ฐ๒๐๙๖๐

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
BOOK VRU
1000175111

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การจำแนกพันธุ์บัวหลวงด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นฤมล ธนานันต์
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ปีงบประมาณ 2549

Identification of Lotus Using SRAP Markers

Assistant Professor Dr. Narumol Thanananta

Curriculum of Biotechnology, Faculty of Science and Technology

This Research was Support by Research and Development Institute

Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage

Budget Year 2006

หัวข้อวิจัย การจำแนกพันธุ์บัวหลวงด้วยเครื่องหมายเอสอาร์เอพี
ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นฤมล ธนานันต์
คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ปีงบประมาณ 2549

บทคัดย่อ

การจำแนกบัวหลวง 6 พันธุ์ ด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 120 คู่ พบว่าไพรเมอร์ 119 คู่ หรือคิดเป็น 99.17 เปอร์เซ็นต์ ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงได้ โดยไพรเมอร์ 40 คู่ ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันและให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์บัวหลวงรวม 9 แถบ เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากลายพิมพ์เอสอาร์เอพีในบัวหลวงแต่ละพันธุ์พบว่าบัวหลวงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ

Research Title Identification of Lotus Using SRAP Markers

Name Assistant Professor Dr. Narumol Thanananta

Faculty Science and Technology

University Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage

Budget Year 2006

ABSTRACT

Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) technique was used to identify 6 lotus cultivars. The total of 120 primer-pair combinations were screened and 119 primer combinations or 99.17 percent of them gave clear DNA fingerprint and could be potentially used to study the genetic diversity of lotus. Forty primer combinations showed clearly differences of DNA pattern among the 6 lotus cultivars and gave 9 DNA markers specific for each lotus cultivar. Comparison of the DNA patterns among lotus cultivars generated from SRAP showed narrow genetic diversity.

กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จของงานวิจัยครั้งนี้จะไม่เกิดขึ้น หากไม่ได้รับความช่วยเหลือและสนับสนุนทุนในการทำวิจัยจากสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีระชัย ธนานันต์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ที่สนับสนุนเครื่องมือ สารเคมี และไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

นฤมล ธนานันต์

8 มิถุนายน 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ ..... (1)

สารบัญตาราง ..... (2)

สารบัญภาพ ..... (3)

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญละที่มาของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 ลักษณะทั่วไปของบัวหลวง 3

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ 4

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ 6

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ 6

3.2 วิธีการ 6

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากเนื้อเยื่อ 6

3.2.2 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ 7

3.2.3 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี 8

3.2.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเจลโพลีอะคริลาไมด์ 8

3.2.5 การวิเคราะห์ผล 11

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ 13

4.1 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวงด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี 13

4.2 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ 39

บทที่ 5 สรุป 41

บรรณานุกรม 42

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	บัวหลวง 6 พันธุ์ ที่ใช้ในการทำวิจัย.....	6
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาเอสอาร์เอพี.....	9
3	การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยใช้ไพรเมอร์ 120 คู่ สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวงด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี.....	24
4	แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์บัวหลวงในลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวงซึ่งสร้างจากเทคนิคเอสอาร์เอพี.....	39
5	ค่าดัชนีความเหมือนของบัวหลวงที่คำนวณจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี.....	40

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 5 คู่ คือ B1-AAT/A2-TA, B1-AAT/A3-AG, B1-AAT/A4-GA, B1-AAT/A4-GA และ B1-AAT/A7-TC.....	14
2	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 2 คู่ คือ B2-TGC/A5-GC และ B2-TGC/A6-CG.....	15
3	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 5 คู่ คือ B3-GCT/A3-AG, B3-GCT/A6-CG, B3-GCT/A8-CT, B3-GCT/A9-TG และ B3-GCT/A10-CC.....	16
4	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 4 คู่ คือ B4-CAC/A2-TA, B4-CAC/A5-GC, B4-CAC/A9-TG และ B4-CAC/A11-TT.....	17
5	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 5 คู่ คือ B5-AGT/A5-GC, B5-AGT/A6-CG, B5-AGT/A7-TC, B5-AGT/A8-CT และ B5-AGT/A11-TT.....	18
6	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 1 คู่ คือ B6-TCC/A12-CA.....	19
7	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 5 คู่ คือ B7-CAT/A1-AT, B7-CAT/A3-AG, B7-CAT/A4-GA, B7-CAT/A5-GC และ B7-CAT/A10-CC.....	20

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 3 คู่ คือ B8-GGA/A4-GA, B8-GGA/A6-CG และ B8-GGA/A7-TC.....	21
9	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 7 คู่ คือ B9-TGA/A2-TA, B9-TGA/A4-GA, B9-TGA/A4-GA, B9-TGA/A6-CG, B9-TGA/A7-TC, B9-TGA/ A8-CT และ B9-TGA/A9-TG.....	22
10	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 3 คู่ คือ B10-CTA/A3-AG, B10-CTA/A5-GC และ B10-CTA/A6-CG.....	23
11	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B1-AAT/A2-TA, B1-AAT/A3-AG และ B1-AAT/A4-GA.....	25
12	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B1-AAT/A6-CG, B1-AAT/A7-TC และ B2-TCG/A5-GC.....	26
13	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B2-TGC/A6-CG, B3-GCT/A3-AG และ B3-GCT/A6-CG....	27
14	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B3-GCT/A8-CT, B3-GCT/A9-TG และ B3-GCT/A10-CC....	28
15	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B4-CAC/A2-TA, B4-CAC/A5-GC และ B4-CAC/A9-TG.....	29
16	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B4-CAC/A6-CG, B5-AGT/A5-GC และ B5-AGT/A6-CG.....	30
17	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B5-AGT/A7-TC, B5-AGT/A8-CT และ B5-AGT/A11-TT.....	31

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B6-TCC/A12-CA, B7-CAT/A1-AT และ B7-CAT/A3-AG.....	32
19	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B7-CAT/A4-GA, B7-CAT/A5-GC และ B7-CAT/A10-CC....	33
20	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B8-GGA/A4-GA, B8-GGA/A6-CG และ B8-GGA/A7-TC....	34
21	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B9-TGA/A2-TA, B9-TGA/A4-GA และ B9-TGA/A5-GC.....	35
22	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B9-TGA/A6-CG, B9-TGA/A7-TC และ B9-TGA/A8-CT.....	36
23	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B9-TGA/A9-TG, B10-CTA/A3-AG และ B10-CTA/A5-GC...	37
24	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ B10-CTA/A6-CG.....	38
25	สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวหลวง จำนวน 6 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี.....	40

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การศึกษาชีววิทยาโมเลกุล (Molecular Biology) ในปัจจุบันจะมุ่งศึกษาเกี่ยวกับดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรม (genetic material) ของสิ่งมีชีวิต การจำแนกพันธุ์พืชก็นำเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มาใช้ตรวจสอบพันธุ์พืชต่างๆ รวมทั้งลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ โดยนอกจากจะจำแนกพันธุ์พืชได้อย่างถูกต้องและแม่นยำแล้ว ยังใช้ในการจดทะเบียนพันธุ์พืชได้อีกด้วย

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaerth.) เป็นพันธุ์ไม้น้ำล้มลุกที่มีอายุหลายปี ลำต้นมีลักษณะเป็นเหง้า ไหล หรือหัวอยู่ในดินใต้น้ำ ใบเป็นใบเดี่ยวรูปร่างค่อนข้างกลมและกว้าง เจริญมาจากลำต้นและมีก้านใบส่งขึ้นมาจากใต้น้ำ ดอกเป็นดอกเดี่ยวที่สมบูรณ์เพศ มีรูปร่างและสีสันของดอกสวยงาม จนได้รับการขนานนามว่าเป็น "ราชินีไม้น้ำ" ดังนั้นจึงนิยมนำมาปลูกประดับในบริเวณบ้านและนิยมใช้บูชาพระ เป็นสัญลักษณ์ของความบริสุทธิ์และคุณงามความดีตามคตินิยมของชาวพุทธ

ผู้วิจัยมีแนวความคิดที่จะรวบรวมพันธุ์บัวหลวงพื้นเมือง นำมาศึกษาและจำแนกพันธุ์ด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล (Molecular Genetics) เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) และตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกพันธุ์บัวหลวงได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในด้านการคุ้มครองพันธุกรรมบัวหลวงพื้นเมืองของประเทศไทย นอกจากนั้นในการการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงจะนิยมใช้วิธีคัดเลือกพันธุ์ที่มีอยู่เดิมที่เห็นว่าดีแล้ว

นฤมล และ มานะ (2549) ได้จัดจำแนกพันธุ์บัวหลวงด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี พบว่าสามารถจัดแบ่งบัวหลวงเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับประวัติและความเป็นมาของการปลูกบัวหลวงในประเทศไทย แต่เนื่องจากเทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่มีความไวต่อปัจจัยภายนอกมาก โดยพบว่ามีบ่อยครั้งที่ทำการทดลองซ้ำตามวิธีที่มีนักวิจัยผู้หนึ่งผู้ใดรายงานไว้แล้ว แต่ผลที่ได้อาจคลาดเคลื่อนไป เพราะมีรายละเอียดบางอย่างในขั้นตอนการดำเนินการวิจัยที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะและเหมาะสมมากกว่า

1.2 วัตถุประสงค์

ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงแต่ละพันธุ์ด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี (SRAP, sequence-related amplified polymorphism) แล้วตรวจหาเครื่องหมายเอสอาร์เอพี (SRAP marker) ที่สามารถจำแนกพันธุ์บัวหลวงได้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ตรวจหาเครื่องหมายเอสอาร์เอพีที่สามารถจำแนกพันธุ์บัวหลวง 6 พันธุ์ ได้แก่

1.3.1 บัวหลวงพระราชินี

1.3.2 บัวหลวงแหลมขาว/บุณฑริก/ปุณฑริก/ขาวแก้ว

1.3.3 บัวหลวงแหลมชมพู/ปทุม/ปัทมา/โกกระณต/ชมพู

1.3.4 บัวหลวงซ้อนขาว/สัตตบุษย์/ฉัตรขาว/ขาวซ้อน

1.3.5 บัวหลวงซ้อนชมพู/สัตตบงกช/ฉัตรชมพู/ชมพูซ้อน

1.3.6 บัวหลวงอุดรธานี

ทั้งนี้เพื่อสนับสนุนการจำแนกลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) ซึ่งได้ทำมาแล้ว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบลายพิมพ์เอสอาร์เอพีของพันธุ์บัวหลวงพื้นเมือง 6 พันธุ์

1.4.2 ทราบเครื่องหมายเอสอาร์เอพีที่สามารถจำแนกพันธุ์บัวหลวงพื้นเมืองได้

1.4.3 สนับสนุนการจำแนกลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของบัวหลวง

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaerth.) เป็นพันธุ์ไม้น้ำล้มลุกที่มีอายุหลายปี ลำต้นมีลักษณะเป็นเหง้า ไหล หรือหัวอยู่ในดินใต้น้ำ ใบเป็นใบเดี่ยวรูปร่างค่อนข้างกลมและกว้าง โดยเจริญมาจากลำต้นและมีก้านใบส่งขึ้นมาจากใต้น้ำ ดอกเป็นดอกเดี่ยวที่สมบูรณ์เพศ มีรูปร่างและสีสันของดอกสวยงาม จนได้รับการขนานนามว่าเป็นราชินีแห่งไม้น้ำ นิยมปลูกประดับในวัดและสถานที่สำคัญ รวมทั้งบริเวณบ้านเรือน (ปริมลาภ และ เสริมลาภ, 2547)

บัวหลวงเป็นพืชที่มีคุณูปการและอยู่คู่กับวิถีชีวิตของคนไทยมาตั้งแต่โบราณ โดยนิยมนำดอกบัวมาบูชาพระและใช้ในพิธีทางศาสนา เป็นสัญลักษณ์ของความบริสุทธิ์และคุณงามความดีตามคตินิยมของพุทธศาสนิกชนทั่วไป เหง้า ไหล และเมล็ดบัวหลวงสามารถนำมาประกอบอาหารได้ นอกจากนี้บัวหลวงยังทรงคุณค่าด้านสมุนไพรอย่างยิ่ง ส่วนต่างๆ ของบัวหลวงที่เป็นยาหรือประกอบเครื่องสมุนไพร ได้แก่ เมล็ด ฝัก ก้าน เหง้า ใบ ดอก และเกสรตัวผู้ เป็นต้น

บัวหลวงที่พบในประเทศไทย (สุปราณี, 2540; สุปรียา, 2546) สามารถแบ่งตามรูปร่างลักษณะและสีของดอกเป็น 4 ชนิด ได้แก่

1. บัวหลวงขาว (Hindu lotus) หรือบุณฑริก ปุณฑริก และบัวแหลมขาว มีดอกตูมรูปไข่ ดอกบานมีขนาดใหญ่ ปลายกลีบเรียว และมีกลีบดอกชั้นเดียว

2. บัวฉัตรขาว (Magnolia lotus) หรือสัตตบุษย์ บัวป้อมขาว และบัวหลวงขาวซ้อน มีดอกตูมป้อม ดอกบานมีขนาดใหญ่และกลีบดอกซ้อนกันหลายชั้น

3. บัวหลวงชมพู (East Indian lotus) หรือปทุม ปัทมา และโกกระณต ถ้ามีสีชมพูเข้มเรียกว่าบัวหลวงแดงหรือบัวแหลมแดง มีดอกตูมรูปไข่ ดอกบานขนาดใหญ่ ปลายกลีบเรียว และกลีบดอกชั้นเดียว

4. บัวฉัตรแดง (Roseum plenum) หรือบัวหลวงป้อมแดง และสัตตบงกช มีดอกตูมป้อม ดอกบานขนาดใหญ่และกลีบดอกซ้อนหลายชั้น

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ปัจจุบันเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลพัฒนาไปมากและเข้ามามีบทบาทในสาขาวิชาต่างๆ มากมาย ดังจะเห็นได้จากการใช้เทคโนโลยีชีวภาพและเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์ พัฒนาอุตสาหกรรมบางประเภท หรือใช้ในการตรวจวินิจฉัยและทำนายโรคในทางการแพทย์ เป็นต้น นอกจากนั้นยังสามารถใช้เทคนิคนี้ในการจำแนก (identify) ลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิต ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกันหรือแม้แต่ระหว่างพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดใดๆ ที่มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ซึ่งเป็นการตรวจสอบดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต เทคนิคการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลายวิธี ได้แก่ อาร์เอพีดี (RAPD; random amplified polymorphic DNA) (William และคณะ, 1990) เอเอฟแอลพี (AFLP; amplified fragment length polymorphism) (Vos และคณะ, 1995) เอสอาร์เอพี (SRAP; sequence-related amplified polymorphism) (Li และ Quiros, 2001) เป็นต้น โดยเครื่องหมายทางโมเลกุลเหล่านี้เรียกว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) วิธีตรวจสอบเหล่านี้เป็นการตรวจสอบแบบสุ่ม สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งในคราวเดียวกัน โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR; polymerase chain reaction) ประยุกต์หรือวิธีพีซีอาร์ที่มีไพรเมอร์จำเพาะและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่แน่นอน ซึ่งอาจพบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากต่างพันธุ์กัน และสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจำแนกพันธุ์ได้

นฤมล และ มานะ (2549) ได้ตรวจสอบดีเอ็นเอบัวหลวง 6 พันธุ์ พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จากเทคนิคอาร์เอพีดีมีความแตกต่างกันและแถบดีเอ็นเอบางแถบสามารถใช้เป็นเครื่องหมายอาร์เอพีดีในการจำแนกพันธุ์บัวหลวงได้ โดยพบว่าบางครั้งไม่สามารถตรวจสอบซ้ำได้ เนื่องจากข้อจำกัดของเทคนิคดังกล่าว

เอสอาร์เอพีเป็นเทคนิคที่พัฒนาและคิดค้นโดย Li และ Quiros (2001) โดยนำดีเอ็นเอจีโนม (genomic DNA) มาเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ (1) ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (forward primer) มีขนาด 17 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) โดยบริเวณปลาย 5′ มี core sequence 14 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย filler sequence 10 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งสังเคราะห์แบบสุ่ม (random) ตามด้วยนิวคลีโอไทด์ CCGG และบริเวณปลาย 3′ มีนิวคลีโอไทด์ที่ใช้สำหรับการคัดเลือก (selective base) 3 นิวคลีโอไทด์ และ (2) ไพเมอร์รีเวิร์ส (reverse primer) มีขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ โดยบริเวณปลาย 5′ มี core sequence 15 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย filler sequence 11 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นคนละชนิดกับไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด ตามด้วยนิวคลีโอไทด์ AATT และนิวคลีโอไทด์ที่ใช้สำหรับการคัดเลือก 3 นิวคลีโอไทด์ หลังจากนั้น

จึงตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลโพลีอะคริลาไมด์แบบเปลี่ยนลักษณะธรรมชาติ (denaturing polyacrylamide gel)

Li และ Quiros ได้เปรียบเทียบเอสอาร์เอพีและเอเอฟแอลพีในการทำแผนที่ยีนเพื่อติดตามยีน *GLS-ALK* ในลูกผสมระหว่างพันธุ์เดิมและสายพันธุ์ที่เป็น double haploid ของ *Brassica oleracea* L. พบว่าเทคนิคเอสอาร์เอพีจะครอบคลุมส่วนต่างๆ ของยีโนม สามารถทำการทดสอบซ้ำได้ผลเหมือนเดิม และยังตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่แสดงลักษณะ co-dominant ในเปอร์เซ็นต์สูง

Budak และคณะ (2004) ใช้เทคนิคเอสอาร์เอพีศึกษาความหลากหลายของหญ้า buffalograss ในอเมริกาเหนือ พบว่าเอสอาร์เอพีเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) และสามารถแยกยีโนไทป์ (genotype) ใหม่ได้ นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์วิวัฒนาการและวิเคราะห์ประวัติการพัฒนาพันธุ์ของหญ้า buffalograss ได้

Liu และคณะ (2008) ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ 3 ชนิด ได้แก่ อาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) ไอเอสเอสอาร์ (ISSR, inter-simple sequence repeat) และเอสอาร์เอพีเพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแรดีส (radish) พันธุ์ปลูกที่มีลักษณะ bolting ช้า จำนวน 35 พันธุ์ พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 3 ชนิด ให้ผลสอดคล้องกันและมีประสิทธิภาพในการจำแนกและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ดีเท่าเทียมกัน

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 บัวหลวง 6 พันธุ์ ที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ดังรายละเอียดในตารางที่ 1 นำมาปลูกและใช้ใบอ่อนสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

ตารางที่ 1 บัวหลวง 6 พันธุ์ ที่ใช้ในการทำวิจัย

หมายเลข	ชื่อพันธุ์บัวหลวง	แหล่งที่มา
1	บัวหลวงพระราชินี	ปางอุบล จ.นนทบุรี
2	บัวหลวงแหลมขาว บุณฑริก ปุณฑริก หรือขาวแก้ว	อ.บางใหญ่ จ.นนทบุรี
3	บัวหลวงแหลมชมพู ปทุม ปัทมา โกกระณต หรือชมพู	อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี
4	บัวหลวงซ้อนขาว สัตตบุษย์ บัวฉัตรขาว หรือขาวซ้อน	อ.บางใหญ่ นนทบุรี
5	บัวหลวงซ้อนชมพู สัตตบงกช บัวฉัตรชมพู หรือชมพูซ้อน	อ.บางใหญ่ นนทบุรี
6	บัวหลวงอุดรธานี	อ.เมือง จ.อุดรธานี

3.1.2 สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้

3.2 วิธีการ

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากเนื้อเยื่อ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยวิธีประยุกต์จาก Agrawal และคณะ (1992) ดังนี้

3.2.1.1 ใช้ใบบัวหลวง ประมาณ 2-5 กรัม โดยเลือกใบที่โตพอสมควรแต่ยังไม่แก่ จัดใส่ลงในโกร่ง เติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วมบดให้ละเอียด ปล่อยให้ไนโตรเจนเหลวระเหยไปจนหมด แล้วจึงถ่ายผงใบลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 มิลลิลิตร ซึ่งมี extraction buffer (4% hexadecyltrimethyl ammonium bromide หรือ CTAB, 2.8 M NaCl, 40 mM EDTA, 200 mM Tris HCl pH 8.0) 10 มิลลิลิตร และ 2-mercaptoethanol 20 ไมโครลิตร ที่อุ่นไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส

3.2.1.2 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง ทุก 10 นาที

3.2.1.3 นำหลอดมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 10 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ

3.2.1.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำและคลอโรฟอร์มออกจากกัน

3.2.1.5 ดูดน้ำใสส่วนบนใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติม linear polyacrylamide 140 ไมโครลิตร และ isopropanol 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.2.1.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2.1.7 เทส่วนน้ำทิ้งและล้างตะกอนด้วย washing buffer (10 mM sodium acetate, 70% ethanol) ปล่อยให้ตะกอนแห้งในอากาศ แล้วละลายตะกอนใน RNase buffer (10 mM Tris HCl pH 8.0, 15 mM NaCl) 500 ไมโครลิตร

3.2.1.8 ถ่ายใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม RNase (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.2.1.9 สกัดด้วย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) 1 ครั้ง และสกัดด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) อีก 1 ครั้ง

3.2.1.10 ดูดน้ำใสที่มีดีเอ็นเอใส่ลงในหลอดใหม่ แล้วเติม linear polyacrylamide 70 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 3 M Sodium acetate pH 5.2 40 ไมโครลิตร และ absolute ethanol 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.2.1.11 นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 15,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2.1.12 เทส่วนน้ำทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วจึงละลายตะกอนใน TE buffer (10 mM Tris HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 200-300 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ต่อไป

3.2.2 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

หาความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เตรียมได้โดยนำมาทำให้เจือจางในปริมาณพอเหมาะ แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของ

ดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่าง และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook และคณะ, 1989)

3.2.3 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี (SRAP; sequence-related amplified polymorphism) ประยุกต์จาก Li และ Quiros (2001) (ตารางที่ 2) โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใบบัวหลวง 6 ตัวอย่าง ด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR; polymerase chain reaction) ซึ่งมีส่วนประกอบ คือ ดีเอ็นเอ (50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) 2.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (forward primer, 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) 1.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์รีเวิร์ส (reverse primer, 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) 1.0 ไมโครลิตร dNTP mix (2 mM) 2.0 ไมโครลิตร 10x PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50 mM) 2.0 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 0.1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 9.9 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 20.0 ไมโครลิตร

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมที่ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ (1) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำปฏิกิริยา 5 รอบ และ (2) อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำปฏิกิริยา 35 รอบ หลังจากนั้นตรวจสอบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) 6 เปอร์เซ็นต์

3.2.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเจลโพลีอะคริลาไมด์

1. การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

1.1 นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น

1.2 กระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหูกระต่าย เช็ดด้วย repel silane ให้ทั่ว เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที

1.3 เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 2 ไมโครลิตร, glacial acetic acid 5 ไมโครลิตร และเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร) เพื่อให้เจลติดกับกระจก

1.4 นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุดโดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้าง เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสองโดยหันด้านที่ทา bind silane และ repel silane เข้าหากัน ใช้คลิบหนีบยึดให้อยู่คงที่

ว
583.3
ก274ร
2549
ค.3

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาเอสอาร์เอพี

ไพรเมอร์	ชนิด	ลำดับเบส (5′→3′)
A1	Forward	TGAGTCCAAACCGGAAT
A2	Forward	TGAGTCCAAACCGGATA
A3	Forward	TGAGTCCAAACCGGAAG
A4	Forward	TGAGTCCAAACCGGAGA
A5	Forward	TGAGTCCAAACCGGAGC
A6	Forward	TGAGTCCAAACCGGACG
A7	Forward	TGAGTCCAAACCGGATC
A8	Forward	TGAGTCCAAACCGGACT
A9	Forward	TGAGTCCAAACCGGATG
A10	Forward	TGAGTCCAAACCGGACC
A11	Forward	TGAGTCCAAACCGGATT
A12	Forward	TGAGTCCAAACCGGACA
B1	Reverse	GACTGCGTACGAATTAAT
B2	Reverse	GACTGCGTACGAATTTGC
B3	Reverse	GACTGCGTACGAATTGCT
B4	Reverse	GACTGCGTACGAATTCAC
B5	Reverse	GACTGCGTACGAATTAGT
B6	Reverse	GACTGCGTACGAATTTCC
B7	Reverse	GACTGCGTACGAATTCAT
B8	Reverse	GACTGCGTACGAATTGGA
B9	Reverse	GACTGCGTACGAATTTGA
B10	Reverse	GACTGCGTACGAATTCTA
B11	Reverse	GACTGCGTACGAATTTCA
B12	Reverse	GACTGCGTACGAATTGTT
B13	Reverse	GACTGCGTACGAATTCGA
B14	Reverse	GTACGAATTAGACTGCCT

2. การเตรียมเจลโพลีอะคริลาไมด์

เตรียมเจลโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (acrylamide : bisacrylamide = 19:1) ในยูเรียเข็มข้น 7.5 โมลาร์ ปริมาตรรวม 20 มิลลิลิตร โดยชั่งยูเรีย 9 กรัม, น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร, 5x TBE buffer 4 มิลลิลิตร ผสมสารละลายในบีกเกอร์ค่อยๆ เขย่าให้ยูเรียละลายหมด แล้วเติมอะคริลาไมด์ 30 เปอร์เซ็นต์ 4 มิลลิลิตร, แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ 200 ไมโครลิตร และ N,N,N′,N′-tetramethylenediamine (TEMED) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว เทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ แล้วใส่หวีเข้าด้านบน ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง (5x TBE buffer : Tris-base 54 กรัม, boric acid 27.5 กรัม, 0.5 M EDTA pH 8.0 20 มิลลิลิตร ในปริมาตรรวม 1 ลิตร)

3. การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำสารละลายดีเอ็นเอ 3.5 ไมโครลิตร มาเติม loading buffer (formamide 98 เปอร์เซ็นต์, 10 mM EDTA, bromphenol blue 0.05 เปอร์เซ็นต์, xylene cyanol 0.05 เปอร์เซ็นต์) 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีพร้อมสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วใช้น้ำล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด ดึงหวีออก ประกอบกระจกเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วเติม TBE buffer ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง

2. ต่อสายไฟเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส เปิดกระแสไฟฟ้าทำ pre-run 300 โวลต์ เป็นเวลา 20-30 นาที

3. ปิดเครื่อง ใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มดูดบัฟเฟอร์มาล้างยูเรียที่อยู่ในช่องหวีแต่ละช่องให้หมด

4. หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 3-5 ไมโครลิตร ลงในแต่ละช่อง

5. เปิดเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 300 โวลต์ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือจนกว่าสี xylene cyanol (สีบน) จะเคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล

6. เมื่อครบเวลาปิดเครื่อง ดูดบัฟเฟอร์จากช่องด้านบนออก นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้ง 2 แผ่นออกจากกัน เจลจะติดอยู่กับกระจกแผ่นหลังที่เป็นสี่เหลี่ยมตรง นำเจลไปย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

4. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

1. นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาล้างในน้ำกลั่น เป็นเวลา 3-5 นาที พร้อมกับเขย่าเบาๆ

2. แช่ในสารละลาย CTAB ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที พร้อมเขย่าเบาๆ อย่างต่อเนื่อง

3. แช่แผ่นเจลในสารละลายแอมโมเนียความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา

4. แช่แผ่นเจลในสารละลายซิลเวอร์ที่เตรียมใหม่ๆ เป็นเวลา 20 นาที โดยเขย่าอย่างสม่ำเสมอ (ชั่งซิลเวอร์ไนเตรท 0.4 กรัม เติมน้ำ 250 มิลลิลิตร และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข็มข้น 1 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร คนให้ละลายจะได้สารละลายขุ่นสีน้ำตาล ค่อยๆ เติมสารละลายแอมโมเนียเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ โดยค่อยๆ เติมทีละหยดจนสารละลายใสจึงเพิ่มอีก 2 หยด)

5. แล้วนำแผ่นเจลออกมาล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

6. ย้ายแผ่นเจลมาใส่ในสารละลาย developer ที่เตรียมใหม่ๆ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เขย่าอย่างสม่ำเสมอ เป็นเวลา 5-25 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน (สารละลาย developer ประกอบด้วย sodium carbonate 2 เปอร์เซ็นต์ และ formaldehyde 0.02 เปอร์เซ็นต์)

7.นำแผ่นเจลมาล้างน้ำอย่างรวดเร็ว

8. หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลมาใส่ในสารละลายกลีเซอรอล 1.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที แล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ

3.2.5 การวิเคราะห์ผล

1. เปรียบเทียบแถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำเทคนิคเอสอาร์เอพีในบัวหลวงพันธุ์ต่างๆ บันทึกแบบแผนของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์แต่ละชนิดและผลรวมที่ได้จากไพรเมอร์ทั้งหมดเพื่อใช้แยกพันธุ์บัวหลวง

2. หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างบัวหลวงแต่ละพันธุ์ โดยเปรียบเทียบจากความเหมือนและแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น/ พันธุ์ที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งให้สัญลักษณ์เป็น + ส่วนพันธุ์ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นให้สัญลักษณ์เป็น -

แล้วเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดจากทุกพันธุ์โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และจัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA)

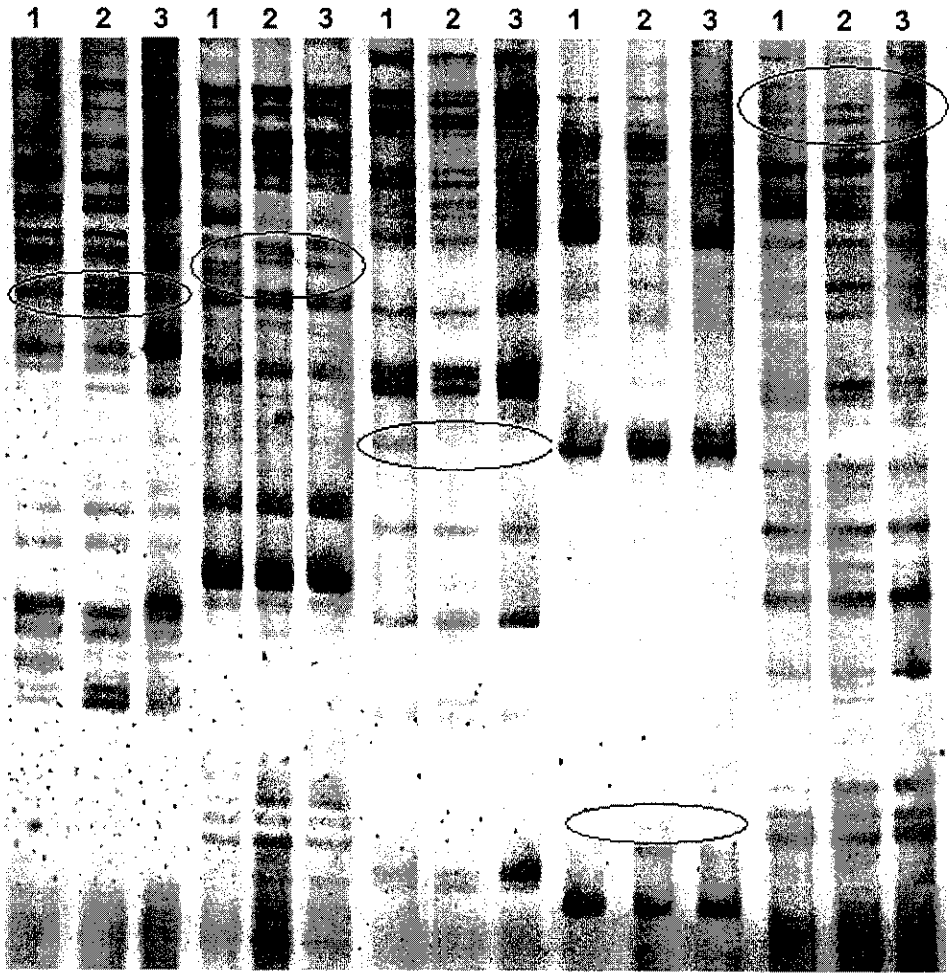
บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวงด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี

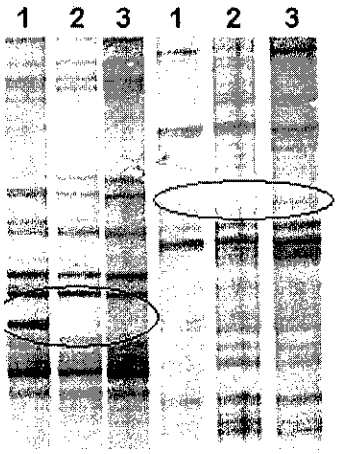
การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) บัวหลวงด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 120 คู่ ตรวจสอบดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมาสัตตบุษย์ และพระราชินี พบว่าไพรเมอร์ 119 คู่ หรือคิดเป็น 99.17 เปอร์เซ็นต์ ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงได้ และมีไพรเมอร์ที่ไม่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 1 คู่ คือไพรเมอร์ B7-CAT/A12-CA (ภาพที่ 1-10 และ ตารางที่ 3)

เมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวง 6 พันธุ์ ด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยคัดเลือกไพรเมอร์มา 40 คู่ พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 744 แถบ (ภาพที่ 11-24) และมีแถบดีเอ็นเอ 9 แถบ ขนาดประมาณ 120-450 คู่เบส (bp) ที่ให้ความแตกต่างในลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ 7 คู่ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละคู่ไพรเมอร์นั้นปรากฏแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์บัวหลวง 1-3 แถบ (ตารางที่ 4) โดยแถบดีเอ็นเอเหล่านี้สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) สำหรับจำแนกพันธุ์บัวหลวงได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคเอสอาร์เอพีที่พัฒนาขึ้นนี้เพื่อจำแนกพันธุ์บัวหลวงได้เช่นเดียวกับบทความวิจัยที่เคยรายงานในเห็ดหลินจือ (Sun *et al.*, 2006) และกระเจี๊ยบเขียว (*Abelmoschus esculentus*) (Gulsen *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงได้ด้วย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนอนุรักษ์และจัดการทรัพยากรบัวหลวงอย่างเหมาะสมต่อไป

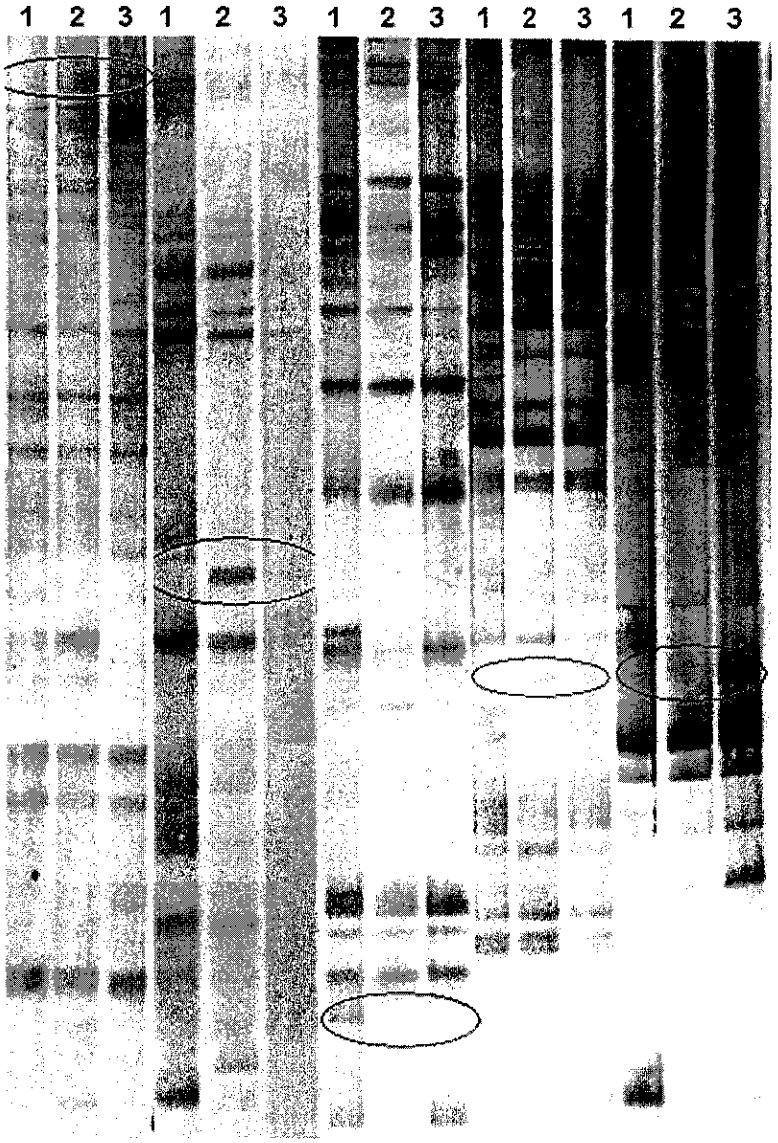
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัย 39



ภาพที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 5 คู่ คือ B1-AAT/A2-TA, B1-AAT/A3-AG, B1-AAT/A4-GA, B1-AAT/A4-GA และ B1-AAT/A7-TC ตามลำดับ (1 คือดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมา, 2 คือดีเอ็นเอบัวหลวงสัตตบุษย์ และ 3 คือดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี)

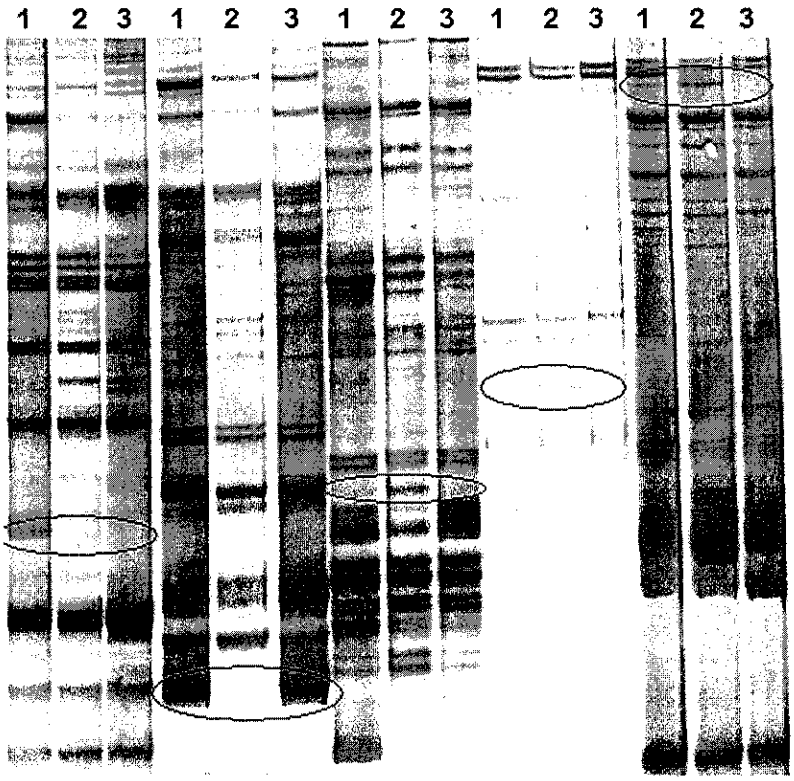


ภาพที่ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 2 คู่ คือ B2-TGC/A5-GC และ B2-TGC/A6-CG ตามลำดับ (1 คือดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมา, 2 คือดีเอ็นเอบัวหลวงสัตตบุษย์ และ 3 คือดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี)



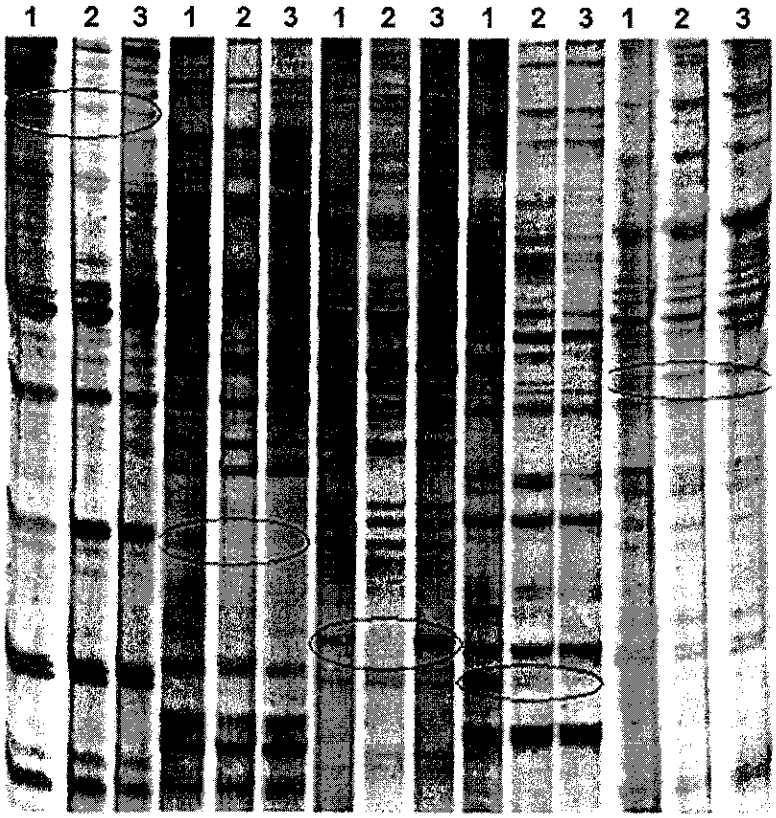
<u>ภาพที่ 3</u> ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 5 คู่ คือ B3-GCT/A3-AG, B3-GCT/A6-CG, B3-GCT/A8-CT, B3-GCT/A9-TG และ B3-GCT/A10-CC ตามลำดับ (1 คือดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมา, 2 คือดีเอ็นเอบัวหลวงสัตตบุษย์ และ 3 คือดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี)

ภาพที่ 4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 4 คู่ คือ B4-CAC/A2-TA, B4-CAC/A5-GC, B4-CAC/A9-TG และ B4-CAC/A11-TT ตามลำดับ (1 คือดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมา, 2 คือดีเอ็นเอบัวหลวงสัตตบุษย์ และ 3 คือดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี)

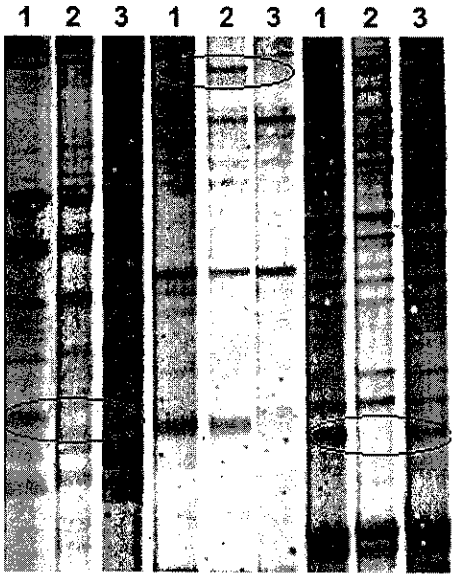


ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 5 คู่ คือ B5-AGT/A5-GC, B5-AGT/A6-CG, B5-AGT/A7-TC, B5-AGT/A8-CT และ B5-AGT/A11-TT ตามลำดับ (1 คือดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมา, 2 คือดีเอ็นเอบัวหลวงสัตตบุษย์ และ 3 คือดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี)

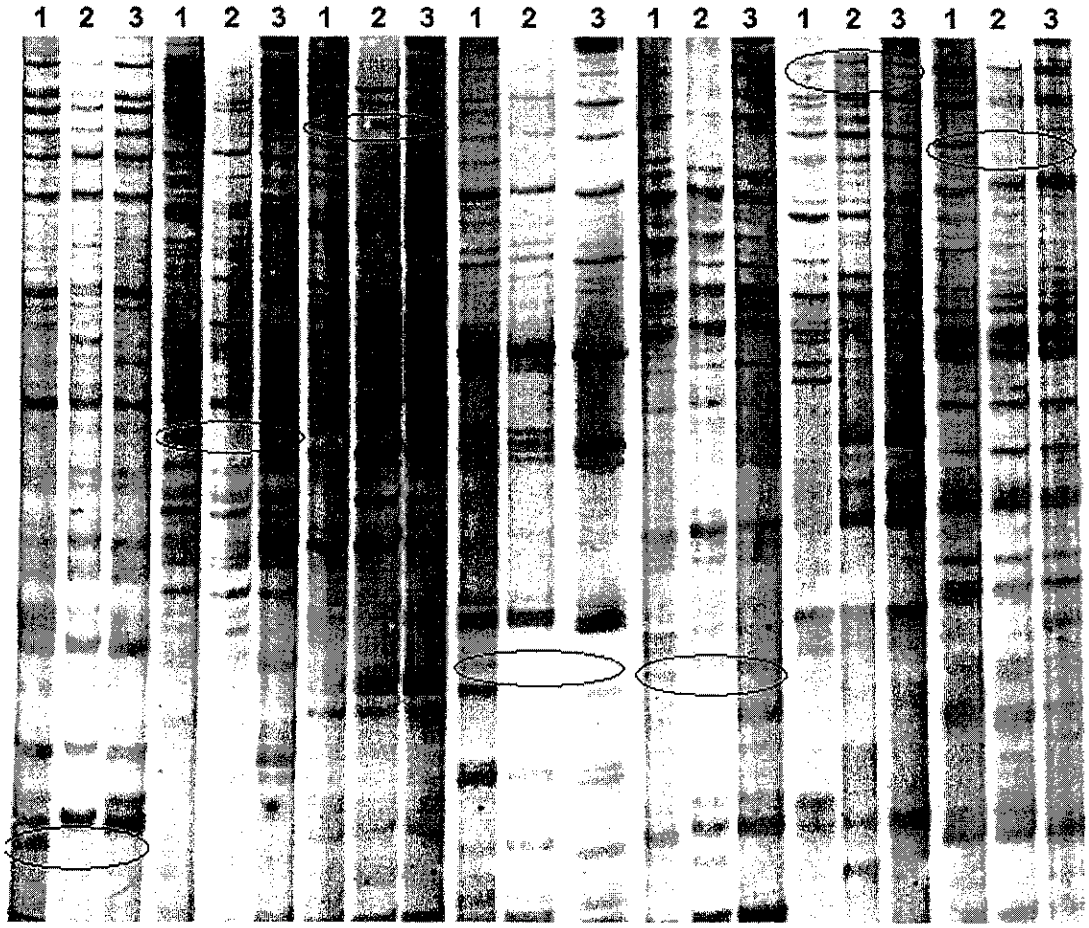
ภาพที่ 6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 1 คู่ คือ B6-TCC/A12-CA (1 คือดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมา, 2 คือดีเอ็นเอบัวหลวงสัตตบุษย์ และ 3 คือดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี)



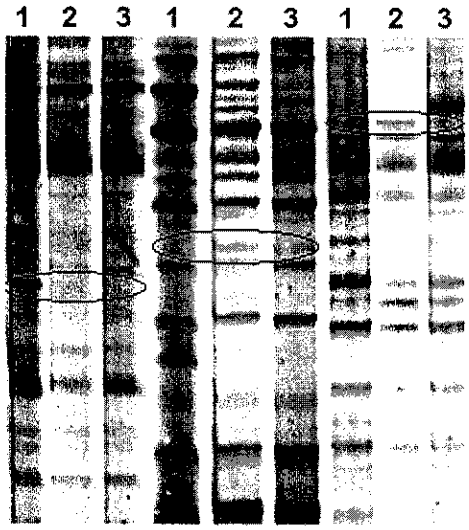
ภาพที่ 7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 5 คู่ คือ B7-CAT/A1-AT, B7-CAT/A3-AG, B7-CAT/A4-GA, B7-CAT/A5-GC และ B7-CAT/A10-CC ตามลำดับ (1 คือดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมา, 2 คือดีเอ็นเอบัวหลวงสัตตบุษย์ และ 3 คือดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี)



<u>ภาพที่ 8</u> ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 3 คู่ คือ B8-GGA/A4-GA, B8-GGA/A6-CG และ B8-GGA/A7-TC ตามลำดับ (1 คือดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมา, 2 คือดีเอ็นเอบัวหลวงสัตตบุษย์ และ 3 คือดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี)



ภาพที่ 9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 7 คู่ คือ B9-TGA/A2-TA, B9-TGA/A4-GA, B9-TGA/A4-GA, B9-TGA/A6-CG, B9-TGA/A7-TC, B9-TGA/A8-CT และ B9-TGA/A9-TG ตามลำดับ (1 คือดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมา, 2 คือดีเอ็นเอบัวหลวงสัตตบุษย์ และ 3 คือดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี)



ภาพที่ 10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่างบัวหลวงปัทมา สัตตบุษย์ และพระราชินี จำนวน 3 คู่ คือ B10-CTA/A3-AG, B10-CTA/A5-GC และ B10-CTA/A6-CG ตามลำดับ (1 คือดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมา, 2 คือดีเอ็นเอบัวหลวงสัตตบุษย์ และ 3 คือดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี)

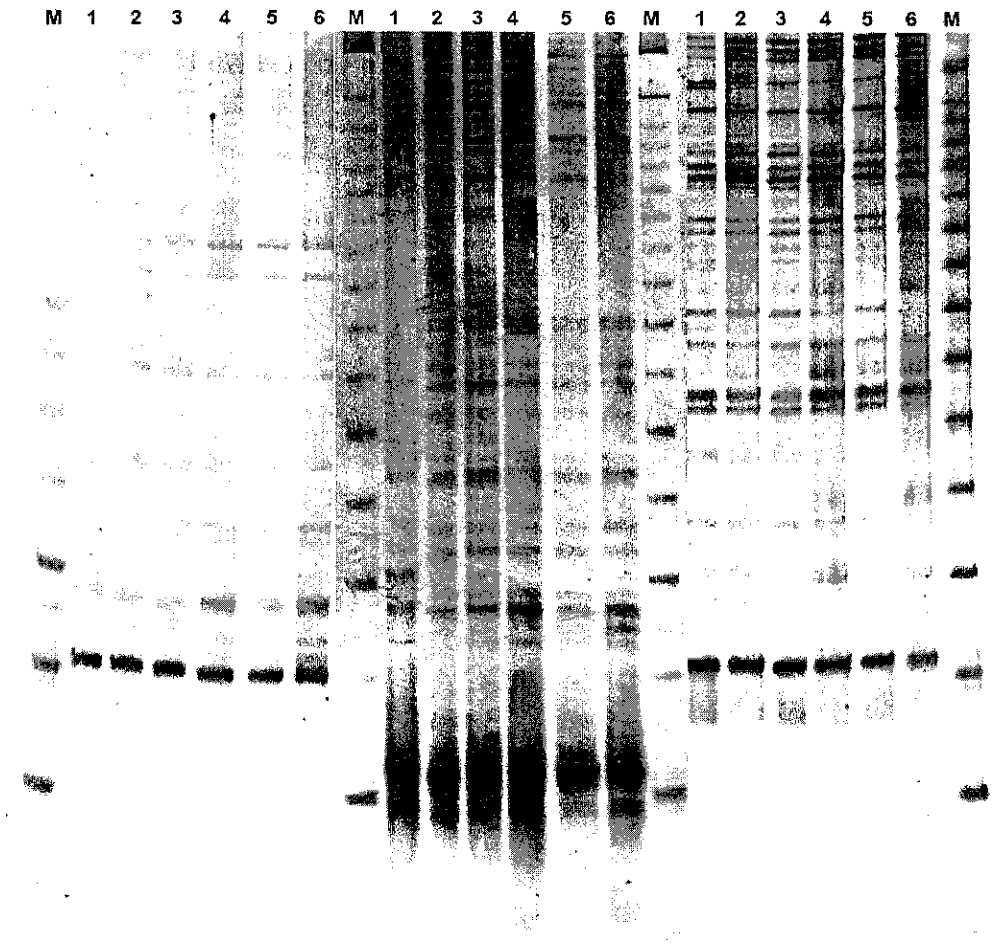
ตารางที่ 3 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยใช้ไพรเมอร์ 120 คู่ สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวงด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี

	B1- AAT	B2-TGC	B3-GCT	B4-CAC	B5-AGT	B6-TCC	B7-CAT	B8-GGA	B9-TGA	B10-CTA
A1-AT	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0
A2-TA	+	0	0	+	0	0	0	0	+	0
A3-AG	+	0	+	0	0	0	+	0	0	+
A4-GA	+	0	0	0	0	0	+	+	+	0
A5-GC	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+
A6-CG	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+
A7-TC	+	0	0	0	+	0	0	+	+	0
A8-CT	0	0	+	0	+	0	0	0	+	0
A9-TG	0	0	+	+	0	0	0	0	+	0
A10-CC	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0
A11-TT	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0
A12-CA	0	0	0	0	0	+	-	0	0	0

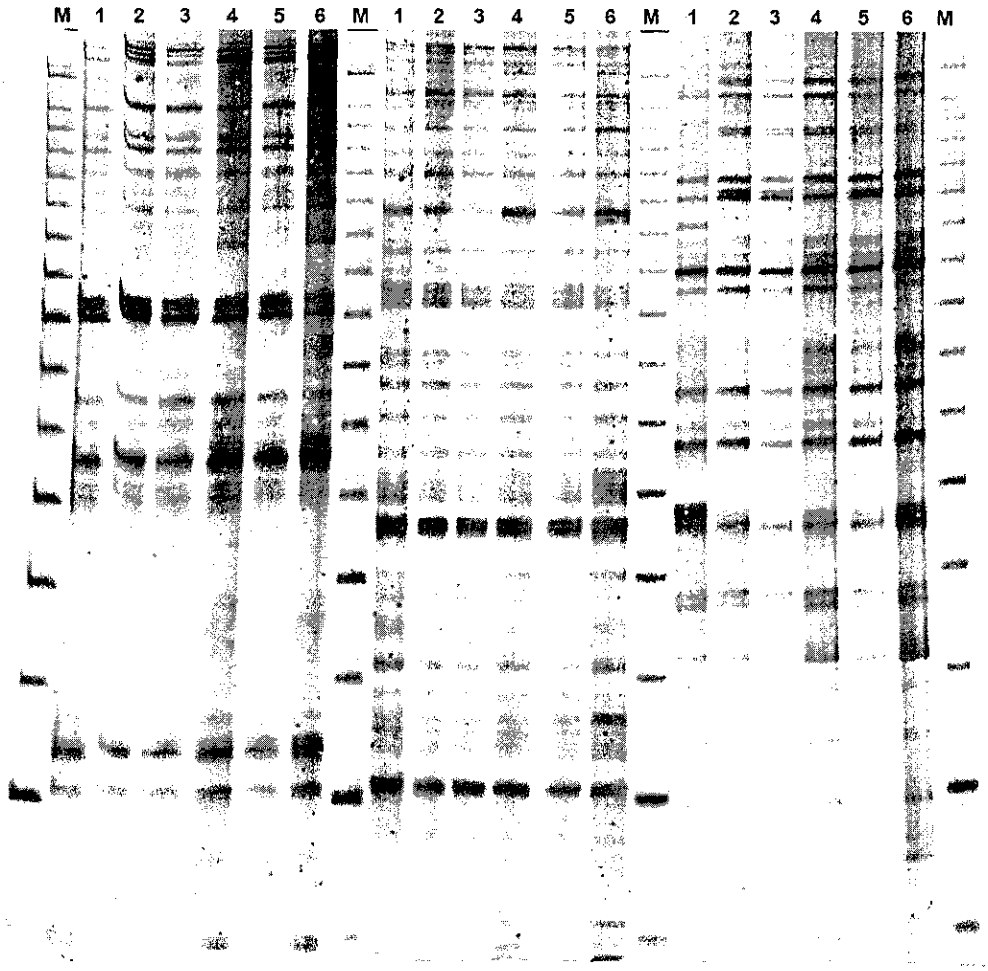
0 คือ ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

- คือ ไพรเมอร์ที่ไม่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

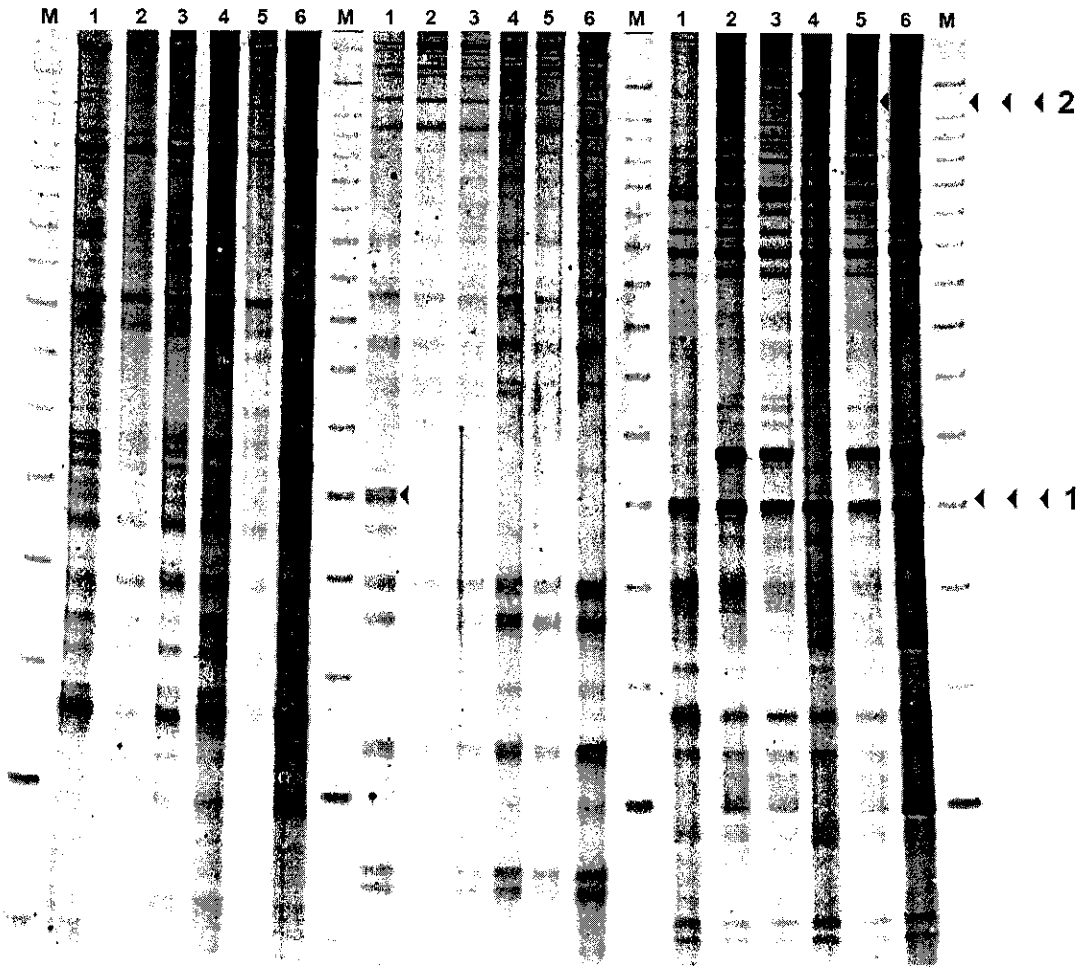
+ คือ ไพรเมอร์ที่เลือกไปใช้



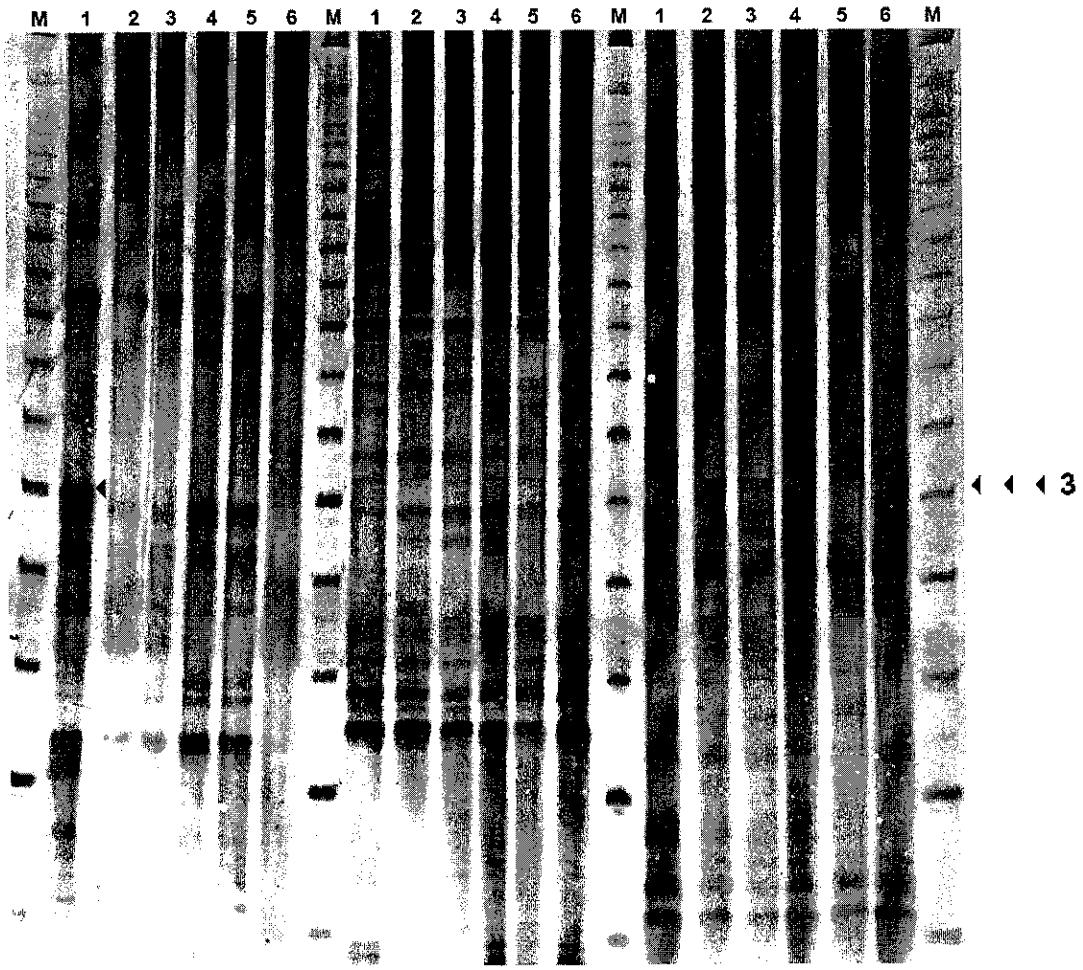
ภาพที่ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B1-AAT/A2-TA, B1-AAT/A3-AG และ B1-AAT/A4-GA ตามลำดับ [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-6 คือบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และอุดรธานี ตามลำดับ]



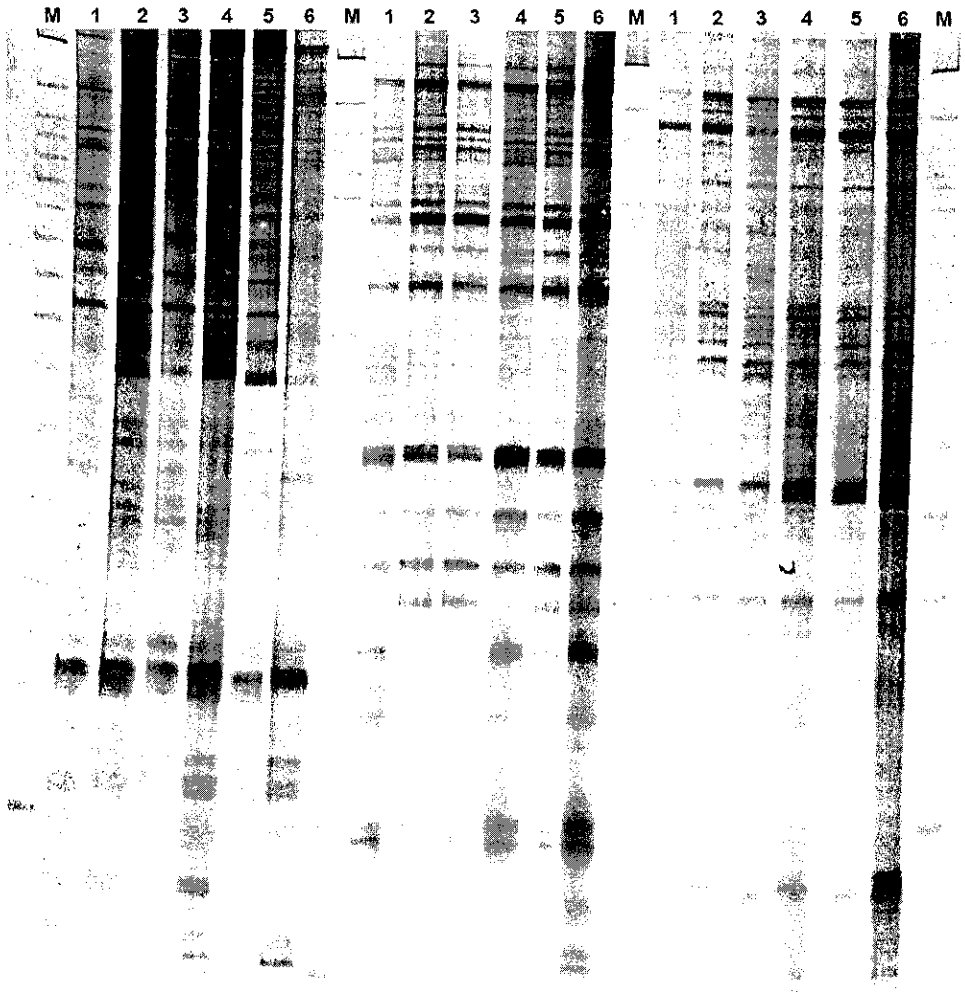
ภาพที่ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B1-AAT/A6-CG, B1-AAT/A7-TC และ B2-TCG/A5-GC ตามลำดับ [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-6 คือบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และอุดรธานี ตามลำดับ]



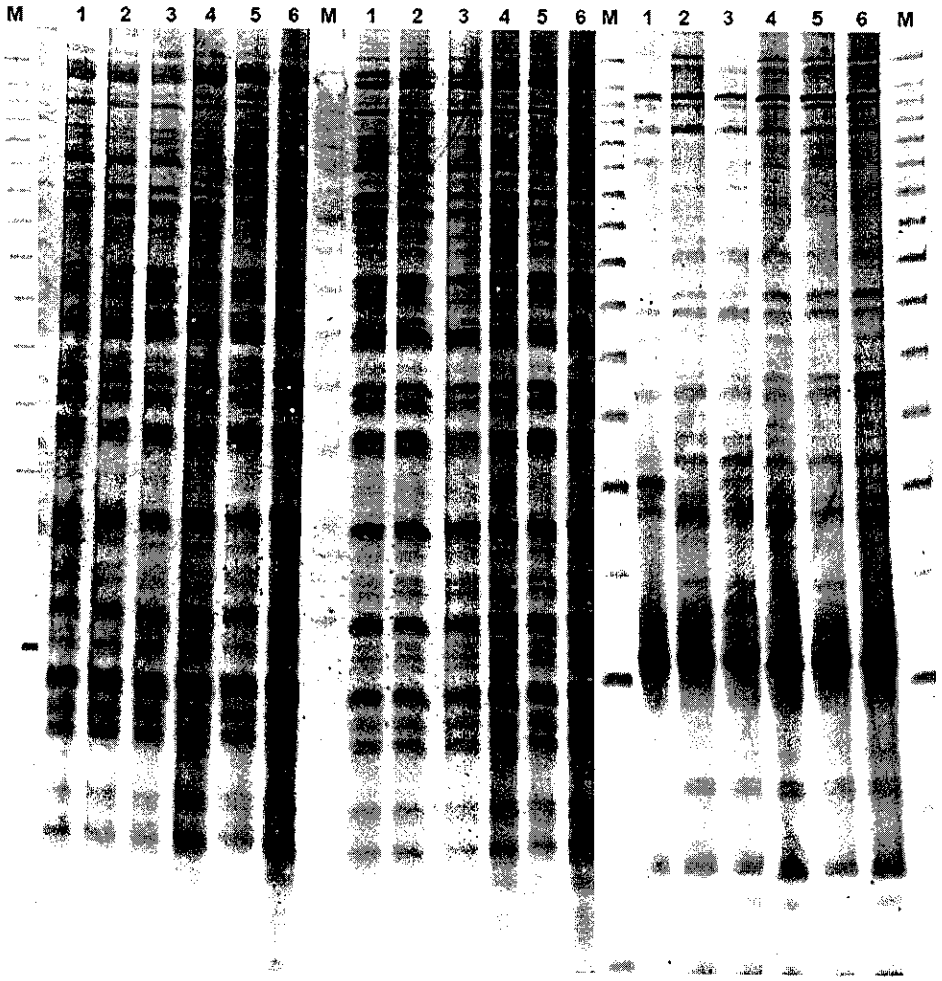
ภาพที่ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B2-TGC/A6-CG, B3-GCT/A3-AG และ B3-GCT/A6-CG ตามลำดับ [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-6 คือบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และอุดรธานี ตามลำดับ, ◀ ◀ ◀ 1 คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 195 bp ที่จำเพาะกับบัวหลวงพระราชินี, ◀ ◀ ◀ 2 คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 450 bp ที่จำเพาะกับบัวหลวงสัตตบงกช]



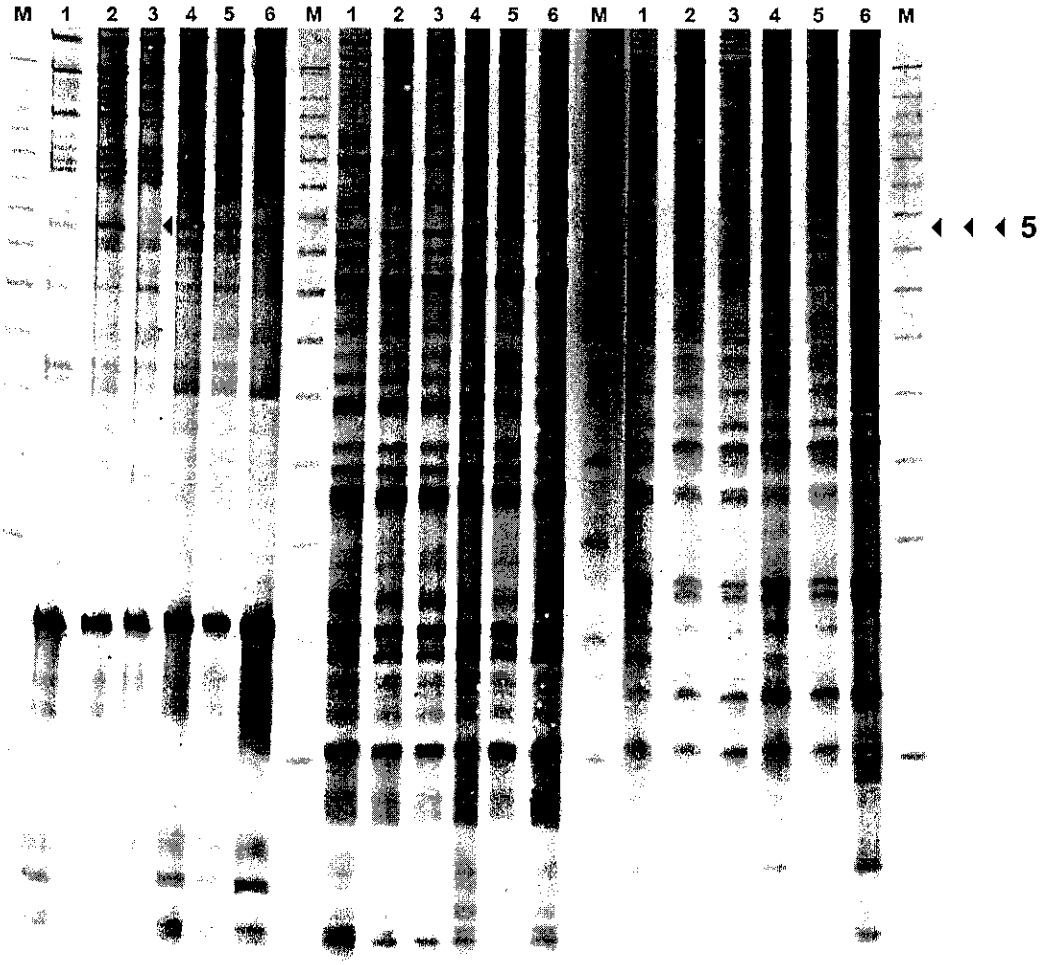
ภาพที่ 14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B3-GCT/A8-CT, B3-GCT/A9-TG และ B3-GCT/A10-CC ตามลำดับ [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-6 คือบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และอุดรธานี ตามลำดับ, ◀ ◀ ◀ 3 คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 200 bp ที่จำเพาะกับบัวหลวงพระราชินี]



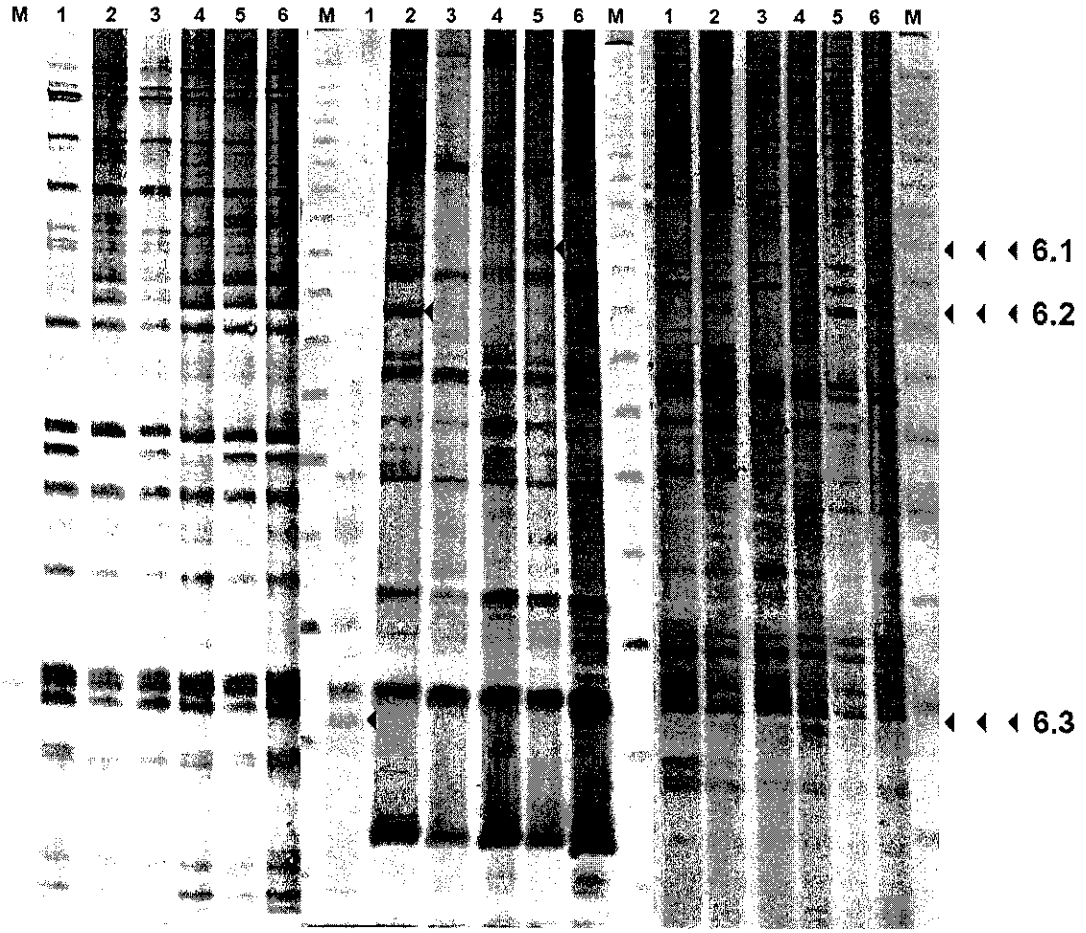
ภาพที่ 16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B4-CAC/A6-CG, B5-AGT/A5-GC และ B5-AGT/A6-CG ตามลำดับ [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-6 คือบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และอุดรธานี ตามลำดับ]



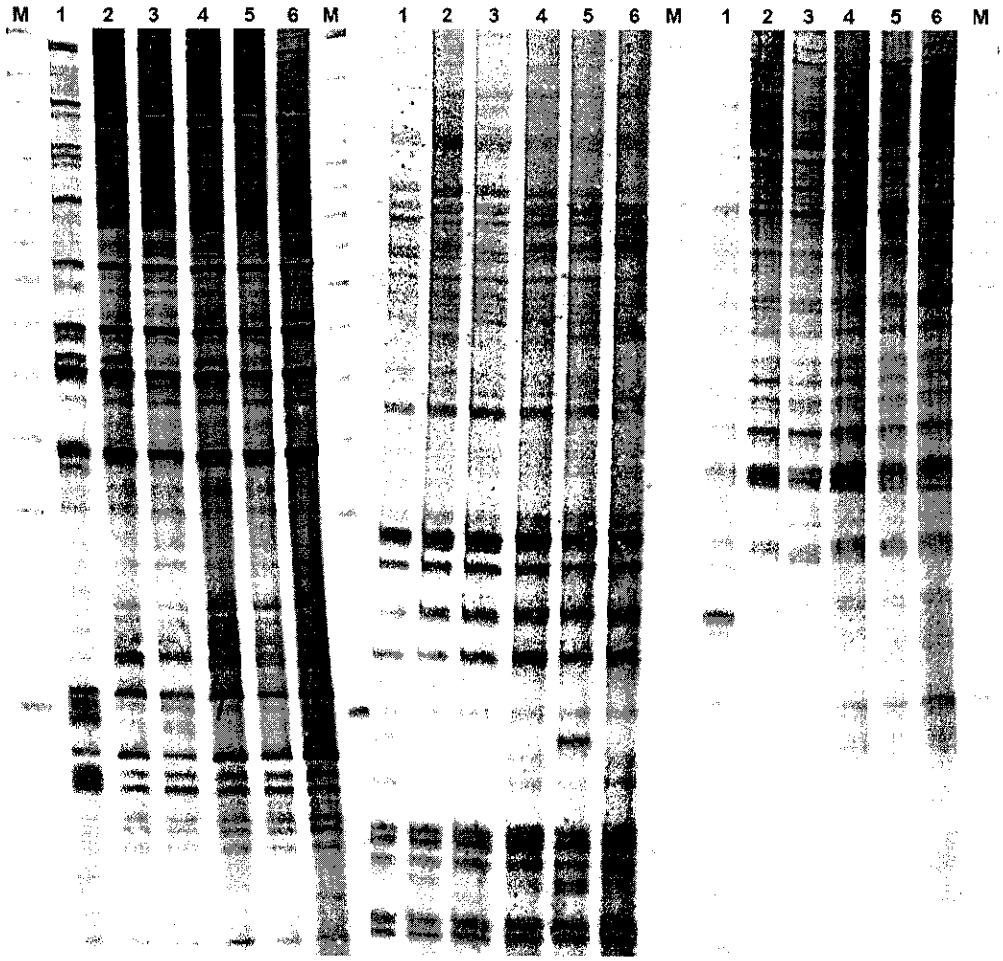
ภาพที่ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B5-AGT/A7-TC, B5-AGT/A8-CT และ B5-AGT/A11-TT ตามลำดับ [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-6 คือบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และอุดรธานี ตามลำดับ]



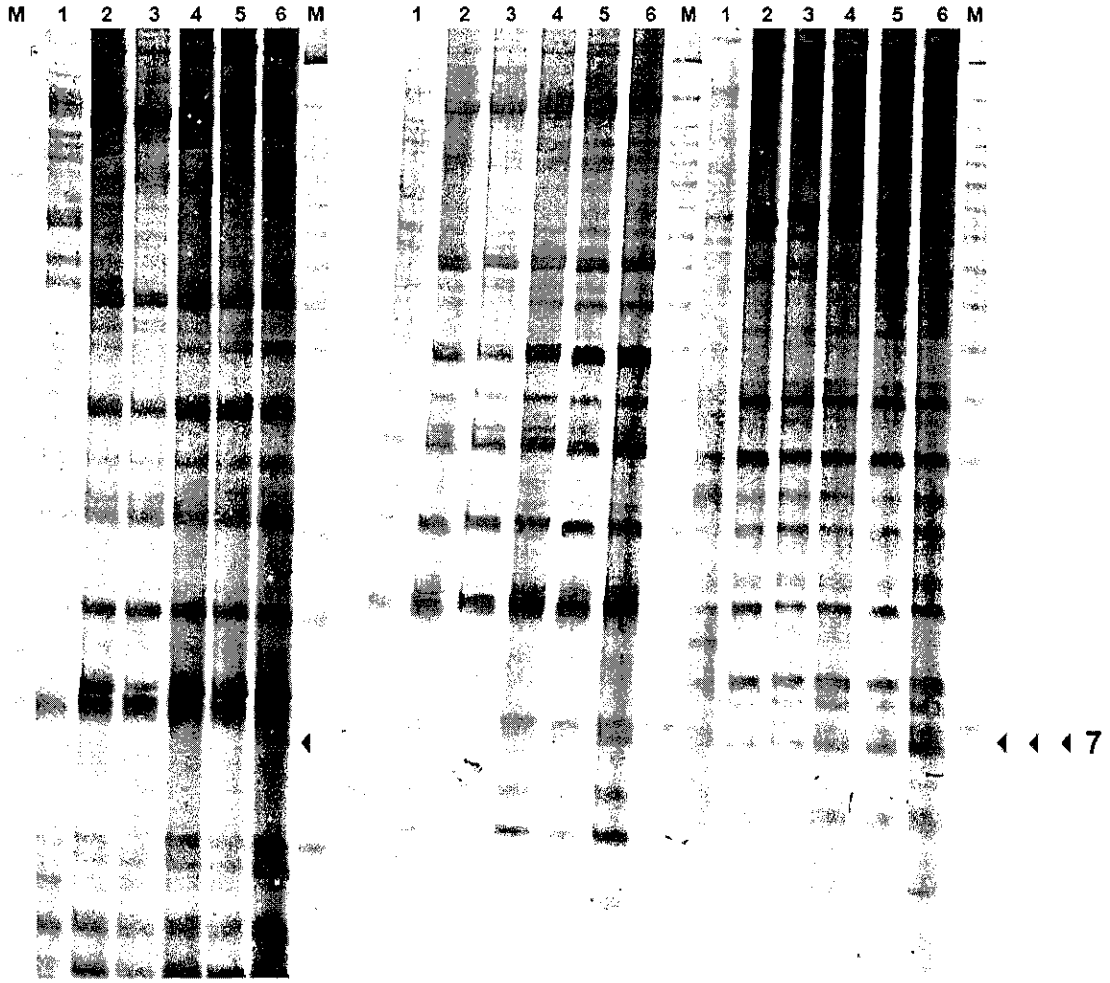
ภาพที่ 19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B7-CAT/A4-GA, B7-CAT/A5-GC และ B7-CAT/A10-CC ตามลำดับ [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-6 คือบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และอุดรธานี ตามลำดับ ◀ ◀ ◀ 5 คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 345 bp ที่จำเพาะกับบัวหลวงปัทมา]



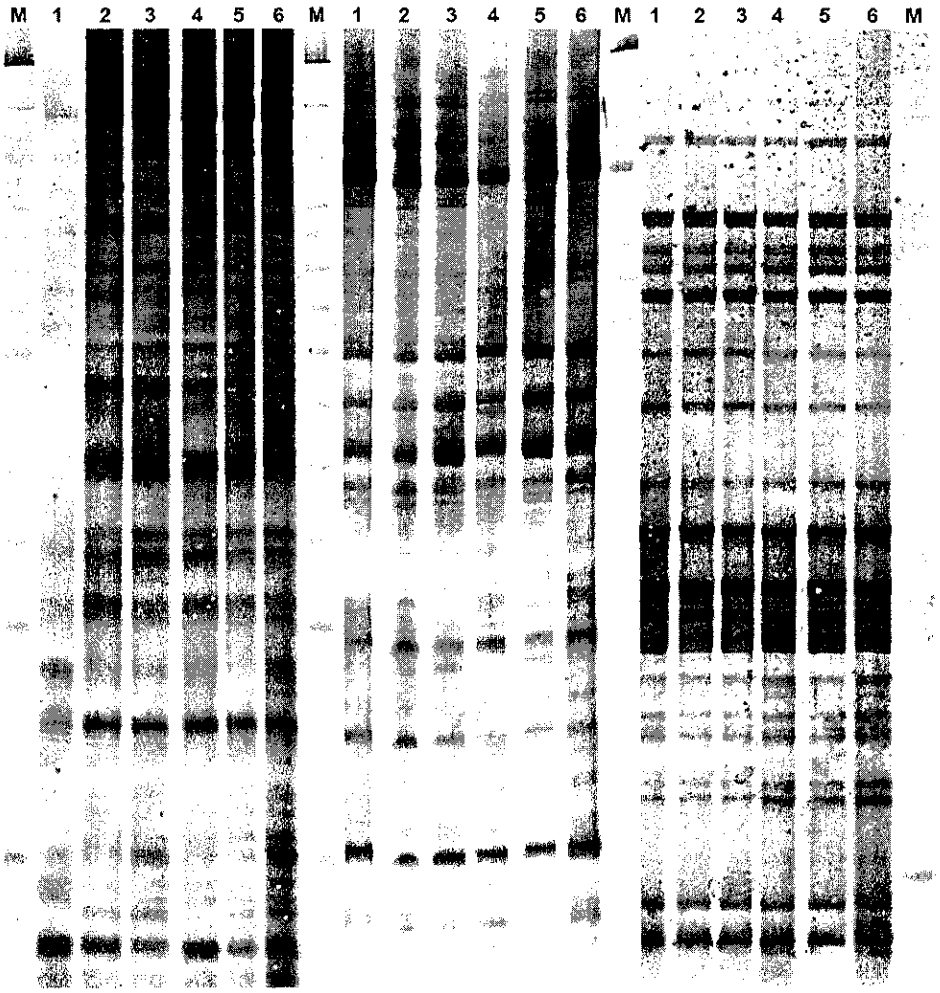
ภาพที่ 20 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B8-GGA/A4-GA, B8-GGA/A6-CG และ B8-GGA/A7-TC ตามลำดับ [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-6 คือบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และอุดรธานี ตามลำดับ ◀ ◀ ◀ 6.1 คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 295 bp ที่จำเพาะกับบัวหลวงสัตตบงกช, ◀ ◀ ◀ 6.2 คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 240 bp ที่จำเพาะกับบัวหลวงบุณฑริก, ◀ ◀ ◀ 6.3 คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 130 bp ที่จำเพาะกับบัวหลวงพระราชินี]



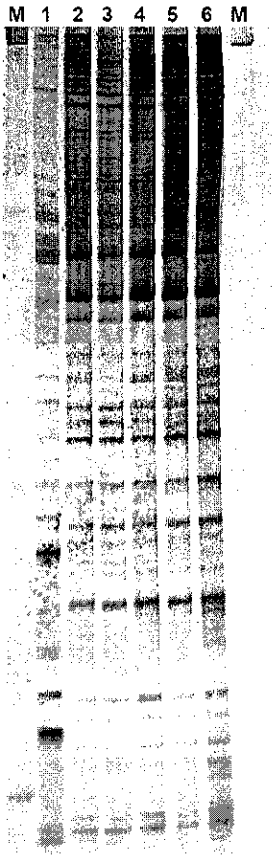
ภาพที่ 21 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B9-TGA/A2-TA, B9-TGA/A4-GA และ B9-TGA/A5-GC ตามลำดับ [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-6 คือบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และอุดรธานี ตามลำดับ]



ภาพที่ 22 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B9-TGA/A6-CG, B9-TGA/A7-TC และ B9-TGA/A8-CT ตามลำดับ [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-6 คือบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และอุดรธานี ตามลำดับ, ◀ ◀ ◀ 7 คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 120 bp ที่จำเพาะกับบัวหลวงอุดรธานี]



ภาพที่ 23 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ B9-TGA/A9-TG, B10-CTA/A3-AG และ B10-CTA/A5-GC ตามลำดับ [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-6 คือบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และอุดรธานี ตามลำดับ]



ภาพที่ 24 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ B10-CTA/A6-CG [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-6 คือบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และอุดรธานี ตามลำดับ]

ตารางที่ 4 แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์บัวหลวงในลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวงซึ่งสร้างจากเทคนิคเอสอาร์เอพี

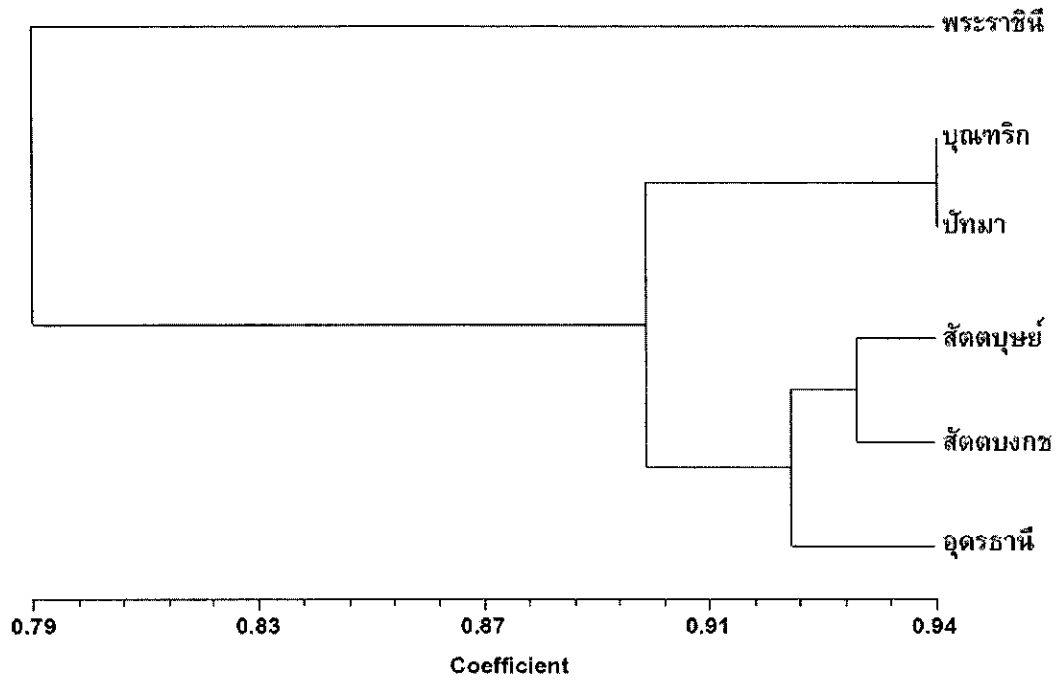
ลำดับที่	ไพรเมอร์	ขนาดแถบดีเอ็นเอ (bp)	ความจำเพาะกับพันธุ์บัวหลวง
1	B3-GCT/A3-AG	195	บัวหลวงพระราชินี
2	B3-GCT/A6-CG	450	บัวหลวงสัตตบงกช
3	B3-GCT/A8-CT	200	บัวหลวงพระราชินี
4	B7-CAT/A3-AG	350	บัวหลวงอุดรธานี
5	B7-CAT/A4-GA	345	บัวหลวงปัทมา (ไม่พบ)
6	B8-GGA/A6-CG	295 240 130	บัวหลวงสัตตบงกช บัวหลวงบุณฑริก บัวหลวงพระราชินี
7	B9-TGA/A6-CG	120	บัวหลวงอุดรธานี

4.2 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวง 6 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 แบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและแสดงผลในรูปของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ได้ผลดังตารางที่ 5 และ ภาพที่ 25 พบว่าบัวหลวงมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในกลุ่มค่อนข้างต่ำ มีค่าดัชนีความเหมือน 0.90-0.97 ซึ่งค่าดัชนีความเหมือนนี้สอดคล้องกับลักษณะจำนวนกลีบดอก ลักษณะทางสรีรวิทยา และประวัติความเป็นมาของบัวหลวง โดยผลการทดลองสอดคล้องกับการจำแนกพันธุ์บัวหลวงด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphism) (นฤมล และ ธีระชัย, 2550)

ตารางที่ 5 ค่าดัชนีความเหมือนของบัวหลวงที่คำนวณจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี

พระราชินี	1.0000000					
บุณฑริก	0.8193202	1.0000000				
ปัทมา	0.8206958	0.9433962	1.0000000			
สัตตบุษย์	0.7957181	0.9155045	0.8985270	1.0000000		
สัตตบงกช	0.7818499	0.9067524	0.9045710	0.9302326	1.0000000	
อุดรธานี	0.7540107	0.8803279	0.8683565	0.9125102	0.9262821	1.0000000
	พระราชินี	บุณฑริก	ปัทมา	สัตตบุษย์	สัตตบงกช	อุดรธานี



ภาพที่ 25 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวหลวง จำนวน 6 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี

บทที่ 5
สรุป

การจำแนกบัวหลวง 6 พันธุ์ คือ บัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และอุดรธานี ด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพีโดยใช้ไพรเมอร์ 40 คู่ พบว่าให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันและให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์บัวหลวงรวม 9 แถบ เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากลายพิมพ์เอสอาร์เอพีในบัวหลวงแต่ละพันธุ์พบว่าบัวหลวงมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ

บรรณานุกรม

นฤมล ธนานันต์ และ ธีระชัย ธนานันต์. 2550. การจำแนกพันธุ์บัวหลวงด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี. *ว.วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี* 15(3): 66-72.

นฤมล ธนานันต์ และ มานะ ขาวเมฆ. 2549. การจำแนกพันธุ์บัวหลวงด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี. *ว.วิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์* 1(3):15-23.

ปริมลาภ ชูเกียรติมั่น และ เสริมลาภ วสุวัต. 2547. *บัวประดับในประเทศไทย*. บริษัท เนชั่นบุ๊คส์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, กรุงเทพฯ.

สุปราณี วนิชชานันท์. 2540. *บัวประดับ*. สำนักพิมพ์เพื่อนเกษตร, นนทบุรี.

สุปรียา จันทะเหลา. 2546. *บัว*. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.

Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves. *Biotech. Biodiv. Lett.* 2:19-24.

Budak, H., R.C. Shearman, I. Parmaksiz, R.E. Gaussoin, T.P. Riordan and I. Dweikat. 2004. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theor. Appl. Genet.* 108: 328-334.

Guilsen, O., Karagul, S. and Abak, K. 2007. Diversity and relationships among Turkish okra germplasm by SRAP and phenotype marker polymorphism. *Biologia Bratislava* 62: 41-45.

Li, G. and C.F. Quiros. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on simple PCR reaction : its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 103:455-461.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Melecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd Ed.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Sun, S.J., Gao, W., Lin, S.Q., Zhu, J. and Lin, Z.B. 2006. Analysis of genetic diversity in *Ganoderma* population with a novel molecular marker SRAP. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 537-543.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.V. Lee, M. Hornes, A. Frijiters, J. Pot, J. Pleleman, M. Kuiper and M. Zebeau. 1995. AFLP : A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23:4407-4414.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tinggey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.