีละ 1 ครั้ง ทำให้ไม่สามารถใช้ลักษณะของดอกระบุพันธุ์ของต้นที่ยังไม่มีดอก ปัจจุบันมีการใช้เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานและความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของพืช เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา จึงมีข้อได้เปรียบกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ มีความคงที่ สามารถตรวจสอบได้จากเนื้อเยื่อของพืชทุกชนิดโดยไม่ขึ้นกับระยะการเจริญและการพัฒนาของพืช หรืออิทธิพลของสิ่งแวดล้อม การพัฒนาเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลโดยทั่วไป ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การสกัดดีเอ็นเอ และการพัฒนาเทคนิคสำหรับการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุล

โครงการวิจัยการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อระบุพันธุ์ของรองเท้านารีเหลืองปราจีนมุ่งหมายที่จะศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนที่พบในประเทศไทยทั้งในถิ่นอาศัยตามธรรมชาติและที่ปลูกเลี้ยงไว้โดยการใช้เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลและการศึกษาความแปรผันทางสัณฐานวิทยา ข้อมูลที่ได้จะสามารถใช้แยกหน่วยอนุกรมวิธานของรองเท้านารีชนิดนี้อย่างเหมาะสม ทำให้ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรในธรรมชาติและในแหล่งปลูกเลี้ยง อันจะเป็นประโยชน์ต่อการกำหนดนโยบายด้านการอนุรักษ์และการฟื้นฟูประชากรของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนในธรรมชาติ เทคโนโลยีที่ได้ยังสามารถใช้ระบุแหล่งที่มาของรองเท้านารีเหลืองปราจีนจึงสามารถใช้ตรวจสอบการลักลอบนำกล้วยไม้

จากป้าอย่างผิดกฎหมาย และเป็นพื้นฐานสำหรับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อศึกษาอนุกรมวิธานและความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีและกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ ต่อไป

โครงการวิจัยการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อระบุพันธุ์ของรองเท้านารีเหลืองปราจีน แบ่งออกเป็น 2 ระยะ โครงการวิจัยระยะที่ 1 คณะผู้วิจัยจะพัฒนาเทคนิคสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารี ออกแบบไพรเมอร์และหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และโครงการวิจัยระยะที่ 2 คณะผู้วิจัยจะรวบรวมกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ใช้เทคนิคที่พัฒนาได้จากโครงการวิจัยระยะที่ 1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ที่รวบรวมได้ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันทางสัณฐานวิทยาและโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) จากเครื่องหมายโมเลกุล

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 2.1) การพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อใช้สกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน
- 2.2) การออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้ได้คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน
- 2.3) การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน

3. ขอบเขตของการวิจัย

- 3.1) ทดสอบวิธีสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน 3 วิธี
- 3.2) ออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ของรองเท้านารีเหลืองปราจีน และทดสอบคู่ไพรเมอร์โดยใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดได้จากรองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองอุดร รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ และรองเท้านารีเหลืองสิงขร อย่างน้อยพันธุ์ละ 1 ตัวอย่าง
- 3.3) ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างอย่างน้อย 3 ตัวอย่าง

4. ระเบียบวิธีวิจัยและผลผลิตจากการวิจัย

4.1) การรวบรวมตัวอย่างพืช ได้รวบรวมตัวอย่างพืชจากแหล่งที่มาต่าง ๆ ดังนี้ รongเท้าณาริเหลืองปราชินจำนวน 4 ต้น รongเท้าณาริเหลืองอุดรจำนวน 3 ต้น รongเท้าณาริเหลืองกาญจนจำนวน 3 ต้น และรongเท้าณาริเหลืองสิงขรจำนวน 2 ต้น

4.2) การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี ได้แก่ (1) ชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction (Vivantis) เพราะเป็นชุดสกัดที่มีราคาถูก (2) วิธี sodium dodecyl sulfate (SDS)-potassium acetate (Nontachaiyapoom et al., 2007 คัดแปลงจากวิธีของ Dellaporta et al., 1983) มีขั้นตอนการกำจัดสิ่งปนเปื้อน 2 ขั้นตอน คือ การตกตะกอนโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์ด้วย SDS/potassium acetate และการสกัดด้วย phenol:chloroform:isoamylalcohol และ chloroform:isoamyl alcohol ตามลำดับ (3) วิธี CTAB คัดแปลงจากวิธีของ Want et al., 2009 โดยสลับให้การสกัดด้วย chloroform:isoamylalcohol ตามหลังการสกัดด้วย phenol:chloroform:isoamyl alcohol เพราะ chloroform:isoamylalcohol ใช้ดึง phenol ซึ่งเป็นสิ่งปนเปื้อนที่จะมีผลต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ออกจากสารละลายดีเอ็นเอ โดยใช้ใบสกรองเท้าณาริเหลืองปราชินจำนวน 4 ตัวอย่าง การหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอใช้วิธี UV absorption method พบว่า วิธี SDS-potassium acetate ให้ปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุดและดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงสุด รองลงมาคือวิธี CTAB ให้ปริมาณดีเอ็นเอรองลงมาแต่มีการปนเปื้อนของสารที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 230 นาโนเมตร (A230) ก่อนข้างสูง และชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction ให้ปริมาณดีเอ็นเอต่ำที่สุดและดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนของสารที่มี A230 ก่อนข้างสูง

4.3) การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของกล้วยไม้รongเท้าณาริ ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information ได้ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (forward primer) ให้ชื่อว่า ITSP-F บริเวณ ITS เป็นบริเวณที่มีความแปรผันสูง เหมาะสำหรับการใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในระดับชนิดหรือต่ำกว่าชนิด

4.4) การทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี และไพรเมอร์สองคู่ คู่ไพรเมอร์ที่หนึ่ง คือ NS3 และ NS4 (White et al., 1990) ใช้เป็นคู่ไพรเมอร์ควบคุม คู่ไพรเมอร์นี้จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน 18S ribosomal DNA (rDNA) และคู่ไพรเมอร์ที่ 2 ได้แก่ ITSP-F และ ITS-4 (White et al., 1990) โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส พบว่าดีเอ็นเอที่เตรียมโดยวิธี SDS-potassium acetate และวิธี CTAB สามารถเพิ่มปริมาณด้วยพีซีอาร์ได้ดีใกล้เคียงกัน และดีกว่าดีเอ็นเอที่เตรียมโดยชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction จากข้อมูลความบริสุทธิ์และผลของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ สรุปได้ว่า วิธีสกัดดีเอ็นเอที่

เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากใบสดของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน คือวิธี SDS-potassium acetate

4.5) ใช้วิธี SDS-potassium acetate สกัดดีเอ็นเอจากใบสดของรองเท้านารีเหลืองปราจีนที่รวบรวมได้ ใช้คูไพรเมอร์ ITSP-F/ITS4 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS PCR purification ใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) ตัวอย่างพืชที่ทำการให้บริสุทธิ์แล้วถูกส่งไปที่ First Base Pte Ltd (Singapore) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 (White et al. 1990) พบว่า คูไพรเมอร์ ITSP-F/ITS4 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนทั้ง 4 พันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและให้ PCR product เพียง 1 ชนิด การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ยืนยันว่าบริเวณที่เพิ่มปริมาณได้คือ ITS และมี PCR product เกิดขึ้นเพียง 1 ชนิดต่อ 1 ปฏิกริยา

5. ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย ผลกระทบทางวิชาการหรือเทคโนโลยี

5.1 โครงการวิจัยนี้รายงานวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากใบสดของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน ได้แก่ วิธี SDS-potassium acetate วิธีสกัดดีเอ็นเอนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้สกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างพืชที่มีปริมาณโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์สูงชนิดอื่น ๆ

5.2 โครงการวิจัยนี้ออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อบริเวณ ITS และรายงานสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จึงสามารถนำไปใช้ในโครงการวิจัยระยะที่ 2 คือการหาโพลีเมอร์ฟิสิกส์บริเวณ ITS ของรองเท้านารีเหลืองปราจีน

5.3 กระบวนการวิจัยขั้นต่อไปคือ การศึกษาความแปรผันทางสัณฐานวิทยา และการรวบรวมตัวอย่างใบจากรองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองอุดร รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ และรองเท้านารีเหลืองสิงขร จากแหล่งต่าง ๆ และจากประชากรของรองเท้านารีเหลืองปราจีนตามธรรมชาติให้ได้จำนวนมาก สกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS และหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบหาโพลีเมอร์ฟิสิกส์บริเวณ ITS ระหว่างพันธุ์หรือกลุ่มประชากรที่ศึกษา หากพบโพลีเมอร์ฟิสิกส์ก็สามารถใช้ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เหล่านี้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้แยกหน่วยอนุกรมวิธานในระดับที่ต่ำกว่าชนิดได้อย่างเหมาะสม เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้สามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรรองเท้านารีเหลืองปราจีนในธรรมชาติ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์และการฟื้นฟูประชากรรองเท้านารีเหลืองปราจีนในธรรมชาติ นอกจากนี้เทคโนโลยีที่ได้ยังอาจนำไปประยุกต์ใช้ศึกษาอนุกรมวิธานและความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีและกล้วยไม้ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันต่อไป

บทคัดย่อ

กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน (*Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ อีกทั้งยังเป็นพืชที่ถูกคุกคามจนทำให้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ ในขณะที่การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ชนิดนี้ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลยังมีน้อยมาก ทั้งนี้ส่วนหนึ่งเนื่องมาจากการเตรียมดีเอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR) ก่อนข้างยาก การศึกษานี้เปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอจากใบสดของรองเท้านารีเหลืองปราจีน 3 วิธี ได้แก่ การใช้ชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction Kit (Vivantis Technologies) วิธี sodium dodecyl sulfate (SDS)-potassium acetate และวิธี cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) พบว่า วิธี SDS-potassium acetate ให้ปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุดและดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงสุด รองลงมาคือวิธี CTAB ให้ปริมาณดีเอ็นเอรองลงมาแต่มีการปนเปื้อนของสารที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 230 นาโนเมตร (A230) ก่อนข้างสูง และชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction ให้ปริมาณดีเอ็นเอต่ำที่สุดและดีเอ็นเอที่ได้มีการปนเปื้อนของสารที่มี A230 ก่อนข้างสูง การทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า ดีเอ็นเอที่เตรียมโดยวิธี SDS-potassium acetate และวิธี CTAB สามารถเพิ่มปริมาณด้วยพีซีอาร์ได้ดีใกล้เคียงกัน และดีกว่าดีเอ็นเอที่เตรียมโดยชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction ดังนั้นวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากใบสดของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน คือวิธี SDS-potassium acetate ไพรมเมอร์ฟอร์เวิร์ดที่ออกแบบเพื่อให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribe Spacer (ITS) ถูกให้ชื่อว่า ITSP-F การทดสอบไพรมเมอร์นี้ร่วมกับไพรมเมอร์รีเวิร์ด ITS4 โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส พบว่า ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เพียงชนิดเดียวในปริมาณมาก จึงเหมาะสมสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ วิธีสกัดดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพและไพรมเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อบริเวณ ITS จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้ศึกษาข้อมูลทางด้านพันธุกรรม อันจะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์และการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนและกล้วยไม้ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันต่อไป

Abstract

Paphiopedilum concolor (Lindl.) Pfitzer is economically important. Moreover, wild populations of this orchid are threatened with extinction. However, there have been very few studies on genetic diversity of this orchid species using molecular tools, partly due to difficulties in obtaining good quality of DNA suitable for polymerase chain reactions (PCRs). This study tested three DNA extraction methods for purification of genomic DNA from *P. concolor* leaves, i.e., GF-1 Plant DNA Extraction Kit (Vivantis Technologies), sodium dodecyl sulfate (SDS)-potassium acetate method, and cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method. It was found that the SDS-potassium acetate method produced the highest yield of DNA with the best quality. The CTAB method produced considerably less yield with greater co-purified contaminants that absorbed strongly at 230 nm. The GF-1 Plant DNA Extraction Kit produced the lowest yield of DNA that contained high proportion of contaminants with absorption at 230 nm. Quality of the DNA was also tested by PCRs. The DNA samples suitable for the PCRs were those prepared by the SDS-potassium acetate and the CTAB methods, but not the samples prepared by the GF-1 Plant DNA Extraction Kit. According to this study, the SDS-potassium acetate method was the best method for purification of DNA from fresh leaves of *P. concolor*. The forward primer designed for amplification of the Internal Transcribe Spacer (ITS) region of *P. concolor* was named ITSP-F. Test of this primer and the reverse primer, ITS4 at annealing temperature 55°C, resulted in high quantity of single product suitable for DNA sequencing. Efficient DNA extraction method and ITS-specific primer would be vital to the development of molecular markers in the study of genetic diversity which would be beneficial to the conservation and varietal improvement programs of *P. concolor* and closely-related orchids.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทสรุปผู้บริหาร	ข
บทคัดย่อ	ฅ
Abstract	ช
สารบัญ	๗
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
ตารางอักษรย่อ	ฏ
บทที่ 1	บทนำ
1.1 ที่มาของปัญหาวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ความสำคัญของการวิจัย	4
1.4 สมมติฐานของการวิจัย	4
1.5 ขอบเขตของการวิจัย	5
1.6 นิยามศัพท์เฉพาะ	5
บทที่ 2	แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
2.1 กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน	7
2.2 อนุกรมวิธานของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน	7
2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล	9
2.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล	11
2.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล	12
2.6 การสกัดดีเอ็นเอ	13

	หน้า
บทที่ 3	ระเบียบวิธีวิจัย
3.1	ตัวอย่างพืช 15
3.2	การศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างวิธีสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี 16
3.3	การออกแบบไพรเมอร์ 18
3.4	การทดสอบไพรเมอร์กับตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีเหลือง ปราจีนทั้ง 4 พันธุ์ 18
บทที่ 4	ผลการศึกษาวิจัยและอภิปรายผล
4.1	การเปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้รองเท้านารีเหลือง ปราจีน 20
4.2	การออกแบบไพรเมอร์ 23
4.3	การทดสอบไพรเมอร์กับตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีเหลือง ปราจีนทั้ง 4 พันธุ์ 24
บทที่ 5	สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ
5.1	สรุปผลการวิจัย 25
5.2	ข้อเสนอแนะ 25
เอกสารอ้างอิง	
ภาคผนวก	
ประวัตินักวิจัย	

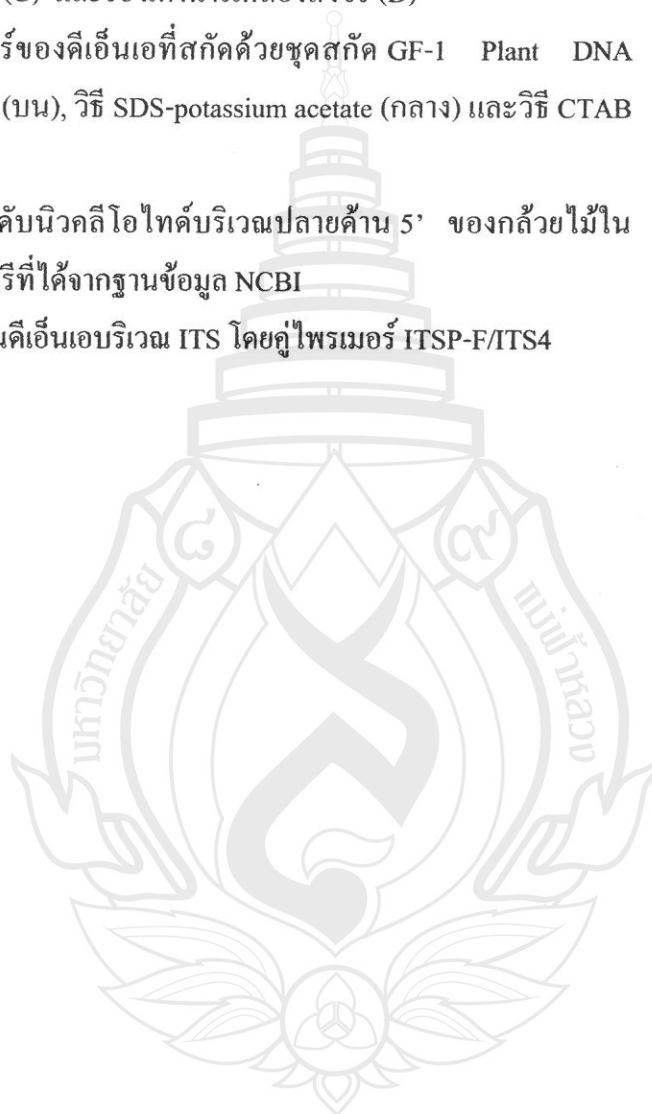
สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	ตัวอย่างร่อนแท่นารี่เหลืองปราจีนที่ใช้ในงานวิจัยนี้
16	
ตารางที่ 2	ปริมาณของดีเอ็นเอจากใบสดกล้วยไม้ร่อนแท่นารี่ที่เตรียมโดยวิธีสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี
20	
ตารางที่ 3	ค่า A260/A280 และค่า A260/A230 ของดีเอ็นเอจากใบสดกล้วยไม้ร่อนแท่นารี่ที่เตรียมโดยวิธีสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี
21	



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 รongเท้าณารี่เหลื่องอุดร (A) รongเท้าณารี่เหลื่องปราจีน (B) รongเท้าณารี่เหลื่องกาญจน์ (C) และรongเท้าณารี่เหลื่องสิงขร (D)	15
ภาพที่ 2 การเกิดพีชีอาร์ของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction Kit (บน), วิธี SDS-potassium acetate (กลาง) และวิธี CTAB (ล่าง)	22
ภาพที่ 3 การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลายด้าน 5' ของกล้วยไม้ในสกุลรongเท้าณารี่ที่ได้จากฐานข้อมูล NCBI	23
ภาพที่ 4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS โดยคู่ไพรมเมอร์ ITSP-F/ITS4	24



ตารางอักษรย่อ

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EST	External transcribe sequence
IGS	Intergenic spacer
IPNI	International Plant Names Index
ITS	Internal transcribe spacer
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase chain reaction
RAPD	Random Amplified Fragment Polymorphic DNA
rDNA	Ribosomal DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
T _m	Melting temperature

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาของปัญหาวิจัย

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum*) เป็นกล้วยไม้ที่มีสัดส่วน ลักษณะใบและดอกสวยงาม ดอกของรองเท้านารีมีขนาดค่อนข้างโต กลีบปากเป็นถุงคล้ายหัวรองเท้า กลีบเลี้ยงคู่ข้างเชื่อมติดกันอยู่ใต้กลีบปาก ทั้งดอกจึงดูคล้ายมีเพียง 4 กลีบ ในประเทศไทยพบกล้วยไม้รองเท้านารี 16 ชนิด (Nanakorn and Indharamusika, 1999) เนื่องจากกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นที่นิยมในหมู่นักสะสมทั้งชาวไทยและชาวต่างประเทศ จึงมีปริมาณและราคาการซื้อขายสูงมาก อีกทั้งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรองเท้านารีหลายชนิดโดยเฉพาะที่เป็นพันธุ์ป่ามักไม่ค่อยประสบความสำเร็จ ทำให้มีการลักลอบนำต้นออกจากป่ามาขายจนรองเท้านารีหลายชนิดได้สูญพันธุ์ไปจากป่าธรรมชาติของประเทศไทย กล้วยไม้รองเท้านารีพันธุ์ป่าทุกชนิดถูกจัดอยู่ใน Convention on International Trade in Endangered Species (CITES) Appendix I (www.cites.org/) หมายถึงเป็นพืชที่ใกล้สูญพันธุ์และห้ามทำการค้าโดยเด็ดขาด

กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน [*Paphiopedilum concolor* (Lindl.) Pfitzer] เป็นกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดที่ปลูกเลี้ยงง่ายกว่าชนิดอื่นเพราะสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ออกดอกง่ายและให้ดอกสีเหลืองสวยงาม จึงเป็นที่นิยมของผู้ปลูกเลี้ยงและนักพัฒนาสายพันธุ์กล้วยไม้ ในอดีตรองเท้านารีเหลืองปราจีนมีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย ในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบที่จังหวัดสระบุรีไปถึงจังหวัดนครราชสีมา อุบลราชธานี และอุดรธานี ในภาคตะวันออกพบที่จังหวัดปราจีนบุรี นครนายกไปจนถึงจังหวัดจันทบุรี ส่วนภาคตะวันตกพบได้บริเวณเขตชายแดนระหว่างจังหวัดกาญจนบุรีกับประเทศพม่า เลยลงไปถึงภาคใต้และเกาะในทะเลอันดามัน (ภาณีรัตน์, 2539) รองเท้านารีที่พบในแต่ละท้องถิ่น จะมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองอุดร รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ และรองเท้านารีเหลืองสิงขร (อุไร, 2550) อย่างไรก็ตาม ชื่อเหล่านี้อาจมิได้บ่งบอกถึงหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานที่แท้จริง เพราะยังไม่เคยมีการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมและลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของรองเท้านารีเหลืองปราจีนจากหลายกลุ่มประชากรหรือหลายตัวอย่างว่ามีความต่อเนื่องกันหรือไม่ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวมีความสำคัญสำหรับการแยกหน่วยอนุกรมวิธานอย่างเหมาะสม จากการตรวจสอบเอกสาร เช่น หนังสือหรือเว็บไซต์ต่าง ๆ พบว่า แม้ว่าจะมีการระบุชื่อพันธุ์ (variety) ของรองเท้านารีเหลืองปราจีนที่พบในประเทศไทยอยู่บ้าง แต่หนังสือหรือเว็บไซต์เหล่านี้มิได้บอกแหล่งที่มาของข้อมูลหรือแหล่งที่มาของข้อมูลไม่ใช่เอกสารทางวิชาการที่น่าเชื่อถือ เท่าที่ตรวจสอบเอกสารพบ มีเพียงรองเท้านารีเหลืองปราจีนในประเทศไทยเพียงพันธุ์เดียวคือ รองเท้านารีเหลืองสิงขร (*P. concolor* Pfitzer var.

longipetalum (Rolfe) O.Gruss & Iamwiriyakul) ที่มีการบรรยายลักษณะประจำพันธุ์ในเอกสารทางวิชาการที่น่าเชื่อถือ (Gruss & Iamwiriyakul, 2006) อย่างไรก็ตาม การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของรองเท้านารีเหลืองปราจีนในประเทศไทยในปัจจุบัน มีอุปสรรคที่สำคัญคือ ประชากรในธรรมชาติในประเทศไทยเหลืออยู่น้อยมาก จากการสำรวจเบื้องต้น พบว่า มีการพบเห็นประชากรในธรรมชาติของรองเท้านารีเหลืองปราจีนที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าอัมผาง จังหวัดตาก และที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จังหวัดอุทัยธานี แต่การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของพืชเพื่อแยกหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานในระดับที่ต่ำกว่าชนิด จำเป็นจะต้องมีกลุ่มประชากรหลายกลุ่มหรือตัวอย่างจำนวนมาก ดังนั้นแหล่งเก็บตัวอย่างที่เป็นไปได้อีกประเภทหนึ่งคือ ตลาดต้นไม้และสวนกล้วยไม้ต่าง ๆ ที่มีการปลูกเลี้ยงรองเท้านารีเหลืองปราจีนพันธุ์แท้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของพืชตัวอย่างจากแหล่งดังกล่าวจำเป็นต้องมีเครื่องมือที่เหมาะสม

Cribb (1998) ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะรูปทรงของดอก ความยาวกลีบดอก จุดประบนกลีบดอก จุดประบนใบ สำหรับการระบุพันธุ์ของรองเท้านารีเหลืองปราจีน การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวเพื่อระบุพันธุ์และเพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมอาจไม่เพียงพอ เพราะรองเท้านารีเหลืองปราจีนที่พบในแหล่งต่าง ๆ อาจมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันหรือมีการผสมกันระหว่างพันธุ์ หรือเป็นเพราะอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม อุปสรรคสำคัญอีกประการหนึ่ง คือ กล้วยไม้ชนิดนี้ออกดอกเพียงปีละ 1 ครั้ง ทำให้ไม่สามารถใช้ลักษณะของดอกระบุพันธุ์ของต้นที่ยังไม่มีดอก ปัจจุบันมีการใช้เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เพื่อศึกษาอนุกรมวิธานและความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของพืช เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลอาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา จึงมีข้อได้เปรียบกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ มีความคงที่ สามารถตรวจสอบได้จากเนื้อเยื่อของพืชทุกชนิดโดยไม่ขึ้นกับระยะการเจริญและการพัฒนาของพืช หรืออิทธิพลของสิ่งแวดล้อม (Agarwal et al., 2008) ตัวอย่างของเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ศึกษาอนุกรมวิธานในระดับที่ต่ำกว่าชนิดและความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของกล้วยไม้ เช่น Random Amplified Polymorphic DNA method (RAPD) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Internal Transcribe Spacer (ITS) (Jo et al., 2005) Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellite (Li et al., 2010) และ Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) (Szalanski et al., 2001) การพัฒนาเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลโดยทั่วไป ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การสกัดดีเอ็นเอ และการพัฒนาเทคนิคสำหรับการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุล

โครงการวิจัยการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อระบุพันธุ์ของรองเท้านารีเหลืองปราจีน มุ่งหมายที่จะศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนที่พบในประเทศไทยทั้งในถิ่นอาศัยตามธรรมชาติและที่ปลูกเลี้ยงไว้โดยการใช้เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลและการศึกษาความแปรผันทางสัณฐานวิทยา ข้อมูลที่ได้จะสามารถนำมาใช้ประโยชน์ดังต่อไปนี้ (1) สามารถใช้สร้างรูปวิธาน (key) สำหรับการแยกหน่วยอนุกรมวิธานของรองเท้านารีชนิดนี้เหมาะสม (2) ทำให้ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรในธรรมชาติและในแหล่งปลูกเลี้ยง อันจะเป็นประโยชน์ต่อการกำหนดนโยบายด้านการอนุรักษ์และการฟื้นฟูประชากรของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนในธรรมชาติ (3) นำไปพัฒนาเป็นเทคนิคสำหรับระบุแหล่งที่มาของรองเท้านารีเหลืองปราจีน ใช้ตรวจสอบการลักลอบนำกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนออกจากแหล่งธรรมชาติอย่างผิดกฎหมาย (4) เทคโนโลยีที่ได้ยังอาจนำไปประยุกต์ใช้ศึกษาอนุกรมวิธานและความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีและกล้วยไม้ชนิดอื่น ๆ ต่อไป

โดยโครงการวิจัยการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อระบุพันธุ์ของรองเท้านารีเหลืองปราจีนแบ่งออกเป็น 2 ระยะ โครงการวิจัยระยะที่ 1 คณะผู้วิจัยจะพัฒนาเทคนิคสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารี ออกแบบไพรเมอร์และหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และโครงการวิจัยระยะที่ 2 คณะผู้วิจัยจะรวบรวมกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ใช้เทคนิคที่พัฒนาได้จากโครงการวิจัยระยะที่ 1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ที่รวบรวมได้ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความแปรผันทางสัณฐานวิทยาและโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) จากเครื่องหมายโมเลกุล

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 การพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อใช้สกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน

1.2.2 การออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้ได้คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน

1.2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน

1.3 ความสำคัญของการวิจัย

1.3.1 การสร้างองค์ความรู้

โครงการวิจัยนี้จะทำให้เกิดองค์ความรู้ดังต่อไปนี้ 1) วิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากใบสดของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน 2) โปรเมอรัที่เฉพาะเจาะจงกับบริเวณ ITS ของกล้วยไม้รองเท้านารี และ 3) สภาพที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน

1.3.2 การประยุกต์ใช้ความรู้

เมื่อนำองค์ความรู้ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ไปพัฒนาต่อยอด จะทำให้ได้เทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับใช้ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนในประเทศไทย อันจะเป็นประโยชน์ต่อการกำหนดนโยบายด้านการอนุรักษ์และการฟื้นฟูประชากรของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนในธรรมชาติ นอกจากนี้เทคโนโลยีที่ได้ยังอาจนำไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบแหล่งที่มาของรองเท้านารีเหลืองปราจีน ป้องกันการลักลอบนำรองเท้านารีเหลืองปราจีนออกจากแหล่งธรรมชาติอย่างผิดกฎหมาย หรือพัฒนาต่อยอดเพื่อนำไปใช้ศึกษาอนุกรมวิธานและความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีและกล้วยไม้ชนิดอื่น

1.4 สมมติฐานของการวิจัย

1.4.1 เนื่องจากใบของกล้วยไม้มีโพลีแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) และสารกลุ่มฟีนอล (phenolic compound) ในปริมาณมาก วิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนน่าจะเป็นวิธีสกัดดีเอ็นเอที่นิยมใช้กับพืชที่มีรายงานว่า มีโพลีแซ็กคาไรด์หรือสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิในปริมาณสูง งานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาวิธีสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธีดังต่อไปนี้

1) วิธี sodium dodecyl sulfate (SDS)-potassium acetate มีหลักการคือ ใช้ SDS ย่อย plasma membrane ของเซลล์ ทำให้ปลดปล่อยดีเอ็นเอ โปรตีนและโพลีแซ็กคาไรด์ ออกมาอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (buffer) โปรตีนและโพลีแซ็กคาไรด์จะถูกหุ้มด้วย dodecyl sulfate การเติม potassium ion เพื่อไปแทนที่ sodium ion ทำให้โปรตีนและโพลีแซ็กคาไรด์ตกตะกอน (Nui et al., 2008) หลังจากนั้นจึงแยกโปรตีนและสิ่งปนเปื้อนอื่น ๆ ออกด้วยการสกัดด้วย phenol: chloroform: isoamyl alcohol และ chloroform: isoamyl alcohol ตามลำดับ วิธีนี้สามารถสกัดดีเอ็นเอจากพืชที่มีสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิในปริมาณสูง (Nontachaiyapoom et al., 2007) และกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดอื่น 2 ชนิด (Rodrigues et al., 2009)

2) วิธี cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) มีหลักการคือ ใช้ CTAB ย่อยผนังเซลล์ของพืชและ plasma membrane ทำให้ปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมา การสกัดสิ่งปนเปื้อน

ประเภทโปรตีนใช้การสกัดด้วย chloroform: isoamyl alcohol และตามด้วย chloroform: isoamyl alcohol จากนั้นจึงตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย NaCl และ absolute ethanol วิธีนี้ประสบความสำเร็จในการสกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้สกุลหวาย (Wang et al., 2009) และกล้วยไม้รองเท้านารีอื่น 3 ชนิด (Sun et al., 2011)

3) ชุดสกัด Plant Genomic DNA purification Kit (Hopegen Biotechnology Development Enterprise, Taichung County, Taiwan) เพราะสามารถแตกเซลล์และตกตะกอนโพลีแซคคาไรด์ก่อนการปั่นเหวี่ยงสารละลายดีเอ็นเอผ่านเมมเบรน (membrane) หากพบว่าชุดสกัดนี้เหมาะสม จะช่วยให้การสกัดดีเอ็นเอสะดวกและรวดเร็วยิ่งขึ้น

1.4.2 บริเวณ ITS เป็นบริเวณที่เหมาะสมสำหรับการแยกหน่วยอนุกรมวิธานในระดับที่ต่ำกว่าชนิดและการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน เพราะเป็นบริเวณที่ความแปรผัน (variation) ของลำดับนิวคลีโอไทด์สูง

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

1.5.1 ทดสอบวิธีสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน 3 วิธี

1.5.2 ออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ของรองเท้านารีเหลืองปราจีน และทดสอบคู่ไพรเมอร์โดยใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดได้จากรองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองอุดร รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ และรองเท้านารีเหลืองสิงขร อย่างน้อยพันธุ์ละ 1 ตัวอย่าง

1.5.3 ทดสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ดีเอ็นเอตัวอย่างอย่างน้อย 3 ตัวอย่าง

1.6 คำอธิบายศัพท์เฉพาะ

พีซีอาร์ (PCR, Polymerase Chain Reaction): การเพิ่มปริมาณส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยใช้เอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนอุณหภูมิสูง ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนได้แก่ การแยกสายดีเอ็นเอต้นแบบออกจากกัน (denaturation) โดยใช้อุณหภูมิสูง การลดอุณหภูมิเพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) และการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ (extension)

โพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism): การที่ประชากรของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ๆ มีลักษณะหนึ่ง ๆ (phenotype) แตกต่างกันหลายรูปแบบ

ไพรเมอร์ (primer): ลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker): ลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอที่สามารถใช้ระบุชนิดของเซลล์ ชนิดของสิ่งมีชีวิต หรือสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว/ต้น



บทที่ 2 แนวคิดทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน

กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน [*Paphiopedilum concolor* (Lindl. ex Bateman) Pfitzer] จัดอยู่ในสกุลย่อย (subgenus) *Brachypetalum* พบครั้งแรกที่แคว้นตะนาวศรี (Tenasserim) ประเทศพม่า (Cribb, 1998) รองเท้านารีชนิดนี้มีการกระจายพันธุ์ทางภูมิศาสตร์กว้างขวางกว่ารองเท้านารีชนิดอื่น ๆ พบในประเทศไทยพม่า ไทย เวียดนาม กัมพูชา ลาว และจีน (Cash, 1991) สำหรับประเทศไทย พบรองเท้านารีเหลืองปราจีนในทุกภาคของประเทศไทยยกเว้นภาคเหนือ ในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบที่จังหวัดสระบุรีไปถึงจังหวัดนครราชสีมา อุบลราชธานี และอุดรธานี ในภาคตะวันออกพบที่จังหวัดปราจีนบุรี นครนายก ไปจนถึงจังหวัดจันทบุรี ส่วนภาคตะวันตกพบได้บริเวณเขตชายแดนระหว่างจังหวัดกาญจนบุรีกับประเทศพม่า เลยลงไปถึงภาคใต้และเกาะในทะเลอันดามัน (ภาณีรัตน์, 2539) กล้วยไม้ชนิดนี้อาจขึ้นตามชอกหินหรือในดิน ที่ความสูง 300 - 1,000 เมตร (วิระชัย และคณะ, 2543) กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน มีลักษณะของใบค่อนข้างหนา รูปขอบขนาน ขนาด 2.5 – 3 x 10 - 15 เซนติเมตร ปลายหยักมนไม่เท่ากัน ใบด้านบนลายเขียวแก่สลับเขียวอมขาว ด้านล่างมีลายประสีม่วงกระจาย แผ่นใบกางออกในแนวเกือบระนาบ ก้านช่อดอกยาว 5 - 7 เซนติเมตร สีเขียวหรือเขียวอมม่วง มีขนสั้นนุ่ม ดอกในช่อ 1 - 3 ดอก ขนาดดอก 4 - 6 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีสีเหลืองอ่อนหรือเข้ม ผิวกลีบมีขนละเอียดนุ่ม ออกดอกตลอดปี รองเท้านารีเหลืองปราจีนในประเทศไทย มีชื่อตามแหล่งที่พบ ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองอุดร รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ และรองเท้านารีเหลืองสิงขร (อุไร, 2550) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันรองเท้านารีเหลืองปราจีนตามธรรมชาติเหลืออยู่น้อยมาก จากการสำรวจเบื้องต้น พบว่าอาจเหลือเพียงที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าอัมผาง จังหวัดตาก และที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าซับลังกา จังหวัดลพบุรี เท่านั้น

2.2 อนุกรมวิธานของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน

ข้อมูลชื่อพืชของ International Plant Names Index (IPNI) ระบุว่ารองเท้านารีเหลืองปราจีนมีหมวดหมู่อนุกรมวิธานที่ต่ำกว่าชนิด (infraspecific taxa) 2 ชนิดย่อย (subspecies) ได้แก่ subsp. *chlorophyllum* (Rchb.f.) Fowlie และ subsp. *reynieri* (Rchb.f.) Fowlie 4 พันธุ์ (variety) ได้แก่ var. *album* Braem, var. *dahuaense* Z.J.Liu & J.Yong Zhang, var. *immaculatum* Z.J.Liu & J.Yong Zhang และ var. *longipetalum* (Rolfe) O.Gruss & Iamwir 3 ฟอร์ม (forma) ได้แก่ f. *album* (Braem) Braem, f. *dahuaense* (Z.J.Liu & J.Yong Zhang) Z.J.Liu & S.C.Chen และ f. *sulphurinum* (Rchb.f.

) O.Gruss (www.tropicos.org, สืบค้นวันที่ 2 ก.พ. 2554) อย่างไรก็ตาม IPNI ไม่ได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับชื่อซ้ำ (synonymy) คณะกรรมการของ World Checklist of Selected Plant Families (<http://apps.kew.org/wcsp/>) รับรองเฉพาะชื่อ *Paphiopedilum concolor* (Lindl. ex Bateman) Pfitzer และกำหนดให้หมวดหมู่อนุกรมวิธานที่ต่ำกว่าชนิดของรองเท้านารีเหลืองปราจีนที่เคยมีรายงาน ได้แก่ subsp. *chlorophyllum*, subsp. *reynieri*, var. *dahuaense*, var. *immaculatum*, var. *longipetalum*, f. *dahuaense*, และ f. *sulphurinum* เป็นชื่อซ้ำทั้งหมด ในหนังสือชื่อ The Genus *Paphiopedilum* ของ Cribb (1998) ได้สรุปลักษณะที่ใช้จำแนกพันธุ์ของรองเท้านารีเหลืองปราจีนดังนี้คือ var. *album* ไม่มีจุดสีม่วงบนดอกและใบ, var. *chlorophyllum* ไม่มีลายสีม่วงได้ใบ, var. *longipetalum* มีกลีบดอกรูปช้อน (spatulate) ยาว 5 เซนติเมตรและกว้าง 1.5 เซนติเมตร, var. *striatum* กลีบดอกมีเส้นสีม่วงมากกว่าที่จะกระจายเป็นจุดทั่วกลีบ, var. *sulphurinum* ดอกและใบไม่มีจุดสีม่วง และ Cribb ยังกล่าวถึงรายงานของ Guillaumin (1924) ว่าพบรองเท้านารีเหลืองปราจีนอีก 2 พันธุ์ในอินโดจีน ได้แก่ var. *regnieri* มีดอกสีเหลืองเข้ม 4 - 5 ดอกต่อหนึ่งช่อ และมีกลีบดอกขนาดใหญ่ และ var. *tonkinense* มีกลีบเลี้ยงบน (dorsal sepal) ขนาดใหญ่ กลีบดอกมีจุดหนาแน่นบริเวณฐานของกลีบ อย่างไรก็ตาม Cribb มีความเห็นว่าลักษณะที่แตกต่างกันเป็นเพียงความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของรองเท้านารีเหลืองปราจีน และน่าจะเรียกว่าฟอร์มทั้งหมด

ในประเทศไทยรองเท้านารีเหลืองปราจีนที่มีความแปรผันทางลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองอุดร รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ รองเท้านารีเหลืองสิงขร แต่ยังไม่มีการศึกษาการระบุหมวดหมู่อนุกรมวิธานที่ต่ำกว่าชนิดอย่างเป็นทางการ จากการตรวจสอบเอกสาร พบว่ามีเพียงรองเท้านารีเหลืองสิงขรที่มีการบรรยายลักษณะประจำพันธุ์ในเอกสารทางวิชาการ รองเท้านารีเหลืองสิงขรมีกลีบดอกยาวและแคบกว่าพันธุ์อื่น ๆ คือ กว้าง 1.1 - 1.6 เซนติเมตร ยาว 3.9 - 5.0 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงบนเป็นรูปรีถึงขอบขนาน กว้าง 1.5 - 2.1 เซนติเมตร ยาว 2.9 - 3.6 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีลายประเป็นเส้นสีม่วงถึงน้ำตาล โดยเส้นตรงกลางมีสีเข้มกว่าเส้นอื่น กลีบปากกว้าง 1.3 - 1.5 เซนติเมตร ยาว 2.8 - 3.3 เซนติเมตร มีจุดสีม่วงเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่ว (Gruss & Iamwiriyakul, 2006) สำหรับกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนที่มีชื่อเรียกอื่น ๆ พบว่ามีความแปรผันของลักษณะต่าง ๆ เช่น การมีหรือไม่มีจุดประบนใบ สีของดอก รูปทรงของดอก ความยาวกลีบดอก จำนวนดอกต่อหนึ่งช่อดอก อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้ชนิดนี้อย่างละเอียด เพื่อนำมาวิเคราะห์หา ลักษณะทางอนุกรมวิธาน (taxonomic characters)

2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

เนื่องจากการศึกษาความแปรผันทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอสำหรับการจำแนกพืชในระดับที่ต่ำกว่าระดับชนิด (Pinheiro and Barros, 2009) เทคโนโลยีใหม่ ๆ อาศัยความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอมาใช้สร้างเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) เพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและช่วยในการจำแนกชนิด/พันธุ์พืช เครื่องหมายโมเลกุลพื้นฐานที่นิยมใช้ เช่น Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Random Amplified Fragment Polymorphic DNA (RAPD), Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellite-based marker, Single Nucleotide Polymorphism (SNP) เทคนิคเหล่านี้มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน เช่น RFLP อาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และการจับคู่กัน (hybridization) ของดีเอ็นเอและดีเอ็นเอตรวจจับ (probe) RFLP เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ค่อนข้างสูงและสามารถทำซ้ำได้ (reproducible) อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ใช้เวลานานและมีราคาแพง, RAPD ใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) สั้น ๆ เข้าจับกับดีเอ็นเอ ทำให้เกิดพอลิมอร์ฟิซึมของ PCR amplicons วิธีนี้สะดวก รวดเร็ว มีราคาถูก แต่ข้อเสียของเทคนิคนี้คือไม่สามารถทำซ้ำได้, เทคนิค AFLP ผสมผสานหลักการของ RFLP และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยทำการต่อดีเอ็นเอดั้วเชื่อม (adaptors) เข้าที่ปลายของสายดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ปลายเหนียวที่เกิดขึ้นสามารถทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ต่อไป หากต้องการให้มีความเฉพาะเจาะจงมากขึ้นก็สามารถทำได้โดยการเพิ่มเบสเข้าที่ปลายด้าน 3' เทคนิคนี้สามารถใช้จำแนกสิ่งมีชีวิตในระดับ sub-species และสามารถใช้ทำแผนที่ยีน อย่างไรก็ตามเทคนิคค่อนข้างยุ่งยากประกอบด้วยหลายขั้นตอน, SSR หรือ microsatellite สร้างพอลิมอร์ฟิซึมจากจำนวนซ้ำที่ไม่เท่ากันของลำดับนิวคลีโอไทด์สั้น ๆ (1 - 5 นิวคลีโอไทด์) ซึ่งกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม (genome) ของสิ่งมีชีวิต การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงต่อบริเวณที่มี SSR จากนั้นใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและวิเคราะห์ PCR amplicons บน polyacrylamide หรือ agarose gel เครื่องหมายโมเลกุล SSR เป็นที่นิยมเพราะเป็น codominant marker มีจำนวนมาก และการวิเคราะห์ค่อนข้างง่าย แม้ว่าการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้ต้องใช้เวลานานและมีราคาสูง (Agarwal et al., 2008)

SNP เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้รับความนิยมสูงสุดชนิดหนึ่ง การตรวจหา SNP ทำได้โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA) บริเวณที่ต้องการศึกษากับเทคนิคพีซีอาร์ จากนั้นจึงทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ข้อดีของ SNP คือ พบมากที่สุด ในจีโนมของสิ่งมีชีวิต พอลิมอร์ฟิซึมได้จากการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์โดยตรง ผลจึงน่าเชื่อถือมาก

ที่สุด (Agarwal et al., 2008) นอกจากนี้เทคโนโลยีในปัจจุบันยังทำให้การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์รวดเร็วและมีราคาต่อหน่วยลดลงเป็นอย่างมาก บริเวณของดีเอ็นเอที่นิยมใช้หา SNP เช่น บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) อยู่ระหว่าง small-subunit และ large-subunit ของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (White et al., 1990) ประกอบด้วย 5' external transcribed sequence (5'EST), 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA และ 3' external transcribed sequence (3'EST) บริเวณที่นิยมใช้ในการศึกษาสายสัมพันธ์วิวัฒนาการ ได้แก่บริเวณ ITS1 spacer, 5.8S rDNA, และ ITS2 space เนื่องจากมีจำนวนชุด (copy number) มาก ทำให้การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ค่อนข้างง่าย และแม้ว่าจะมีจำนวนหลายพันชุดต่อเซลล์ แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS ในยีนโอมเดียวกันมีความคล้ายคลึงกันสูง (highly homogenous) นอกจากนี้ส่วนประกอบย่อยและบริเวณ spacer ของ ITS ยังมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการที่แตกต่างกันจึงเหมาะสมที่จะใช้ศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตทุกหมวดยทางอนุกรมวิธาน (Gulbitti-Onarici et al., 2009) นอกจากนี้โอมในนิวเคลียสแล้ว การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogeny) อาจใช้คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA) โดยบริเวณที่มีการแปลรหัส (coding region) เช่น ribulose-1,5-diphosphate decarboxylase/oxydase large subunit (*rbcL*), maturaseK (*matK*), ATP synthase B (*atpB*) และ NADH dehydrogenase F (*ndhF*) เหมาะสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ของพืชระหว่างวงศ์ (family) หรือระดับชั้นทางอนุกรมวิธานที่สูงกว่า และบริเวณที่ไม่มีการแปลรหัส (non-coding region) เช่น tRNA Leu (*trnL*) (UAA) intron และบริเวณ *trnL*- tRNA phenylalanine (*trnF*) intergenic spacer (IGS) ใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของพืชที่มีความใกล้ชิดกัน เช่น พืชในสกุลหรือชนิดเดียวกัน (Gielly et al., 1995)

ปัจจุบันยังได้มีการคิดแปลงและพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลพื้นฐานให้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิดใหม่ ๆ เช่น Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) อาศัยการออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อบริเวณที่จะศึกษา แล้วใช้เทคนิคพีซีอาร์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โพลีเมอร์เฟสซิมคือการมีหรือไม่มี PCR amplicon, Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) หรือ PCR-RFLP ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัด PCR amplicons โพลีเมอร์เฟสซิมเกิดจาก SNP หรือ insertions/deletions ของดีเอ็นเอ (Agarwal et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีเครื่องหมายโมเลกุลที่อาศัยความยาวที่แตกต่างกันของดีเอ็นเอบริเวณต่าง ๆ (length polymorphism) ทั้งในยีนโอมของนิวเคลียส (Braglia et al., 2010) และยีนโอมพลาสติด (plastid genome) (Fay et al., 2009)

2.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาเพื่อการอนุรักษ์ในอดีตนิยมใช้เครื่องหมาย allozyme/isozyme เพราะเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ (เช่น RFLP) ต้องใช้ดีเอ็นเอปริมาณมาก (Swarts and Dixon, 2009) ปัจจุบันเทคนิคพีซีอาร์ช่วยให้ข้อจำกัดนี้หมดไป เครื่องหมายโมเลกุลได้ถูกนำมาใช้เพื่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้อย่างกว้างขวาง ข้อมูลที่ได้เป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิวัฒนาการของกล้วยไม้ และสามารถนำมาใช้วางแผนปรับปรุงพันธุ์หรือการจัดการอนุรักษ์กล้วยไม้ ตัวอย่างเทคโนโลยีเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ เช่น

Gustafsson and Siögren-Gulve (2002) ศึกษาแบบแผนทางพันธุกรรมใน microsatellite 5 ตำแหน่งของประชากรกล้วยไม้หายาก *Gymnadenia odoratissima* ในประเทศสวีเดน พบว่ากล้วยไม้ชนิดนี้มีการกระจายพันธุ์ค่อนข้างแคบ ความแปรผันทางพันธุกรรมในประชากรค่อนข้างต่ำแต่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรค่อนข้างสูง และประชากรของกล้วยไม้บนแผ่นดินมีมากกว่าประชากรที่อยู่บนเกาะ การอนุรักษ์ควรเน้นไปที่การช่วยเหลือให้มีการตั้งรกราก (colonization) และการอนุรักษ์กลุ่มประชากรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

Cozzolino et al. (2003) ศึกษาการกระจายเชิงภูมิศาสตร์ตามสายวิวัฒนาการ (phylogeography) ของประชากรของ *Anacamptis palustris* ในแถบเมดิเตอร์เรเนียนโดยใช้ chloroplast minisatellite และ microsatellite พบว่าความแปรผันของ microsatellite สามารถให้ข้อมูลในระดับภูมิภาคแต่ไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ระหว่างประชากร ในขณะที่ minisatellite มีความแปรผันสูงกว่าและสามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับการเคลื่อนย้ายของยีน (gene flow) ที่เกิดจากเมล็ด และประมาณอัตราส่วนละอองเรณูต่อการเคลื่อนย้ายของเมล็ดระหว่างประชากรข้างเคียง

Jo et al. (2005) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ กล้วยไม้สกุล *Cypripedium* ในเกาะญี่ปุ่นและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *rbcL*, ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และ RAPD พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *rbcL* สามารถใช้จำแนกชนิดแต่ไม่สามารถจำแนกระหว่าง *C. macranthos* สองสายพันธุ์ ในขณะที่ RAPD และ SNP ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS สามารถใช้จำแนกทั้งระดับชนิดและพันธุ์ของกล้วยไม้ที่ศึกษา

Szalanski et al. (2001) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์และ PCR-RFLP บริเวณ ITS และบริเวณที่ไม่แปลรหัสของดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA) และดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ (chloroplast DNA) ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของ *Spiranthes diluvialis* ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่ถูกคุกคาม พบว่า *S. diluvialis* มี rDNA ทั้งของ *S. magnicamporum* และ *S. romanzoffiana* แสดงว่า *S. diluvialis* เป็น allotetraploid ที่เกิดจากกล้วยไม้สองชนิดนี้ ข้อมูลจากดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์

และไมโครคอนเดรียยังแสดงว่า *S. diluvialis* ใกล้เคียงกับ *S. magnicamporum* มากกว่า ดังนั้น *S. magnicamporum* จึงน่าจะเป็น maternal parent ของ *S. diluvialis* นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุลยังบ่งชี้ว่า *S. diluvialis* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำมากทั้งภายในและระหว่างกลุ่มประชากร

Srimuang (2009) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ในสกุล *Sirindhornia* โดยใช้เทคนิค AFLP พบว่ากล้วยไม้สกุลนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ และกระจายพันธุ์อยู่ในบริเวณแคบ ๆ เท่านั้น การอนุรักษ์นอกจากการพยายามรักษาประชากรในธรรมชาติและการเก็บรักษามล็ดอาจทำได้โดยการผสมข้ามต้นเพื่อเพิ่มความแปรผันทางพันธุกรรมในประชากร

Fay et al. (2009) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Cypripedium calceolus* ในยุโรปตะวันออก โดยใช้โพลิมอร์ฟิซึมจากความยาวที่แตกต่างกันของดีเอ็นเอในพลาสมิด อย่างไรก็ตาม Fay et al. (2009) พบว่าความแปรผันทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอในพลาสมิดภายในประชากรของกล้วยไม้ที่ศึกษามีมากกว่าความแปรผันทางพันธุกรรมระหว่างประชากร Fay et al. (2009) สรุปว่า ดีเอ็นเอของพลาสมิดสามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ได้แต่ข้อมูลที่ได้นั้นไม่มากเท่าการศึกษาดีเอ็นเอของนิวเคลียส

2.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล

จักรพันธ์ (2549) ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ในแหล่งต่าง ๆ โดยใช้เครื่องหมาย AFLP และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิดในประเทศไทยโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS พบว่า การจัดกลุ่มของรองเท้านารีโดยเครื่องหมาย AFLP สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งแบ่งรองเท้านารีที่ศึกษาเป็น 2 สกุลย่อย นอกจากนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS ยังแสดงให้เห็นว่ารองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองอุดร และรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากสอดคล้องกับการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาที่กำหนดให้เป็นชนิดเดียวกันและมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Paphiopedilum concolor* อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่ได้มุ่งเน้นที่จะหาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานที่ต่ำกว่าชนิด จึงใช้รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองอุดร และรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ เพียงพันธุ์ละ 1 ต้น และไม่ได้วิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS ของรองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองอุดร และรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ ที่ใช้ศึกษาอย่างละเอียด นอกจากนี้ จักรพันธ์ (2549) ยังไม่ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS ของรองเท้านารีเหลืองสิงขร

2.6 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA extraction) และการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (DNA purification) เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญต่อการศึกษาด้านชีวโมเลกุล คุณภาพและความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้มีผลโดยตรงกับผลการทดลอง (Ginwal and Maurya, 2010) สิ่งปนเปื้อนในสารละลายดีเอ็นเอ เช่น ส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ สารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และสารกลุ่มโพลีฟีนอล อาจไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Fang et al., 1992)

เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีส่วนประกอบและสารต่างๆ ภายในเซลล์ไม่เหมือนกันทำให้วิธีการสกัดดีเอ็นเอวิธีเดียวไม่เหมาะสมสำหรับพืชทุกชนิด (Loomis, 1974) แม้ว่าการสกัดดีเอ็นเอสำหรับพืชทั่วไปไม่ยุ่งยาก สามารถเลือกใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอวิธีใดวิธีหนึ่งหรือใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ แต่การสกัดดีเอ็นเอจากพืชหลายชนิดค่อนข้างยาก เช่น พืชในเขตร้อน พืชที่มีเนื้อใบเหนียวคล้ายแผ่นหนัง และพืชที่มีโพลีแซคคาไรด์หรือสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิในปริมาณมาก (Sánchez-Hernández and Gaytán-Oyarzún, 2006) Jones et al. (1998) รายงานว่า ใบของกล้วยไม้บางสกุลมีปริมาณน้ำตาลสูง ทำให้การสกัดดีเอ็นเอไม่ประสบความสำเร็จ อาภาพรและณัฐินี (2552) สกัดดีเอ็นเอจากใบสดและใบแห้งของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี พบว่า ดีเอ็นเอที่ได้จากใบสดที่สกัดโดยใช้ชุดสกัด DNeasy Plant Mini (Qiagen) มีความบริสุทธิ์ต่ำแต่สามารถเกิดพีซีอาร์ ดีเอ็นเอจากใบสดที่สกัดด้วยวิธี Organic extraction และชุดสกัด QuickExtract Plant DNA Extraction Solution (Epicentre Biotechnologies) ไม่เกิดพีซีอาร์ สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากใบแห้ง การสกัดด้วยวิธี Organic extraction ได้ดีเอ็นเอคุณภาพต่ำจากการปนเปื้อนของสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตและกลุ่มฟีนอลแม้ว่าจะเกิดพีซีอาร์ ส่วนดีเอ็นเอที่สกัดโดยชุดสกัดไม่เกิดพีซีอาร์

ตัวอย่างวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่นิยมใช้กับพืชที่มีปัญหาสิ่งปนเปื้อน ได้แก่ วิธี sodium dodecyl sulfate (SDS)-potassium acetate เป็นวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Dellaporta et al. (1983) วิธีนี้ใช้ SDS ย่อย plasma membrane ของเซลล์ ทำให้ปลดปล่อยดีเอ็นเอ โปรตีนและโพลีแซคคาไรด์ออกมา โปรตีนและโพลีแซคคาไรด์จะถูกหุ้มด้วย dodecyl sulfate การเติม potassium ion เพื่อให้ไปแทนที่ sodium ion ทำให้โปรตีนและโพลีแซคคาไรด์ตกตะกอนออกมา วิธีนี้สามารถใช้สกัดดีเอ็นเอจากพืชที่มีสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิในปริมาณสูง (Nontachaiyapoom et al., 2007) และกล้วยไม้รองเท้านารีสองชนิด (Rodrigues et al., 2009) วิธี cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) มีหลักการคือ CTAB จะย่อยผนังเซลล์ของพืชทำให้ปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมา การสกัดสิ่งปนเปื้อนประเภทโปรตีนใช้การสกัดด้วย chloroform: isoamyl alcohol และตามด้วย chloroform: isoamyl alcohol จากนั้นจึงตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย NaCl และ absolute ethanol วิธีนี้ประสบความสำเร็จในการสกัดดี

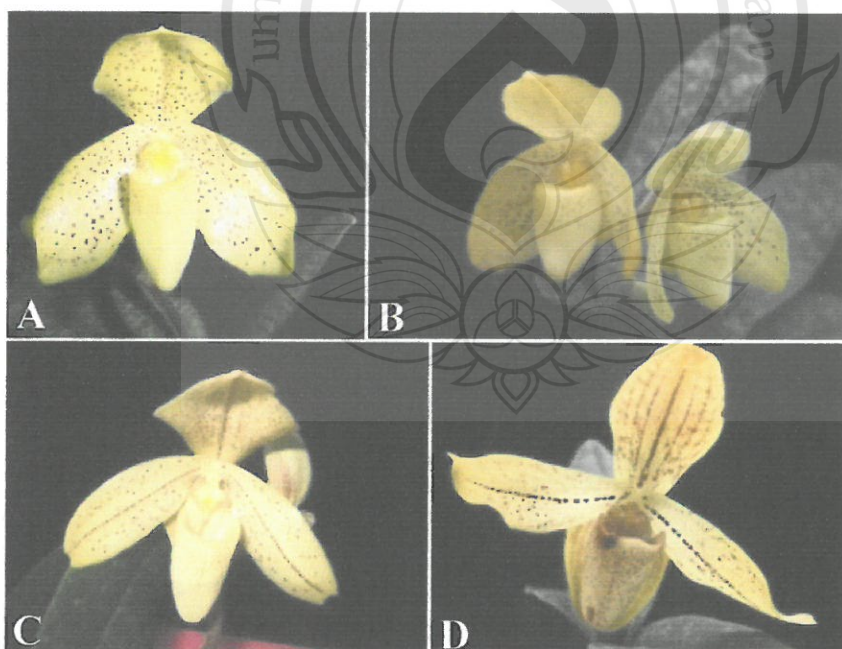
เอ็นเอจากกล้วยไม้สกุลหวาย 31 ชนิด (Wang et al., 2009) และรองเท้านารี *P. armeniacum*, *P. micranthum* และ *P. delenatii* รวมทั้งถูกผสมในกลุ่มนี้ได้สำเร็จ (Sun et al., 2011)



บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชและแหล่งที่มา แสดงในตารางที่ 1 กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนที่ใช้ทุกต้น มีลักษณะตรงตามลักษณะของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน (ดูคำบรรยายลักษณะในบทที่ 2 ข้อ 2.1) การระบุชนิดของรองเท้านารีเหลืองปราจีนดำเนินการโดย ดร.สันติ วัฒนานะ องค์การสวนพฤกษศาสตร์ การระบุพันธุ์ของรองเท้านารีเหลืองปราจีน ใช้ลักษณะดังต่อไปนี้ รองเท้านารีเหลืองอุดร มีใบขนาดใหญ่ หลังใบเป็นสีเขียวเข้ม ท้องใบมีสีม่วง ปลายกลีบข้างโค้งออก (ภาพที่ 1A) รองเท้านารีเหลืองปราจีน มีใบขนาดใหญ่และยาว หลังใบมีสีเขียว ท้องใบมีสีเขียว กลีบดอกค่อนข้างกลมมน (ภาพที่ 1B) รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ มีกลีบดอกที่มีจุดสีม่วงกระจายทั่วกลีบและมีเส้นสีม่วงกลางกลีบ (ภาพที่ 1C) รองเท้านารีเหลืองสิงขร มีกลีบดอกยาวเป็นรูปช้อน มีจุดประสีม่วงกระจายทั่วกลีบและมีเส้นสีม่วงกลางกลีบ กลีบปากมีจุดสีม่วงกระจายทั่ว (ภาพที่ 1D) (หมายเหตุ การระบุพันธุ์ของรองเท้านารีเหลืองปราจีนในรายงานวิจัยนี้เป็นวิธีการระบุพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนที่นักสะสมกล้วยไม้รองเท้านารีใช้กันโดยทั่วไป การระบุพันธุ์ของรองเท้านารีเหลืองปราจีนอย่างถูกต้อง จำเป็นจะต้องได้ข้อมูลจากโครงการวิจัยฯ ทั้งระยะที่ 1 และระยะที่ 2 เพื่อสร้างรูปวิธาน (key) ซึ่งไม่อยู่ในขอบเขตของงานวิจัยของโครงการวิจัยฯ ระยะที่ 1 นี้)



ภาพที่ 1 รองเท้านารีเหลืองอุดร (A) รองเท้านารีเหลืองปราจีน (B) รองเท้านารีเหลืองกาญจน์ (C) และรองเท้านารีเหลืองสิงขร (D)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างรอนแทนารีเลื่องปราจีนที่ใช้ในงานวิจัยนี้

รหัสตัวอย่างพืช	ชื่อเรียก	แหล่งที่มา
เหลืองอุดร1	รอนแทนารีเหลืองอุดร	คุณสายทอง หลวงสุภา อ.เมือง จ.เชียงราย
เหลืองอุดร2	รอนแทนารีเหลืองอุดร	ร้านจำหน่ายกล้วยไม้ อ.เมือง จ.เชียงราย
เหลืองปราจีน1	รอนแทนารีเหลืองปราจีน	สั่งซื้อทางจาก mamaworchid@gmail.com
เหลืองปราจีน2	รอนแทนารีเหลืองปราจีน	ร้านจำหน่ายกล้วยไม้ อ.เมือง จ.เชียงราย
เหลืองกาญจน์1	รอนแทนารีเหลืองกาญจน์	อาจารย์ธีรพันธ์ โตศิริกุล มูลนิธิแม่ฟ้าหลวง โครงการพัฒนาอยตุง
เหลืองกาญจน์2	รอนแทนารีเหลืองกาญจน์	
เหลืองกาญจน์3	รอนแทนารีเหลืองกาญจน์	
เหลืองอุดร3	รอนแทนารีเหลืองอุดร	ร้านจำหน่ายกล้วยไม้ ตลาดจตุจักร จ. กรุงเทพฯ
เหลืองปราจีน3	รอนแทนารีเหลืองปราจีน	
เหลืองปราจีน4	รอนแทนารีเหลืองปราจีน	
เหลืองสิงขร1	รอนแทนารีเหลืองสิงขร	คุณจรรยาพร ถาวรสถิตย์สกุล สวนกล้วยไม้พร้าว อำเภอพร้าว จ. เชียงใหม่
เหลืองสิงขร2	รอนแทนารีเหลืองสิงขร	

3.2 การศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างวิธีสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี

ใช้ใบสดจากกล้วยไม้รอนแทนารีเหลืองอุดร 2 ต้น (ได้แก่ เหลืองอุดร1 และเหลืองอุดร2) และใบสดจากกล้วยไม้รอนแทนารีเหลืองปราจีน 2 ต้น (ได้แก่เหลืองปราจีน1 และเหลืองปราจีน2) นำไปบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว โดยใบที่บดแล้วจะถูกแบ่งใส่หลอดทดลองสำหรับปั่นเหวี่ยง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในตู้แช่ -80 องศาเซลเซียสเพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอ

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

(1) ชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction

ใช้ตัวอย่างใบ 30 มิลลิกรัม ขั้นตอนการสกัดใช้วิธีที่แนะนำไว้ในคู่มือการใช้ GF-1 Plant DNA Extraction (Vivantis Technologies, Selangor DE, Malaysia) แต่เพิ่มการปั่นเหวี่ยงคอลัมน์ หลังจากการล้างคอลัมน์ด้วย Wash Buffer เป็น 2 ครั้ง และใช้ Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 40 ไมโครลิตร

(2) วิธี SDS-potassium acetate

เป็นวิธีสกัดดีเอ็นเอที่ Nontachaiyapoom et al. (2007) ดัดแปลงจากวิธีของ Dellaporta et al. (1983) ใช้ตัวอย่างใบ 250 มิลลิกรัม เติม extraction buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1.5% (w/v) SDS, 10 mM β -mercaptoethanol) 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 5 M potassium acetate 264 ไมโครลิตร นำไปแช่น้ำแข็ง 10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปิดเฉพาะสารละลายดีเอ็นเอใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 0.7 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอเพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นจึงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที นำตะกอนที่ได้ไปอบให้แห้งที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงละลายตะกอนด้วยสารละลาย Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร สกัดด้วย phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) 3 ครั้ง และ chloroform: isoamyl alcohol (24:1) 1 ครั้ง ตามลำดับ จากนั้นจึงนำมาตกตะกอนด้วย 3 M sodium acetate และ isopropanol นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 2 ครั้ง ทำให้ตะกอนแห้งที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงละลายดีเอ็นเอด้วย Elution Buffer จากชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

(3) วิธี CTAB

ใช้ตัวอย่างใบ 250 มิลลิกรัม การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธี CTAB ของ Wang et al. (2009) แต่ดัดแปลงโดยการสกัดสิ่งปนเปื้อนออกด้วย phenol: chloroform: isoamyl alcohol ก่อนแล้วจึงสกัดด้วย chloroform: isoamyl alcohol เพื่อแยกเอา phenol ที่อาจปนเปื้อนในสารละลายดีเอ็นเอออก และใช้ Elution Buffer ของชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

3.2.2 การหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

วัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) และอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 230 นาโนเมตร (A_{260}/A_{230}) ด้วยเครื่อง NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Delaware, USA) โดยใช้ตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร

3.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ใช้คู่ไพรเมอร์ 2 คู่ คู่ไพรเมอร์ที่ 1 ได้แก่ NS3 และ NS4 (White et al., 1990) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณขึ้น 18S ribosomal DNA (rDNA) และคู่ไพรเมอร์ที่ 2 ได้แก่ ITSP-F (งานวิจัยนี้, ดู 3.3) และ ITS-4 (White et al., 1990) ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ internal transcribed spacer (ITS) และ 5.8S rDNA ปริมาตรของพีซีอาร์ 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอหรือสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจาง 5 เท่า 0.7 ไมโครลิตร 10x PCR buffer 1.5 ไมโครลิตร 50 mM MgCl₂ 0.45 ไมโครลิตร 10 mM dNTPs 0.3 ไมโครลิตร คู่ไพรเมอร์ ความเข้มข้น 10 μ M ชนิดละ 0.6 ไมโครลิตร และ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) 0.15 ไมโครลิตร กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้อุณหภูมิ denature เริ่มต้นที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1.2 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย extension รอบสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นเก็บผลผลิตพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การวิเคราะห์การเกิดพีซีอาร์ใช้ agarose gel electrophoresis ใน Tris-acetate-EDTA buffer (0.04 M Tris-acetate; 0.1 mM EDTA) โดยใช้เจลความเข้มข้น 2% (w/v) และบันทึกภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.3 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณ ITS โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของกล้วยไม้รองเท้านารี ในฐานะข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) ใช้โปรแกรม BIOEDIT (Hall, 1999) การคำนวณหา T_m (melting temperature) ของไพรเมอร์ใช้โปรแกรม T_m Calculator ของ Applied Biosystems (<http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/index.cfm>) ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (forward primer) สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้จากงานวิจัยนี้ให้ชื่อว่า ITSP-F

3.4 การทดสอบไพรเมอร์กับตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนทั้ง 4 พันธุ์

ใช้ตัวอย่างใบสดของรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ 1 เหลืองกาญจน์ 2 เหลืองกาญจน์ 3 เหลืองอุดร 3 เหลืองปราจีน 4 เหลืองสิงขร 1 และเหลืองสิงขร 2 การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธี SDS-potassium acetate (ดู 3.3.1) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ใช้สภาวะที่ระบุไว้ใน 3.3.3 แต่ใช้เฉพาะคู่ไพรเมอร์ ITSP-F และ ITS-4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำเช่นเดียวกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ แต่เพิ่มปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร PCR purification ใช้ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) ตัวอย่างพีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วถูกส่งไปที่ First Base Pte Ltd (Singapore) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 (White et al. 1990)



บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การเปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน

จากการทดลองสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธีการ ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS-potassium acetate มีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB และดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction มีปริมาณต่ำที่สุด (ตารางที่ 2) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณตัวอย่างพืชที่ใช้สำหรับชุดสกัดน้อยกว่าวิธีอื่น วิธีสกัดดีเอ็นเอที่ไม่ใช้ชุดสกัดมีข้อได้เปรียบวิธีสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ชุดสกัด คือสามารถใช้ปริมาณตัวอย่างพืชเริ่มต้นมากกว่า เพราะไม่ต้องปั่นเหวี่ยงสารละลายดีเอ็นเอผ่านคอลัมน์ (column) ที่สามารถจับดีเอ็นเอปริมาณจำกัด

ตารางที่ 2 ปริมาณของดีเอ็นเอจากใบสดกล้วยไม้รองเท้านารีที่เตรียมโดยวิธีสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี

รหัสตัวอย่างพืช	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng/μl)		
	วิธี SDS-potassium acetate	วิธี CTAB	GF-1 Plant DNA Extraction
เหลืองอุดร1	188	86	51
เหลืองอุดร2	304	55	39
เหลืองปราจีน1	148	86	113
เหลืองปราจีน2	203	87	39

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอสามารถประเมินได้จากค่า A_{260}/A_{280} และค่า A_{260}/A_{230} อัตราส่วน A_{260}/A_{280} เป็นค่าที่แสดงถึงการปนเปื้อนของโปรตีน โดยค่า A_{260}/A_{280} ของดีเอ็นเอบริสุทธิ์จะอยู่ที่ประมาณ 1.8 หากอัตราส่วน A_{260}/A_{280} ต่ำกว่า 1.8 แสดงถึงการปนเปื้อนของโปรตีน อย่างไรก็ตามพบว่า pH มีผลต่อค่า A_{260}/A_{280} กล่าวคือ หาก pH เป็นเบสจะทำให้ค่า A_{260}/A_{280} สูงขึ้น ดีเอ็นเอที่มีโปรตีนปนอยู่ต่ำกว่า 1% จะมีค่า A_{260}/A_{280} อยู่ที่ประมาณ 1.9 เมื่อตัวทำละลายที่ใช้คือ 10 mM Tris-HCl ที่มี pH 8.5 (Sauer et al., 1998) การศึกษาครั้งนี้พบว่า สารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากทั้งสามวิธีมีอัตราส่วน A_{260}/A_{280} ประมาณ 1.9 หรือสูงกว่า บ่งชี้ว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนค่อนข้างต่ำ ยกเว้นสารละลายดีเอ็นเอของเหลืองอุดร1 ที่เตรียมโดยวิธี CTAB (ตารางที่ 3) อัตราส่วน A_{260}/A_{230} แสดงถึงการปนเปื้อนของคาร์โบไฮเดรต ฟีนอล guanidine (สารที่มักใช้ในชุดสกัดดีเอ็นเอ) และไกลโคเจน (Page, 2010) โดยดีเอ็นเอที่ค่อนข้างบริสุทธิ์จะมีค่า A_{260}/A_{230} อยู่ระหว่าง 1.8-2.2 และสารละลายดีเอ็นเอที่มีการปนเปื้อนของคาร์โบไฮเดรต ฟีนอล guanidine หรือไกลโคเจนสูงจะมีอัตราส่วน A_{260}/A_{230} ต่ำกว่า 1.8 การศึกษาครั้งนี้พบว่า วิธี SDS-potassium

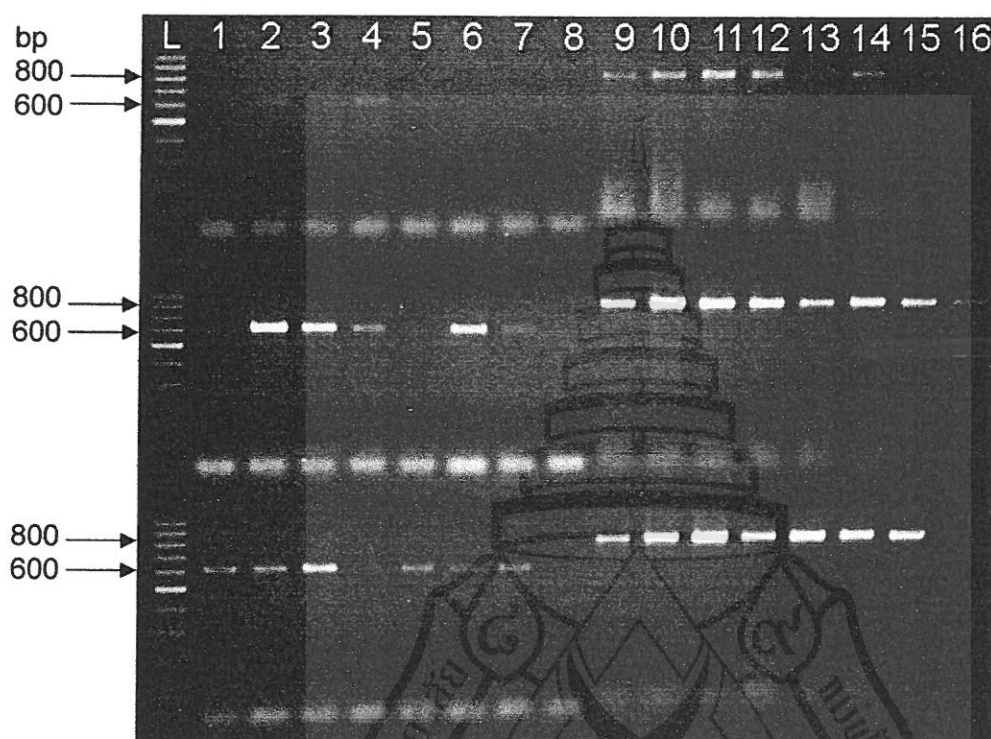
acetate ให้ดีเอ็นเอที่มีการปนเปื้อนน้อยที่สุด รองลงมาคือวิธี CTAB และชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ค่า A260/A280 และค่า A260/A230 ของดีเอ็นเอจากใบสดกล้วยไม้รองเท้านารีที่เตรียมโดยวิธีสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี

รหัสตัวอย่างพืช	วิธี SDS-potassium acetate		วิธี CTAB		GF-1 Plant DNA Extraction	
	A260/A280	A260/A230	A260/A280	A260/A230	A260/A280	A260/A230
เหลืองอุดร1	1.90	1.70	1.80	0.78	2.00	1.00
เหลืองอุดร2	1.96	2.06	1.90	1.06	2.05	0.09
เหลืองปราจีน1	1.93	1.76	1.89	1.19	1.97	0.26
เหลืองปราจีน2	1.88	1.72	1.95	1.37	2.08	0.12

ปฏิกิริยาพีซีอาร์สามารถเกิดได้ดีในสถานะที่แสดงไว้ใน 3.3.3 โดยพีซีอาร์ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ ITSP-F/ITS4 มีประสิทธิภาพมากกว่าพีซีอาร์ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ NS3/NS4 (ภาพที่ 2, lane ที่ 1-8 เทียบกับ lane ที่ 9-16) การเปรียบเทียบการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันพบว่า ดีเอ็นเอที่เตรียมโดยวิธี SDS-potassium acetate (ภาพที่ 2, กลาง) และวิธี CTAB (ภาพที่ 2, ล่าง) ให้ผลการเกิดพีซีอาร์ค่อนข้างใกล้เคียงกัน และดีกว่าดีเอ็นเอที่เตรียมโดยชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction (ภาพที่ 2, บน) ส่วนส่วนของสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างที่ยังไม่เจือจางที่เตรียมโดยวิธี SDS-potassium acetate และวิธี CTAB สามารถเกิดพีซีอาร์ได้ดีเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ NS3/NS4 และทุกตัวอย่างสามารถเกิดพีซีอาร์ได้ดีเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ ITSP-F/ITS4 ในขณะที่สองส่วนของสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างที่ยังไม่เจือจางที่ได้จากชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction สามารถเกิดพีซีอาร์เพียงเล็กน้อยเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ NS3/NS4 และทุกตัวอย่างสามารถเกิดพีซีอาร์เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ ITSP-F/ITS4 แต่ปริมาณของ PCR product ไม่มากนัก เมื่อใช้สารละลายดีเอ็นเอเจือจาง 5 เท่า เป็นดีเอ็นเอตั้งต้น พบว่าสองในสี่และสามในสี่ของสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมโดยวิธี SDS-potassium acetate และวิธี CTAB สามารถเกิดพีซีอาร์เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ NS3/NS4 ตามลำดับ และเมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ ITSP-F/ITS4 ทุกสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างที่เตรียมโดยวิธี SDS-potassium acetate สามารถเกิดพีซีอาร์แต่ปริมาณของ PCR product จากตัวอย่างที่ 4 ค่อนข้างน้อย และสามในสี่ของสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมโดยวิธี CTAB เกิดพีซีอาร์ การเจือจางสารละลายดีเอ็นเอช่วยลดความเข้มข้นของสารยับยั้งพีซีอาร์ (PCR inhibitor) แต่ทำให้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอในสารละลายตัวอย่างลดลง จากการศึกษา การเจือจางไม่ช่วยให้การเกิดพีซีอาร์ดีขึ้น แสดงว่าไม่มีสารยับยั้งพีซีอาร์ในสารละลายดี

เอ็นเอตัวอย่างที่เตรียมโดยวิธีสกัดดีเอ็นเอทั้ง 3 วิธีและ/หรือปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิดพีซีอาร์มากกว่า



ภาพที่ 2 การเกิดพีซีอาร์ของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction Kit (บน), วิธี SDS-potassium acetate (กลาง) และวิธี CTAB (ล่าง)

lane L, GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas) 200 ng; lane 1, 5, 9, 13 ใช้สารละลายดีเอ็นเอจากเห็ดทองอุดร1; lane 2, 6, 10, 14 ใช้สารละลายดีเอ็นเอจากเห็ดทองอุดร2; lane 3, 7, 11, 15 ใช้สารละลายดีเอ็นเอจากเห็ดทองปราจีน1; lane 4, 8, 12, 16 ใช้สารละลายดีเอ็นเอจากเห็ดทองปราจีน2; lane 1-8 ไพรมเมอร์ NS-3/NS-4, lane 9-16 ไพรมเมอร์ ITSP-F/ITS4; lane 1-4 และ 9-12 ใช้สารละลายดีเอ็นเอไม้เจือจาง; lane 5-8 และ 13-16 ใช้สารละลายดีเอ็นเอเจือจาง 5 เท่า

อาภาพรและณัฐินี (2552) รายงานว่า ดีเอ็นเอจากใบสดกล้วยไม้รองเท้านารีที่สกัดด้วยวิธี Organic extraction และชุดสกัด QuickExtract Plant DNA Extraction Solution (Epicentre Biotechnologies) มีความบริสุทธิ์ต่ำและไม่เกิดพีซีอาร์ ดังนั้นดีเอ็นเอที่เตรียมโดยวิธีสกัดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ทั้งสามวิธี จึงให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีกว่าดีเอ็นเอที่เตรียมโดยวิธี Organic extraction และชุดสกัด QuickExtract Plant DNA Extraction Solution การเปรียบเทียบคุณภาพของดีเอ็นเอที่เตรียม

โดยวิธี SDS-potassium acetate กับดีเอ็นเอจากใบสดของรองเท้านารีที่เตรียมโดยชุดสกัด DNeasy Plant Mini (Qiagen) ที่รายงานโดยอาภาพรและณัฐินี (2552) พบว่า ดีเอ็นเอที่เตรียมโดยวิธี SDS-potassium acetate มีการปนเปื้อนของโปรตีนต่ำกว่า ส่วนการปนเปื้อนโดยสารที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ A230 ใกล้เคียงกัน แม้ว่า อาภาพรและณัฐินี (2552) จะรายงานว่าดีเอ็นเอที่เตรียมโดยชุดสกัด DNeasy Plant Mini สามารถเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ แต่เนื่องจาก อาภาพรและณัฐินี (2552) มิได้แสดงภาพ gel electrophoresis ของ PCR product หรือแสดงปริมาณของ PCR product จึงไม่สามารถเปรียบเทียบประสิทธิภาพของพีซีอาร์ได้

4.2 การออกแบบไพรเมอร์

เนื่องจากต้องการให้ดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดยาวมากที่สุด และสามารถจับคู่กับไพรเมอร์ ITS1 (White et al., 1990) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่จะใช้สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงได้สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของกล้วยไม้ในสกุลรองเท้านารีในฐานข้อมูล NCBI เฉพาะที่มีปลายทางด้าน 5' ยาวกว่าบริเวณของไพรเมอร์ ITS1 เพื่อใช้สำหรับการออกแบบไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (forward primer) พบ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ GenBank accession number EF459731.1 (*P. rothschildianum*) และ EU232630.1 (*P. lowii*) ผลของการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์และบริเวณที่เลือกเป็นไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (ให้ชื่อว่า ITSP-F, ดูภาพที่ 3) การคำนวณหา Tm พบว่า ไพรเมอร์ ITSP-F มี Tm 58.17 องศาเซลเซียส

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              60          70          80          90         100
EF459731.1  ---GATCGTT GTGATTGGG CGGTCCGCCG CGCACGACAC AG-CAAGAAG
EU232630.1  -----CGTT GTGATGTGGG CGGTCCGCCG CGCACGACAC AGGCAAGAAG
Clustal Co  **** *      *      *      *      *      *      *      *      *
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              110         120         130         140         150
EF459731.1  TCCATTGAAC CTTATCATTT AGAGGAAGGA GAAGTCGTAA CAAGGTTTCC
EU232630.1  TCCATTGAAC CTTATCATTT AGAGGAAGGA GAAGTGGTAA CAAGGTTTCC
Clustal Co  ***** *      *      *      *      *      *      *      *
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
              160         170         180         190         200
EF459731.1  GTAGGTGAAC CTGCGGAAGG ATCATTGTTG AGATCACATA ATAATTGATC
EU232630.1  GTAGGTGAAC CTGCGGAAGG ATCATTGTTG AGATCACATA ATAATTGATC
Clustal Co  ***** *      *      *      *      *      *      *      *

```

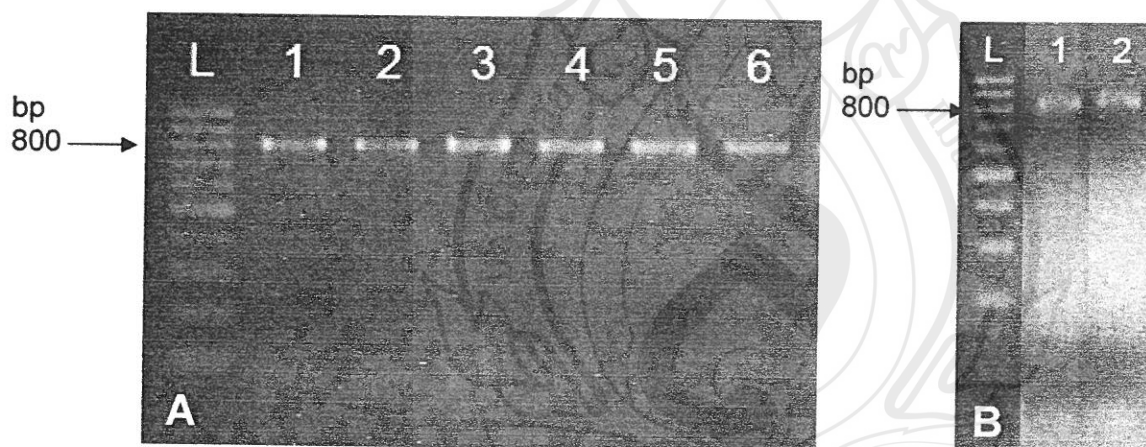
ภาพที่ 3 การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลายด้าน 5' ของกล้วยไม้ในสกุลรองเท้านารีที่ได้จากฐานข้อมูล NCBI

บริเวณที่ขีดเส้นได้คือลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ITSP-F

สำหรับไพรเมอร์รีเวิร์ด (reverse primer) ไม่พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้ในสกุล รongเท้าหนีที่มีปลายทางด้าน 3' ยาวกว่าไพรเมอร์ ITS4 (White et al., 1990) ดังนั้นจึงใช้ไพรเมอร์ ITS4 เป็นไพรเมอร์รีเวิร์ดสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเนื่องจาก ITS4 มี T_m ประมาณ 56.34 องศาเซลเซียส จึงเลือกใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็น annealing temperature สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์

4.3 การทดสอบไพรเมอร์กับตัวอย่างกล้วยไม้รongเท้าหนีเหลืองปราจีนทั้ง 4 พันธุ์

ไพรเมอร์ ITSP-F เมื่อใช้ร่วมกับไพรเมอร์ ITS4 สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS จากดีเอ็นเอของกล้วยไม้รongเท้าหนีเหลืองปราจีนทั้ง 4 พันธุ์ เมื่อวิเคราะห์ด้วย agarose gel electrophoresis พบว่ามี PCR product เพียง 1 band (ภาพที่ 4) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ยืนยันว่ามี PCR product เกิดขึ้นเพียง 1 ชนิดต่อ 1 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ลำดับนิวคลีโอไทด์ดู ภาคผนวก) และบริเวณของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้คือ ITS



ภาพที่ 4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS โดยคู่ไพรเมอร์ ITSP-F/ITS4

โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจาก (A) เหลืองกาญจน์ 1, 2 และ 3 (lane 1, 2, 3 ตามลำดับ), เหลืองอุดร 3 (lane 4) และเหลืองปราจีน 3 และ 4 (lane 5 และ 6 ตามลำดับ) และจาก (B) เหลืองสิงขร 1 และ 2 (lane 1 และ 2 ตามลำดับ)

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การเปรียบเทียบวิธีสกัดดีเอ็นเอจากใบสดของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน 3 วิธี พบว่าวิธี SDS-potassium acetate ให้ปริมาณดีเอ็นเอมากที่สุดและดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงที่สุด รองลงมาคือวิธี CTAB และชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction ตามลำดับ วิธี sodium dodecyl sulfate (SDS)-potassium acetate สามารถให้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงที่สุด เนื่องจากวิธีนี้มีขั้นตอนการแยกสิ่งปนเปื้อน 2 ขั้นตอน ได้แก่ การตกตะกอน โปรตีนและโพลีแซคาไรด์ด้วย potassium acetate/SDS และการสกัดด้วย phenol: chloroform: isoamyl alcohol ตามด้วย chloroform: isoamyl alcohol ส่วนวิธี CTAB มีขั้นตอนลดการปนเปื้อนเพียงขั้นตอนเดียวคือ การสกัดด้วย phenol: chloroform: isoamyl alcohol ตามด้วย chloroform: isoamyl alcohol การใช้ชุดสกัด GF-1 Plant DNA Extraction ให้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยเนื่องจากไม่สามารถใช้ตัวอย่างพืชได้มากกว่า 30 มิลลิกรัมตามที่แนะนำไว้ในคู่มือการใช้

การทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่า ดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี SDS-potassium acetate และวิธี CTAB สามารถเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ NS3/NS4 หรือคู่ไพรเมอร์ ITSP-F/ITS4 ได้ใกล้เคียงกันและดีกว่าดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี GF-1 Plant DNA Extraction ดังนั้นวิธีสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากใบสดของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน คือวิธี SDS-potassium acetate รองลงมาคือวิธี CTAB นอกจากนี้การสกัดดีเอ็นเอโดย 2 วิธีนี้ยังมีราคาต่ำกว่าการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเออีกด้วย จึงน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาเทคนิคสำหรับการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลของรองเท้านารีเหลืองปราจีนและรองเท้านารีชนิดอื่น ๆ การทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จากงานวิจัยนี้กับตัวอย่างดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนทั้ง 4 พันธุ์พบว่า ไพรเมอร์ ITSP-F/ITS4 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ได้อย่างเฉพาะเจาะจง มีประสิทธิภาพดี และให้ PCR product เพียง 1 ชนิด โดยอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมคือ 55 องศาเซลเซียส

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การนำผลงานวิจัยไปใช้

การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี SDS-potassium acetate นอกจากสามารถใช้สกัดดีเอ็นเอจากใบสดของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนแล้ว น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างพืชที่มีปริมาณโปรตีนและโพลีแซคาไรด์สูงชนิดอื่น ๆ

5.2.2 การทำวิจัยเพิ่มเติม

กระบวนการวิจัยขั้นต่อไปคือ การศึกษาความแปรผันทางสัณฐานวิทยา และการรวบรวมตัวอย่างใบจากรองเท้าหนีรืเหลืองปราจีน ที่มีชื่อเรียกแตกต่างกันไป ได้แก่ รองเท้าหนีรืเหลืองปราจีน รองเท้าหนีรืเหลืองอุดร รองเท้าหนีรืเหลืองกาญจน์ และรองเท้าหนีรืเหลืองสิงขร และประชากรของรองเท้าหนีรืเหลืองปราจีนตามธรรมชาติให้ได้จำนวนมาก สกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อเปรียบเทียบหาโพลิมอร์ฟิซึมบริเวณ ITS ระหว่างพันธุ์หรือกลุ่มประชากรที่ศึกษา หากพบโพลิมอร์ฟิซึมก็สามารถใช้ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เหล่านี้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้แยกหน่วยอนุกรมวิธานในระดับที่ต่ำกว่าชนิดได้อย่างเหมาะสม นอกจากนี้ยังสามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรรองเท้าหนีรืเหลืองปราจีนในธรรมชาติ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์และการฟื้นฟูประชากรรองเท้าหนีรืเหลืองปราจีนในธรรมชาติ นอกจากนี้เทคโนโลยีที่ได้ยังอาจนำไปประยุกต์ใช้ศึกษาอนุกรมวิธานและความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้าหนีรืและกล้วยไม้ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันต่อไป



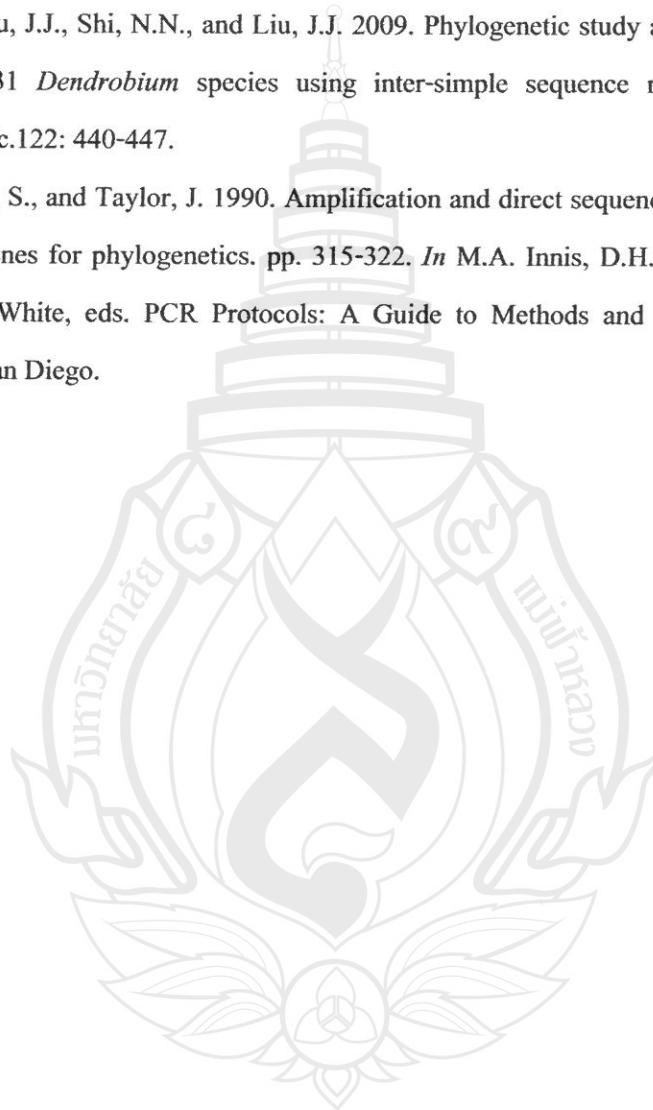
เอกสารอ้างอิง

- จักรพันธ์ วนิชกุล. 2549. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีและการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิดในประเทศไทยโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งไอทีเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ภาณุรัตน์ โคเจริญ. 2539. การขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีในสภาพปลอดเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วีระชัย ณ นคร และคณะ. 2543. สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ เล่ม 6. โอ.เอส. พรินติ้งเฮ้าส์, กรุงเทพฯ.
- อาภาพร สุทธิพัฒน์สมบุญ และ ญัฐินี พันธุ์วิสาส. 2552. การเปรียบเทียบการสกัดสารพันธุกรรมพืชด้วยวิธี Organic Extraction, DNeasy™ Mini Plant Kit และ QuikExtract™ Plant DNA Extraction Solution, น 193-198 . ใน พวงผกา สุนทรชัยนาคแสง อุยณีย์ พิชกรรม และ ศศิวิมล แสงผล. รายงานการประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 3. มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.
- อุไร จิรมงคลการ. 2550. กล้วยไม้รองเท้านารี. พิมพ์ครั้งที่ 5 สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.
- Agarwal, M., Shrivastava, N., and Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 27: 617-631.
- Braglia, L., Manca, A., Mastromauro, F., and Breviario, D. 2010. cTBP: A successful intron length polymorphism (ILP)-based genotyping method targeted to well defined experimental needs. *Diversity* 2: 572-582; doi:10.3390/d2040572.
- Cash, C. 1991. *The Slipper Orchids*. Timber Press, Inc., Portland, Oregon, pp. 80-81.
- Cozzolino, S., Cafasso, D., Pellegrino, G., Musacchio, A., and Widmer, A. 2003. Fine-scale phylogeographical analysis of Mediterranean *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) populations based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation. *Mol. Ecol.* 2783-2792.
- Cribb, P. 1998. *The Genus PAPHIOPEDILUM* (2nd edition). The Royal Botanical Gardens, Kew, Richmond. England, pp. 110-114.
- Dellaporta, S., Wood, J., and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Reporter*. 1:19-21.

- Fang, G., Hammar, S., and Grumet, R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biotechniques*. 13:52-54.
- Fay, M.F., Bone, R., Cook, P., Kahandawala, I., Greensmith, J., Harris, S., Pedersen, H., Ingrouille, M.J., and Lexer, C. 2009. Genetic diversity in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) with a focus on north-western Europe, as revealed by plastid DNA length polymorphisms. *Annals of Botany* 104: 517-525.
- Gielly, L., and Taberlet, P. 1994. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: non-coding versus *rbcL* sequences. *Mol. Biol. Evol.* 11(5): 769-777.
- Ginwal, H.S., and Maurya, S.S. 2010. Evaluation and optimization of DNA extraction method for *Dalbergia sissoo* leaf. *Indian. J. Biotechnol.* 9: 69-73.
- Gruss, O., and Iamwiriyakul, P. 2006. *Paphiopedilum concolor* var. *longipetalum* – eine lange unbeachtete Varietät wieder in Kultur. *Die Orchidee*. 57(1):070-072. (in German).
- Gulbitti-Onarici, S., Sancak, C., Summer, S., and Ozcan, S. 2009. Phylogenetic relationships of some wild wheat species based on the internal transcribed spacer sequences of nrDNA. *Current Science* 96: 794-800.
- Gustafsson, S., Sjögren-Gulve, P. 2002. Genetic diversity in the rare orchid, *Gymnadenia odoratissima* and a comparison with the more common congener, *G. conopsea*. *Conservation Genetics* 3: 225-234.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Jo, S., Ochiai, M., Furuta, K., and Yagi, K. 2005. Genetic analyses of genus *Cypripedium* found in Northern Japanese islands and related species endemic to northeast China. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 74: 234-241.
- Jones, W.E., A.R. Kuehnle, A.R., and Arumuganathan, K. 1998. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. *Annals of Botany*. 82: 189-194.
- Li, L-N., Zeng, S., Zheng, F., Chen, Z-L., Wu, K-L., Zhang, J-X., and Duan, J. 2010. Isolation and characterization of 10 polymorphic microsatellite loci in *Paphiopedilum concolor* (Batem.) Pfitzer (Orchidaceae) and cross-species amplification. *Hortscience* 45: 1286-1287.0

- Loomis, W.D. 1974. Overcoming problems of phenolics and quinines in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods Enzymol.* 31:528-544.
- Nanakorn, W., and Indharamusika, S. 1998. *Ex-situ* conservation of native Thai orchids at Queen Sirikit Botanic Garden. *Pure Appl. Chem.* 70: 2065-2145.
- Nontachaiyapoom, S., Scott, P.T., Men, A.E., Kinkema, M., Schenk, P.M., and Gresshoff, P.M. 2007. Promoters of orthologous *Glycine max* and *Lotus japonicus* nodulation autoregulation genes interchangeably drive phloem-specific expression in transgenic plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 769-780.
- Nui, C., Kebede, H., Auld, D. L., Woodward, J. E., Burow, G., and Wright, R. J. 2008. A safe inexpensive method to isolate high quality plant and fungal DNA in an open laboratory environment. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 2818-2822.
- Page, A.F. 2010. The MIQE guidelines and assessment of nucleic acids prior to qPCR and RT-qPCR. Available Source: <http://www.nanodrop.com/Library/T097-MIQE-Guidelines-and-Assessment-of-Nucleic-Acids-Prior-to-qPCR-and-RT-qPCR.pdf>, November 28, 2010.
- Pinheiro, F., and Barros, F. 2009. Morphometric analysis of the *Brasiliorchis picta* complex (Orchidaceae). *Revista Brasil. Bot.* 32: 11-21.
- Rodrigues, K.F., Aziz, Z.A., Kumar, S.V., and Latip, M.A. 2009. Molecular markers for the DNA fingerprinting of *Paphiopedilum dayanum* and *Paphiopedilum lowii*, two endangered slipper orchids. *Conservation Genet. Resour.*, doi: 10.1007/s12686-009-9142-4.
- Sauer, P., Müller, M., and Kang, J. 1998. Quantitation of DNA. Available Source: <http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/0298/982quant.pdf>, November 29, 2010.
- Sánchez-Hernández, C. and Gaytán-Oyarzún, J.C. 2006. Two mini-preparation protocols to DNA extraction from plants with high polysaccharide and secondary metabolites. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 1864-1867.
- Srimuang, K-O. 2009. Genetic diversity and biology of *Sirindhornia* H. Æ. Pedersen & Suksathan (Orchidaceae). Ph.D. Thesis, Mae Fah Luang University.
- Sun, Y.W., Liao, Y.J., Hung, Y.S., Chang, J.C., and Sung, J.M. 2011. Development of ITS sequences based SCAR markers for discrimination of *Paphiopedilum armeniacum*, *Paphiopedilum micranthum*, *Paphiopedilum delenatii* and their hybrids. *Sci. Hortic.* 127: 405-410.

- Swarts, N.D., Dixon, K.W. 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*; doi:10.1093/aob/mcp025.
- Szalanski, A. L., Steinauer, G., Bischof, R., and Petersen, J. 2001. Origin and conservation genetics of the threatened Ute ladies'-tresses, *Spiranthes diluvialis* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 88: 177-180.
- Wang, H.Z., Feng, S.G., Lu, J.J., Shi, N.N., and Liu, J.J. 2009. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Sci. Hortic.* 122: 440-447.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In* M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego.



ภาคผนวก

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของรองเท้ารีเหลืองปราจีน

>LueangKan1

AGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTG
TTGAGATCGCATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCC
ACGGGCATTTGCTGTTGCAGTGACCTAGATTTGCCATCGGGCCTCCTTAGGAGCTTTCT
TGCTGGCGATCTATAACCCTTGCCCGGCGCAGTTTTGCGCCAAGTCATATGACACATAAT
TGGTGAAGGGGGGAGGGGGCGTGCTGCCTTGACCCGCTCCAAATTATTTTTTAACAA
CTCTCAGCAACGGATATCTCGGCTCTTGATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA
AATGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCC
GAGGCCATCAGGCCAAGGGCACGCCTGCCTGGGCATTGCGAGTCATATCTCTCCCTTA
ATGAGGCTGTCCATACATACTGTTGAGCCGGTGCGGATGTGAGTTTGGCCCCTTGTCT
TTGGTACGGGGGGTCTAAGAGCTGCATGGGCTTTTGATGGTCCTAAATACGGCAAGAG
GTGGACGAACTATGCTACAACAAAAGTGTGTGCGAATGCCCCGGGTGTTGTGTTAC
ATGGACCAGCTTAATCAGAAGACCCTTTTGAACCCCATTAGAGGCCCATCAACCCATG
ATCAGTTGATTGGCCATTTGGTTGCGATCCCAGGTCAGGTGAGGCAACCCGCTGAGTT
TAA

>LueangUdom3

CAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGAGATCGCATAATAATTGA
TCGAGTTAATCTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCCACGGGCATTTGCTGTTGCAGT
GACCTAGATTTGCCATCGGGCCTCCTTAGGAGCTTTCTTGCTGGCGATCTATAACCCTTG
CCCGGCGCAGTTTTGCGCCAAGTCATATGACACATAATTGGTGAAGGGGGGAGGGGG
CGTGCTGCCTTGACCCGCTCCAAATTATTTTTTAACAACTCTCAGCAACGGATATCTC
GGCTCTTGATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAATGGTGTGAATTGCAGAA
TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCATCAGGCCAAGGG
CACGCCTGCCTGGGCATTGCGAGTCATATCTCTCCCTTAATGAGGCTGTCCATACATAC
TGTTGAGCCAGTGCGGATGTGAGTTTGGCCCCTTGTCTTTGGTACGGGGGGTCTAAGA
GCTGCATGGGCTTTTGATGGTCCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACTATGCTACAA
CAAAAGTGTGTGCGAATGCCCCGGGTGTTGTGTTACATGGACCAGCTTAATCAGAA
GACCCTTTTGAACCCCATTAGAGGCCCATCAACCCATGATCAGTTGATTGGCCATTTGG
TTGC

> LueangPrachin3

GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTTGAGATCGCATAATAATTGATCGAGTTAAT
CTGGAGGATCAGTTTACTTTGGTCACCCACGGGCATTTGCTGTTGCAGTGACCTAGATT
TGCCATCGGGCCTCCTTAGGAGCTTTCTTGCTGGCGATCTATACCCTTGCCCGGCGCAG
TTTTGCGCCAAGTCATATGACACATAATTGGTGAAGGGGGGAGGGGGCGTGCTGCCTT
GACCCGCTCCAAATTATTTTTTTAACAACCTCTCAGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCA
TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAATGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACC
ATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAGGCCATCAGGCCAAGGGCACGCCTGCCT
GGGCATTGCGAGTCATATCTCTCCCTTAATGAGGCTGTCCATACATACTGTTTCAGCCGG
TGCGGATGTGAGTTTGGCCCCCTTGTTCTTTGGTACGGGGGGTCTAAGAGCTGCATGGG
CTTTTGATGGTCCTAAATACGGCAAGAGGTGGACGAACTATGCTACAACAAAACCTGTT
GTGCGAATGCCCCGGGTTGTTGTGTTACATGGACCAGCTTAATCAGAAGACCCTTTTG
AACCCCATTAGAGGCCCATCAACCCATGATCAGTTGATTGGCC

>LueangSinghorn1

CATGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACC
TGCGGAAGGATCATTGTTGAGATCGCATAATAATTGATCGAGTTAATCTGGAGGATCA
GTTTACTTTGGTCACCCATGGGCATTTGCTATTGCAGTGACCTAGATTTGCCATCGGGC
CTCCTTGGGAGCTTTCCTGCTGGCGATCTATACCCTTGCCCGGCGCAGTTTTCGCGCAA
GTCATATGACACATAAATTGGTGAAGGGGGGCGGCATGCTGCCTTGACCCGCTCCAAAT
TATTTATTTAACAACCTCTCAGCAACGGATATCTCGGCTCTTGCAATCGATGAAGAACGC
AGCGAAATGCGATAAATGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAA
CGCAAGTTGCGCCCGAGGCCATCAGGCCAAGGGCACGCCTGCCTGGGCATTGCGAGTC
ATATCTCTCCCTTAATGAGGCTGTCCATACGTAATGTTTCAGCCGGTGCGGATGTGAGTT
TGGCCCCCTTGTTCTTCGGTACGGGGGGTCTAAGAGCTGCATGGGCTTTTGATGGTCCTA
AATACGGCAAGAGGTGGACGAACTATGCTACAACAAAACCTGTTGTGCGAATGCCCCG
GGTTGTCGTGTTTAATCAGAAGACCCTTTTGAACCCCATGGAGGCCCATCGACCCAT
GATCAGTTGAATGGCCATTTGGTTGCGATCCAGGTCAGGTGAGGCAACCCGCTGAGT
TTAA

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ-สกุล ดร. สุริย์พร นนทชัยภูมิ
2. รหัสบัตรประจำตัวประชาชน
3102200578087
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำสำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
333 ตำบลท่าสุค อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย 57100
โทรศัพท์ 053 926786
โทรสาร 053 916776
E-mail nontachaiyapoom@yahoo.com

4. ประวัติการศึกษา

- | | |
|-------------|---|
| 1991 – 1995 | Bachelor of Science (First Class Honours)
Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University,
Thailand
Senior project: Aseptic techniques for <i>in vitro</i> culture of three species of
<i>Lycopodium</i> |
| 1997 – 2000 | Master of Science
Department of Gene Science, Graduate School of Science, Hiroshima
University, Japan
Thesis: Scanning electron microscopic observation on the diffused
centromeric chromosome of <i>Drosera</i> |
| 2003 – 2007 | Doctor of Philosophy
Department of Botany/School of Integrative Biology
University of Queensland (UQ), Australia
Thesis: Expression and promoter analysis of <i>Glycine max</i> nodule
autoregulation receptor kinase gene |

5. ประวัติการทำงาน

2000 – present Lecturer, School of Science, Mae Fah Luang University

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Gene expression
- Orchid mycorrhiza
- Orchid biotechnology

7. ประวัติการนำเสนอผลงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โปรดระบุชื่อเรื่องของผลงาน ชื่อการประชุม สถานที่ วัน เวลา ตามระบบสากล

Aewsakul, N., Eungwanichayapant, P., Watthana, S., and **Nontachaiyapoom, S.** 2011. Comparative study of three DNA extraction methods for *Paphiopedilum* leaves. Proceedings of the 5th Thailand Botany Conference, March 30-April 1, 2011. Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, P-22. (in Thai)

Srisanga, P., Wongpakam, S., Kamkuan, W., Pekthong, T., Tovanaronte, J., Yaso, T., and **Nontachaiyapoom, S.** 2011. Ethnobotany of Akha in Huai Yuak Pa So village, Mae Fah Luang district and Ban Mai Patthana village, Mae Suai district, Chiang Rai province. Book of abstracts of the 5th Thailand Botany Conference, March 30-April 1, 2011. Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, p.83. (in Thai)

Sasirat, S., **Nontachaiyapoom, S.**, Sawasdwanih, A. and Manoch, L. 2010. Mycorrhizal symbionts of some terrestrial orchids in Queen Sirikit Botanic Garden. Book of abstracts of the 4th Thailand Botany Conference, March 24-26, 2010, Lotus Pang Suan Kaew Hotel, Chiang Mai, Thailand, p. 148.

Taluengjit, A., Watthana, S., Hyde, K. D., and **Nontachaiyapoom, S.** 2010. Isolation and identification of endophytic fungi from roots of *Chiloschista* and *Schoenorchis* (Orchidaceae). Book of abstracts of the 4th Thailand Botany Conference, March 24-26, 2010, Lotus Pang Suan Kaew Hotel, Chiang Mai, Thailand, p.165.

Nontachaiyapoom, S., Sasirat, S., and Manoch, L. 2009. Isolation and identification of mycorrhizal fungi from roots of three commercial orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium* and *Cymbidium*. Book of abstracts of International Conference on Fungal Evolution and Charles Darwin: From Morphology to Molecules, July 9-11, 2009, Sirindhorn Science Home, Thailand Science Park, Thailand, p.61.

Gresshoff, P. M., Indrasumunar, A., **Nontachaiyapoom, S.**, Kinkema, M., Lin, Y., Jiang, Q., Li, D. X., Miyahara, A., Nguyen, C., Buzas, D., Biswas, B., Chan, P. K., Scott, P., Hirani, T., Miyagi, M., Djordjevic, M., Carroll, B. J., Men, A., and Kereszt, A. 2007. Nodulation control in legumes. Proceedings of the 15th International Conference on Nitrogen Fixation, January 21-26, 2007, Cape Town, South Africa.

Nontachaiyapoom, S., Men, A. E., Schenk, P. M., Scott, P., and Gresshoff, P. M. 2006. Expression analysis of *Glycine max* nodule autoregulation receptor kinase promoter through *GUS* and *GFP* reporter gene fusion. Proceedings of the 3rd International Conference on Legume Genomics and Genetics, April 9-13, 2006, Brisbane Convention and Exhibition Centre, Brisbane, Australia, p. 95.

Nontachaiyapoom, S., Men, A. E., Schenk, P. M., Scott, P., and Gresshoff, P. M. 2006. Analysis of *Glycine max* nodule autoregulation receptor kinase promoter through *GUS* reporter gene expression in *Lotus japonicus*. Proceedings of the Plant and Animal Genome XIV Conference, January 14-18, 2006, Town and Country Hotel, San Diego, CA, USA, p. 300.

Gresshoff, P. M., **Nontachaiyapoom, S.**, Kereszt, A., Meksem, K., and Indrasumunar, A. 2005. Functional genomics and induction and regulation of cell divisions during nodulation in legumes. Proceedings of the 10th International Congress of the Society for the Advancement of Breeding Researches in Asia and Oceania (SABRAO), Tsukuba International Congress Center, Tsukuba, Japan.

Sharp, A. and **Nontachaiyapoom, S.** 2002. The use of scientific method to enhance environmental education in Chiangrai Province, Thailand. Proceedings of the International Conference on Environmental Management: Ten Years after Rio, 22-23 October 2002, Bangi, Selangor, Malaysia. pp. 563-569.

8. ประวัติการเผยแพร่ผลงานวิจัย ทั้งภายในและภายนอกประเทศ โปรตระบูชื้อเรื่องผลงาน ชื่อวารสาร ตามระบบสากล

Nontachaiyapoom, S., Sasirat, S., and Manoch, L. 2011. Symbiotic seed germination of *Grammatophyllum speciosum* Blume and *Dendrobium draconis* Rchb. f., native orchids of Thailand. *Scientia Horticulturae* 130: 303-308. [Impact factor 1.045]

Srisanga, P., Wongpakam, S., Kamkuan, W., Pekthong, T., Tovaranton, J., Yaso, T., and **Nontachaiyapoom, S.** 2011. Ethnobotany of Akha in Huay Yuak Pa So village, Mae Fah Luang district and Ban Mai Patthana village, Mae Suai district, Chiang Rai province. *Thai Journal of Botany* 3: 93-114. (in Thai)

Nontachaiyapoom, S., Sasirat, S., and Manoch, L. 2010. Isolation and identification of *Rhizoctonia*-like fungi from roots of three orchid genera, *Paphiopedilum*, *Dendrobium* and *Cymbidium* collected in Chiang Rai and Chiang Mai provinces of Thailand. *Mycorrhiza* (in press), doi:10.1007/s00572-010-0297-3. (Impact factor 2.571)

Kondo, K., and **Nontachaiyapoom, S.** 2008. An evidence on diffused centromeres in *Drosera* chromosomes provided by scanning electron microscopy. *Chromosome Botany* 3: 79-81.

Turakulov, R., **Nontachaiyapoom, S., Mitchelson, K. R., Gresshoff, P. M., and Men, A. E.** 2007. Ultra-sensitive determination of absolute mRNA amounts at attomole levels of nearly identical plant genes with high-throughput mass spectrometry (MassARRAY). *Plant Cell Physiol.* 48: 1379-1384. (Impact factor 4.257)

Nontachaiyapoom, S., Scott, P. T., Men, A. E., Kinkema, M., Schenk, P. M., and Gresshoff, P. M. 2007. Promoters of orthologous *Glycine max* and *Lotus japonicus* nodulation autoregulation genes interchangeably drive phloem-specific expression in transgenic plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 20: 769-780. (Impact factor 4.407)

Kereszt, A., Li, D., Indrasumunar, A., Nguyen, C. D. T., **Nontachaiyapoom, S., Kinkema, M., and Gresshoff, P. M.** 2007. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nat. Protoc.* 2: 948-952. (Impact factor 6.335)

Nontachaiyapoom, S., Inaga, S., Iino, A., and Kondo, K. 2000. Ultrastructure of chromatin organization in diffused-centromeric chromosomes of *Drosera* as compared with localized-centromeric chromosomes of *Drosophyllum* (Droseraceae) detected by scanning electron microscopy. Chromosome Sci. 4: 75-85.

9. ผลงานวิจัยที่ได้รับการจดทะเบียนทรัพย์สินทางปัญญา หรือผลงานวิจัยที่อยู่ระหว่างการยื่นขอจดทะเบียนทรัพย์สินทางปัญญา

-

10. ประสิทธิภาพที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและต่างประเทศ โดยระบุตำแหน่งหน้าที่ในการทำการวิจัย ว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย และระบุสถานภาพของงานวิจัยด้วย

ชื่อโครงการ การแยกและตรวจสอบชนิดของเชื้อราไมคอร์ไรซาในรากกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี
หวายและเข็มขัด

ตำแหน่ง หัวหน้าโครงการวิจัย

ผู้ให้ทุน สกว. และสกอ.

ผู้ร่วมวิจัย นางสาวสาวิตรี สระศรีรัตน์ สังกัดสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์

สถานภาพ สิ้นสุดโครงการวิจัย (พ.ศ. 2551- พ.ศ. 2554)

ชื่อโครงการ การแยกและตรวจสอบชนิดของเชื้อราไมคอร์ไรซาในรากกล้วยไม้สกุลเอื้อง
พญาไร้ใบและสกุลเอื้องจ้าว

ตำแหน่ง หัวหน้าโครงการวิจัย

ผู้ให้ทุน มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ผู้ร่วมวิจัย ดร.สันติ วัฒนานะ สังกัดสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์

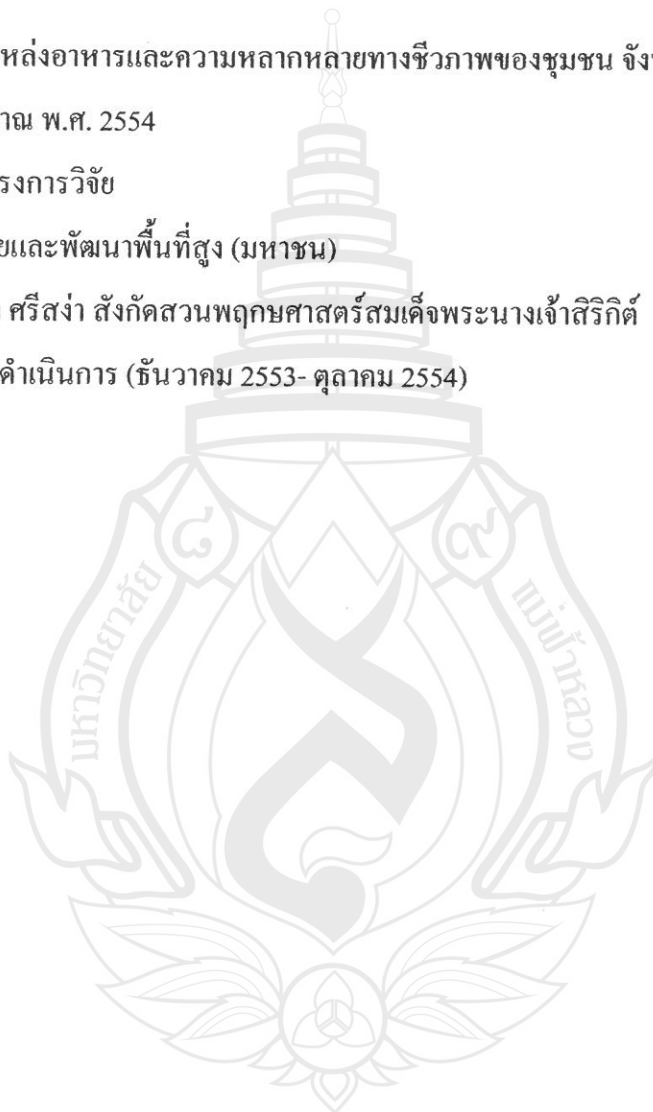
สถานภาพ ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์และรายงานการเงิน (เมษายน 2552- พฤษภาคม 2553)

ชื่อโครงการ การฟื้นฟูแหล่งอาหารและความหลากหลายทางชีวภาพของชุมชน จังหวัดเชียงราย
ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

ตำแหน่ง	หัวหน้าโครงการวิจัย
ผู้ให้ทุน	สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (มหาชน)
ผู้ร่วมวิจัย	ดร.ปรัชญา ศรีสง่า สังกัดสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์
สถานภาพ	สิ้นสุดโครงการวิจัย (พฤศจิกายน 2552- สิงหาคม 2553)

ชื่อโครงการ	การฟื้นฟูแหล่งอาหารและความหลากหลายทางชีวภาพของชุมชน จังหวัดเชียงราย ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554
-------------	---

ตำแหน่ง	หัวหน้าโครงการวิจัย
ผู้ให้ทุน	สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (มหาชน)
ผู้ร่วมวิจัย	ดร.ปรัชญา ศรีสง่า สังกัดสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์
สถานภาพ	อยู่ระหว่างดำเนินการ (ธันวาคม 2553- ตุลาคม 2554)



ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ - สกุล ดร.ประภัสสร คำรงกุล อึ้งวณิชพันธ์
2. รหัสบัตรประจำตัวประชาชน 3 6399 00158 30 9
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
333 หมู่ 1 ตำบลท่าสุต อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย 57100
โทรศัพท์ 053-916778
E-mail: ppsdrk@yahoo.com

4. ประวัติการศึกษา

ปี	ระดับ	ชื่อปริญญา	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2539	ปริญญาตรี	วท.บ. / วิทยาศาสตร์ บัณฑิต	ชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
2540	ปริญญาโท	M.Sc. / Master of Science	Plant Genetic Manipulation	The University of Nottingham	U.K.
2546	ปริญญาเอก	Ph.D. / Doctor of Philosophy	Genetics and Developmental Biology	West Virginia University	U.S.A.

5. ประวัติการทำงาน

17 ก.ค. 2546 – ปัจจุบัน: อาจารย์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

Molecular biology

ผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ-สกุล คร. สันติ วัฒนานะ

2. รหัสบัตรประจำตัวประชาชน

3220200071176

3. ตำแหน่งปัจจุบัน นักวิจัย

สวนพฤกษศาสตร์ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์

ตู้ ปณ. 7 อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ 50180

E-mail: s_watthana@yahoo.com

4. ประวัติการศึกษา

- | | |
|------|---|
| 2535 | วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยรามคำแหง กรุงเทพฯ |
| 2543 | วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ |
| 2548 | Ph.D (Biology) University of Copenhagen, Denmark. |

5. ประวัติการทำงาน

- | | |
|-----------|--|
| 2535-2537 | ผู้ช่วยวิจัย หน่วยวิจัยชีววิทยาสังแวดล้อม ภาควิชาชีววิทยา คณะ
วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง |
| 2537 | พนักงานวิชาการ ระดับ 5 องค์การสวนพฤกษศาสตร์ กระทรวง
ทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม |
| 2549 | อาจารย์พิเศษ สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร วิทยาเขตสารสนเทศ
พะเยา |

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ อนุกรมวิธานพืช นิเวศวิทยากล้วยไม้ และการอนุรักษ์กล้วยไม้

7. ประวัติการนำเสนอผลงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โปรดระบุชื่อเรื่องของผลงาน ชื่อ การประชุม สถานที่ วัน เวลา ตามระบบสากล

1. Watthana, S. 1997. A Study on Herbal Medicinal Plant Used for Making Spiritual
Liquor in Northern Thailand. A presentation given at the Biodiversity Research and

Training Programme Conference, during 13-15 October, 1997, at Pang Suan Kaew Hotel, Chiang Mai, Thailand.

2. Watthana, S. 2002. *Pomatocalpa naevata* J.J.Sm.-Ecology and Population Structure in Southeastern Thailand. A poster presentation given at International Seidenfaden Orchid Symposium: Orchid biology and conservation 1-4 December 2002. Lotus Pang Suan Kaew Hotel, Chiang Mai. Thailand.
3. Watthana, S. 2004. Conservation Biology of *Pomatocalpa* (Orchidaceae) : Biogeographic and ecological factors. A poster presentation given at Flora Malesiana symposium 20-24 September 2004. Los Banos. Philippines.
4. Watthana, S. 2008. Ericaceae of Thailand (oral presentation). 14th Flora of Thailand Meeting. 17-21 August 2008. Copenhagen.

8. ประวัติการเผยแพร่ผลงานวิจัย ทั้งภายในและภายนอกประเทศ โปรดระบุชื่อเรื่องผลงาน ชื่อวารสาร ตามระบบสากล

1. Watthana, S. 1998. A Study on Herbal Medicinal Plant Used for Making Spiritual Liquor in Northern Thailand, The Botanical Garden Organization, Prime Minister's Office, 182 p. (in Thai).
2. Watthana, S. 1999. A Study on Trees in Queen Sirikit Botanic Garden, Chiang Mai Province. An independent study as part of M.Sc. Study, Chiang Mai University, 137 p. (in Thai).
3. Watthana, S. and Trisonthi, C. 1999. *Agapetes inopinata* Airy Shaw, a New Record for Thailand Thai For. Bull. (Bot) 27: 19-23.
4. Watthana, S. 2000. Taxonomy of the Genera *Agapetes* and *Vaccinium* (Ericaceae) in Thailand, M.Sc. Thesis, Faculty of Science, Chiang Mai University, 137 p. (in Thai).
5. Watthana, S. 2001. New species of *Agapetes* (Ericaceae) from Thailand. Edin. Jour. Bot. 58 (3): 423-427.
6. Rundel, P. W., Patterson, M, Boonpragob and Watthana, S. 2001. Photosynthesis capacity in Thai Conifers. Nat. Hist. Bull. Siam. Soc. 49 (2). 125-128.
7. Pedersen H.Æ., Watthana, S., Suddee, S. and Sarirat, S. 2004. Breeding system, post-pollination growth, and seed dispersal in *Gastrodia exilis* (Orchidaceae). 52 (1): 9-26.

8. Watthana, S. 2004. Ecology and conservation biology of *Pomatocalpa naevata* J.J.Sm. (Orchidaceae). Nat. Hist. Bull. Siam Soc. 52(2): 201-215.
9. Watthana, S. 2006. The *Pomatocalpa maculosa* Complex (Orchidaceae) resolved by multivariate morphometric analysis. Taiwania 51(1): 44-53: (2006).
10. Watthana, S., Pedersen, H.A., and Suddee, S. 2006. Substrate preference, demography, and fruit set in two populations of the epiphyte *Pomatocalpa spicatum* (Orchidaceae). Selbyana 27(2): 165-174.
11. Watthana, S. Topik, H., Yukawa, T and Ito, M. 2006. Phylogeny of the genus *Pomatocalpa* Breda (Orchidaceae).-Gard. Bull. Singapore 58: 55-80.
12. Watthana, S. 2007. The genus *Pomatocalpa* (Orchidaceae) – a taxonomic monograph. –Harvard Pap. Bot. 11(2): 207-256.
13. Watthana, S. and H. A. Pedersen. 2008. Phorophyte diversity, substrate requirements and fruit set in *Dendrobium scabrilingue* (Orchidaceae): basic observations for re-introduction experiments. Nat. Hist. J. Chulalongkorn Univ. 8(2): 135-142.
14. Damapong, S., C. Tapyai and S. Watthana. 2008. *Ornithochilus yingjiangensis* Z.H. Tsi (Orchidaceae), A new record for Thailand. Nat. Hist. J. Chulalongkorn Univ. 8(2): 213-215.
15. Nanakorn, W. and S. Watthana. 2008. Thai native orchid vol. 1-2. Vanida Press. Chiang Mai.

9. ผลงานวิจัยที่ได้รับการจดทะเบียนทรัพย์สินทางปัญญา หรือผลงานวิจัยที่อยู่ระหว่างการขึ้นขอจดทะเบียนทรัพย์สินทางปัญญา

10. ประสิทธิภาพที่เกี่ยวกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและต่างประเทศ โดยระบุตำแหน่งหน้าที่ในการทำการวิจัย ว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย และระบุสถานภาพของงานวิจัยด้วย

ตำแหน่ง ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

ชื่อโครงการ การอนุรักษ์กล้วยไม้แบบบูรณาการ – กรณีศึกษาฟ้ามุ่ย [Multi-disciplinary Conservation of Orchid- Case Study: Blue Vanda (*Vanda coelurea* Griff. ex Lindl.)]

ตำแหน่ง ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย และหัวหน้าโครงการย่อย 2 โครงการในแผนนี้ ได้แก่

1. นิเวศวิทยาและชีววิทยาเพื่อการอนุรักษ์ฟ้ามุ่ย (Ecology and Biological Conservation of *Vanda coerulea* Griff. ex Lindl. in Thailand)
2. การศึกษาอัตราการอยู่รอดหลังปล่อยฟ้ามุ่ยในสภาพกึ่งธรรมชาติ (Study of survival of Blue Vanda (*Vanda coelurea* Griff. ex Lindl.) after release to semi-natural condition)

ผู้ให้ทุน สภาวิจัยแห่งชาติ งบประมาณปี 2553-2555

สถานภาพ กำลังอยู่ระหว่างดำเนินการ

