คุณลักษณะเชิงโมเลกุลของลูกผสมข้ามสกุลระหว่างเอื้องดินใบหมากกับเอื้องดินใบไผ่ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี

Molecular Characterization of Intergeneric hybrids between *Spathoglottis plicata* Bl. And *Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr. by PCR-RFLP

อรวรรณ ไทยเจริญ, วิชาญ แฟงเมือง, อนุพันธ์ กงบังเกิด และ มลิวรรณ นาคขุนทด*

Orawan Thaijalern, Wichan Faengmuang, Anupan Kongbangkerd and Maliwan Nakkuntod*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

การศึกษาคุณลักษณะเชิงโมเลกุลของลูกผสมข้ามสกุลของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก และเอื้องดินใบไผ่ที่ได้จากการถ่ายฝากและนำเมล็ดมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ nrITS (nuclear ribosomal internal transcribed spacer) และตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิดให้รูปแบบที่เหมือนกัน ขณะที่ 2 ชนิดจะให้รูปแบบที่แตกต่างกัน คือ *Alu*I และ *Taq*I ซึ่งจากการสุ่มตัวอย่างต้นที่เกิดจากการถ่ายฝากทั้งหมด 100 ต้น ความน่าจะเป็นที่จะได้ลูกผสมจากการถ่ายฝากเมื่อใช้เอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ คิดเป็น 9.62% และ 8.33% ตามลำดับ

คำสำคัญ : ลูกผสมข้ามสกุล / เอื้องดินใบหมาก / เอื้องดินใบไผ่ / พีซีอาร์-อาร์แอฟแอลพี

Abstract

Molecular characterization by polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in nrITS (nuclear ribosomal internal transcribed sequence) of intergeneric hybrids between *Spathoglottis plicata* Bl. and *Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr. was investigated. The intergeneric seeding originated from deposit pollination together with tissue culture technique. PCR-RFLP profiles were generated using seven restriction enzymes (REs). Two REs, *Alu*I and *Taq*I, were restricted polymorphic bands profiling whereas the others five gave monomorphic. The studies showed that probability analysis of the hybrids on maternal *S. plicata* and *A. graminifolia* was 9.62% and 8.33%, respectively.

Keywords : Intergeneric hybrids / *Spathoglottis plicata* / *Arundina graminifolia* / PCR-RFLP

***Corresponding author.** E-mail: lotharmali@yahoo.com

1. บทนำ

กล้วยไม้เป็นพืชดอกที่มีความหลากหลายมากและมีความสำคัญในเชิงเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก อีกทั้งยังเป็นประเทศที่ส่งออกกล้วยไม้มากที่สุดของโลก (สุภาพร หนูชนะภัย และ บุญจิต ฐิตาภิวัฒนกุล, 2553) ด้วยความต้องการกล้วยไม้ในปริมาณมาก ในปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเข้ามาช่วยในการเพิ่มปริมาณให้เพียงต่อความต้องการ และยังมีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะเด่นตามที่ต้องการ โดยส่วนใหญ่เป็นการผสมข้ามชนิดในสกุลเดียวกันซึ่งประสบความสำเร็จเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ยังมีการผสมข้ามสกุลเกิดขึ้น เช่น ลูกผสมข้ามสกุลระหว่าง *Aerides vandarum* Reichb.f และ *Vanda stangeana* Reichb.f (Kishor *et al*., 2008) เป็นต้น ซึ่งจะทำให้ได้ลักษณะที่เด่นที่ต้องการแตกต่างกันออกไป ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นที่การผสมข้ามสกุลของเอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis plicata* Bl.) และเอื้องดินใบไผ่ (*Arundina graminifolia* (D.Don) Hochr.) โดยเอื้องดินใบหมากเป็นกล้วยไม้ดินพันธุ์แท้ของไทยที่พบตามชายป่าหรือทุ่งโล่งที่ชื้นแฉะทางภาคตะวันออกและภาคใต้ ดอกออกเป็นช่อตั้ง สีชมพูอมม่วงและสามารถออกดอกได้ตลอดปี ในปัจจุบันพบว่าสามารถปลูกได้ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย ปัจจุบันเอื้องดินใบหมากนี้ได้มีการนำมาพัฒนาสายพันธุ์ เพื่อผลิตเป็นไม้กระถางเชิงการค้าอย่างต่อเนื่อง ขณะที่เอื้องดินใบไผ่ เป็นกล้วยไม้ดินที่พบได้ทั่วประเทศ ตามชายป่าและทุ่งโล่ง สามารถทนต่อสภาพภูมิอากาศที่แห้งแล้งและร้อนได้ดี ออกดอกได้เกือบตลอดทั้งปี ดอกเป็นช่อ ทยอยบานที่ละดอก มีกลิ่นหอม กลีบดอกสีชมพูอ่อน แต่กลีบปากมีสีชมพูเข้ม ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เหมาะสมในการนำมาพัฒนาและสร้างกล้วยไม้ดินลูกผสม

ซึ่งในการผสมข้ามสกุลไม่ได้ประสบความสำเร็จเสมอไป จึงนำเทคนิคการถ่ายฝากเข้ามาช่วย ทำให้สามารถติดฝัก และมีเมล็ดได้ แต่ถ้าจะรอการตรวจสอบลูกผสมที่เกิดขึ้นอาจจะต้องรอจนกระทั่งกล้วยไม้เจริญเติบโตและออกดอก ซึ่งจะใช้เวลานาน ดังนั้นในการตรวจสอบด้านดีเอ็นเอทำให้สามารถวิเคราะห์ผลได้รวดเร็วขึ้น ซึ่งในรายงานของ กนกวรรณ แดงสวัสดิ์ (2551) ได้ทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวหลวงโดยใช้ชิ้นส่วนบริเวณ nrITS ร่วมกับบริเวณยีนที่มีความจำเพาะ พบว่าสามารถตรวจสอบลูกผสมบัวหลวงที่เกิดขึ้นได้ และมีการนำเทคนิคที่สามารถใช้ในการตรวจสอบได้อย่างแม่นยำสูงอย่างเช่น เทคนิค SSCP (single strand conformational polymorphisms) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถแยกความแตกต่างแม้มีลำดับเบสของดีเอ็นเอต่างเพียงเล็กน้อยก็ตาม จีรภา ดาทอง และ วิภา หงษ์ตระกูล (2555) ศึกษาการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมในบัวประดับและบัวหลวง โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีนที่จำเพาะร่วมกับบริเวณ nrITS พบรูปแบบแถบดีเอ็นเอเพียงรูปแบบเดียวในทุกตัวอย่างที่ศึกษาบน 1% agarose gel แต่เมื่อวิเคราะห์บน non-denaturing polyacrylamide gel พบความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นและสามารถระบุลูกผสมได้ ดังนั้นในการศึกษากล้วยไม้ครั้งนี้จึงได้นำบริเวณ nrITS มาใช้ ซึ่งจากผลการทดลองของ Kishor *et al*. (2009) ก็ได้รายงานความมีเสถียรภาพทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ดินลูกผสมระหว่าง *Vanda stangeana* กับ *Aerides vandarum* เมื่อมีการเพิ่มปริมาณอย่างมากและรวดเร็วด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยตรวจสอบจากดีเอ็นเอในนิวเคลียสบริเวณ nrITS ด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิด พบว่าลูกผสมที่เกิดขึ้นมีรูปแบบของดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมด นั่นหมายความว่าลูกผสมที่เกิดขึ้น มีเสถียรภาพทางพันธุกรรมในบริเวณ nrITS สูงเมื่อเทียบกับต้นพ่อแม่ ดังนั้นดีเอ็นเอบริเวณนี้จึงน่าที่จะเหมาะที่จะนำมาทำการทดสอบกล้วยไม้ลูกผสมในครั้งนี้เช่นกัน

2. วิธีการ

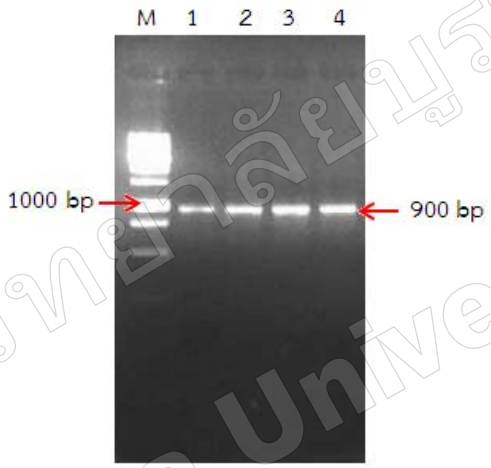
สุ่มตัวอย่างจากกล้วยไม้ดิน 5 กลุ่ม คือ 1) เอื้องดินใบหมากพันธุ์แท้จากธรรมชาติ 2) เอื้องดินใบไผ่พันธุ์แท้จากธรรมชาติ เพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์อย่างละ 3 ต้น 3) ลูกผสมระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ด้วยเทคนิคการถ่ายฝากโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่จำนวน 52 ตัวอย่าง 4) ลูกผสมระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ด้วยเทคนิคการถ่ายฝาก โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่จำนวน 48 ตัวอย่าง และ 5) ลูกผสมจริงระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ โดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่จำนวน 20 ตัวอย่าง จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากนิวเคลียส คลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรียรวมกันทั้งหมด (Total DNA) ด้วยวิธีดัดแปลงของ Doyle and Doyle (1987) โดยใช้ 1X CTAB buffer (2% Cetyl trimethylammonium bromide, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris pH 8.0) ที่เติม β-mercaptoethanol แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 ºC จากนั้นเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) แล้วย่อยอาร์เอ็นเอด้วย RNase A จากนั้นทำลายโปรตีนด้วย phenol:chloroform (1:1) แล้วทำซ้ำด้วย chloroform: isoamyl alcohol (24:1) จากนั้นทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 3 M sodium acetate และ absolute ethanol และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย Ethanol 70% และสุดท้ายละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer (0.01 M Tris pH 8.0, 0.001 M EDTA pH 8.0) แล้วนำไปตรวจสอบขนาดและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิสที่ความเข้มข้นเจล 0.8% จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ nrITS

โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ 17SE (5’ ATG GTC CGG TGA AGT GTT CG 3’) และ 26SE (5’ CCC GGT TCG CTC GCC GTT AC 3’) (Kishor *et al*., 2009) แล้วทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย HiYieldTM Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience)

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มาทำการตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด คือ *Alu*I, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Msp*I, *Rsa*I และ *Taq*I ในปฏิกิริยาทั้งหมด 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ 2-3 ไมโครกรัม 1X บัฟเฟอร์ เอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด 3 U และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแต่ละเอนไซม์ แล้ววิเคราะห์รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 2% อะกาโรสเจล โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่แรงดัน 50 โวลต์ จากนั้นนำไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในเครื่อง Gel documentation (Bio-rad)

3. ผลและอภิปราย

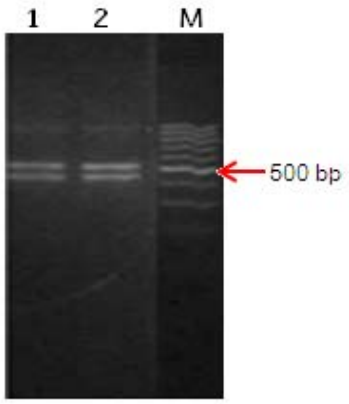
เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งหมดพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณมาก จากนั้นเมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ nrITS พบว่าได้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวมีขนาดประมาณ 900 คู่เบส (ภาพที่ 1)



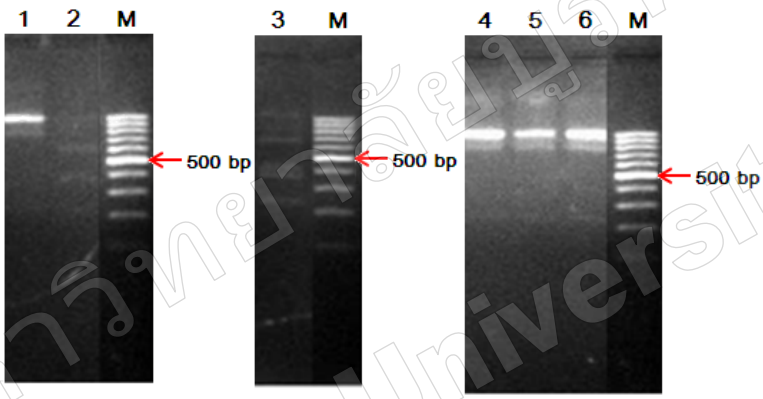
ภาพที่ 1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดย 1 คือเอื้องดินใบหมาก 2 คือเอื้องดินใบไผ่ และ 3-4 คือลูกผสมที่ได้จากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ตามลำดับ และ M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kilobase DNA ladder (Fermentas)

จากนั้นเมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ nrITS ของต้นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมด 7 ชนิด ที่ได้จากข้อมูลใน Genebank ได้แก่ *Alu*I, *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Msp*I, *Rsa*I และ *Taq*I เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (Fermentas) พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Msp*I และ *Rsa*I ทำให้เกิดรูปแบบของดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (monomorphic banding pattern) (ภาพ 2) จึงไม่สามารถนำเอนไซม์ 5 ชนิดนี้มาใช้ในการตรวจสอบลูกผสมได้ ในขณะที่เอนไซม์ตัดจำเพาะอีก 2 ชนิด คือ *Alu*I และ *Taq*I นั้นทำให้เกิดรูปแบบของดีเอ็นเอที่ต่างกัน (polymorphic banding pattern) ของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์แต่ละต้น จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบลูกผสมในครั้งนี้ได้ โดยเมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากต้นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์บริเวณ nrITS ด้วยเอนไซม์ *Alu*I (AG^CT) และ *Taq*I (T^CGA) จำนวนอย่างละ 3 ต้น พบว่าเมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ด้วยเอนไซม์ *Alu*I จะให้รูปแบบของดีเอ็นเอของเอื้องดินใบหมากที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ โดยทั้ง 3 ตัวอย่างก็ได้รูปแบบที่แตกต่างกัน ขณะที่ต้นที่ 3 จะให้ผลรวมของขนาดของแถบดีเอ็นเอเกิน 900 คู่เบส อาจจะเนื่องมาจากความแตกต่างของชุดดีเอ็นเอทั้ง 2 ชุด ที่เป็นเฮทเทอโรไซกัส ขณะที่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเอื้องดินใบไผ่จะให้เพียง 1 รูปแบบเท่านั้น ดังภาพที่ 3-4 (ตาราง1)

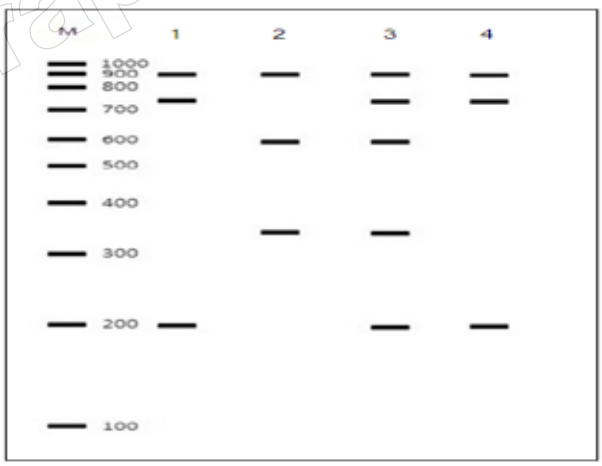
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2 รูปแบบ monomorphic ของเอื้องดินใบหมาก (1) เอื้องดินใบไผ่ (2) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR*V และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)



ภาพที่ 3 รูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ AluI โดยที่ 1-3 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 4-6 คือเอื้องดินใบไผ่ต้นที่ 1-3 และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)



ภาพที่ 4 ไดอะแกรมรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I โดยที่ 1-3 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 4 คือเอื้องดินใบไผ่ต้นที่ 1-3 และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

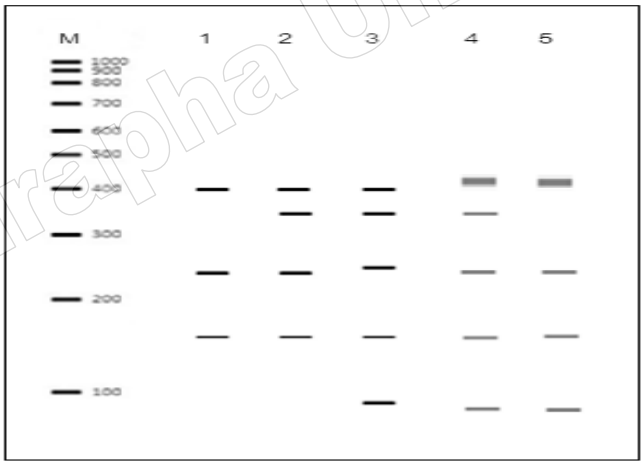
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 1 ขนาดของแถบดีเอ็นเอพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์

ต้นที่	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเอื้องดินใบหมาก(คู่เบส)	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเอื้องดินใบไผ่ (คู่เบส)
1	900, 750, 200	900, 750, 200
2	900, 600, 350	900, 750, 200
3	900, 750, 600, 350, 200	900, 750, 200

(1) 900, 750, 200
(2) 900, 600, 350

และเมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตัดด้วย *Taq*I จะให้รูปแบบดีเอ็นเอจากเอื้องดินใบหมาก 3 รูปแบบ โดยพบว่าเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1 นั้นมีขนาดของแถบดีเอ็นเอรวมกันน้อยกว่า 900 คู่เบส ซึ่งเป็นไปได้ว่ามีดีเอ็นเอสายสั้นๆ อยู่ นั่นคือ ประมาณ 60 คู่เบส และ 20 คู่เบส ที่ไม่สามารถปรากฏอยู่ในการทำเจลอิเล็กโตรโฟริซิสได้ เช่นเดียวกับในเอื้องดินใบหมากต้นที่ 2 และ 3 จะพบว่ามีขนาดของแถบดีเอ็นเอรวมกันทั้งหมดมากกว่า 900 คู่เบส เนื่องจากความแตกต่างของชุดดีเอ็นเอทั้ง 2 ชุดที่เป็นเฮทเทอโรไซกัส ขณะที่เอื้องดินใบไผ่จะให้ 2 รูปแบบ โดยมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 คู่เบส ที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ โดยต้นที่ 1 และ 2 จะมีรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน และจะพบว่ามีขนาดของแถบดีเอ็นเอรวมกันทั้งหมดมากกว่า 900 คู่เบส เนื่องจากความแตกต่างของชุด ดีเอ็นเอทั้ง 2 ชุดที่เป็นเฮทเทอโรไซกัส ดังภาพที่ 5 (ตารางที่ 2) นอกจากนี้จากทุกรูปแบบยังพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบสที่เกิดจากการตัดไม่หมดของเอนไซม์ เนื่องจากความเข้มข้นของปฏิกิริยาอาจไม่เหมาะสม และขณะที่ในบางตัวอย่างอาจไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นมากปรากฏอยู่ในการทำเจลอิเล็กโตรโฟริซิส



ภาพที่ 5 ไดอะแกรมรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I โดยที่ 1-3 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 4 คือเอื้องดินใบไผ่ต้นที่ 1 และ 2 ในขณะที่ 5 คือเอื้องดินใบไผ่ต้นที่ 3 และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

ตารางที่ 2 ขนาดของแถบดีเอ็นเอพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I

ต้นที่	ขนาดขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเอื้องดินใบหมาก (คู่เบส)	ขนาดขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นของเอื้องดินใบไผ่ (คู่เบส)
1	400, 250, 170, (60, 20)*	450, 350, 250, 170, 80, (20)*
		(1) 450, 350, 80, (20)*
		(2) 450, 250, 170, 80
2	400, 350, 250, 170, (60, 20)*	450, 350, 250, 170, 80, (20)*
	(1) 400, 250, 170, (60, 20)*	(1) 450, 350, 80, (20)*
	(2) 400, 350, 170	(2) 450, 250, 170, 80
3	400, 350, 250, 170,80	450, 250, 170, 80
	(1) 400, 250, 170, 80	
	(2) 400, 350, 170	

หมายเหตุ : ไม่พบในการทำ gel electrophoresis

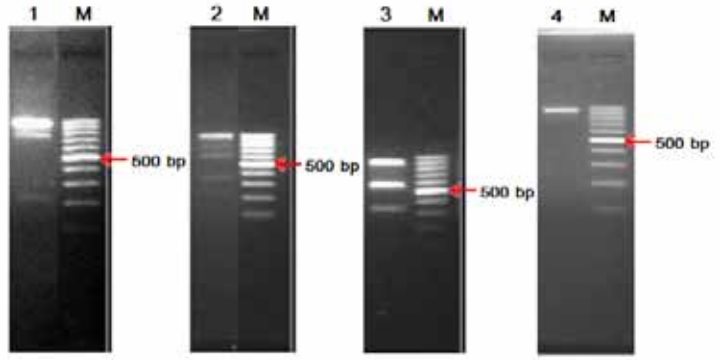
การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมด้วยเอนไซม์ *Alu*I

การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่บริเวณ nrITS ด้วยเอนไซม์ *Alu*I จำนวน 20 ตัวอย่าง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ ดังภาพที่ 8 (ตาราง 3) โดยพบรูปแบบที่ 1 จำนวน 13 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900, 750, 200 คู่เบสซึ่งสามารถระบุได้ว่ารูปแบบนี้น่าจะเป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่ต้นที่ 1 กับพ่อ ลูกผสมในรูปแบบที่ 2 พบจำนวน 2 ตัวอย่างซึ่งน่าจะเป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่ต้นที่ 1 มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900, 750, 600, 350, 200 คู่เบส และรูปแบบที่ 3 จำนวน 5 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบสเพียงแถบเดียวซึ่งไม่สามารถระบุได้ว่าเกิดจากแม่ต้นใด เนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวไม่สามารถตัดได้

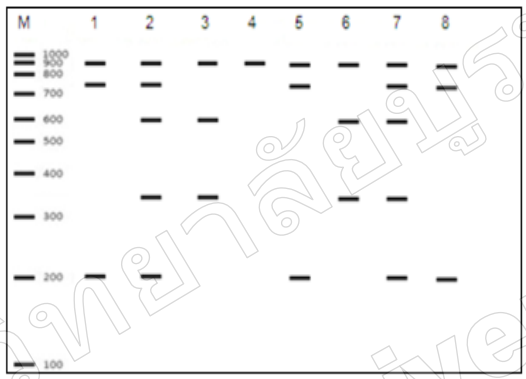
ตารางที่ 3 ขนาดของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I

รูปแบบที่	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ (คู่เบส)	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ (คู่เบส)	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ (คู่เบส)
1	900, 750, 200	900, 750, 200	900, 750, 200
2	900, 750, 600, 350, 200	900, 750, 600, 350, 200	900, 750, 600, 350, 200
3	900	900, 600, 350	900
4	-	900	-

เมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Alu*I จำนวน 52 ตัวอย่าง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ ดังภาพที่ 6-7 (ตารางที่ 3) โดยรูปแบบที่ 1 พบจำนวน 1 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900, 750, 200 คู่เบสซึ่งน่าจะเป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างแม่ต้นที่ 1 กับพ่อ หรือเกิดจากการผสมตัวเองของแม่ในต้นที่ 1 ก็เป็นได้ รูปแบบที่ 2 พบจำนวน 6 ตัวอย่างซึ่งน่าจะเป็นลูกผสมที่เกิดแม่ต้นที่ 1 กับพ่อ มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 และ 350 คู่เบส จากต้นแม่ และขนาด 750 และ 200 คู่เบส จากต้นพ่อ ในรูปแบบที่ 3 พบจำนวน 36 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900, 600, 350 คู่เบส จะเห็นได้ว่าไม่พบแถบดีเอ็นเอของเอื้องดินใบไผ่ที่มีขนาด 750 และ 200 คู่เบสเลย ดังนั้นจึงไม่น่าจะเป็นลูกผสมข้ามที่แท้จริง และรูปแบบที่ 4 จำนวน 9 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบสเพียงแถบเดียว จึงไม่สามารถระบุความเป็นลูกผสมได้

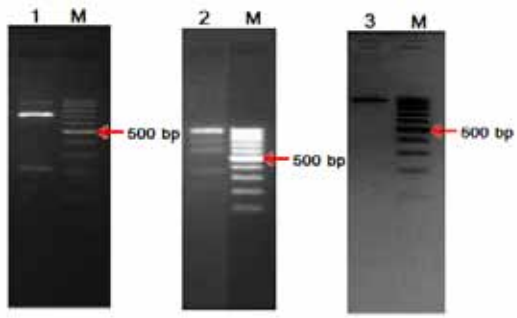


ภาพที่ 6 รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I โดย 1-4 คือรูปแบบที่ 1-4 และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)



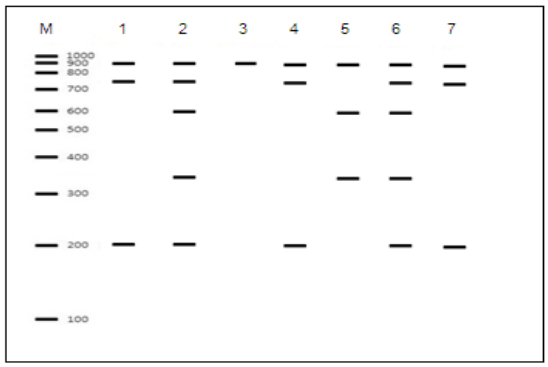
ภาพที่ 7 ไดอะแกรมรูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝาก โดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I โดย 1-4 คือรูปแบบที่ 1-4 ขณะที่ 5-7 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 8 คือเอื้องดินใบไผ่ และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

เมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Alu*I จำนวน 48 ตัวอย่าง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 รูปแบบ ดังภาพที่ 8-9 (ตารางที่ 3) โดยรูปแบบที่ 1 พบจำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งมีโอกาสที่จะเป็นลูกผสมระหว่างแม่และพ่อต้นที่ 1 หรือเป็นการผสมตัวเองของเอื้องดินใบไผ่ นอกจากนี้ในรูปแบบที่ 2 พบจำนวน 4 ตัวอย่างก็มีโอกาสเป็นลูกผสมที่เกิดจากแม่และพ่อต้นที่ 2 และในรูปแบบที่ 3 จำนวน 24 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบสเพียงแถบเดียว ซึ่งไม่สามารถใช้ในการระบุความเป็นลูกผสมได้



ภาพที่ 8 รูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I โดย 1-3 คือรูปแบบที่ 1-3 และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

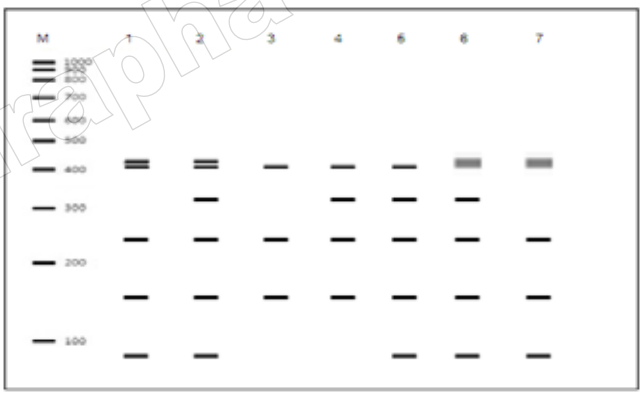


ภาพที่ 9 ไดอะแกรมรูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I โดย 1-3 คือรูปแบบที่ 1-3 ขณะที่ 4-6 คือเอื้องดินใบหมาก ต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 7 คือเอื้องดินใบไผ่ และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ *Alu*I นั้น สามารถตัดดีเอ็นเอของลูกผสมที่ได้จากการถ่ายฝากแล้วให้รูปแบบของดีเอ็นเอต่างๆ ที่สามารถบอกถึงโอกาสที่ตัวอย่างนั้นๆ จะเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริงโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ทั้งสิ้น 7 ตัวอย่าง ในขณะที่เมื่อมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่พบ 24 ตัวอย่าง

การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมด้วยเอนไซม์ *Taq*I

การตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Taq*I จำนวน 20 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นลูกที่เกิดจากการผสมข้ามที่แท้จริง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ ดังภาพที่ 10 (ตารางที่ 4) โดยรูปแบบที่ 1 พบ 19 ตัวอย่าง มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450, 400, 250, 170, 80 คู่เบส สามารถบอกได้ว่าเป็นลูกผสมที่น่าจะเกิดจากการผสมระหว่างต้นแม่ต้นที่ 1 และต้นพ่อต้นที่ 3 และรูปแบบที่ 2 จำนวน 1 ตัวอย่าง พบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450, 400, 350, 250, 170, 80 คู่เบสซึ่งไม่สามารถระบุต้นพ่อแม่ได้ จะเห็นได้ว่าลูกผสมจริงนั้นจะมีแถบของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400-450 คู่เบสที่มีความหนามาก ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 และ 400 คู่เบสออกจากกันได้อย่างชัดเจนโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิส

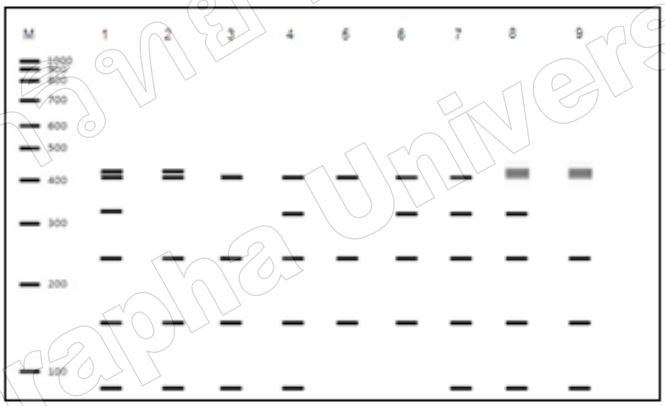


ภาพที่ 10 ภาพไดอะแกรมรูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I โดย 1-2 คือรูปแบบที่ 1-2 ขณะที่ 3-5 คือเอื้องดิน ใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 6-7 คือเอื้องดินใบไผ่รูปแบบที่ 1-2 ตามลำดับ และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

ตารางที่ 4 ขนาดของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I

รูปแบบที่	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ (คู่เบส)	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ (คู่เบส)	ขนาดประมาณของแถบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ (คู่เบส)
1	450, 400, 250, 170, 80	450, 400, 350, 250, 170, 80	450, 350, 250, 170, 80
2	450, 350, 250, 170, 80	450, 400, 250, 170, 80	450, 250, 170, 80
3	-	400, 250, 170, 80	-
4	-	400, 350, 250, 170, 80	-

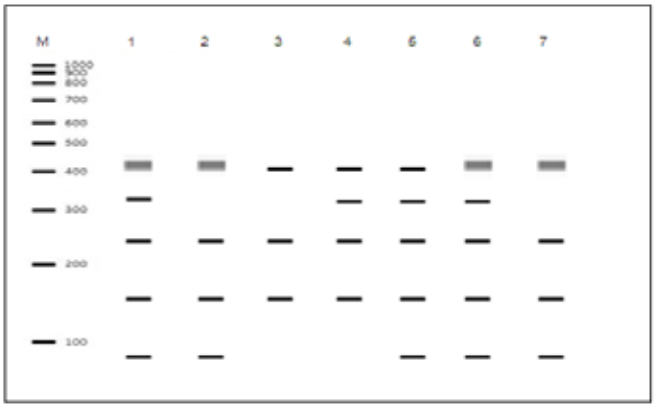
เมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Taq*I จำนวน 52 ตัวอย่าง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ ดังภาพที่ 11 (ตารางที่ 4) โดยรูปแบบที่ 1 พบจำนวน 15 ตัวอย่าง และในรูปแบบที่ 2 พบ 2 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถบอกได้ว่าน่าจะเป็นลูกผสมระหว่างต้นแม่ต้นที่ 1 และต้นพ่อต้นที่ 3 ดังนั้นตัวอย่างทั้งสองรูปแบบนี้พบว่า น่าจะเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริง เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอหนาขนาดประมาณ 450 คู่เบสที่ได้จากต้นพ่อ ขณะที่รูปแบบที่ 3 จำนวน 3 ตัวอย่าง และรูปแบบที่ 4 จำนวน 32 ตัวอย่าง ซึ่งทั้งตัวอย่างในรูปแบบที่ 3 และ 4 นี้ไม่มีโอกาสที่จะเป็นลูกผสมทั้งสิ้น เนื่องจากไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 คู่เบส จากเอื้องดินใบไผ่เลย



ภาพที่ 11 ภาพไดอะแกรมรูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I โดย 1-4 คือรูปแบบที่ 1-4 ขณะที่ 5-7 คือเอื้องดินใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 8-9 คือเอื้องดินใบไผ่รูปแบบที่ 1-2 ตามลำดับ และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

เมื่อตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Taq*I จำนวน 48 ตัวอย่าง พบรูปแบบของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบ ดังภาพที่ 12 (ตารางที่ 4) โดยรูปแบบที่ 1 พบ 9 ตัวอย่าง และรูปแบบที่ 2 จำนวน 39 ตัวอย่าง ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบสหรือไม่ เนื่องจากความหนาของแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 คู่เบส ซึ่งพบในเอื้องดินใบไผ่ต้นพ่ออยู่แล้ว รูปแบบที่ได้ทั้งสองรูปแบบอาจเกิดจากการผสมข้ามสกุลหรือการผสมตัวเองของเอื้องดินใบไผ่ จึงไม่สามารถระบุความเป็นลูกผสมข้ามสกุลของลูกที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ด้วยเอนไซม์ *Taq*I ได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 12 ภาพไดอะแกรมรูปแบบดีเอ็นเอของลูกผสมจากการถ่ายฝาก โดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *Taq*I โดย 1-2 คือรูปแบบที่ 1-2 ขณะที่ 3-5 คือเอื้องดิน ใบหมากต้นที่ 1-3 ตามลำดับ 6-7 คือเอื้องดินใบไผ่รูปแบบที่ 1-2 ตามลำดับ และ M คือดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp DNA ladder (Fermentas)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ *Taq*I นั้น สามารถตัดดีเอ็นเอของลูกผสมที่ได้จากการถ่ายฝากแล้วให้รูปแบบของดีเอ็นเอต่างๆ ที่สามารถบอกถึงโอกาสที่ตัวอย่างนั้นๆ จะเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริงโดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นแม่ทั้งสิ้น 17 ตัวอย่าง (32.69%)

จากการตรวจสอบลูกผสมที่เกิดจากการถ่ายฝากที่พบว่ามีโอกาสเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริงนั้น จากทั้งการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Alu*I และ *Taq*I ให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยมีเอื้องดินใบหมากเป็นต้นแม่ ทั้งสิ้น 5 ตัวอย่าง (9.62%) แต่เมื่อใช้เอื้องดินใบไผ่เป็นต้นแม่นั้นไม่สามารถระบุความเป็นลูกผสมได้เมื่อใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Taq*I ดังนั้นจาก 24 ตัวอย่างจึงมีเพียง 4 ตัวอย่าง (8.33%) ที่ตรวจสอบได้ว่าเป็นลูกผสมข้ามสกุล เนื่องจากมีแถบดีเอ็นเอของต้นพ่อที่ชัดเจนและเห็นง่ายกว่ารวมถึงแตกต่างจากต้นแม่อย่างชัดเจน เพราะสามารถระบุได้ว่าเกิดจากการผสมข้ามสกุลจริงระหว่างต้นพ่อแม่ต้นใด ส่วนตัวอย่างที่เหลืออาจจะต้องใช้เทคนิคอื่นเข้ามาช่วยระบุเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงพบว่ามีลูกผสมข้ามสกุลที่เกิดจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดิน-ใบหมากและเอื้องดินใบเป็นต้นแม่ทั้งสิ้น 5 และ 4 ตัวอย่าง ตามลำดับ แต่จากการรายงานของ Mao *et al*. (2004) ศึกษาการงอกของเมล็ด และการพัฒนาเป็นต้นกล้า โดยเปรียบเทียบระหว่างการผสมตัวเองและการผสมข้ามชนิดของกล้วยไม้สกุล *Spathoglottis* Bl. พบว่ามีอัตราการงอกของเมล็ดและการพัฒนาเป็นต้นกล้าที่ต่างกัน ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่าลูกผสมทั้ง 5 ตัวอย่างที่เกิดจากการถ่ายฝากเมื่อมีเอื้องดินใบหมากเป็นต้นแม่นั้น น่าจะไม่ใช่ลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริง เนื่องจากมีระยะเวลาในการงอกของเมล็ด และการเจริญของต้นกล้าที่เท่ากับต้นที่เกิดจากการผสมตัวเองของเอื้องดินใบหมาก แต่จะมีการเจริญของต้นกล้าที่ช้ากว่าลูกผสมข้ามที่ใช้เอื้องดินใบหมากเป็นต้นแม่โดยการผสมแบบปกติ กล่าวคือลูกผสมข้ามสกุลจะงอกและพัฒนาช้ากว่าต้นที่เกิดจากการผสมตัวเอง ในขณะที่ลูกผสมข้ามสกุลอีก 4 ตัวอย่างที่เกิดจากเอื้องดินใบไผ่เป็นต้นแม่นั้น มีระยะเวลาในการงอกของเมล็ดที่สั้นกว่าต้นที่เกิดจากการผสมตัวเองของเอื้องดินใบไผ่ จึงอาจจะเป็นไปได้อย่างมากที่จะเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่แท้จริง ในการตรวจสอบลูกผสมที่ได้จากการถ่ายฝากในครั้งนี้จึงพบว่ามีโอกาสที่จะได้ลูกผสมข้ามสกุลจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นต้นแม่ 4 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 48 ตัวอย่าง คิดเป็น 8.33% แสดงถึงว่าเอื้องดินใบไผ่ไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมหรือมีน้อยมากในธรรมชาติ ซึ่งถือว่าการผสมข้ามสกุลของกล้วยไม้ดินสองสกุลนี้ประสบความสำเร็จในระดับหนึ่งและเทคนิคการถ่ายฝากก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถเกิดลูกผสมได้ในกล้วยไม้ที่ไม่สามารถผสมข้ามสกุลโดยวิธีปกติได้

จากการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ nrITS ของพ่อแม่พันธุ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I และ *Taq*I พบความหลากหลายของรูปแบบที่เกิดขึ้น โดยพบว่าเอื้องดินใบหมากจะเกิดรูปแบบดีเอ็นเอที่หลากหลายกว่าเอื้องดินใบไผ่ โดยความหลากหลายที่เกิดขึ้นนั้นอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nrITS ใน rDNA ซึ่งเป็นบริเวณระหว่างยีน โดยเกิดจากการแทนที่ การแทรกเข้ามาหรือการขาดหายไปของลำดับดีเอ็นเอ (Venkateswarlu and Nazar, 1991) ซึ่งเอื้องดินใบหมากนั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าเอื้องดินใบไผ่ ดังนั้นในการตรวจสอบลูกผสมโดยใช้บริเวณ nrITS จึงอาจไม่เหมาะสมกับพืชที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมของบริเวณ nrITS สูง อย่างเช่นเอื้องดินใบหมากซึ่งพบว่าภายในต้นเดียวกันก็มีความหลากหลายของลำดับดีเอ็นเอบริเวณนี้เช่นกัน ซึ่งพบรายงานว่าพืชบางชนิดนั้นมีชุดยีน rDNA หลายซ้ำ ซึ่งการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์อาจทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณบริเวณ nrITS จากคนละชุดยีนกัน (Bailey *et al*., 2003) นอกจากนี้อาจ

ใช้ชิ้นส่วนของยีนซึ่งเป็นบริเวณที่ความจำเพาะสูง (specific gene) เช่น 18S rRNA มาช่วยหรือการนำเทคนิค SSCP มาใช้ในการตรวจสอบร่วมก็ได้ ซึ่งก็อาจจะให้ผลชัดเจนขึ้นเมื่อใช้หลายๆ บริเวณและหลายๆ เทคนิคร่วมกัน

4. บทสรุป

จากการตรวจสอบรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี บริเวณ nrITS ของกล้วยไม้ดินทั้งสองชนิด แต่คนละสกุลนี้สามารถทำได้ โดยใช้เอนไซม์ *Taq*I และ *Alu*I ซึ่งสามารถให้รูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างเอื้องดินใบหมากและเอื้องดินใบไผ่ และผลที่ได้จากทั้งสองเอนไซม์นี้ สามารถบอกความเป็นลูกผสมข้ามสกุลที่เกิดจากการถ่ายฝากได้ อีกทั้งยังสามารถคาดคะเนได้ว่าเป็นลูกผสมที่เกิดขึ้นนี้ เกิดจากพ่อและแม่ต้นใดได้อีกด้วย แต่พบว่าเอนไซม์ 5 ชนิด ได้แก่ *Eco*RV, *Hae*III, *Hind*III, *Msp*I และ *Rsa*I ไม่สามารถใช้ในการตรวจสอบลูกผสมข้ามสกุลที่เกิดขึ้นนี้ได้ เนื่องจากไม่สามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอต้นพ่อแม่พันธุ์ได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ พบโอกาสที่จะเกิดลูกผสมข้ามสกุลจากการถ่ายฝากโดยมีเอื้องดินใบไผ่เป็นแม่ คือ 8.33% นอกจากนี้ยังสรุปได้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของบริเวณ nrITS ของเอื้องดินใบหมากมากกว่าเอื้องดินใบไผ่จากจำนวนรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นนั่นเอง

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557 และความอนุเคราะห์สถานที่ รวมถึงอุปกรณ์ในการทำวิจัยจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

6. เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ แดงสวัสดิ์. (2551). การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวหลวง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จีรภา ดาทอง และ วิภา หงษ์ตระกูล. (2555). การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมในบัวประดับและบัวหลวง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50. 48-56.

สุภาพร หนูชนะภัย และ บุญจิต ฐิตาภิวัฒนกุล. (2010). การวิเคราะห์ศักยภาพตลาดกล้วยไม้ส่งออกที่สำคัญของไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Bailey, C.D., Carr, T.G., Harris, S.A., and Hughes, C.E. (2003). Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 435-455.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15.

Kishor, R. and Sharma, GJ. (2008). Multiple shoot induction in *Ascocenda*Kangla—a monopodial hybrid orchid. *Lindleyana*, 21(1): 6-9.

Kishor, R., Devi, HS., and Jeyaram, K. (2009). Induction of multiple shoots in a monopodial orchid hybrid (*Aerides vandarum* Reichb. f *x Vanda stangeana* Reichb. f) using thidiazuron and analysis of their genetic stability. *Plant Cell Tissues Organ Culture*. 97:121-129.

Moa, M., Chitrapan, P., and Alisara, M. (2004). A study on seed germination and seedling development of *Spathoglottis* Bl. Orchids. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 38:141-156.

Venkateswarlu, K., and Nazar, R. (1991). A conserved core structure in the 18–25S rRNA intergenic region from tobacco, *Nicotiana rustica*. *Plant Molecular Biology*, 17: 189-194.