

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของ กล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบเขียวด้วยเครื่องหมายสก็อต

Genetic Relationship Assessment and Identification of Strap-Leaf *Paphiopedilum* Using SCoT Markers

ธีระชัย ธานันต์, พรประภา สิริเทพทวี และภัทรพร คุ่มภัย
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Theerachai Thanananta, Pornprapa Siritheptawee and Phataraporn Khumphai

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Narumol Thanananta*

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

บทคัดย่อ

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารีเป็นไม้ดอกชนิดหนึ่งที่พบได้ตามธรรมชาติในพื้นที่ป่า โดยในประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีทั้งหมด 18 ชนิด จากทั่วโลกประมาณ 136 ชนิด ปัจจุบันกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีจัดเป็นไม้ดอกที่ได้รับความนิยมในการปลูกและสามารถส่งออกไปยังต่างประเทศ เนื่องจากดอกมีสีสันที่สวยงามและหลากหลาย นอกจากนั้นยังมีการปรับปรุงพันธุ์ซึ่งทำให้เกิดลูกผสมมากมาย โดยทำให้ดอกบานทน ดอกมีสีสันสวยงามและหลากหลาย รวมทั้งเพิ่มมูลค่าอีกด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาการจำแนกชนิดและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีด้วยเครื่องหมายสก็อต โดยใช้ไพรเมอร์ 80 ชนิด ผลการวิจัยพบว่าไพรเมอร์ 17 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีทั้ง 15 ชนิดได้ และยังให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจน เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพบแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย 219 แถบ เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่าง 0.7613 ถึง 0.3514 และสามารถจำแนกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งผลการวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรมต่อไป

คำสำคัญ : กล้วยไม้, สกุลรองเท้านารี, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม, การระบุชนิด, เครื่องหมายสก็อต

Abstract

Paphiopedilum is one of the flowering plant, naturally found in forest. In Thailand, there are 18 species out of 136 species in the world. With beautiful and colourful flowers, *Paphiopedilum* has currently become a popular orchid in cultivation and exported many countries. Various hybrids with more colorful flowers have been widely created, resulting in an increased value of *Paphiopedilum*. Therefore, Start codon targeted (SCoT) marker was used to identify and investigate the genetic relationship of 15 *Paphiopedilum* species. The total 80 primers were screened and 17 primers could be used for DNA amplification giving clear amplified products to construct DNA fingerprints. The total 219 polymorphic bands were found. A dendrogram was constructed based on polymorphic bands using UPGMA by the NTSYS program. The results showed genetic similarities among 15 *Paphiopedilum* species with similarity coefficients ranging from 0.7613 to 0.3514, providing their classification into 3 clusters. These indicated that the SCoT markers are capable to specify *Paphiopedilum*, and use in the breeding program and further genetic resource conservation.

Keywords: orchid; *Paphiopedilum*; genetic relationship; identification; SCoT marker

1. คำนำ

กล้วยไม้เป็นไม้อดอกที่มีสีสันสวยงาม พบทั่วโลกประมาณ 19,000 ชนิด จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledonous plant) ในวงศ์ออร์คิดีเดซีอี (Orchidaceae) พบได้ทั้งในเขตร้อนหรือแม้แต่บริเวณที่มีน้ำแข็งปกคลุม กล้วยไม้เป็นไม้อดอกที่มีจำนวนชนิดมากที่สุด นอกจากนี้ยังมีลูกผสมที่เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์อีกมากมาย ดังนั้นกล้วยไม้จึงเป็นไม้อดอกที่มีความหลากหลายมากที่สุด ปัจจุบันกล้วยไม้เป็นไม้อดอกที่ได้รับความนิยมในการปลูกและส่งออกขายยังต่างประเทศในปริมาณมาก เนื่องด้วยเป็นพืชที่มีอายุยืนนานหลายปี มีสีสันของดอกที่สวยงามและหลากหลาย จึงนิยมนำไปประดับตกแต่งอาคารและสถานที่ บางชนิดมีกลิ่นหอมและช่วยทำให้ผ่อนคลาย และกล้วยไม้ลูกผสมบางพันธุ์มีลักษณะดอกบานทน สีสันสวยงาม และมีความหลากหลาย ซึ่งเพิ่มมูลค่าให้กับกล้วยไม้อีกด้วย

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ที่ได้รับความนิยมในการปลูก ใบมีลักษณะอวบน้ำ สี

เขียวหรืออาจมีลวดลายขึ้นอยู่กับชนิด ใบมีการเรียงตัวสลับกันทั้ง 2 ข้าง ลำต้นสั้น ดอกมีสีสันสวยงามและหลากหลาย ดอกกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีสามารถบานทนเป็นสัปดาห์หรือมากกว่า (อบจันทร์, 2543) โดยลักษณะดอกมีกลีบนอก 3 กลีบ และกลีบใน 3 กลีบ ซึ่งกลีบนอกบนมี 1 กลีบ กลีบล่าง 2 กลีบ รวมกันเหมือนเป็นกลีบเดียวกัน ส่วนกลีบในแบ่งเป็นกลีบบน 2 กลีบ อีก 1 กลีบ มีลักษณะต่างจากกลีบบนทั้งสอง เรียกว่าปาก มีรูปร่างคล้ายกับหัวรองเท้าสตรี เล้าเกสรจะประกอบไปด้วยเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย โดยเกสรเพศเมียมีแผ่นยื่นออกมา เป็นรอยปุ่ม เว้า แต่ละชนิดมีลักษณะของดอกที่แตกต่างกันออกไป กล้วยไม้สกุลรองเท้านารีชอบขึ้นตามใบไม้ที่ผุ ดินร่วนซุย ไม่มีลำลูกกล้วย จัดเป็นกล้วยไม้กึ่งดิน แหล่งกำเนิดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีคือเขตร้อนแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเขตอบอุ่น (ชาวลิต, 2542)

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารีแต่ละชนิดมีความคล้ายกันมาก ส่งผลให้การจำแนกชนิดโดยใช้เพียง

ลักษณะสัณฐาน (morphology) ทำได้ยากและเกิดการสับสนได้ง่าย โดยลักษณะของใบมีความคล้ายคลึงกันมาก นอกจากนี้กล้วยไม้สกุลรองเท้านารียังออกดอกช้ำมาก และออกดอกเพียงปีละ 1 ครั้ง หรือ 2 ปี ออกดอกเพียงครั้งเดียว ดังนั้นการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีจึงจำเป็นต้องใช้เครื่องหมาย ดีเอ็นเอเข้ามาช่วยในการจำแนกชนิดและประเมินความสัมพันธ์ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารี เพื่อใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์และการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต

ด้วยความสำคัญดังกล่าว คณะผู้วิจัยจึงได้ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบเขียวด้วยเครื่องหมายสก็อต (SCoT, start codon targeted) ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นโดย Collard และ Mackill (2009) โดยไพรเมอร์สก็อต (SCoT primer) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ATG อยู่ด้วยหลักการของเครื่องหมายสก็อต คือ ไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมบนดีเอ็นเอแบบสุ่มเมื่อจับกันในตำแหน่งที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) ซึ่งข้อดีของเครื่องหมายสก็อต คือ ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายไม่สูงนัก และผลการตรวจสอบมีความน่าเชื่อถือ (Collard and Mackill, 2009)

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 กล้วยไม้สกุลรองเท้านารี

กล้วยไม้สกุลรองเท้านารีที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ 15 ชนิด ได้แก่ (1) รองเท้านารีอินทนนท์ [*P. villosum* (Lindl.) Stein] (2) รองเท้านารีอินทนนท์คอแดง (*P. barbigerrum* var. *coccineum*) (3) รองเท้านารีอินทนนท์ หรือรองเท้านารีอินทนนท์ใบกว้าง [*P. insigne* (Wallich ex Lindley) Pfitzer] (4) รองเท้านารีอินทนนท์ลาว [*P. gratixianum* (Mast.) Guil-

laumin] (5) รองเท้านารีเหลืองเลย (*P. hirsutissimum* var. *esquirolei*) (6) รองเท้านารีเหลืองกระบี่ [*P. exul* (Ridl.) Rolfe] (7) รองเท้านารี Rothschildianum [*P. rothschildianum* (Rchb.f.) Stein] (8) รองเท้านารีไพรมูลินัม (*P. primulinum* M.W. Wood & P. Taylor) (9) รองเท้านารีตอยตุงกาญจน์ (*P. vejvarutianum* O. Gruss & Roellke) (10) รองเท้านารีสไปเซเรียนัม [*P. spicerianum* (Rchb.f) Pfitz.] (11) รองเท้านารีเมืองกาญจน์ [*P. parishii* (Rchb.f) Stein] (12) รองเท้านารีตอยตุง [*P. charlesworthii* (Rolfe) Pfitzer] (13) รองเท้านารีเชียงดาว (*P. dianthum* Tang & Wang) (14) รองเท้านารีเฮนรียานัม (*P. henryanum* Braem) และ (15) รองเท้านารีแพรสแทนส์ [*P. praestans* (Rchb.f) Pfitz]

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีด้วยวิธีประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธีของนงมุต และคณะ (2555) จากนั้นตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose) ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 และคำนวณอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายสก็อต

มี 2 ขั้นตอน คือ (1) การตรวจหาไพรเมอร์ที่ตอบสนองต่อปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยรวมดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีทั้ง 15 ชนิดเข้าด้วยกัน เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยไพรเมอร์ขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 80 ชนิด (Luo *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2013) แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

(DNA fingerprint) ด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และ (2) การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีได้อย่างชัดเจนมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีแต่ละพันธุ์ด้วยเครื่องหมายสก็อต

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9.1, 0.1 % Triton™ X-100 และ 2.5 mM MgCl₂) และมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์ 250 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis technologies Sdn. Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (Unit) โดยมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร ปฏิกิริยา ลูกโซ่พอลิเมอเรสมิ 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ (นฤมล และคณะ, 2555)

2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตในกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีทั้ง 15 ชนิด โดยการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ชนิดที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งจะให้สัญลักษณ์เป็น 1 ส่วนชนิดที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้น จะให้สัญลักษณ์เป็น 0 และหาค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) จากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 (Rohlf, 2002)

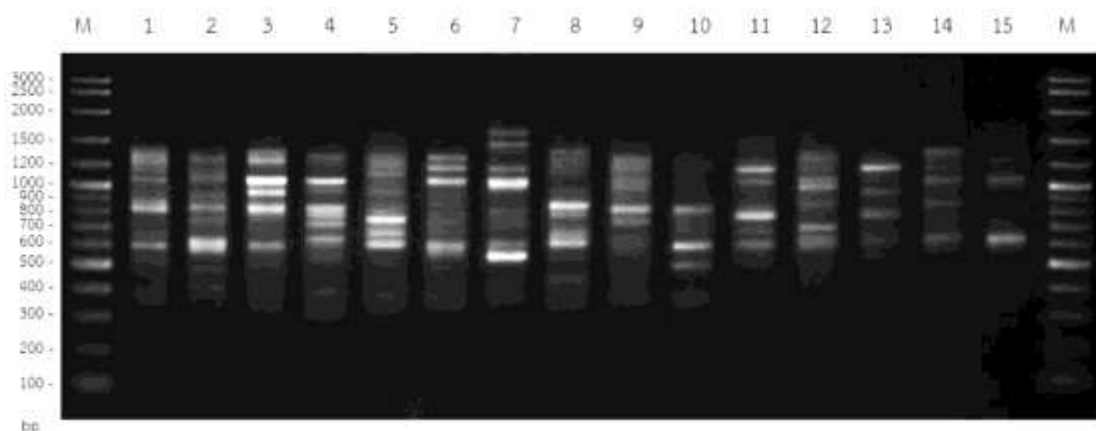
3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของเครื่องหมายสก็อต โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 80 ชนิด พบว่า ไพรเมอร์ 28 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มไบเซียวทั้ง 15 ชนิด (คิดเป็น 35 %) แต่มีไพรเมอร์เพียง 17 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจน ได้แก่ SCot13, SCot32, SCot23, SCot40, SCot46, SCot50, SCot51, SCot52, SCot53, SCot54, SCot55, SCot57, SCot65, SCot66, SCot68, SCot73 และ SCot76 ดังนั้นจึงนำมาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 15 ชนิด พบว่าได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 230 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 300 ถึง 2,700 คู่เบส ตัวอย่าง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ SCot65 (รูปที่ 1) พบว่ามีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 22 แถบ โดยมีขนาดตั้งแต่ 300 ถึง 1,700 คู่เบส (bp, base pair)

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก็อตโดยใช้โปรแกรม NTSYS เลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนมีค่าอยู่ระหว่าง 0.7613 ถึง 0.3514 (รูปที่ 2) โดยรองเท้านารีเมืองกาญจน์และรองเท้านารีเชียงดาวมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนมากที่สุด คือ 0.7613 ในขณะที่รองเท้านารีอินทนนท์ลาวและรองเท้านารีเชียงดาวมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนน้อยที่สุด คือ 0.3514 สามารถแบ่งกลุ่มกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย คือกลุ่มย่อยที่ 1.1 ได้แก่ รองเท้านารีอินทนนท์ รองเท้านารีอินทนนท์คอแดง รองเท้านารีอินทนนท์ใบกว้าง รองเท้านารีอินทนนท์ลาว รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ รองเท้านารีดอยตุง และรองเท้านารีเฮนรียานุม กลุ่มย่อยที่ 1.2 ได้แก่ รองเท้านารีสไปเซเรียนุม กลุ่มย่อยที่ 1.3 ได้แก่ รองเท้านารีเหลืองเลย และรองเท้านารีเหลืองกระบี่ กลุ่มที่ 2

ได้แก่ รองเท้านารีโรสคิลเดีย눔 รองเท้านารีแพร-
สแทนส์ รองเท้านารีเมืองกาญจน์ และรองเท้านารี

เชียงดาว กลุ่มที่ 3 ได้แก่ รองเท้านารีไพรมูลินุม
(รูปที่ 3)



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีโดยใช้ไพรเมอร์ SCot65 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™), 1-15 คือ (1) รองเท้านารีอินทนนท์ (2) รองเท้านารีอินทนนท์คอแดง (3) รองเท้านารีอินชิกเน หรือรองเท้านารีอินทนนท์ใบกว้าง (4) รองเท้านารีอินทนนท์ลาว (5) รองเท้านารีเหลืองเลย (6) รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (7) รองเท้านารีโรสคิลเดีย눔 (8) รองเท้านารีไพรมูลินุม (9) รองเท้านารีตอยตุงกาญจน์ (10) รองเท้านารีสไปเซเรียนุม (11) รองเท้านารีเมืองกาญจน์ (12) รองเท้านารีตอยตุง (13) รองเท้านารีเชียงดาว (14) รองเท้านารีเฮนริยานุม และ (15) รองเท้านารีแพรสแทนส์]

เมื่อพิจารณาแผนภูมิความสัมพันธ์พบว่า รองเท้านารีอินทนนท์ใบกว้างและรองเท้านารีเหลืองเลยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chung และคณะ (2006) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA)

นอกจากนี้ยังพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างกันและสามารถระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบเขี้ยวทั้ง 15 ชนิด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงแสดงถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายสก็อตในการวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ของกล้วยไม้สกุลรองเท้านารีกลุ่มใบเขี้ยวได้เช่นเดียวกับพืชอื่น เช่น รักแกนมอ

(กรรทอง และคณะ, 2557) ลิลลี่ (Gao *et al.*, 2014) อินทผาลัม (Al-Qurainy *et al.*, 2015) และมีประสิทธิภาพในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ได้ไม่ต่างจากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น ตัวอย่าง เช่น การใช้เครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดีและเครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสาย (จิตติพร และคณะ, 2557) กล้วยไม้สิงโตกลอกตา (เกียรติชัย และคณะ, 2557) กล้วยไม้สกุลกุหลาบ (วริสรา และคณะ, 2557) กล้วยไม้สกุลแวนด้าหมู่เข็ม (จินต์ และคณะ, 2558) กล้วยไม้สกุลหวายหมู่ไนโครเซอร์ซูเรและลูกผสม (จุฑาทิพย์ และคณะ, 2559) และกล้วยไม้สกุลเอื้องเทียน (ภัทรา และคณะ, 2559)

เขียว จำนวน 15 ชนิด เป็น 3 กลุ่ม โดยรองเท้านารีเมืองกาญจน์และรองเท้านารีเชียงใหม่มีความใกล้เคียงกันมากที่สุด มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนมากที่สุด คือ 0.7613 ขณะที่รองเท้านารีอินทนนท์ลาวและรองเท้านารีเชียงใหม่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนน้อยที่สุด คือ 0.3514 ดังนั้นเครื่องหมายสก็อตจึงเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่น่าสนใจในการนำมาระบุชนิดของกล้วยไม้ เนื่องจากสามารถจำแนกได้ดีและมีวิธีการทำง่าย

5. รายการอ้างอิง

- กรองทอง ใจแก้วแดง, วิชาญ เอียดทอง และสุนิรร์ ปิยะโชคณากุล, 2557, การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของต้นรักแกนมอใน ประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมาย Start Codon Targeted (SCoT), Thai J. For. 33(2): 19-27.
- เกียรติชัย แซ่ใต้อ, ชีระชัย ธนาคันต์ และนฤมล ธนาคันต์, 2557, การจำแนกและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาห่มุสิงโตสยามด้วยเครื่องหมายแอสเตอร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Tech. 2: 92-101.
- จินต์ ทองสม, ชีระชัย ธนาคันต์, นฤมล ธนาคันต์, 2558, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้าห่มุเข็มด้วยแอสเตอร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23: 475-484.
- จุฑาทิพย์ พันธุ์รูปท้าว, ชีระชัย ธนาคันต์ และนฤมล ธนาคันต์, 2559, การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายห่มุในโครเชอร์ซูเรและลูกผสมด้วยแอสเตอร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 5: 77-87.
- จิตติพร โทมัสโกภา, ชีระชัย ธนาคันต์ และนฤมล ธนาคันต์, 2557, การจำแนกพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายกลุ่มเอื้องสายด้วยเทคนิคแอสเตอร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Technol. 3: 82-91.
- ภัทรา หงษ์ทองดี, ชีระชัย ธนาคันต์ และนฤมล ธนาคันต์, 2559, ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของชนิดกล้วยไม้ในสกุลเอื้องเทียนด้วยไอเอสเอสอาร์, Thai J. Sci. Tech. 2: 343-350.
- วริศรา แทนสง่า, ชีระชัย ธนาคันต์ และ นฤมล ธนาคันต์, 2557, การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลกุหลาบด้วยเครื่องหมายแอสเตอร์เอพีดี, Thai J. Sci. Tech. 3: 317-326.
- ขวลิต ดาบแก้ว, 2542, การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สำหรับผู้แรกเริ่ม, สำนักพิมพ์ไอ.เอส.พรินติ้งเฮ้าส์, กรุงเทพฯ.
- นฤมล ธนาคันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และชีระชัย ธนาคันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแอสเตอร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-188.
- อบฉันท์ ไทยทอง, 2543, กล้วยไม้เมืองไทย, สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.
- Al-Qurainy, F., Khan, S., Nadeem, M. and Tarroum, M., 2015, SCoT marker for the assessment of genetic diversity in Saudi Arabian date palm cultivars, Pak. J. Bot. 47: 637-643.
- Chung, S.Y., Choi, S.H., Kim, M.J., Yoon, K.E., Lee, G.P., Lee, J.S. and Ryu, K.H., 2006, Genetic relationship and differentiation of *Paphiopedilum* and *Phragmepedium* based on RAPD analysis, Sci. Hort. 109: 153-159.
- Collard, B.C.Y. and Mackill, D.J., 2009, Start codon targeted (SCoT) polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for

- p>generating gene-targeted markers in plants, Plant Mol. Biol. Rep. 27: 86-93.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1978, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 11-15.
- Gao, Y.H., Zhu, Y.Q., Tong, Z.K., Xu, Z.Y., Jiang, X.F., Jiang, X.F. and Huang, C.H., 2014, Analysis of genetic diversity and relationships among genus *Lycoris* based on start codon targeted (SCoT) marker, Biochem. System. Ecol. 57: 221-226.
- Luo, C., Hea, X.H., Chena, H., Oua, S.J. and Gaoa, M.P., 2010, Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using start codon targeted (SCoT) markers, Biochem. System. Ecol. 6: 1176–1184.
- Rohlf, F.J., 2002, NTSYSpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Inc., New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Wu, J.M., Li, Y.R., Yang, L.T., Fang, F.X., Song, H.Z., Tang, G.Q., Wang, M. and Weng, M.L., 2013, cDNA-SCoT: A novel rapid method for analysis of gene differential expression in sugarcane and other plants.