



ใบพายเขาใหญ่และความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการพัฒนาพันธุ์

Cryptocoryne balansae and genetic diversity for crop improvement

เบญจพร สัมฤทธิ์เวช

Benjaporn Somridhivej

สุจิตรา เพชรคง

Sujitra Pechkong

สุรางค์ สุมโนจิตรารักษ์

Surang Sumanojitraporn

ชมพูนุช มรรคทรัพย์

Chompunuch Makkasap

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ

Aquatic Animal Genetics Research and

Development Institute

กรมประมง

Department of Fisheries

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Ministry of Agriculture and Cooperatives

เอกสารวิชาการฉบับที่ ๖ /๒๕๕๓



Technical Paper No. 6 /2010

ใบพายเขาใหญ่และความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการพัฒนาพันธุ์

Cryptocoryne balansae and genetic diversity for crop improvement

เบญจพร สัมฤทธิ์เวช

Benjaporn Somridhivej

สุจิตรา เพชรคง

Sujitra Pechkong

สุรางค์ สุมโนจิตรารักษ์

Surang Sumanojitraporn

ชมพูนุช มรรคทรัพย์

Chompunuch Makkasap

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ

Aquatic Animal Genetics Research and

Development Institute

กรมประมง

Department of Fisheries

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Ministry of Agriculture and Cooperatives

๒๕๕๓

2010

รหัสทะเบียนวิจัยเลขที่ 52-0600-50024

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์	4
วิธีดำเนินการ	5
1 สถานที่และระยะเวลาดำเนินการทดลอง	5
2 การทำเทคนิค AFLP	6
3 การวิเคราะห์ข้อมูล	6
ผลการศึกษา	8
1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยค่าเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึม (P) ของแถบดีเอ็นเอ	9
2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยค่า Shannon–Weaver index (I)	9
3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยค่า Nei's gene diversity	9
4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการ	10
5 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี principal coordinate analysis (PCO)	11
วิจารณ์ผลการศึกษา	11
กิตติกรรมประกาศ	13
เอกสารอ้างอิง	13
ภาคผนวก	17

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบที่แสดงความผันแปร และเปอร์เซ็นต์แถบ ที่แสดงความผันแปรของคู่ไพรเมอร์ที่ถูกคัดเลือก 10 คู่	8
2	เปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึม (P) ของแถบดีเอ็นเอและ Shannon–Weaver index (I) ในใบพายเขาใหญ่ จ.สระบุรี ตราด และ จ.กระบี่	9
3	ค่า Nei's gene diversity เฉลี่ยของใบพายเขาใหญ่ จ.สระบุรี ตราด และ จ.กระบี่	9
4	ระยะห่างทางพันธุกรรมของใบพายเขาใหญ่ จ.สระบุรี ตราด และ จ.กระบี่	10

ตารางผนวกที่

1	ลำดับเบสของอะแดปเตอร์และไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำเทคนิคเอเอฟแอลพี	17
---	---	----

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 พื้นที่เก็บรวบรวมใบพายเขาใหญ่ (1 ต.มวกเหล็ก อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี 2 ต.เขา	5
2 ทอง อ.เมือง จ.กระบี่ และ 3 ต.เขาระกำ อ.เมือง จ.ตราด)	
3 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยวิธี UPGMA และค่า bootstrapping	10
ของใบพายเขาใหญ่ จ.สระบุรี ตราด และ จ.กระบี่	
แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี principal coordinate analysis	11
ของใบพายเขาใหญ่ จ.สระบุรี ตราด และ จ.กระบี่	
 ภาพผนวกที่	
1 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของคู่ไพรเมอร์ E-ACT/M-ACC E-AAC/M-ACC และ E-ACA/M-ACC ในตัวอย่างใบพายอัลบิดำจาก จ.กระบี่ ตราด และ จ.สระบุรี (bp =	18
หน่วยขนาดของแถบดีเอ็นเอ (base pair) $\phi XHinfI$ = แถบดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน)	
2 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของคู่ไพรเมอร์ E-ATA/M-AGG E-ATA/M-AAC และ E-AGG/M-CAA ในตัวอย่างใบพายอัลบิดำจาก จ.กระบี่ ตราด และ จ.สระบุรี (bp =	18
หน่วยขนาดของแถบดีเอ็นเอ (base pair) $\phi XHinfI$ = แถบดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน)	
3 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของคู่ไพรเมอร์ E-AGG/M-ATT และ E-AAG/M-ACC ใน	19
ตัวอย่างใบพายอัลบิดำจาก จ.กระบี่ ตราด และ จ.สระบุรี (bp = หน่วยขนาดของ	
แถบดีเอ็นเอ (base pair) $\phi XHinfI$ = แถบดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน)	
4 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของคู่ไพรเมอร์ E-ACA/M-ATT และ E-CAG/M-TAC ใน	19
ตัวอย่างใบพายอัลบิดำจาก จ.กระบี่ ตราด และ จ.สระบุรี (bp = หน่วยขนาดของ	
แถบดีเอ็นเอ (base pair) $\phi XHinfI$ = แถบดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน)	

ใบพายเขาใหญ่และความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์

เบญจพร สัมฤทธิ์เวช² อัจจิรา เพชรคง^{1*} สุรางค์ สุมโนจิตรารณ¹ ชมพูนุช มรรคทรัพย์¹

¹สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ

²สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด

บทคัดย่อ

ศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของใบพายเขาใหญ่ (*Cryptocoryne balansae*) จาก 3 แหล่ง คือ จ.สระบุรี ตราด และ จ.กระบี่ แหล่งละ 10 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดย ใช้ 10 คู่ไพรเมอร์ ได้แถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 261 แถบ โดยมีสัดส่วนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความผันแปร 61.14% ผลจากการวิเคราะห์ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยค่า (1) เปอร์เซ็นต์โพลิโมอร์ฟิซึม (P) ที่ระดับความมั่นใจ 95% มีค่า 27.20–39.46 (2) ค่า Shannon–Weaver index (I) มีค่า 0.2333–0.3352 (3) ค่า Nei's gene diversity มีค่าความหลากหลายระหว่างประชากร (H_T) 0.1793±0.0351 ค่าความหลากหลายภายในประชากร (H_S) 0.1116±0.0160 และค่าสัดส่วนความหลากหลายของยีน (G_{ST}) 0.3581 (4) ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่า 0.0790 (จ.ตราด และ จ.กระบี่) ถึง 0.1349 (จ.สระบุรี และ จ.ตราด) และ (5) แผนภูมิการกระจายตัวด้วยวิธี principal coordinate analysis (PCO) แสดงให้เห็นว่าใบพายเขาใหญ่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างแหล่ง จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำใบพายในแต่ละแหล่งมาวางแผนปรับปรุงพัฒนาพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ: ใบพายเขาใหญ่ เทคนิคเอเอฟแอลพี ความหลากหลายทางพันธุกรรม

*ผู้รับผิดชอบ: 39 หมู่ 1 ต.คลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120 โทร. 0 2904 7604

e-mail: veview@hotmail.com

***Cryptocoryne balansae* and genetic diversity for crop improvement**

Benjapron Somridhivej² Sujitra Pechkong^{1*} Surang Sumnojitraporn¹ Chompunuch Makkasap¹

¹Aquatic Animal Genetics Research and Development Institute

²Inland Fisheries Research and Development Bureau

Abstract

Genetic diversity in *Cryptocoryne balansae* was studied. Samples (n=10) were collected at 3 locations, Saraburi, Trat and Krabi province. DNA was extracted from samples and analysed by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) technique. Ten primer combinations produced 261 DNA bands and 61.14% were polymorphic bands. Result from (1) percent polymorphism (P) at 95% confidence level was 27.20–39.46 (2) Shannon–Weaver diversity index was 0.2333–0.3352 (3) Nei's gene diversity values including diversity among population (H_T) (0.1793 ± 0.0351) was significantly higher than diversity within population (H_S) (0.1116 ± 0.0160) and high level of population differentiation value (G_{st}) (0.3581) (4) Genetic distance were 0.0790 (Trat–Krabi) to 0.1349 (Saraburi–Trat) (5) Cluster analysis by principal component analysis (PCO) indicated samples were grouped respected to their location. These results indicate *C. balansae* in 3 locations were genetically different. These information which gathered from AFLP were important and will have feasibility for conservation and genetic improvement in the further.

Key words: *Cryptocoryne balansae*, AFLP, genetic diversity

* Corresponding author: 39 Moo 1, Khlong 5, Khlong Luang, Pathum Thani, 12120, Tel. 0 2904 7604
e-mail: veview@hotmail.com

คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายของทรัพยากรพรรณไม้น้ำสูง เนื่องจากเป็นแหล่งกำเนิดของไม้น้ำที่สวยงามหลายชนิด ทรัพยากรพรรณไม้น้ำในธรรมชาติเหล่านี้ได้ก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมหาศาลต่ออุตสาหกรรมการผลิตและเพาะเลี้ยงพรรณไม้น้ำเพื่อการส่งออกที่ทำรายได้สูงให้แก่ประเทศ ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการพัฒนาการผลิตพรรณไม้น้ำเพื่อให้สามารถแข่งขันในตลาดโลกได้ ส่งผลให้มีการเก็บพรรณไม้น้ำที่มีอยู่ตามธรรมชาติในแหล่งต่าง ๆ มาใช้เป็นต้นพันธุ์ในการผลิตเพื่อการค้าและการส่งออกเพิ่มมากขึ้น ซึ่งการใช้ทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่นั้นจะต้องมีการจัดการและวางแผนในการใช้ทรัพยากรให้มีประสิทธิภาพ เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดอย่างยั่งยืน โดยในเบื้องต้นจะต้องมีความรู้และความเข้าใจพื้นฐานเกี่ยวกับทรัพยากรนั้นๆ โดยเฉพาะลักษณะทางพันธุกรรม หรือความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของประชากรในธรรมชาติ ซึ่งความรู้ดังกล่าวนี้จะสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อการพัฒนา และเลือกวิธีในการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไปในอนาคต

ความแตกต่างทางพันธุกรรม (Genetic differentiation) โดยเฉพาะความแตกต่างในระดับอนุพันธุศาสตร์ (Molecular genetics) เช่น ดีเอ็นเอและโปรตีนของพรรณไม้น้ำในแต่ละชนิด หรือแม้แต่ภายในชนิดเดียวกันแต่มีแหล่งกำเนิดในพื้นที่ต่างกัน ทำให้พรรณไม้น้ำมีลักษณะที่สวยงามและมีการแสดงออกที่แตกต่างกันไป ความแตกต่างทางพันธุกรรมเป็นจุดเริ่มต้นที่ทำให้เกิดความหลากหลายของสายพันธุ์ต่างๆ อันเป็นรากฐานมาจากการปรับตัวให้เข้ากับสภาพของสิ่งแวดล้อมนั้นๆ เพื่อให้สามารถมีชีวิตรอดขยายพันธุ์ต่อไปได้ ความหลากหลายทางสายพันธุ์ของพรรณไม้น้ำก่อให้เกิดประโยชน์ในด้านต่างๆ แก่สิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะมนุษย์ เช่น นำสายพันธุ์ที่แตกต่างกันมาใช้ในการปรับปรุงเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ดีขึ้น มีลักษณะตรงตามความต้องการ หรือมีลักษณะเหมาะสมในแต่ละสภาพแวดล้อม ในขณะที่เดียวกันก็ต้องไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อทรัพยากรพรรณไม้น้ำในธรรมชาติที่อาจนำไปสู่การสูญพันธุ์ในอนาคตได้ การวิจัยเพื่อศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของพรรณไม้น้ำที่มีอยู่ในธรรมชาติ โดยเฉพาะที่เป็นพันธุ์ดั้งเดิม (native species) จึงเป็นสิ่งที่ควรคำนึงถึงและริบดำเนินการเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลพื้นฐานที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์พรรณไม้น้ำในการเพิ่มศักยภาพการผลิตเชิงพาณิชย์ของประเทศในอนาคต

ไม้น้ำใบพายเขาใหญ่ (*Cryptocoryne balansae*) เป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมในประเทศไทย จัดอยู่ในวงศ์ Araceae สกุล *Cryptocoryne* (Unnikrishnan, 2002) ใบพายเขาใหญ่เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20-28 องศาเซลเซียส pH 6-8 โดยเฉพาะในบริเวณที่มีปริมาณความเข้มแสงปานกลาง พบว่าใบพายเขาใหญ่นี้สามารถสูงได้ถึง 40 ซม. อรุณี และคณะ (2547) รายงานว่า ใบพายเขาใหญ่ชอบขึ้นในที่ดินปนทราย ในแหล่งน้ำที่ไหลเอื่อย เช่น ลำธาร และน้ำมีความกระด้างเล็กน้อย ใบเป็นใบเดี่ยวสีเขียวสด มีก้านใบสั้น (10-15 ซม.) กว้างแผ่นใบ (20-30 ซม.) ซึ่งมีลักษณะเรียวยาว คล้ายเทป แผ่นใบเป็นคลื่นเล็กน้อย และมีที่สวยงาม นิยมนำมาเลี้ยงประดับในตู้ปลา จากการสำรวจใบพายเขาใหญ่ในธรรมชาติพบว่า พืชชนิดนี้สามารถพบได้ในหลายพื้นที่ของประเทศไทย ทั้งทางภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ (อรุณี และณัฐกร,

2549) นอกจากนี้พรรณไม้น้ำใบพายเขาใหญ่สามารถนำมาขยายพันธุ์ได้โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ด้วยอาหาร MS ที่เติม NAA 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ BA 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (มณีรัตน์, 2546) ซึ่งจัดว่าเป็นไม้น้ำที่มีศักยภาพในการผลิตอีกชนิดหนึ่ง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานผลการศึกษาทางพันธุศาสตร์ในกลุ่มประชากรใบพายเขาใหญ่ในประเทศไทย ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อการอนุรักษ์ให้ใบพายเขาใหญ่มีความหลากหลาย ไม่มีการปนเปื้อนของสายพันธุ์ในแต่ละกลุ่มประชากร และใช้เป็นข้อมูลในการเลือกแนวทางที่เหมาะสมในการปรับปรุงสายพันธุ์ในอนาคต

การศึกษาโครงสร้างพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์พืชต้องอาศัยข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในชนิด ความหลากหลายหรือความผันแปรในระดับโมเลกุลในระดับโปรตีนและดีเอ็นเอจะเป็นข้อมูลที่สำคัญในการศึกษา ในปัจจุบันดีเอ็นเอเครื่องหมายที่นำมาใช้หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพได้แก่ ดีเอ็นเอเครื่องหมายจากเทคนิค AFLP ซึ่งมีข้อดีหลายอย่างเช่น ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับเทคนิค RFLP ที่ต้องใช้ดีเอ็นเอในปริมาณมาก ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อนำไปสังเคราะห์ไพรเมอร์ AFLP เป็นเครื่องหมายแบบสุ่มที่กระจายทั่วจีโนมตัวอย่าง จึงสามารถศึกษาวิเคราะห์จีโนมได้หลายตำแหน่งจากการทำปฏิกิริยาเพียงครั้งเดียว (multilocus) นอกจากนี้ผลการทำ AFLP ยังมีความคงตัวและสามารถทำซ้ำได้ เทคนิค AFLP จึงมีประโยชน์ในการใช้วิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมตั้งแต่ระดับชนิด สายพันธุ์ ประชากร จนถึงระดับประชากรย่อย (Vos *et al.*, 1995; Larson *et al.*, 2004)

ได้มีการนำ AFLP มาใช้ในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ของพืชและสัตว์รวมถึงพรรณไม้น้ำหลายชนิด เช่น ทรัพยากรไม้ป่าในธรรมชาติ (สุจิตรา, 2547) กล้วยไม้รองเท้านารี (จักรพันธ์ และสุจิตรา, 2547) การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในดิลิน้ำ (Whittall *et al.*, 2004) และยังมีรายงานการใช้ AFLP ในการศึกษาถึงผลของการให้รังสี ^{12}C ในกล้วยไม้ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (Bae *et al.*, 2004) และในพืชน้ำสกุล *Cryptocoryne* นั้นมีรายงานในชนิด *C. x purpurea* โดยใช้เทคนิค Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในกลุ่มเดียวกับเทคนิค AFLP มาศึกษาไม้น้ำชนิดนี้ 2 แหล่งในประเทศมาเลเซีย โดยได้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความหลากหลาย 86% เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbour-joining และวิธี principal coordinate (PCO) พบว่าไม้น้ำสองกลุ่มแยกกันอย่างชัดเจนตามแหล่งที่เก็บ และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธี analysis of molecular variance (amova) พบว่า 67% ของความผันแปรทางพันธุกรรมมาจากความผันแปรระหว่างประชากร ขณะที่ส่วนที่เหลือ (33%) เกิดจากความผันแปรภายในประชากร (Othman *et al.*, 2007)

ดังนั้น การศึกษานี้จึงได้นำเทคนิค AFLP มาใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของใบพายเขาใหญ่ ซึ่งจะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานและองค์ความรู้ของลักษณะทางพันธุกรรมของใบพายเขาใหญ่ในธรรมชาติของประเทศไทย เพื่อนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาพันธุ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในเชิงพาณิชย์ และการบริหารจัดการทรัพยากรใบพายเขาใหญ่เพื่อการอนุรักษ์ต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของใบพายเขาใหญ่ในประเทศไทย

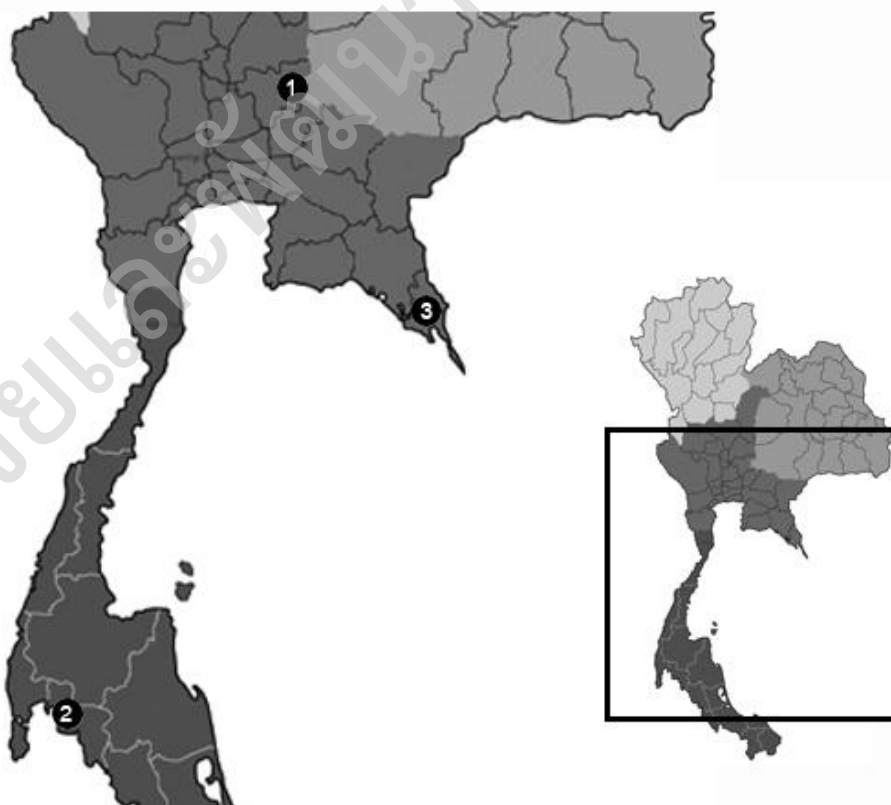
วิธีดำเนินการ

1. การเก็บตัวอย่างและสกัดดีเอ็นเอ

เก็บรวบรวมพรรณไม้ใบพายเขาใหญ่จากแหล่งน้ำธรรมชาติ 3 แห่งๆ ละ 10 ตัวอย่าง ตามภาพที่ 1 คือ

- น้ำตกเจ็ดสาวน้อย ต.มวกเหล็ก อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี
- สระธารทิพย์ บ้านในสระ ต.เขาทอง อ.เมือง จ.กระบี่
- อ่างเก็บน้ำเขาระกำ หมู่ 10 ต.เขาระกำ อ.เมือง จ.ตราด

สกัดดีเอ็นเอโดยนำใบสดมาบดให้ละเอียดในโถงบดยาที่เติมในไตรเจนเหลว สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสำเร็จรูป DNAeasy plant mini kit (Qiagen, U.S.A.) และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดปริมาณและคุณภาพโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ตามวิธีการของ วัฒนาลัย (2536)



ภาพที่ 1 พื้นที่เก็บรวบรวมใบพายเขาใหญ่ (1 ต.มวกเหล็ก อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี 2 ต.เขาทอง อ.เมือง จ.กระบี่ และ 3 ต.เขาระกำ อ.เมือง จ.ตราด)

2. การทำเทคนิค AFLP

นำตัวอย่างดีเอ็นเอใบพายเขาใหญ่ที่สกัดได้มาทำเทคนิค AFLP ตามวิธีที่ประยุกต์จาก Vos *et al.* (1995) มีวิธีการโดยสรุปดังต่อไปนี้

2.1 นำตัวอย่างดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) 2 ชนิด คือ *EcoRI* และ *MseI* พร้อมทั้งเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดที่ปลายสองข้างด้วย adapter 2 เส้น คือ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter (ลำดับเบสอยู่ในภาคผนวก) โดยทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้เอนไซม์ T4 ligase

2.2 นำไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ (pre-selective primers) จำนวน 2 เส้นคือ *EcoRI*-A และ *MseI*-C (ลำดับเบสอยู่ในภาคผนวก) ซึ่งมีเบสเพิ่มเข้าที่ปลายด้าน 3' ของไพรเมอร์จำนวน 1 เบส เพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอบางส่วน

2.3 นำไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ (selective primers) (ลำดับเบสอยู่ในภาคผนวก) ซึ่งมีเบสเพิ่มเข้าที่ปลายด้าน 3' ของไพรเมอร์เพิ่มขึ้นจำนวน 3 เบส เพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยเฉพาะเจาะจง

2.4 นำผลผลิตชิ้นดีเอ็นเอไปแยกขนาดโดยทำ electrophoresis ใน denaturing polyacrylamide gel และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver staining

โดยเบื้องต้นจะคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ selective ที่เหมาะสม โดยใช้ชุดไพรเมอร์ 2 ชุด ชุดละ 8 ไพรเมอร์ เมื่อนำมาจับคู่ไพรเมอร์ (primer combination) แบบพบกันหมด จะได้คู่ไพรเมอร์สำหรับคัดเลือกรวมทั้งสิ้น 64 คู่ นำตัวอย่างดีเอ็นเอมาทดสอบกับคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด หลังจากนั้นจะคัดเฉพาะคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลของรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเหมาะสมและแสดงความผันแปรของแถบดีเอ็นเอระหว่างตัวอย่างหรือเกิด polymorphism มาใช้ในตัวอย่างดีเอ็นเอของใบพายเขาใหญ่จาก 3 แหล่งต่อไป

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

เนื่องจากการแสดงออกของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค AFLP เป็นประเภทข่มสมบูรณ์ (dominant marker) นั่นคือการปรากฏแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งใดๆ คืออัลลีล AA หรือ Aa และการไม่ปรากฏแถบ ณ ตำแหน่งนั้น คืออัลลีล aa แต่ต้องใช้วิธีการที่ยุ่งยากในแยกระหว่างอัลลีล AA และ Aa โดยวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังไม่สามารถหา null allele หรืออัลลีล aa ได้โดยตรง เนื่องจากการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย จึงทำให้เครื่องหมายประเภทนี้มีความแม่นยำน้อยกว่าเครื่องหมายร่วม (co-dominant marker) (De Wolf *et al.*, 1998) ดังนั้นการศึกษาค้างนี้จะใช้วิธีคำนวณความถี่อัลลีลโดยทางอ้อมตามวิธีการของ Lynch and Milligan (1994) แล้วจึงนำไปคำนวณความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมต่อไป

แปรข้อมูลแถบดีเอ็นเอโดยให้เครื่องหมาย “1” แทนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ และ “0” แทนแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏในตำแหน่งของแถวเดียวกัน นำข้อมูลการปรากฏและไม่ปรากฏแถบที่ทุกตำแหน่งของตัวอย่างใบพายเขาใหญ่จากทั้ง 3 แหล่ง ไปวิเคราะห์ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยคำนวณค่าทางพันธุกรรมต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยค่าเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึม (P) ของแถบดีเอ็นเอ

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แสดงความผันแปร (polymorphism) ภายในและระหว่างแหล่ง ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 95% ตามวิธีการของ Hawksworth (1995) โดยใช้โปรแกรม TFPGA เวอร์ชัน 1.3 (Miller, 1997) คำนวณค่า P ของใบพายเขาใหญ่แต่ละแหล่งจากสูตร

$$P = 100 (p/n)$$

(p = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความผันแปร n = จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด)

3.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยค่า Shannon–Weaver index (I) (Shannon, 1948) โดยใช้โปรแกรม POPGENE 32 เวอร์ชัน 1.31 (Yeh and Yang, 1999) คำนวณค่า I ของใบพายเขาใหญ่แต่ละแหล่งจากสูตร

$$I = -\sum p_i \log_2 p_i$$

(p_i = ความถี่ของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ณ ตำแหน่งที่ i)

3.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยค่าความหลากหลายของยีน (Nei's gene diversity) โดยใช้โปรแกรม POPGENE 32 เวอร์ชัน 1.31 (Yeh and Yang, 1999) ตามวิธีการของ Nei (1973) โดยคำนวณความหลากหลายของยีนภายในประชากร (H_S) และความหลากหลายของยีนรวมจากทุกประชากร (H_T) และคำนวณสัดส่วนความหลากหลายของยีนระหว่างกลุ่ม (G_{st}) จากสูตร

$$G_{st} = [(H_T - H_S)/H_T]$$

3.4 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการ

คำนวณระยะห่างทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม TFPGA เวอร์ชัน 1.3 (Miller, 1997) โดยเริ่มต้นจากการคำนวณค่าดัชนีความคล้ายคลึงในแต่ละแหล่งฯ (similarity index, S_{xy}) ก่อน โดยเปรียบเทียบตัวอย่างใบพายเขาใหญ่เป็นคู่ๆ ตามวิธีการของ Nei (1978) จากสูตร

$$S_{xy} = 2n_{xy}/(n_x + n_y)$$

โดย n_x และ n_y คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดในตัวอย่าง x และ y และ n_{xy} คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดทั้งในตัวอย่าง x และ y

แล้วจึงทำการเฉลี่ยค่าที่ได้ภายในแต่ละแหล่งฯ (average similarity index, S) และเปรียบเทียบระหว่างคู่แหล่งฯ (S_{ij}) หลังจากนั้นคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่ง (D_{ij}) โดยใช้วิธีการของ Lynch (1990) มาแปลงค่าดัชนีความคล้ายคลึงระหว่างแหล่งฯ เป็นค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างแหล่งฯ จากสูตร

$$D_{ij} = 1 - S_{ij}$$

นำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยวิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means (UPGMA) ตามวิธีการของ Sneath and Sokal (1973) และแสดงค่าสัดส่วนการทำซ้ำโดยวิธี bootstrapping จากการจัดเรียงข้อมูลใหม่จำนวน 1,000 ครั้ง ตามวิธีการของ (felsenstein, 1985) โดยใช้โปรแกรม TFPGA เวอร์ชัน 1.3 (Miller, 1997)

3.5 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี principal coordinate analysis (PCO) โดยนำข้อมูลความผันแปรของแถบดีเอ็นเอจากทุกตำแหน่งไปวิเคราะห์ด้วยวิธี PCO ซึ่งจะทำการรวมความผันแปรจากแถบดีเอ็นเอทุกตำแหน่งมารวมกันจนได้ข้อมูลความผันแปรลดลง แล้วจึงเลือกข้อมูลที่ถูกรวบรวมจากแถบดีเอ็นเอที่มีเปอร์เซ็นต์มากที่สุด 2 ข้อมูล ไปสร้างแผนภูมิการกระจายตัวของตัวอย่างแบบ 2 มิติ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpC เวอร์ชัน 2.2 (Rohlf, 2000)

ผลการศึกษา

จากการนำตัวอย่างดีเอ็นเอใบพายเขาใหญ่ไปทำเทคนิค AFLP เพื่อคัดเลือกว่าจำนวน 64 คู่ พบว่าคู่ไพรเมอร์ 10 คู่ ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอในขนาดที่เหมาะสมและแสดงความผันแปรของรูปแบบแถบระหว่างตัวอย่าง ตามตารางที่ 1 จึงได้นำคู่ไพรเมอร์ทั้ง 10 คู่ไปทำใช้กับตัวอย่างใบพายเขาใหญ่ทั้ง 3 แห่ง ได้แถบดีเอ็นเอตามภาพในภาคผนวก และได้ผลการศึกษาดังต่อไปนี้

ตารางที่ 1 จำนวนแถบดีเอ็นเอ จำนวนแถบที่แสดงความผันแปร และเปอร์เซ็นต์แถบที่แสดงความผันแปรของคู่ไพรเมอร์ที่ถูกคัดเลือก 10 คู่

คู่ไพรเมอร์*	จำนวน แถบดีเอ็นเอรวม	ขนาด (bp)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ ที่แสดงความ ผันแปร	% แถบดีเอ็นเอ ที่แสดงความ ผันแปร
E-AAC/M-ACC	26	90-400	17	65.38
E-AAG/M-AAC	24	70-550	10	41.67
E-AAG/M-CAA	40	100-560	15	37.50
E-ACA/M-ACC	24	100-600	16	66.67
E-ACT/M-ACC	19	120-530	15	78.95
E-ATA/M-AAC	22	70-480	14	63.64
E-AGG/M-ATT	24	110-500	11	45.83
E-ACA/M-ATT	23	100-550	16	69.57
E-ATA/M-AGG	29	70-550	19	65.52
E-CAG/M-TAC	30	100-650	23	76.67
รวม	261		156	
เฉลี่ย±S.D.	26.10±5.84		15.60±3.72	61.14±14.44

*ลำดับเบสของไพรเมอร์อยู่ในภาคผนวก

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยค่าเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึม (P) ของแถบดีเอ็นเอ

ค่า P ที่ระดับความมั่นใจ 95% ของแถบดีเอ็นเอใบพายเขาใหญ่จาก 3 แหล่ง แสดงตามตารางที่ 2 โดยใบพายเขาใหญ่จาก จ.สระบุรี ตราด และ จ.กระบี่ มีค่า 39.46 27.20 และ 32.18 ตามลำดับ

2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยค่า Shannon–Weaver index (I)

ค่า I แสดงตามตารางที่ 2 โดยใบพายเขาใหญ่ จ.สระบุรี ตราด และ จ.กระบี่ มีค่า 0.3352 0.2333 และ 0.2890 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึม (P) ของแถบดีเอ็นเอและ Shannon–Weaver index (I) ในใบพายเขาใหญ่ จ.สระบุรี ตราด และ จ.กระบี่

	P (95%)	I
จ. สระบุรี	39.46	0.3352
จ. ตราด	27.20	0.2333
จ. กระบี่	32.18	0.2890

3. ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยค่า Nei's gene diversity

ค่า Nei's gene diversity คือ H_T , H_S และ G_{st} โดยเฉลี่ยจากข้อมูลแถบดีเอ็นเอ 261 ตำแหน่งจากใบพายเขาใหญ่ทั้ง 3 แหล่ง แสดงตามตารางที่ 3 จากการวิเคราะห์สถิติพบว่า H_T มีค่ามากกว่า H_S อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$)

ตารางที่ 3 ค่า Nei's gene diversity เฉลี่ยของใบพายเขาใหญ่ จ.สระบุรี ตราด และ จ.กระบี่

H_T	H_S	G_{st}
0.1739 ± 0.0351^a	0.1116 ± 0.0160^b	0.3581

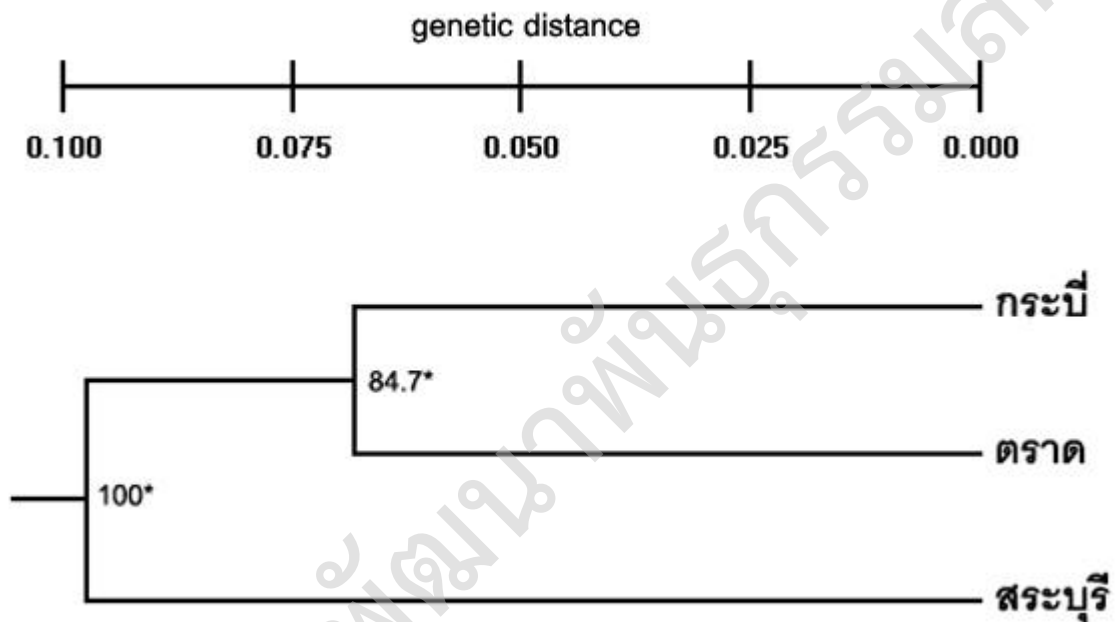
อักษรกำกับที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.01$)

4. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการ

ระยะห่างทางพันธุกรรมโดยการเปรียบเทียบเป็นคู่จังหวัด แสดงตามตารางที่ 4 พบว่าใบพายเขาใหญ่จาก 3 จังหวัด มีระยะห่างทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.0790 (จ. ตราด และ จ. กระบี่) ถึง 0.1349 (จ.สระบุรี และ จ.ตราด) และนำระยะห่างทางพันธุกรรมมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการด้วยวิธี UPGMA และกำกับค่า bootstrapping ตามภาพที่ 3

ตารางที่ 4 ระยะห่างทางพันธุกรรมของใบพายเขาใหญ่ จ.สระบุรี ตราด และ จ.กระบี่

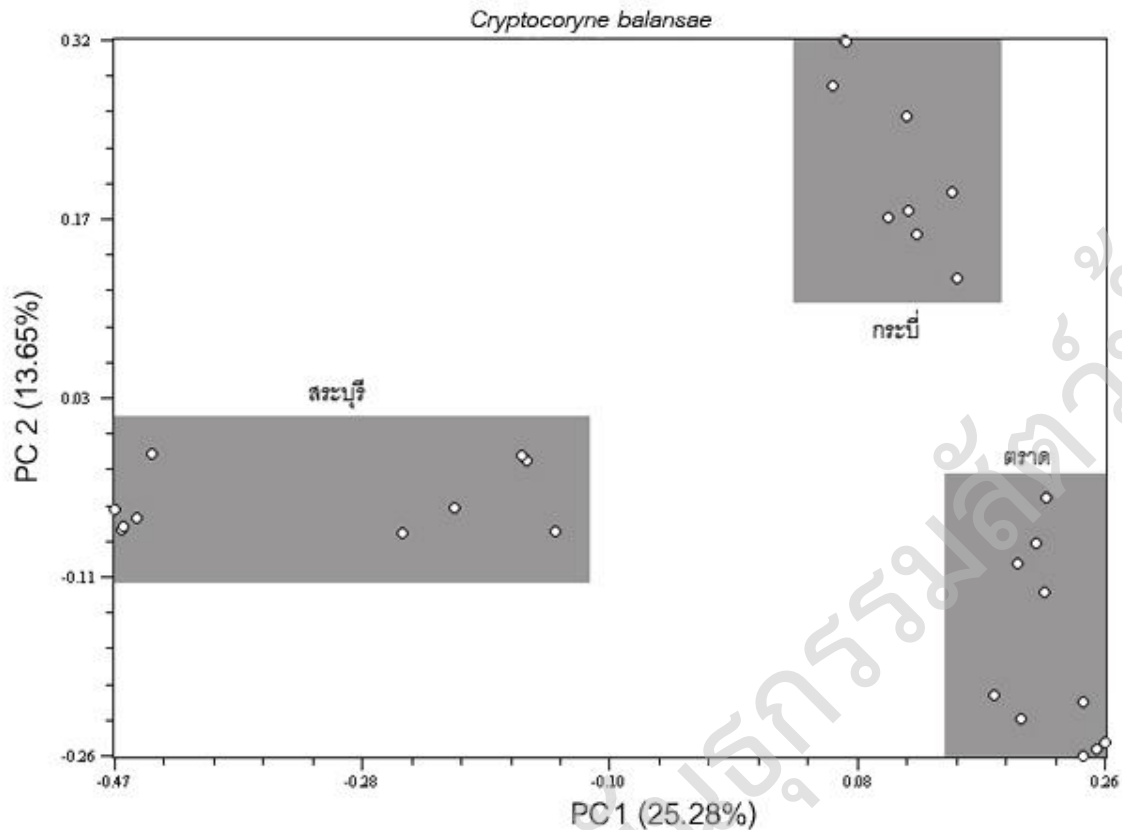
	จ.สระบุรี	จ.ตราด	จ.กระบี่
จ.สระบุรี	—	0.1349	0.1000
จ.ตราด		—	0.0790
จ.กระบี่			—



ภาพที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยวิธี UPGMA และค่า bootstrapping ของใบพายเขาใหญ่ จ.สระบุรี ตราด และ จ.กระบี่ (*ค่า bootstrapping)

5. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี principal coordinate analysis (PCO)

จากการนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอจำนวนรวม 261 ตำแหน่งไปวิเคราะห์ด้วยวิธี PCO และสร้างแผนภูมิการกระจายของตัวอย่างได้ตามภาพที่ 3 โดยแผนภูมิแสดงความผันแปรรวม 38.93% ซึ่งแยกแ่งแกนนอน (PC 1) 25.28% และแกนตั้ง (PC 2) 13.65%พบว่า จากแผนภูมิแสดงให้เห็นว่าใบพายเขาใหญ่จากทั้ง 3 แหล่งมีการรวมกลุ่มตามแหล่ง และไม่มีตัวอย่างใดอยู่ตำแหน่งทับซ้อนกันระหว่างแหล่ง



ภาพที่ 3 แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี principal coordinate analysis ของใบพาย
เขาใหญ่ จ.สระบุรี ตราด และ จ.กระบี่

วิจารณ์ผลการศึกษา

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของใบพายเขาใหญ่ด้วยเทคนิค AFLP

จากการทำเทคนิค AFLP ในใบพายเขาใหญ่ด้วย 10 คู่ไพรเมอร์ ได้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 261 แถบ โดยเป็นแถบที่แสดงความผันแปรจำนวน 156 แถบ หรือมีสัดส่วนแถบที่แสดงความผันแปรโดยเฉลี่ย $61.14 \pm 14.44\%$ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ Coulibaly et al. (2002) ซึ่งทำเทคนิค AFLP ในพืช cowpea (*Vigna unguiculata*) ซึ่งได้สัดส่วนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความผันแปร 61.0% มีค่ามากกว่ารายงานของ Palacios et al. (1999), Wang et al. (2005) และ Dessalegn et al. (2008) ที่ทำในพืช sea lavender (*Limonium dufourii*), Pawpaw (*Asimina triloba*) และ Ethiopian Arabica coffee (*Coffea arabica*) ซึ่งมีค่า 20.2, 27.6 และ 30.9% ตามลำดับ และมีค่าน้อยกว่ารายงานของ Miyashita et al. (1999), Cardoso et al. (2000), Huh and Ohnishi (2002), Martinez et al. (2003), Ubi et al. (2003), Othman et al. (2007) และ Sharma et al. (2008) ที่ทำในพืชกลุ่มปาล์ม (*Euterpe edulis*), Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), wild radish (*Raphanus sativus*), Argentine grapevine (*Vitis vinifera*), Rhodes grass (*Chloris gayana*), ไม้หน้า *Cryptocoryne* $\times$ *purpurea* และเฟือก (*Colocasia esculenta*) ซึ่งมีค่า 79.2, 92.07, 77.4, 73.0, 84.0, 86.0% และ 73.3% ตามลำดับ

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของใบพายเขาใหญ่จากค่าเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึม (P) และ Shannon–Weaver index (I) จาก 3 แหล่ง พบว่ามีความสัมพันธ์กันโดยตรง ($r=0.9738$) กล่าวคือใบพายฯ จ. ตราด ซึ่งมีค่า P ต่ำสุด (27.20) จะมีค่า I ต่ำสุด (0.2333) ในขณะเดียวกัน ใบพายฯ จ. สระบุรี ซึ่งมีค่า P สูงสุด (39.46) ก็จะมีค่า I สูงสุด (0.3352) ค่า P โดยเฉลี่ยของใบพายเขาใหญ่ (32.95) มีค่าใกล้เคียงกับพืชชนิด *Lisianthus peduncularis* และ Yarrow (*Achillea millefolium*) ตามรายงานของ Sytsma and Schaal (1985) และ Purdy and Bayer (1996) ที่มีค่า 33.3 และ 31.6 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามหากพิจารณาเฉพาะค่า P นั้น ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าใบพายเขาใหญ่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับใด ซึ่งเมื่อพิจารณาร่วมกับ ค่า Nei's gene diversity (H_T , H_S และ G_{ST}) จากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าค่า H_T (0.1739) ซึ่งเป็นค่าความหลากหลายระหว่างใบพายฯ 3 แหล่ง มีค่ามากกว่า H_S (0.1116) ที่เป็นค่าความหลากหลายภายในแหล่งอย่าง มีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) และค่า G_{ST} (0.3581) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Harada et al. (2005) ในพืชชาเลน (*Kandelia obovata*) ซึ่งมีค่า G_{ST} ที่ 0.265 และสรุปว่าพืชชนิดนี้แต่ละแหล่งมีความแตกต่างทาง พันธุกรรม ดังนั้น จึงเป็นการยืนยันว่าใบพายเขาใหญ่ทั้ง 3 แหล่งมีความแตกต่างทางพันธุกรรม

2. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของใบพายเขาใหญ่

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และแผนภูมิ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงวิวัฒนาการ และแผนภูมิการกระจายตัวโดยวิธี PCO ใบพายฯ 3 แหล่ง มี ระยะห่างทางพันธุกรรม 0.0790–0.1349 โดยมีส่วนต่างที่ 0.0559 ซึ่งถือว่ามีความสัมพันธ์ที่ค่อนข้างแคบ โดยมีค่าใกล้เคียงกับรายงานของ ปิยะดา และจุฑามาศ (2551) ที่ศึกษาในถั่วเหลือง (ส่วนต่าง 0.0270) และมี ค่าต่ำกว่ารายงานของ Cardoso et al. (2000) (ส่วนต่าง 0.160) และ Coulibaly et al. (2002) (ส่วนต่าง 0.2179) ที่ศึกษาในพืชกลุ่มปาล์ม (*Euterpe edulis*) และ cowpea (*Vigna unguiculata*) ตามลำดับ ฐานพันธุกรรมที่ ค่อนข้างแคบของใบพายเขาใหญ่อาจเป็นข้อจำกัดในการปรับปรุงพันธุ์ และเมื่อนำค่า Nei's gene diversity มาพิจารณาร่วมกับแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยวิธี UPGMA และแผนภูมิการกระจายตัวโดยวิธี PCO แสดงให้เห็นว่าใบพายฯ ทั้ง 3 กลุ่มแยกออกจากกันอย่างชัดเจน

จากการวิเคราะห์ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของใบพายเขาใหญ่ซึ่ง แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างแหล่ง มีโครงสร้างทางพันธุกรรมเฉพาะเจาะจงกับ แหล่งอาศัยแต่มีฐานพันธุกรรมที่ค่อนข้างแคบซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดในการปรับปรุงพันธุ์ใบพายเขาใหญ่ อย่างไรก็ตาม ใบพายเขาใหญ่ยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับแหล่ง จึงยังมีความเป็นไปได้ในการ ปรับปรุงพันธุ์หากมีการศึกษาถึงลักษณะภายนอกที่แตกต่างของใบพายเขาใหญ่แต่ละแหล่ง เพื่อนำข้อมูลที่ได้ มาสนธิร่วมกับข้อมูลด้านพันธุกรรมเพื่อวางแผนปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ดำเนินการภายใต้งบประมาณปกติของกรมประมง ในส่วนกิจกรรมพัฒนาการเพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์ รหัสทะเบียนวิจัยที่ 52-0600-50024

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณคณะกรรมการวิชาการของสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ ที่กรุณาตรวจแก้ไขต้นฉบับ

สุดท้ายขอขอบคุณข้าราชการและพนักงานราชการของกลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพพรรณไม้น้ำที่ช่วยให้งานวิจัยเรื่องนี้สำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- จักรพันธ์ วณิชกุล และ สุจิตรา จางตระกูล. 2547. การพัฒนาเทคนิคเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) เพื่อการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphiopedilum exul* (Ridl.) Rolfe). การประชุมเชิงปฏิบัติการ “ความหลากหลายทางชีวภาพ งานวิจัยจากอดีตสู่อนาคต”. หน้า 158-165.
- มณีนีรัตน์ หวังวิญญ์กิจ. 2546. การขยายพันธุ์ใบพายเขาใหญ่โดยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อ. บทคัดย่อการประชุมวิชาการกรมประมงประจำปี 2546. กรมประมง. กรุงเทพฯ.
- ปิยะดา ทิพย์พ่อง และ จุฑามาศ ตรงชื่น. 2551. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วฝักยาวไร้ค้าง ถั่วฝักยาว ถั่วเขียว และถั่วเหลือง. รายงานการวิจัย รหัสโครงการ SUT3-302-46-24-13. สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 149 หน้า
- สุจิตรา จางตระกูล. 2547. การประยุกต์ใช้ Molecular Markers เพื่อใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ป่าในประเทศไทย. การประชุมเชิงปฏิบัติการ “ความหลากหลายทางชีวภาพ งานวิจัยจากอดีตสู่อนาคต”. หน้า 146-157.
- วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2536. การวัดปริมาณและคุณภาพของกรดนิวคลีอิก ใน: วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรอง อุดมวรภักษ์ (บรรณาธิการ). เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม. สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย, ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 9.1-9.5.
- อรุณี รอดลอย คีรี กอนันตกุล วันเพ็ญ มินกาญจน์ วิชัย ก้องรัตนโกศล และ วิไลวรรณ เหมศิริ. 2547. พรรณไม้น้ำไทยที่นิยมนำมาประดับตู้ปลา. สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด. กรมประมง. กรุงเทพฯ. 114 หน้า.
- อรุณี รอดลอย และณัฐกร ประดิษฐ์สรรพ. 2549. การสำรวจและการเพาะเลี้ยงพรรณไม้น้ำในสกุลใบพาย *Cryptocoryne*. บทคัดย่อการประชุมวิชาการกรมประมง ประจำปี 2549. กรมประมง. กรุงเทพฯ.

- Bae, C-H, Lyu, J-I, Abe, T., Yano, Y., Yoshida, S., Lee, Y-I and Lee, H-Y. 2004. Effect of heavy-ion beam irradiation on in vitro cultured plant organisms. *Proceedings of APAC*: 444-445.
- Coulibaly, S., R. S. Pasquet, R. Papa and P. Gepts. 2002. AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. Reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. *Theor. Appl. Genet.* 104: 358-366.
- Dessalegn, Y., L. Herselman and M. T. Labuschagne. 2008. AFLP analysis among Ethiopian Arabica coffee genotypes. *African Journal of Biotechnology* 7: 3193-3199.
- De Wolf, H., T. Backeljau and R. Verhagen. 1998. Congruence between allozyme and RAPD data in assessing macrogeographical genetic variation in the periwinkle *Littorina striata* (Mollusca, Gastropoda). *Heredity* 81: 486-492.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Harada, K., T. Okaura, L. H. Giang, N. V. Huan, M. Iwasaki and E. Nitasaka. 2005. A novel microsatellite locus isolated from an AFLP fragment in the mangrove species *Kandelia obovata* (Rhizophoraceae). *J. of Plant Res.* 118: 49-51.
- Hawksworth, D.L. 1995. Biodiversity, Measurement and Estimation. Chapman & Hall, Oxford, U.K. 140 p.
- Huh, M. K. and O. Ohnishi. 2002. Genetic diversity and genetic relationships of east Asian natural populations of wild Radish revealed by AFLP. *Breeding Science* 52: 79-88.
- Larson, S. R., T. A. Jones and K. B. Jensen. 2004. Population structure in *Pseudoroegneria spicata* (Poaceae: Triticeae) modeled by Bayesian clustering of AFLP genotypes. *Am. J. Bot.* 9: 1789-1801.
- Lynch, M. and B. B. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Martinez, L., P. Cavagnaro, R. Masuelli and J. Rodriguez. 2003. Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. *Electronic Journal of Biotechnology* <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol6/issue3/full/11>.
- Miller, M.P. 1997. Tools For Population Genetic Analysis (TFPGA) version 1.3: Department of Biology Science, North Arizona University, Arizona.
- Miyashita, N. T., A. Kawabe and H. Innan. 1999. DNA variation in the wild plant *Arabidopsis thaliana* revealed by amplified fragment length polymorphism analysis. *Genetics* 152: 1723-1731.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 3321-3323.

- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590.
- Othman, A. S., Y. C. How, C. Choke and M. Mansor. 2007. Genetic variation within the aquatic plant species *Cryptocoryne x purpurea* in Tasik Bera, Malaysia as revealed by RAPD analysis. *Journal Bioscience* 18: 99–107.
- Palacios, C., S. Kresovich and F. Gonzalez-Candelas. 1999. A population genetic study of the endangered plant species *Limonium dufourii* (*Plumbaginaceae*) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Ecology* 8: 645–657.
- Purdy, B. G. and R. J. Bayer. 1996. Genetic variation in populations of the endemic *Achillea millefolium* spp. *megacephala* from the Athabasca sand dunes and the widespread spp. *lanulosa* in western North America. *Can. J. of Botany* 74: 1138–1146.
- Rohlf, F. J. 2000. NTSYS–pc numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.2. user guide. Applied Biostatistics Inc. New York, U.S.A.
- Shannon, C. E. 1948. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal* 27: 379–423.
- Sharma, K., A. K. Mishra and R. S. Misra. 2008. Analysis of AFLP variation of Taro population and marker associated with leaf blight resistance gene. *Acad. J. of Plant Sci.* 1: 42–48.
- Sneath, P. H. A. and R. R. Sokal. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman, San Francisco, CA.
- Sytsma, K. J. and B. A. Schaal. 1985. Genetic variation, differentiation, and evolution in a species complex of tropical shrubs based on isozymic data. *Evolution* 39: 582–593.
- Ubi, B. E., R. Kolliker, M. Fujimori and T. Komatsu. 2003. Genetic diversity in diploid cultivars of Rhodesgrass determined on the basis of amplified fragment length polymorphism markers. *Crop Sci.* 43: 1516–1522.
- Unnikrishnan, S.K. 2002. *The Aquarium Plants Handbook*. Oriental Aquarium (S) Pte Ltd. Singapore. 183 pp.
- Vos, P. R., Hogers, M., Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids* 23: 4407–4414.
- Wang, Y., G. L. Reighard, D. R. Layne, A. G. Abbott and H. Huang. 2005. Inheritance of AFLP markers and their use for genetic diversity analysis in wild and domesticated Pawpaw [*Asimina triloba* (L.) Dunal]. *J. Amer. Hort. Sci.* 130: 561–568.

Whittall, J.B., Hellquist, C.B., Schneider, E.L. and Hodges, S.A. 2004. Cryptic species in an endangered pondweed community (*Potamogeton*, POTAMOGETONACEAE) revealed by AFLP markers. Amer J. Bot. 91(12): 2022-2029.

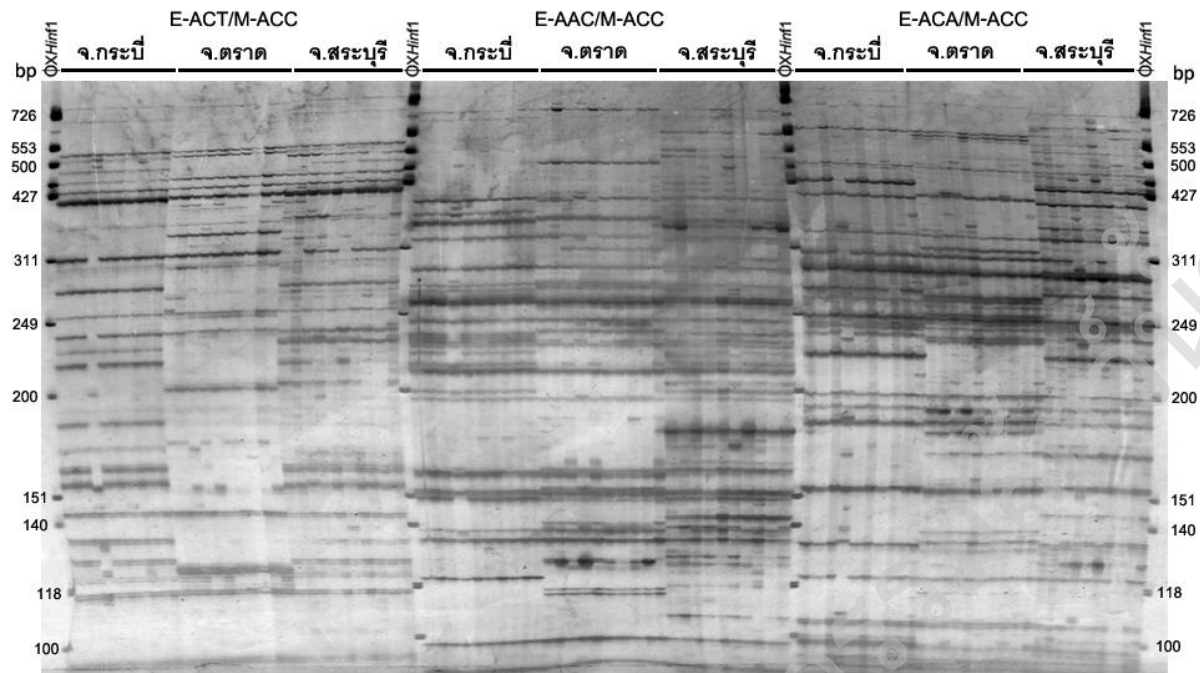
Yeh, F. C. and R. Yang. 1999. Microsoft Window based freeware for population genetic analysis (POPGENE version 1.31). Univ. of Alberta, Canada.

กองวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ

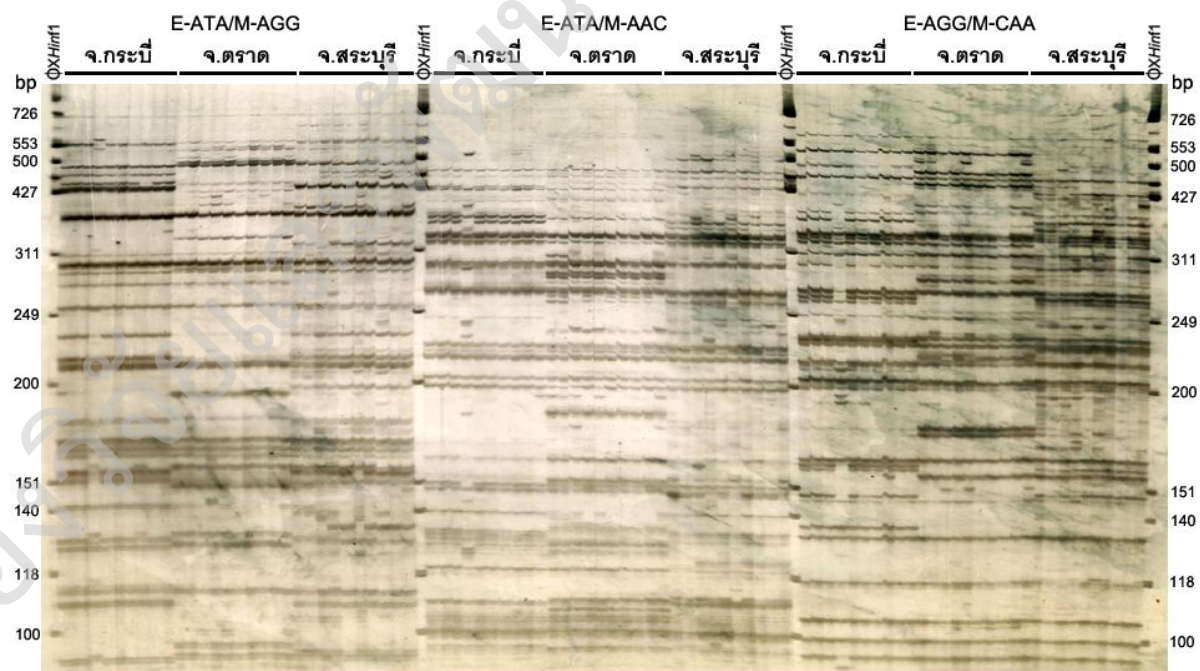
ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ลำดับเบสของอะแดปเตอร์และไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำเทคนิคเอเอฟแอลพี

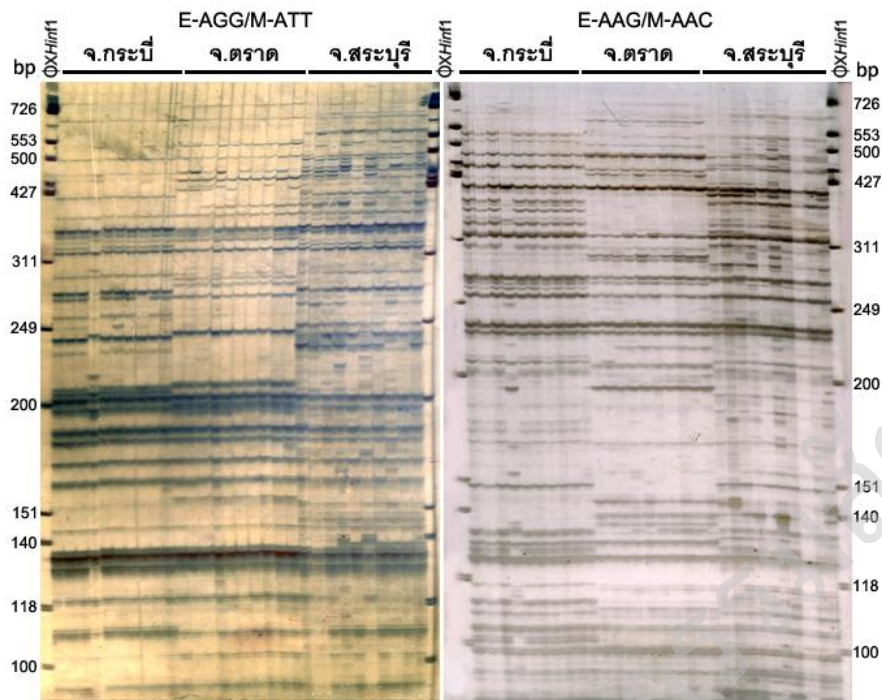
ลำดับเบส (5'–3')		
<u>adaptors</u>		
<i>Eco</i> RI adaptor1	CTC GTA GAC TGC GTA CC	
<i>Eco</i> RI adaptor2	AAT TGG TAC GCA GTC TAC	
<i>Mse</i> I adaptor1	GAC GAT GAG TCC TGA G	
<i>Mse</i> I adaptor2	TAC TCA GGA CTC AT	
<u>preselective</u>		
<u>primers</u>		
<i>Eco</i> RI–A	GAC TGC GTA CCA ATT CA	
<i>Mse</i> I–C	GAT GAG TCC TGA GTA AC	
<u>selective primers</u>	<i>Eco</i> RI selective primers	<i>Mse</i> I selective primers
E–AAC/M–ACC	GAC TGC GTA CCA ATT CAA C	GAT GAG TCC TGA GTA AAC C
E–AAG/M–AAC	GAC TGC GTA CCA ATT CAA G	GAT GAG TCC TGA GTA AAA C
E–AAG/M–CAA	GAC TGC GTA CCA ATT CAA G	GAT GAG TCC TGA GTA ACA A
E–ACA/M–ACC	GAC TGC GTA CCA ATT CAC A	GAT GAG TCC TGA GTA AAC C
E–ACT/M–ACC	GAC TGC GTA CCA ATT CAC T	GAT GAG TCC TGA GTA AAC C
E–ATA/M–AAC	GAC TGC GTA CCA ATT CAT A	GAT GAG TCC TGA GTA AAA C
E–AGG/M–ATT	GAC TGC GTA CCA ATT CAG G	GAT GAG TCC TGA GTA AAT T
E–ACA/M–ATT	GAC TGC GTA CCA ATT CAC A	GAT GAG TCC TGA GTA AAT T
E–ATA/M–AGG	GAC TGC GTA CCA ATT CAT A	GAT GAG TCC TGA GTA AAG G
E–CAG/M–TAC	GAC TGC GTA CCA ATT CCA G	GAT GAG TCC TGA GTA ATA C



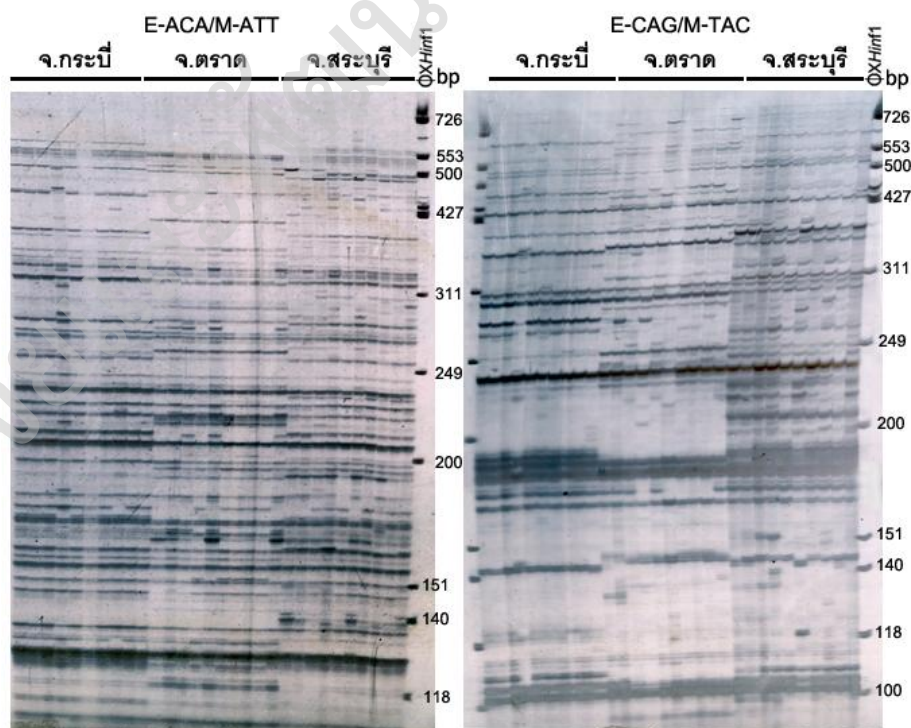
ภาพผนวกที่ 1. แอปติเอ็นเอที่ปรากฏของคู่ไพรเมอร์ E-ACT/M-ACC E-AAC/M-ACC และ E-ACA/M-ACC ในตัวอย่างไบพาสอัลบิคำจาก จ.กระบี่ ตราด และ จ.สระบุรี (bp = หน่วยขนาดของแอปติเอ็นเอ (base pair) ϕ XHinfI = แอปติเอ็นเอขนาดมาตรฐาน)



ภาพผนวกที่ 2. แอปติเอ็นเอที่ปรากฏของคู่ไพรเมอร์ E-ATA/M-AGG E-ATA/M-AAC และ E-AGG/M-CAA ในตัวอย่างไบพาสอัลบิคำจาก จ.กระบี่ ตราด และ จ.สระบุรี (bp = หน่วยขนาดของแอปติเอ็นเอ (base pair) ϕ XHinfI = แอปติเอ็นเอขนาดมาตรฐาน)



ภาพผนวกที่ 3. แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของคู่ไพรเมอร์ E-AGG/M-ATT และ E-AAG/M-ACC ในตัวอย่างใบพายอัลบิคำจาก จ.กระบี่ ตราด และ จ.สระบุรี (bp = หน่วยขนาดของแถบดีเอ็นเอ (base pair) ϕ XHinfI = แถบดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน)



ภาพผนวกที่ 4. แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของคู่ไพรเมอร์ E-ACA/M-ATT และ E-CAG/M-TAC ในตัวอย่างใบพายอัลบิคำจาก จ.กระบี่ ตราด และ จ.สระบุรี (bp = หน่วยขนาดของแถบดีเอ็นเอ (base pair) ϕ XHinfI = แถบดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน)