



รายงานการวิจัย  
เรื่อง

การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ  
กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม *Nigrohirtae* ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี  
Identification and genetic relationship analysis of  
*Dendrobium*, *Nigrohirtae* group, using HAT-RAPD technique

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นฤมล ธนานันต์  
รองศาสตราจารย์ ดร. วีระชัย ธนานันต์

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา  
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

พ.ศ. 2558

## รายงานการวิจัย

### เรื่อง

การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ  
กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม *Nigrohirtae* ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

Identification and genetic relationship analysis of  
*Dendrobium*, *Nigrohirtae* group, using HAT-RAPD technique

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นฤมล ธนานันต์

รองศาสตราจารย์ ดร. ชีระชัย ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา  
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

พ.ศ. 2558

หัวข้อวิจัย	การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี
ชื่อผู้วิจัย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นฤมล ธนานันต์ รองศาสตราจารย์ ดร. อีระชัย ธนานันต์
หน่วยงาน	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ปี พ.ศ.	2558

### บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมเป็นกล้วยไม้ที่ได้รับความนิยม จึงมีการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการผสมพันธุ์และขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ดังนั้นการจำแนกพันธุ์ด้วยลักษณะสัณฐานจึงมีความยุ่งยากและเกิดความสับสนง่าย งานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมาตรวจสอบพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสม รวม 7 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 37 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ 21 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมแต่ละพันธุ์ ผลการวิจัยพบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ออกจากกันได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ ซึ่งพบไพรเมอร์ 14 ชนิด ที่สามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมทั้งหมดได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.16 ถึง 0.52 นอกจากนั้นผลการวิจัยครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีสามารถจำแนกพันธุ์ของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสม รวมทั้งสามารถใช้วางแผนการผสมพันธุ์เพื่อพัฒนาพันธุ์ใหม่ในอนาคต

**คำสำคัญ :** สกุลหวาย; กลุ่ม Nigrohirutae; หวายลูกผสม; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; เครื่องหมายดีเอ็นเอ; แฮตอาร์เอพีดี

<b>Research Title</b>	Identification and genetic relationship analysis of <i>Dendrobium</i> , Nigrohurutae group, using HAT-RAPD technique
<b>Authors</b>	Assistant Professor Dr. Narumol Thanananta Associate Professor Dr. Theerachai Thanananta
<b>Faculty</b>	Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage
<b>Year</b>	2015

## ABSTRACT

*Dendrobium*, Nigrohurutae group, and hybrids are important and most popular Thai orchid. High genetic diversity was found in this genus according to cross breeding and propagation by using tissue culture. Therefore, identification base on morphology may cumbersome and confusing easily. High annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique was used to identify 7 cultivars of *Dendrobium*, Nigrohurutae group, and hybrids. The total 72 random primers were screened and 37 primers could be used for DNA amplification. Twenty-one primers were selected and used analyze each DNA cultivars of *Dendrobium*, Nigrohurutae group, and hybrids. These results showed differences among 7 cultivars with specific DNA bands. Fourteen of 21 random primers were able to identify each cultivar even though using as only one primer. A dendrogram based on polymorphic bands showed genetic similarities among *Dendrobium*, Nigrohurutae group, and hybrids with similarity coefficients ranging 0.16-0.52. Finally, these results indicate that the HAT-RAPD markers capable to specify the cultivars of *Dendrobium*, Nigrohurutae group, and hybrids, which used to planning in the breeding program in the future.

**Keywords:** *Dendrobium*; Nigrohurutae; *Dendrobium* hybrid; genetic relationship; DNA marker; HAT-RAPD

## กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัย เรื่อง การจำแนกพันธุ์และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม *Nigrohirtae* ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัย (ทุน วจ.) จากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปีงบประมาณ 2557

นฤมล ธนานันต์

ธีระชัย ธนานันต์

มีนาคม 2558

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	(2)
กิตติกรรมประกาศ.....	(3)
สารบัญ.....	(4)
สารบัญตาราง.....	(6)
สารบัญภาพ.....	(7)
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 ลักษณะทั่วไปของกล้วยไม้สกุลหวาย.....	3
2.2 กล้วยไม้สกุลหวาย ( <i>Dendrobium</i> ) กลุ่ม <i>Nigrohrutae</i> ใช้ในการวิจัย.....	4
2.3 เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล.....	9
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	11
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....</b>	<b>15</b>
3.1 ตัวอย่างกล้วยไม้ที่ใช้ในการวิจัย.....	15
3.2 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากเนื้อเยื่อ.....	15
3.3 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ.....	17
3.4 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี.....	18
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย.....</b>	<b>22</b>
4.1 การตอบสนองของดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม <i>Nigrohrutae</i> ต่อไพรมเมอร์.....	22
4.2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม <i>Nigrohrutae</i> และลูกผสม ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี.....	40
4.3 อภิปรายผลการวิจัย.....	42

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	43
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	43
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	43
บรรณานุกรม.....	44

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมที่ใช้ในการวิจัย.....	15
2	ไพรมอร์ 72 ชนิด ที่ใช้ในเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี.....	19
3	ความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้ในเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี.....	21
4	ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมโดยใช้ไพรมอร์ 21 ชนิด.....	26
5	แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมในแต่ ละพันธุ์.....	38
6	รูปแบบดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสม รวม 7 พันธุ์ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรมอร์ 21 ชนิด.....	39



## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เอื้องปากนกแก้ว.....	5
2	เอื้องเงินหลวง.....	5
3	ดอนมาลี .....	6
4	รุ่งกมล เวศย์วรุฒม์.....	6
5	กรีนแลนเทิร์น .....	7
6	สวิตดอน.....	7
7	เอื้องแซะหอม.....	8
8	พันธุ์ประวัติของกล้วยไม้ลูกผสมที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้.....	8
9	แถบตีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมโดยใช้ไพรมอร์ซูด A-2.....	22
10	แถบตีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมใช้ไพรมอร์ซูด B-2.....	23
11	แถบตีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมใช้ไพรมอร์ซูด C-2.....	23
12	แถบตีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมใช้ไพรมอร์ซูด D-2.....	24
13	แถบตีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมใช้ไพรมอร์ซูด E-2.....	24
14	แถบตีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมใช้ไพรมอร์ซูด F-2.....	25
15	แถบตีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมโดยใช้ไพรมอร์ A24.....	27
16	แถบตีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมโดยใช้ไพรมอร์ A32.....	27



## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
30	แถบตีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมโดยใช้ไพรเมอร์ E31.....	34
31	แถบตีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมโดยใช้ไพรเมอร์ E32.....	35
32	แถบตีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมโดยใช้ไพรเมอร์ F22.....	35
33	แถบตีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมโดยใช้ไพรเมอร์ F23.....	36
34	แถบตีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมโดยใช้ไพรเมอร์ F31.....	36
35	แถบตีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสมโดยใช้ไพรเมอร์ F32.....	37
36	ค่าดัชนีความเหมือนซึ่งคำนวณจากแถบตีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสม รวม 7 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแอสตาร์เอพีดี.....	41
37	แผนภูมิความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่ม Nigrohirutae และลูกผสม รวม 7 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคแอสตาร์เอพีดี.....	41