BOOK_VRU
1000172473

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวง ในเขตจังหวัดปทุมธานีด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี

อาจารย์สุนันท์ สุดใจ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นฤมล ธนานันต์
โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

รายงานการวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ปีงบประมาณ 2548

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

Genetic diversity of lotus (*Nelumbo nucifera*) in Pathum Thani province using RAPD markers

Mrs. Sunan Sudjai

Assistant Professor Dr. Narumol Thanananta

Program of Applied Biology

Faculty of Science and Technology

Valaya Alongkorn Rajabhat University under The Royal Patronage

2005

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

หัวข้อวิจัย การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงในเขตจังหวัดปทุมธานี ด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี

ชื่อผู้วิจัย อาจารย์สุนันท์ สุดใจ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นฤมล ธนานันต์

คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ปีการศึกษา 2548

บทคัดย่อ

ได้นำเทคนิคอาร์เอพีดีมาตรวจสอบบัวหลวงพันธุ์ปัทมาในเขตจังหวัดปทุมธานี โดยเก็บบัวหลวงพันธุ์ปัทมา 15 ตัวอย่าง มาตรวจสอบกับไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 70 ชนิด หรือคิดเป็น 97.22 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ หลังจากนั้นได้คัดเลือกไพรเมอร์ 21 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จากเทคนิคอาร์เอพีดีมีความแตกต่างกันซึ่งแสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาในเขตจังหวัดปทุมธานี

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

Research Title Genetic diversity of lotus (*Nelumbo nucifera*) in Pathum Thani province using RAPD markers

Name Mrs. Sunan Sudjai and Assistant Professor Dr. Narumol Thanananta

Faculty Science and technology

University Valaya Alongkorn Rajabhat University under The Royal Patronage

Year 2005

ABSTRACT

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique was used to identify lotus cultivar Pathama in Pathum Thani province. Fifteen lotus varieties have been collected. The total of 72 random primers was screened and 70 primers or 97.22 percent of them could be used for DNA amplification. Twenty-one primers which gave clear amplified products were selected and used to analyze genetic diversity. The RAPD fingerprint showed significant differences among the 15 cultivars and indicated that they were have genetic diversity (similarity index = 0.91-0.99).

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จของงานวิจัยครั้งนี้จะไม่เกิดขึ้น หากไม่ได้รับความช่วยเหลือและสนับสนุนทุนในการทำวิจัยจากสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

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

สุนันท์ สุดใจ
นฤมล ธนานันต์
8 มิถุนายน 2550

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

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 ประโยชน์ที่ าดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ลักษณะทั่วไปของบัวหลวง	3
2.2 เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล	5
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	7
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์	7
3.2 วิธีการวิจัย	8
3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากใบบัวหลวงพันธุ์ปัทมา	9
3.2.2 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ	10
3.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์	11
3.2.4 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	12
บทที่ 4 ผลการวิจัย	13
4.1 การดอบสนองของดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาต่อไพรเมอร์	13
4.2 ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของบัวหลวงพันธุ์ปัทมา	36
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการวิจัยและสรุป	38
5.2 วิจารณ์ผลการวิจัย	38
5.2 สรุป	38
บรรณานุกรม	39

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา ในพระบรมราชูปถัมภ์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แหล่งที่มาของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้	8
2	ไพรเมอร์แบบสุ่ม 31 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงได้อย่างชัดเจน	11
3	ความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์	12
4	จำนวนและขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมา	14

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ขอบเขตจังหวัดปทุมธานี	4
2	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ A21	15
3	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ A22	16
4	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ A23	17
5	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ A25	18
6	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ A27	19
7	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ A28	20
8	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ B25	21
9	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ B28	22
10	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ B29	23
11	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ C22	24
12	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ C23	25
13	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ C25	26
14	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ C26	27
15	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ D23	28

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา
โพธิ์พระบรมราชูปถัมภ์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ D24	29
17	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ E25	30
18	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ E28	31
19	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ F23	32
20	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ F28	33
21	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ F30	34
22	แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ F31	35
23	สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาในเขตจังหวัดปทุมธานีที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี	36
24	ค่าดัชนีความเหมือนของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาในเขตจังหวัดปทุมธานีซึ่งคำนวณจากแถบดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี	37

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaerth) เป็นพันธุ์ไม้น้ำล้มลุกที่มีอายุหลายปี ลำต้นมีลักษณะเป็นเหง้า ไหล หรือหัวอยู่ในดินใต้น้ำ ใบเป็นใบเดี่ยวรูปร่างค่อนข้างกลมและกว้าง เจริญมาจากลำต้นและมีก้านใบส่งขึ้นมาจากใต้น้ำ ดอกเป็นดอกเดี่ยวที่สมบูรณ์เพศ มีรูปร่างและสีสันของดอกสวยงาม จนได้รับการขนานนามว่าเป็นราชินีแห่งไม้น้ำ นิยมนำมาปลูกประดับในบริเวณบ้านเรือนที่อยู่อาศัยและนิยมใช้บูชาพระ โดยถือเป็นสัญลักษณ์ของความบริสุทธิ์และคุณงามความดีตามคตินิยมของชาวพุทธ

ประเทศไทยมีการปลูกบัวหลวงมาเป็นเวลานานตั้งแต่เริ่มนับถือศาสนาพุทธ ดังนั้นจึงมีบัวหลวงกระจายตามแหล่งน้ำและพื้นที่ชุ่มน้ำโดยทั่วไป บัวหลวงเป็นพืชผสมข้ามจึงมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชผสมตัวเอง โดยนอกจากใช้เหง้า ไหล หรือหัวในการขยายพันธุ์แล้ว บางครั้งก็เพาะปลูกจากเมล็ดที่ได้รับการผสมข้าม หรือเมล็ดที่ได้รับการผสมข้ามนี้แพร่กระจายไปตามแหล่งน้ำโดยวิธีธรรมชาติ ซึ่งทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมขึ้นได้มากมาย ดังนั้นจึงมีแนวความคิดที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาในเขตจังหวัดปทุมธานี เพื่อเป็นแนวทางเบื้องต้นในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงในประเทศไทยต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถคัดเลือกบัวหลวงพันธุ์ดีเพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเพื่อการค้าได้

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เก็บรวบรวมบัวหลวงพันธุ์ปัทมาในเขตจังหวัดปทุมธานี

1.2.2 ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD: random amplified polymorphic DNA)

1.2.3 ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) ของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาจากการผสมข้ามตามธรรมชาติ

1.3. ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาความหลากหลายและความผันแปรทางพันธุกรรมของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาในเขตจังหวัดปทุมธานี โดยตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาในเขตจังหวัดปทุมธานี

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

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของบัวหลวง

บัวหลวง (lotus) จัดอยู่ในสกุล *Nelumbo* วงศ์ Nymphaeaceae พบทั่วไปทั้งในเขตร้อน เขตอบอุ่น และเขตหนาว มีลำต้นใต้ดินแบบเหง้าและไหลซึ่งเมื่อยังอ่อนจะมีลักษณะเรียวยาว เมื่อโตเต็มที่จะอวบอ้วนเนื่องจากสะสมอาหารไว้มาก มีข้อปล้องเป็นที่เกิดของราก ใบ และดอกเกิดจากหน่อที่ข้อปล้องแล้วเจริญขึ้นมาที่ผิวน้ำหรือเหนือน้ำ 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)

ประเทศที่มีบัวหลวงในแหล่งน้ำและพื้นที่ชุ่มน้ำตามธรรมชาติ ได้แก่ จีน ญี่ปุ่น เกาหลี เวียดนาม ลาว พม่า ไทย เขมร มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ออสเตรเลีย ศรีลังกา อียิปต์ สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก เวเนซูเอล่า บราซิล เป็นต้น โดยสามารถแบ่งชนิดบัวหลวงตามถิ่นกำเนิดได้เป็น 2 ชนิด คือ (1) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *N. nucifera* Gaertn. มีถิ่นกำเนิดแถบซีกโลกตะวันออก (ทวีปเอเชีย) มี 2 กลุ่ม คือ ดอกสีขาว และดอกสีชมพู-แดง และ (2) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *N. pentapetala* Fermald. หรือ *N. lutea* Pers. มีดอกสีเหลือง (คุณา, 2546)

บัวหลวงที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนทุกพันธุ์สามารถปลูกได้ในประเทศไทย โดยบัวหลวงที่ปลูกและขึ้นเองตามธรรมชาติในประเทศไทย (สุปราณี, 2540; สุปรียา, 2546) 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 และโกประณด ถ้ามีสีชมพูเข้มเรียกว่าบัวหลวงแดงหรือบัวแหลมแดง มีดอกดูมรูปไข่ ดอกบานขนาดใหญ่ ปลายกลีบเรียวและกลีบดอกชั้นเดียว

4. บัวฉัตรแดง (Roseum plenum) หรือบัวหลวงป้อมแดง และสัตตบงกช มีดอกตูมป้อม ดอกบานขนาดใหญ่และกลีบดอกซ้อนหลายชั้น

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งบัวหลวงตามการใช้ประโยชน์ได้เป็น 3 ชนิด คือ (1) ดอกบัว (flower lotus) ใช้เป็นไม้ดอกและไม้ประดับ (2) เมล็ดบัว (seed lotus) ใช้เป็นอาหารและยา และ (3) รากบัว (root lotus) หรือเรียกว่าบัวเหง้า โดยเก็บเหง้าหรือลำต้นใต้ดินของบัวมาใช้เป็นอาหารและยา (คุณา, 2546)

หลักฐานทางประวัติศาสตร์บ่งชี้ว่าจังหวัดปทุมธานีเป็นถิ่นฐานบ้านเมืองมาแล้วประมาณ 350 ปี ตั้งแต่รัชสมัยสมเด็จพระนารายณ์มหาราชแห่งกรุงศรีอยุธยา เดิมมีชื่อว่า "เมืองสามโคก" เป็นถิ่นที่อยู่อาศัยของชาวมอญที่อพยพหนีภัยศึกสงครามมาจากพม่า ต่อมาพระบาทสมเด็จพระพุทธเลิศหล้านภาลัยได้พระราชทานนามใหม่ว่า "เมืองประทุมธานี" เนื่องจากพบบัวหลวงพันธุ์ปัทมากระจายอยู่ในพื้นที่ชุ่มน้ำโดยทั่วไปและชาวมอญได้เก็บดอกบัวหลวงพันธุ์ปัทมาขึ้นทูลเกล้าฯ ถวายเป็นราชสักการะอยู่เป็นนิจ ปัจจุบันจังหวัดปทุมธานีแบ่งเขตการปกครองส่วนภูมิภาคออกเป็น 7 อำเภอ 60 ตำบล (ภาพที่ 1) พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นที่ราบลุ่ม ดินเป็นดินเหนียวจัดมีค่า pH ประมาณ 4-6 โดยอยู่ติดกับแม่น้ำเจ้าพระยาและประกอบด้วยคลองซอยที่เป็นคลองชลประทานจำนวนมาก (จังหวัดปทุมธานี, 2550) ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการแพร่กระจายของบัวหลวง

ภาพที่ 1 ขอบเขตจังหวัดปทุมธานี

2.2 เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

ปัจจุบันเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลพัฒนาไปมากและเข้ามามีบทบาทในสาขาวิชาต่างๆ มากมาย ดังจะเห็นได้จากการใช้เทคโนโลยีชีวภาพและเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช สัตว์ พัฒนาอุตสาหกรรมบางประเภท หรือใช้ในการตรวจวินิจฉัยและทำนายโรคในทางการแพทย์ เป็นต้น นอกจากนั้นยังสามารถใช้เทคนิคนี้ในการจำแนก (identify) ลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิต ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงกันหรือแม้แต่ระหว่างพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดใดๆ 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) เมื่อวิเคราะห์ขนาดหรือรูปแบบของแถบดีเอ็นเอโดยใช้

โพรบจำนวนหนึ่งก็จะสามารถบ่งบอกลักษณะเฉพาะของพันธุ์ 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 สามารถดรวจดูแถบดีเอ็นเอได้ทันทีโดยการย้อมด้วยสารเอธิเดียม โบรไมด์ (ethidium bromide) มีรายงานการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อตรวจสอบดีเอ็นเอของพืชและสัตว์หลายชนิด เช่น มะเขือเทศ (Klein-Lankhorst และคณะ, 1991) หอม (Wilkie และคณะ, 1993) แดงโม (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* มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมระหว่างกันมากกว่าแวนด้าใบกลม 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

Kump และคณะ (2002) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ป่า (wild) กับพันธุ์ปลูก (cultivar) ใน buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) โดยพบว่าสามารถแบ่งกลุ่ม buckwheat ตามความแตกต่างทางภูมิศาสตร์ (geographic) ได้

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

มหาวิทยาลัยรังสิต ในพระบรมราชูปถัมภ์

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 ใบอ่อนของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี โดยมีรายละเอียดดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แหล่งที่มาของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้

หมายเลข	แหล่งที่มา
1.	ตำบลบ่อเงิน อำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี
2.	ตำบลคูบางหลวง อำเภอลาดหลุมแก้ว จังหวัดปทุมธานี
3.	ตำบลคูบางปรอก อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี
4.	ตำบลบางหลวง อำเภอเมืองปทุมธานี จังหวัดปทุมธานี
5.	ตำบลเชียงรากน้อย อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี
6.	ตำบลบ้านปทุม อำเภอสามโคก จังหวัดปทุมธานี
7.	ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี
8.	ตำบลคลองหก อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี
9.	ตำบลบึงชำอ้อ อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี
10.	ตำบลบึงบอน อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี
11.	ตำบลสนั่นรักษ์ อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี
12.	ตำบลธัญบุรี อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี
13.	ตำบลบึงคำพร้อย อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี
14.	ตำบลลำลูกกา อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี
15.	ตำบลคลองเจ็ด อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี

3.1.2 สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา ปทุมธานี

๓
๑๕๖๖
๔๘๑๔๐
๓๔๙๘
๓๖

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากใบบัวหลวงพันธุ์ปัทมา

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยวิธีประยุกต์จาก Agrawal และคณะ (1992) ดังนี้

3.2.1.1 ใช้ใบบัวหลวงพันธุ์ปัทมาประมาณ 2-5 กรัม โดยเลือกใบที่โตพอสมควร แต่ยังไม่แก่จัดใส่ลงในโกร่ง 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°ซ.

3.2.1.2 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60°ซ. 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°ซ. เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำและคลอโรฟอร์มออกจากกัน

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

3.2.1.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000g อุณหภูมิ 4°ซ. 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°ซ. 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

มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี ในพระบรมราชูปถัมภ์

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 15,000 g 4°ซ. 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°ซ. จนกว่าจะใช้ต่อไป

3.2.2 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอ

หาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้โดยนำมาทำให้เจือจางในปริมาณพอเหมาะ แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร (nm) คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่าง ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วยเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8% (Sambrook และคณะ, 1989)

3.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอบัวหลวงมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ที่มีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ (mer) จำนวนทั้งหมด 31 ชนิด (Wako Company, Japan) (ตารางที่ 2) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงได้อย่างชัดเจน (นฤมล และ มานะ, 2549) และเอนไซม์ที่ใช้ คือ *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL®) ส่วนความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แสดงไว้ในตารางที่ 3

มหาวิทยาลัยราชภัฏเลยลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์แบบสุ่ม 31 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงได้อย่างชัดเจน

ชื่อชุดไพเมอร์	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5′→3′)
A-2	A21	AGAATTGGACGA
	A22	GCCTGCCTCACG
	A23	ACTGACCTAGTT
	A24	CTCCTGCTGTTG
	A25	CTCAGCGATACG
	A27	ATCGCGGAATAT
	A28	ATTTGGATAGGG
	A29	GGTTCGGGAATG
B-2	B23	GGTGCCGGAGCA
	B25	AGCACTGAATCT
	B27	GGCGGTTATGAA
	B28	GTCATTAAAGCT
	B29	GCCATCGAAAAA
C-2	C22	GGTCACCGATCC
	C23	CCGTCTTTTCTG
	C25	AGATTCTTACTG
	C26	GAGTTCGAACGA
D-2	D21	GGCGATTCTGCA
	D22	TGCCCACTACGG
	D23	ACCATCAAACGG
	D24	GTGCAATTTGGC
E-2	E22	GGAATGGAACCG
	E25	ATCGTTACAGTA
	E27	CCATTGTCGGTA
	E28	CGCCCTGCAGTA
F-2	F23	CCATCCGCACGA
	F28	CCAAGATCCATT
	F29	GCCGCTAATATG
	F30	ACTTTCGCCGAA
	F31	ATCGTGACGCCG
	F32	TTCAACATCGAC

มหาวิทยาลัยราชภัฏเลยลิขสิทธิ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

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°ซ. เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตามด้วย 94°ซ. เป็นเวลา 1 นาที 35°ซ. เป็นเวลา 1 นาที และ 72°ซ. เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 40 รอบ และจบโดยให้อยู่ที่ 72°ซ. อีก 5 นาที แล้วเก็บไว้ที่ 4°ซ. จนกว่าจะใช้ในขั้นต่อไป

ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5% เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV: ultraviolet) และถ่ายภาพเก็บไว้

3.2.4 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

3.2.4.1 เปรียบเทียบแถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำอาร์เอพีดีในบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากแหล่งต่างๆ

3.2.4.2 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาในเขตจังหวัดปทุมธานี โดยการเปรียบเทียบจากความเหมือนและแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งให้สัญลักษณ์เป็น + ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นให้สัญลักษณ์เป็น - แล้วเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดจากทุกตัวอย่างโดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และจัดกลุ่มด้วยวิธี unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA)

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การตอบสนองของดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาต่อไพรเมอร์

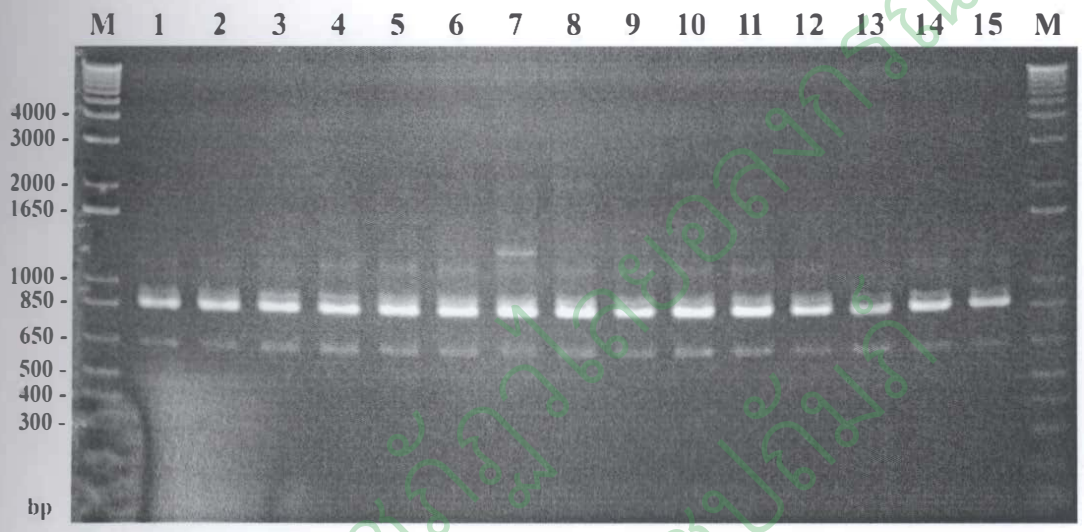
เมื่อใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ใน 7 อำเภอ ของจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด รวม 15 แหล่ง โดยใช้ไพรเมอร์ 21 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงได้อย่างชัดเจน พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 21 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาทั้ง 15 แหล่ง ได้แถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 173 แถบ มีขนาดประมาณ 350-3,200 คู่เบส (base pairs) ดังสรุปไว้ในตารางที่ 4 ซึ่งทำให้เกิดรูปแบบดีเอ็นเอเฉพาะของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาแต่ละแหล่ง (ภาพที่ 2-22)

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตารางที่ 4 จำนวนและขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมา

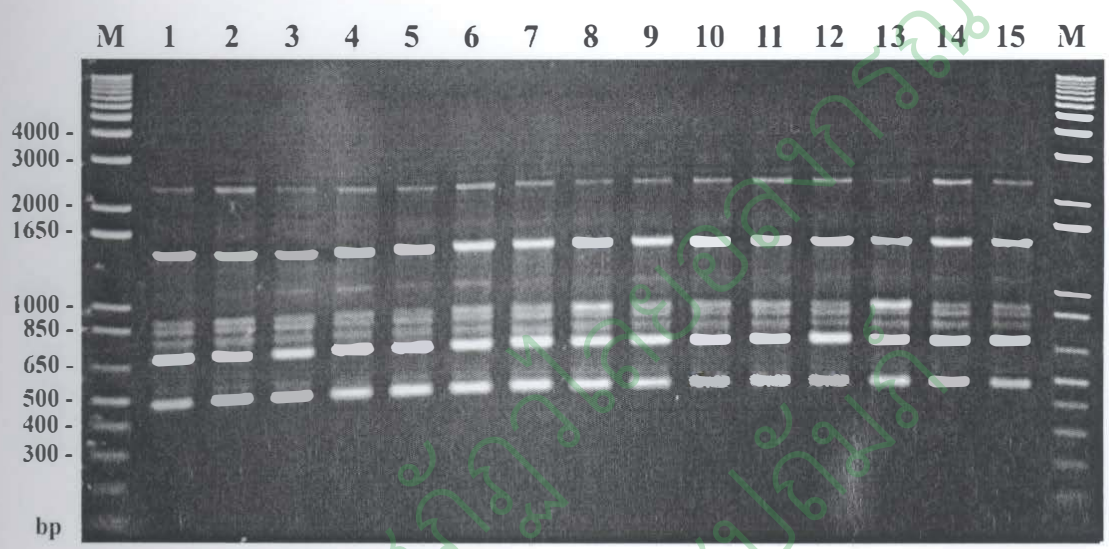
ชื่อไพรเมอร์ (ลำดับเบส 5′→3′)	จำนวนแถบดีเอ็นเอ	ขนาดแถบดีเอ็นเอ (กิโลเบส; kb)
A21 (AGAATTGGACGA)	5	0.65-1.3
A22 (GCCTGCCTCACG)	10	0.5-2.6
A23 (ACTGACCTAGTT)	12	0.35-2.5
A25 (CTCAGCGATACG)	6	0.55-3.0
A27 (ATCGCGGAATAT)	9	0.7-2.5
A28 (ATTTGGATAGGG)	10	0.35-1.65
B23 (GGTGCCGGAGCA)	9	0.5-1.65
B28 (GTCATTAAAGCT)	10	0.6-3.0
B29 (GCCATCGAAAAA)	8	0.8-1.8
C22 (GGTCACCGATCC)	4	0.8-1.4
C23 (CCGTCTTTTCTG)	8	0.7-2.1
C25 (AGATTCTTACTG)	9	0.6-2.0
C26 (GAGTTCGAACGA)	7	0.7-2.0
D23 (ACCATCAAACGG)	12	0.5-2.5
D24 (GTGCAATTTGGC)	5	1.0-2.0
E25 (ATCGTTACAGTA)	10	0.6-2.2
E28 (CGCCCTGCAGTA)	4	0.65-1.65
F23 (CCATCCGCACGA)	9	0.55-3.2
F28 (CCAAGATCCATT)	6	0.75-2.9
F30 (ACTTTCGCCGAA)	9	0.6-2.0
F31 (ATCGTGACGCCG)	11	0.5-2.0

มหาวิทยาลัยราชภัฏเลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์



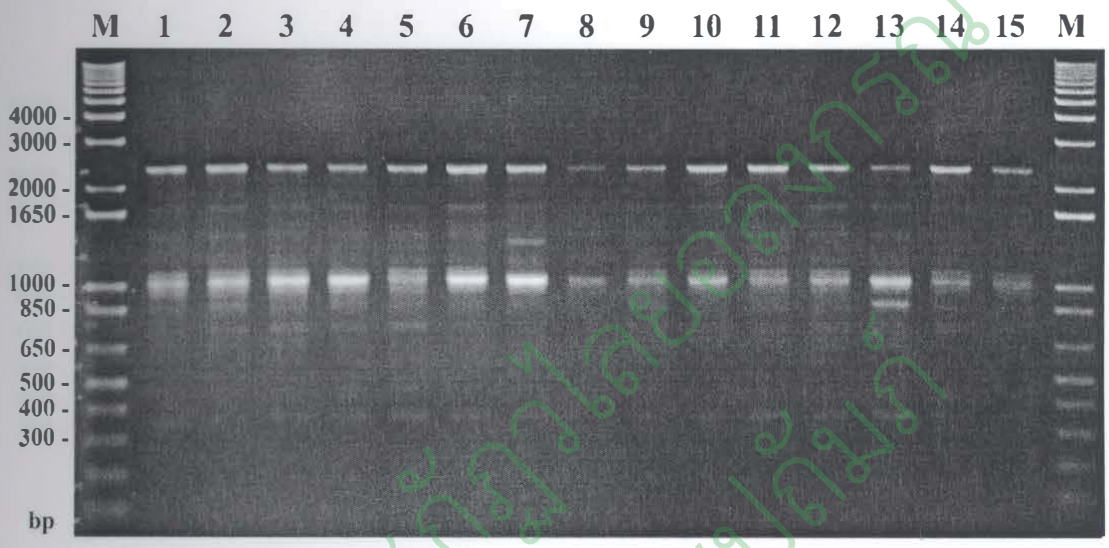
ภาพที่ 2 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ A21 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี สำนักวิทยบริการ



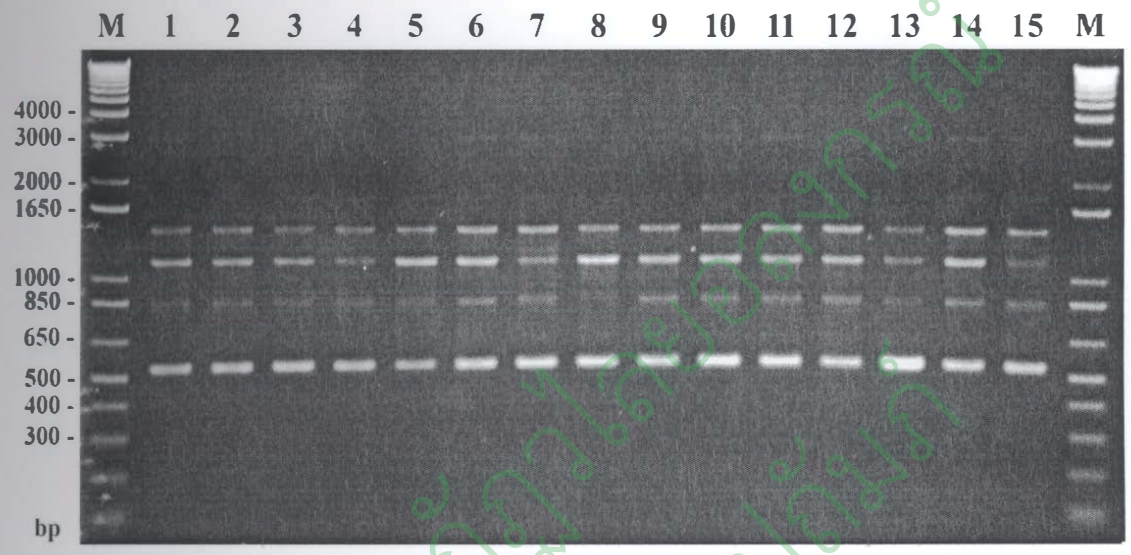
ภาพที่ 3 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ A22 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่าง ๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์



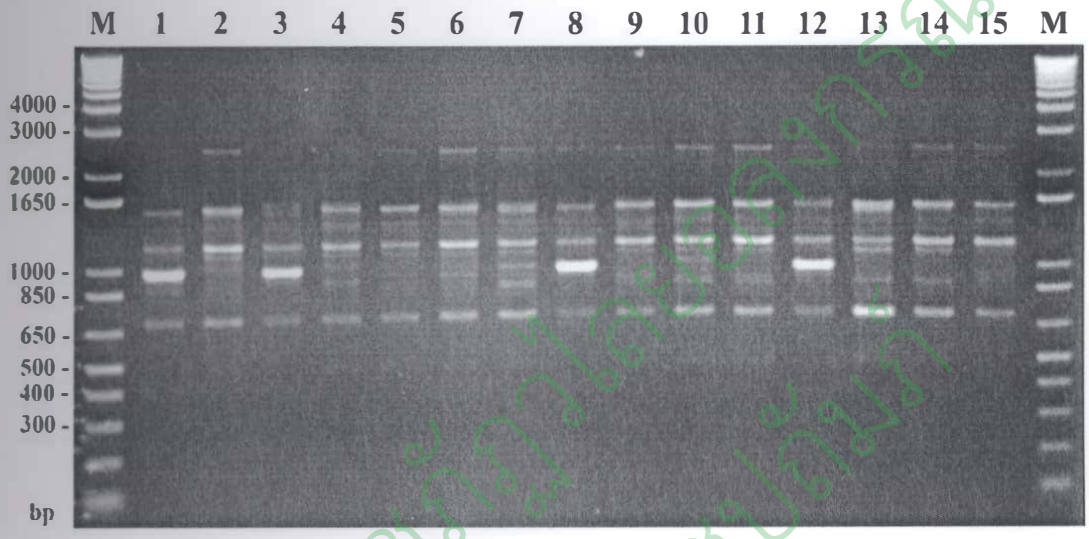
ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ A23 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี สำนักวิทยบริการ ไฟล์ข้อมูลอิเล็กทรอนิกส์



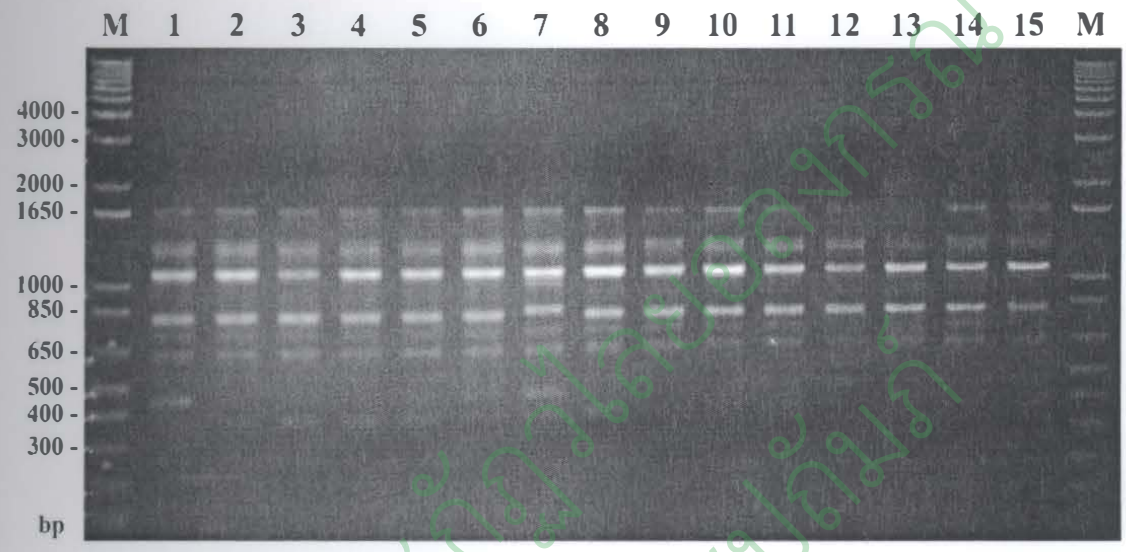
ภาพที่ 5 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ A25 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ไม่ใช่ยืมออกจากห้องสมุด



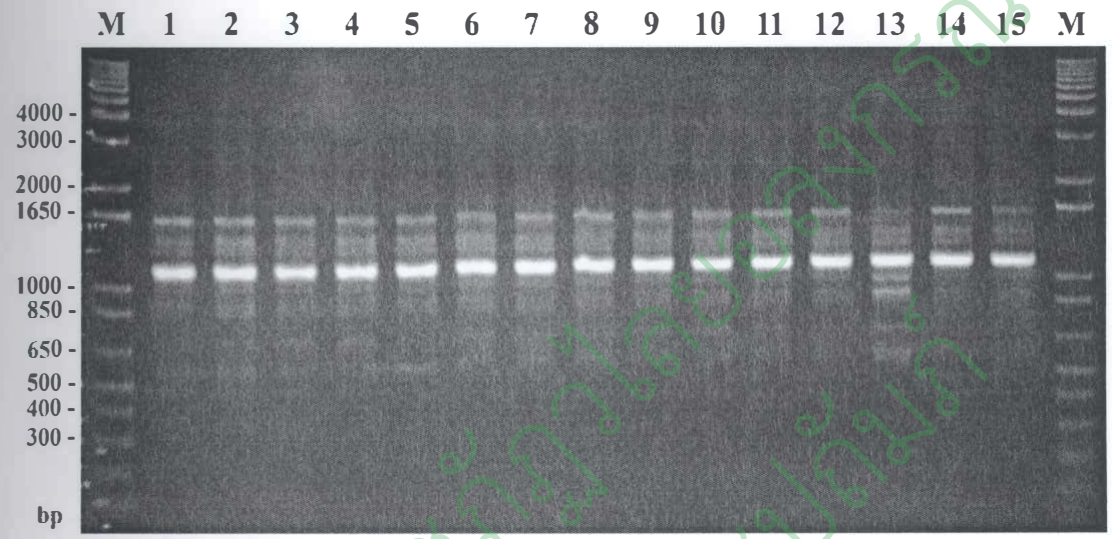
ภาพที่ 6 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ A27 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ไม่พึงประสงค์



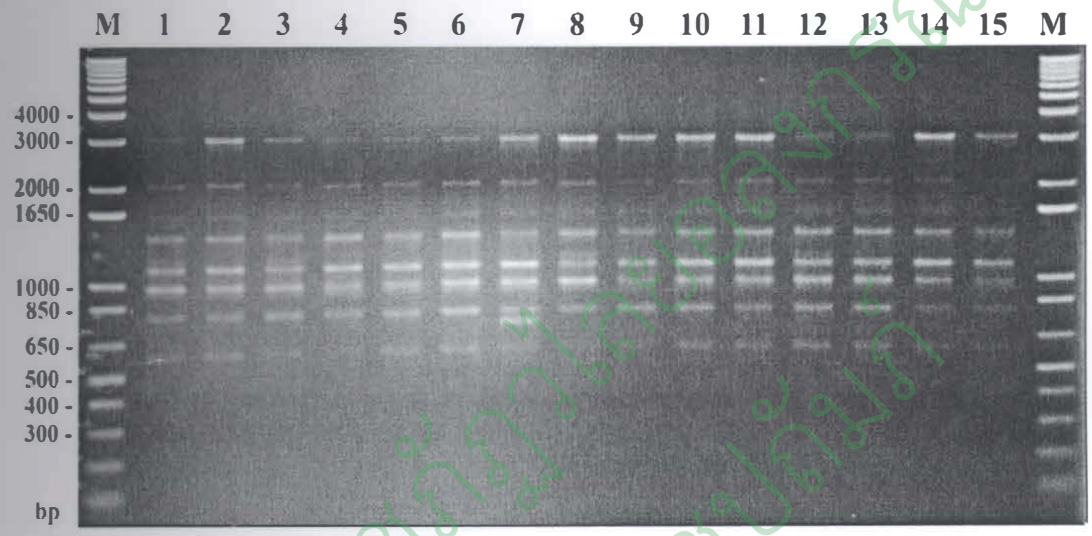
ภาพที่ 7 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ A28 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ห้องสมุดกลาง



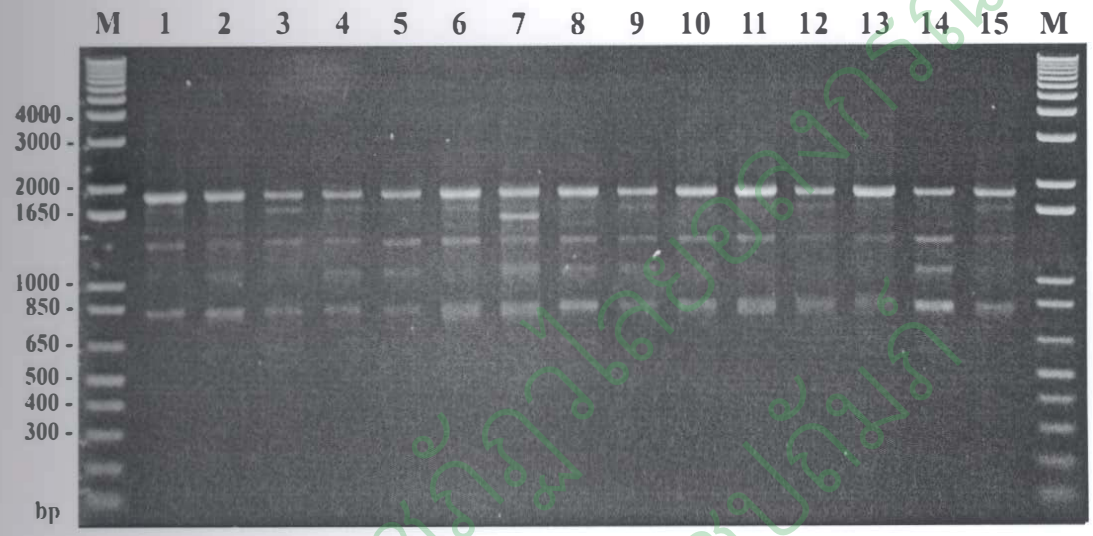
ภาพที่ 8 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ B25 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ห้องสมุดกลางการ์ด



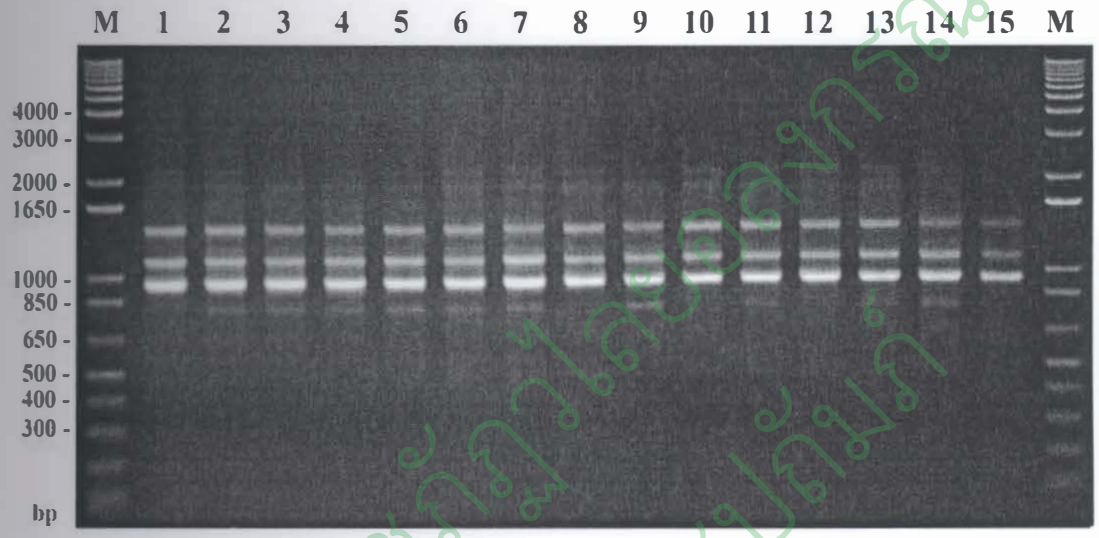
ภาพที่ 9 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ B28 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัย



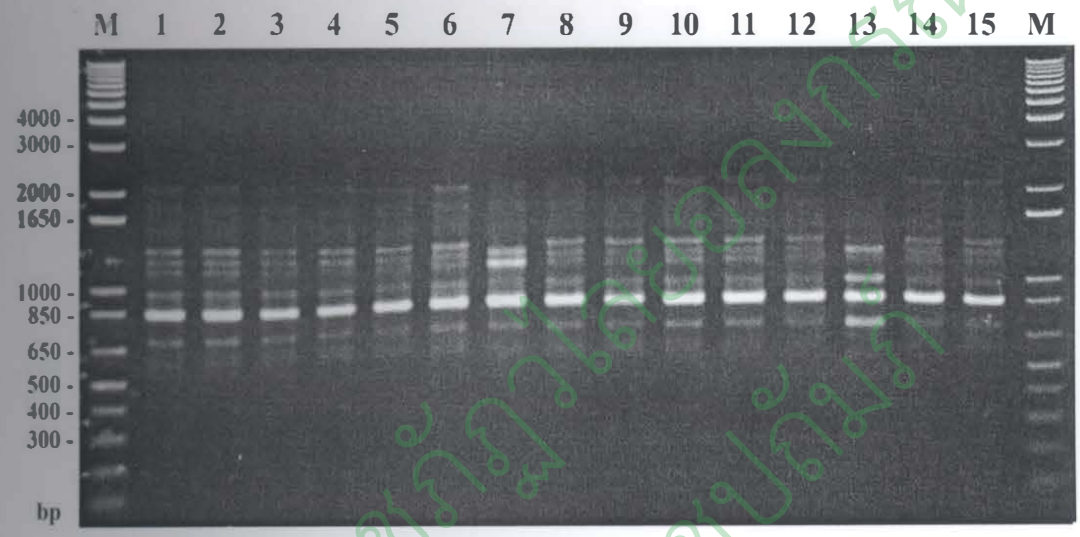
ภาพที่ 10 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ B29 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธัญบุรี ห้องสมุดงานวิจัย



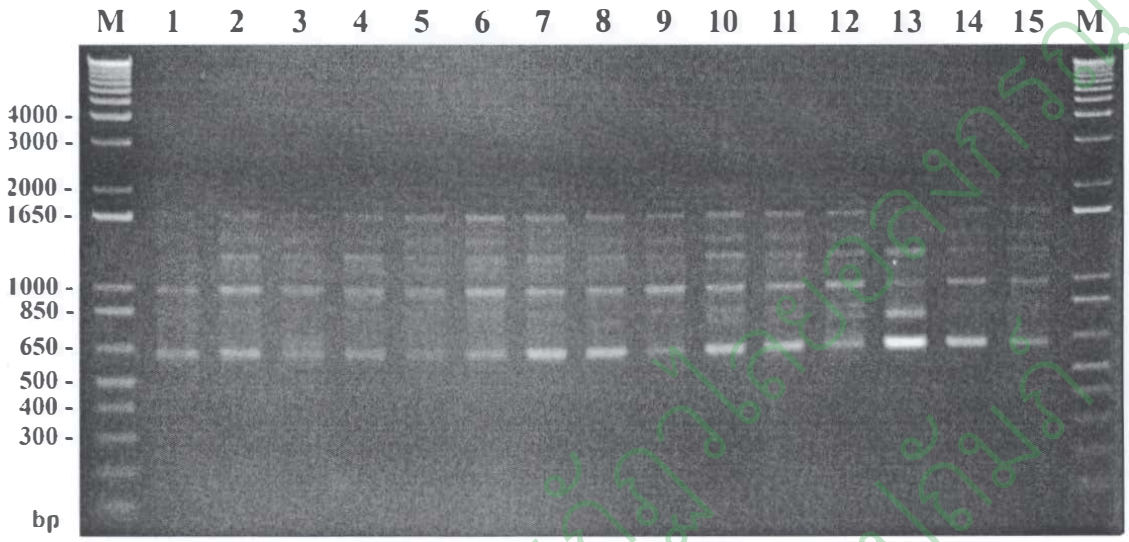
ภาพที่ 11 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ C22 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธัญบุรี ห้องสมุดกลาง



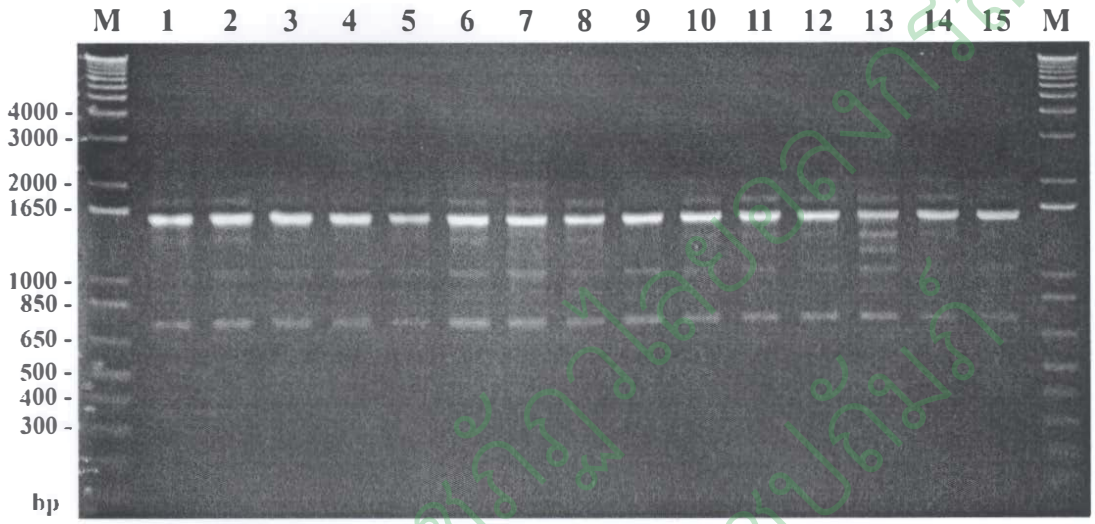
ภาพที่ 12 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ C23 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัย



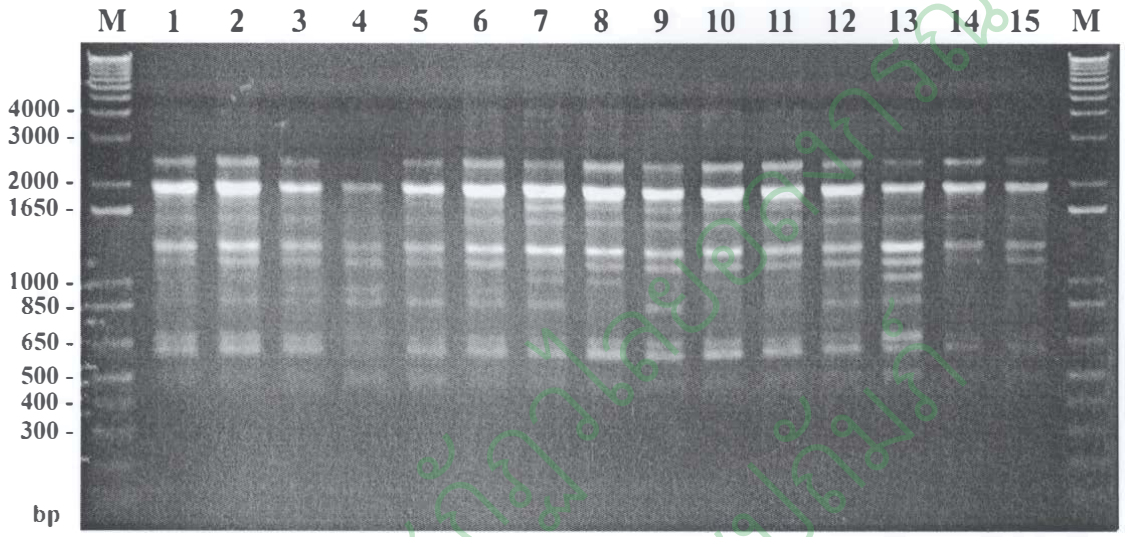
าพที่ 13 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ C25 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ห้องสมุดกลาง



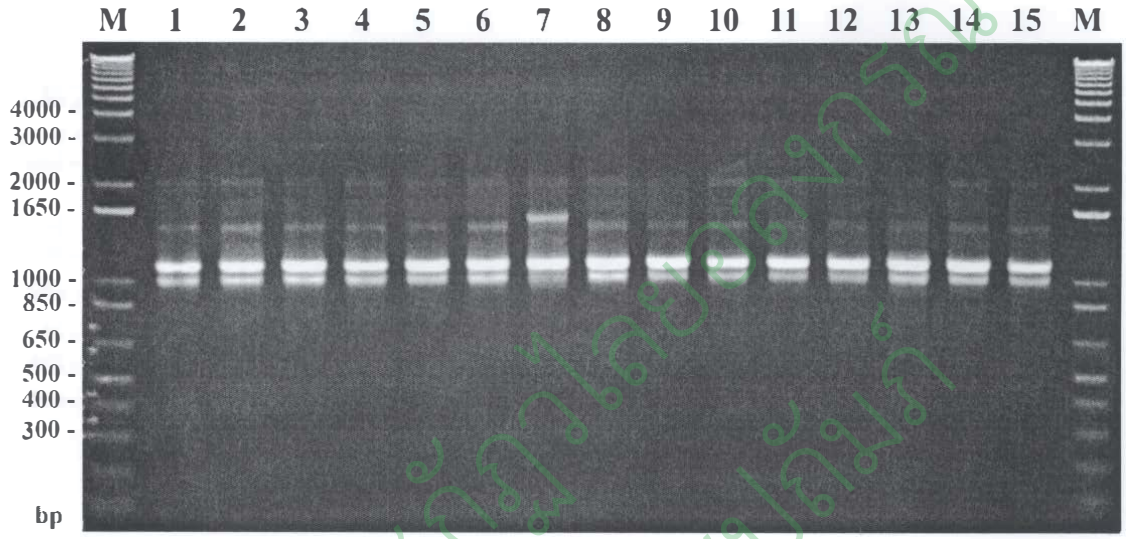
ภาพที่ 14 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ C26 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธัญบุรี ห้องสมุดกลาง



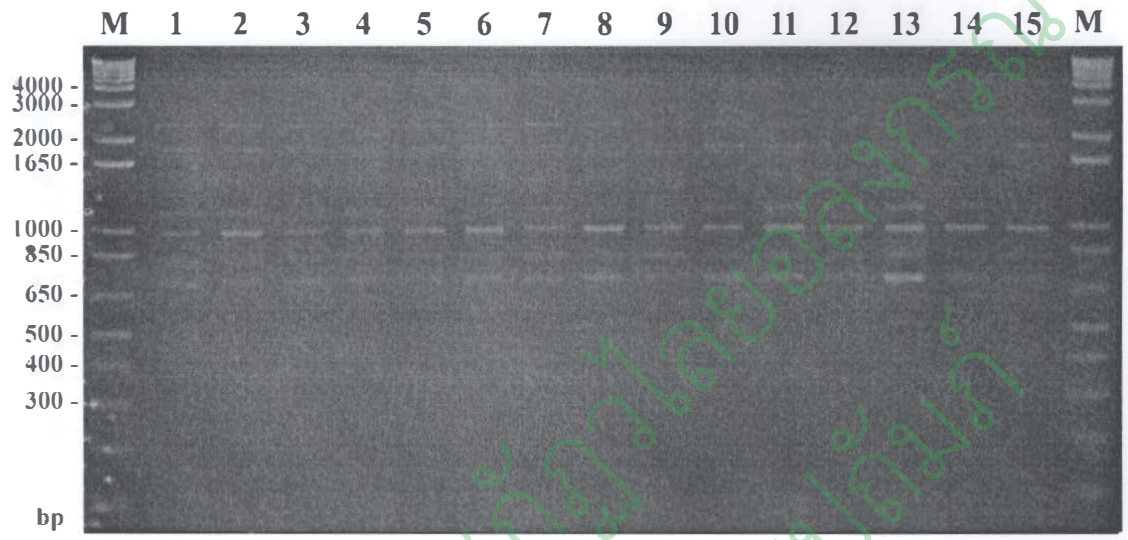
ภาพที่ 15 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ D23 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ห้องสมุดกลาง



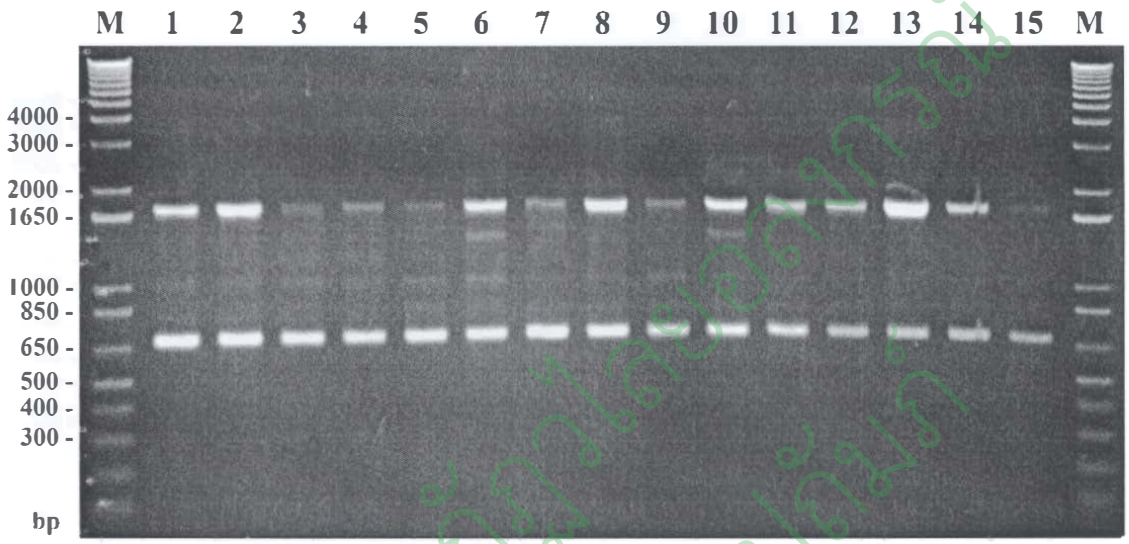
ภาพที่ 16 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ D24 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ไม่อนุญาตให้ทำสำเนาเพื่อการค้า



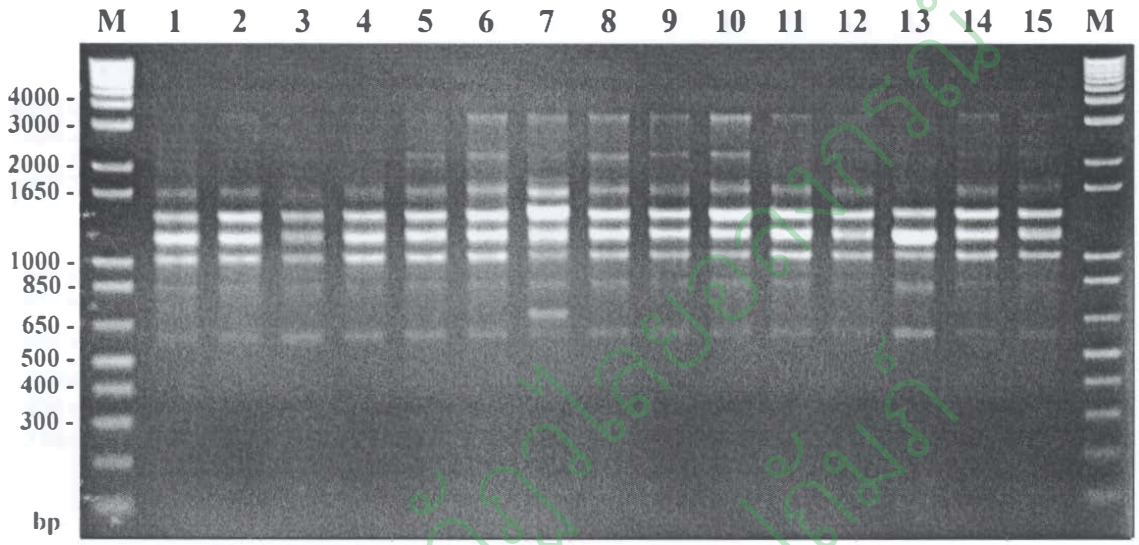
ภาพที่ 17 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ E25 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัย



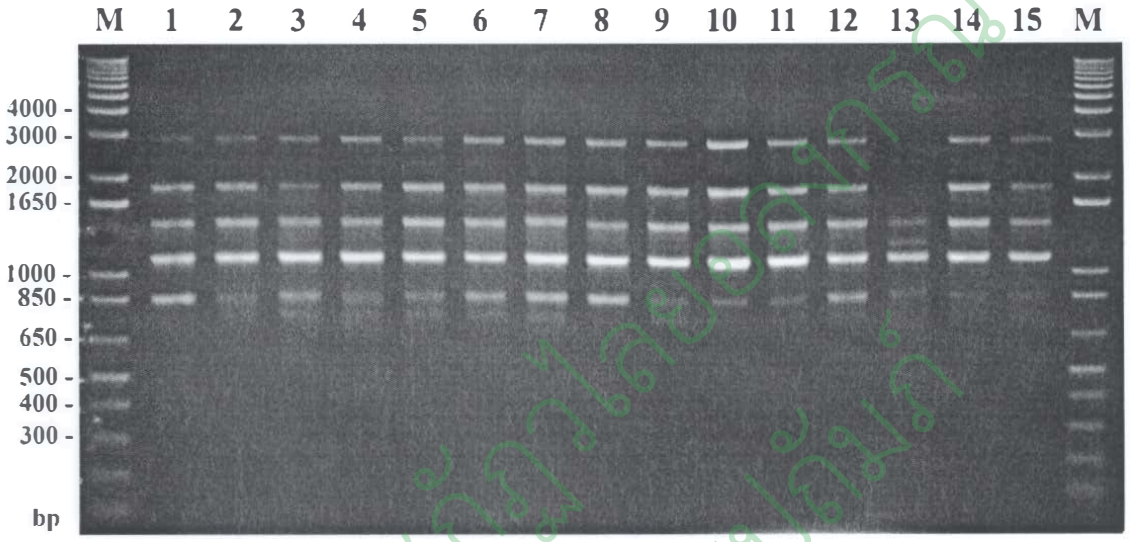
ภาพที่ 18 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ E28 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี เอกสารอ้างอิง ไม่พร้อมปรับปรุงชั่วคราว



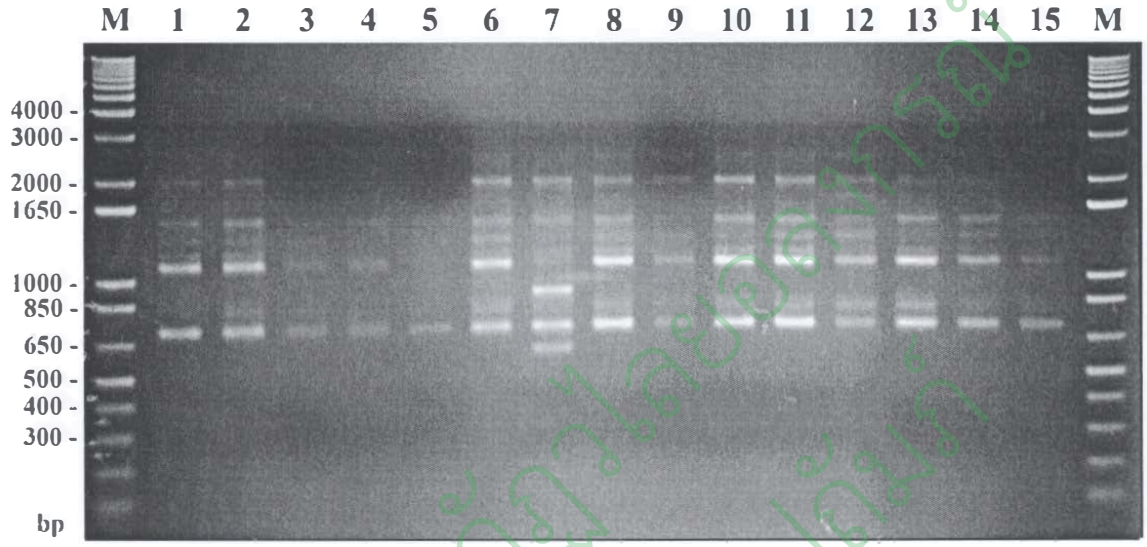
ภาพที่ 19 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ F23 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ลิขสิทธิ์ ห้องสมุดกลาง



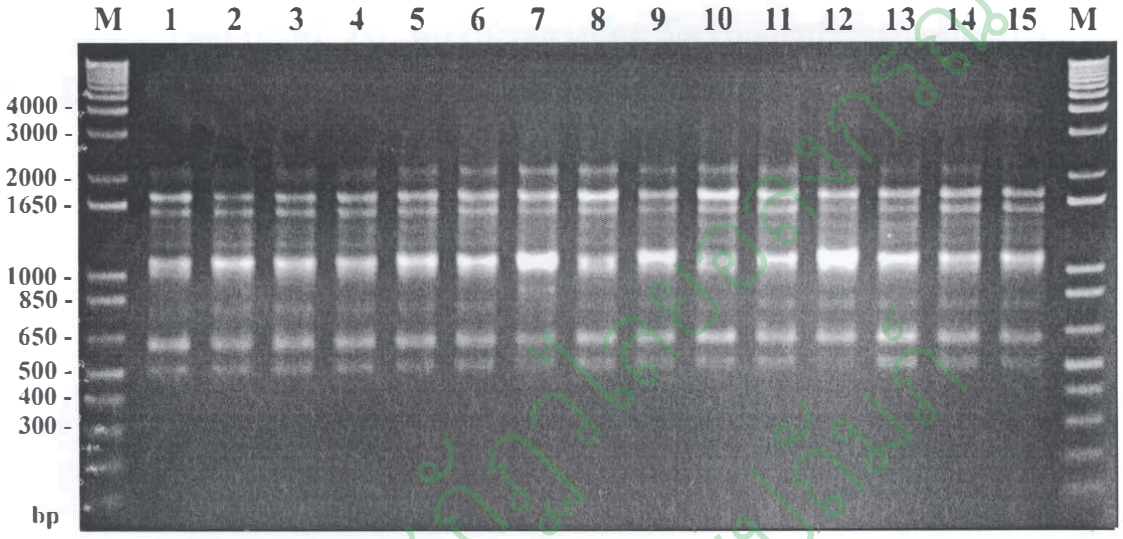
ภาพที่ 20 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ F28 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ไพรัช ธนบุรี



ภาพที่ 21 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ F30 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ห้องสมุดกลาง ใบพิมพ์ปฏิญญาชุมชน

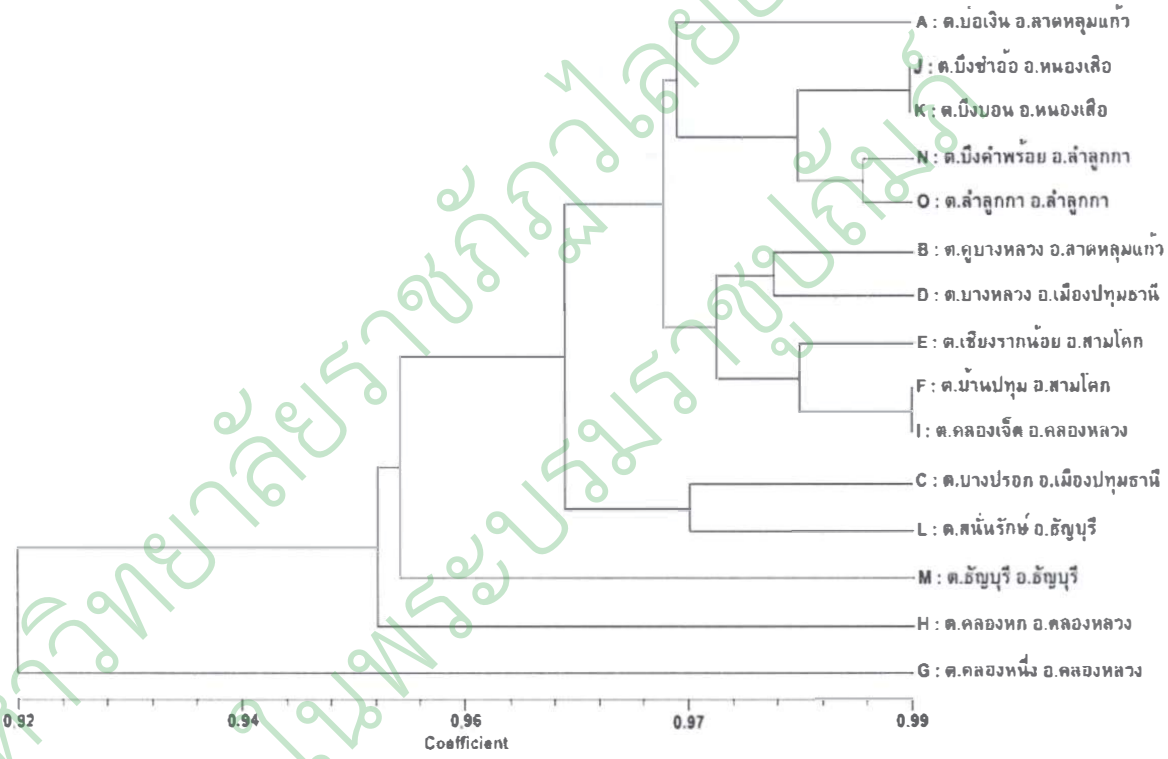


ภาพที่ 22 แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาโดยใช้ไพรเมอร์ F31 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-15 คือ ดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ]

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ห้องสมุดกลาง โพธิ์ยอดกรุงธนบุรี

4.2 ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของบัวหลวงพันธุ์ปัทมา

เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 แบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) และแสดงผลในรูปสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) (ภาพที่ 23) พบว่าบัวหลวงปัทมามีความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม มีค่าดัชนีความเหมือน 0.91-0.99 (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 23 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาในเขตจังหวัดปทุมธานีที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
A	1.00														
B	0.98	1.00													
C	0.97	0.97	1.00												
D	0.97	0.98	0.97	1.00											
E	0.96	0.97	0.97	0.97	1.00										
F	0.97	0.98	0.97	0.98	0.98	1.00									
G	0.94	0.93	0.92	0.93	0.92	0.93	1.00								
H	0.95	0.95	0.96	0.94	0.95	0.95	0.91	1.00							
I	0.98	0.98	0.97	0.97	0.99	0.99	0.93	0.96	1.00						
J	0.97	0.97	0.95	0.95	0.96	0.98	0.92	0.96	0.97	1.00					
K	0.97	0.98	0.96	0.96	0.97	0.98	0.92	0.96	0.98	0.99	1.00				
L	0.96	0.96	0.97	0.96	0.95	0.96	0.92	0.96	0.97	0.97	0.96	1.00			
M	0.95	0.96	0.95	0.95	0.96	0.95	0.92	0.94	0.96	0.95	0.96	0.94	1.00		
N	0.97	0.97	0.96	0.98	0.98	0.98	0.92	0.95	0.98	0.98	0.99	0.96	0.95	1.00	
O	0.97	0.96	0.96	0.96	0.96	0.97	0.92	0.95	0.98	0.98	0.98	0.98	0.94	0.99	1.00

ภาพที่ 24 ค่าดัชนีความเหมือนของบัวหลวงพันธุ์ปัทมาในเขตจังหวัดปทุมธานีซึ่งคำนวณจากแถบดีเอ็นเอบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดี (A-O คือบัวหลวงพันธุ์ปัทมาที่เก็บจากตำบลต่างๆ ในเขตจังหวัดปทุมธานี ได้แก่ ตำบลบ่อเงิน ตำบลคูบางหลวง ตำบลคูบางปรอก ตำบลบางหลวง ตำบลเชียงรากน้อย ตำบลบ้านปทุม ตำบลคลองหนึ่ง ตำบลคลองหก ตำบลบึงชำอ้อ ตำบลบึงบอน ตำบลสนั่นรักษ์ ตำบลธัญบุรี ตำบลบึงคำพร้อย ตำบลลำลูกกา และตำบลคลองเจ็ด ตามลำดับ)

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี ลิขสิทธิ์ของสถาบันวิจัยและพัฒนา

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการวิจัยและสรุป

5.1 วิจารณ์ผลการวิจัย

การตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่ดอมสนองต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมาด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่าไพรเมอร์ 70 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หรือคิดเป็น 97.22 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นจึงเลือกไพรเมอร์ 21 ชนิด ที่เพิ่มดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาตรวจสอบดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมา 15 ตัวอย่าง ที่เก็บจาก 7 อำเภอ (อำเภอละ 2 ตำบล ยกเว้นอำเภอคลองหลวงเก็บ 3 ตำบล) พบแถบดีเอ็นเอรวม 173 แถบ ขนาดประมาณ 350-3,200 คู่เบส (base pairs) ซึ่งทำให้เกิดรูปแบบดีเอ็นเอเฉพาะของบัวหลวงปัทมาแต่ละตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 แบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) และแสดงผลในรูปสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) (ภาพที่ 1) พบว่าบัวหลวงปัทมามีความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) ภายในกลุ่ม มีค่าดัชนีความเหมือน 0.91-0.99 (ภาพที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับการแพร่กระจายของบัวหลวงปัทมาตามลักษณะทางภูมิศาสตร์และหลักฐานทางประวัติศาสตร์ที่พบบัวหลวงปัทมาในพื้นที่ของจังหวัดปทุมธานีมาตั้งแต่โบราณ

การตรวจสอบดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมา 15 ตัวอย่าง พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จากเทคนิคอาร์เอพีดีมีความแตกต่างกันแสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงปัทมาในจังหวัดปทุมธานี และแถบดีเอ็นเอบางแถบอาจใช้เป็นเครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD marker) เพื่อจำแนกบัวหลวงปัทมาที่เก็บมาจากแต่ละตำบลได้ ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้นเพื่อการศึกษาวิจัยและการวางแผนอนุรักษ์ในอนาคต

5.2 สรุป

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมา 15 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีพบว่าสามารถแยกความแตกต่างของบัวหลวงปัทมาแต่ละตัวอย่างได้ และพบว่าบัวหลวงปัทมามีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่น่าจะศึกษาวิจัยและอนุรักษ์ต่อไป

บรรณานุกรม

คุณา นนทพัฒน์. 2546. การปลูกบัวประดับ. บริษัท คอมแพคท์พริ้นท์ จำกัด , กรุงเทพฯ.

จังหวัดปทุมธานี. 2550. ลักษณะทางภูมิศาสตร์. กระทรวงมหาดไทย. แหล่งที่มา : http://www.pathumthani.go.th, 9 มีนาคม 2550.

เฉลิมเกียรติ ถาวรสุข สุมิตานัน มณีดำ ณัฐวุฒิ ทองเพิ่ม ยุทธนา ภู่ทับทิม นพพร ทวีวิทยากร กรวิทย์ ธาระพุทร และ ศรัทธา ลาภวัฒนเจริญ. 2546. บัว พรรณไม้มงคล. สำนักพิมพ์วันชนะ, กรุงเทพฯ.

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.

นฤมล ธนานันต์ และ มานะขาวเมฆ. 2549. การจำแนกบัวหลวงด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี. ว. วิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ 1(3)15-23.

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

สุปราณี วนิชชานันท์. 2540. บัวประดับ. สำนักพิมพ์เพื่อนเกษตร, นนทบุรี.

สุปรียา จันทะเหลา. 2546. บัว. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, 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.

มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

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.