7336560

BOOK_VRU
1000172193

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การจำแนกพันธุ์บัวหลวงด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี

อ.ดร.นฤมล ธนานันต์
โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ผศ.ดร.มานะ ขาวเมฆ
โปรแกรมวิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

รายงานการวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ISBN 974-337-052-8
ปีงบประมาณ 2548

Identification of Lotus Using RAPD Markers

Dr. Narumol Thananantha
Program of Applied Biology

Assistant Professor Dr. Mana Kaomek
Program of Chemistry

Faculty of Science and Technology
Valaya Alongkorn Rajabhat University
ISBN 974-337-052-8
2005

หัวข้อวิจัย การจำแนกพันธุ์บัวหลวงด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี
ชื่อผู้วิจัย นางนฤมล ธนานันต์ และ นายมานะ ขาวเมฆ
คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ปีการศึกษา 2548

บทคัดย่อ

ผู้วิจัยได้ประยุกต์เทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อตรวจสอบพันธุ์บัวหลวงในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างบัวหลวง 6 พันธุ์ มาตรวจสอบกับไพรเมอร์ 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 70 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หรือคิดเป็น 97.22 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นได้คัดเลือกไพรเมอร์ 31 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในปริมาณสูงอย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของบัวหลวงทั้งหมด พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ โดยไพรเมอร์บางชนิดให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่ง ซึ่งสามารถจำแนกบัวหลวงทั้ง 6 พันธุ์ ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว และเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอในแต่ละพันธุ์สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้

Research Title Identification of Lotus Using RAPD Markers
Name Mrs. Narumol Thananana and Mr. Mana Kaomek
Faculty Science and Technology
University Valaya Alongkorn Rajabhat University
Year 2005

ABSTRACT

We were applied random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique for identity of lotus varieties. Six varieties of lotus have been collected. Seventy-two random primers were screened and 70 primers or about 97.22 percent of them responded with the lotus DNA. Thirty-one primers which gave clear amplified products were used to analyze all the DNA samples. The result showed significant differences among the 6 varieties. All varieties could be identified by using one primer. A comparison of RAPD patterns from each variety with another can analyzed evolutionary relationship.

กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จของงานวิจัยครั้งนี้จะไม่เกิดขึ้น หากไม่ได้รับความช่วยเหลือและสนับสนุนทุนในการทำวิจัยจากสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

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

นฤมล ธนานันต์
มานะ ขาวเมฆ
1 เมษายน 2549

สารบัญ

หน้า

สารบัญ (1)

สารบัญตาราง (2)

สารบัญภาพ (3)

บทที่ 1 บทนำ 1

- 1.1 ความสำคัญละที่มาของปัญหา 1
- 1.2 วัตถุประสงค์ 1
- 1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
- 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

- 2.1 ลักษณะทั่วไปของบัวหลวง 3
- 2.2 เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล 4

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ 7

- 3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ 7
- 3.2 วิธีการ 7
  - 3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากเนื้อเยื่อ 7
  - 3.2.2 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ 8
  - 3.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ 9
  - 3.2.4 การวิเคราะห์ผล 12

บทที่ 4 ผลการวิจัย 13

- 4.1 การตอบสนองของดีเอ็นเอบัวหลวงต่อไพรเมอร์ 13
- 4.2 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างบัวหลวงแต่ละพันธุ์ 51

บทที่ 5 สรุป วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ 53

- 5.1 สรุปผลการวิจัย 53
- 5.2 วิจารณ์ผลการวิจัย 53
- 5.2 ข้อเสนอแนะ 54

บรรณานุกรม 55

ภาคผนวก 59

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	บัวหลวง 6 พันธุ์ ที่ใช้ในการทำวิจัย	7
2	ไพรเมอร์ 72 ชนิด ที่ใช้ในการทำวิจัย	9
3	ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์	12
4	จำนวนและขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ 31 ชนิด	17
5	รูปแบบดีเอ็นเอบัวหลวง 6 พันธุ์ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ 31 ชนิด	50
6	ค่าดัชนีความเหมือนซึ่งคำนวณจากแถบดีเอ็นเอบัวหลวงที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี	51

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงอุดรธานีโดยใช้ไพรเมอร์ ชุด A-2........ 13
2 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงอุดรธานีโดยใช้ไพรเมอร์ ชุด B-2........ 14
3 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงอุดรธานีโดยใช้ไพรเมอร์ ชุด C-2........ 14
4 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงอุดรธานีโดยใช้ไพรเมอร์ ชุด D-2........ 15
5 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงอุดรธานีโดยใช้ไพรเมอร์ ชุด E-2........ 15
6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงอุดรธานีโดยใช้ไพรเมอร์ ชุด F-2........ 16
7 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A21..... 18
8 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A22..... 19
9 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A23..... 20
10 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A24..... 21
11 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A25..... 22
12 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A27..... 23
13 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A28..... 24
14 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A29..... 25
15 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ B23..... 26
16 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ B25..... 27
17 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ B27..... 28
18 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ B28..... 29
19 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ B29..... 30
20 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ C22..... 31
21 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ C23..... 32
22 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ C25..... 33
23 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ C26..... 34

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

24 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ D21..... 35
25 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ D22..... 36
26 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ D23..... 37
27 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ D24..... 38
28 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ E22..... 39
29 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ E25..... 40
30 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ E27..... 41
31 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ E28..... 42
32 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ F23..... 43
33 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ F28..... 44
34 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ F29..... 45
35 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ F30..... 46
36 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ F31..... 47
37 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ F32..... 48
38 Phylogenetic tree ของบัวหลวง 6 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี................. 52

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

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

บัวหลวง (lotus) เป็นพันธุ์ไม้น้ำล้มลุกที่มีอายุหลายปี ลำต้นมีลักษณะเป็นเหง้า ไหลหรือหัวอยู่ในดินใต้น้ำ ใบเป็นใบเดี่ยวรูปร่างค่อนข้างกลมและกว้าง เจริญมาจากลำต้นและมีก้านใบส่งขึ้นมาจากใต้น้ำ ดอกเป็นดอกเดี่ยวที่สมบูรณ์เพศ มีรูปร่างและสีสันของดอกสวยงามจนได้รับการขนานนามว่าเป็นราชินีแห่งไม้น้ำ ดังนั้นจึงนิยมนำมาปลูกประดับในบริเวณบ้านและนิยมใช้บูชาพระ เป็นสัญลักษณ์ของความบริสุทธิ์และคุณงามความดีตามคตินิยมของชาวพุทธ

จากความสำคัญของบัวดังที่กล่าวมาข้างต้น จึงมีแนวความคิดที่จะรวบรวมพันธุ์บัวพื้นเมือง นำมาศึกษาและจำแนกพันธุ์ด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล (Molecular Genetics) เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) และตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกพันธุ์บัวได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในด้านการคุ้มครองพันธุกรรมบัวพื้นเมืองของประเทศไทย นอกจากนั้นในการการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงจะนิยมใช้วิธีคัดเลือกพันธุ์ที่มีอยู่เดิมที่เห็นว่าดีแล้ว ซึ่งการคัดเลือกพันธุ์โดยวิธีนี้บางครั้งก็ผิดพลาดได้ เนื่องจากเกิดการกลายพันธุ์หรือการผสมข้ามในธรรมชาติ ทำให้ได้ต้นที่ไม่ตรงตามพันธุ์ การตรวจสอบพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ลักษณะภายนอกเป็นเกณฑ์ เช่น รูปร่างใบ ดอก ผล และทรงต้น เป็นต้น ลักษณะเหล่านี้บางอย่างต้องใช้เวลานานกว่าจะตรวจสอบได้ เพราะต้องใช้เวลานานกว่าจะถึงฤดูการที่ให้ดอกให้ผลและยังเกิดการผิดพลาดได้ง่าย เมื่อเกษตรกรนำพันธุ์ที่ได้ไปปลูกกว่าจะทราบว่าเป็นพันธุ์ที่กลายไปหรือคุณภาพด้อยกว่าพันธุ์เดิมก็อาจต้องใช้เวลานาน

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เก็บรวบรวมพันธุ์บัวหลวงพื้นเมือง 6 พันธุ์

1.2.2 ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงแต่ละพันธุ์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD; random amplified polymorphic DNA) แล้วตรวจหาเครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD marker) ที่สามารถจำแนกพันธุ์บัวหลวงได้

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

ตรวจหาเครื่องหมายอาร์เอพีดีที่สามารถจำแนกพันธุ์บัวหลวง 6 พันธุ์ ได้แก่ บัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์บัวหลวงพื้นเมือง 6 พันธุ์

1.4.2 ทราบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกพันธุ์บัวหลวงพื้นเมืองได้

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

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของบัวหลวง

บัวหลวงจัดอยู่ในสกุล *Nelumbo* วงศ์ Nymphaeaceae พบทั่วไปทั้งในเขตร้อน เขตอบอุ่น และเขตหนาว มีลำต้นใต้ดินแบบเหง้าและไหลซึ่งเมื่อยังอ่อนจะมีลักษณะเรียวยาว เมื่อโตเต็มที่จะอวบอ้วนเนื่องจากสะสมอาหารไว้มาก มีข้อปล้องเป็นที่เกิดของราก ใบและดอกเกิดจากหน่อที่ข้อปล้องแล้วเจริญขึ้นมาที่ผิวน้ำหรือเหนือน้ำ ใบเป็นใบเดี่ยวมีลักษณะกลมใหญ่สีเขียวอมเทา ขอบใบยก ผิวด้านบนมีขนอ่อนๆ ทำให้เมื่อโดนน้ำจะไม่เปียกน้ำ เมื่อใบยังอ่อนใบจะลอยปิ่มน้ำ ส่วนใบแก่จะพ้นน้ำ ก้านใบและก้านดอกมีหนาม ดอกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ชูสูงพ้นผิวน้ำ มีทั้งดอกป้อมและดอกแหลม ประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 4-6 กลีบ ด้านนอกมีสีเขียว ด้านในมีสีเดียวกับกลีบดอก กลีบดอกมีทั้งชนิดดอกซ้อนและไม่ซ้อน สีของกลีบดอกมีทั้งสีขาว ชมพู หรือเหลือง โดยดอกจะบานในเวลากลางวันและมีกลิ่นหอมอ่อนๆ บัวในสกุลนี้เป็นที่รู้จักกันดีเพราะมีดอกขนาดใหญ่ นิยมนำมาไหว้พระและใช้ในพิธีทางศาสนา เหง้าหรือที่มักเรียกกันว่ารากบัวและไหลบัวรวมทั้งเมล็ดสามารถนำมาเป็นอาหารได้ (ปริมลาภ และ เสริมลาภ, 2547)

นอกจากบัวหลวงจะมีคุณค่าในการเป็นไม้ดอกไม้ประดับ เป็นอาหาร และเป็นสัญลักษณ์สำคัญในทางพุทธศาสนาแล้ว บัวยังทรงคุณค่าด้านสมุนไพรอย่างยิ่ง โดยพบว่าส่วนต่างๆ ของบัวสามารถใช้เป็นสมุนไพร (อุไรรัตน์, 2546) ดังนี้

2.1.1 เมล็ดบัว ช่วยบำรุงกำลัง แก้กษัย ท้องร่วง สมานแผล แก้ร้อนใน เจริญอาหารและแก้พุพอง

2.1.2 ฝักบัว ช่วยขับลม สมานแผล แก้มดลูกพิการ แก้ท้องเสีย และแก้พิษเบื่อเมา

2.1.3 ก้านบัว รักษาโรคลมออกหู และแก้ท้องเดิน

2.1.4 เหง้าบัว แก้ท้องเสีย แก้พิษ ฝี ปวดบวม รักษาแผลไฟลวก และช่วยขับปัสสาวะ

2.1.5 ใบบัว บำรุงร่างกาย แก้ไข ห้ามเลือด แก้ปวดฝี และปวดศีรษะ

2.1.6 ดอกบัว แก้ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน แก้ไข้ บำรุงกำลัง แก้จุกเสียด และช่วยให้คลอดบุตรง่าย

2.1.7 เกสรตัวผู้ รักษาอาการเกี่ยวกับเลือดลม บำรุงกำลัง แก้ไข้ ขับเสมหะ ช่วยในการขับถ่าย แก้ท้องร่วง ขับปัสสาวะ และบำรุงตับ

2.2 เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

ปัจจุบันเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลพัฒนาไปมากและเข้ามามีบทบาทในสาขาวิชาต่าง ๆ มากมาย ดังจะเห็นได้จากการใช้เทคโนโลยีชีวภาพและเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช สัตว์ พัฒนาอุตสาหกรรมบางประเภท หรือใช้ในการตรวจวินิจฉัยและทำนายโรคในทางการแพทย์ เป็นต้น นอกจากนั้นยังสามารถใช้เทคนิคนี้ในการจำแนก (identify) ลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิต ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกันหรือแม้แต่ระหว่างพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดใด ๆ ที่มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล (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 ซึ่งอาจให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากต่างพันธุ์กัน และสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจำแนกพันธุ์ได้

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีรายงานครั้งแรกในมนุษย์ (Jeffreys และคณะ, 1985a) โดยสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างและนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เหมาะสม แล้วนำดีเอ็นเอทั้งหมดมาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) หลังจากนั้นจึงย้ายดีเอ็นเอไปยังแผ่นเมมเบรนโดยวิธี Southern blotting แล้วนำไปไฮบริไดซ์ (hybridize) กับโพรบ (probe) ที่มาจาก minisatellite DNA ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่พบหลายซ้ำ (repeated DNA) ในโครโมโซมของคน เมื่อนำไปตรวจแถบดีเอ็นเอโดยการทำออโตเรดิโอกราฟ (autoradiograph) จะพบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (DNA pattern) ของแต่ละคนซึ่งไม่ซ้ำกันเลย การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้สามารถทำในมนุษย์ (Jeffreys และคณะ, 1985b; Jeffreys และคณะ, 1991) สัตว์ (Wetton และคณะ, 1987; Burke และ Bruford, 1987) และพืช (Dallas, 1988; Vaccino และคณะ, 1993; Thomas และคณะ, 1993; Gorg และคณะ, 1992; Wang และคณะ, 1992)

การตรวจสอบอาร์เอฟแอลพีหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้น มีวิธีการตรวจหาเช่นเดียวกับการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอนั่นเอง ต่างกันเพียงโพรบที่ใช้ โดยโพรบอาจมาจากส่วนของยีนหรือชิ้นดีเอ็นเอที่มีเพียง 1 ซ้ำ (single copy) หรือมีจำนวนซ้ำน้อย (low copy) เมื่อวิเคราะห์ขนาดหรือรูปแบบของแถบดีเอ็นเอโดยใช้โพรบจำนวนหนึ่งก็จะสามารถบ่งบอกลักษณะเฉพาะของพันธุ์ ศึกษาแบบแผนการถ่ายทอดทางพันธุกรรม หรือความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งได้มีการตรวจสอบอาร์เอฟแอลพีในพืชหลายชนิด เช่น ถั่วเหลือง (Menancio และคณะ, 1990) มะเขือเทศ (Miller และ Tanksley, 1990) ข้าวบาเลย์ (Saghai-Maroof และคณะ, 1984) เป็นต้น

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอฟแอลพีมีวิธีการที่ยุ่งยากกว่าเทคนิคอาร์เอพีดี เนื่องจากต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า และต้องตรวจสอบด้วยวิธีไฮบริไดเซชันซึ่งยุ่งยาก ใช้เวลานาน และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูงกว่า หลังจากที่มีการค้นพบเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยวิธีพีซีอาร์และเทคนิคนี้ได้แพร่หลายไปสู่ห้องปฏิบัติการต่างๆ อย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้มากมาย แต่มีข้อจำกัดอยู่ที่จะต้องทราบลำดับเบส (nucleotide base) บริเวณส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจ เพื่อจะได้สังเคราะห์ไพรเมอร์ (primer) ที่สามารถจับกับบริเวณส่วนหัวและท้ายสำหรับนำมาใช้เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจ เทคนิคอาร์เอพีดีเป็นการดัดแปลงวิธีเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสมาก่อน โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นๆ ประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ เพียงชนิดเดียวมาใช้เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอแบบสุ่ม วิธีนี้ทำได้สะดวกและรวดเร็ว ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย และตรวจผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส สามารถตรวจดูแถบดีเอ็นเอได้ทันทีโดยการย้อมด้วยสารเอธิเดียม โบรไมด์ (ethidium bromide) มีรายงานการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอของพืชและสัตว์หลายชนิด เช่น มะเขือเทศ (Klein-Lankhorst และคณะ, 1991) หอม (Wilkie และคณะ, 1993) แตงโม (Hashizume และคณะ, 1993) ข้าวโพดลูกผสม (Welsh และคณะ, 1991) ยูคาลิปตัส (Nesbitt และคณะ, 1995) celery (Yang และ Quiros, 1993) แมลง (Puterka และคณะ, 1993)

Lim และคณะ (1999) นำเทคนิคอาร์เอพีดีมาใช้ในการวิเคราะห์หาความใกล้เคียงทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลแวนด้า (*Vanda)* 12 ชนิด ซึ่งมีทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ (1) แวนด้าใบแบน (strap-leaved) ได้แก่ *Vanda lamellata, V. limbata, V. tessellata, V. luzonica, V. sumatrana, V. merrillii* และ *V. insignis* (2) แวนด้าใบกลม (terete-leaved) ได้แก่ *V. teres* และ *V. hookeriana* (3) *Euanthe sanderiana* และ (4) *Ascocentrum miniatum* พบว่าแวนด้าใบแบนกับ *Euanthe sanderiana* และ *Ascocentrum miniatum* มี ความใกล้เคียงทางพันธุกรรมระหว่างกันมากกว่าแวนด้าใบกลม ซึ่งสามารถสนับสนุนการจัดกลุ่มแวนด้าใบกลมให้อยู่ในสกุล *Papilionanthe* และจัด *Euanthe sanderiana* ให้อยู่ในสกุลแวนด้า

Renganayaki และคณะ (2001) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ Texas bluegrass (*Poa arachnifera* Torr.) ด้วยเทคนิคการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ 2 เทคนิค คือ เทคนิคเอเอฟแอลพีและเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่าทั้ง 2 เทคนิค สามารถแยกความแตกต่างระหว่างต้นตัวผู้และต้นตัวเมียได้

Casa และคณะ (2002) ศึกษา *Paspalum dilatatum* ซึ่งเป็นหญ้าเลี้ยงสัตว์ที่มีความสำคัญมากในประเทศเขตร้อน มีจีโนมเป็น tetraploid, pentaploid และ hexaploid เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ *P. dilatatum* 9 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับ *P. intermedium, P. juergensii* และ *P. dilatatum* ด้วยวิธีอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ 86 ชนิด พบว่า *P. dilatatum* ทั้ง 9 ตัวอย่าง มีค่าความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเท่ากับ 0.913 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก

Ude และคณะ (2003) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยแอฟริกา (*Musa spp.* Subgroup AAB) ด้วยเทคนิคการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอ 2 เทคนิค คือ เทคนิคเอเอฟแอลพีและเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีมีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกกลุ่มของกล้วยแอฟริกาที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากได้ดีกว่าเทคนิคอาร์เอพีดี อย่างไรก็ตาม เทคนิคอาร์เอพีดีก็สามารถใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มของกล้วยแอฟริกาที่มีลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ที่แตกต่างกันได้ดี

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.	แหลมขาว บุณฑริก ปุณฑริก หรือบัวหลวงขาวแก้ว	อ.บางใหญ่ จ.นนทบุรี
3.	แหลมชมพู ปทุม ปัทมา โกกระณต หรือบัวหลวงชมพู	อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี
4.	ซ้อนขาว สัตตบุษย์ บัวฉัตรขาว หรือบัวหลวงขาวซ้อน	อ.บางใหญ่ นนทบุรี
5.	ซ้อนชมพู สัตตบงกช บัวฉัตรชมพู หรือบัวหลวงชมพูซ้อน	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 โดยเลือกใบที่โตพอสมควรแต่ยังไม่แก่จัดใส่ลงในโกร่ง 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 มล. เก็บไว้ที่ -20°ซ. 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

อพ
583.9
ช874ก
2548

ดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่าง ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยนำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8%

3.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอบัวหลวงมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยตรวจหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แล้วจึงเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลเป็นบวกมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอตัวอย่างทั้งหมดอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบมีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ (mer) จำนวนทั้งหมด 72 ชนิด (Wako Company, Japan) (ตารางที่ 2) และเอนไซม์ที่ใช้ คือ *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL®) ส่วนความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นแสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ 72 ชนิด ที่ใช้ในการทำวิจัย

ชื่อชุดไพเมอร์	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5′→3′)
A-2	A21	AGAATTGGACGA
	A22	GCCTGCCTCACG
	A23	ACTGACCTAGTT
	A24	CTCCTGCTGTTG
	A25	CTCAGCGATACG
	A26	ACTGAGAAAATA
	A27	ATCGCGGAATAT
	A28	ATTTGGATAGGG
	A29	GGTTCGGGAATG
	A30	GACCTGCGATCT
	A31	AAGGCGCGAACG
	A32	TTGCCGGGACCA
B-2	B21	AAGCCTATACCA
	B22	GGTGACTGGTGG
	B23	GGTGCCGGAGCA
	B24	CACACTACTTAT
	B25	AGCACTGAATCT
	B26	ATGAGAAAGGAA
	B27	GGCGGTTATGAA

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อชุดไพเมอร์	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5′→3′)
B-2	B28	GTCATTAAAGCT
	B29	GCCATCGAAAAA
	B30	CTTAGGTTACGT
	B31	CACAAGGAACAT
	B32	ATCGCGGCTTAT
C-2	C21	GGAGAGCGGACG
	C22	GGTCACCGATCC
	C23	CCGTCTTTTCTG
	C24	CCTTGGCATCGG
	C25	AGATTCTTACTG
	C26	GAGTTCGAACGA
	C27	GCATTGCAATCG
	C28	GTCGACGCATCA
	C29	GTCGCCTTACCA
	C30	TATTGGGATTGG
	C31	TCTGCTGACCGG
	C32	TCTACACGAAGT
D-2	D21	GGCGATTCTGCA
	D22	TGCCCACTACGG
	D23	ACCATCAAACGG
	D24	GTGCAATTTGGC
	D25	GTTTTGTCACCG
	D26	GATGAGCTAAAA
	D27	AGAATGTCCGTA
	D28	ACTGAGGGGGGA
	D29	ATCAAGTATCCA
	D30	GAGACTACCGAA
	D31	GGAGGTCGACCA
	D32	AAGCTGGGGGGA

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชื่อชุดไพเมอร์	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5′→3′)
E-2	E21	TGCTTCGTATTA
	E23	AGGTACGCCGCA
	E22	GGAATGGAACCG
	E24	CCGGAGTGGATG
	E25	ATCGTTACAGTA
	E26	CTGCCTGTACCA
	E27	CCATTGTCGGTA
	E28	CGCCCTGCAGTA
	E29	GTTATGCAAGGG
	E30	TACCTGGTTGAT
	E31	GAGGGACAGCAA
	E32	CAGGAACAGCAA
F-2	F21	AACCTTTAGGGC
	F22	AAGAGGGTTGAC
	F23	CCATCCGCACGA
	F24	ACTGTTATAACG
	F25	CCAGATCCGAAT
	F26	CTCAGCATTGAT
	F27	CAGGTGGGAGTA
	F28	CCAAGATCCATT
	F29	GCCGCTAATATG
	F30	ACTTTCGCCGAA
	F31	ATCGTGACGCCG
	F32	TTCAACATCGAC

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารที่ใช้	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
ดีเอ็นเอบัวหลวงแต่ละตัวอย่าง	100 ng
บัฟเฟอร์	1 เท่า*
$MgCl_2$	2.5 mM
dNTP ชนิดละ	200 µM
Taq DNA polymerase	5 units/100 µl
ไพรเมอร์	5 pmole
น้ำกลั่น	เติมจนครบ 20 µl

*1 เท่าบัฟเฟอร์ คือ 500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 8.4

บ่มไว้ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตามด้วย 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 40 รอบ และจบโดยให้อยู่ที่ 72 องศาเซลเซียส อีก 5 นาที แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในขั้นต่อไป

ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5% เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ถ่ายภาพเก็บไว้

3.2.4 การวิเคราะห์ผล

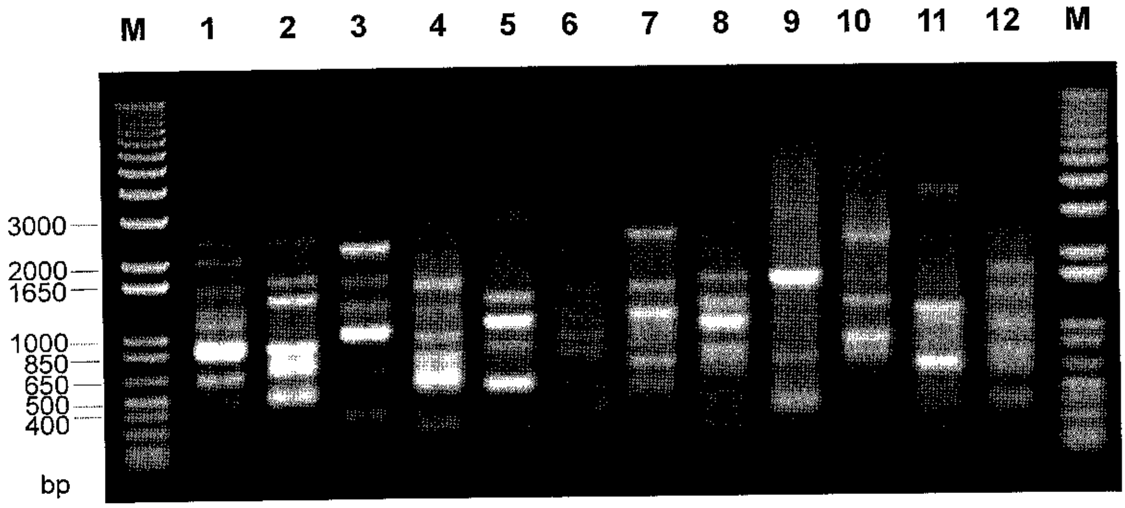
3.2.4.1 เปรียบเทียบแถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำอาร์เอพีดีในบัวหลวงพันธุ์ต่างๆ บันทึกแบบแผนของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์แต่ละชนิดและผลรวมที่ได้จากไพรเมอร์ทั้งหมดเพื่อใช้แยกพันธุ์บัวหลวงที่มีอยู่

3.4.2 หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างบัวหลวงแต่ละพันธุ์ โดยการเปรียบเทียบจากความเหมือนและแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น พันธุ์ที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งให้สัญลักษณ์เป็น + ส่วนพันธุ์ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นให้สัญลักษณ์เป็น - แล้วเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดจากทุกพันธุ์โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และจัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA)

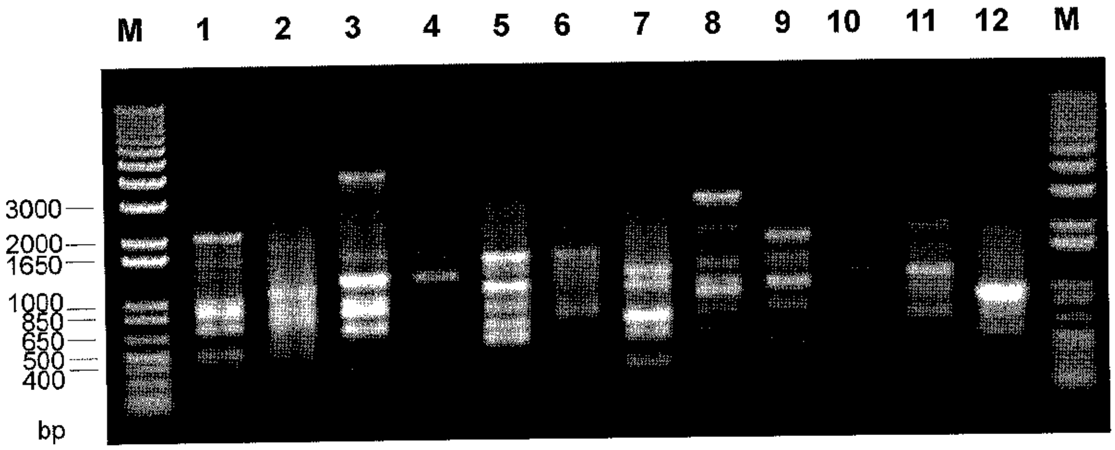
บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การตอบสนองของดีเอ็นเอบัวหลวงต่อไพรเมอร์

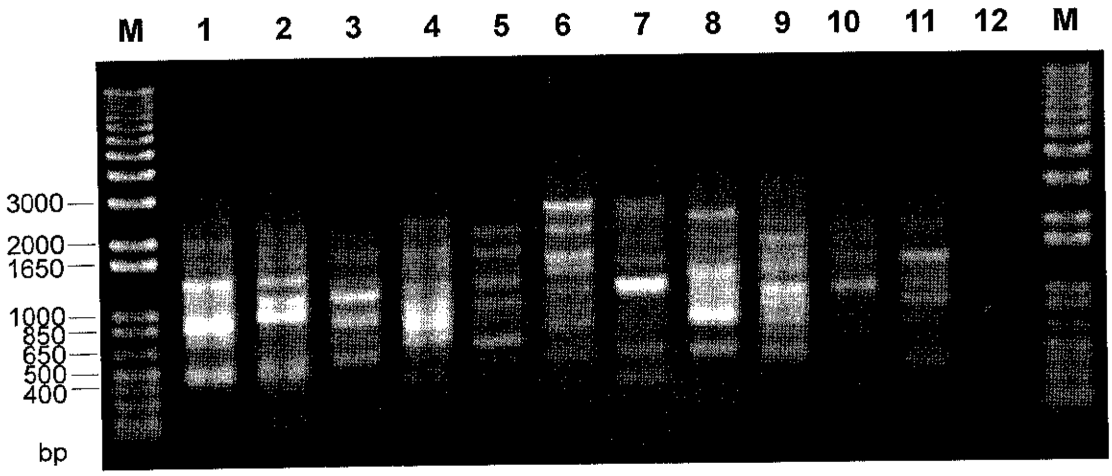
จากการตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 72 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงอุดรธานีด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามีไพรเมอร์ 70 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ หรือคิดเป็น 97.22 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นได้เลือกไพรเมอร์ 31 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ปริมาณสูงอย่างชัดเจน (ภาพที่ 1-6) มาใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอบัวหลวง 6 พันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 31 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงทั้ง 6 พันธุ์ ซึ่งได้แถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 264 แถบ มีขนาดตั้งแต่ประมาณ 350-4,500 คู่เบส (base pairs) ดังสรุปไว้ในตารางที่ 4 โดยพบแถบดีเอ็นเอ 81 แถบ ที่มีขนาดแตกต่างกัน (polymorphic band) หรือคิดเป็น 30.68 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำให้เกิดรูปแบบของดีเอ็นเอเฉพาะที่สามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ได้ (ภาพที่ 7-37)



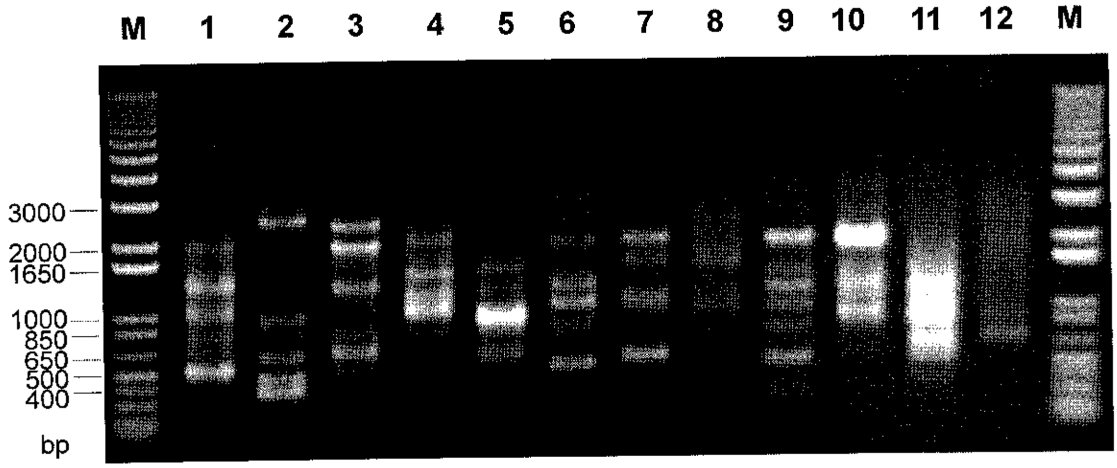
ภาพที่ 1 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงอุดรธานีโดยใช้ไพรเมอร์ชุด A-2 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen$^{\text{TM}}$ Life Technology, USA), 1-12 คือไพรเมอร์ A21, A22, A23, A24, A25, A26, A27, A28, A29, A30, A31 และ A32 ตามลำดับ]


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

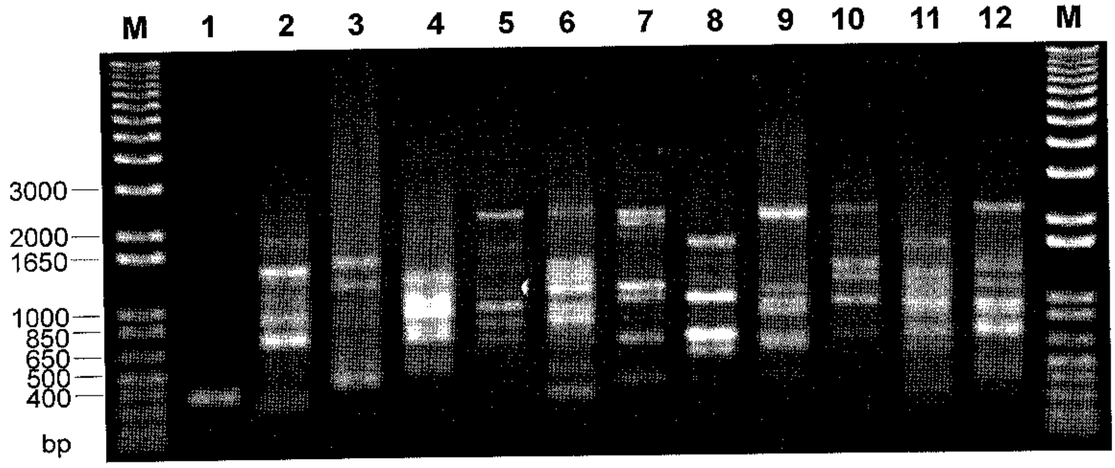
ภาพที่ 2 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงอุดรธานีโดยใช้ไพรเมอร์ชุด B-2 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen$^{\text{TM}}$ Life Technology, USA), 1-12 คือไพรเมอร์ B21, B22, B23, B24, B25, B26, B27, B28, B29, B30, B31 และ B32 ตามลำดับ]


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

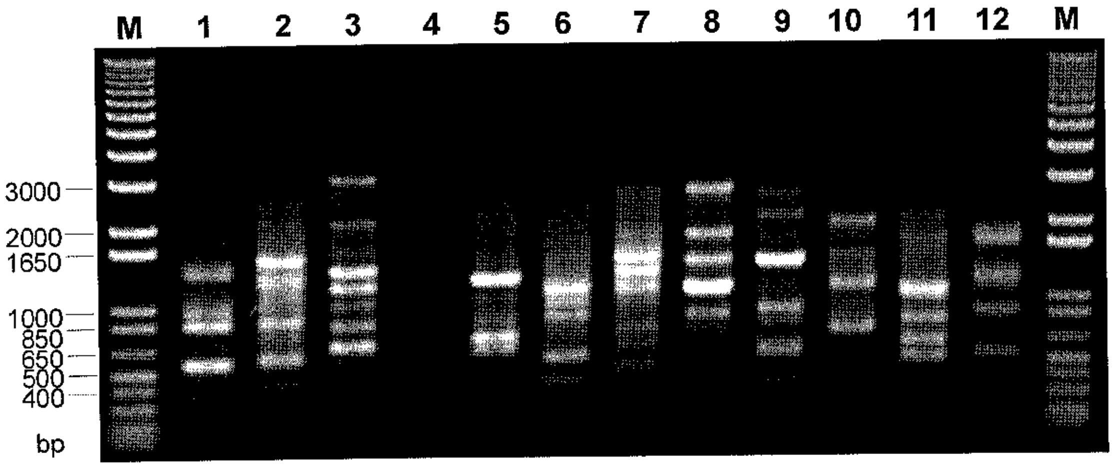
ภาพที่ 3 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงอุดรธานีโดยใช้ไพรเมอร์ชุด C-2 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen$^{\text{TM}}$ Life Technology, USA), 1-12 คือไพรเมอร์ C21, C22, C23, C24, C25, C26, C27, C28, C29, C30, C31 และ C32 ตามลำดับ]


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงอุดรธานีโดยใช้ไพรเมอร์ชุด D-2 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-12 คือไพรเมอร์ D21, D22, D23, D24, D25, D26, D27, D28, D29, D30, D31 และ D32 ตามลำดับ]


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

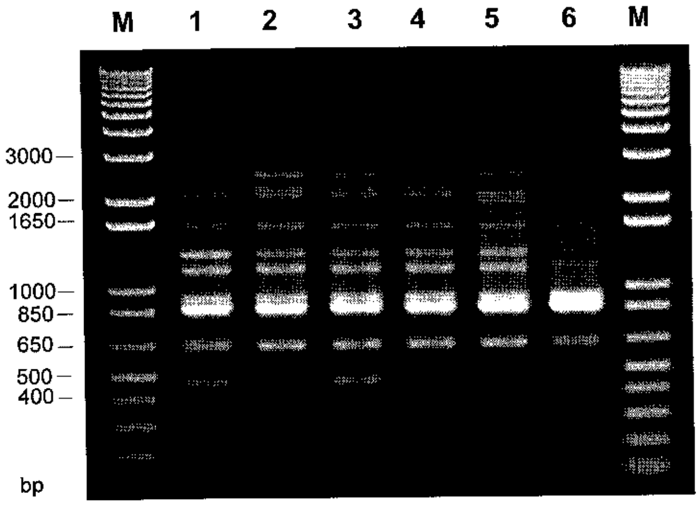
ภาพที่ 5 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงอุดรธานีโดยใช้ไพรเมอร์ชุด E-2 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-12 คือไพรเมอร์ E21, E22, E23, E24, E25, E26, E27, E28, E29, E30, E31 และ E32 ตามลำดับ]


M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงอุดรธานีโดยใช้ไพรเมอร์ชุด F-2 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-12 คือไพรเมอร์ F21, F22, F23, F24, F25, F26, F27, F28, F29, F30, F31 และ F32 ตามลำดับ]

ตารางที่ 4 จำนวนและขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ 31 ชนิด

ชื่อไพรเมอร์ (ลำดับเบส 5′→3′)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	ขนาดแถบดีเอ็นเอ (กิโลเบส; kb)
A21 (AGAATTGGACGA)	9	0.45-2.6
A22 (GCCTGCCTCACG)	9	0.5-2.8
A23 (ACTGACCTAGTT)	7	0.35-2.3
A24 (CTCCTGCTGTTG)	10	0.5-2.1
A25 (CTCAGCGATACG)	8	0.55-3.0
A27 (ATCGCGGAATAT)	9	0.5-2.8
A28 (ATTTGGATAGGG)	8	0.6-2.8
A29 (GGTTCGGGAATG)	3	0.4-1.6
B23 (GGTGCCGGAGCA)	6	0.65-4.5
B25 (AGCACTGAATCT)	8	0.5-2.9
B27 (GGCGGTTATGAA)	7	0.3-1.5
B28 (GTCATTAAAGCT)	9	0.6-3.0
B29 (GCCATCGAAAAA)	8	0.3-2.7
C22 (GGTCACCGATCC)	5	0.9-2.1
C23 (CCGTCTTTTCTG)	9	0.6-2.1
C25 (AGATTCTTACTG)	6	0.65-2.1
C26 (GAGTTCGAACGA)	9	0.7-2.6
D21 (GGCGATTCTGCA)	9	0.5-2.0
D22 (TGCCCACTACGG)	9	0.4-2.5
D23 (ACCATCAAACGG)	9	0.5-3.0
D24 (GTGCAATTTGGC)	8	1.0-2.0
E22 (GGAATGGAACCG)	9	0.6-1.9
E25 (ATCGTTACAGTA)	6	0.6-1.4
E27 (CCATTGTCGGTA)	8	0.65-2.2
E28 (CGCCCTGCAGTA)	6	0.6-1.7
F23 (CCATCCGCACGA)	11	0.6-3.2
F28 (CCAAGATCCATT)	5	0.85-2.8
F29 (GCCGCTAATATG)	10	0.6-3.0
F30 (ACTTTCGCCGAA)	10	0.6-2.5
F31 (ATCGTGACGCCG)	11	0.5-2.1
F32 (TTCAACATCGAC)	8	0.55-2.3

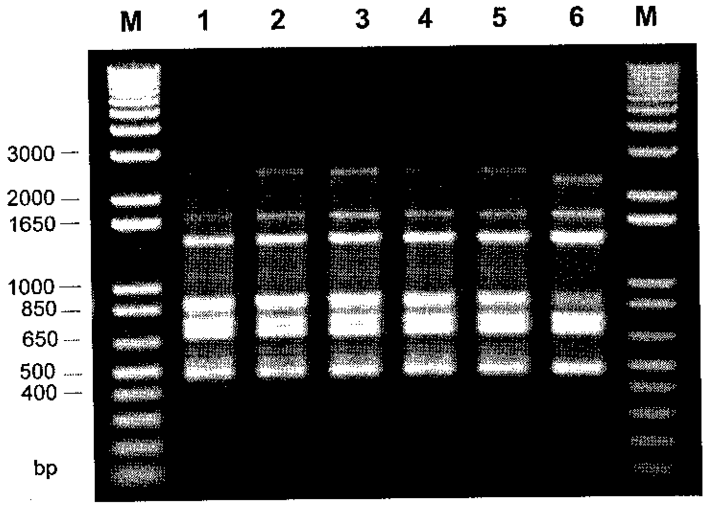

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 7 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A21 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 2 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 3 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ		
	A	B	C
2,000	-	-	+
400	+	-	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

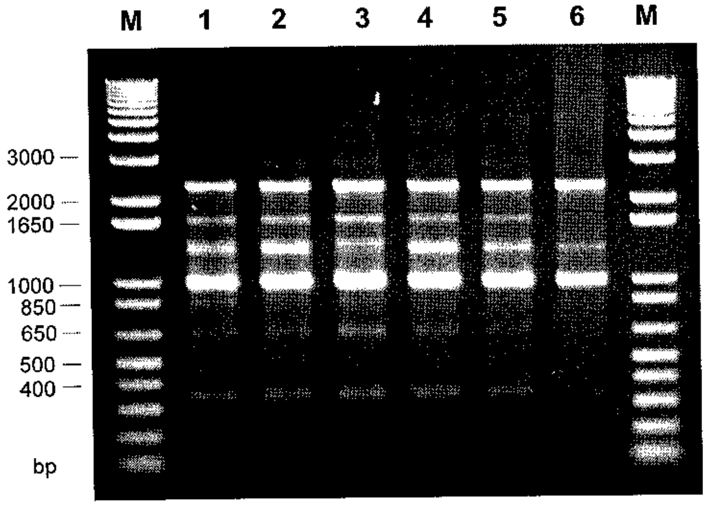

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 8 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A22 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen$^{\text{TM}}$ Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 2 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 3 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ		
	A	B	C
2,800	+	+	-
2,500	-	+	+

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

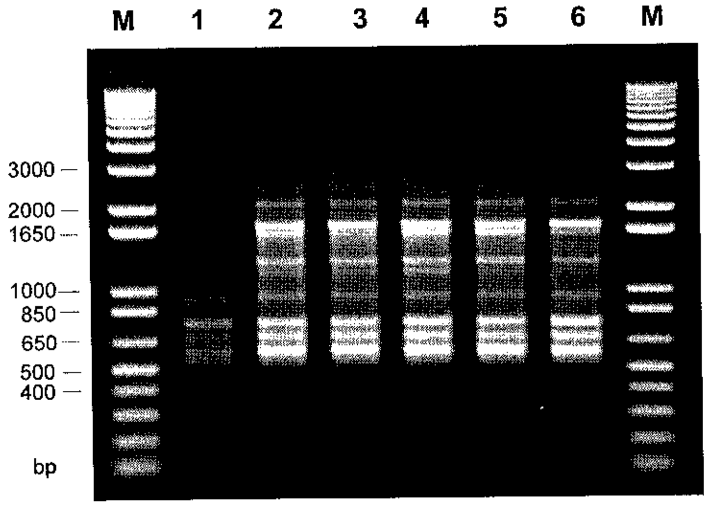

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 9 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A23 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 3 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 4 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ			
	A	B	C	D
1,650	+	+	+	-
1,300	+	+	-	-
1,200	+	-	+	+

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

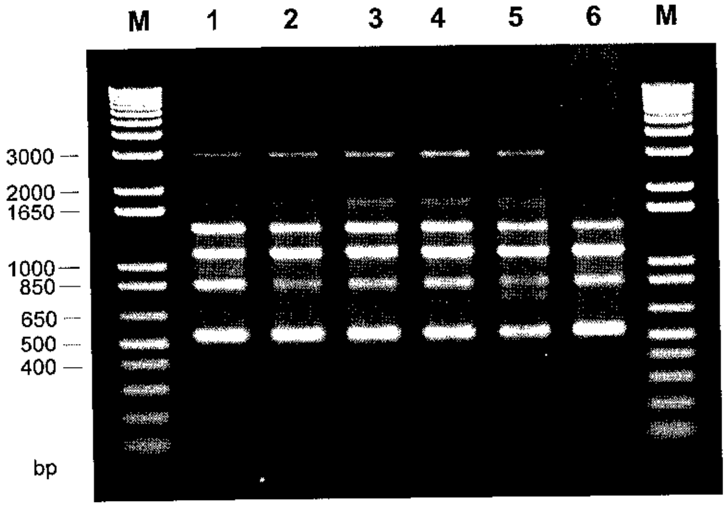

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 10 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A24 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 5 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 2 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ	
	A	B
2,100	-	+
1,700	-	+
1,600	-	+
1,300	-	+
1,100	-	+

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

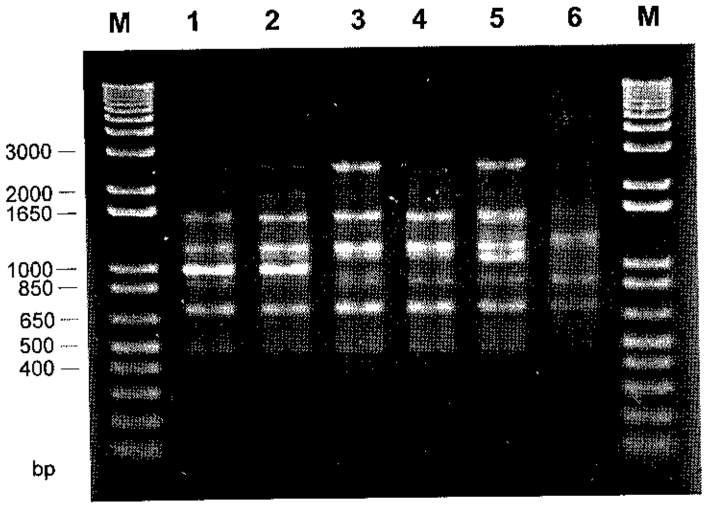

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 11 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A25 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 3 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 4 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ			
	A	B	C	D
3,000	+	+	+	-
900	+	-	-	-
750	+	-	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

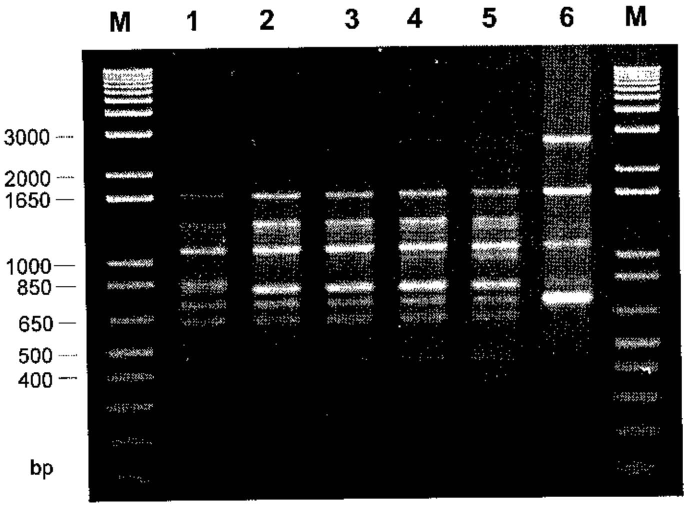

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 12 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A27 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen$^{\text{TM}}$ Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 5 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 6 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ					
	A	B	C	D	E	F
2,800	+	+	+	-	+	+
2,700	-	+	+	+	+	-
1,000	+	+	-	-	-	+
900	-	-	+	+	-	-
500	+	+	+	+	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

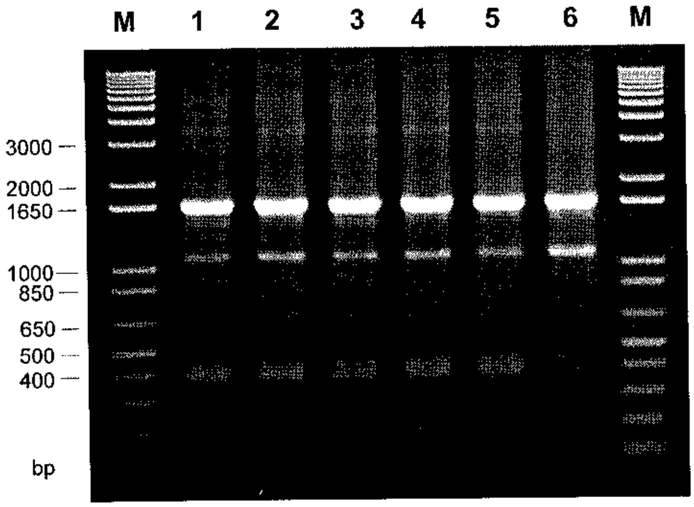

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 13 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A28 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 3 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 3 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ		
	A	B	C
2,800	-	+	+
1,000	-	+	-
600	+	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

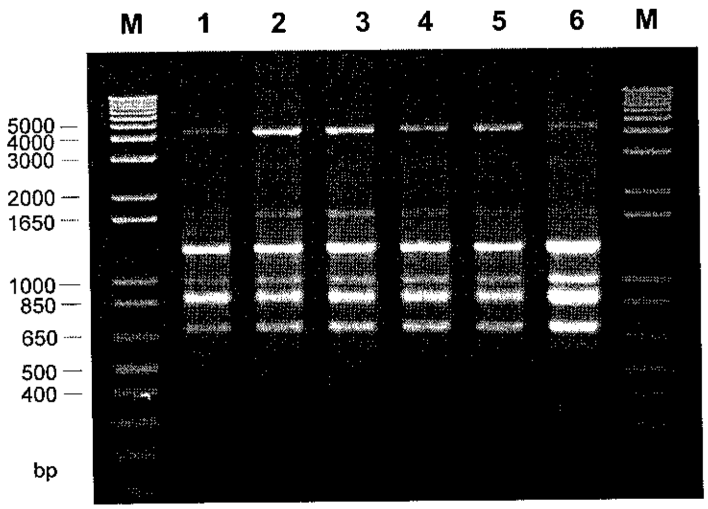

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 14 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ A29 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen$^{\mathrm{TM}}$ Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอเป็นแบบ A เพียงแบบเดียว

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ
	A
1,650	+
1,100	+
400	+

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

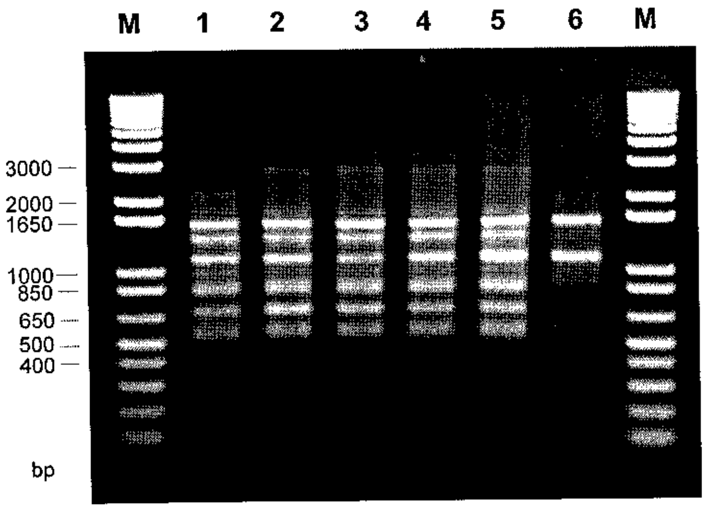

M
1
2
3
4
5
6
M
5000
4000
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 15 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ B23 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอเป็นแบบ A เพียงแบบเดียว

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ
	A
4,000	+
1,650	+
1,300	+
1,000	+

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

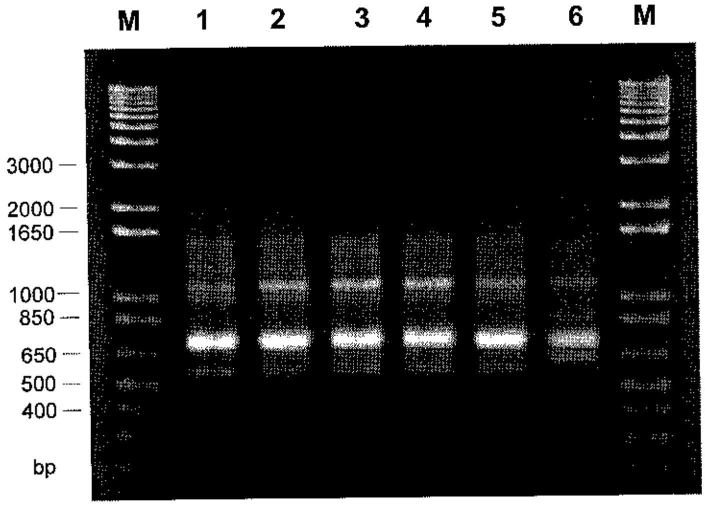

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 16 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ B25 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen$^{\text{TM}}$ Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 5 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 3 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ		
	A	B	C
2,900	-	+	-
1,650	+	-	-
850	+	+	-
650	+	+	-
500	+	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

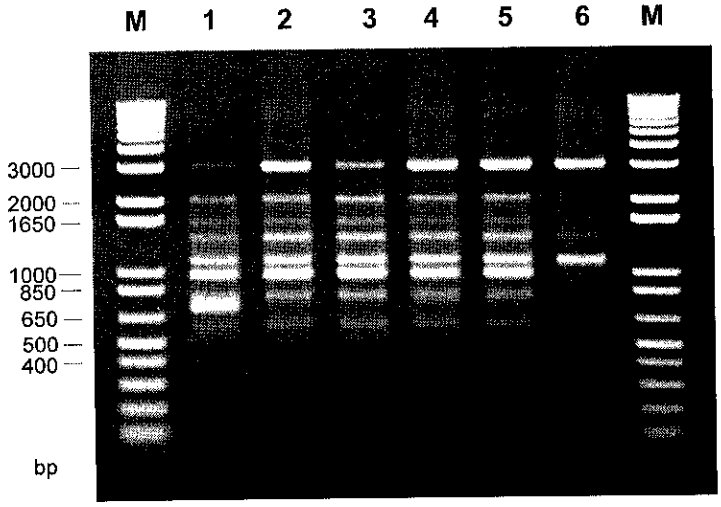

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 17 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ B27 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 4 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 3 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ		
	A	B	C
1,000	+	+	-
650	-	-	+
550	+	+	-
300	-	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

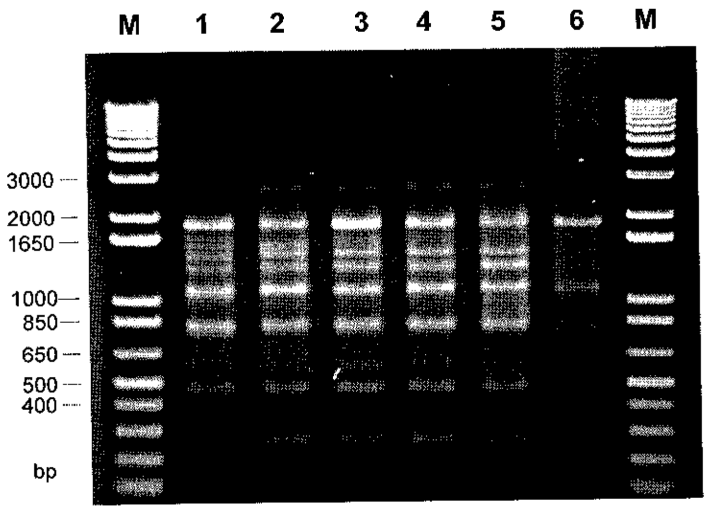

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 18 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ B28 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen$^{\text{TM}}$ Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 5 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 3 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ		
	A	B	C
1,650	+	+	-
1,000	+	+	-
800	+	+	-
700	+	-	-
600	+	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

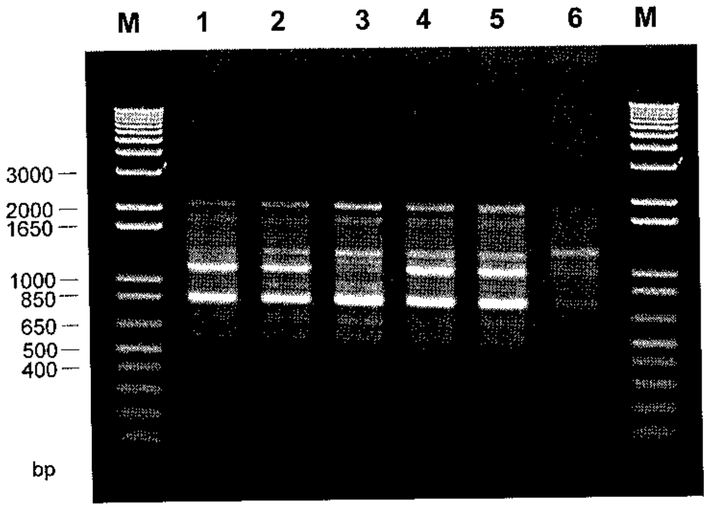

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 19 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ B29 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 5 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 4 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ			
	A	B	C	D
2,700	-	+	+	-
1,650	+	-	-	-
1,500	+	+	-	-
600	+	+	+	-
300	+	+	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

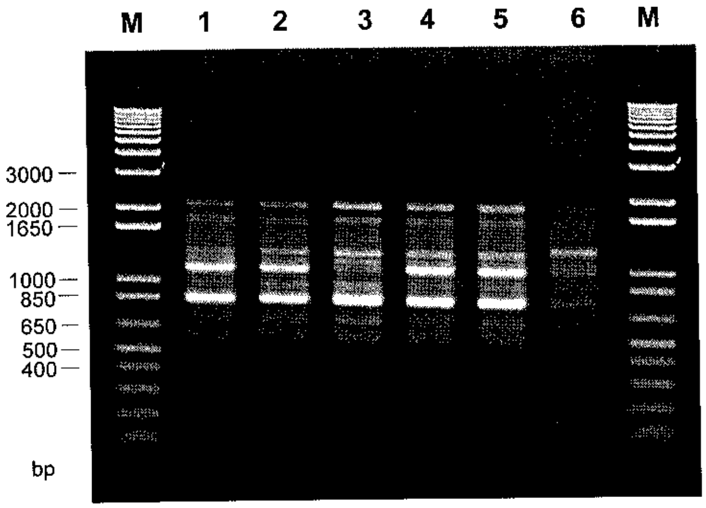

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 20 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ C22 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอเป็นแบบ A เพียงแบบเดียว

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ
	A
2,100	+
1,800	+
1,400	+
1,200	+
900	+

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

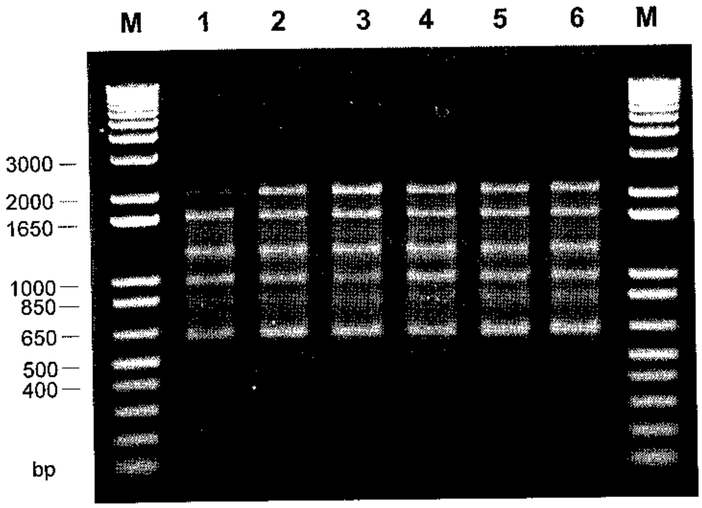

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 21 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ C23 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 2 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 2 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ	
	A	B
700	+	-
600	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

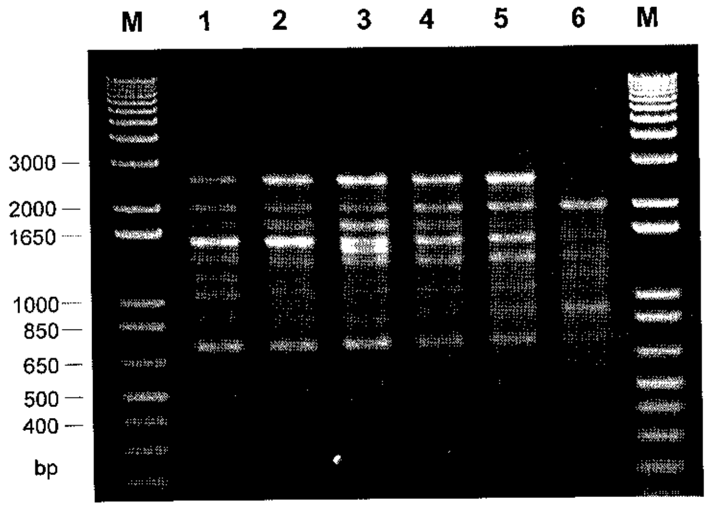


ภาพที่ 22 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ C25 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอเป็นแบบ A เพียงแบบเดียว

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ
	A
2,100	+
1,700	+
1,300	+
1,000	+
850	+
650	+

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

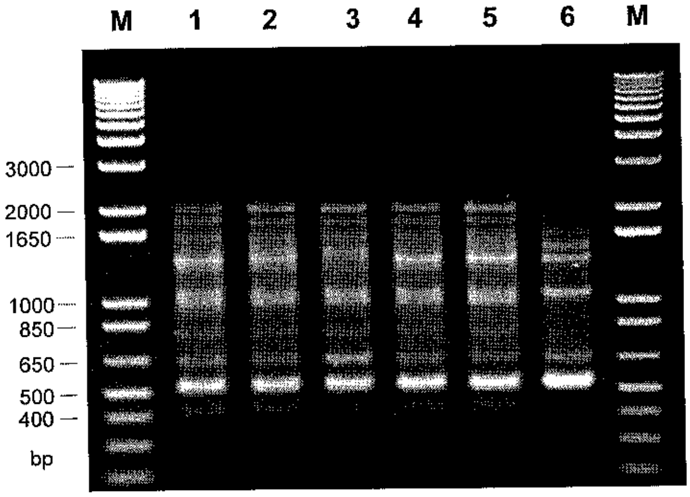

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 23 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ C26 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 4 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 3 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ		
	A	B	C
2,600	+	+	-
1,650	+	+	-
1,300	+	-	+
1,100	+	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

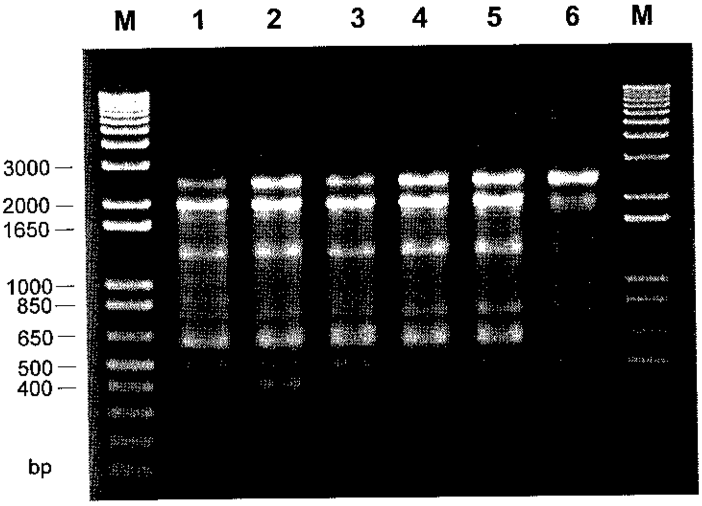

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 24 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ D21 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen$^{\text{TM}}$ Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 1 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 2 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ	
	A	B
1,000	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

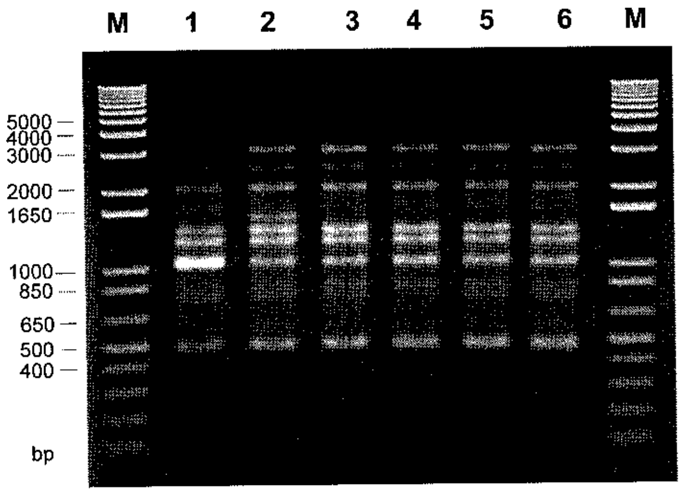

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 25 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ D22 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 3 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 4 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ			
	A	B	C	D
1,000	+	-	-	-
850	+	+	+	-
400	-	+	-	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

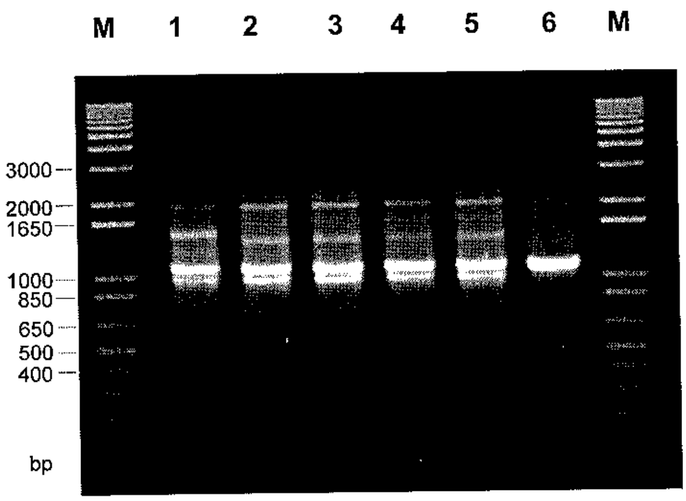

M
1
2
3
4
5
6
M
5000
4000
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 26 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ D23 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 2 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 3 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ		
	A	B	C
1,500	-	+	-
850	+	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

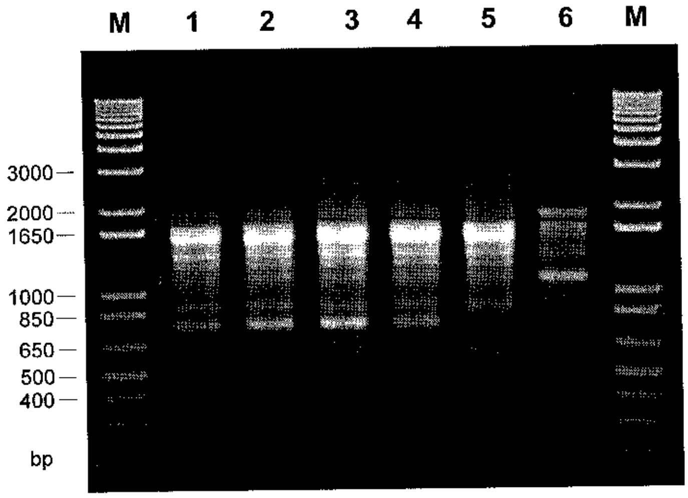

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 27 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ D24 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 6 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 4 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ			
	A	B	C	D
2,000	-	+	-	-
1,900	+	+	+	-
1,650	+	+	+	-
1,500	+	-	-	-
1,400	-	+	+	+
1,300	+	-	-	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

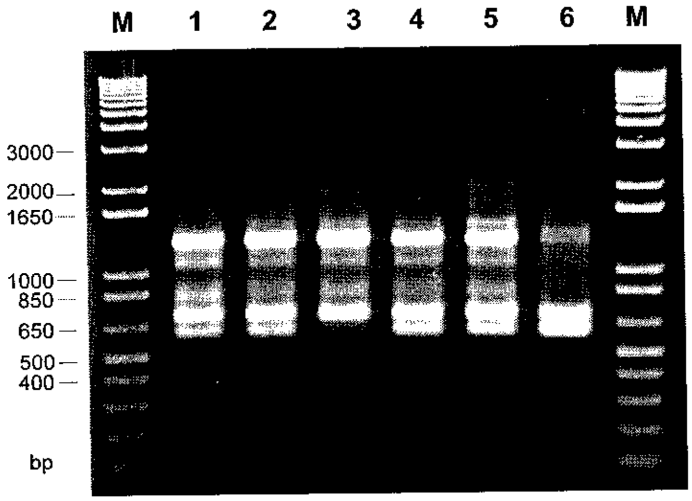

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 28 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ E22 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 3 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 4 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ			
	A	B	C	D
1,300	+	+	+	-
700	+	+	-	-
600	-	+	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

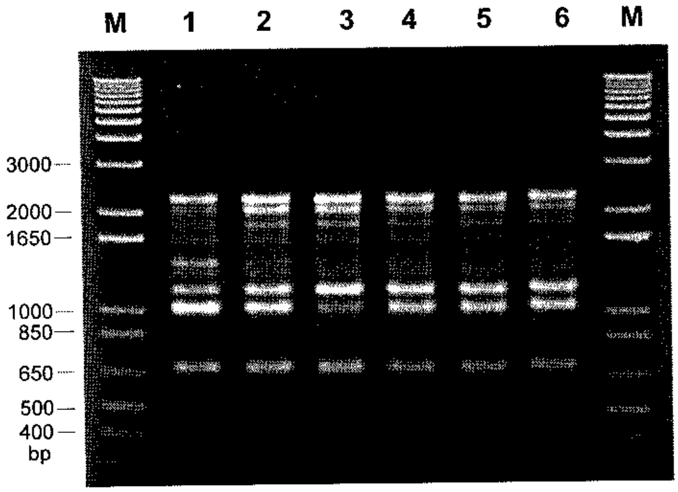

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 29 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ E25 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 3 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 4 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ			
	A	B	C	D
1,400	-	+	+	-
1,100	+	+	+	-
600	-	+	-	+

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

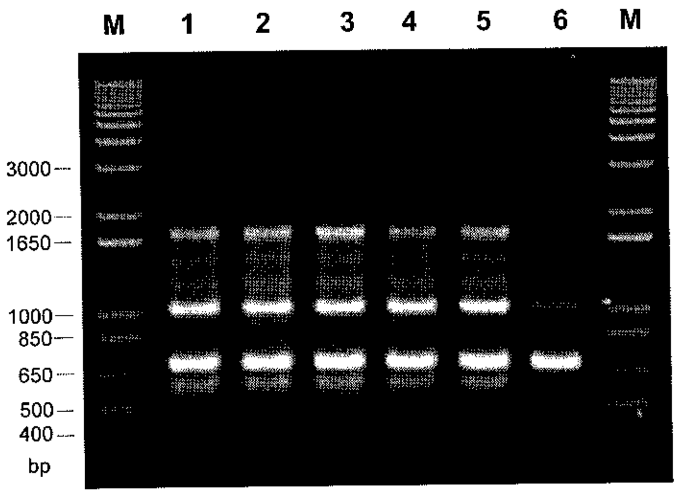


ภาพที่ 30 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ E27 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอเป็นแบบ A เพียงแบบเดียว

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ
	A
2,200	+
2,000	+
1,800	+
1,650	+
1,400	+
1,300	+
1,200	+
1,100	+
650	+

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

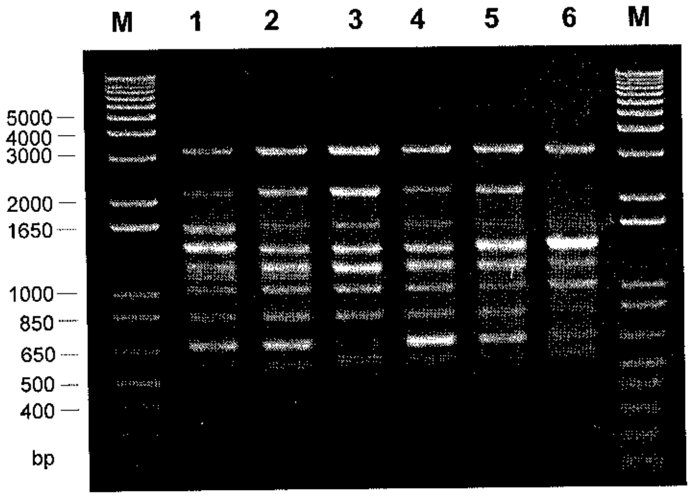

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 31 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ E28 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 3 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 2 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ	
	A	B
1,700	+	-
1,400	+	-
1,200	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

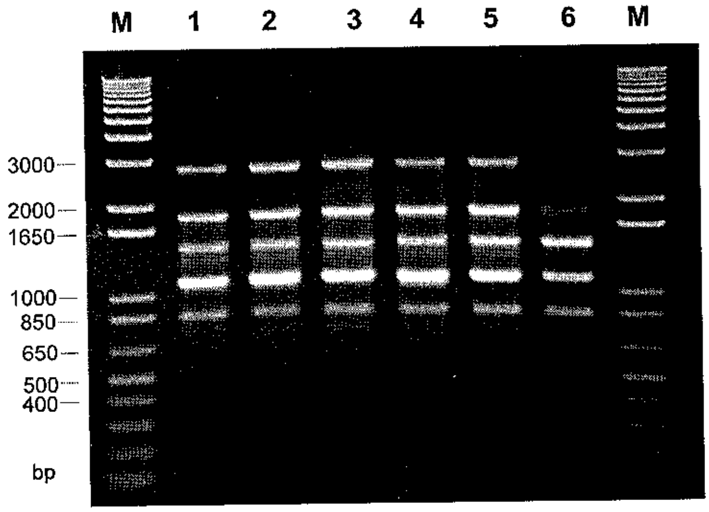

M
1
2
3
4
5
6
M
5000
4000
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 32 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ F23 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen$^{\text{TM}}$ Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 2 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 3 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ		
	A	B	C
1,700	+	-	-
1,200	+	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

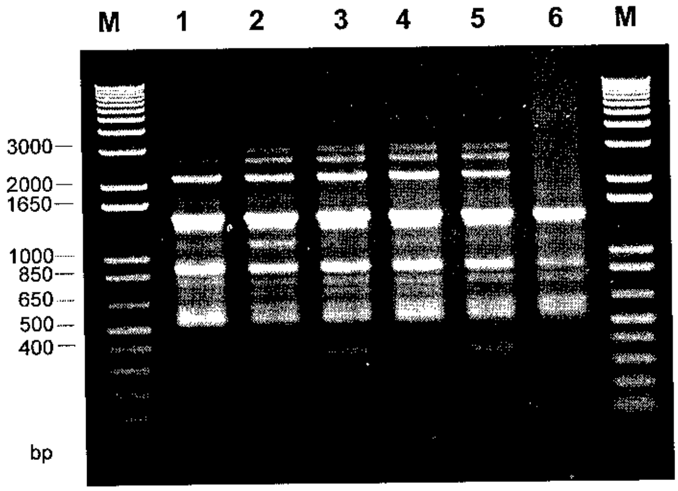

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 33 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ F28 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 1 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 2 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ	
	A	B
2,800	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

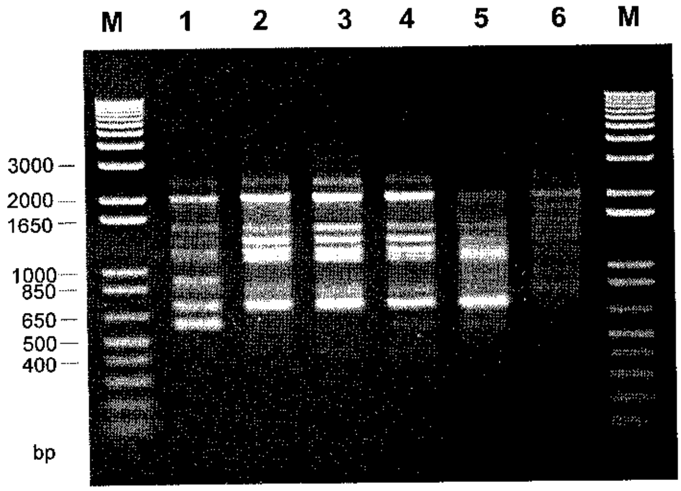

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 34 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ F29 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen$^{\text{TM}}$ Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 2 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 4 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ			
	A	B	C	D
3,000	-	+	+	-
700	+	+	-	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

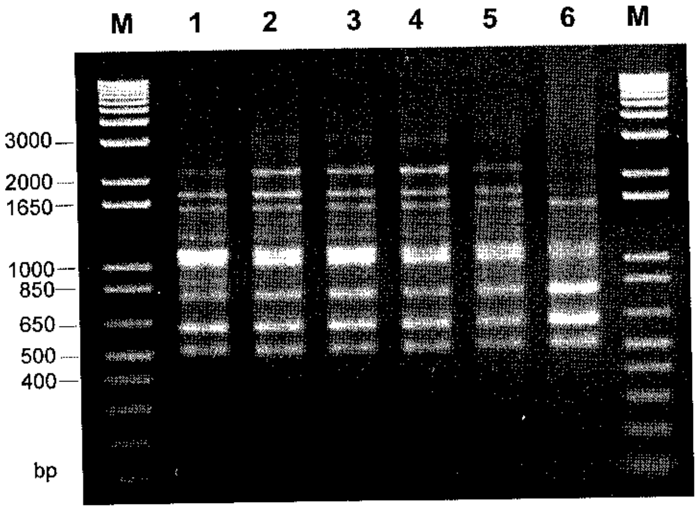

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 35 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ F30 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen^{TM} Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 3 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 4 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ			
	A	B	C	D
2,500	+	+	-	+
900	+	-	-	+
600	+	-	-	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

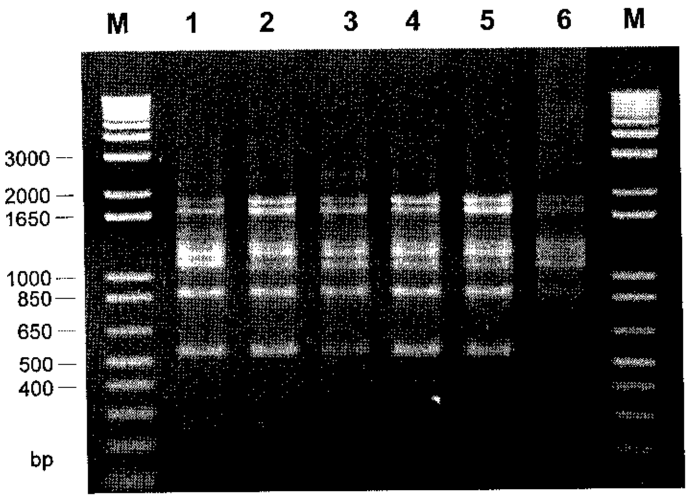

M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 36 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ F31 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen$^{\text{TM}}$ Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 2 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 2 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ	
	A	B
900	+	-
650	-	+

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ


M
1
2
3
4
5
6
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
bp

ภาพที่ 37 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงโดยใช้ไพรเมอร์ F32 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder (Invitrogen$^{\text{TM}}$ Life Technology, USA), 1-6 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงอุดรธานี ตามลำดับ] พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 2 แถบ ทำให้ได้รูปแบบดีเอ็นเอ 3 แบบ

ขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยประมาณ (คู่เบส)	รูปแบบของดีเอ็นเอที่พบ		
	A	B	C
1,700	-	+	-
1,200	+	+	-

+ คือพบแถบดีเอ็นเอ

- คือไม่พบแถบดีเอ็นเอ

ไพรเมอร์ A29, B23, C22 และ C25 ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 6 พันธุ์ ซึ่งมีขนาดประมาณ 400-4,500 คู่เบส จึงสามารถจำแนกรูปแบบของดีเอ็นเอได้ 1 แบบ คือ แบบ A (ภาพที่ 14)

ไพรเมอร์ A27 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันทั้ง 6 พันธุ์ และให้แถบดีเอ็นเอ 5 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 2,800 2,700 1,000 900 และ 500 คู่เบส จึงสามารถจำแนกรูปแบบของดีเอ็นเอได้เป็น 6 แบบ คือ (1) แบบ A พบเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาด 2,800 1,000 และ 500 (2) แบบ B พบแถบดีเอ็นเอขนาด 2,800 2,700 1,000 และ 500 คู่เบส (3) แบบ C พบแถบดีเอ็นเอขนาด 2,800 2,700 900 และ 500 คู่เบส (4) แบบ D พบแถบดีเอ็นเอขนาด 2,700 900 และ 500 คู่เบส (5) แบบ E พบแถบดีเอ็นเอขนาด 2,800 2,700 และ 500 คู่เบส และ (6) แบบ F พบแถบดีเอ็นเอขนาด 2,800 และ 1,000 คู่เบส (ภาพที่ 12)

ไพรเมอร์ A25 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 750 คู่เบส ที่จำเพาะกับสัตตบงกช (ภาพที่ 11)

ไพรเมอร์ B28 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบส ที่จำเพาะกับบัวหลวงพระราชินี (ภาพที่ 18)

ไพรเมอร์ B29 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,650 คู่เบส ที่จำเพาะบัวหลวงพระราชินี (ภาพที่ 19)

ไพรเมอร์ D22 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 คู่เบส ที่จำเพาะบัวหลวงพระราชินี (ภาพที่ 25) และให้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส ที่จำเพาะกับบุณฑริก (ภาพที่ 25)

ไพรเมอร์ D23 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,500 คู่เบส ที่จำเพาะกับบุณฑริก (ภาพที่ 26)

ไพรเมอร์ D24 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,300 คู่เบส ที่จำเพาะบัวหลวงพระราชินี (ภาพที่ 27)

ส่วนไพรเมอร์อีก 19 ชนิด นั้นจะให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันตั้งแต่ 1-8 แถบ และสามารถจำแนกรูปแบบดีเอ็นเอได้ตั้งแต่ 1-6 แบบ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 รูปแบบดีเอ็นเอบัวหลวง 6 พันธุ์ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ 31 ชนิด

ไพรเมอร์	รูปแบบของดีเอ็นเอในบัวหลวงแต่ละพันธุ์					
	1	2	3	4	5	6
A21	A	B	A	C	C	C
A22	A	B	A	A	A	C
A23	A	A	B	C	C	D
A24	A	B	B	B	B	B
A25	A	B	B	B	C	D
A27	A	B	C	D	E	F
A28	A	B	B	B	B	C
A29	A	A	A	A	A	A
B23	A	A	A	A	A	A
B25	A	B	B	B	B	C
B27	A	B	A	B	B	C
B28	A	B	B	B	B	C
B29	A	B	B	C	C	D
C22	A	A	A	A	A	A
C23	A	A	A	A	A	B
C25	A	A	A	A	A	A
C26	A	B	B	B	B	C
D21	A	A	A	A	A	B
D22	A	B	C	D	D	D
D23	A	B	A	C	A	A
D24	A	B	B	C	B	D
E22	A	B	B	B	C	D
E25	A	B	C	B	B	D
E27	A	A	A	A	A	A
E28	A	A	A	A	A	B
F23	A	B	C	C	C	C
F28	A	A	A	A	A	B
F29	A	B	B	B	C	D
F30	A	B	B	B	C	D
F31	A	B	A	A	A	A
F32	A	A	B	A	A	C

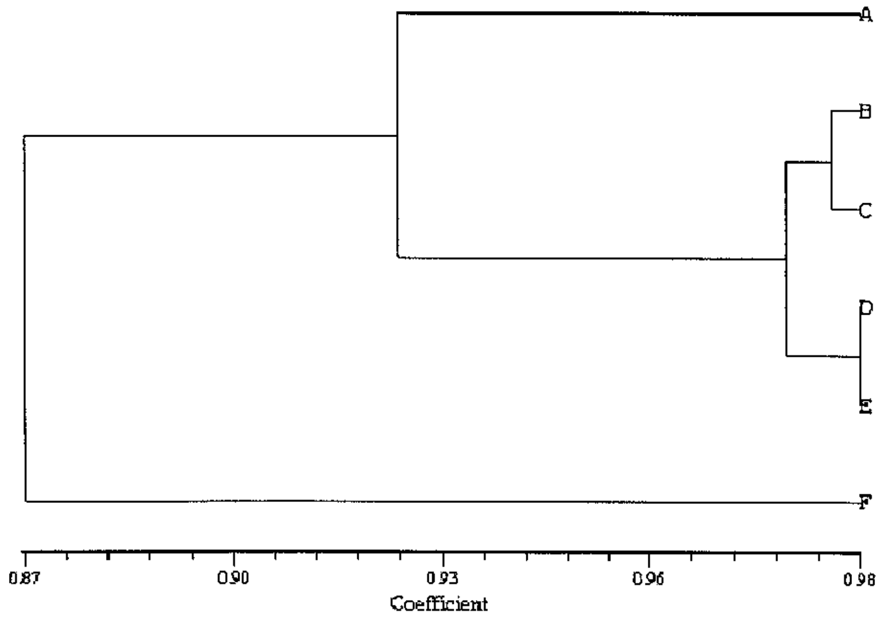
จากผลการวิจัยในภาพที่ 7-37 และตารางที่ 5 พบว่าบัวหลวงทั้ง 6 พันธุ์ สามารถแยกได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว และไพรเมอร์บางชนิดสามารถแยกบัวหลวงพันธุ์ต่าง ๆ ออกเป็นกลุ่มๆ โดยไพรเมอร์ที่แยกบัวหลวงได้จำนวนกลุ่มมากที่สุดมี 1 ไพรเมอร์ คือ ไพรเมอร์ A27 ซึ่งสามารถแยกบัวหลวงแต่ละพันธุ์ออกจากกันได้ ไพรเมอร์ A23, A25, B29, D22, D24, E22, E25, F29 และ F30 สามารถแยกบัวหลวงได้ 4 กลุ่ม ไพรเมอร์ A21, A22, A28, B25, B27, B28, C26, D23,,F23 และ F32 สามารถแยกบัวหลวงได้ 3 กลุ่ม และไพรเมอร์ A24, C23, D21, E28, F28 และ F32 สามารถแยกบัวหลวงได้ 2 กลุ่ม

4.2 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างบัวหลวงแต่ละพันธุ์

การตรวจสอบดีเอ็นเอของบัวหลวงด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ 31 ชนิด พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 264 แถบ เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 จัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA) คำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) และแสดงผลในรูปแบบ phylogenetic tree พบว่าบัวหลวงมีความแปรปรวนภายในกลุ่ม โดยมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.86-0.98 (ตารางที่ 6) สามารถแบ่งกลุ่มของบัวหลวงเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงพระราชินี มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.91-0.98 ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของกลีบดอก และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ บัวหลวงอุดรธานี ที่เก็บตัวอย่างจากจังหวัดอุดรธานี มีค่าดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.86-0.89 เมื่อเปรียบเทียบกับบุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงพระราชินี (ภาพที่ 38)

ตารางที่ 6 ค่าดัชนีความเหมือนซึ่งคำนวณจากแถบดีเอ็นเอบัวหลวงที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี

	บัวหลวงพระราชินี	บุณฑริก	ปัทมา	สัตตบุษย์	สัตตบงกช	บัวหลวงอุดรธานี
บัวหลวงพระราชินี	1					
บุณฑริก	0.93	1				
ปัทมา	0.93	0.98	1			
สัตตบุษย์	0.92	0.97	0.98	1		
สัตตบงกช	0.91	0.97	0.97	0.98	1	
บัวหลวงอุดรธานี	0.86	0.88	0.87	0.88	0.89	1


A
B
C
D
E
F
0.87
0.90
0.93
0.96
0.98
Coefficient

ภาพที่ 38 Phylogenetic tree ของบัวหลวง 6 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี (A คือบัวหลวงพระราชินี, B คือบุณฑริก, C คือปัทมา, D คือสัตตบุษย์, E คือสัตตบงกช และ F คือบัวหลวงอุดรธานี)

บทที่ 5

สรุป วิจารณ์และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การตรวจสอบดีเอ็นเอบัวหลวงอุดรธานีด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 70 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ คิดเป็น 97.22 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลือกไพรเมอร์ 31 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในปริมาณสูงมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอบัวหลวง 6 พันธุ์ พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 264 แถบ และสามารถแยกความแตกต่างของบัวหลวงแต่ละพันธุ์ออกจากกันได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวคือไพรเมอร์ A27

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 จัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA) คำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) และแสดงผลในรูปแบบ phylogenetic tree พบว่าสามารถแบ่งบัวหลวงเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ สัตตบงกช และบัวหลวงพระราชินี และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ บัวหลวงอุดรธานี (ภาพที่ 38)

5.2 วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการตรวจสอบบัวหลวงจำนวน 6 พันธุ์ ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีนั้น เมื่อสกัดแยกดีเอ็นเอและนำมาเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 31 ชนิด พบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันและสามารถจำแนกพันธุ์บัวหลวงได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 7-37 และ ตารางที่ 5) ดังนั้นจึงใช้เทคนิคอาร์เอพีดีจำแนกพันธุ์ของบัวหลวงได้เช่นเดียวกับยูคาลิปตัส (Nesbitt และคณะ, 1995) พริก (ธีระชัย และคณะ, 2543) และส้มโอ (ธีระชัย และคณะ, 2544) โดยบัวหลวงทั้ง 6 พันธุ์ สามารถแยกได้โดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว นอกจากนั้นยังพบว่าไพรเมอร์บางชนิดยังสามารถแยกบัวหลวงออกเป็นกลุ่มๆ

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอในแต่ละพันธุ์ พบว่าสามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวหลวงได้ดังภาพที่ 38 ซึ่งแบ่งบัวหลวงเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับประวัติและความเป็นมาของการปลูกบัวหลวงในประเทศไทย กล่าวคือ บัวหลวง 5 พันธุ์ ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันเป็นบัวหลวงพันธุ์ดั้งเดิมของประเทศไทย ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคอาร์เอพีดีวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวหลวงได้เช่นเดียวกับมะม่วง (สุรินทร์ และคณะ, 2539)

5.3 ข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบพันธุ์ที่ถูกต้องนั้น ควรใช้ไพรเมอร์หลายชนิดเพื่อให้มีความเชื่อมั่นมากขึ้น และควรจะมีพันธุ์มาตรฐานไว้เปรียบเทียบด้วย เพราะเทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่มีความไวต่อปัจจัยภายนอกมาก โดยพบว่ามีบ่อยครั้งที่ทำการทดลองซ้ำตามวิธีที่มีนักวิจัยผู้หนึ่งผู้ใดรายงานไว้แล้ว แต่ผลที่ได้อาจคลาดเคลื่อนไป เนื่องจากอาจมีรายละเอียดบางอย่างในขั้นตอนการดำเนินการวิจัยที่แตกต่างกัน ดังนั้นการตรวจสอบทุกครั้งจำเป็นต้องควบคุมปัจจัยต่างๆ ให้คงเดิมเสมอ

บรรณานุกรม

ธีระชัย ธนานันต์ และ นฤมล ธนานันต์. 2543. เทคนิคอาร์เอพีดีกับการจำแนกพันธุ์พริก. ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 8(1):6-10.

ธีระชัย ธนานันต์ และ นฤมล ธนานันต์. 2544. การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบส้มโอพันธุ์สายน้ำผึ้งและขาวน้ำผึ้ง, น. 172-175. การสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 12 : พันธุศาสตร์ยุคปฏิวัติยีน, 28-30 มีนาคม 2544. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

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

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช, ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, เสาวนีย์ สุพุทธิธาดา และ สุมน มาสุธน. 2539. การพัฒนาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อการจำแนกและรับรองพันธุ์มะม่วงและมังคุด, รายงานการวิจัย. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อุไรรัตน์ สิงหนาท. 2546. บัว...พืชมหัศจรรย์. ชุมนุมแพทย์แผนไทยและสมุนไพรแห่งชาติ ครั้งที่ 5 : สุขภาพดีได้ด้วยแพทย์แผนไทย, 9-18 พฤษภาคม 2546. สำนักการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข, นนทบุรี.

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

Burke, T. and M.W. Bruford. 1987. DNA fingerprintingg in birds. Nature 327:149-152.

Casa, A.M., S.E. Mitchell, C.R. Lopes and J.F.M. Valls. 2002. RAPD analysis reveals genetic variability among sexual and apomictic *Paspalum dilatatum* poiret biotypes. Heredity 93:300-302.

Dallas, J.F. 1988. Detection of DNA “fingerprints” of cultivated rice by hybridization of a human minisatellite DNA probe. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6831-6835.

Gorg, R., U. Schachtschabel, E. Ritter, F. Salamini and C. Gebhardt. 1992. Discrimination among 136 tetraploid potato varieties by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. Crop Sci. 32:815-819.

Hashizume, T., T. Sato and M. Hirai. 1993. Determination of genetic purity of hybrid seed in watermelon (*Citrullus lanatus*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Japan J. Breed. 43:367-375.

Jeffreys, A.J., A. Macleod, K. Tamaki and D.L. Neil. 1991. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. Nature 354:204-209.

Jeffreys, A.J., V. Wilson and S.L. Thein. 1985a. Individual-specificfingerprints of human DNA. Nature 316:76-79.

Jeffreys, A.J., V. Wilson and S.L. Thein. 1985b. Individual specific fingerprints of human DNA. Nature 316:76-79.

Klein-Lankhorst, R.M., A. Vermunt, R. Weide, T. Liharska and P. Zabel. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Theor. Appl. Genet. 83:108-114.

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.

Lim, S.H., P.C.P. Teng, Y.H. Lee and C.J. Goh. 1999. RAPD analysis of some species in the genus *Vanda* (Orchidaceae) Ann. Bot. 83:193-196.

Menacio, D.I., A.G. Hepburn and T. Hymowitz. 1990. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of wild perennial relatives to soybean. Theor. Appl. Genet. 79:235-240.

Miller, M.C. and S.D. Tanksley. 1990. RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. Theor. Appl. Genet. 80:437-448.

Nebitt, K.A., B.M. Potts, R.E. Vaillancourt, A.K. West and J.B. Reid. 1995. Partitioning and distribution of RAPD variation in a forest tree species, *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). Heredity 74:628-637.

Puterka, G.J., W.C. Block IV, W.M. Steiner and R.L. Burton 1993. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. Heredity 70:604-618

Reanganayaki, K., J.C. Read, A.K. Fritz. 2001. Genetic diversity among Texas bluegrass genotypes (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 102:1037-1045.

Saghai-Maroof, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen and R.W. Allard. 1984. Ribosomal RNA spacer-length polymorphisms in barley : Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:8014-8018.

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

Thomas, M.R., S. Matsumoto, P. Cain and N.S. Scott. 1993. Repetitive DNA of grapevine : classes present and sequences suitable for cultivar identification. Theor. Appl. Genet. 86:173-180.

Ude, G., M. Pillay, E. Ogundiwin and A. Tenkouano. 2003. Genetic diversity in an African plantain core collection using AFLP and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 107:248-255.

Vaccino, P., M. Accerbi and M. Corbellini. 1993. Cultivar identification in *T. aestivum* using highly polymorphic RFLP probe. Theor. Appl. Genet. 86:833-836.

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.

Wang, Z.Y., G. Second and S.D. Tanksley. 1992. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. Theor. Appl. Genet. 83:565-581.

Welsh, J., R.J. Honeycutt, M. McClell and B.W.S. Sobral. 1991. Parentage determination in maize hybrids using arbitrarity primed polymerase chain reaction (AP-PCR). Theor. Appl. Genet. 82:473-476.

Wetton, J.H., R.E. Carter, D.T. Parkin and D. Walters. 1987. Demographic study of wild horse sparrow population by DNA fingerprint. Nature 327:147-149.

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.

Wilkie, S.E., P.G. Isaac and R.J. Slater. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. Theor. Appl. Genet. 86:479-504.

Yang, X. and. C. Quiros. 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 86:205-212.