ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์ | พันธุศาสตร์

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวประดับและบัวหลวง

Development of Molecular Markers for Hybrid Detection in Waterlily (*Nymphaea* spp.) and Lotus (*Nelumbo* spp.)

นามผู้วิจัย นางสาวจีรภา ดาทอง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา หงษ์ตระกูล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์นิตย์ศรี แสงเดือน, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวประดับและบัวหลวง

Development of Molecular Markers for Hybrid Detection in Waterlily (*Nymphaea* spp.) and Lotus (*Nelumbo* spp.)

โดย

นางสาวจีรภา ดาทอง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)
พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จีรภา ดาทอง 2555: การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวประดับและบัวหลวง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา หงษ์ตระกูล, Ph.D. 113 หน้า

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับยีน 12 ตำแหน่งโดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสของยีนจากพืชที่มีในฐานข้อมูล และใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวง (*Nelumbo* spp.) 69 ตัวอย่างที่รวบรวมจากในประเทศ และต่างประเทศ พบว่าเมื่อตรวจสอบโดยเทคนิค DFLP (DNA Fragment Length Polymorphism) ในเจลอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในทุกตำแหน่งให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอเพียงรูปแบบเดียว (monomorphism) แต่เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบโดยเทคนิค SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) ในเจล non-denaturing polyacrylamide พบว่ามี 2 ตำแหน่งที่ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอหลายรูปแบบ (polymorphism) คือตำแหน่งของยีน *fruitfull* (*ful*) และ *AGAMOUS-like* (*AG*) โดยมีค่า PICs (Polymorphic Information Contents) เท่ากับ 0.611 และ 0.458 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยอาศัยความหลากหลายของรูปแบบแถบดีเอ็นเอของทั้ง 2 ตำแหน่งโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc-2.20k สามารถแบ่งตัวอย่างบัวหลวง 69 ตัวอย่างเป็น 3 กลุ่มใหญ่ โดย 2 กลุ่มแรกเป็นตัวอย่างบัวหลวงในประเทศไทย และต่างประเทศ ส่วนกลุ่มที่ 3 เป็นตัวอย่างบัวหลวงจากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างบัวหลวงทั้งหมด มีค่า 0.328-0.748ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมภายในชนิด (intraspecific hybridization) ทั้งหมด 31 ตัวอย่างพบว่าสามารถยืนยันความเป็นลูกผสมได้ทั้งหมด 2ตัวอย่าง โดยใช้ SSCP marker ที่จำเพาะกับยีน *ful* สำหรับในบัวประดับ (*Nymphaea* spp.) ได้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมข้ามสกุลย่อย (intersubgeneric hybridization) จำนวน 7 ตัวอย่างโดยใช้เครื่องหมายจำเพาะกับบริเวณ ITS ของยีน *rRNA* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์มาตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I, *Mse*I และ *Rsa*I และศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค SSCP พบว่ารูปแบบดีเอ็นเอที่ได้สามารถยืนยันความเป็นลูกผสมได้ทุกตัวอย่าง นอกจากนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับยีนอีก 5 ตำแหน่งคือ คือ *Apetala* 3 (*AP*3), *AGAMOUS-like* protein (*AGL*), *Leafy* (*LFY*), *pistillata* (*PI*) และ *Sepallata1* (*SEP1*) โดยอาศัยข้อมูลจีโนมบัวประดับและใช้ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างบัวประดับ 12 ตัวอย่างโดยเทคนิค DFLP พบว่ามีสองตำแหน่งมีรูปแบบแถบดีเอ็นเอหลายรูปแบบได้แก่ตำแหน่งยีน *LFY* และ *PI* โดยมีค่า PICs เท่ากับ 0.444 และ 0.152 ตามลำดับ การตรวจสอบ เครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 5 ตำแหน่ง รวมทั้งตำแหน่ง ITS ของ *rRNA* โดยเทคนิค SSCP พบว่าตำแหน่งยีน *AP*3, *LFY*, *PI*, *SEP1* และ ITS ของยีน *rRNA* ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอหลายรูปแบบ และมีค่า PICs เท่ากับ 0.219, 0.607, 0.607, 0.468 และ 0.290 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้ง 5 ตำแหน่งโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc-2.20k พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างบัวประดับเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มบัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* และกลุ่มบัวประดับสกุลย่อย *Brachyceras* ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.333-0.933 ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมในบัวประดับทั้ง 7 ตัวอย่าง โดยเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับพันธุ์ที่พัฒนาโดยอาศัยลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับสกุลย่อยจากเทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) และเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน พบว่าสามารถยืนยันความเป็นลูกผสมได้ทุกตัวอย่างในบัวประดับที่ศึกษา เครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะนี้สามารถใช้ประโยชน์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์บัวในอนาคต

/ /

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Jirapa Dathong 2012: Development of Molecular Markers for Hybrid Detection in Waterlily (*Nymphaea* spp.) and Lotus (*Nelumbo* spp.). Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Assistant Professor Vipa Hongtrakul, Ph.D. 113 pages.

Twelve gene specific markers were developed based on plant gene sequences available in database and used for DNA fingerprinting of 69 lotus (*Nelumbo* spp.) samples collected from Thailand and foreign countries. All 12 specific markers developed exhibited monomorphism when detected in 1% agarose gel (DFLP: DNA Fragment Length Polymorphism technique), but when analysis of the PCR product in non-denaturing polyacrylamide gel (SSCP: Single Strand Conformational Polymorphism technique) resulted in two polymorphic loci, *fruitful* (*ful*) and *AGAMOUS-like* (*AG*). Polymorphic Information Contents (PICs) of these two loci were 0.611 and 0.548, respectively. Cluster analysis using NTSYSpc-2.20k based on DNA variation at the 2 loci (*ful* and *AG*) was performed and could classify all 69 samples into 3 groups. Group I and II consisted of lotus samples form Thailand and foreign counties, while group III was composed of only lotus samples from People Republic of China. Genetic similarlity among lotus samples ranged from 0.328-0.748. Twenty six lotus samples out of 31 samples from the intraspecific hybridization were confirmed to be the hybrids using SSCP *ful* gene specific marker. Seven intersubgeneric waterlily (*Nymphaea* spp.) samples were verified by PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) technique. The PCR products of *rRNA* ITS region were cut by *Alu*I, *Mse*I and *Rsa*I restriction enzymes. All 7 samples were confirmed to be hybrids using SSCP ITS specific marker. In addition, 5 gene specific markers, *Apetala* 3 (*AP*3), *AGAMOUS-like* protein (*AGL*), *Leafy* (*LFY*), *Pistillata* (*PI*) and *Sepallata1 (SEP1*), were developed based on waterlily genome. Only *LFY* and *PI* gene specific markers were polymorphic based on DFLP technique. PIC scores of these two loci were 0.444 and 0.152, respectively. Using SSCP technique with 12 waterlily samples, *AP*3, *LFY*, *PI*, *SEP1* and ITS of *rRNA* gene specific makers were found to be polymorphic. PIC scores of *AP*3, *LFY*, *PI*, *SEP1* and ITS of *rRNA* specific makers were 0.219, 0.607, 0.607, 0.468 and 0.290, respectively. DNA fingerprints of 12 waterlilies based on 5 polymorphic markers were analyzed using NTSYSpc-2.20k and could classify all samples into 2 groups. Group I consisted of subgenus of *Nymphaea* and their hybrids and group II consisted of subgenus of *Brachyceras*. Genetic similarlity was ranged from 0.333-0.933. Markers specific to subgenus *Nymphaea* and subgenus *Brachyceras* (hybrid parent) were developed by sequencing of AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) subgenus specific DNA bands. All gene specific and subgenus specific markers developed could be used to verify all 7 intersubgeneric hybrids and could be used for hybrid detection in waterlily breeding program in the future.

_____ _____ ___ / ___ / _____

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิภา หงษ์ตระกูล ประธานกรรมการที่ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำตลอดช่วงเวลาที่ทำงานวิจัย รวมถึงตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. นิตย์ศรี แสงเดือน ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในงานวิจัย รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ประดิษฐ์ พงษ์ทองคำ ประธานการสอบ และ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเม อรัญนารถ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาอบรมสั่งสอน ถ่ายทอดวิชาความรู้ และให้กำลังใจเป็นอย่างดีเสมอมา

ขอขอบคุณ นางปิยมาศ ผองแก้ว นางเมธานี หอมทอง นายฐิติ กาญจนเกตุ นางสาว ญาตวี รัตนมณี นางสาวเมทินี กลัดมุข และนางสาวศิรินันท์ สุวรรณน้อย รวมทั้งสมาชิกทุกคนในห้องปฏิบัติการ 4511 ภาควิชาพันธุศาสตร์ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในทุกด้าน และเป็นกำลังใจที่ดีแก่ผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2551-2552 ทุนบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ปี 2552-2553 คุณไพรัตน์ ทรงพานิช ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างบัวประดับพ่อแม่และลูกจากการผสม ขอขอบคุณคุณกฤษฎา สไลยรักษ์ และ ผศ. ดร. ณ นพชัย ชาญศิลป์ สำหรับตัวอย่างบัวหลวงพ่อแม่และลูกผสมบางส่วนที่ใช้ศึกษา

ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกทุกคนในครอบครัว ที่คอยดูแล เป็นกำลังใจ และสนับสนุนกำลังทรัพย์ ตลอดจนคอยช่วยเหลือในทุกสิ่งจนสำเร็จการศึกษา

จีรภา ดาทอง

มีนาคม 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
อุปกรณ์	19
วิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	34
สรุปและข้อเสนอแนะ	96
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	99
ภาคผนวก	107
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	113

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายชื่อพันธุ์บัวหลวงที่ศึกษา	22
2	รายชื่อพันธุ์บัวประดับที่ศึกษา	23
3	ลำดับเบสของไพรเมอร์ และ adapter ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวประดับด้วยเทคนิค AFLP	30
4	ไพรเมอร์จำเพาะของยีนที่ใช้ศึกษา ความหลากหลายทางพันธุกรรมบัวหลวง	34
5	สรุปลำดับเบสไพรเมอร์จำเพาะกับยีนที่พัฒนาและใช้ศึกษา และ Annealing temperature ไพรเมอร์ที่ได้ตรวจสอบทั้งหมด ด้วยเทคนิค DFLP และ SSCP	48
6	สรุปจำนวนแอลลีล ค่า PICs และขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ของยีนทั้งหมดที่ได้พัฒนาให้จำเพาะกับยีนในบัวหลวง	50
7	ความถี่ของแอลลีลในแต่ตำแน่งที่ได้ศึกษาในบัวประดับ และจำนวน homozygote และ heterozygote ในตัวอย่างบัวประดับด้วยเทคนิค SSCP	71
8	ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ของยีนที่พัฒนาให้จำเพาะกับยีนในบัวประดับทั้งหมดรวมถึงจำนวนแอลลีลและค่า PICs	72
9	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พัฒนาขึ้นจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP ทั้ง 6 ตำแหน่ง	75

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	บัวจำแนกตามสกุล (A) สกุลนีลัมโบ (*Nelumbo*), (B) สกุลนิมเฟีย (*Nymphaea*) และ (C) สกุลวิกตอเรีย (*Victoria*)	6
2	ลักษณะดอกของบัวหลวง (A) บัวหลวงปทุม (B) บัวหลวงปักกิ่งชมพู (C) บัวหลวง สัตตบงกช (D) บัวหลวงบุณฑริก (E) บัวหลวงสัตตบุษย์ (F) บัวหลวงปักกิ่งขาว (G) บัวหลวงพระราชินี และ (H) บัวเหลืองอเมริกัน (*Nelumbo lutea* Pers.)	8
3	ลักษณะดอกอุบลชาติล้มลุกบานกลางวัน (A) บัวผัน บัวเผื่อน (B) บัวขาบ และ (C) บัวจงกลนี	10
4	ลักษณะดอกของอุบลชาติล้มลุกบานกลางคืน (A) *Nymphaea lotus* L. (B) *N. pubescens* Wild. (C) *N. rubra* Roxb (D) *N. spontaneous* Landon และ (E) *N. Zenkeri* Glig.	11
5	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัวหลวงตัวอย่างต่างๆ ทั้งจากในประเทศ และต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *chalcone synthase* (*CHS*) ด้วย (A) เทคนิค AS-PCR และ (B)	35
6	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัวหลวงตัวอย่างต่างๆ ทั้งจากในประเทศ และต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *SP* ด้วย (A) เทคนิค AS-PCR และ (B)	37
7	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัวหลวงตัวอย่างต่างๆ ทั้งจากในประเทศ และต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *ful* ด้วย (A) เทคนิค AS-PCR และ (B)	39
8	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัวหลวงตัวอย่างต่างๆ ทั้งจากในประเทศ และต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับบริเวณ ITS ของยีน *rRNA* ด้วย (A) เทคนิค AS-PCR และ (B)	41
9	ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *AG*	45
10	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัวหลวงตัวอย่างต่างๆ ทั้งจากในประเทศ และต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *AG* ด้วย (A) เทคนิค AS-PCR และ (B)	46

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	แสดง phylogenetic tree ของตัวอย่างบัวหลวงทั้ง 69 สายพันธุ์ โดยตัวอย่างบัวหลวงกลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มตัวอย่างของบัวหลวงจากประเทศจีนคือ แหลมชมพู ฉัตรชมพู Taikong และฉัตรชมพู Hubai	52
12	ลักษณะของคู่พ่อแม่ผสมและลูกผสมหมายเลข LH_1-LH_4 และ LH_7 (ภาพ A) และรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ บริเวณ *fruitfull protein* ด้วยเทคนิคSSCP (ภาพ B)	54
13	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ บริเวณ *fruitfull protein* ด้วยเทคนิคSSCP	55
14	ลักษณะของคู่พ่อแม่ผสมและลูกผสมหมายเลข LH_{28} (A) รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ บริเวณ fruitfull protein ด้วยเทคนิคSSCP (B)	57
15	ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *PI* ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก genomic DNA ของ *A. thaliana* (AF115829.1) และ cDNA ของบัวประดับ และ *A. thaliana*	60
16	ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *AP3* ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก genomic DNA ของ *A. lyrata* (AF143380.1) และ cDNA ของบัวหลวง, บัวประดับ และ *A. lyrata*	62
17	ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *AGL* ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก genomic DNA ของ *A. lyrata* (GQ117273.1) และ cDNA ของบัวหลวง, บัวประดับ และ *A. Lyrata*	64
18	ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *LFY* ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก genomic DNA ของ *Nymphaea odorata* (AF105110.1)	66
19	ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *SEP1* ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก genomic DNA ของ ของ *A. thaliana* (AY727578.1) และ cDNA ของบัวหลวง, บัวประดับ และ *A. thaliana*	68
20	แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัวหลวงตัวอย่างต่างๆ ทั้งจากในประเทศ และต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *AP3, AGL, LFY, PI, SEP และ* ITS ของยีน *rRNA* ด้วย เทคนิค AS-PCR	69

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัวหลวงตัวอย่างต่างๆ ทั้งจากในประเทศและต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *AP3, AGL, LFY, PI, SEP 1* และ ITS ของยีน *rRNA* ด้วย เทคนิค SSCP	70
22	แสดง phylogenetic tree ของพันธุ์บัวประดับทั้ง 12 สายพันธุ์ และตัวอย่างบัวหลวงกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างของบัวนางกวักฟ้าใบลาย *N.* 'Nankwak blue'	73
23	รูปแบบของดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP ในตัวอย่างบัวหลวง และบัวนางกวักฟ้า (ภาพ A) (แหลมขาว คลองโยง นครปฐม (9), แหลมชมพู สามร้อยยอด ประจวบฯ (10), แหลมชมพู พระราชินี (RN) เพชรบุรี (55), จีน แหลมชมพู Taikong (C3) กวางฉาง (64), *N. Nangkwak blue* (12)) (คู่ไพรเมอร์ E-ACC/M-CTC, E-ACG/ M-CTC, E-ACT/ M-CTC, E-AGC/ M-CTC, และ E-AGG/ M-CTC) และรูปแบบของดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP ในบัวประดับ (ภาพ B)	74
24	แสดงผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ที่พัฒนามาจากเทคนิค AFLP ทั้ง 6 ตำแหน่งในตัวอย่างบัวหลวงและบัวประดับ	76
25	แสดงภาพของคู่ผสมระหว่าง บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* (*N.'Supranee Pink'*และสกุลย่อย *Brachyceras* (*N.'Nangkwak blue'*) และลูกผสมที่ได้ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง (ภาพ A) และรูปแบบที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในบริเวณ ITS ของยีน *rRNA* ด้วยเอนไซม์ *AluI*, *Mse*I และ *Rsa*I ตามลำดับ ในเจลอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ B)	78
26	แสดงภาพของคู่ผสมระหว่าง บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* (*N.* 'Miss Siam') และสกุลย่อย *Brachyceras* (*N.* '*Nangkwak blue*') และลูกผสมที่ได้ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง (ภาพ A) และรูปแบบที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในบริเวณ ITS ของยีน *rRNA* ด้วยเอนไซม์ *AluI*, *Mse*I และ *Rsa*I ตามลำดับ ในเจลอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ B)	79
27	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของคู่ผสม ระหว่าง บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* (*N.* 'Miss Siam') กับสกุลย่อย *Brachyceras* (*N.* '*Nangkwak blue*') และลูกผสมที่ได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *pitellata (PI),* ด้วย เทคนิค DFLP และ SSCP	80

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
28	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของคู่ผสม ระหว่าง บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* (*N.* 'Miss Siam') กับสกุลย่อย *Brachyceras* (*N.* '*Nangkwak blue*') และลูกผสมที่ได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *Leafy protein (LFY)* ด้วย DFLP และ เทคนิค SSCP	81
29	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของคู่ผสม ระหว่าง บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* (*N.* 'Miss Siam') กับสกุลย่อย *Brachyceras* (*N.* '*Nangkwak blue*') และลูกผสมที่ได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับบริเวณ ITS ของยีน *rRNA* ด้วย เทคนิค SSCP	82
30	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ multiplex PCR ของคู่ไพรเมอร์ E-AGG/M-CAT_B และ EAAC/M-CTA_N ของคู่ผสมระหว่าง บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* (*N.* 'Miss Siam') กับสกุลย่อย *Brachyceras* (*N.* '*Nangkwak blue*') และลูกผสมที่ได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง (ภาพ A) และรูปแบบของยีนในจีโนมของคลอโรพลาสต์โดยคู่ไพรเมอร์ E-AAC/MCAT_N ด้วย เทคนิค SSCP	82

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFLP	=	Amplified Fragment Length Polymorphism
AS-PCR	=	Allele Specific-PCR
cDNA	=	Complementary DNA
DFLP	=	DNA Fragment Length Polymorphism
Ref-SSCP	=	endonuclease fingerprinting-SSCP
ISSR	=	Inter Simple Sequence Repeat
MS	=	Microsatellites
nrITS	=	nuclear ribosomal internal transcribed spacer
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PICs	=	Polymorphic Information Contents
RAPD	=	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism
SCAR	=	Sequence Characterized Amplified Region
SSCP	=	Single Strand Conformation Polymorphism
SSR	=	Simple Sequence Repeat
T_a	=	annealing temperature
T_m	=	melting temperature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวประดับและบัวหลวง

Development of Molecular Markers for Hybrid Detection in Waterlily (*Nymphaea* spp.) and Lotus (*Nelumbo* spp.)

คำนำ

บัวเป็นพืชไม้น้ำที่มีความสวยงามนิยมปลูกเพื่อเป็นไม้มงคลและประดับบ้าน บัวแบ่งเป็น 3 ชนิดคือ ปทุมชาติ หรือบัวหลวง (lotus) อุบลชาติ หรือบัวประดับ (waterlily) และบัวกระด้ง (victoria) โดยอุบลชาติอยู่ในวงศ์ Nymphaeaceae สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามแหล่งกำเนิดคือ tropical waterlily เป็นบัวประดับที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนเช่น บัวผัน บัวเผื่อน บัวสายและจงกลนี และอีกประเภท คือ hardy waterlily เป็นบัวประดับที่มีถิ่นกำเนิดในเขตอบอุ่นและหนาว บัวฝรั่งมีดอกเพียง 5 สี ได้แก่ แดง ชมพู เหลือง ขาว และแสด อุบลชาติทั้งหมดประกอบไปด้วย 5 สกุลย่อย (Subgenus) ได้แก่ สกุลย่อย *Anecphya*, *Brachyceras*, *Hydrocallis*, *Lotos* และ *Nymphaea* โดยมีเพียง 2 สกุลย่อยที่ให้ดอกโทนสีน้ำเงิน คือสกุลย่อย *Anecphya* และ *Brachyceras* ที่ผ่านมาประเทศไทยได้มีการนำเข้าบัวฝรั่งเข้ามาในประเทศเพื่อการปลูกเป็นไม้ประดับที่สวยงามจนถึงการนำมาปรับปรุงสายพันธุ์ลูกผสมใหม่ ดังเช่น Siam Blue Hardy ที่เป็นบัวสีม่วงน้ำเงินซึ่งเป็นสีที่ไม่เคยปรากฏในบัวฝรั่งมาก่อน และยังมีแทนขวัญที่ชนะเลิศการประกวดบัวฝรั่งพันธุ์ใหม่ของสมาคมบัวโลก ปี 2549 (มติชนกรุ๊ป, 2554)

บัวหลวงเป็นพืชดอกที่อยู่ในวงศ์ Nelumbonaceae ซึ่งมี 2 ชนิด คือ *Nelumbo nucifera* หรือบัวหลวงเขตร้อน เป็นดอกบัวที่ใช้บูชาพระและประกอบพิธีที่สำคัญทางศาสนา เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ประโยชน์ได้จากทั้ง ราก ดอก ฝัก มีสรรพคุณเป็นยาและสามารถนำมาประกอบอาหารได้ และบัวเหลืองอเมริกัน *Nelumbo lutea* หรือบัวเหลือง lotus มีลักษณะเหมือนบัวหลวงในประเทศไทยทุกประการ เพียงแต่มีลักษณะใบเล็กกว่า และมีดอกสีเหลืองและหยุดการเจริญเติบโตในฤดูหนาว (Slocum, 1996) โดยจุดมุ่งหมายของการพัฒนาสายพันธุ์บัวปัจจุบันคือต้องการปรับปรุงพันธุ์บัวให้มีลักษณะสวยงามหลากหลาย มีกลิ่นหอม และผลผลิตสูงเมล็ดโต เป็นที่ต้องการของตลาด วิธีที่เกษตรกรนิยมปรับปรุงพันธุ์บัวคือการผสมบัวแล้วปลูกด้วยเมล็ดจึงทำให้ในปัจจุบันมีบัวลูกผสมพันธุ์ใหม่จำนวนมาก ที่ผ่านมาการจำแนกบัวและการตรวจสอบความเป็นลูกผสมจะนิยมใช้ลักษณะทางสรีระวิทยาของบัวไม่ว่าจะเป็น สีดอก รูปร่างของดอก ขนาดของดอก (Chen *et al*., 2007) ซึ่งเป็นวิธีที่จำกัด ปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตนิยมศึกษากันในระดับโมกุลโดยใช้เครื่องหมาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โมเลกุลซึ่งมีหลายเทคนิคล้วนมีข้อดีที่ต่างกัน ทั้งที่เป็น dominant marker และ co-dominant marker ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุลประเภท co-dominant marker เป็นเครื่องหมายที่ดีกว่าเครื่องหมายโมเลกุลประเภท dominant marker โดยเฉพาะที่สามารถให้ความแตกต่างเมื่อตรวจสอบ heterozygote และ homozygote ซึ่งเหมาะอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้ตรวจสอบความเป็นลูกผสมและศึกษาความแตกต่างกันของรูปแบบยีนในบัวหลวง จากรายงานที่ผ่านมาได้มีการใช้ ISSR (Xue *et al*., 2006) RAPD (Han *et al*., 2000) mtDNA RFLP (Kanazawa *et al*., 1998) และ allozyme รวมกับ ISSR (Tian *et al*., 2008) ศึกษาพันธุกรรมของบัวหลวง จะเห็นได้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลประเภท co-dominant marker ที่ได้มีการศึกษาแล้วจะมีเพียง allozyme ซึ่งเป็นการศึกษาในระดับโปรตีนเท่านั้นจึงมีข้อจำกัดทางด้านให้ความหลากหลายที่น้อยกว่าศึกษาระดับดีเอ็นเอ การศึกษาในครั้งนี้เพื่อพัฒนาเครื่องหมายประเภท co-dominant marker เพื่อระบุความจำเพาะของพันธุ์และตรวจสอบลูกผสมพันธุ์ใหม่ของบัวหลวงและบัวประดับ โดยใช้เทคนิค SSCP ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถแยกความแตกต่างได้แม้มีความแตกต่างใลำดับเบสเพียงเล็กน้อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. รวบรวมพันธุ์บัวทั้งจากในประเทศและต่างประเทศประมาณ 50-60 พันธุ์/ตัวอย่าง ผสมพันธุ์บัวหลวงและบัวประดับอย่างน้อย 10 คู่

2. พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลประเภท co-dominant marker ที่จำเพาะกับยีน และศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวงและบัวประดับ โดยใช้ DFLP marker และ SSCP marker

3. วิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ได้ เพื่อยืนยันความจำเพาะของเครื่องหมายโมเลกุล

4. สรุปเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถใช้ตรวจสอบความเป็นลูกผสม และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในตัวอย่างพ่อแม่ลูกผสมและบัวพันธุ์ต่างๆ ที่ศึกษา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. ข้อมูลทั่วไป

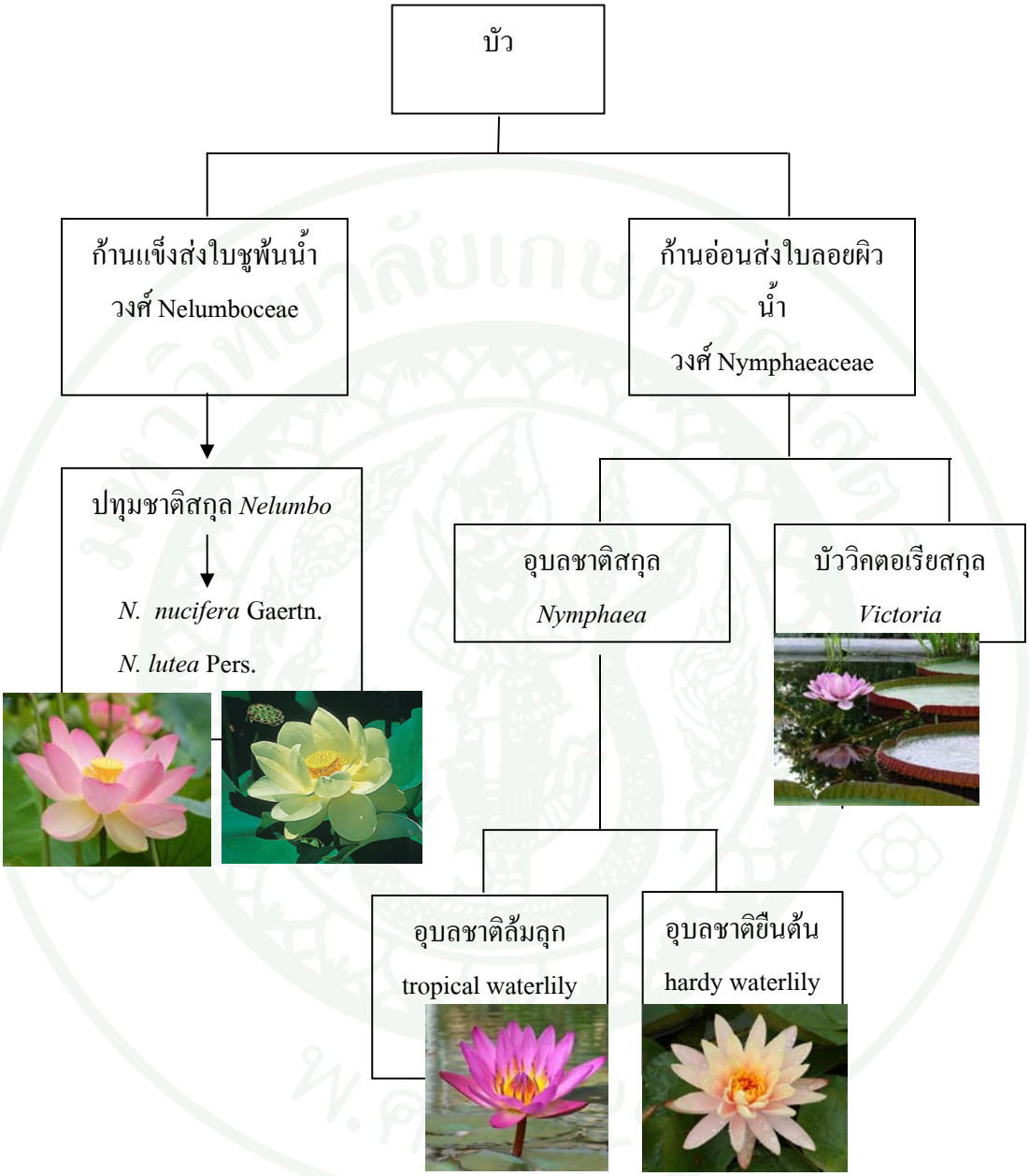
บัวเป็นพรรณไม้น้ำประเภทพืชล้มลุก มีลำต้นและหัวอยู่ในดินใต้น้ำ การเจริญชูก้านใบและดอกขึ้นมาบนผิวน้ำ ใบมีลักษณะกลมกว้างใหญ่ ผิวใบเรียบ มีสีเขียวหรือน้ำตาลอ่อน ดอกเป็นกลีบซ้อนกันหลายชั้น ลักษณะดอกคล้ายรูปกรวย เวลาบานคล้ายกับร่ม ดอกมีสีขาว ชมพู เหลือง ผลคือส่วนที่อยู่ตรงกลางดอก ซึ่งมีเมล็ดประกอบอยู่ภายในจำนวนมาก ลักษณะ ขนาด และสี ของใบและดอกขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ พืชในวงศ์บัวเป็นกลุ่มพันธุ์พืชที่อยู่ในน้ำทั้งหมด เดิมนักพฤกษศาสตร์ได้รวมเอาบัวหลวงและบัวสายไว้ในวงศ์ Nymphaeaceae ซึ่งมี 7 สกุลคือ *Nymphaea*, *Nelumbo*, *Victoria*, *Barclaya*, *Nyphar*, *Euryale* และ *Ondinea* ขณะนี้นักพฤกษศาสตร์ได้แยกบัวหลวงออกเป็นวงศ์ Nelumbonaceae ส่วนสกุลอื่นๆ นั้นยังคงอยู่ในวงศ์ Nymphaeaceae (สุชาดา, 2550) บัวหลวงหรือ sacred lotus เป็นพืชดอกที่อยู่ในวงศ์ Nelumbonaceae ซึ่งมี 2 ชนิด คือ *Nelumbo nucifera* Gaertn. หรือบัวหลวงเขตร้อน และบัวหลวงอเมริกัน *Nelumbo lutea* Pers. หรือบัวเหลือง ซึ่งมีลักษณะเหมือนบัวหลวงในประเทศไทยทุกประการ เพียงแต่มีลักษณะใบเล็กกว่า และมีดอกสีเหลืองและหยุดการเจริญเติบโตในฤดูหนาว (Slocum, 1996) บัวหลวงเป็นบัวก้านแข็งใบชูพ้นน้ำ ส่วนบัวก้านอ่อนใบลอยบนน้ำอยู่ในวงศ์ Nymphaeaceae แบ่งเป็นบัวในสกุลนิมเฟีย (*Nymphaea*) ประกอบด้วยอุบลชาติยืนต้น (hardy waterlily) เป็นบัวมีถิ่นกำเนิดในเขตอบอุ่นและเขตหนาวพบทั้งในยุโรปและอเมริกา สามารถยืนต้นอยู่ได้ในสภาพอากาศที่หนาวเย็น และอุบลชาติล้มลุก (tropical waterlily) เป็นบัวที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนไม่สามารถปลูกในเขตหนาวได้ และบัวสกุลวิคตอเรีย (*Victoria*) เป็นบัวที่มีใบขนาดใหญ่ลอยระดับผิวน้ำ ขอบใบโค้งขึ้น มีเส้นใบที่แข็งแรง (ภาพที่ 1) (เสริมลาภ, 2548)

บัวหลวงเป็นดอกไม้ที่เกี่ยวข้องกับพุทธศาสนามาตั้งแต่สมัยพุทธกาล ชาวพุทธนิยมใช้ดอกบัวในพิธีกรรมทางศาสนา ถือเป็นสัญลักษณ์ของความบริสุทธิ์ ในประเทศไทยบัวนับเป็นดอกไม้ที่ตลาดมีความต้องการสม่ำเสมอและต้องการปริมาณมาก โดยเฉพาะในวันพระหรือวันสำคัญทางศาสนา นอกจากจะใช้ประโยชน์ในแง่ไม้ตัดดอกแล้ว ยังสามารถปลูกบัวเพื่อเก็บเมล็ด ขายฝักอ่อน ใบแห้ง ส่วนของไหลหรือที่เรียกว่ารากบัว และยังนิยมปลูกเป็นไม้ประดับที่มีความสวยงาม แหล่งผลิตบัวตัดดอกที่สำคัญในปัจจุบันอยู่ในเขตชานเมืองกรุงเทพมหานคร เช่น จังหวัดนนทบุรี นครปฐม ปทุมธานี และยังมีกระจายอยู่ในท้องที่อื่นๆ เช่น จังหวัด ขอนแก่น นครพนม หนองคาย พิษณุโลก และนครสวรรค์ ส่วนแหล่งปลูกเพื่อเก็บเกี่ยวเมล็ดที่สำคัญคือจังหวัดนครสวรรค์ พิจิตร และพิษณุโลก บัวพันธุ์ที่นิยมปลูกเพื่อเก็บเมล็ด คือบัวหลวงพันธุ์ปทุม ซึ่งมีขนาดฝักใหญ่ และมีเมล็ดมาก โดยทั่วไปผู้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปลูกบัวเพื่อเก็บเมล็ด จะเริ่มปลูกในเดือนพฤศจิกายน และเก็บเกี่ยวภายหลังปลูก 3-4 เดือน ระยะเวลาตั้งแต่ดอกตูมถึงเก็บฝักได้ประมาณ 40-50 วัน บัวจะให้ผลผลิตนานประมาณ 3-4 เดือน ผลผลิตเมล็ดบัวแห้งจะได้ไร่ละประมาณ 12-15 ถัง หรือ 144-180 กิโลกรัม ราคาถังละประมาณ 120-400 บาท สรรพคุณของบัวมีมากมาย เหง้ามีรสหวาน ช่วยบำรุงหัวใจ แก้ร้อนใน ดอกมีรสฝาด ช่วยบำรุงครรภ์ แก้ไข้ เกสรมีรสฝาด กลิ่นหอม ช่วยชูกำลัง ทำให้ชื่นใจ ฝักมีรสฝาด แก้ท้องเสีย แก้พิษเห็ดเมา ขับรก เปลือกเมล็ดมีรสฝาด แก้ท้องร่วง สมานแผล เมล็ด รสหวานมัน ช่วยบำรุงหัวใจ ดีบัว รสขม ช่วยขยายหลอดเลือดในหัวใจ บำรุงหัวใจ ใบอ่อน (ใบกลม) รสฝาดเปรี้ยว แก้ดีซ่าน ไหลบัว ช่วยบำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย นอกจากนี้ส่วนต่างๆ ของบัวยังนำมาใช้ประกอบอาหารรับประทานนานมาแล้ว เช่น รากบัว ฝักบัว ส่วนกลีบบัวและเกสรบัวใช้ทำเครื่องดื่ม ใบโตเต็มที่ค่อนข้างแก่ใช้ห่ออาหารข้าวห่อใบบัว (http://www.balavi.com/content_th/nanasara/Con00128.asp)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 บัวจำแนกตามสกุล: สกุลนีลัมโบ (*Nelumbo*), สกุลนิมเฟีย (*Nymphaea*) และ สกุลวิกตอเรีย (*Victoria*)

ที่มา: เสริมลาภ (2548) และ Wikipedia (2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การจำแนกประเภทของบัว

2.1 ปทุมชาติ หรือบัวหลวง (secred lotus, *Nelumbo nucifera* Gaertn.) เป็นไม้น้ำ และไม้ล้มลุกหลายฤดู ลำต้นมีทั้งที่เป็นเหง้าใต้ดิน และเป็นไหลเหนือดิน ใต้น้ำ ใบแตกจากข้อของลำต้น ก้านใบกลมเรียวแข็งส่งใบให้เจริญเหนือน้ำ แผ่นใบรูปร่างกลม ขอบใบเรียบและเป็นคลื่น ผิวใบเรียบ ก้านใบมีหนามเป็นตุ่มเล็กๆ เมื่อหักเป็นสายใย และมีน้ำยางใส เมื่อถูกอากาศเป็นสีคล้ำ ดอกเดี่ยวมีกลิ่นหอม เกิดจากข้อของเหง้าใต้ดินตรงซอกใบ ก้านดอกมีลักษณะเหมือนก้านใบส่งดอกขึ้นมาบานเหนือน้ำ ดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 4-5 กลีบ ขนาดเล็ก กลีบดอกจำนวนมาก สีขาว สีชมพู เรียงซ้อนกันหลายชั้น เกสรเพศผู้จำนวนมากติดอยู่รอบฐานรองดอกที่บวมขยายใหญ่หุ้มรังไข่ไว้ภายใน เรียกว่าฝักบัว ในบัวหลวงบางชนิดมีเกสรเพศผู้หลายแบบปนกันอยู่ คือ เกสรเพศผู้ เกสรเพศผู้ที่เหมือนกลีบดอก และเกสรเพศผู้ที่เหมือนกลีบดอกและเป็นหมัน ผลเป็นแบบผลกลุ่ม ประกอบด้วยผลย่อยจำนวนมากเจริญอยู่ภายในฝักบัว ภายในผลย่อยมีเมล็ดขนาดใหญ่ ใบเลี้ยงหนานำมารับประทานได้ หลังจากปลูกบัวไปหลายฤดูหากแตกไหลและใบจำนวนมากจะทำให้ดอกมีขนาดเล็กลง (http://th.wikipedia.org/wiki/สกุลบัวหลวง)

บัวหลวงในประเทศไทยมีเพียงชนิดเดียวคือ *Nelumbo nucifera* แต่มีหลายพันธุ์ด้วยกัน และเรียกชื่อต่างกันไปตามขนาดและลักษณะของดอก คือ ดอกเล็กสีขาว เรียก บัวปักกิ่งขาว บัวหลวงจีนขาว บัวเข็มขาว ดอกเล็กสีชมพู เรียก บัวปักกิ่งชมพู บัวหลวงจีนชมพู บัวเข็มชมพู ดอกสีขาว เรียก บุณฑริก ปุณฑริก แหลมขาว ดอกสีชมพู เรียก ประทุม ปทุมมาลย์ ปัทมา โกกระณต แหลมชมพู ดอกสั้นป้อมสีขาวกลีบซ้อน เรียก สัตตบุษย์ บัวฉัตรขาว ดอกสั้นป้อมสีชมพูกลีบซ้อน เรียก สัตตบงกช บัวฉัตรชมพู (พาชินย์, 2538) (ภาพที่ 2) นอกจากนี้ยังมีบัวหลวงพระราชินี ซึ่งสมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถทรงโปรดและให้อนุรักษ์ไว้จากจังหวัดเพชรบุรี บัวหลวงชนิดนี้มีใบคล้ายวงกลมสองวงทับกันข้างละ 1/3 ส่วนของวงที่ทับกันจะงอเป็นรูปเว้า หน้าใบสีเขียวเข้ม หลังใบสีเหลืองอมเทา ใบใหญ่เต็มที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใบถึง 50-60 เซนติเมตร ใบไม่จับน้ำ ก้านใบและก้านดอกแข็ง สีเขียวเหลือบน้ำตาลที่โคนก้าน เหนือขึ้นมาจนถึงขั้วใบเป็นสีเขียว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเกือบน้ำตาล มีหนามสั้นเล็กๆ ทั่วทั้งก้าน ก้านยาวเต็มที่ยาวได้ถึง 2 เมตร ดอกช่วงแรกสีเขียวอ่อน เมื่อแก่เต็มที่ก่อนจะเริ่มบานสีกลีบด้านนอกจะเริ่มอ่อนลงเป็นสีชมพูอ่อนเกือบขาว ปลายกลีบสีชมพูจะเด่นขึ้น กลีบดอกไม่ซ้อน มีกลิ่นหอมอ่อนๆ อับเรณูและก้านอับเรณูมีสีเหลือง เกสรเพศเมียบานวันแรกสีเหลือง หลังจากนั้นค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองเขียวและเป็นสีเขียว เมื่อดอกโรย จะมีเมล็ดโดยประมาณ 25-30 เมล็ด (ภาพที่ 2) (ปริมลาภ และเสริมลาภ, 2548)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บัวเหลืองอเมริกัน (American yellow lotus, *Nelumbo lutea* Pers. หรือ *Nelumbium luteum* Willd.) มีลักษณะเหมือนบัวหลวงในประเทศไทยทุกประการ เพียงแต่มีลักษณะใบเล็กกว่า และมีดอกสีเหลือง (ภาพ 2) และหยุดการเจริญเติบโตในฤดูหนาว (Slocum, 1996) ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการนำบัวเหลืองดังกล่าวมาปลูกในประเทศไทยผลที่ได้คือไม่สามารถเจริญจนออกดอกได้ การวิจัยและพัฒนาบัวเหลืองจากถิ่นกำเนิดอเมริกาให้สามารถออกดอกได้ในประเทศไทย พบว่าเมื่อนำบัวเหลืองอเมริกามาฉายรังสีแกมมาด้วยปริมาณรังสี 0, 10, 20 และ 30 เกรย์ จากจำนวนต้นที่รอดตายทั้งหมดเมื่อมาปลูกเป็นเวลา 3 ปีมีเพียง 1 ต้นที่สามารถออกดอกได้ (วิชัย และ กนกพร, 2550) โดยได้นำเอาไปปลูกทดลองที่ จ.เชียงราย และที่องค์การสวนพฤกษศาสตร์ สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จ.เชียงใหม่ (http://www.wowthailand.org/index.php) ต่อมาได้มีการพัฒนาพันธุ์บัวหลวงพันธุ์ใหม่ ชื่อ “บัวสามสี” ซึ่งเป็นผลงานการวิจัยที่เริ่มมาตั้งแต่ปี 2536 โดยการนำพันธุ์บัวสีเหลืองอมส้มจากสหรัฐอเมริกามาผ่านการฉายรังสีแกมมาได้บัวหลวงสีเหลือง นำมาผสมกับบัวไทยสีชมพู ได้เป็นบัวหลวงสามสี และตั้งชื่อว่า “จันทร์โกเมน” โดยช่วงดอกตูมจะเป็นสีเขียว ช่วงดอกแย้มบานเป็นสีชมพู ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีชมพูเหลือง สีเหลืองขาว และสีขาวตามลำดับ (http://www.tint.or.th/nkc/nkc5004/nkc5004j.html) อย่างไรก็ตามการออกดอกของบัวเหลืองนี้ก็ยังต้องการอากาศที่เย็นและช่วงวันที่ยาวเพื่อกระตุ้นให้เกิดตาดอก

ภาพที่ 2 ลักษณะดอกของบัวหลวง (A) บัวหลวงปทุม (B) บัวหลวงปักกิ่งชมพู (C) บัวหลวงสัตตบงกช (D) บัวหลวงบุณฑริก (E) บัวหลวงสัตตบุษย์ (F) บัวหลวงปักกิ่งขาว (G) บัวหลวงพระราชินี และ (H) บัวเหลืองอเมริกัน (*Nelumbo lutea* Pers.)

ที่มา: นันท์ (2540)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อนุกรมวิธานของบัวหลวง หรือปทุมชาติ (http://www.itis.usda.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt, http://www.holoweb.com/cannon/sacred.htm)

Kingdom	Plantae – Plants
Subkingdom	Tracheobionta – Vascular plants
Superdivision	Spermatophyta – Seed plants
Division	Magnoliophyta – Flowering plants
Class	Magnoliopsida – Dicotyledons
Subclass	Magnoliidae
Order	Nymphaeales
Family	Nelumbonaceae
Genus	*Nelumbo* Adans. – Lotus
Species	*Nelumbo nucifera* Gaertn. – Sacred Lotus
	Nelumbo lutea Pers – American Lotus

2.2 อุบลชาติ หรือบัวประดับ (waterlily, *Nymphaea* spp.) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มบัวฝรั่ง หรืออุบลชาติยืนต้น มีถิ่นกำเนิดในเขตอบอุ่นและเขตหนาวทั้งในยุโรปและอเมริกา เนื่องด้วยบัวในกลุ่มนี้ทนความหนาวเย็นและสภาพผิวน้ำที่แข็งตัวในฤดูหนาวตามธรรมชาติจึงเรียกบัวกลุ่มนี้ว่าอุบลชาติยืนต้นหรือ hardy waterlily และกลุ่มบัวผัน บัวเผื่อน และบัวสาย หรืออุบลชาติล้มลุก มีชื่อสากลว่า tropical waterlily เพราะเป็นบัวที่มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อนเมื่อนำไปปลูกในเขตหนาวจะตายเพราะสู้อากาศหนาวไม่ได้ ในกลุ่มอุบลชาติล้มลุกนี้แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยคือ อุบลชาติล้มลุกบานกลางวัน (tropical day blooming waterlily) และอุบลชาติล้มลุกบานกลางคืน (tropical night blooming waterlily) (เสริมลาภ, 2548)

อุบลชาติล้มลุกบานกลางวัน ประกอบด้วยบัว 3 ชนิด <u>ชนิดที่ 1</u> ได้แก่ บัวผัน บัวเผื่อน หรือ *N. Nouchali* var. versicolor (Roxburgh) Hooker f. &Thomson มีชื่อพ้อง *N. stellata* var. versicolor แต่การจำแนกของคนไทย จำแนกเองว่า บัวผัน ใบมีรูปเกือบกลม ขอบใบหยักเป็นคลื่น ฐานใบเว้าลึก ดอกชูเหนือน้ำได้สูง กลีบดอกปลายแหลม เรียงซ้อนกันหลายชั้น คล้ายบัวเผื่อนแต่ดอกใหญ่กว่า เมื่อเริ่มบานมีสีครามอ่อน แล้วเปลี่ยนเป็นชมพูม่วง ดอกหอม บานกลางวัน เหง้ากินได้ไม่ขม สายบัวกินดิบเป็นผักจิ้มได้ แต่ไม่นิยมต้มแกง บัวเผื่อนใบมีรูปเกือบกลม ขอบใบหยักเป็นคลื่น ฐานใบเว้าลึก ดอกชูเหนือน้ำได้สูง กลีบดอกปลายแหลม เรียงซ้อนกันหลายชั้น คล้ายบัวผัน แต่ดอกเล็กกว่า สีขาว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ซีด กลีบในไม่มีสีครามปน หรือมีเพียงจางๆ บานกลางวันสีจะซีดขาว เมื่อบานในวันถัดไป (ภาพที่ 3A) ชนิดที่ 2 คือ บัวขาบ หรือ *Nymphaea nouchali* var. cyanea (Hooker f. & Thomson) Almeida ชื่อพ้อง *N. stella* var. cyanea มีชื่ออื่นว่า นิลุบล นิลอุบล นิโลตบล ป้านสั่งก๋อน ป้านดำ ใบรูปรี ขอบใบเรียบ ผิวใบเป็นคลื่นเล็กน้อย ขอบใบอาจเป็นจักหรือไม่เป็น ฐานใบเว้าลึก แผ่นใบขนาด 20-30 ซม. ดอกชูเหนือน้ำเล็กน้อย สีม่วงคราม หรือ สีขาบ ขนาด 15-20 ซม. ดอกบานกลางวัน มีกลิ่นอ่อนๆ หรือไม่มีกลิ่น สีจางลงเมื่อบานหลายๆ วัน (ภาพที่ 3B) และชนิดที่ 3 คือ บัวจงกลนี *Nymphaea* sp. เป็นบัวที่เชื่อว่ามีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย เป็นบัวก้านอ่อน ใบลอยบนผิวน้ำ ดอกลอยบนผิวน้ำ กลีบดอกซ้อนกันมาก มีสีชมพูเมื่อบานวันแรก แล้วเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน ลงจนเกือบขาว เมื่อใกล้จะโรย ดอกบานครั้งแรกในตอนกลางวัน และพยายามจะหุบกลีบดอกตอนเย็น เนื่องจากมีกลีบดอกที่ซ้อนกันมาก จึงหุบได้เพียงเล็กน้อย วันต่อๆ ไปไม่หุบเลย จึงทำให้จงกลนีเป็นบัวชนิดเดียวที่บานตลอดทั้งกลางวันและกลางคืน ไม่มีเกสรทั้งเพศผู้และเพศเมีย ขยายพันธุ์ด้วยหัวเพียงอย่างเดียว ลำต้นเป็นเหง้าเจริญในทางดิ่ง (ภาพที่ 3C) (http://www.thaiwaterlily.com/knowledge.html)?

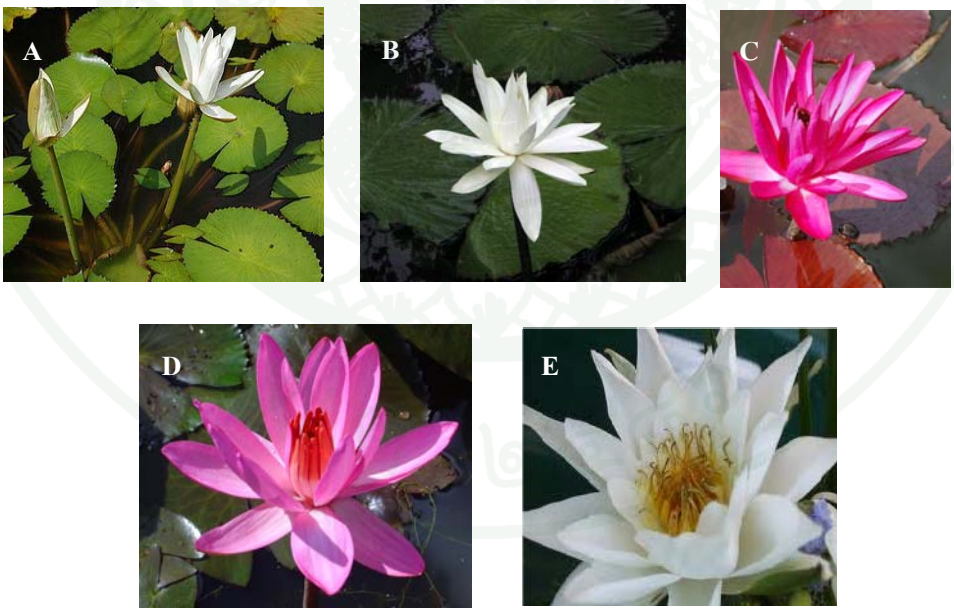
ภาพที่ 3 ลักษณะดอกอุบลชาติล้มลุกบานกลางวัน (A) บัวผัน บัวเผื่อน (B) บัวขาบ และ (C) บัวจงกลนี

ที่มา: วิกิพีเดีย (2554)

อุบลชาติล้มลุกบานกลางคืนประกอบด้วยบัว 5 ชนิด ชนิดที่ 1 คือ *Nymphaea lotus* L. มีถิ่นกำเนิดในอียิปต์ แอฟริกากลาง และตะวันตก ซึ่งน่าจะมีคนนำเข้ามาปลูกในเมืองไทยนานแล้ว และน่าจะเป็นพันธุ์ที่ชื่อว่า เศวตอุบล หรือ บัวขาว อาจเกิดต้นอ่อนที่กลางใบ (viviparous) ดอกมีสีขาว เกสรเพศผู้สีเหลือง ดอกทรงแบน (flat) ขนาดใหญ่ มีกลิ่นหอมเล็กน้อย กลีบดอก 19-20 กลีบ ใบด้านบนสีเขียว ใบอ่อนสีแดง ใต้ใบสีเขียว หรือ น้ำตาลอมม่วง ใบแก่กลม ส่วนเว้าของใบ (sinus) อาจซ้อนกันได้ ก้านดอกมีขนใบ ปกติจะมีขน (ภาพที่ 4A) ชนิดที่ 2 คือ *N. pubescens* Wild. มีถิ่นกำเนิดในอินเดีย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย และออสเตรเลีย ใบรูปไข่ ขอบใบเป็นลอน มีจักไม่สม่ำเสมอ มีขนปกคลุม มีส่วนเว้าของใบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปิด หรือ ปิด ใบด้านบนสีเขียวแก่ ด้านล่างสีเขียวอมม่วง ใบขนาด 20-25 ซม. ดอกมีกลีบเลี้ยงสีขาว กลีบดอกสีขาว เกสรเพศผู้สีเหลือง ทรงดอกรูปดาว เมื่อบานแล้วแบนลง ดอกขนาด 15-25 ซม. มีกลิ่นหอม จำนวนกลีบดอก 18-20 ซม. ได้แก่ บัวกินสาย (ภาพที่ 4B) ชนิดที่ 3 คือ *N. rubra* Roxb มีถิ่นกำเนิดในตอนกลางและตอนใต้ของอินเดีย ออกดอกง่าย กลีบดอกสีแดงเข้ม กลีบเลี้ยงสีแดงอมม่วง ก้านอับเรณูสีแสดอมแดง ก้านชูอับเรณูสีแสดอมแดง ทรงดอกรูปแบน เมื่อบานเต็มที่เป็นรูปดาว ดอกขนาด 15-25 ซม. มีกลิ่นหอมเล็กน้อย จำนวนกลีบดอก 12-20 กลีบ ใบด้านบนสีน้ำตาลแดง ใบแก่มากๆ สีเขียว ด้านล่างสีน้ำตาลแดงแก่ ใบเกือบกลม มีจัก ด้านล่างมีขน ส่วนเว้าของใบเปิด และอาจปิดบางส่วน ใบขนาด 24-45 ซม. อาจเป็นพันธุ์ที่ เรียกว่า รัตนะอุบล สัตตบรรณ หรือบัวแดง (ภาพที่ 4C) ชนิดที่ 4 คือ *N. spontaneous* Landon มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ใบด้านบนสีเลือดหมู ถึงเขียวอ่อน ด้านล่างสีเลือดหมูถึงม่วง ใบเป็นจัก ส่วนเว้าของใบเปิด ขนาดใบ 20-30 ซม. ออกดอกง่ายมาก กลีบดอกสีชมพู กลีบเลี้ยงสีแดงอมม่วง อับเรณูสีชมพู ก้านชูอับเรณูสีแดง ทรงดอกกว้าง รูปดาว ดอกขนาด 13-18 ซม. กลิ่นหอมเล็กน้อยแต่ค่อนข้างฉุน จำนวนกลีบดอก 13-18 กลีบ บางครั้งมีขนที่ก้านใบและก้านดอก (ภาพที่ 4D) และ ชนิดที่ 5 คือ *N. Zenkeri* Glig มีถิ่นกำเนิดในอัฟริกาตะวันตก ไม่มีในเมืองไทย (ภาพ 4E) (ภูริพันธุ์ , 2553)



ภาพที่ 4 ลักษณะดอกของอุบลชาติล้มลุกบานกลางคืน (A) *Nymphaea lotus* L. (B) *N. pubescens* Wild. (C) *N. rubra* Roxb (D) *N. spontaneous* Landon และ (E) *N. Zenkeri* Glig.

ที่มา: Wikipedia (2007); Davis (2550) and Wikipedia (2012)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อนุกรมวิธานของบัวประดับหรืออุบลชาติ (http://en.wikipedia.org/wiki/Nymphaea)

Kingdom	Plantae – Plants
Subkingdom	Tracheobionta – Vascular plants
Superdivision	Spermatophyta – Seed plants
Division	Magnoliophyta – Flowering plants
Class	Magnoliopsida – Dicotyledons
Subclass	Magnoliidae
Order	Nymphaeales
Family	Nymphaeaceae
Genus	*Nymphaea*
Subgenus	*Nymphaea*
	Brachyceras
Species	*Nymphaea* spp.

3. การขยายพันธุ์บัว

การแยกเหง้า บัวในเขตอบอุ่นและเขตหนาวที่มีลำต้นเป็นแบบเหง้าสามารถขยายพันธุ์ได้โดยวิธีแยกหน่อหรือต้นอ่อนจากเหง้าต้นแม่ไปปลูก โดยตัดแยกเหง้าที่มีหน่อหรือต้นอ่อนยาว 5-8 เซนติเมตร ตัดรากออกให้หมด ถ้าเป็นต้นอ่อน สามารถนำไปปลูกยังที่ต้องการได้เลย ถ้าเป็นหน่อให้นำไปปลูกในกระถางเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-25 เซนติเมตร ฝังดินให้ลึกประมาณ 3-5 เซนติเมตร กดดินให้แน่น ต้นอ่อนขึ้นจากตาและเจริญเป็นต้นใหม่ต่อไป

การแยกไหล บัวเขตร้อนโดยเฉพาะบัวหลวงจะสร้างไหลจากหัวหรือเหง้าของต้นแม่แล้วไปงอกเป็นต้นใหม่ สามารถขยายพันธุ์โดยวิธีตัดเอาไหลที่มีหน่อหรือปลิดต้นใหม่จากไหลไปปลูก การตัดไหลที่มีหน่อไปปลูกควรตัดให้มีขนาดความยาวประมาณ 2-3 ข้อ และมีตาประมาณ 3 ตา นำไหลที่ตัดฝังดินให้ลึก 3-5 เซนติเมตร กดดินให้แน่น ต้นอ่อนจะขึ้นจากตาและเจริญเป็นต้นใหม่ต่อไป

การแยกต้นอ่อนที่เกิดจากใบ บัวในเขตร้อนสกุลบัวสายบางชนิดจะแตกต้นอ่อนบนใบบริเวณกลางใบตรงจุดที่ต่อกับก้านใบหรือขั้วใบ สามารถขยายพันธุ์ได้โดยการตัดใบที่มีต้นอ่อนโดยตัดให้มีก้านใบติดอยู่ 5-8 เซนติเมตร เสียบก้านลงในภาชนะที่ใช้ปลูกให้ขั้วใบที่มีต้นอ่อนติดกับผิว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดิน ใช้อิฐหรือหินทับแผ่นใบไม่ให้ลอย เติมน้ำให้ท่วมยอด 6-10 เซนติเมตร ประมาณ 2 สัปดาห์ ต้นอ่อนจะแตกรากยึดติดกับผิวดิน และเจริญเติบโตต่อไป

การเพาะเมล็ด การขยายพันธุ์วิธีนี้ไม่ค่อยนิยมปฏิบัติเนื่องจากยุ่งยากและต้องใช้เวลานาน ยกเว้นบัวกระด้งที่ต้องขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ดเท่านั้น นอกจากนี้การเพาะเมล็ดมักนิยมใช้กับเมล็ดบัวที่ได้จากการผสมบัวขึ้นมาใหม่แล้วเก็บเมล็ดมาเพาะ เพื่อสะดวกในการคัดแยกพันธุ์ วิธีการเพาะเมล็ดมีดังนี้ เตรียมดินเหนียวที่ไม่มีรากพืช ใส่ลงในภาชนะปากกว้างที่มีความลึกประมาณ 25-30 เซนติเมตร โดยใส่ดินให้สูงอย่างน้อย 10 เซนติเมตร ปรับแต่งหน้าดินให้เรียบและแน่น เติมน้ำให้สูงจากหน้าดินประมาณ 7-8 เซนติเมตร นำเมล็ดที่ใช้เพาะโรยกระจายบนผิวน้ำให้ทั่ว เมล็ดจะค่อยๆ จมลงใต้น้ำ สำหรับเมล็ดบัวหลวงและบัวกระด้งเมล็ดมีขนาดใหญ่ ให้กดเมล็ดให้จมลงไปในดินแล้วเติมน้ำให้สูงจากผิวดินประมาณ 15 เซนติเมตร นำภาชนะที่เพาะไปไว้ในที่มีแดดรำไร ประมาณ 1 เดือน เมล็ดจะเริ่มงอกเป็นต้นอ่อน เมื่อต้นอ่อนแข็งแรงและมีใบประมาณ 2-3 ใบ จึงแยกนำไปปลูกยังที่ต้องการ (กนกวรรณ, 2551)

การเลือกพันธุ์บัวไปปลูกต้องระมัดระวังและควรพิถีพิถันเป็นพิเศษ โดยอย่านำบัวที่ขยายพันธุ์ยาก โตช้า ไปปลูกรวมกับบัวที่โตง่ายและขยายพันธุ์เร็ว ควรใช้ภาชนะแยกปลูกบัวแต่ละชนิดเนื่องจากการเจริญเติบโตแตกต่างกัน เช่น บัวหลวง บัวฝรั่งจะเจริญเติบโตไปตามแนวนอน หากปลูกในภาชนะควรฝังเหง้าหรือหน่อตามแนวนอนริมอ่าง ส่วนบัวผัน บัวเผื่อน และบัวสาย จะเจริญเติบโตในแนวดิ่ง จึงปลูกได้โดยตรงที่จุดที่ต้องการปลูก (สินันต์ธร, 2554)

4. การผสมพันธุ์

การผสมพันธุ์บัวหลวง ดอกบัวจัดเป็นดอกสมบูรณ์เพศที่มีเกสรเพศผู้และเพศเมียอยู่ในดอกเดียวกัน เกสรเพศเมียบานก่อนเกสรเพศผู้ 1-2 วัน ดังนั้นเกสรเพศเมียจึงมักได้รับการผสมพันธุ์จากเกสรเพศผู้ของดอกอื่นโดยมีลมและแมลงเป็นตัวช่วยในการผสมพันธุ์ การผสมพันธุ์บัวเพื่อการพัฒนาสายพันธุ์ และให้ได้พันธุ์บัวพันธุ์ใหม่ จึงเป็นการผสมโดยมนุษย์ โดยการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์มาผสม กรณีบัวหลวงก่อนดอกแม่บาน 1-2 วัน จะเปิดดอกออก แล้วใช้กรรไกรขลิบเกสรเพศผู้ออกให้หมด แล้วคลุมด้วยถุงตาข่าย เพื่อป้องกันเกสรเพศผู้จากดอกอื่นมาผสม เมื่อดอกแม่บานให้ตัดเอาเกสรเพศผู้ต้นพ่อพันธุ์ซึ่งควรเป็นดอกที่บานแล้วประมาณ 2 วัน มาใส่บนเกสรเพศเมีย แล้วคลุมด้วยถุงตามเดิม เมื่อได้รับการผสมแล้ว ถ้าผสมติดดอกจะเริ่มกลายเป็นฝัก เมื่อดอกเจริญเป็นฝักแก่ และมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมล็ดแก่ จึงเก็บเอาฝักแก่มาแยกเอาเมล็ดนำไปฝนกับกระดาษทรายก่อนนำไปเพาะโดยแช่น้ำไว้ก่อน จนเมล็ดงอกมีใบและรากสมบูรณ์จึงนำไปปลูกลงดิน

การผสมพันธุ์บัวประดับ คล้ายกับการผสมพันธุ์บัวหลวงโดยใช้พู่กันเขี่ยเอาเกสรเพศผู้จากต้นพ่อพันธุ์ที่บานแล้ว 2-3 วันมาป้ายบนเกสรเพศเมีย (stigma) ของดอกแม่ที่เริ่มบาน แล้วคลุมด้วยถุงตาข่าย ป้องกันแมลงพาเกสรเพศผู้จากต้นอื่นมาผสม ประมาณ 5 วันหลังการผสม ดอกจะจมลงใต้น้ำ กลีบดอกและกลีบเลี้ยงจะเน่าสลายไปเมื่อประมาณ 2 สัปดาห์ผ่านไป รังไข่จะขยายออกมีเมล็ดอยู่ภายในประมาณ 3-4 สัปดาห์หลังการผสม โดยทั่วไปเมล็ดจะถูกคลุมไปด้วยวุ้น (gelatin) ซึ่งช่วยให้เมล็ดกระจายในน้ำเป็นการกระจายของต้นอ่อน ใส่เมล็ดในถุงผ้าและแช่น้ำไว้เป็นเวลาประมาณ 2 วัน แล้วล้างวุ้นออก คัดเลือกเมล็ดที่สมบูรณ์แช่น้ำและเก็บไว้ที่ 4-5 °C อย่างน้อย 2 เดือนเพื่อ break dormancy ก่อนนำเมล็ดออกปลูก (http://www.panmai.com/ WaterLily/WaterLily.htm)

5. ความสำคัญทางเศรษฐกิจ

บัวประดับและบัวหลวงเป็นพันธุ์ไม้น้ำที่นิยมปลูก จึงมีความสำคัญทางเศรษฐกิจในการเพาะพันธุ์ไม้น้ำเพื่อขายเพิ่มรายได้ให้เกษตรกร พื้นที่การปลูกบัวหลวงในประเทศไทยมีประมาณ 5,000 ไร่ กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ เช่น นนทบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี อุบลราชธานี ขอนแก่น พิจิตร พะเยา นครสวรรค์ พิษณุโลก พัทลุง การผลิตบัวของไทยนั้นเป็นการผลิตเพื่อใช้ในประเทศเป็นส่วนใหญ่ ส่วนต่างๆ ของบัวสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ในบัวประดับนิยมรับประทานบัวสาย ซึ่งมีประโยชน์และมีคุณค่าทางโภชนาการ โดยประกอบด้วย ฟอสฟอรัส เหล็ก วิตามินเอ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 วิตามินซี ไนอาซีน คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน และมีน้ำอยู่ถึง 97.6% ส่วนที่ใช้ประโยชน์ของบัวสาย คือ ก้านใบ ดอกและหัว ซึ่งแต่ละส่วนจะให้สรรพคุณแตกต่างกันคือ ก้านใบ หรือสายบัวของบัวสาย มีรสจืด ช่วยบรรเทาความร้อนในร่างกายได้ดี ดอกของบัวสาย มีฤทธิ์บำรุงหัวใจ บำรุงกำลัง แก้ไข้ตัวร้อน และบำรุงครรภ์ หัวของบัวสาย ใช้บำรุงร่างกาย บำรุงครรภ์ บำรุงหัวใจ บำรุงธาตุ ใช้หัวของบัวสายประมาณ 30 กรัม ใส่น้ำ 1 ลิตร ต้มนาน 15 นาที จากนั้นนำน้ำที่ได้มาดื่มครั้งละครึ่งถ้วยกาแฟ วันละสองครั้ง ก่อนอาหาร เช้าและเย็น (ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ, 2546) ส่วนประโยชน์ของบัวหลวง คือ ดอกบัวนิยมนำมาใช้บูชาพระ ใช้ในการจัดตกแต่งสถานที่ จัดแจกัน สายพันธุ์ที่ใช้คือ บัวสัตตบุษย์ (ฉัตรขาว) และบัวสัตตบงกช (ฉัตรชมพู) ฝักบัวสด (ฝักแก่) นิยมใช้บริโภคเมล็ดที่ยังมีสีเขียวสดอยู่ สายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการผลิตเพื่อรับประทานเมล็ดสดนั้น มักจะเป็นสายพันธุ์ที่มีรูปทรงดอกแหลมสีชมพู มีการเก็บจากธรรมชาติและการทำนาบัว พื้นที่การผลิตอยู่ที่จังหวัดนนทบุรี เชียงราย อุบลราชธานี และยโสธร ปัจจุบันเริ่มมีการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใช้ฝักอ่อนในการจัดดอกไม้เพิ่มขึ้นและในต่างประเทศมีการสั่งซื้อฝักบัวอ่อนและใบบัว เพื่อนำไปใช้ในรูปของลักษณะตัดใบ ใช้ร่วมในการจัดดอกไม้และจัดตกแต่ง เมล็ดแห้ง มีการผลิตกันมากเพื่อทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ สายพันธุ์ที่นิยมใช้ปลูกเพื่อเก็บเมล็ดส่วนมากมักเป็นบัวแหลมชมพู ไหลบัว (stolon) มีการผลิตบ้างแต่ไม่แพร่หลายมากนัก ไหลบัวอ่อนใช้ในการทำอาหารคาวเหง้าบัว (rhizome) มีความต้องการของตลาดมาก เพราะเหง้าบัว คือส่วนที่สะสมอาหารของบัวก่อนมีการพักตัว ทำให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูงมาก แต่การผลิตยังน้อยอยู่เนื่องจากเหง้าบัวของสายพันธุ์บัวในไทยยังมีขนาดไม่ใหญ่มากนัก ใบบัว มีการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบอย่างหนึ่งในธุรกิจร้านอาหาร คือนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทำข้าวห่อใบบัว และนำไปจัดตกแต่งสถานที่ซึ่งเป็นที่นิยมมากในต่างประเทศ ประเทศที่นำเข้าบัวหลวงจากประเทศไทยได้แก่ เนเธอร์แลนด์ ญี่ปุ่น สวิตเซอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา สำหรับในประเทศไทยมีการใช้กันน้อย ใบบัวที่ใช้ส่วนมากจะเป็นใบบัวที่ขึ้นเองตามแหล่งน้ำธรรมชาติ (www.doae.go.th/LIBRARY/html/detail/sacredlotus)

6. เครื่องหมายโมเลกุลและการใช้ประโยชน์

ปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุล (DNA markers) ได้ถูกนำมาใช้ศึกษาพันธุกรรมของพืชและสัตว์กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นการศึกษาลึกลงไปในระดับโมเลกุล อันเป็นตัวการที่ควบคุมให้เกิดลักษณะต่างๆ ในสิ่งมีชีวิต เครื่องหมายโมเลกุลมีหลายชนิด ทั้งที่เป็นประเภท dominant marker ได้แก่ RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) และ ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ศึกษาโดยไม่มีความจำเป็นต้องรู้ข้อมูลของจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆมาก่อน นอกจากนี้ยังตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละหลายตำแหน่ง (multi-locus detection) และประเภท co-dominant marker ได้แก่ RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms), SSRs (Simple Sequence Repeats) หรือ MS (Microsatellites) และ SSCPs (Single Strand Conformational Polymorphisms) ซึ่งเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลของจีโนมก่อนเพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลขึ้นมาใช้และใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอได้ครั้งละเพียงหนึ่งตำแหน่ง (single-locus detection) เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ได้ถูกนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชและสัตว์ และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprints) ที่แสดงความจำเพาะกับพันธุ์แต่ละพันธุ์ เมื่อพิจารณาจากเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมด RAPD จัดเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ยังคงมีการใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และราคาถูก โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR, Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างไพรเมอร์ที่จับในทิศกลับกัน SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker เป็นเครื่องหมายโมเลกุล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่พัฒนาให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งในจีโนม โดยอาศัยลำดับเบสที่ได้มาจากการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลอื่น เช่น RAPD marker มาก่อน SSCP และ SSR markers เป็น multi-allelic marker ที่ให้รูปแบบของยีนหรือแอลลีล (allele) หรือ ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (DNA fragment) หลายรูปแบบ (highly polymorphic) จึงทำให้เป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบันในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ทำแผนที่จีโนม (genome mapping) และใช้ระบุความจำเพาะของพันธุ์ SSR marker เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ครอบคลุมส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำๆ (repeat sequence) ซึ่งพบกระจายทั่วไปในจีโนมพืชและสัตว์ และสามารถถูกเพิ่มปริมาณเพื่อนำมาตรวจสอบได้ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ primers ที่จำเพาะกับลำดับเบสรอบข้าง (franking sequences) ของลำดับเบสซ้ำๆ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วยเจล denaturing polyacrylamide อิเล็กโทรฟอริซิส เทคนิคนี้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว มีแถบแบนที่เข้าใจง่ายสามารถแยก homozygote และ heterozygote ได้ ทำซ้ำได้ผลดี และใช้อุปกรณ์น้อยไม่ยุ่งยากซับซ้อน แม้ห้องปฏิบัติการที่มีความพร้อมเบื้องต้นก็ทำได้ แต่จำต้องมีการพัฒนา microsatellite marker ขึ้นมาก่อนซึ่งในการพัฒนาใช้เวลา และค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากต้องผ่านการเตรียม genomic library, hybridization และ DNA sequencing ส่วนเทคนิค ISSR สามารถใช้ศึกษาความถี่ของ SSR ในจีโนมโดยเฉพาะที่ไม่มีการศึกษาจีโนมมาก่อน เสียค่าใช้จ่ายน้อย ไม่ต้องทำ genomic library และเร็ว ISSR marker เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถใช้ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่มีความใกล้ชิดกันมากๆ (Zietkiewicz *et al*., 1994) ให้รูปแบบความหลากหลาย (polymorphisms) สูงใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพียงครั้งเดียวและสามารถทำซ้ำได้ผลดีเช่นเดิม (Fang and Roose., 1997; Blair *et al*., 1999) เทคนิค ISSR เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์เดียวที่ประกอบด้วยลำดับเบสซ้ำๆ หรือลำดับเบสซ้ำๆ ที่ต่อปลาย 3' หรือ 5' ด้วย 2-4 เบสเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างลำดับเบสซ้ำๆ จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ในเจล denaturing polyacrylamide เครื่องหมายโมเลกุลบางชนิดพัฒนาขึ้นมาให้จำเพาะกับยีนสำคัญ เรียกว่า gene specific marker สามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ศึกษาการแสดงออกของยีนระบุความจำเพาะของพันธุ์ และนำไปสู่การหาข้อมูลลำดับเบสที่สมบูรณ์ของยีนนั้น SSCP marker เป็น เครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมพัฒนาขึ้นมาให้จำเพาะกับยีน โดยอาศัยลำดับเบสของยีนจากสิ่งมีชีวิตต่างๆ มาเป็นข้อมูลเพื่อพัฒนาตำแหน่งของ specific primer และใช้เพื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วยเจล non-denaturing polyacrylamide อิเล็กโทรฟอริซิส ซึ่งให้ความละเอียดในการตรวจสอบระหว่างขนาดผลผลิตพีซีอาร์ที่ต่างกันเพียงเล็กน้อยได้ ในกรณีที่ผลผลิตพีซีอาร์ระหว่างตัวอย่างมีขนาดที่แตกต่างกันมากสามารถตรวจวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยเจลอะกาโรสอิเล็กโทรฟอริซิสได้ เรียกเครื่องหมายโมเลกุลนี้ว่า DFLP (DNA Fragment Length Polymorphism) marker ในการศึกษาพันธุกรรมโดยใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เครื่องหมายโมเลกุล สามารถศึกษาได้ในขณะที่ต้นพืชยังเป็นต้นกล้า หรือจากส่วนของเซลล์จากอวัยวะต่างๆ โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย

7. การศึกษาพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมในบัวหลวง

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อการตรวจสอบพันธุ์บัวหลวงยังไม่มีผู้รายงาน มีเพียงรายงานของ กัญจนา (2542) ที่ได้ศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์ ซึ่งเป็น protein marker ของบัวหลวงและพบว่าสามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์บัวหลวงบางพันธุ์ได้ และรายงานของ สุนันท์ และ นฤมล (2550) ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์บัวหลวง 6 พันธุ์ในเขตปทุมธานีด้วย RAPD marker จากการทดลองผสมพันธุ์บัวหลวงบางพันธุ์ในปีที่ผ่านมา และใช้เครื่องหมายโมเลกุลประเภท dominant marker ได้แก่ RAPD marker และ AFLP marker ตรวจสอบความเป็นลูกผสมเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพ่อแม่ รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอบอกได้แต่เพียงว่าลูกที่ได้น่าจะเป็นลูกผสมจากพ่อแม่ดังกล่าว แต่ไม่สามารถระบุแน่ชัดได้เช่นเดียวกับการใช้ co-dominant marker ที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง homozygote และ heterozygote ได้ จึงน่าที่จะได้มีการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลประเภท co-dominant marker เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของสายพันธุ์บัว ซึ่งปัจจุบันมีผู้สนใจผลิตบัวพันธุ์ใหม่ขึ้นมาเรื่อยๆ

8. การศึกษาพันธุกรรมและความหลากหลายทางพันธุกรรมในบัวประดับ

ปัจจุบันบัวประดับมีผู้นิยมปลูกและมีการผสมพันธุ์เพื่อการค้าเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก จากการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลในบัวประดับที่ผ่านมาเป็นการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการภายในสกุล *Nymphaea* ซึ่งแบ่งย่อยเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม Apocarpiae ซึ่งมี 3 สกุลย่อย คือ *Anecphya*, *Confluentes* ซึ่งเป็นบัวท้องถิ่นแถบออสเตรเลีย และ *Brachyceras* ส่วนกลุ่ม Syncarpiae มี 3 สกุลย่อยเช่นเดียวกัน คือ *Hydrocallis*, *Lotos* ซึ่งเป็นบัวบานกลางคืน และ *Nymphaea* เป็นบัวบานกลางวัน (Songpanich and Hongtrakul, 2010) การจัดจำแนกพันธุ์บัวนิยมดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่กับการศึกษาในระดับโมเลกุลโดยศึกษาบริเวณ nrITS (nuclear ribosomal internal transcribed spacer) และ plastid *trn*T–*trn*F พบว่าลำดับเบสของ nrITS สามารถระบุชนิดของบัวในสกุล *Nymphaea* ได้ดีกว่าบริเวณลำดับเบส plastid *trn*T–*trn*F ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ในปัจจุบันจำแนกบัวออกเป็นสกุลย่อยถูกต้องมากยิ่งขึ้น และเข้าใจการแพร่กระจายพันธุ์ ความใกล้ชิดของสายพันธุ์ เพื่อดูความเป็นไปได้ในการสร้างสายพันธุ์ใหม่จากการผสมข้ามสกุลย่อย และข้ามพันธุ์ (Ouborg *et al*.,1999; Borsch *et al*., 2011) การพัฒนา SSR marker จากจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Nuphar lutea* สามารถใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตรวจสอบความหลากหลายในบัวประดับชนิดนี้ได้ รวมทั้งพบว่าบางตำแหน่งของ SSR marker ที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับดีเอ็นเอของบัวประดับชนิดอื่นได้ด้วย เช่น *Nymphaea alba* และ *Nymphaea candida* (Woods *et al*.,2005) .การใช้เครื่องหมายโมเลกุล ISSR marker จำแนกชนิดของบัวประดับร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยาใน *N. odorata* และ *N. Mexicana* จากตัวอย่างในอเมริกาเหนือ พบความแตกต่างอย่างชัดเจนจากกลุ่มตัวอย่างบัวประดับระหว่างชนิด และตัวอย่างประชากรของบัวประดับภายในชนิดเดียวกัน การตรวจสอบความเป็นลูกผสมในบัวประดับที่ผ่านมาได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nrITS ของพ่อและแม่เปรียบเทียบกับลูกเพื่อตรวจสอบรูปแบบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากพ่อแม่สู่ลูก และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในคลอโรพลาสต์เพื่อตรวจสอบการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากแม่เพื่อยืนยันความเป็นลูกผสม (Les *et al*., 2004) อย่างไรก็ตามเครื่องหมายโมเลกุลของบัวหลวงและบัวประดับเพื่อใช้ตรวจสอบความเป็นลูกผสมยังมีน้อยเทียบกับพืชชนิดอื่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และหาลำดับเบส

1.1 โกร่งบดตัวอย่าง

1.2 เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น KS 125B บริษัท IKA LAbortechnick Stufen, Germany

1.3 เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) และภาพถ่าย (gel documentation) รุ่น DOC-PRINT- 1000/26M บริษัท Vilber Lourmat, France

1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง รุ่น AR 2130 บริษัท Adventurer™, USA

1.5 เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR) รุ่น PTC-100™ บริษัท MJ Research, USA

1.6 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (refrigerated centrifuge) รุ่น 3K20 บริษัท Sigma, Germany, เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (microcentrifuge) รุ่น 1010 บริษัท Century Scientific, England

1.7 เครื่อง spectrophotometer รุ่น lamda UV/VIS spectrophotometer บริษัท Perkin Elmer, USA

1.8 ชุดเครื่องมือ agarose gel อิเล็กโทรฟอริซิส

1.9 ชุดเครื่องมือ acrylamide gel อิเล็กโทรฟอริซิส รุ่น protein® II xi cell บริษัท Biorad, USA

1.10 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิได้ (oven) บริษัท Gallenkamp, Japan

1.11 ไมโครปิเปตต์ชนิดปรับปริมาตรได้ บริษัท Gilson, France พร้อม tip ขนาด 10, 200 และ 1,000 µl

1.12 หม้อนึ่งความดันสูง (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tommy Seiko, Japan

1.13 หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ml) และหลอดใส่สาร ขนาด 15 ml

1.14 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Memmert, Germany

1.15 หลอดสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (PCR tube)

1.16 แผ่น cellophane สำหรับประกบเจล

2. สารเคมีและเอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.1.1 ไนโตรเจนเหลว

2.1.2 3X cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) buffer (ในสารละลาย 100 ml: CTAB 3 g, 1 M Tris-HCl pH 8.0 10 ml, 0.5 M EDTA (ethylenediamine tetraacetate) pH 8.0 4 ml และ 5 M NaCl 28 ml)

2.1.3 polyvinylpyrrolidone (PVP)

2.1.4 ß– Mercaptoethanal

2.1.5 10% CTAB (ในสารละลาย 100 ml: CTAB 10 g และ 5 M NaCl 28 ml)

2.1.6 คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1)

2.1.7 TE buffer (10:0.1 = 10 mM Tris: 0.1 mM EDTA)

2.1.8 เอธานอล 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์

2.1.9 RNase บริษัท US Biological, USA

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำ agarose gel อิเล็กโทรฟอริซิส

2.2.1 agarose บริษัท Research Organics, USA

2.2.2 1X Tris-borate EDTA (TBE) buffer (เตรียมจาก Stock 10X TBE : Tris base 108 g, boric acid 55 g และ 500 mM EDTA pH 8.0 40 ml)

2.2.3 bromophenol blue

2.2.4 xylene cyanol

2.2.5 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder mix) ของบริษัท GeneRuler™, USA

2.3 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพีและSSCP

2.3.1 acrylamide บริษัท Pharmacia Biotech, Sweden

2.3.2 methylene bisacrylamide บริษัท Pharmacia Biotech, Sweden

2.3.3 10% ammonium persulphate (APS)

2.3.4 TEMED (N', N', N', N',-tetramethyl ethylenediamine)

2.3.5 1X TBE buffer

2.3.6 ซิลเวอร์ไนเตรต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3.7 1 N และ 10 N NaOH

2.3.8 เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์

2.3.9 formamide

2.3.10 formaldehyde

2.3.11 bromophenol blue

2.3.12 xylene cyanol

2.3.13 glacial acetic acid

2.3.14 restriction enzyme บริษัท Fermentas, USA

2.3.15 agarose บริษัท Research Organics, USA

วิธีการ

1. รวบรวมพันธุ์บัวทั้งจากในประเทศและต่างประเทศประมาณ 50 พันธุ์/ตัวอย่าง ผสมพันธุ์บัวอย่างน้อย 10 คู่ ปลูกลูกผสมที่ได้ และสกัดดีเอ็นเอของบัวพันธุ์ต่างๆ ทั้งพ่อ แม่และลูกผสม จากส่วนใบอ่อนกรณีเป็นบัวหลวง และจากกลีบดอกกรณีเป็นบัวประดับโดยใช้ CTAB ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Doyle and Doyle (1990)

2. พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนโดยใช้ลำดับเบสอนุรักษ์ของยีนในบัวหลวง บัวประดับ และพืชอื่น ที่มีลำดับเบสรายงานไว้ในฐานข้อมูล รวมกันจำนวนอย่างน้อย 12 ยีน

3. ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนในข้อ 2 กับ genomic DNA ของบัวหลวงและบัวประดับพันธุ์ต่างๆ และลูกผสมตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ในเจลอะกาโรส เรียกเทคนิค DFLP และในเจล non-denaturing polyacrylamide เรียกเทคนิค SSCP เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบจากลำดับเบสที่มีความแตกต่างกันระหว่างตัวอย่างเพียงเล็กน้อย

4. วิเคราะห์ลำดับเบสของยีนที่ได้ หรือยืนยันความเป็นเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับยีนและเก็บไว้ในฐานข้อมูล

5. สรุป marker ที่สามารถใช้ตรวจสอบลูกผสม และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในตัวอย่างพ่อแม่และลูกผสมที่ได้วิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำเพาะกับแต่ละพันธุ์ คำนวณค่า genetic similarlity สร้างรูปแบบความสัมพันธ์ โดยสร้าง phylogenetic tree โดยโปรแกรม NTSYS

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การรวบรวมตัวอย่างบัว

รวบรวมพันธุ์บัวจากทั้งในประเทศและต่างประเทศของบัวหลวงและบัวประดับ รายชื่อพันธุ์บัวที่ได้นำมาศึกษาดังตารางที่ 1 และ 2 นำมาปลูกรวบรวมไว้เพื่อใช้สกัดดีเอ็นเอ และผสมพันธุ์

ตารางที่ 1 รายชื่อพันธุ์บัวหลวงที่ศึกษา

บัวหลวงพื้นเมืองในไทย		บัวหลวงจากต่างประเทศ	
หมายเลข	ชื่อ	หมายเลข	ชื่อ
1	แหลมชมพู พระราชินี	28	จีน แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว
2	แหลมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด)	29	จีน Wuhan (เมล็ด)
3	แหลมชมพู พิจิตร	30	ไต้หวัน แหลมชมพู -ต2 (เมล็ด)
4	แหลมขาว พิจิตร	31	ไต้หวัน Hunan white -ต4 (เมล็ด)
5	ฉัตรชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร	32	ไต้หวัน East Indian Lotus -ต6
6	ฉัตรขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร	33	ไต้หวัน -ต7 (เมล็ด)
7	แหลมชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร	34	ไต้หวัน ฉัตรขาว -ต8 (เมล็ด)
8	แหลมขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร	35	ไต้หวัน -ต9 (เมล็ด)
9	แหลมขาว คลองโยง นครปฐม	36	ไต้หวัน –N1 (เมล็ด)
10	แหลมชมพู สามร้อยยอด ประจวบฯ	37	ไต้หวัน –N6 (เมล็ด)
11	แหลมชมพู สระบุรี	38	ไต้หวัน –N7 (เมล็ด)
12	ฉัตรชมพู สระบุรี	39	ไต้หวัน –G2 (เมล็ด)
13	แหลมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด)	40	จีน ฉัตรชมพู พันธุ์เหง้า
14	แหลมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด)	41	จีน ฉัตรชมพู Hubai
15	ฉัตรชมพู จตุจักร (เมล็ด)	42	จีน ดอกจำปา (เมล็ด)
16	แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด)	43	จีน 2551-4 (เมล็ด)
17	แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด)	44	จีน 2551-12 (เมล็ด)
18	ฉัตรขาว มก.	45	จีน 2551-16 (เมล็ด)
19	แหลมชมพู มก.	46	จีน แหลมชมพู วิโรจน์ 1
20	บัวหลวง มก.	47	จีน แหลมชมพู วิโรจน์ 2
21	แหลมขาว ปทุมธานี เกษตรแฟร์	48	จีน แหลมชมพู Chiangxi (เมล็ด)
22	แหลมชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์	49	ญี่ปุ่น ฉัตรชมพู
23	ฉัตรชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์	50	จีน แตงไทย 2 (เมล็ด)
24	แหลมขาว ชลบุรี	51	จีน 2551 -5 (เมล็ด)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

บัวหลวงพื้นเมืองในไทย		บัวหลวงจากต่างประเทศ	
หมายเลข	ชื่อ	หมายเลข	ชื่อ
25	แหลมชมพู อ. เมือง จ. พิจิตร (เมล็ด)	63	จีน แหลมชมพู Taikong (C1)
26	แหลมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด)	64	จีน แหลมชมพู Taikong (C3)
27	แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว	65	จีน ฉัตรชมพู Taikong (C4)
52	แหลมชมพู พระราชินี	66	จีน แหลมชมพู Taikong (C5)
53	แหลมขาว คลองโยง	67	จีน ฉัตรชมพู Hubai (C6)
54	แหลมชมพูสายรุ้ง (SR) ลาดหลุมแก้ว	68	จีน 2551 -7 (เมล็ด)
55	แหลมชมพู พระราชินี (RN) เพชรบุรี	69	จีน 2551 -1 (เมล็ด)
56	แหลมชมพู ฉวาง (CV) นครศรีธรรมราช		
57	แหลมขาว คลองโยง (KY) พุทธมณฑล		
58	แหลมชมพู นครสวรรค์ (NW) บึงบอระเพ็ด		
59	แหลมชมพู พุทธมณฑล (PT)		
60	แหลมชมพู สามร้อยยอด (SY) อุทยานแห่งชาติ ประจวบฯ		
61	แหลมชมพู พิจิตร (PJ) (บึงสีไฟ)		
62	แหลมชมพู วัดศรีเอี่ยม (SA) กรุงเทพฯ		

ตารางที่ 2 รายชื่อพันธุ์บัวประดับที่ศึกษา

หมายเลข	ชื่อ	หมายเลข	ชื่อ
1	*N.* 'Mayla'	2	*N.* 'Tanpong'
3	*N.* 'Siam Jasmine'	4	*N.* 'Madame Wilfron Gonnère'
5	*N.* 'Miss Siam'	6	*N.* 'Supranee Pink'
7	*N.* 'Pink Ribbon'	8	*N.* 'Prapunt White'
9	*N.* 'Perry's Fire Opal'	10	*N.* 'Tan-khwan'
11	*N.* 'Sirius'	12	*N.* 'Nankwak blue'

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีสกัดดีเอ็นเอ

1. สกัดดีเอ็นเอของบัวพันธุ์ต่างๆ ทั้งพ่อแม่ และลูกผสม จากส่วนใบอ่อนบัวหลวง และกลีบดอกบัวประดับโดยใช้ CTAB ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Doyle and Doyle (1990) ซึ่งมีวิธีดังต่อไปนี้

เตรียม 3X CTAB ใส่หลอด 15 ml หลอดละ 5 ml และ ß– mercaptoethanol 5 µl เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 45 นาที บดตัวอย่างในไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่าง 2 กรัม ใส่หลอดเขย่าให้เข้ากัน แบ่งใส่หลอด 1.5 ml หลอดละ 750 µl ได้ประมาณ 6 หลอด บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส 45 นาทีขึ้นไปนำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เติมคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24: 1) 750 µl กลับหลอดไปมาประมาณ 5-10 นาที ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบ/นาที (rpm) 15 นาที ดูดน้ำใสตอนบน 500 µl ใส่หลอดใหม่ เติม 10% CTAB 50 µl ผสมให้เข้ากันเติมคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 500 µl กลับหลอดไปมา 5-10 นาที ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบ/นาที 15 นาที ดูดน้ำใสตอนบนหลอดละ 300 µl ใส่ในหลอด 1.5 ml รวมแต่ละหลอดให้มีปริมาตร 600 µl (ได้ทั้งหมด 3 หลอดต่อตัวอย่าง) ตกตะกอนด้วยเอธานอลสัมบูรณ์ 600 µl กลับหลอดไปมาเบาๆ แช่ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ถ้าตะกอนมากเกี่ยวดีเอ็นเอ (hook) ถ้าตะกอนน้อยปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที 10 นาที ล้างตะกอนด้วยเอธานอล 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปล่อยตะกอนให้แห้งละลายใน TE buffer 80-120 µl (ขึ้นกับปริมาณตะกอน) เติม RNaseA 2 µl/หลอด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เก็บดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส พร้อมใช้ต่อไป

2. การวิเคราะห์คุณภาพและความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอโดยเจลอะกาโรสอิเล็กโทรฟอริซิส ที่ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ (V) เป็นเวลาประมาณ 45 นาที แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 µg/ml นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดนาน 5 นาที ดูผลเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) เพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ การแตกหักของดี เอ็นเอ การปนเปื้อนจากอาร์เอ็นเอ โปรตีน และสารอื่นๆ และคาดคะเนปริมาณเอ็นเอ โดย spectrophotometry ใช้เครื่อง lamda UV/VIS spectrophotometer วัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ของดีเอ็นเอที่สกัดได้เพื่อคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอและคุณภาพของดีเอ็นเอ การคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอ มีหลักการว่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ของกรดนิวคลีอิกจะอยู่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในช่วงความยาวคลื่นสูงสุดที่ 260 นาโนเมตร (nm) โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 1 mg/ml มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (absorbance, A_{260}) เท่ากับ 20 หน่วย absorbance (A_{260})

กรดนิวคลีอิก หน่วยไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (µg/µl) $= A_{260} \times 1/20$

กรดนิวคลีอิก หน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/µl) $= A_{260} \times 1/20 \times 1000$

$= A_{260} \times 50$

หากใช้สารละลายดีเอ็นเอ ที่เจือจางในการตรวจ 100 เท่า (ดีเอ็นเอ 3 µl ต่อน้ำกลั่น 300 µl) สามารถคำนวณปริมาณกรดนิวคลีอิก หน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/µl) = $A_{260} \times 50 \times 100$

การหาคุณภาพของดีเอ็นเอ ค่าอัตราส่วนการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 260 กับ 280 nm (A_{260}/A_{280}) ใช้บอกคุณภาพดีเอ็นเอว่ามีการปนเปื้อนหรือไม่ ถ้ามีค่าอยู่ระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอนั้นบริสุทธิ์ ถ้าค่าสูงกว่า 1.85 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ และถ้าค่าต่ำกว่า 1.65 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีน

โปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลทางชีวโมเลกุลบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

1. โปรแกรม BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) จาก http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/blast สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายนิวคลีโอไทด์ กับฐานข้อมูล

2. โปรแกรม ClustalW 1.82 จาก http://www.ebi.ac.uk/clustalw/ สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือ โปรตีนที่กำลังศึกษา

3. โปรแกรม FastPCR ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการพัฒนา co-dominant marker

4. โปรแกรม CAP3 Sequence Assembly จาก http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php สำหรับการรวมลำดับเบสปลาย 3' และปลาย 5' เข้าด้วยกันโดยอาศัยบริเวณ overlap

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การพัฒนาเครื่องหมายจำเพาะกับยีนในบัวหลวงและบัวประดับ

พัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนในบัวหลวงทั้งหมด 14 ยีน ได้แก่ *storage protein* (*SP*), nrITS, *fruitfull protein* (*ful*), *Chalone synthase* (*CHS*), *Waxy gene* (*Wx*), *AGAMOUS-like protein* (*AG*) , *Alternative oxidase 1a* (*AOX*), *MADS-box transcription factor AP3* (*AP3*), *Glutathione peroxidase* (*GP*), *ACC oxidase* (*ACC*), *Cu/Zn superoxide dismutase* (*SOD*), *cationic peroxidase, flavonone 3-hydroxylase* (*CP*), *Sapallata 1*(*SEP1*) และ *MT*-seed specific metallothionein-like protein (*MT*) โดยรวมรวมข้อมูลลำดับเบสของยีนที่พบในพืช ใน Entrez (http://www.ncbi.nlm .nih.gov) นำลำดับเบสของยีนต่างๆ ที่รวบรวมมาทำ alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW 1.82 (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/) ทำ alignment ทั้ง 2 รูปแบบดังนี้ ลำดับเบสที่เป็น cDNA และ genomic DNA และลำดับเบสที่เป็น cDNA เพียงอย่างเดียว ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนต่างๆ โดยหลักการที่ว่า ความแตกต่างน่าจะพบมากที่บริเวณ intron ดังนั้นไพรเมอร์ที่ออกแบบจะคาบเกี่ยวบริเวณ exon-intron-exon หรือ ให้ครอบคลุมส่วนที่เป็น intron โดยมีไพรเมอร์อยู่ในส่วนของ exon และออกแบบไพรเมอร์ทั้ง forward primer (F) และ reverse primer (R) ให้มีความยาวประมาณ 20-23 เบส มีค่า T_m ใกล้เคียงกันทั้ง 2 ทิศทาง

พัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนในบัวประดับทั้งหมด 6 ยีน ได้แก่ *Pistillata* (*PI*), ITS ของยีน *nrRNA*, *Apetala 3* (AP3), *Sepallata1* (SEP1), *AGAMOUS-like* protein (AGL) และ *Leafy* protein (LFY) โดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับในบัวหลวง

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค DFLP

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนที่พัฒนา องค์ประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ (60 ng/µl) 1.0 µl ไพรเมอร์ (forward/reverse 5 pmol) ชนิดละ 1.0 µl dNTP (2 mM) 0.5 µl, 10X PCR buffer 1.25 µl, $MgCl_2$ (50 mM) 0.5 µl, *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) 0.1 µl และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 12.5 µl อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 1 รอบสำหรับการคลายเกลียว และแยกสายดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที และ 35 รอบสำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 54-59 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ในรอบสุดท้ายอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ เก็บผลผลิตพีซีอาร์ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบขนาด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยเทคนิค DFLP ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 115 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 40 นาที (ขึ้นกับขนาดของชิ้น DNA) แล้วย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำสะอาดนาน 5 นาที ตรวจสอบผลภายใต้แสง UV บันทึกผลรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค SSCP

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนที่พัฒนา องค์ประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ (50 ng/µl) 2.0 µl ไพรเมอร์ (forward/reverse 5 pmol) ชนิดละ 2.0 µl dNTP (2.5 mM) 2 µl, 10X PCR buffer 2.5 µl, $MgCl_2$ (50 mM) 0.75 µl, *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) 0.2 µl และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 25 µl

เตรียมดีเอ็นเอสภาพสายเดี่ยว โดยนำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 3 - 5 µl ใส่หลอดพีซีอาร์เติม loading buffer (95% formamide, 0.01M NaOH, bromphenol blue และ 0.05% xylene cyanol) 9 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันทีเพื่อให้ดีเอ็นเอคงอยู่ในสภาพสายเดี่ยวก่อนนำไปทำอิเล็กโทรฟอริซิส

เตรียมเจล acrylamide ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ชนิดที่ไม่มีส่วนผสมของสารที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (non-denaturing polyacrylamide gel) ประกอบด้วย 30% acrylamide (29:1) 9.0 ml, 6X TBE buffer 4.5 ml, 10% APS 300 µl , TEMED 120 µl และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 31.5 ml ใช้แผ่นเจลแนวตั้งขนาด 20 x 20 x 0.3 เซนติเมตร โดยเตรียมเจลไว้ล่วงหน้าประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็งตัวสม่ำเสมอ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้เสียสภาพที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที มาทำอิเล็กโทรฟอริซิส แนวตั้งในสารละลาย 1X TBE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 300 โวลต์ นาน 2-10 ชั่วโมง ทั้งนี้ระยะเวลาจะขึ้นอยู่กับความยาวของชิ้นดีเอ็นเอ

ย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต โดยแยกแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจกอย่างระมัดระวัง ใส่ในถาดพลาสติก เติม fixer (10% ethanol ใน 0.5% acetic acid) ให้ท่วมเขย่าเบาๆ นาน 5 นาที เท fixer ออก แล้วย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต (0.6% slivernitrate ในสารละลาย fixer) เขย่าเบาๆ นาน 30 นาที เทสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตทิ้ง (เก็บในภาชนะที่เฉพาะ) ล้างด้วยน้ำกลั่น 20 วินาที ในครั้งแรก และ 1 นาทีในครั้งที่สองตามลำดับ จากนั้นเติมสารละลาย developer ปริมาตร 300 ml (10 N NaOH 15 ml, 37% formaldehyde 1.5 ml) เขย่าเบาๆ เมื่อเจลเริ่มเปลี่ยนสีให้เท developer เดิม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทิ้ง แล้วเติม developer ใหม่ลงไป เขย่าต่อไปจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน เท developer ทิ้ง แล้วเติม fixer ลงไปให้ทั่วเจล เขย่าเบาๆ นาน 10 นาที แล้วเท fixer ทิ้ง ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง

วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแผ่นเจล ในกรณีที่ต้องการนำไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอชิ้นใหม่ด้วยวิธีพีซีอาร์เพื่อนำไปหาลำดับเบสต่อไป สามารถบ่มแถบเจลที่ตัดมาใส่ในสารละลาย TE buffer แช่ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ้าต้องการเก็บแผ่นเจลให้นำแผ่น cellophane ที่เปียกประกบกับแผ่นเจลทั้งสองด้าน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ขึงแผ่นเจลให้ตึงทุกด้าน แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับพันธุ์บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* และ *Brachyceras*

สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวประดับโดยเทคนิค AFLP (Vos *et al*., 1995) มีวิธีการดังต่อไปนี้ นำจีโนมิกดีเอ็นเอของบัวประดับมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดพร้อมกัน คือ *Eco*RI ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความถี่ในการตัดต่ำ มีตำแหน่งจดจำขนาด 6 คู่เบส และเอนไซม์ *Mse*I ซึ่งมีความถี่ในการตัดสูง มีตำแหน่งจดจำขนาด 4 คู่เบส แล้วเชื่อมต่อปลายดีเอ็นเอทั้งสองด้านด้วย adapter 2 ชนิด คือ *Eco*RI adapter และ *Mse*I adapter เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 2 ขั้นตอน ดังนี้ (1) preselective amplification เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เฉพาะส่วนที่ต้องการ โดยนำดีเอ็นเอที่ต่อกับ adapter เรียบร้อยแล้วมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ *Eco*RI ไพรเมอร์และ *Mse*I ไพรเมอร์ ที่ต่ออยู่กับเบส 1 ตัวที่ปลาย 3' (primer E+1, primer M+1) องค์ประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอที่ต่อกับ adapter แล้ว (100 ng/µl) 2.0 µl ไพรเมอร์ (forward/reverse 5 pmol) ชนิดละ 1.0 µl dNTP (2 mM) 2.5 µl, 10X PCR buffer 2.5 µl, $MgCl_2$ (50 mM) 0.75 µl, *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) 0.1 µl และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 25.0 µl โดยโปรแกรมปฏิกิริยาพีซีอาร์เป็นดังนี้ อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 25 รอบสำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ผลที่ได้จากการทำ preselective amplification คือ จะเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *Eco*RI และปลายอีกด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *Mse*I ซึ่งในขั้นตอนนี้จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการได้ 16 เท่า แบ่งส่วนของผลผลิตพีซีอาร์มาทำอิเล็กโทรฟอริซิส โดยใช้เจลอะกาโรสที่ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และเจือจาง 20 เท่าด้วย TE buffer (2) selective amplification เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ *Eco*RI ไพรเมอร์ และ *Mse*I ไพรเมอร์ที่ต่ออยู่กับเบส 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตัวที่ปลาย 3' (primer E+3, primer M+3) องค์ประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยดีเอ็นเอที่ต่อกับ adapter แล้ว 5 µl ไพรเมอร์ (forward/reverse 5 pmol) ชนิดละ 1.0 µl dNTP (2 mM) 2.0 µl, 10X PCR buffer 2.0 µl, $MgCl_2$ (50 mM) 0.60 µl, *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) 0.1 µl และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 20.0 µl โดยโปรแกรมปฏิกิริยาพีซีอาร์เริ่มจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แบบ touch down 1 รอบซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 1 รอบจากนั้นจึงลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย 35 รอบสำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งประกอบด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 60 วินาที

แบ่งผลผลิตพีซีอาร์ มาตรวจสอบด้วยอิเล็กโทรฟอริซิส โดยใช้ เจลอะกาโรสที่ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ นำผลผลิตพีซีอาร์มาเติม AFLP loading buffer (98 % formamide, 10 mM EDTA, 0.1% bromophenol และ 0.1% xylene cyanol) จำนวน 20 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่พร้อมสำหรับทำเจล acrylamide อิเล็กโทรฟอริซิส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของไพรเมอร์ และ adapter ที่ใช้ศึกษาบัวประดับด้วยเทคนิค AFLP

Adapter และ ไพรเมอร์ ลำดับเบส	ลำดับเบส
*Eco*RI adapter	5' -CTCGTAGACTGCGTACC- 3' |||||||||||||||| 3'-CATCTGACGCATGGTTAA- 5'
*Mse*I adapter	5' -GACGATGAGTCCTGAG- 3' |||||||||||||||| 3'-TACTCAGGACTCAT- 5'
Primer E+1 (E-A)	5' GACTGCGTACCAATTCA 3'
Primer E+1 (E-C)	5'GACTGCGTACCAATTCC 3'
Primer M+1 (M-C)	5' GATGAGTCCTGAGTAAC 3'
Primer M+1 (M-A)	5' GATGAGTCCTGAGTAAA 3'
Primer E+3 (E-AAC)	5' GACTGCGTACCAATTCAAC 3'
Primer E+3 (E-AAG)	5' GACTGCGTACCAATTCAAG 3'
Primer E+3 (E-ACT)	5' GACTGCGTACCAATTCACT 3'
Primer E+3 (E-CAA)	5' GACTGCGTACCAATTCCAA 3'
Primer E+3 (E-CAC)	5' GACTGCGTACCAATTCCAC 3'
Primer E+3 (E-CAG)	5' GACTGCGTACCAATTCCAG 3'
Primer M+3(M-CAA)	5' GATGAGTCCTGAGTAACAA 3'
Primer M+3 (M-CAC)	5' GATGAGTCCTGAGTAACAC 3'
Primer M+3 (M-CAG)	5' GATGAGTCCTGAGTAACAG 3'
Primer M+3 (M-CAT)	5' GATGAGTCCTGAGTAACAT 3'
Primer M+3 (M-CTC)	5' GATGAGTCCTGAGTAACTC 3'
Primer M+3 (M-AGA)	5' GATGAGTCCTGAGTAAAGA 3'
Primer M+3 (M-ATA)	5' GATGAGTCCTGAGTAAATA 3'
Primer M+3 (M-AAG)	5' GATGAGTCCTGAGTAAAAG 3'
Primer M+3 (M-AAT)	5' GATGAGTCCTGAGTAAAAT 3'

เตรียมกระจกสำหรับเทเจล โดยเช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silene (bind silene 1 µl, glacial acetic acid 2.5 µl และ ethanol 500 µl) และเช็ดกระจกแผ่นหน้าด้วย repel silene ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที จากนั้นนำกระจกทั้งสองแผ่นมาประกอบเข้าชุด วาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่าง โดยหันด้านที่ทา bind silene และ repel silene เข้าหากัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เตรียมเจล acrylamide ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ โดยมีส่วนประกอบดังนี้ urea 27 g, 10X TBE 6 ml, 10% APS 400 µl, TEMED 120 µl, 30% acrylamide (29% acrylamide และ 1% methylene bisacrylamide) 12 ml และน้ำกลั่น 21 ml ผสมเข้าด้วยกัน เทเจลลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม แล้วใส่หวีลงไปด้านบน ทิ้งไว้จนเจล แข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ใช้น้ำล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด ดึงหวีออกและประกอบเข้ากับชุด sequencing gels เติมสารละลาย 1X TBE buffer ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง ต่อสายไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าทำ pre-run โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 20-30 นาที แล้วปิดเครื่อง ใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์มาล้างผิวหน้าของเจล หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 8-10 µl ลงในแต่ละช่อง เปิดเครื่องโดยใช้แรงเคลื่อนเท่าเดิม คือ 1,500 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมงครึ่ง ปิดเครื่อง ดูดบัฟเฟอร์จากช่องด้านบนออก นำกระจกออกและนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรตเพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Caetano-Anolles (1997) โดยนำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่แช่ในสารละลาย fixative (10% acetic acid) เป็นเวลา 20 นาที เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า ล้างในน้ำกลั่น 30 นาที ล้างซ้ำอีกครั้ง 5 นาที นำแผ่นกระจกมาย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำแผ่นเจลออกมาจุ่มลงในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว (10 วินาที) เพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรตส่วนเกินออก ย้ายแผ่นเจลมาเขย่าในสารละลาย developer (2.5% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde และ sodium thiosulfate 2 µg/ml) เมื่อแถบดีเอ็นเอปรากฏชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลใส่ใน stop solution (5% acetic acid และ 3% glycerol) เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างกระจกเจลครั้งสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 2 นาที ผึ่งให้แห้งในอากาศ เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป

เลือกแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับบัวประดับแต่ละพันธุ์จากเทคนิค AFLP ตัดแถบดีเอ็นเอด้วยมีดผ่าตัดขนาดเล็กที่ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนโดยการจุ่มแอลกอฮอล์แล้วผ่านเปลวไฟ จากนั้นรอให้มีดเย็นนำมาตัดแถบดีเอ็นเอโดยให้เนื้อเจลติดมาน้อยที่สุดใส่ในสารลาย TE buffer บ่มที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์อีกครั้ง (re-amplification) โดยเติมสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 2.0 µl ใช้ไพรเมอร์คู่เดิมจากเทคนิค AFLP (10 pmol/µl) 1.0 µl dNTP (2 mM) 2 µl 10X PCR buffer ปริมาตร 2.0 µl $MgCl_2$ (50 mM) 0.6 µl *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) 0.1 µl แล้วเติมน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรรวม 20 µl นำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิ และเวลาในการทำปฏิกิริยา เช่นเดียวกับการทำ AFLP ในขั้น selective amplification ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยเทคนิคอิเล็กโทรฟอริซิสในเจลอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และนำผลผลิตพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป HiYield™ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Real Biotech Corp., ไต้หวัน)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เชื่อมต่อดีเอ็นเอภายหลังการทำให้บริสุทธิ์แล้วเข้ากับพลาสมิด pGEM®-T Vector โดยใส่สารละลายดีเอ็นเอ 3.0 µl 2X ligation buffer 5.0 µl พลาสมิด pGEM®-T Vector 1.0 µl T_4 DNA ligase (100 U/µl) 1.0 µl นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง การถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย เติมสารละลายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดปริมาตร 5 µl ลงในหลอดที่มีคอมพีเทนต์เซลล์ 100 µl แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (heat shock)โดยจุ่มลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แล้วย้ายมาแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาทีเติมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย LB medium ปริมาตร 900 µl ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งให้เหลือประมาณ 500 µl ผสมตะกอนให้เป็นเนื้อเดียวกัน และดูดสารละลาย ปริมาตร 100 µl มาเกลี่ย (spread) ให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง LB agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 2 % X-gal และ 20 % IPTG นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีสีขาว โดยเขี่ยเชื้อใส่ลงในหลอดที่มีน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 30 µl มาละลายให้เข้ากันแล้วดูดมา 5 µl เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ (colony PCR)โดยมีองค์ประกอบ คือ สารละลายดีเอ็นเอ (60 ng/µl) 5.0 µl ไพรเมอร์ (forward/reverse 5 pmol) ชนิดละ 0.5 µl dNTP (2 mM) 1.0 µl, 10X PCR buffer 1.0 µl, $MgCl_2$ (50 mM) 1.0 µl, *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) 0.05 µl และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 10.0 µl ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่องพีซีอาร์ อุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย 1 รอบสำหรับการคลายเกลียว และแยกสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และ 30 รอบสำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ในรอบสุดท้ายอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ นำผลผลิตพีซีอาร์ไปตรวจสอบผลด้วยการทำอิเล็กโทรฟอริซิสใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ การสกัดแยกพลาสมิดให้บริสุทธิ์ โดยเลือก single colony ที่ตรวจสอบผลว่ามีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือยีนแล้ว มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน incubator shaker ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดพลาสมิดสายผสมออกจากแบคทีเรียเจ้าบ้านด้วยชุดสกัด High-Speed plasmid Mini Kit (บริษัท Geneaid) ตรวจสอบผลภายหลังการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ก่อนการอิเล็กโทรฟอริซิส โดยใช้ เจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนที่ศึกษาเพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์โดยนำพลาสมิดที่สกัดมา ส่งบริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd. เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม fastPCR version 4

การวิเคราะห์ผลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาจากเทคนิค DFLP และ SSCP

บันทึกแถบดีเอ็นเอที่ได้มาจากเทคนิค DFLP และ SSCP คำนวณหาค่าความถี่ในแต่ละรูปแบบแอลลีลตามจีโนไทป์และคำนวณค่าความถี่ของแต่ละแอลลีลโดย

ค่าความถี่ของแอลลีล= $\frac{Pi}{\sum pi}$ (Pi =จำนวนแอลลีล i, $\sum pi$ =จำนวนแอลลีลทั้งหมด)

คำนวนค่า Polymorphic Information Contents (PICs) ของแต่ละ marker จากสูตร

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{k} Pi^2$$

บันทึกแถบดีเอ็นเอของบัวหลวงและบัวประดับที่ปรากฏบนลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้โดยเทคนิค SSCP โดยอ่านแถบที่ปรากฏบนแผ่นเจลและบันทึกเป็นสัญลักษณ์ “1” เมื่อเกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” เมื่อไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc เวอร์ชั่น 2.20k ซึ่งจะคำนวณความสัมพันธ์ภายในตัวอย่างบัวหลวงและภายในตัวอย่างบัวประดับ และสร้างแผนภูมิพันธุกรรมเพื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (clustal analysis) ด้วยวิธี UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) และการคำนวณค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (genetic similarlity: GS) ใช้วิธีของ Sneath and Sokal (1979)

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์โมเลกุลพืชห้อง 4511 ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

เริ่มการทดลอง ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2552 สิ้นสุดการทดลอง เดือนมกราคม 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การสกัดดีเอ็นเอจากใบบัวหลวง และกลีบดอกจากบัวประดับ

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของบัวหลวง รวม 69 ตัวอย่าง และจากกลีบดอกของบัวประดับรวม 12 ตัวอย่าง ด้วยวิธี CTAB วิเคราะห์คุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรฟอริซิสใน เจลอะกาโรสเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน และวัดการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร (A_{260}/A_{280}) พบว่าได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพค่อนข้างดี โดยมีค่า A_{260}/A_{280}อยู่ระหว่าง 1.8-1.9

2. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวง ด้วยเทคนิค SSCP โดยไพรเมอร์จำเพาะกับยีน

ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนในบัวหลวง 4 ตำแหน่งคือ *chalone synthase, storage protein, fruitfull protein* และ *nr*ITS พัฒนาโดย กนกวรรณ (2551) (ตารางที่ 4) ถูกนำมาใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นในเบื้องต้นกับตัวอย่างบัวหลวงที่รวบรวมจากในประเทศและต่างประเทศทั้งหมด 69 ตัวอย่าง โดยเทคนิค DFLP ในเจลอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และโดยเทคนิค SSCP ในเจล non-denaturing polyacrylamide (ภาพที่ 5-8)

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์จำเพาะของยีนที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบัวหลวง

ชื่อยีน	Ta (°C)	ขนาด (คู่เบส)	ลำดับเบสของไพรเมอร์
chalcone synthase (CHS)	57	636	CHS-F: 5' -TGACTACCAGCTCACCAA-3'
			CHS-R: 5' -TCCGCATCTCATCCAATATG-3'
storage protein (SP)	59	1,200	SP-F: 5' -GATTGAGCTTGAGCGAAGTG-3'
			SP-R: 5' -TACATCACATGGATCATATCC-3'
fruitfull protein (*ful*)	60	1,500	FUL-F: 5' -TTCTTATGCAGAGCGAGAGC-3'
			FUL-R: 5' -GATTGAGATGACACCTCTGC-3'
ITS ของ *rRNA*	59	870	ITS-F: 5' -TCGCTCCTACCGATTGAATG -3'
			ITS-R: 5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'

*พัฒนาโดย กนกวรรณ และคณะ (2551)

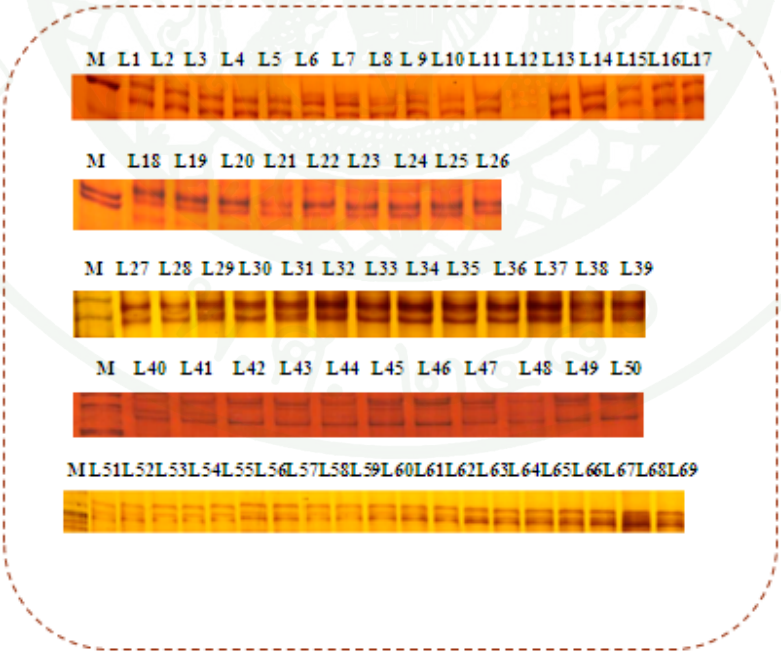
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 5 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัวหลวงต่างๆ ทั้งจากในประเทศ และต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *chalcone synthase* (*CHS*) ด้วย (A) เทคนิค DFLP และ (B) เทคนิค SSCP

(M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, L1 = แหลมชมพู พระราชินี, L2 = แหลมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด), L3 = แหลมชมพู พิจิตร, L4 = แหลมขาว พิจิตร, L5 = ฉัตรชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร, L6 = ฉัตรขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร, L7 = แหลมชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร, L8 = แหลมขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร, L9 = แหลมขาว คลองโยง นครปฐม, L10 = แหลมชมพู สามร้อยยอด, L11 = แหลมชมพู สระบุรี, L12 = ฉัตรชมพู สระบุรี, L13 = แหลมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด), L14 = แหลมขาว กำแพงแสน (เมล็ด), L15 = ฉัตรชมพู จตุจักร (เมล็ด), L16 = แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด), L17 = แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด), L18 = ฉัตรขาว มก., L19 = แหลมชมพู มก., L20 = บัวหลวง มก., L21 = แหลมขาว ปทุมธานี เกษตรแฟร์, L22 = แหลมชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์, L23 = ฉัตรชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์, L24 = แหลมขาว ชลบุรี, L25 = แหลมชมพู จ.พิจิตร(เมล็ด), L26 = แหลมชมพู พุทธมณฑล (เมล็ด), L27 = แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว, L28 = จีน แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว, L29 = จีน Wuhan (เมล็ด), L30 = ไต้หวัน แหลมชมพู -ต2 (เมล็ด), L31 = ไต้หวัน Hunan white -ต4 (เมล็ด), L32 = ไต้หวัน East Indian Lotus -ต6, L33 = ไต้หวัน -ต7 (เมล็ด), L34 = ไต้หวัน ฉัตรขาว -ต8 (เมล็ด), L35 = ไต้หวัน -ต9 (เมล็ด), L36 = ไต้หวัน –N1 (เมล็ด), L37 = ไต้หวัน –N6 (เมล็ด), L38 = ไต้หวัน –N7 (เมล็ด), L39 = ไต้หวัน –G2 (เมล็ด), L40 = จีน ฉัตรชมพู เหง้า, L41 = จีน ฉัตรชมพู Hubai, L42 = จีน ดอกจำปา (เมล็ด), L43 = จีน 2551-4 (เมล็ด), L44 = จีน 2551-12 (เมล็ด), L45 = จีน 2551-16 (เมล็ด), L46 = จีน แหลมชมพู วิโรจน์ 1, L47 = จีน แหลมชมพู วิโรจน์ 2, L48 = จีน แหลมชมพู Chiangxi (เมล็ด), L49 = ญี่ปุ่น ฉัตรชมพู, L50 = จีน แตงไทย 2 (เมล็ด), L51 = จีน 2551 -5 (เมล็ด), L52 = แหลมชมพู พระราชินี , L53 = แหลมขาว คลองโยง , L54 = แหลมชมพู(SR) ลาดหลุมแก้ว, L55 = แหลมชมพู (RN) เพชรบุรี, L56 = แหลมชมพู ฉวาง (CV) นครศรีฯ, L57 = แหลมขาว คลองโยง (KY), L58 = แหลมชมพู (NW) บึงบอระเพ็ด, L59 = แหลมชมพู พุทธมณฑล (PT), L60 = แหลมชมพู สามร้อยยอด (SY), L61 = แหลมชมพู พิจิตร (PJ) (บึงสีไฟ), L62 = แหลมชมพู วัดศรีเอี่ยม (SA), L63 = จีน แหลมชมพู Taikong (C1), L64 = จีน แหลมชมพู Taikong (C3), L65 = จีน ฉัตรชมพู Taikong (C4), L66 = จีน แหลมชมพู Taikong (C5), L67 = จีน ฉัตรชมพู Hubai (C6), L68 = จีน 2551 -7 (เมล็ด), L69 = จีน 2551 -1 (เมล็ด))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(A)



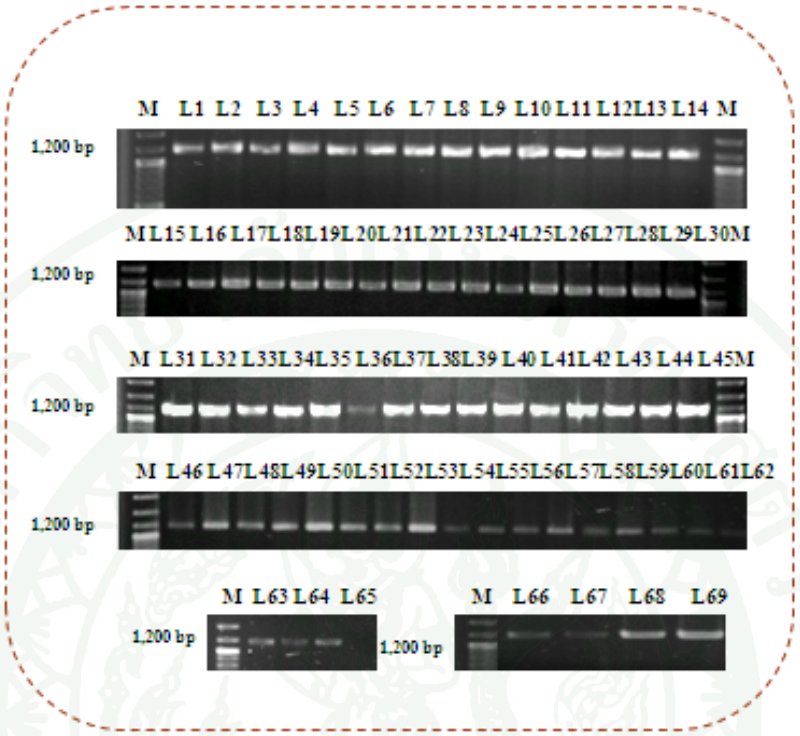
(B)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

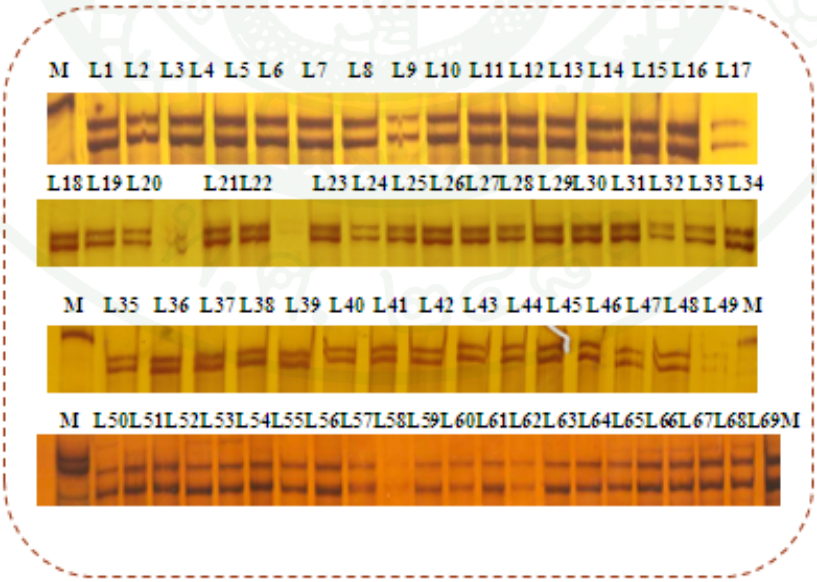
ภาพที่ 6 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัวหลวงต่างๆ ทั้งจากในประเทศ และต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *storage protein* (*sp*) ด้วย (A) เทคนิค DFLP และ (B) เทคนิค SSCP

(M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, L1 = แหลมชมพู พระราชินี, L2 = แหลมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด), L3 = แหลมชมพู พิจิตร, L4 = แหลมขาว พิจิตร, L5 = ฉัตรชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร, L6 = ฉัตรขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร, L7 = แหลมชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร, L8 = แหลมขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร, L9 = แหลมขาว คลองโยง นครปฐม, L10 = แหลมชมพู สามร้อยยอด, L11 = แหลมชมพู สระบุรี, L12 = ฉัตรชมพู สระบุรี, L13 = แหลมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด), L14 = แหลมขาว กำแพงแสน (เมล็ด), L15 = ฉัตรชมพู จตุจักร (เมล็ด), L16 = แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด), L17 = แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด), L18 = ฉัตรขาว มก., L19 = แหลมชมพู มก., L20 = บัวหลวง มก., L21 = แหลมขาว ปทุมธานี เกษตรแฟร์, L22 = แหลมชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์, L23 = ฉัตรชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์, L24 = แหลมขาว ชลบุรี, L25 = แหลมชมพู จ.พิจิตร(เมล็ด), L26 = แหลมชมพู พุทธมณฑล (เมล็ด), L27 = แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว, L28 = จีน แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว, L29 = จีน Wuhan (เมล็ด), L30 = ไต้หวัน แหลมชมพู -ต2 (เมล็ด), L31 = ไต้หวัน Hunan white -ต4 (เมล็ด), L32 = ไต้หวัน East Indian Lotus -ต6, L33 = ไต้หวัน -ต7 (เมล็ด), L34 = ไต้หวัน ฉัตรขาว -ต8 (เมล็ด), L35 = ไต้หวัน -ต9 (เมล็ด), L36 = ไต้หวัน –N1 (เมล็ด), L37 = ไต้หวัน –N6 (เมล็ด), L38 = ไต้หวัน –N7 (เมล็ด), L39 = ไต้หวัน –G2 (เมล็ด), L40 = จีน ฉัตรชมพู เหง้า, L41 = จีน ฉัตรชมพู Hubai, L42 = จีน ดอกจำปา (เมล็ด), L43 = จีน 2551-4 (เมล็ด), L44 = จีน 2551-12 (เมล็ด), L45 = จีน 2551-16 (เมล็ด), L46 = จีน แหลมชมพู วิโรจน์ 1, L47 = จีน แหลมชมพู วิโรจน์ 2, L48 = จีน แหลมชมพู Chiangxi (เมล็ด), L49 = ญี่ปุ่น ฉัตรชมพู, L50 = จีน แตงไทย 2 (เมล็ด), L51 = จีน 2551 -5 (เมล็ด), L52 = แหลมชมพู พระราชินี , L53 = แหลมขาว คลองโยง , L54 = แหลมชมพู(SR) ลาดหลุมแก้ว, L55 = แหลมชมพู (RN) เพชรบุรี, L56 = แหลมชมพู ฉวาง (CV) นครศรีฯ, L57 = แหลมขาว คลองโยง (KY), L58 = แหลมชมพู (NW) บึงบอระเพ็ด, L59 = แหลมชมพู พุทธมณฑล (PT), L60 = แหลมชมพู สามร้อยยอด (SY), L61 = แหลมชมพู พิจิตร (PJ) (บึงสีไฟ), L62 = แหลมชมพู วัดศรีเอี่ยม (SA), L63 = จีน แหลมชมพู Taikong (C1), L64 = จีน แหลมชมพู Taikong (C3), L65 = จีน ฉัตรชมพู Taikong (C4), L66 = จีน แหลมชมพู Taikong (C5), L67 = จีน ฉัตรชมพู Hubai (C6), L68 = จีน 2551 -7 (เมล็ด), L69 = จีน 2551 -1 (เมล็ด))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)



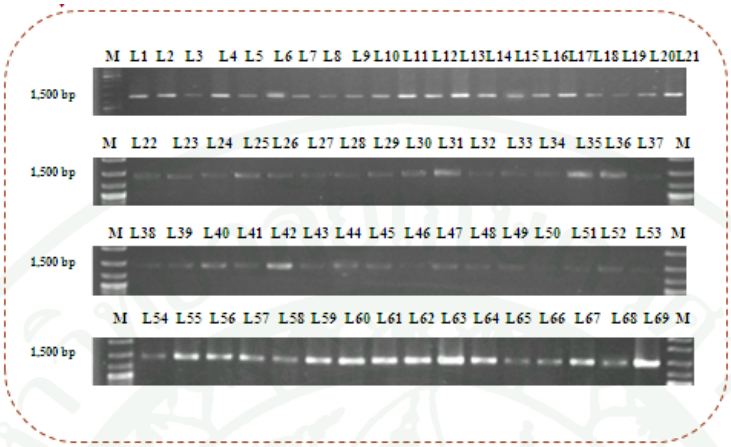
(B)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

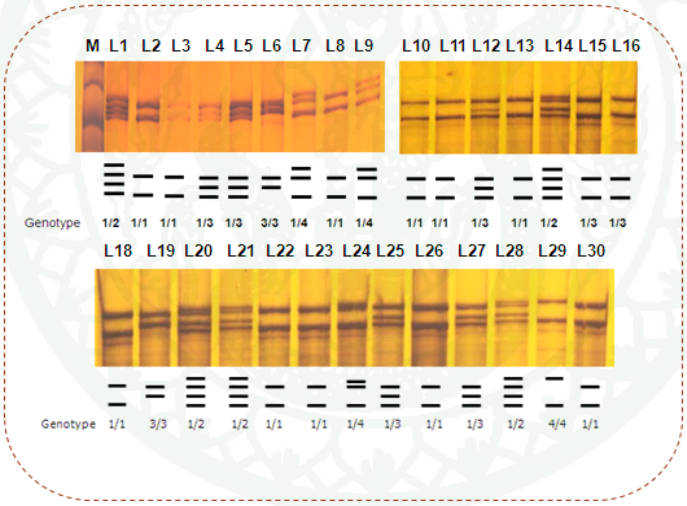
ภาพที่ 7 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัวหลวงต่างๆ ทั้งจากในประเทศ และต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *fruitfull protein* (*ful*) ด้วย (A) เทคนิค DFLP และ (B) เทคนิค SSCP

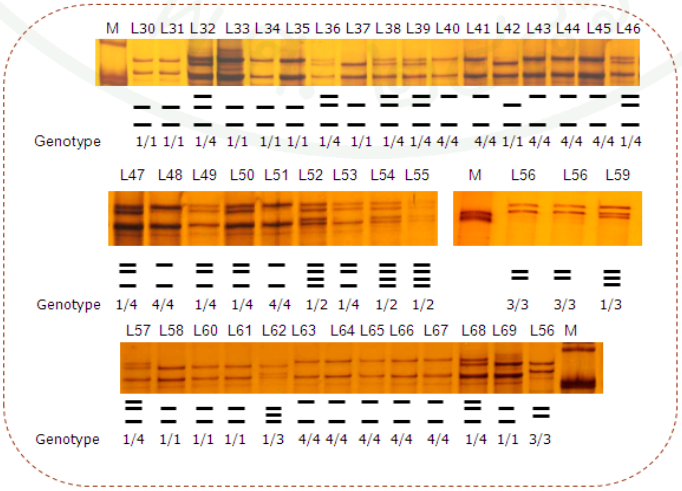
(M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, L1 = แหลมชมพู พระราชินี, L2 = แหลมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด), L3 = แหลมชมพู พิจิตร, L4 = แหลมขาว พิจิตร, L5 = ฉัตรชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร, L6 = ฉัตรขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร, L7 = แหลมชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร, L8 = แหลมขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร, L9 = แหลมขาว คลองโยง นครปฐม, L10 = แหลมชมพู สามร้อยยอด, L11 = แหลมชมพู สระบุรี, L12 = ฉัตรชมพู สระบุรี, L13 = แหลมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด), L14 = แหลมขาว กำแพงแสน (เมล็ด), L15 = ฉัตรชมพู จตุจักร (เมล็ด), L16 = แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด), L17 = แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด), L18 = ฉัตรขาว มก., L19 = แหลมชมพู มก., L20 = บัวหลวง มก., L21 = แหลมขาว ปทุมธานี เกษตรแฟร์, L22 = แหลมชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์, L23 = ฉัตรชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์, L24 = แหลมขาว ชลบุรี, L25 = แหลมชมพู จ.พิจิตร(เมล็ด), L26 = แหลมชมพู พุทธมณฑล (เมล็ด), L27 = แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว, L28 = จีน แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว, L29 = จีน Wuhan (เมล็ด), L30 = ไต้หวัน แหลมชมพู -ต2 (เมล็ด), L31 = ไต้หวัน Hunan white -ต4 (เมล็ด), L32 = ไต้หวัน East Indian Lotus -ต6, L33 = ไต้หวัน -ต7 (เมล็ด), L34 = ไต้หวัน ฉัตรขาว -ต8 (เมล็ด), L35 = ไต้หวัน -ต9 (เมล็ด), L36 = ไต้หวัน –N1 (เมล็ด), L37 = ไต้หวัน –N6 (เมล็ด), L38 = ไต้หวัน –N7 (เมล็ด), L39 = ไต้หวัน –G2 (เมล็ด), L40 = จีน ฉัตรชมพู เหง้า, L41 = จีน ฉัตรชมพู Hubai, L42 = จีน ดอกจำปา (เมล็ด), L43 = จีน 2551-4 (เมล็ด), L44 = จีน 2551-12 (เมล็ด), L45 = จีน 2551-16 (เมล็ด), L46 = จีน แหลมชมพู วิโรจน์ 1, L47 = จีน แหลมชมพู วิโรจน์ 2, L48 = จีน แหลมชมพู Chiangxi (เมล็ด), L49 = ญี่ปุ่น ฉัตรชมพู, L50 = จีน แตงไทย 2 (เมล็ด), L51 = จีน 2551 -5 (เมล็ด), L52 = แหลมชมพู พระราชินี , L53 = แหลมขาว คลองโยง , L54 = แหลมชมพู(SR) ลาดหลุมแก้ว, L55 = แหลมชมพู (RN) เพชรบุรี, L56 = แหลมชมพู ฉวาง (CV) นครศรีฯ, L57 = แหลมขาว คลองโยง (KY), L58 = แหลมชมพู (NW) บึงบอระเพ็ด, L59 = แหลมชมพู พุทธมณฑล (PT), L60 = แหลมชมพู สามร้อยยอด (SY), L61 = แหลมชมพู พิจิตร (PJ) (บึงสีไฟ), L62 = แหลมชมพู วัดศรีเอี่ยม (SA), L63 = จีน แหลมชมพู Taikong (C1), L64 = จีน แหลมชมพู Taikong (C3), L65 = จีน ฉัตรชมพู Taikong (C4), L66 = จีน แหลมชมพู Taikong (C5), L67 = จีน ฉัตรชมพู Hubai (C6), L68 = จีน 2551 -7 (เมล็ด), L69 = จีน 2551 -1 (เมล็ด))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)





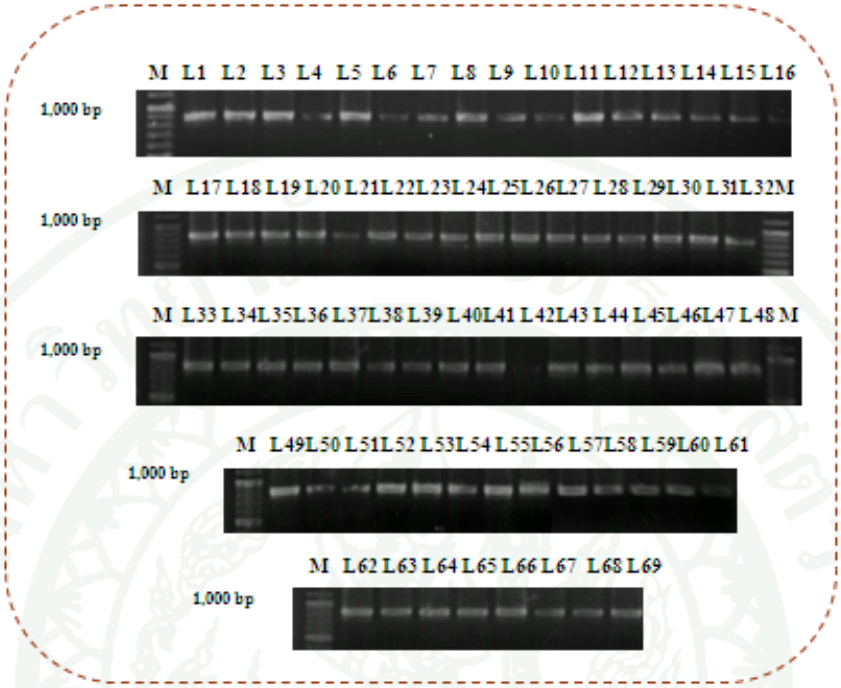
(B)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

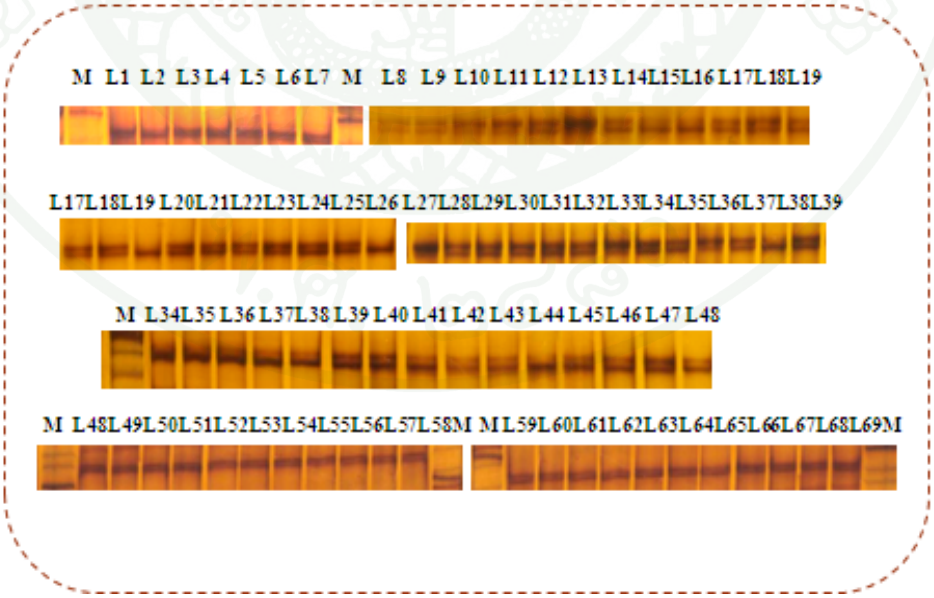
ภาพที่ 8 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัวหลวงต่างๆ ทั้งจากในประเทศ และต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับ ITS ของยีน *rRNA* ด้วย (A) เทคนิค DFLP และ (B) เทคนิค SSCP

(M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, L1 = แหลมชมพู พระราชินี, L2 = แหลมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด), L3 = แหลมชมพู พิจิตร, L4 = แหลมขาว พิจิตร, L5 = ฉัตรชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร, L6 = ฉัตรขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร, L7 = แหลมชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร, L8 = แหลมขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร, L9 = แหลมขาว คลองโยง นครปฐม, L10 = แหลมชมพู สามร้อยยอด, L11 = แหลมชมพู สระบุรี, L12 = ฉัตรชมพู สระบุรี, L13 = แหลมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด), L14 = แหลมขาว กำแพงแสน (เมล็ด), L15 = ฉัตรชมพู จตุจักร (เมล็ด), L16 = แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด), L17 = แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด), L18 = ฉัตรขาว มก., L19 = แหลมชมพู มก., L20 = บัวหลวง มก., L21 = แหลมขาว ปทุมธานี เกษตรแฟร์, L22 = แหลมชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์, L23 = ฉัตรชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์, L24 = แหลมขาว ชลบุรี, L25 = แหลมชมพู จ.พิจิตร(เมล็ด), L26 = แหลมชมพู พุทธมณฑล (เมล็ด), L27 = แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว, L28 = จีน แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว, L29 = จีน Wuhan (เมล็ด), L30 = ไต้หวัน แหลมชมพู -ต2 (เมล็ด), L31 = ไต้หวัน Hunan white -ต4 (เมล็ด), L32 = ไต้หวัน East Indian Lotus -ต6, L33 = ไต้หวัน -ต7 (เมล็ด), L34 = ไต้หวัน ฉัตรขาว -ต8 (เมล็ด), L35 = ไต้หวัน -ต9 (เมล็ด), L36 = ไต้หวัน –N1 (เมล็ด), L37 = ไต้หวัน –N6 (เมล็ด), L38 = ไต้หวัน –N7 (เมล็ด), L39 = ไต้หวัน –G2 (เมล็ด), L40 = จีน ฉัตรชมพู เหง้า, L41 = จีน ฉัตรชมพู Hubai, L42 = จีน ดอกจำปา (เมล็ด), L43 = จีน 2551-4 (เมล็ด), L44 = จีน 2551-12 (เมล็ด), L45 = จีน 2551-16 (เมล็ด), L46 = จีน แหลมชมพู วิโรจน์ 1, L47 = จีน แหลมชมพู วิโรจน์ 2, L48 = จีน แหลมชมพู Chiangxi (เมล็ด), L49 = ญี่ปุ่น ฉัตรชมพู, L50 = จีน แตงไทย 2 (เมล็ด), L51 = จีน 2551 -5 (เมล็ด), L52 = แหลมชมพู พระราชินี , L53 = แหลมขาว คลองโยง , L54 = แหลมชมพู(SR) ลาดหลุมแก้ว, L55 = แหลมชมพู (RN) เพชรบุรี, L56 = แหลมชมพู ฉวาง (CV) นครศรีฯ, L57 = แหลมขาว คลองโยง (KY), L58 = แหลมชมพู (NW) บึงบอระเพ็ด, L59 = แหลมชมพู พุทธมณฑล (PT), L60 = แหลมชมพู สามร้อยยอด (SY), L61 = แหลมชมพู พิจิตร (PJ) (บึงสีไฟ), L62 = แหลมชมพู วัดศรีเอี่ยม (SA), L63 = จีน แหลมชมพู Taikong (C1), L64 = จีน แหลมชมพู Taikong (C3), L65 = จีน ฉัตรชมพู Taikong (C4), L66 = จีน แหลมชมพู Taikong (C5), L67 = จีน ฉัตรชมพู Hubai (C6), L68 = จีน 2551 -7 (เมล็ด), L69 = จีน 2551 -1 (เมล็ด))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)



(B)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลของการใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนทั้ง 4 ตำแหน่งทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับตัวอย่างบัวหลวงทั้งหมด 69 ตัวอย่าง พบมีเพียงหนึ่งตำแหน่งที่ให้รูปแบบของแอลลีลหรือแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน คือที่ตำแหน่งยีน *ful* (ภาพที่ 7) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค DFLP และ SSCP ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาของ กนกวรรณ แดงสวัสดิ์ และคณะ (2551) รูปแบบของแอลลีลที่พบทั้งหมดในตำแหน่ง *ful* นี้พบ 4 รูปแบบ มีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ประมาณ 1,500 คู่เบส โดยเป็นตัวอย่างที่เป็น homozygote 41 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่เป็น heterozygote 28 ตัวอย่าง และแอลลีลที่ 1 -4 มีค่าความถี่แอลลีลคือ 0.536, 0.051, 0.123 และ 0.290 ตามลำดับ

2. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับยีนและการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสภาพสายเดี่ยวในบัวหลวง

รวบรวมยีนที่สนใจที่ได้รายงานแล้วในฐานข้อมูล GenBank โดยเฉพาะยีนในบัวหลวงนำมาเปรียบเทียบกับยีนเดียวกันในพืชต่างๆ เพื่อพัฒนาไพรเมอร์ในตำแหน่งอนุรักษ์แต่ครอบคลุมบริเวณอินตรอนของยีน ซึ่งได้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะกับยีนเพิ่มอีกทั้งหมด 10 ตำแหน่ง คือ *Wx*, *AG, AOX, AP3, GP, ACC, SOD, CP, SEP1* และ *MT* พบว่าสามารถใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ชัดเจนในเจลอะกาโรส 8 ตำแหน่ง ส่วน 2 ตำแหน่งสุดท้ายให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ไม่ชัดเจน เมื่อตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (DFLP) และพบว่ารูปแบบแถบดีเอ็นเอทุกตำแหน่งมีเพียงรูปแบบเดียว (monomorphism) จากตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมด 69 ตัวอย่าง แต่เมื่อตรวจสอบในเจล non-denaturing polyacrylamide (SSCP) และเมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมดพบว่ามีเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้นที่มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ต่างกันในตัวอย่างที่ศึกษาคือตำแหน่ง *AG* ซึ่งมีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 รูปแบบ โดยมีค่า PICs คำนวณจาก 69 ตัวอย่างเท่ากับ 0.458 (ตารางที่ 6)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน *AGAMOUS-like protein* (AG) ในบัวหลวง

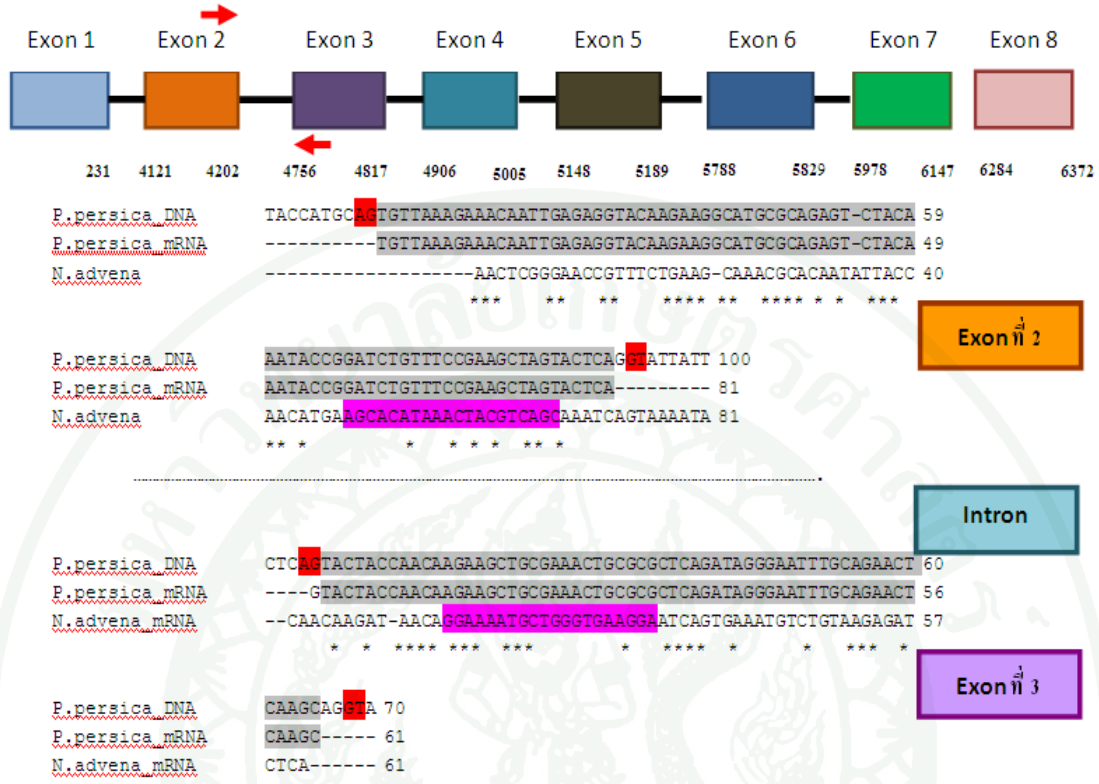
เมื่อนำข้อมูลกรดแอมิโนของยีน *AGAMOUS-like protein* (AG) ของ *Prunus persica* ใน accession nember (EU072354.1*)* และของ *Nuphar advena* ใน accession number (GU048647.1) มา align เทียบกันพบว่ามีตำแหน่งที่ conserve กันจากฐานข้อมูล GenBank จากนั้นเมื่อนำ gDNA และ cDNA ของ *Prunus persica* มา align กันโดยใช้โปรแกรม ClustalW พบว่ามีทั้งหมด 8 exon และนำมา align รวมกับ cDNA ของ *Nuphar advena* พบว่า intron ที่ 1 มีขนาดยาวประมาณ 3,871 คู่เบส ดังนั้นจึงเลือกออกแบบไพรเมอร์ครอบคลุม intron ที่ 2 ซึ่งมีความยาวประมาณ 540 คู่เบส

การออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีน *AGAMOUS-like* protein (AG) นี้ครอบคลุม exon 2-intron 2-exon 3 มี forward primer (F) คือ F 5' AGCACATAAACTACGTCAGC 3' และ reverse primer (R) คือ R 5' TCCTTCACCCAGCATTTTCC 3' มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส (ภาพที่ 9)

ยีน *Agamous-like protein* (*AG*) เป็นยีนในกลุ่ม mads-box gene เป็นกลุ่มของยีน family ที่ทำหน้าที่เป็น transcription factors โดย *Agamous-like protein* (*AG*) นี้เป็น flora homeotic gene ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนาโครงสร้างดอกตาม ABC model จัดอยู่ใน class C ทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของดอกวงในคือส่วนของเกสรตัวเมีย (carpels) แต่ถ้ามีการทำงานร่วมกับยีนในกลุ่ม B จะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของ stamen (http://en.wikipedia.org/wiki/ABC_model_of_flower_development)

หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำผลผลิต PCR ที่จำเพาะกับยีน (AS-PCR) มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอริซิสบนเจลอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (เทคนิค DFLP) จากตัวอย่างบัวหลวงทั้ง 69 ตัวอย่างพบว่าไม่มีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างตัวอย่างทั้งหมด และในเจล non-denaturing polyacrylamide (เทคนิค SSCP) พบว่ามีรูปแบบของแอลลีลที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบด้วยกัน (ภาพที่ 10)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



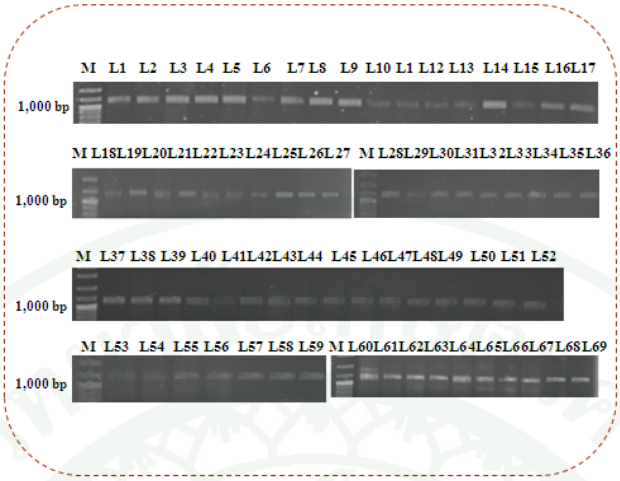
ภาพที่ 9 ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *AG* ครอบคลุม exon 2-intron 2-exon 3 มี forward primer (F) คือ F 5'AGCACATAAACTAC GTCAGC 3' และ reverse primer (R) คือ R 5'TCCTTCACCCAGCATTTTCC 3' มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

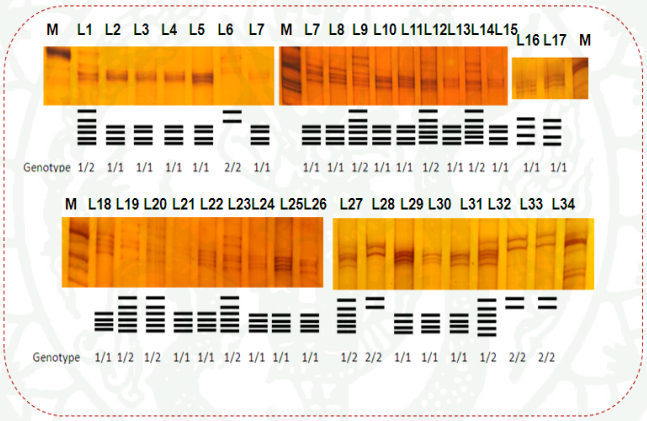
ภาพที่ 10 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัวหลวงต่างๆ ทั้งจากในประเทศ และต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับ *AGAMOUS-like* protein (*AG*) ด้วย (A) เทคนิค DFLP และ (B) เทคนิค SSCP

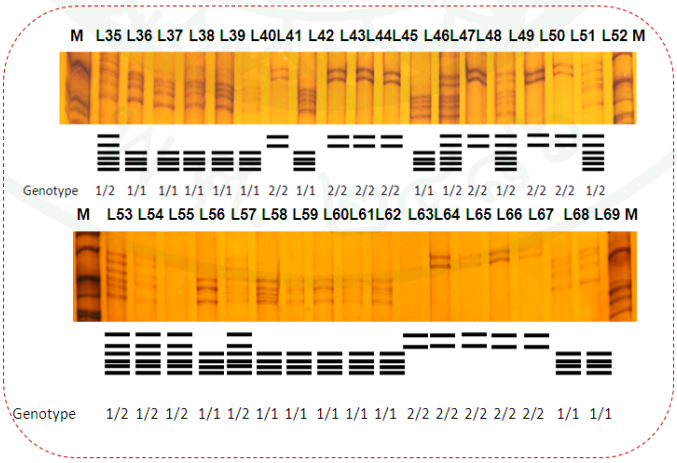
(M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน, L1 = แหลมชมพู พระราชินี, L2 = แหลมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด), L3 = แหลมชมพู พิจิตร, L4 = แหลมขาว พิจิตร, L5 = ฉัตรชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร, L6 = ฉัตรขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร, L7 = แหลมชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร, L8 = แหลมขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร, L9 = แหลมขาว คลองโยง นครปฐม, L10 = แหลมชมพู สามร้อยยอด, L11 = แหลมชมพู สระบุรี, L12 = ฉัตรชมพู สระบุรี, L13 = แหลมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด), L14 = แหลมขาว กำแพงแสน (เมล็ด), L15 = ฉัตรชมพู จตุจักร (เมล็ด), L16 = แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด), L17 = แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด), L18 = ฉัตรขาว มก., L19 = แหลมชมพู มก., L20 = บัวหลวง มก., L21 = แหลมขาว ปทุมธานี เกษตรแฟร์, L22 = แหลมชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์, L23 = ฉัตรชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์, L24 = แหลมขาว ชลบุรี, L25 = แหลมชมพู จ.พิจิตร(เมล็ด), L26 = แหลมชมพู พุทธมณฑล (เมล็ด), L27 = แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว, L28 = จีน แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว, L29 = จีน Wuhan (เมล็ด), L30 = ไต้หวัน แหลมชมพู -ต2 (เมล็ด), L31 = ไต้หวัน Hunan white -ต4 (เมล็ด), L32 = ไต้หวัน East Indian Lotus -ต6, L33 = ไต้หวัน -ต7 (เมล็ด), L34 = ไต้หวัน ฉัตรขาว -ต8 (เมล็ด), L35 = ไต้หวัน -ต9 (เมล็ด), L36 = ไต้หวัน –N1 (เมล็ด), L37 = ไต้หวัน –N6 (เมล็ด), L38 = ไต้หวัน –N7 (เมล็ด), L39 = ไต้หวัน –G2 (เมล็ด), L40 = จีน ฉัตรชมพู เหง้า, L41 = จีน ฉัตรชมพู Hubai, L42 = จีน ดอกจำปา (เมล็ด), L43 = จีน 2551-4 (เมล็ด), L44 = จีน 2551-12 (เมล็ด), L45 = จีน 2551-16 (เมล็ด), L46 = จีน แหลมชมพู วิโรจน์ 1, L47 = จีน แหลมชมพู วิโรจน์ 2, L48 = จีน แหลมชมพู Chiangxi (เมล็ด), L49 = ญี่ปุ่น ฉัตรชมพู, L50 = จีน แตงไทย 2 (เมล็ด), L51 = จีน 2551 -5 (เมล็ด), L52 = แหลมชมพู พระราชินี , L53 = แหลมขาว คลองโยง , L54 = แหลมชมพู(SR) ลาดหลุมแก้ว, L55 = แหลมชมพู (RN) เพชรบุรี, L56 = แหลมชมพู ฉวาง (CV) นครศรีฯ, L57 = แหลมขาว คลองโยง (KY), L58 = แหลมชมพู (NW) บึงบอระเพ็ด, L59 = แหลมชมพู พุทธมณฑล (PT), L60 = แหลมชมพู สามร้อยยอด (SY), L61 = แหลมชมพู พิจิตร (PJ) (บึงสีไฟ), L62 = แหลมชมพู วัดศรีเอี่ยม (SA), L63 = จีน แหลมชมพู Taikong (C1), L64 = จีน แหลมชมพู Taikong (C3), L65 = จีน ฉัตรชมพู Taikong (C4), L66 = จีน แหลมชมพู Taikong (C5), L67 = จีน ฉัตรชมพู Hubai (C6), L68 = จีน 2551 -7 (เมล็ด), L69 = จีน 2551 -1 (เมล็ด))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)





(B)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 สรุปลำดับเบสไพรเมอร์จำเพาะกับยีนที่พัฒนาและใช้ศึกษา และ Annealing temperature ไพรเมอร์ที่ได้ตรวจสอบทั้งหมด ด้วยเทคนิค DFLP และ SSCP

ชื่อยีน	อุณหภูมิ Ta (ºC)	ขนาด (คู่เบส)	ลำดับเบสของไพรเมอร์
1 *Chalcone synthase (CHS)*	57 °C	640	F 5'-TGACTACCAGCTCACCAA -3'
			R 5'-TCCGCATCTCATCCAATATG -3'
2 storage protein (*SP)*	59 °C	1,100	F 5'-GATTGAGCTTGAGCGAAGTG-3'
			R 5'-TACATCACATGGATCATATCC-3'
3 fruitfull protein *(FP)*	60 °C	1,200	F 5'-TTCTTATGCAGAGCGAGAGC -3'
			R 5'-GATTGAGATGACACCTCTGC -3'
4 ITS of *rRNA* gene	59 °C	870	F 5'-TCGCTCCTACCGATTGAATG -3'
			R 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'
5 Waxy- granule-bound	~52-55 °C	830	F 5'-TTCGGAAGACTGGCATTACTGG -3'
starch synthase			R 5'-TGACTGTGTCAACCAGTCCACC -3'
6 AOX1a-alternative	~51-55 °C	720	F 5'-TACGTAACGGGAGTACCTCG -3'
oxidase			R 5'-TACCACTTGGGCTGCGATACC -3'
7 AGAMOUS-like protein	~50-55 °C	600	F 5'-AGCACATAAACTACGTCAGC -3'
(AG) gene			R 5'-TCCTTCACCCAGCATTTTCC -3'
8 *Cu/Zn superoxide*	~52-56 °C	300	F 5'-ATTGACCCAAGAAGACGACGG -3'
dismutase (SOD)			R 5'–ATGACGGACTTCATCCTCAGG -3'
9 *glutathione peroxidase*	~52-55 °C	900	F 5'-ACGGAGCTGAGTACGCTATATG -3'
(GP)			R 5'-GTATCTGCTCATTAGTCCCTGG -3'
10 *ACC oxidase*	~53-56 °C	730	F 5'-TATAGGACCCACCTTAGGCACC -3'
			R 5'-TGCGATAGACATCCTGTTACCG -3'
11 *AP3* -MADS-box	~53-55 °C	630	F 5'-TAAGAAAGCTGCCGAACTCACC -3'
transcription factor			R 5'-CTGCTTGCTCAAATGTTCTTGC -3'
12 *cationic peroxidase*	~55-57 °C	630	F 5'-TACAAGGACTCCTGTCCTCAAGCC -3'
(CP)			R 5'-AGCTCCTATCTGTCTCCTTCTCCG -3'

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จำเพาะสำหรับยีน *AGAMOUS-like* protein (*AG*) นั้นพบ 2 รูปแบบในเทคนิค SSCP มีขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ประมาณ 1,200 คู่เบส โดยเป็นตัวอย่างที่เป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

homozygote 51 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่เป็น heterozygote 18 ตัวอย่าง และแอลลีลที่ 1 -2 มีค่าความถี่แอลลีลคือ 0.645 และ 0.355 ตามลำดับ

จากการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนทั้งหมด 10 ตำแหน่ง สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนทั้งหมด 8 ตำแหน่ง เมื่อตรวจสอบในเจล non-denaturing polyacrylamide มีเพียงตำแหน่ง *AG* เท่านั้นที่ให้ความแตกต่างกันของรูปแบบแอลลีล ส่วนอีก 7 ตำแหน่งไม่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นใน DFLP และ SSCP (ตารางที่ 6) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในบัวหลวงที่ผ่านมาได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุล SSR, ISSR ในการศึกษาความหลากหลายในบัวหลวงชนิด *nucifera* และ *lutea* รวมทั้งลูกผสมของสองชนิดพบว่ามีความใกล้ชิดกันมาก (Kubo *et al*., 2009), (Pan *et al*., 2007) ซึ่งค่าความหลากหลายที่ต่ำมากนี้อาจมีเหตุผลมาจากความหลากหลายที่ต่ำอยู่แล้วของสายพันธุ์ปลูกเอง และการขยายพันธุ์บัวหลวงก็นิยมเลือกขยายพันธุ์บัวที่มีลักษณะสวยงามหรือมีลักษณะดอกที่มีลักษณะพิเศษมีกลิ่นหอมเป็นสำคัญไว้ อีกทั้งนิยมขยายพันธุ์โดยการใช้ไหลบัวจึงทำให้อัตราการเกิดรีคอมบิเนชันต่ำกว่าที่ควรจะเป็นและการขยายพันธุ์ด้วยวิธีนี้เป็นที่นิยมมานานพอที่จะทำให้ความหลากหลายของบัวหลวงต่ำลง (Chen *et al.*, 2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 สรุปจำนวนแอลลีล ค่า PICs และขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ของยีนทั้งหมดที่ได้พัฒนาให้จำเพาะกับยีนในบัวหลวง

ยีน	ขนาด	จำนวนแอลลีล		PICs	
	(คู่เบส)	DFLP	SSCP	DFLP	SSCP
**1. storage protein* (*SP*)	1,200	1	1	0	0
**2.* ITS ของยีน *rRNA*	800	1	1	0	0
**3.Chalcone synthase* (*CHS*)	1,500	1	1	0	0
**4. fruitfull protein* (*ful*)	680	1	4	0	0.611
6.AGAMOUS-like protein (*AG*)	1,200	1	1	0	0.458
5. Waxy (*Wx*)	900	1	1	0	0
7.*ACC oxidase* (*ACC*)	500	1	1	0	0
8.*Alternativeoxidase-1a* (*AOX*)	860	1	1	0	0
9. MADS-box transcription factor AP3 (*AP3*)	500	1	1	0	0
10. Glutathion peroxidase (*GP*)	300	1	1	0	0
11. Cu/Zn superoxide dismutase (*SOD*)	600	1	1	0	0
12. cationic peroxidase (*CP*)	300	1	1	0	0

*ยีนที่พัฒนาโดย กนกวรรณ ปี 2551

จากไพรเมอร์ที่พัฒนาให้จำเพาะกับยีนในบัวหลวงทั้งหมด 14 ตำแหน่งคือ *SP*, *nr*ITS, *ful*, *CHS, Wx*, *AG* , *AOX, AP3, GP, ACC*, *SOD, CP*, *SEP1* และ *MT* ไม่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค DFLP และมีเพียงสองตำแหน่งเท่านั้นที่มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจากการศึกษาตัวอย่างในบัวหลวงทั้งหมด 69 ตัวอย่างเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SSCP ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ได้จากทั้งสองตำแหน่งนี้ นำมาสร้าง phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของตัวอย่างที่มาจากทั้งในประเทศและต่างประเทศต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การสร้าง phylogenetic tree จากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากยีนที่จำเพาะในบัวหลวง

จากไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับยีนทั้ง 12 ตำแหน่งนี้พบว่ามี 2 ตำแหน่งที่ให้ความแตกต่างของรูปแบบแอลลีลคือ ตำแหน่ง *ful* มี 4 รูปแบบแถบดีเอ็นเอ และตำแหน่ง *AG* มี 2 รูปแบบแถบดีเอ็นเอ เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ 2 ตำแหน่งรวมกันทั้ง 6 รูปแบบมาให้คะแนนในตัวอย่างที่ศึกษาทั้งในประเทศและต่างประเทศทั้งหมด 69 ตัวอย่าง มาจัดกลุ่มสร้างเป็น phylogenetic tree พบค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (Genetic similarity) อยู่ในช่วง 0.328-0.748 และการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี UPGMA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc 2.20k สามารถจำแนกบัวหลวงเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

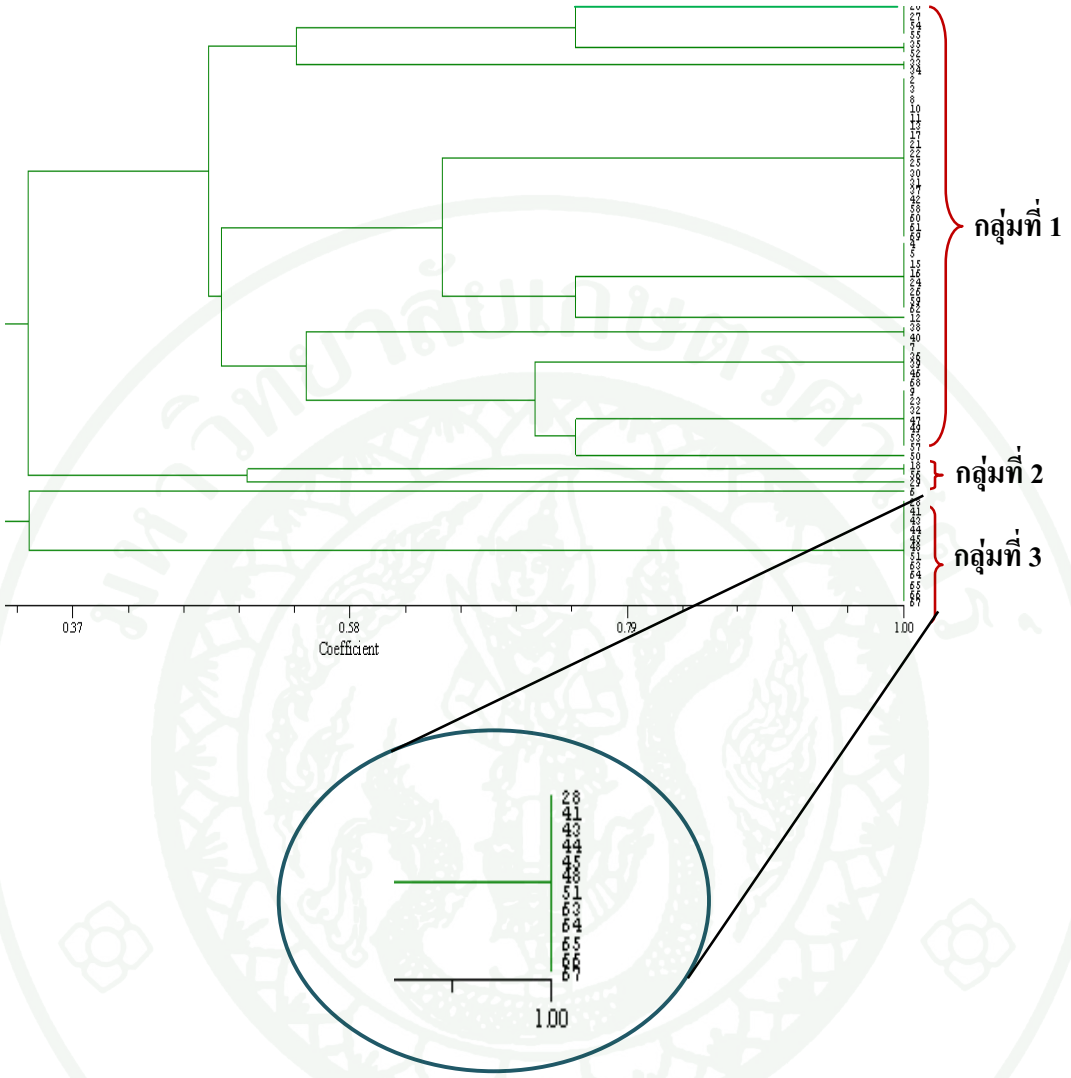
กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มตัวอย่างบัวหลวง ราชินี แหลมชมพูในไทยและไต้หวัน แหลมขาว ฉัตรชมพูในไทยและประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน และตัวอย่างบัวหลวงในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มตัวอย่างบัวหลวง ฉัตรขาว แหลมชมพู ฉวาง และ ตัวอย่างจากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน wuhan

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มตัวอย่างของบัวหลวงจากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน คือ แหลมชมพู ฉัตรชมพู Taikong และฉัตรชมพู hubai

จะเห็นได้ว่าการจัดกลุ่มตัวอย่างบัวหลวงทั้ง 69 ตัวอย่างนี้ สองกลุ่มแรกมีทั้งตัวอย่างที่มาจากทั้งในประเทศไทยและตัวอย่างจากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนและไต้หวันรวมกัน แต่ในกลุ่มที่สามเป็นกลุ่มตัวอย่างที่มาจากประเทศจีนเท่านั้นผลของการจัดกลุ่มโดยการสร้าง phylogenetic tree แสดงดังภาพที่ 11

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 phylogenetic tree ของตัวอย่างบัวหลวงทั้ง 69 สายพันธุ์ โดยตัวอย่างบัวหลวงกลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มตัวอย่างของบัวหลวงจากประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนคือ แหลมชมพู ฉัตรชมพู Taikong และฉัตรชมพู Hubai

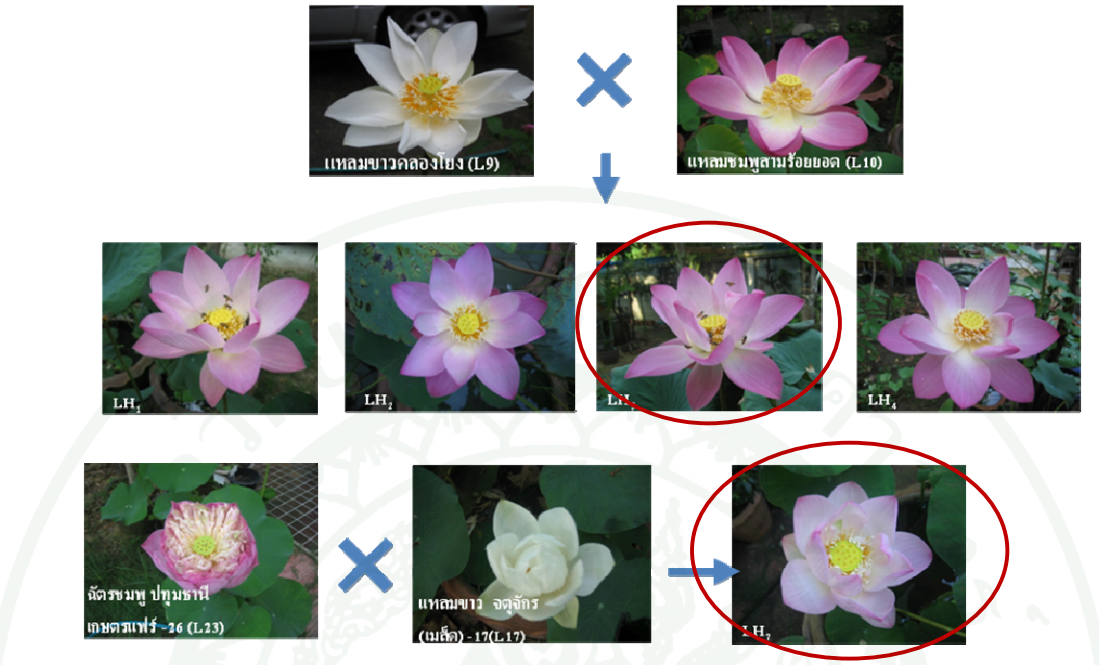
การตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน *ful* จากตารางที่ 6 จะพบว่าไพรเมอร์ในบัวหลวงที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีนทั้งหมด 12 ตำแหน่ง มีเพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้นที่เป็น polymorphic marker คือ ตำแหน่ง *ful* มีค่าความหลายหลายทางพันธุกรรม (PICs) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SSCP เท่ากับ 0.611 ส่วนยีน *AG* มีค่า PIC ของ SSCP เท่ากับ 0.458 ซึ่งมีรูปแบบของแอลลีล เพียงแค่ 2 รูปแบบเท่านั้นจึงได้เลือกคู่ไพรเมอร์ของยีน *ful* มาตรวจสอบลูกผสมในบัวหลวงเนื่องจากมีค่า PIC ที่สูงและมีรูปแบบของแอลลีลถึง 4 แอลลีล ด้วยกัน ซึ่งผลการตรวจสอบลูกผสมแสดงดังภาพที่ 12-14

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

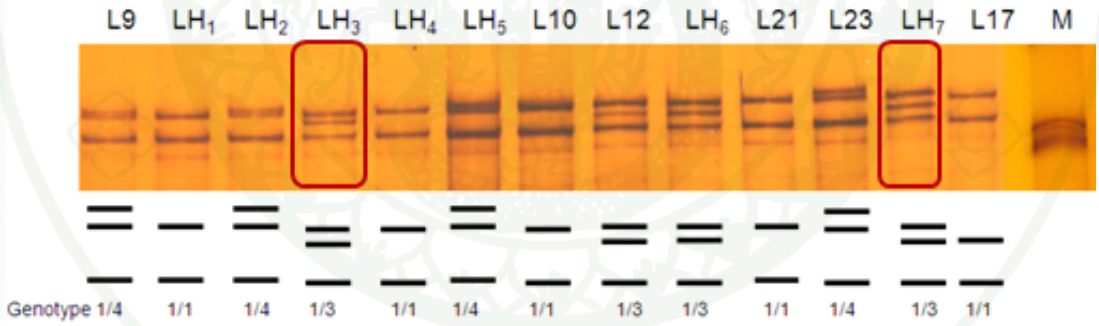
4. การตรวจสอบความเป็นลูกผสมในบัวหลวงโดยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนในบัวหลวง

เมื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมจากจำนวนลูกผสมทั้งหมด 31 สายพันธุ์ ที่มาจากการผสมของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ทั้งในและต่างประเทศ (intraspecific hybridization) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนในบริเวณ *ful* ด้วยเทคนิค SSCP พบว่าสามารถตรวจสอบและยืนยันความเป็นลูกผสมได้ 26 ตัวอย่าง ส่วนที่เหลืออีก 5 ตัวอย่างคือ ลูกผสมหมายเลข H_3, H_7, H_{10}, H_{11} และ H_{28} มีแอลลีลที่ไม่สอดคล้องกับแม่และพ่อดังภาพที่ 12, 13 และ 14 โดยลูกผสม H_3 มีจีโนไทป์ เป็น 1/3 ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างแหลมขาวคลองโยง (L9) (แม่พันธุ์) ซึ่งมีจีโนไทป์ เป็น 1/4 กับ แหลมชมพูสามร้อยยอด (L10) (พ่อพันธุ์) ซึ่งมีจีโนไทป์ เป็น 1/1 ลูกผสม H_7 มีจีโนไทป์ เป็น 1/3 ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างฉัตรชมพู ปทุมธานี (L23) (พันธุ์แม่) ซึ่งมีจีโนไทป์ เป็น 1/4 กับ แหลมขาว จตุจักร (L17) (พ่อพันธุ์) ซึ่งมีจีโนไทป์เป็น 1/1 ลูกผสม H_{10} และ H_{11} มีจีโนไทป์ เป็น 1/4 ซึ่งเป็นลูกที่มาจากการผสมตัวเองของบัวหลวงไต้หวัน ฉัตรขาว-๓8 (L34) ซึ่งมีจีโนไทป์เป็น 1/1 และลูกผสม H_{28} มีจีโนไทป์เป็น 3/4 ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง แหลมชมพู สามร้อยยอด (L60) ซึ่งมีจีโนไทป์เป็น 1/1 กับ จีน แหลมชมพู Taikong 1 (L63) ซึ่งมีจีโนไทป์ เป็น 4/4 โดยผลที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากดอกเพศเมียได้รับการผสมจากเกสรตัวผู้ของดอกอื่นก่อนที่จะได้ทดลองผสมพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)



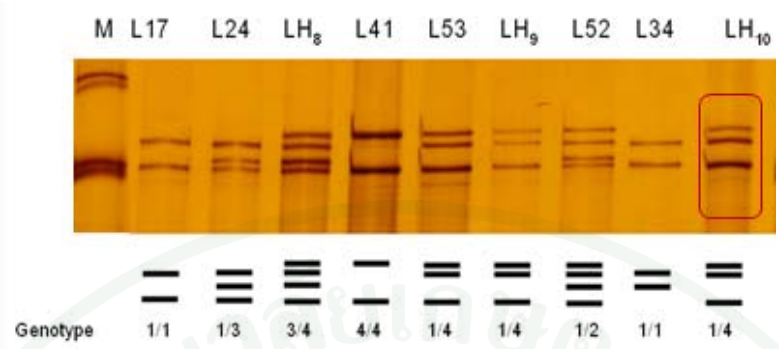
(B)

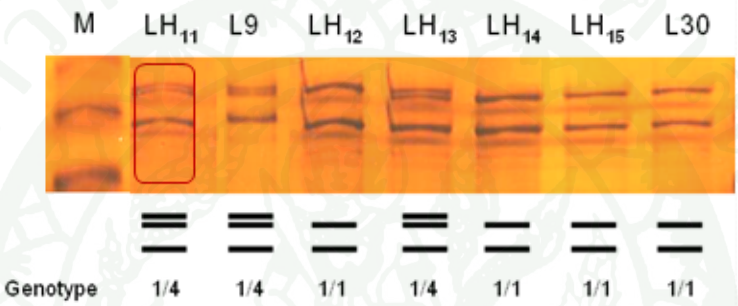
ภาพที่ 12 ลักษณะของคู่พ่อแม่ และลูกผสมหมายเลข LH_1-LH_4 และ LH_7 (ภาพ A) และรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ บริเวณ *fruitfull protein* ด้วยเทคนิค SSCP (ภาพ B) (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน) (LH_1-LH_5 เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมขาว คลองโยง (L9) x แหลมชมพู สามร้อยยอด (L10), LH_6 เป็นลูกผสมระหว่าง ฉัตรชมพู สระบุรี (L12) x แหลมขาว ปทุมธานี (L21), LH_7 เป็นลูกผสมระหว่าง ฉัตรชมพู ปทุมธานี (L23) x แหลมขาว จตุจักร (L17), รูปตัวอย่างบัวและแถบดีเอ็นเอที่ล้อมกรอบสีแดง คือตัวอย่างลูกผสมที่มีแถบดีเอ็นเอไม่สอดคล้องกับจีโนไทป์ในแม่และพ่อ)

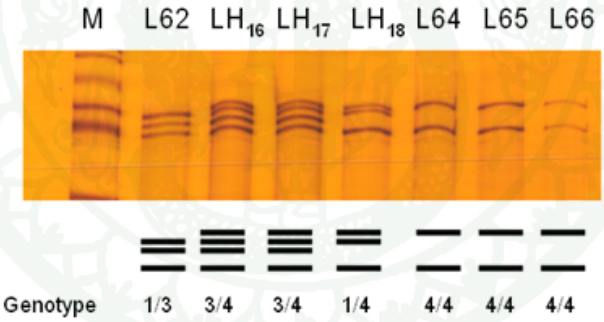
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

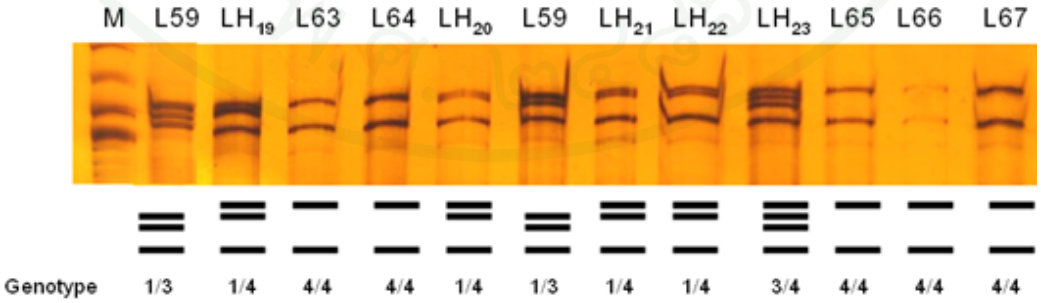
ภาพที่ 13 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ บริเวณ *fruitfull protein* ด้วยเทคนิค SSCP (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน) (LH_8 เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมขาว ชลบุรี (L24) x ฉัตรชมพู Hubai (L41), LH_9 เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมขาวคลองโยง (L53) x แหลมชมพูพระราชินี (L52), LH_{10} - LH_{11} เป็นลูกผสมระหว่าง ไต้หวัน ฉัตรขาว -ต8 (L34) x ไต้หวัน ฉัตรขาว -ต8 (L34), LH_{12} -LH_{13} เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมขาว คลองโยง (L9) x ไต้หวัน แหลมชมพู -ต2 (L30), LH_{14} -LH_{15} เป็นลูกผสมระหว่าง ไต้หวัน แหลมชมพู -ต2 (L30) x แหลมขาว คลองโยง–1 (L9), LH_{16} เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมชมพู วัดศรีเอี่ยม (L62) x จีน แหลมชมพู Taikong 3 (L64), LH_{17} เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมชมพู วัดศรีเอี่ยม (L62) x ฉัตรชมพู Taikong 4(L65), LH_{18} เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมชมพู วัดศรีเอี่ยม (L62) x จีน แหลมชมพู Taikong 5 (L66), LH_{19} เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมชมพู พุทธมณฑล (L59) x จีน แหลมชมพู Taikong 1(L63), LH_{20} เป็นลูกผสมระหว่างจีน แหลมชมพู Taikong 3 (L64) x แหลมชมพู พุทธมณฑล (L59), LH_{21} เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมชมพู พุทธมณฑล (L59) x ฉัตรชมพู Taikong C4 (L65), LH_{22} เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมชมพู พุทธมณฑล (L59) x จีน แหลมชมพู Taikong 5 (L66), LH_{23} เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมชมพู พุทธมณฑล (L59) x จีน ฉัตรชมพู Hubai C6 (L67), รูปตัวอย่างและแถบดีเอ็นเอที่ล้อมกรอบสีแดง คือตัวอย่างที่มีแถบดีเอ็นเอไม่สอดคล้องกับจีโนไทป์ในแม่และในพ่อพันธุ์ผสม)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

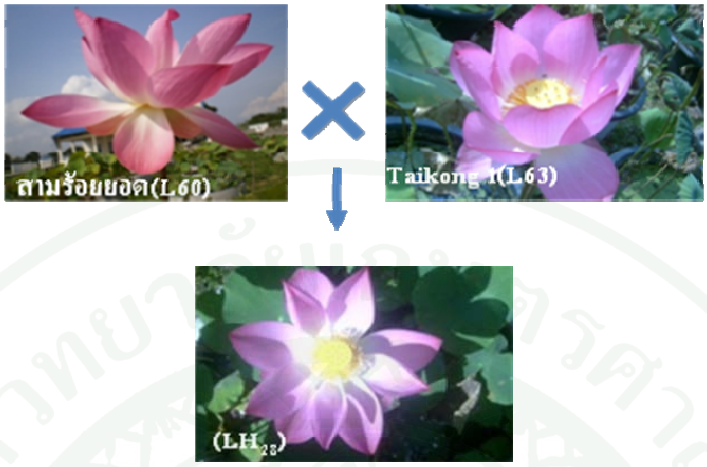




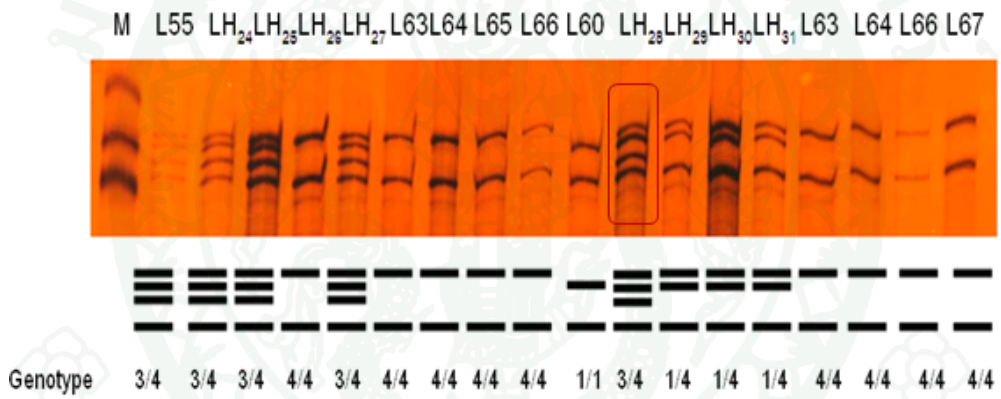




ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)



(B)

ภาพที่ 14 ลักษณะของคู่พ่อแม่ผสมและลูกผสมหมายเลข LH_{28} (A) รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ บริเวณ fruitfull protein ด้วยเทคนิค SSCP (B) (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน) (LH_{24} เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมชมพู พระราชินี (L55) x จีน แหลมชมพู Taikong 1(L63), LH_{25} เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมชมพู พระราชินี (L55) x จีน แหลมชมพู Taikong 3 (L64), LH_{26} เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมชมพู พระราชินี (L55) x ฉัตรชมพู Taikong 4 (L65), LH_{27} เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมชมพู พระราชินี (L55) x จีน แหลมชมพู Taikong 5 (L66), LH_{28} เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมชมพู สามร้อยยอด (L60) x จีน แหลมชมพู Taikong 1 (L63), LH_{29} เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมชมพู สามร้อยยอด (L60) x จีน แหลมชมพู Taikong 3 (L64), LH_{30} เป็นลูกผสมระหว่าง แหลมชมพู สามร้อยยอด (L60) x จีน แหลมชมพู Taikong 5 (L66), LH_{31} เป็นลูกผสมระหว่างแหลมชมพู สามร้อยยอด (L60) x จีน ฉัตรชมพู Hubai 6 (L67))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับยีนและการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสภาพสายเดี่ยวในบัวประดับ

รวบรวมยีนที่สนใจที่ได้รายงานแล้วในฐานข้อมูล GenBank โดยเฉพาะยีนในบัวประดับและบัวหลวงนำมาเปรียบเทียบกับยีนเดียวกันในพืชต่างๆ เพื่อพัฒนาไพรเมอร์ในตำแหน่งอนุรักษ์แต่ครอบคลุมบริเวณอินตรอนของยีนซึ่งได้ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะกับยีนทั้งหมด 6 ตำแหน่ง คือ *PI, nrITS*, *AP3*, *SEP1*, *AGL* และ *LFY* เมื่อนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่ชัดเจนในทุกตำแหน่ง เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างทั้ง 12 ตัวอย่างที่ประกอบด้วยสกุลย่อย *Nymphaea* และ *Brachyceras* โดยเทคนิค DFLP มีเพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้นที่ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 รูปแบบคือตำแหน่ง *PI* และ *LFY* ส่วนอีก 3 ตำแหน่ง ไม่พบความแตกต่างในเทคนิค DFLP เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบด้วยเทคนิค SSCP พบความแตกต่างของรูปแบบแถบดีเอ็นเอ 4 ตำแหน่งคือ *AP3, LFY, PI, SEP* และ ITS ของยีน *rRNA* ซึ่งมีค่า PICs เท่ากับ 0.219, 0.607, 0.607, 0.468 และ 0.290 ตามลำดับ ผลที่ได้แสดงในตารางที่ 7

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.1 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน *floral homeotic protein PI (PISTILLATA)* ในบัวประดับ

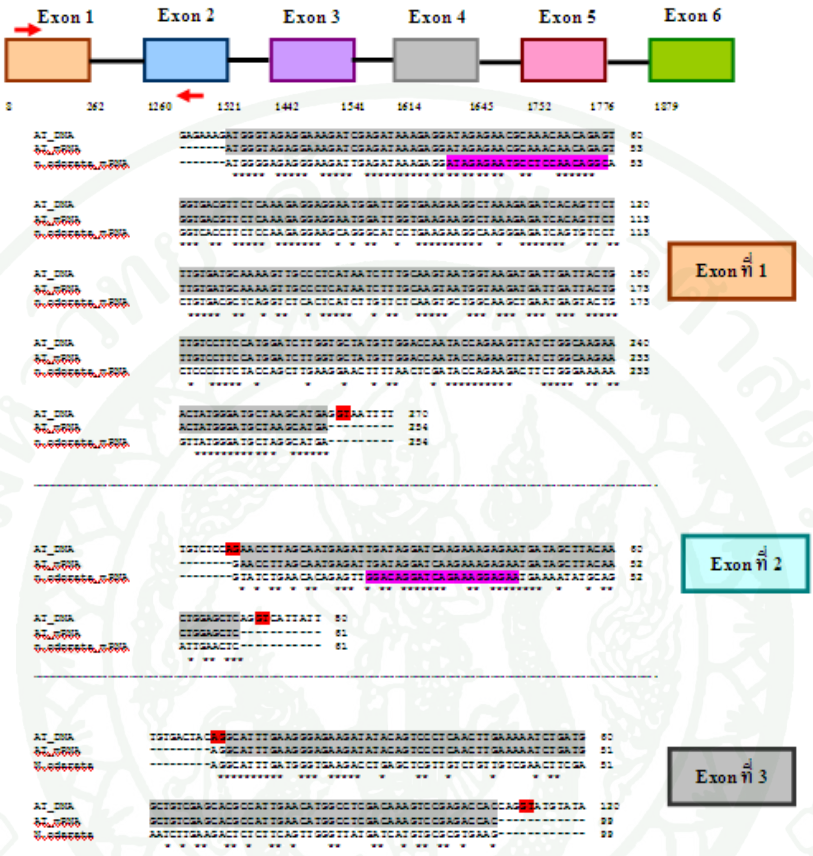
เมื่อนำข้อมูลกรดแอมิโนของยีน *floral homeotic protein* (*PI*) ของ *Arabidopsis thaliana* ใน accession number (AF115829.1) และของ *Nymphaea odorata* ใน accession number (GU048661.1) ซึ่งเป็น complete CDS มา align เทียบกันพบว่ามีตำแหน่งที่ conserve กันจากฐานข้อมูลใน GenBank จากนั้นเมื่อนำ gDNA และ cDNA ของ *Arabidopsis thaliana* มา align กันโดยใช้โปรแกรม ClustalW พบว่ามีทั้งหมด 6 exon และนำมา align รวมกับ cDNA ของ *Nymphaea odorata* เพื่อออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีน *PI* นี้ครอบคลุม exon 1-intron 1-exon 2 มี forward primer (F) คือ F 5’ATAGAGAATGCCTCCAACAGGC 3’ และ reverse primer (R) คือ R5’CATTCTCCTTTCTGATCCTGTCC 3’มีขนาดประมาณ 1,260 คู่เบส

ยีน *PI* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของดอกตาม ABC model ยีนนี้จัดอยู่ในกลุ่ม B ที่จะทำหน้าที่ร่วมกับยีนในกลุ่ม A เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาของกลีบดอก และทำงานร่วมกับยีนในกลุ่ม C เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาของก้านเกสรเพศผู้ (Samipak, 2009)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Arabidopsis thaliana ใน accession number (AF115829.1)



ภาพที่ 15 ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *PI* ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก genomic DNA ของ *Arabidopsis thaliana* (AF115829.1) และ cDNA ของบัวประดับ และ *Arabidopsis thaliana*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.2 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน *Apetala* (*AP3*) ในบัวประดับ

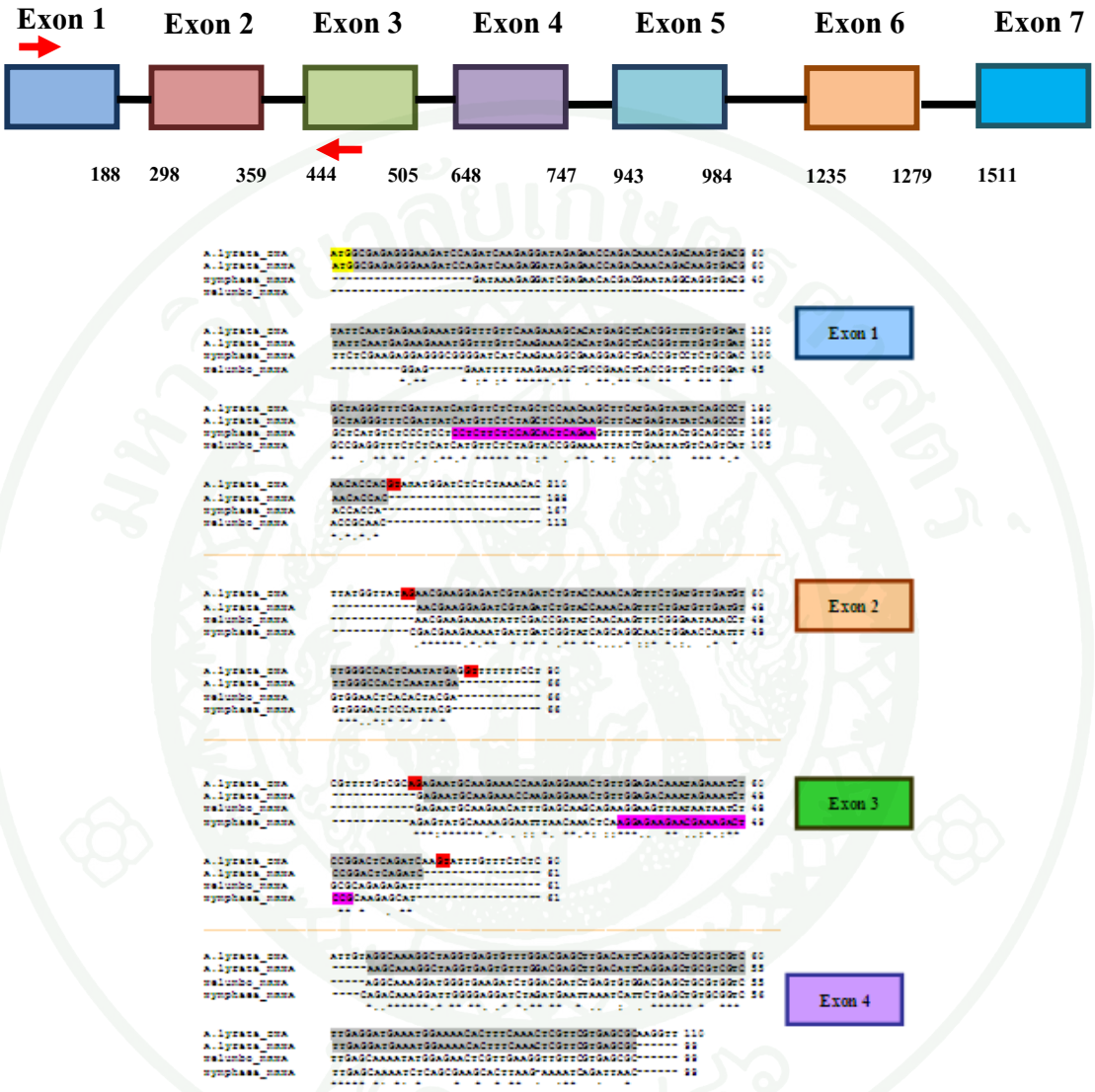
เมื่อนำข้อมูลกรดแอมิโนของยีน *apetala3* (*AP3*) ของ *Arabidopsis lyrata* ใน accession nember (AF143380.1) ซึ่งเป็น complete cds, *Nymphaea odorata* ใน accession nember (GU048660.1) และของ *Nelumbo nucifera* ใน accession number (DQ453775.1) ซึ่งเป็น partial CDS มา align เทียบกันพบว่า กรดแอมิโนของ *Arabidopsis lyrata, Nelumbo nucifera* และ *Nymphaea odorata* มีตำแหน่งที่ conserve กันจากฐานข้อมูลใน GenBank จากนั้นเมื่อนำ gDNA และ cDNA ของ *Arabidopsis lyrata* มา align กันโดยใช้โปรแกรม ClustalW พบว่ามีทั้งหมด 7 exon และนำมา align กับ cDNA ของ *Nelumbo nucifera* และ cDNA ของ *Nymphaea odorata* เพื่อออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีน *AP3* นี้ครอบคลุม exon 1-intron 1-exon 2-intron 2-exon 3 มี forward primer (F) คือ F 5' CCTCTTCTCCAGCACTCAGAA 3' และ reverse primer (R) คือ R 5' CGGAGTCTTTCGTTCTTCTCCT 3' มีขนาดประมาณ 630 คู่เบส

ยีน *AP3* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของดอกตาม ABC model ยีนนี้จัดอยู่ในกลุ่ม B ที่จะทำงานร่วมกับกลุ่ม A ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาของกลีบดอก และทำงานร่วมกับกลุ่ม C ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาของก้านเกสรเพศผู้ การแสดงอกของยีนในกลุ่มนี้จะเกิดขึ้นในระยะที่ 2 ของเซลล์ primordial สร้างวงที่ 2 และ 3 ของดอก (Busch *et al.*, 1999)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Arabidopsis lyrata ใน accession nember (AF143380.1)



ภาพที่ 16 ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *AP3* ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก genomic DNA ของ *Arabidopsis lyrata* (AF143380.1) และ cDNA ของบัวหลวง บัวประดับ และ *Arabidopsis lyrata*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.3 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน *AGL* ในบัวประดับ

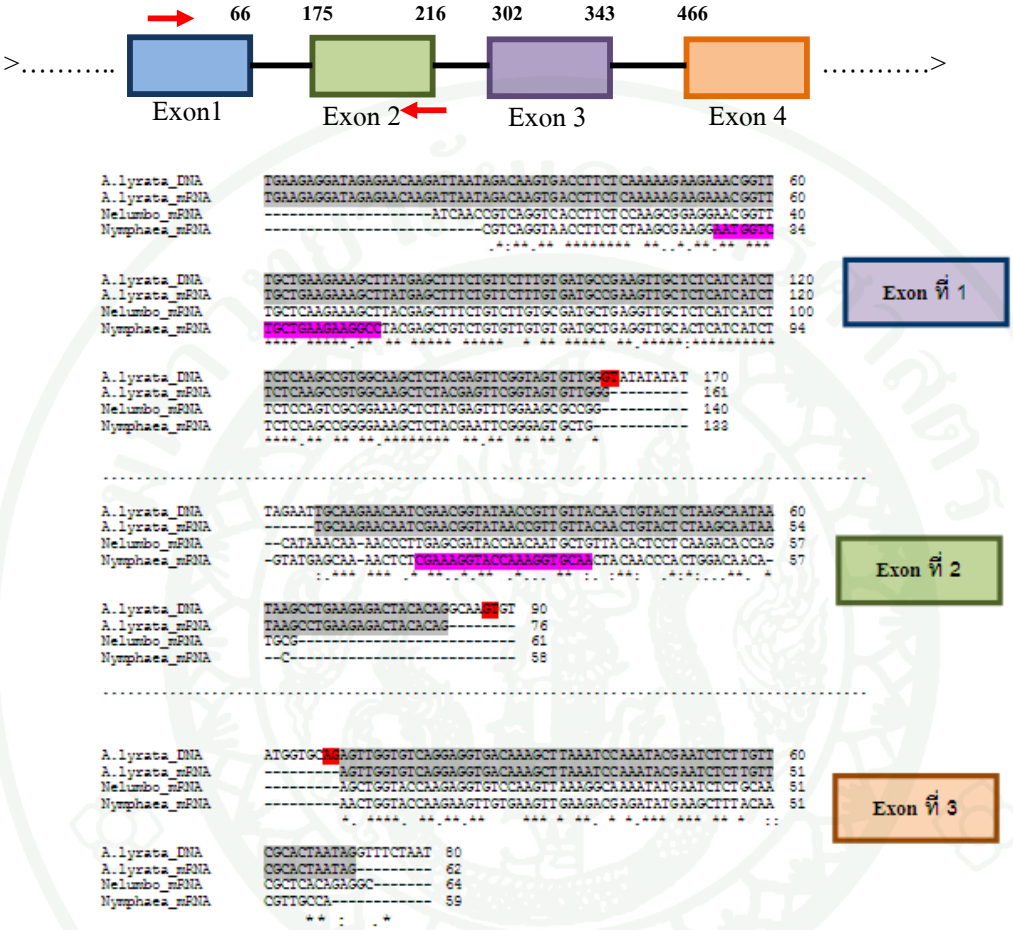
เมื่อนำข้อมูลกรดแอมิโนของยีน *AGAMOUS-like protein* (*AGL*) ของ *Arabidopsis lyrata* ใน accession nember (GQ117273.1), *Nymphaea odorata* ใน accession number GU048659.1 และของ *Nelumbo nucifera* ใน accession number (GU048640.1) ซึ่งเป็น partial CDS ทั้งหมดนำมา align เทียบกันพบว่า กรดแอมิโนของ *Arabidopsis lyrata, Nelumbo nucifera* และ *Nymphaea odorata* มีตำแหน่งที่ conserve กันจากฐานข้อมูลใน GenBank จากนั้นเมื่อนำ gDNA และ cDNA ของ *Arabidopsis lyrata* มา align กันโดยใช้โปรแกรม ClustalW พบว่ามีทั้งหมด 8 exon และนำมา align รวมกับ cDNA ของ *Nelumbo nucifera* และ *Nymphaea odorata* เพื่อออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีน *AGL* นี้ครอบคลุม exon 1-intron 1-exon 2 มี Forward primer (F) คือ 5' AATGGTCTGCTGAAGAAGGCC 3' และ reverse primer (R) คือ 5'TTGCACCTTTGGTACCTTTCG 3' มีขนาดประมาณ 840 คู่เบส

ยีน *AG* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของดอกตาม ABC model ยีนนี้จัดอยู่ในกลุ่ม C ที่จะทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของก้านเกสรเพศเมียซึ่งการแสดงออกของยีนนี้จะมีการแสดงออกที่ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญบริเวณ center of floral primordial ในช่วงเวลาที่จะมีการสร้างเกสรเพศเมียและก้านเกสรเพศผู้ เท่านั้น จากการศึกษาของ Toshiro พบว่าการพัฒนาโครงสร้างของก้านเกสรเพศผู้ในระยะการพัฒนาเป็นเกสรเพศผู้ที่สมบูรณ์นั้น ถูกควบคุมโดยการทำงานของ *AG* ผ่านทางกลการทำงานของเอนไซม์ lipid-derived phytohormone jasmonic acid (JA) (Ito *et al.*, 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Arabidopsis lyrata ใน accession nember (GQ117273.1)



ภาพที่ 17 ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *AGL* ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก genomic DNA ของ *Arabidopsis lyrata* (GQ117273.1) และ cDNA ของบัวหลวง บัวประดับ และ *Arabidopsis lyrata*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

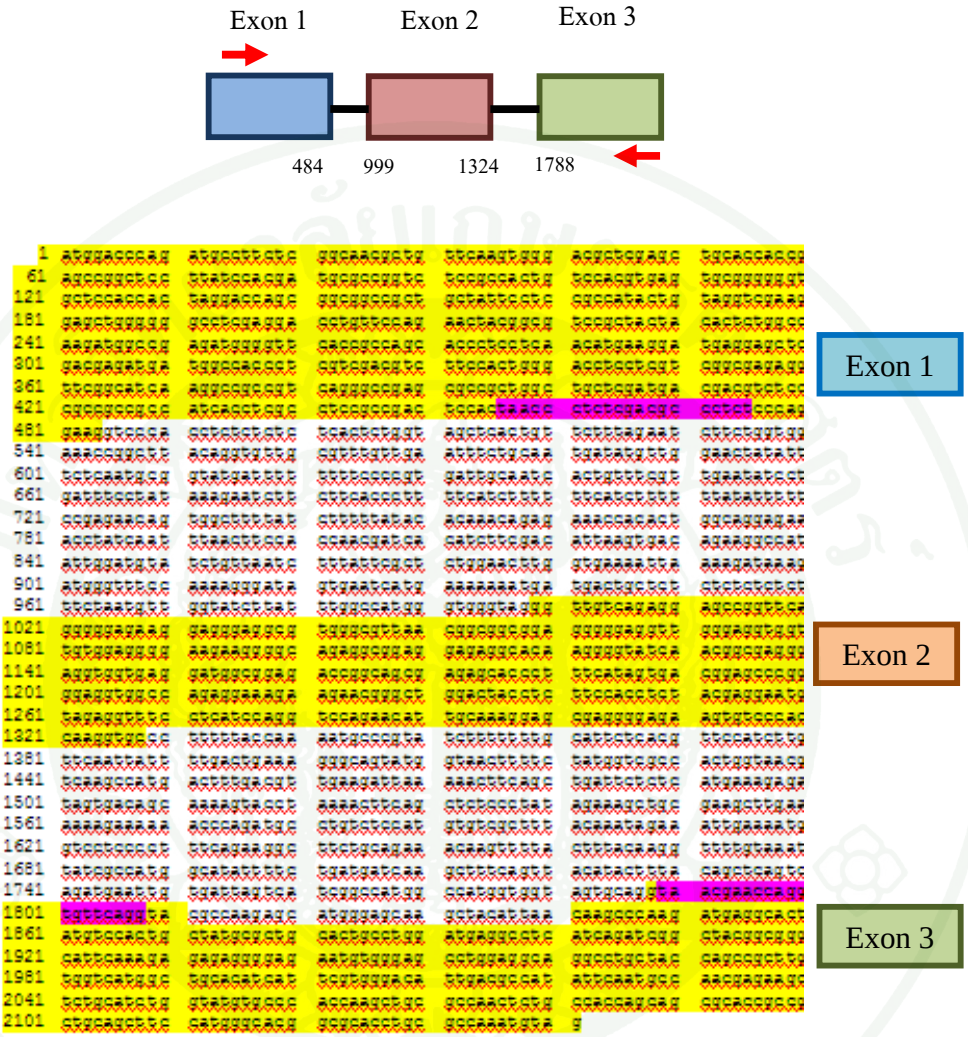
5.4 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน *LFY* ในบัวประดับ

เมื่อนำข้อมูล gDNA ของยีน *Leafy* protein (*LFY*) ของ *Nymphaea odorata* ใน accession nember (AF105110.1) ซึ่งเป็น complete CDS มาออกแบบไพรเมอร์โดยครอบคลุม exon 1-intron 1-exon 2-intron 2-exon 3 มี forward primer (F) คือ 5' TAACCCTCTCGACGCCCTCT 3' และ reverse primer (R) คือ 5' CCTGAACACCTGGTTCGTTA 3' มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส

ยีน *Leafy protein* (*LFY*) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของดอกตาม ABC model ยีนนี้จัดอยู่ในกลุ่ม C ที่จะทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของส่วนเกสรเพศเมียโดย *LFY* นี้เป็น transcription factor เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของดอก จะควบคุมให้เกิดการสร้างดอกที่เนื้อเยื่อเจริญแทนใบและยอด ซึ่งมีการแสดงออก ที่จำเพาะกับบริเวณที่จะถูกพัฒนาไปเป็นดอกเท่านั้น โดยทำงานร่วมกับ ยีนในกลุ่มอื่นๆ เช่น *AG* ซึ่ง *LFY* เป็นตัวส่งเสริมการทำงานของ *AG* (Busch, 1999)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nymphaea odorata ใน accession nember (AF105110.1)



ภาพที่ 18 ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *LFY* ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก genomic DNA ของ *Nymphaea odorata* (AF105110.1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.5 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน *Sepallata* ในบัวประดับ

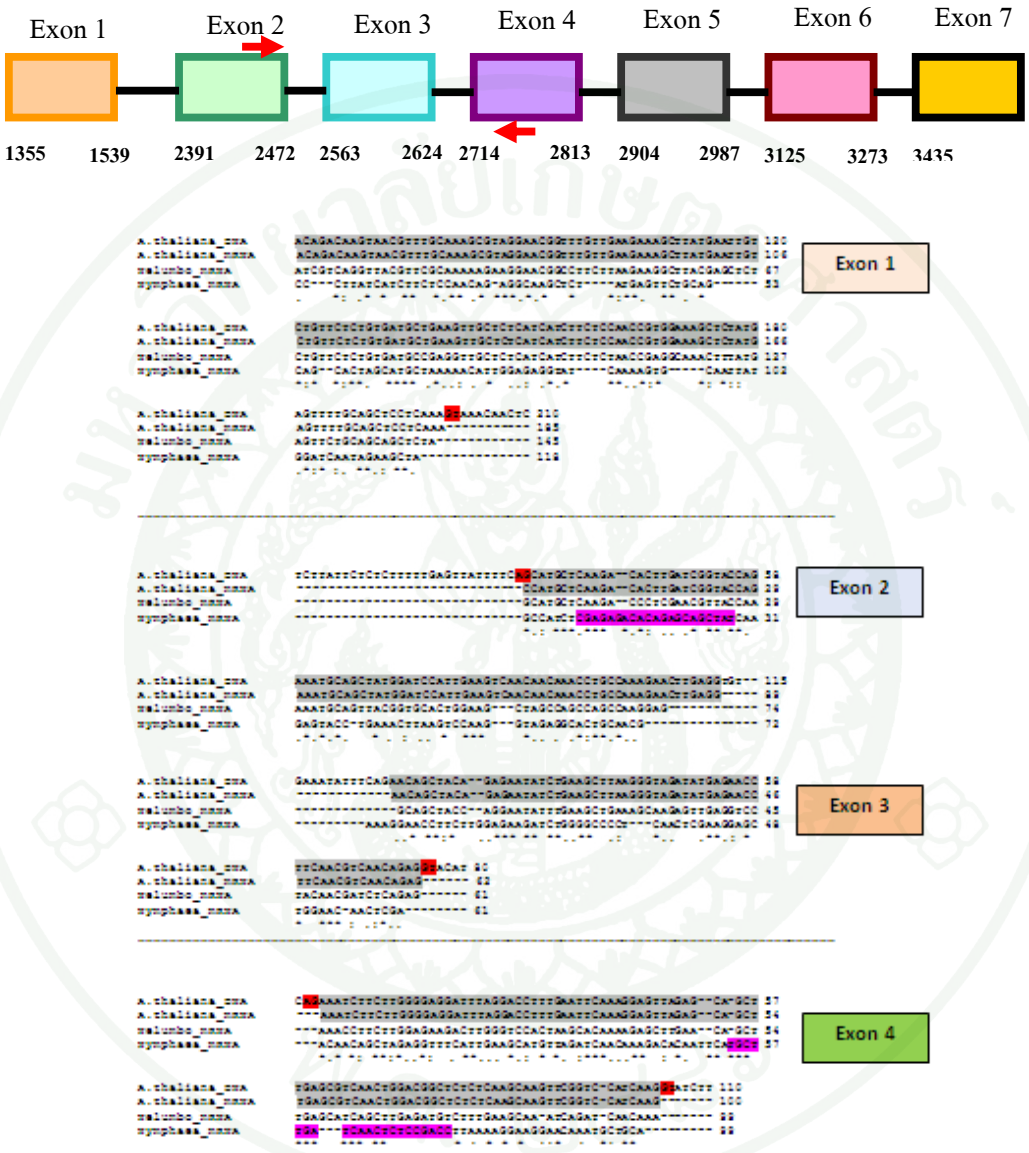
เมื่อนำข้อมูลกรดแอมิโนของยีน SEPALLATA1 (*SEP1*) ของ *Arabidopsis thaliana* ใน accession nember (AY727578.1) ซึ่งเป็น complete cds, *Nymphaea odorata* ใน accession nember (GU048658.1) และของ *Nelumbo nucifera* ใน accession number (GU048641.1) ซึ่งเป็น partial cds มา align เทียบกันพบว่า กรดแอมิโนของ *Arabidopsis thaliana, Nelumbo nucifera* และ *Nymphaea odorata* มีตำแหน่งที่ conserve กันจากฐานข้อมูลใน GenBank จากนั้นเมื่อนำ gDNA และ cDNA ของ *Arabidopsis thaliana* มา align กันโดยใช้โปรแกรม ClustalW พบว่ามีทั้งหมด 7 exon และนำมา align รวมกับ cDNA ของ *Nymphaea odorata* และ *Nelumbo nucifera* เพื่อออกแบบไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อยีน *SEP1* นี้ครอบคลุม exon 2-intron 2-exon 3-intron 3-exon 4 มี forward primer (F) คือ F 5'CGAGAGACACAGAGCAGCTAT 3' และ reverse primer (R) คือ R 5' GGTCGGAGAGTTGATCAAGCA 3' มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส

SEP1 เป็นยีนที่เหนี่ยวนำให้เกิดการพัฒนาส่วนต่างของดอก เช่น โครงสร้างของ กลีบดอก ส่วนของเกสรเพศผู้ ส่วนของเกสรเพศเมีย รวมทั้งมีบทบาทในการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนในกลุ่ม B และ C (Samipak, 2009)

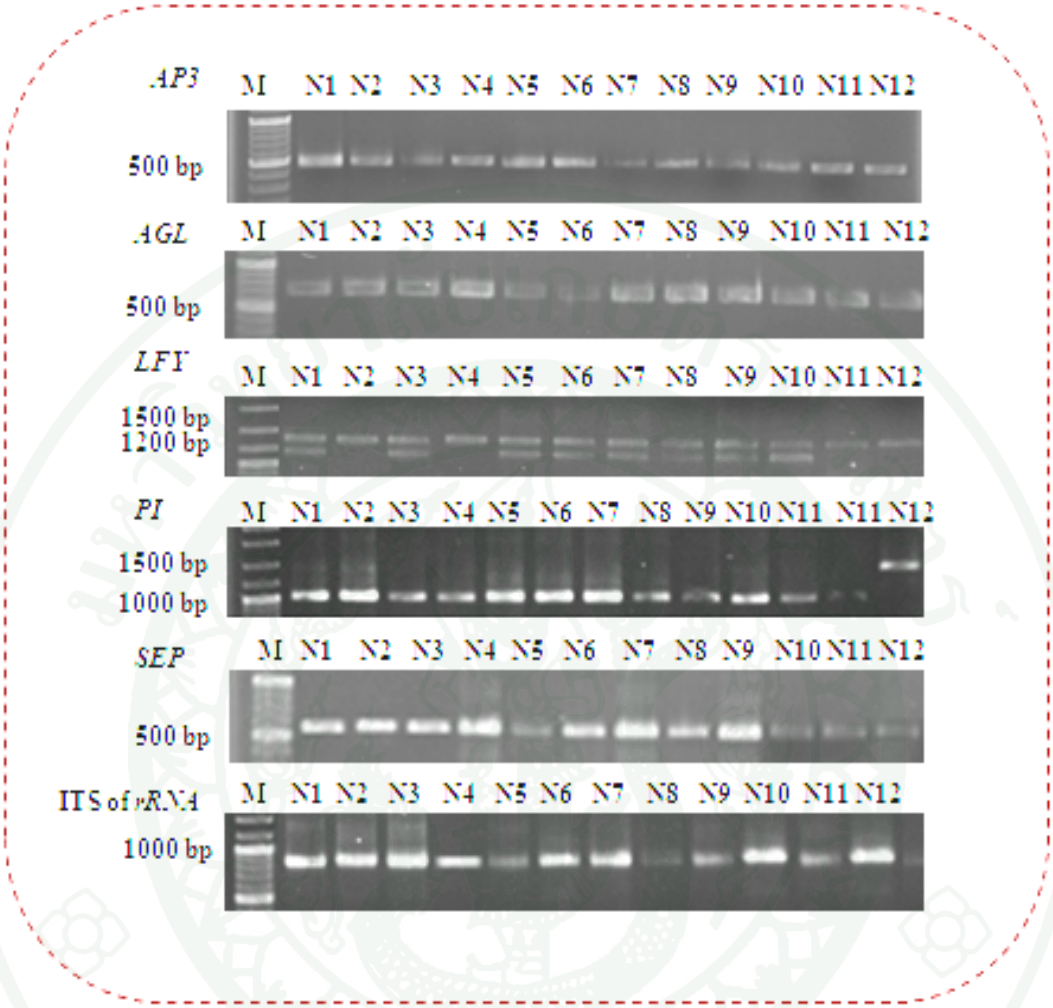
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Arabidopsis thaliana ใน accession nember (AY727578.1)



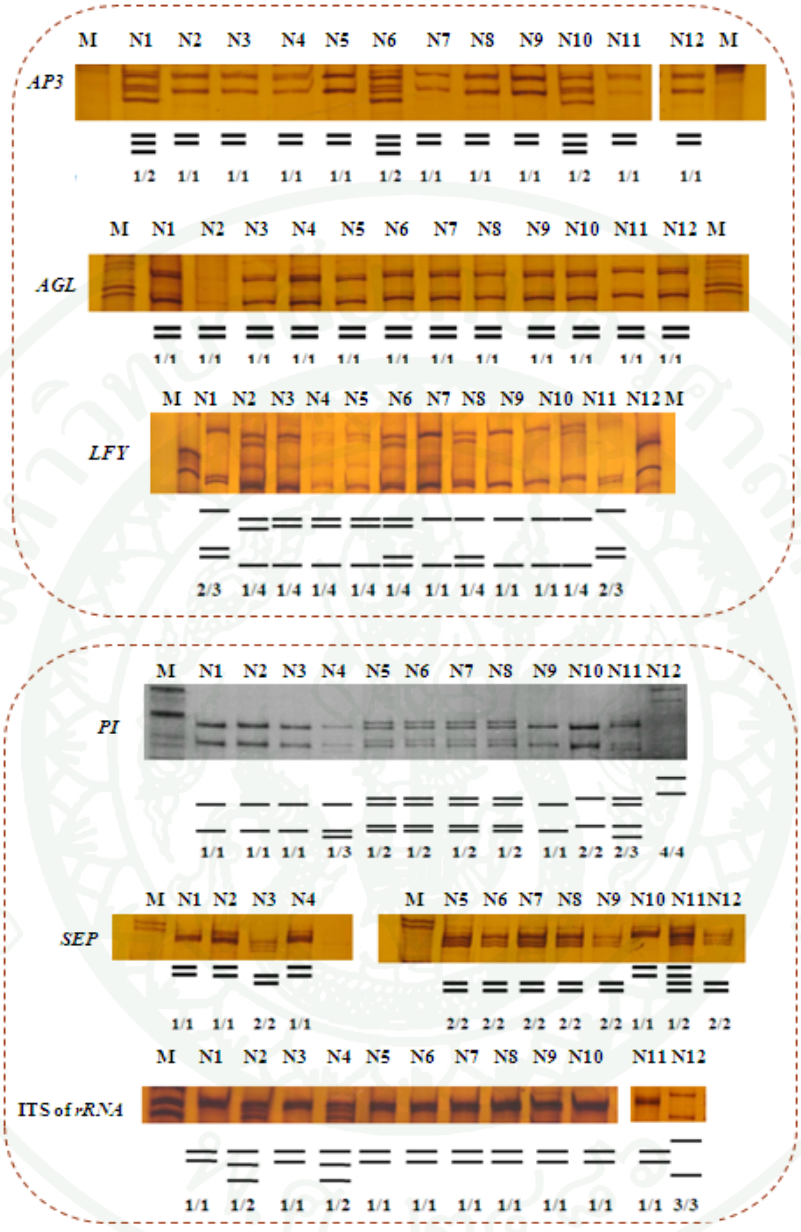
ภาพที่ 19 ตำแหน่ง และลำดับเบสของ forward และ reverse primers ที่ออกแบบจำเพาะกับยีน *SEP1* ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสจาก genomic DNA ของ ของ *Arabidopsis thaliana* (AY727578.1) และ cDNA ของบัวหลวง, บัวประดับ และ *Arabidopsis thaliana*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 20 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัวประดับตัวอย่างต่างๆ ทั้งจากในประเทศและต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *AP3, AGL, LFY, PI, SEP1* และ ITS ของยีน *rRNA* ด้วย เทคนิค AS-PCR (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (*Nymphaea* 'Mayla' (N1), *N.* 'Tanpong' (N2), *N.* 'Siam Jasmine' (N3), *N.* 'Madame Wilfron Gonnère' (N4), *N.* 'Miss Siam' (N5), *N.* 'Supranee Pink' (N6), *N.* 'Pink Ribbon' (N7), *N.* 'Prapunt White' (N8), *N.* 'Perry's Fire Opal'(N9), *N.* 'Tan-khwan'(N10), *N.* 'Sirius'(N11) และ *N.* 'Nankwak blue'(N12))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 21 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัวประดับตัวอย่างต่างๆ ทั้งจากในประเทศและต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *AP3, AGL, LFY, PI, SEP 1* และ ITS ของยีน *rRNA* ด้วย เทคนิค SSCP (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน) (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (*Nymphaea* ‘Mayla’ (N1), *N.* ‘Tanpong’ (N2), *N.* ‘Siam Jasmine’ (N3), *N.* ‘Madame Wilfron Gonnère’ (N4), *N.* ‘Miss Siam’ (N5), *N.* ‘Supranee Pink’ (N6), *N.* ‘Pink Ribbon’ (N7), *N.* ‘Prapunt White’ (N8), *N.* ‘Perry's Fire Opal’(N9), *N.* ‘Tan-khwan’(N10), *N.* ‘Sirius’(N11) และ *N.* ‘Nankwak blue’(N12))

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ความถี่ของแอลลีลในแต่ตำแน่งที่ได้ศึกษาในบัวประดับ และจำนวน homozygote และ heterozygote ในตัวอย่างบัวประดับด้วยเทคนิค SSCP

ยีน/รูปแบบแอลลีล	ความถี่ของแอลลีล	Homozygote	Heterozygote
Apetala 3(AP3)		9	3
แอลลีล 1	0.875		
แอลลีล 2	0.125		
Leafy protein (LFY)		3	9
แอลลีล 1	0.542		
แอลลีล 2	0.083		
แอลลีล 3	0.083		
แอลลีล 4	0.292		
Pistillata (PI)		6	6
แอลลีล 1	0.542		
แอลลีล 2	0.292		
แอลลีล 3	0.083		
แอลลีล 4	0.083		
Sepallata (SEP1)		11	1
แอลลัล 1	0.375		
แอลลีล 1	0.625		
ITS ของ *nrRNA*		9	3
แอลลีล 1	0.834		
แอลลีล 2	0.083		
แอลลีล 3	0.083		

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ของยีนที่พัฒนาให้จำเพาะกับยีนในบัวประดับทั้งหมดรวมถึงจำนวนแอลลีลและค่า PICs

ยีน	ขนาด (bp)	จำนวนแอลลีล		PICs	
		DFLP	SSCP	DFLP	SSCP
1. *Apetala 3 (AP3)*	500	1	2	0	0.219
2. *AGAMOUS-like protein 6(AGL)*	600	1	1	0	0
3.*Leafy protein (LFY)*	1,200 และ 1,500	2	4	0.444	0.607
4.*Pistillata (PI)*	1,200 และ 1,500	2	4	0.152	0.607
5. *Sepallata (SEP)*	600	1	2	0	0.468
6. ITS ของ *rnRNA*	840	1	3	0	0.290

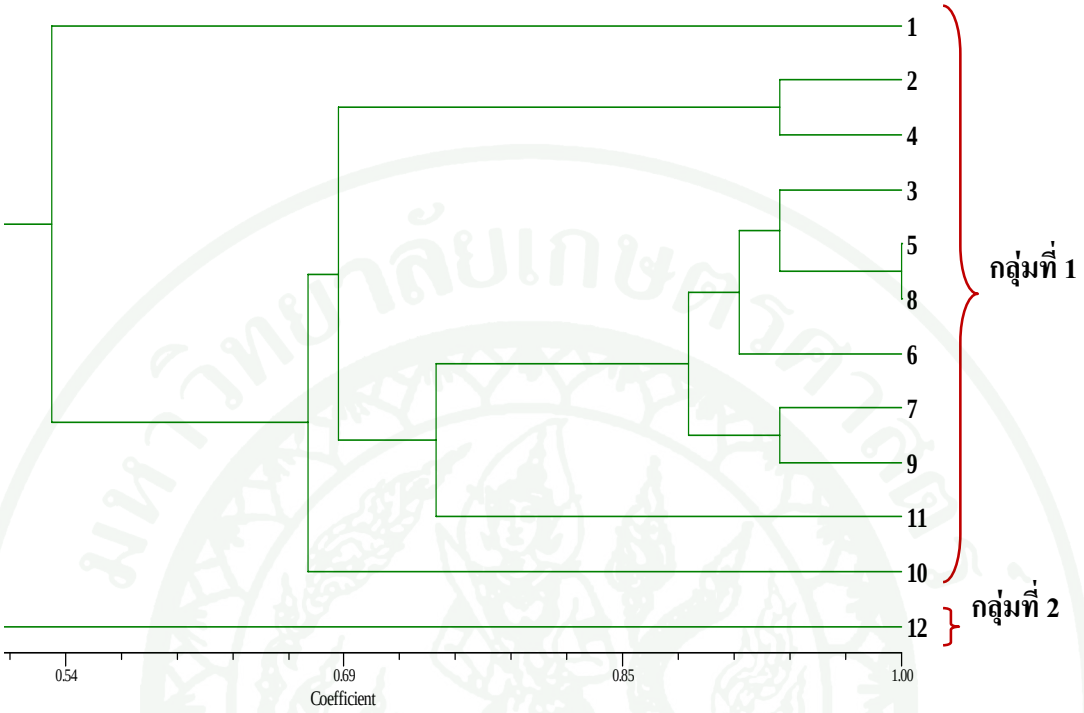
6. การสร้าง phylogenetic tree จากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากยีนที่จำเพาะในบัวประดับ

จากไพรเมอร์ที่ออกแบบจำเพาะกับยีนทั้ง 6 ตำแหน่งนี้พบว่ามี 2 ตำแหน่งที่ให้ความแตกต่างของรูปแบบแอลลีลในเทคนิค DFLP คือ ตำแหน่ง *Leafy protein (LFY)* และ *Pistillata (PI)* มี 5 ตำแหน่งที่ให้ความแตกต่างของแอลลีลในเทคนิค SSCP คือ *Apetala 3 (AP3), AGAMOUS-like protein 6 (AGL), Leafy protein (LFY), Pistillata (PI), Sepallata (SEP)* และ ITS ของยีน *rRNA* รูปแบบแถบดีเอ็นเอทุก ตำแหน่ง รวมกันทั้งหมด 15 รูปแบบได้มาให้คะแนนในตัวอย่างบัวประดับที่ศึกษาทั้งในประเทศและต่างประเทศทั้งหมด 12 ตัวอย่าง มาจัดกลุ่มสร้างเป็น phylogenetic tree พบค่าความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.333-0.933 และการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี UPGMA ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS-pc เวอร์ชั่น 2.20k สามารถจำแนกบัวประดับเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มตัวอย่างบัวประดับที่เป็นบัวฝรั่ง ได้แก่ *Nymphaea* ‘Mayla’ (N1), *N.* ‘Madame Wilfron Gonnère’ (N4), *N.* ‘Perry's Fire Opal’ (N9), *N.* ‘Sirius’(N11) และบัวประดับที่เป็นลูกผสมระหว่างบัวฝรั่ง ได้แก่ *N.* ‘Tanpong’ (N2), *N.* ‘Siam Jasmine’ (N3), *N.* ‘Miss Siam’ (N5), *N.* ‘Supranee Pink’ (N6), *N.* ‘Pink Ribbon’ (N7), *N.* ‘Prapunt White’ (N8), และ *N.* ‘Tan-khwan’(N10)

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของตัวอย่างบัวประดับสกุลย่อย *Brachyceras* คือ นางกวักฟ้าใบลาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

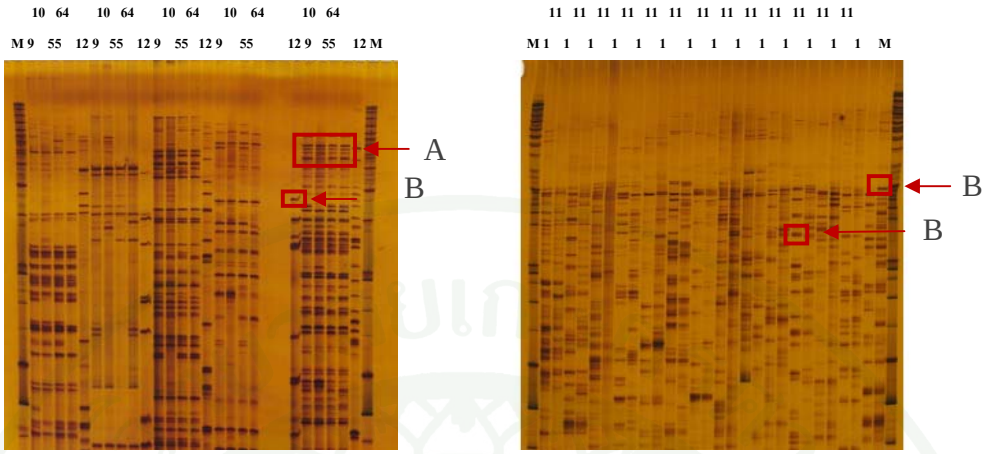


ภาพที่ 22 phylogenetic tree ของพันธุ์บัวประดับทั้ง 12 สายพันธุ์ และตัวอย่างบัวประดับกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นตัวอย่างของบัวนางกวักฟ้าใบลาย *N.* 'Nankwak blue' สกุลย่อย *Brachyceras*

7. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลให้จำเพาะกับพันธุ์โดยเทคนิค SCAR

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมในบัวประดับและบัวหลวงนั้น นอกจากพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีนแล้วยังศึกษาตำแหน่งของเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับพันธุ์ด้วย โดยศึกษาความจำเพาะกับพันธุ์บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* และ *Brachyceras* จากเทคนิค AFLP แสดงดังภาพที่ 23

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A) (B)

ภาพที่ 23 รูปแบบของดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP ในตัวอย่างบัวหลวง และบัวนางกวักฟ้า (ภาพ A) (9 = แหลมขาว คลองโยง นครปฐม, 10 = แหลมชมพู สามร้อยยอด ประจวบฯ, 55 = แหลมชมพู พระราชินี (RN) เพชรบุรี, 64= จีน แหลมชมพู Taikong (C3) กวางฉาง , 12= *N. Nangkwak blue*) (คู่ไพรเมอร์ E-ACC/M-CTC, E-ACG/ M-CTC, E-ACT/ M-CTC, E-AGC/ M-CTC, และ E-AGG/ M-CTC) และรูปแบบของดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP ในบัวประดับ (ภาพ B) (1 = *N. Mayla* และ 11= *N. Sirius*) (คู่ไพรเมอร์ E-AAC/ M-CAA, E-AAC/M-CAG, E-AAC/M-CAT, E-AAC/M-CTA, E-AAC/M-CTC, E-AAC/M-CTG, E-AAC/M-CTT, E-ACC/ M-CAA, E-ACC/ M-CAG, E-ACC/M- CAT, E-ACC/ M-CTA, E-ACC/ M-CTC, E-ACC/ M-CTG, E-ACC/ M-CTT) เพื่อตัดแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับพันธุ์นำมาพัฒนา SCAR marker

จากการศึกษาแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP จากตัวอย่างที่เป็นบัวหลวง (9, 10, 55, 64) พบว่าแถบดีเอ็นเอที่เข้มพอที่สามารถนำมาตัดออกจากเจลแล้วนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้อีกครั้งนั้น (re-amplification) มักจะเป็นตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่เป็น monomorphic marker (ภาพที่ 23 กรอบ A ในรูป A) ส่วนในบัวประดับพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์ในบัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* และสกุลย่อย *brachyceras* (ภาพที่ 23 กรอบ B ในรูป A และ B) ซึ่งสามารถหาลำดับเบสได้ทั้งหมด 13 ตำแหน่ง เมื่อนำไป Blast ด้วย nucleotide blast ในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้นที่ตรงกับยีนที่ได้รายงานลำดับเบสในฐานข้อมูลแล้วนั่นคือ ตำแหน่งที่ตัดมาจากคู่ไพรเมอร์ E-AAC/M-CAT_N ซึ่งเป็นจีโนมคลอโรพลาสต์ ของ *Nymphaea alba* (AJ627251.1) (ภาคผนวกที่ 1) สามารถนำมายืนยันความเป็นลูกผสมโดยตรวจสอบยีนที่อยู่นอกนิวเคลียสซึ่งมีการถ่ายทอดแบบ maternal inheritance ควบคู่กับยีนที่อยู่ในนิวเคลียสได้ และสามารถออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมด 6

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตำแหน่ง คือ E-AAC/M-CAT_N, E-AAC/M-CTA_N*, E-AAG/M-CAT_N*, E-ACA/M-CTG_N*, E-AGC/M-CAG_N* และ E-AGG/M-CAT_B* ลำดับเบส และค่าอุณหภูมิ annealing แสดงดังตารางที่ 9

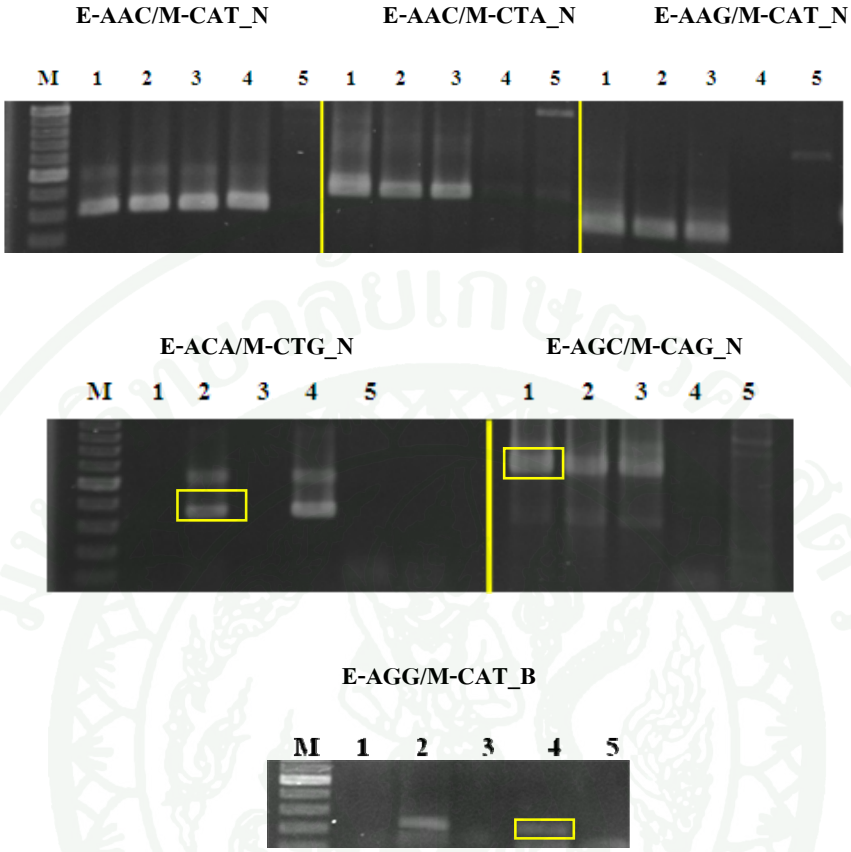
ตารางที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พัฒนาจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP ทั้ง 6 ตำแหน่ง

ชื่อยีน	อุณหภูมิ Ta (ºC)	ขนาด (คู่เบส)	ลำดับเบสของไพรเมอร์
E-AAC/M-CAT_N*	57 °C	306	F 5' GGATGATCTGTACTAGACGAT 3'
			R 5' GGATATTACAATGAGGAGCA 3'
E-AAC/M-CTA_N*	57 °C	405	F 5' CCAGCTGCAGACTTTGAGACT3'
			R 5' GGCATTACATGCATCGCCGTT3'
E-AAG/M-CAT_N*	57 °C	267	F 5' GTAATGCCTTTTGGACTGACA 3'
			R 5' CCTTACTTCACCATTGCTGAT 3'
E-ACA/M-CTG_N*	57 °C	350	F 5' CTGCAGCCACGATATACTGA 3'
			R 5' GGTGAATCTGTCATATGCTAG 3'
E-AGC/M-CAG_N*	57 °C	597	F 5' GCTTCATGGAGAGAAGAAGAC 3'
			R 5' GCTCTCTACAATCGACATCCA 3'
E-AGG/M-CAT_B*	57 °C	213	F 5' AAGATGTTGCTGACGCCGAAG 3'
			R 5' ACTAGGAACAGAGCTTGCTGG 3'

*N ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากแถบดีเอ็นเอของบัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea*

*B ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากแถบดีเอ็นเอของบัวประดับสกุลย่อย *Brachyceras*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 24 ผลผลิตพีซีอาร์จากคู่ไพรเมอร์ที่พัฒนามาจากเทคนิค AFLP ทั้ง 6 ตำแหน่งในตัวอย่างบัวหลวงและบัวประดับ (*N. 'Mayla'* (1), *N. 'P309-3'*(2), *N. 'Supranee Pink'* (3), *N. 'Nangkwak blue'* (4), บัวหลวงราชินี (5))

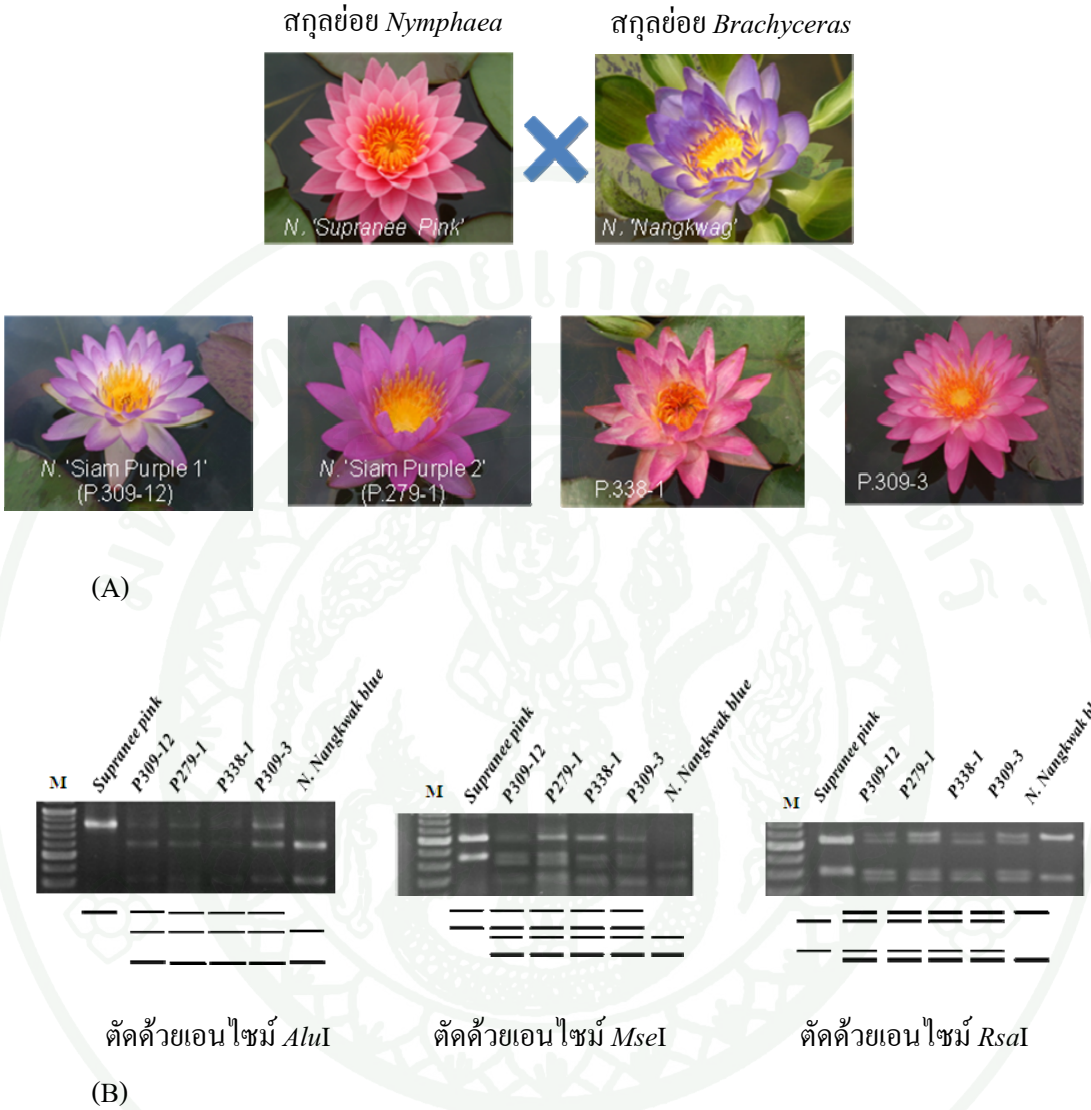
จากการพัฒนาไพรเมอร์ทั้งหมด 6 ตำแหน่งพบว่ามี 3 ตำแหน่งที่จำเพาะกับบัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* คือ ตำแหน่งคู่ไพรเมอร์ E-AAC/M-CTA_N, E-AAG/M-CAT_N และ E-AGC/M-CAG_N มี 1 ตำแหน่งที่จำเพาะกับบัวประดับสกุลย่อย *Brachyceras* คือตำแหน่งคู่ไพรเมอร์ของ E-AGG/M-CAT_B ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ในตัวอย่างบัวนางกวักฟ้าใบลายและลูกผสมของนางกวักฟ้าใบลาย (*N. 'P309-3'*) ส่วนตำแหน่งของคู่ไพรเมอร์ที่เป็น E-AAC/M-CAT_N พบว่าเป็นจีโนมคลอโรพลาสต์พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตปฏิกิริยาพีซีอาร์ในบัวประดับได้ทุกตัวอย่างและพบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับบัวประดับนี้สามารถเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ในดีเอ็นเอต้นแบบบัวหลวงได้เช่นกันแต่ไม่ชัดเจน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. การตรวจสอบความเป็นลูกผสมในบัวประดับโดยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนในบัวประดับ

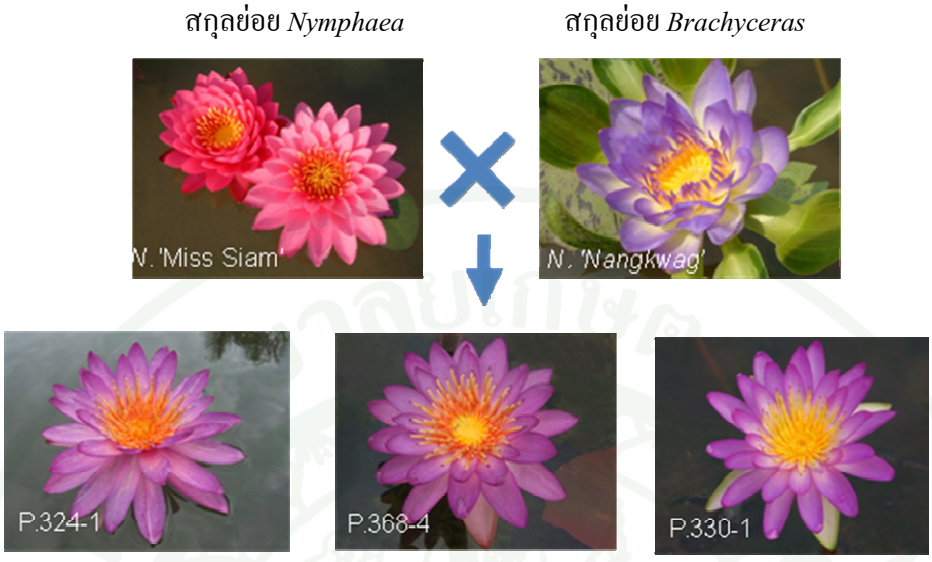
จากตัวอย่างลูกผสมทั้งหมด 7 ตัวอย่างซึ่งมาจากการผสมข้ามสกุลย่อย (intersubgeneric) ในบัวประดับสกุล *Nymphaea* คือ ระหว่างพันธุ์แม่ที่เป็น สกุลย่อย *Nymphaea* และพันธุ์พ่อที่เป็นสกุลย่อย *Brachyceras* จากรายงานที่ผ่านมาการตรวจลูกผสม ระหว่างแม่สกุลย่อย *Nymphaea* และพ่อสกุลย่อย *Brachyceras* ได้ใช้เทคนิค PCR-RFLP ตรวจสอบและยืนยันความเป็นลูกผสมเรียบร้อยแล้ว (Songpanich and Hongtrakul, 2010) ดังนั้นในเบื้องต้นการตรวจสอบความเป็นลูกผสมในบัวประดับที่เกิดจากการผสมข้ามสกุลย่อยเช่นเดียวกันจึงใช้เครื่องหมายโมเลกุล PCR-RFLP ก่อนในเบื้องต้น ในคู่ผสมคู่ที่ 1 ระหว่าง *N. 'Supranee Pink'* กับ *N. 'Nangkwak'* ดังภาพที่ 25 และคู่ผสมที่ 2 ระหว่าง *N. 'Miss Siam'* กับ *N. 'Nangkwak'* ดังภาพที่ 26 รวมถึงการเลือกใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่ให้รูปแบบที่แตกต่างกันในพันธุ์แม่ และพันธุ์พ่อที่นำมาผสมกันซึ่งพบว่ามีทั้งหมด 3 ตำแหน่งคือ *LFY, PI,* และ ITS ของยีน *rRNA* และการเลือกคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับพันธุ์แม่และพันธุ์พ่อที่พัฒนามาจากเทคนิค AFLP (SCAR marker) โดยเลือกคู่ไพรเมอร์ E-AGG/M-CAT_B ที่จำเพาะกับบัวสกุลย่อย *Brachyceras* คือบัวนางกวักฟ้าใบลาย คู่กับไพรเมอร์ E-AAC/M-CTA_N ที่จำเพาะกับบัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* ซึ่งใช้เป็นคู่ผสม โดยนำคู่ไพรเมอร์ไปตรวจสอบค่า Tm และการจับกันเป็น primer dimer กันเองระหว่างคู่ได้โดยใช้โปรแกรม FastPCR version 4 พบว่ามีค่า Ta ประมาณ 55-61 องศาเซลเซียส และไม่พบการจับกันเองเป็น primer dimer ของไพรเมอร์ทั้ง 4 สายจากนั้นนำมาทำ multiplex PCR ซึ่งผลแสดงดังรูปที่ 30 นอกจากนี้ได้ใช้คู่ไพรเมอร์ E-AAC/M-CAT_N ที่จำเพาะกับยีนในคลอโรพลาสต์ของบัวประดับในการตรวจสอบยีนที่อยู่นอกนิวเคลียสซึ่งมีการถ่ายทอดแบบ maternal inheritance ในลูกผสมทั้ง 7 ตัวอย่างดังภาพที่ 30

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 25 (ภาพ A) ภาพของคู่ผสมระหว่าง บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* (*N.* '*Supranee Pink*') และสกุลย่อย *Brachyceras* (*N.* '*Nangkwak blue*') และลูกผสมที่ได้ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง และ (ภาพ B) รูปแบบที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในบริเวณ ITS ของยีน *rRNA* ด้วยเอนไซม์ *AluI*, *Mse*I และ *Rsa*I ตามลำดับ ในเจลอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



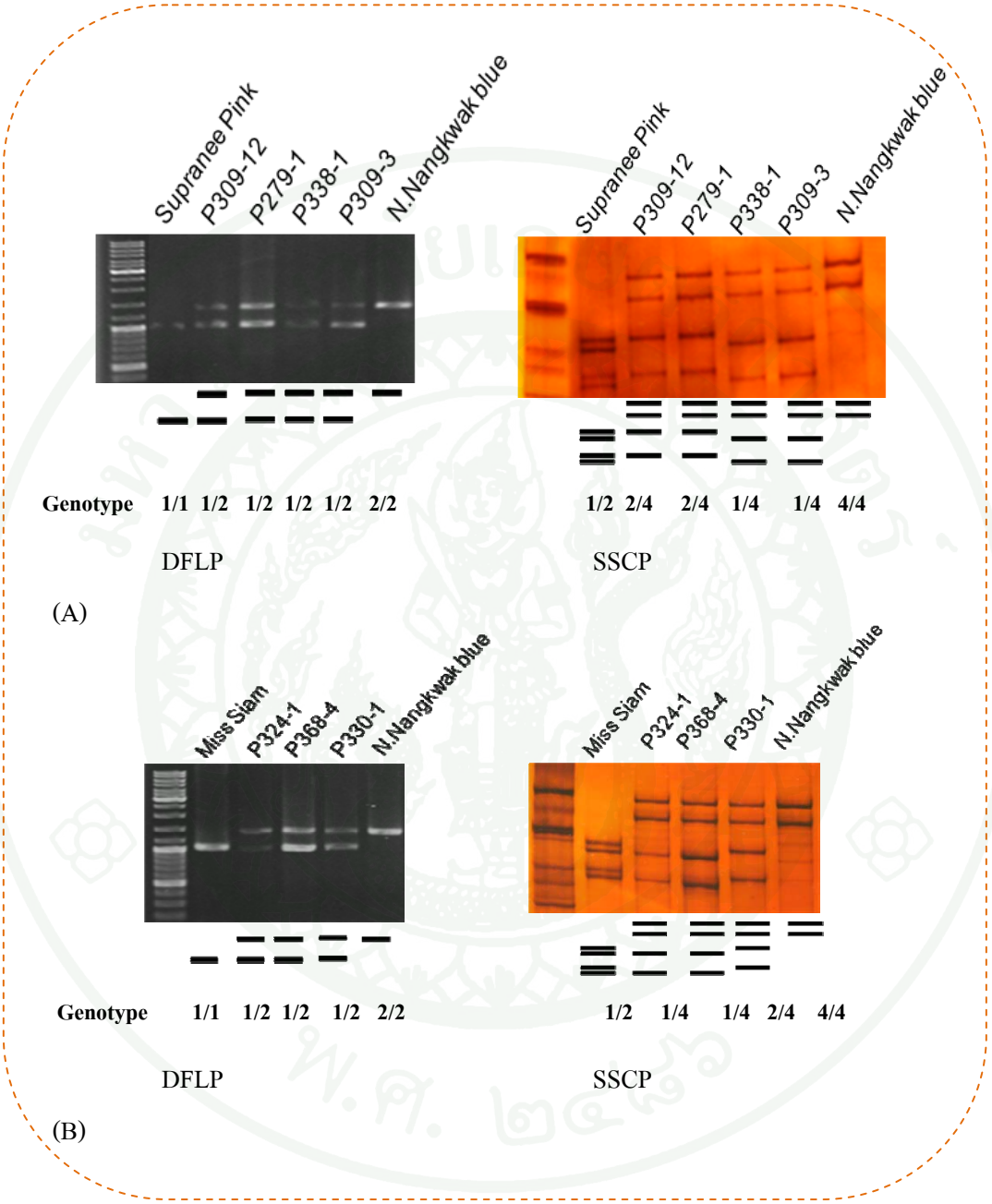
(A)

ตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I ตัดด้วยเอนไซม์ *Mse*I ตัดด้วยเอนไซม์ *Rsa*I

(B)

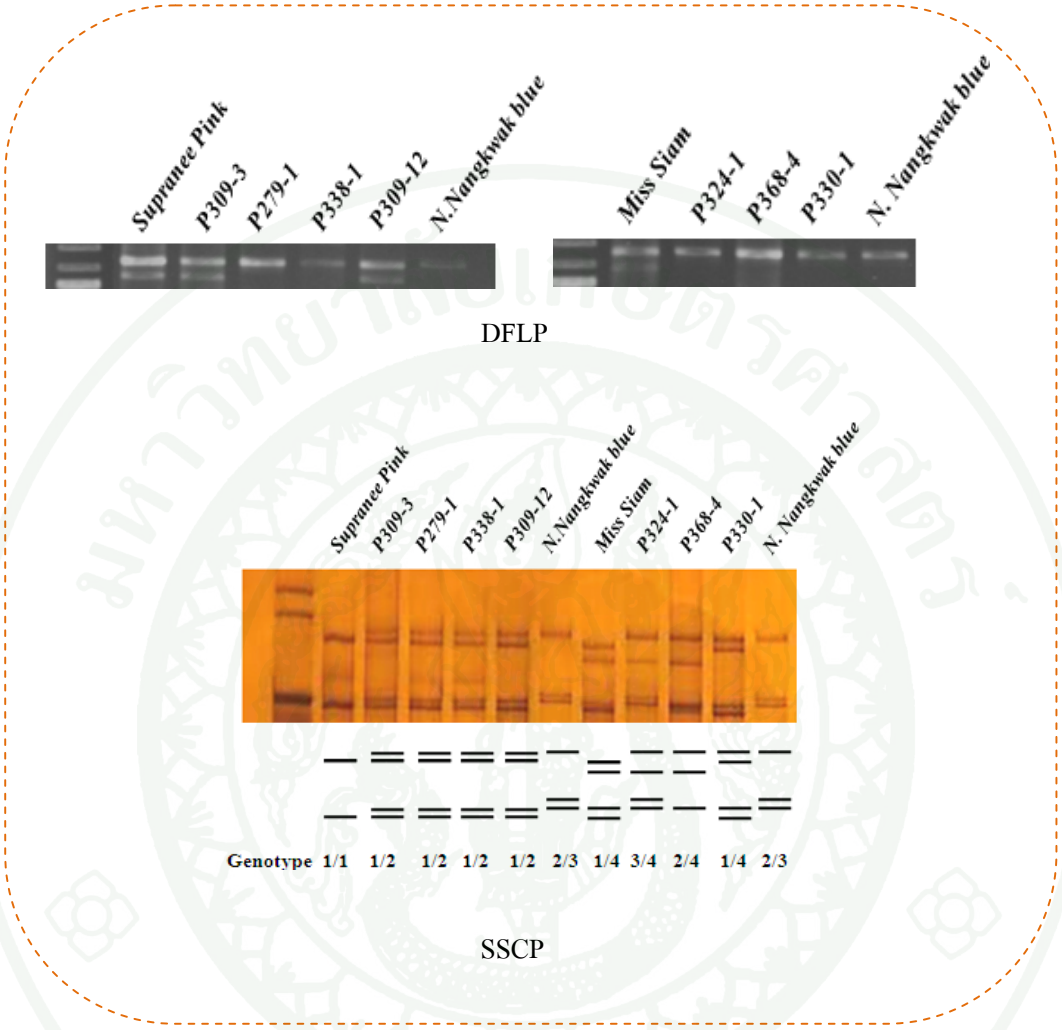
ภาพที่ 26 (ภาพ A) ภาพของคู่ผสมระหว่าง บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* (*N.* 'Miss Siam') และสกุลย่อย *Brachyceras* (*N.* '*Nangkwak blue*') และลูกผสมที่ได้ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง และ (ภาพ B)รูปแบบที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะในบริเวณ ITS ของยีน *rRNA* ด้วยเอนไซม์ *AluI*, *Mse*I และ *Rsa*I ตามลำดับ ในเจลอะกาโรสเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



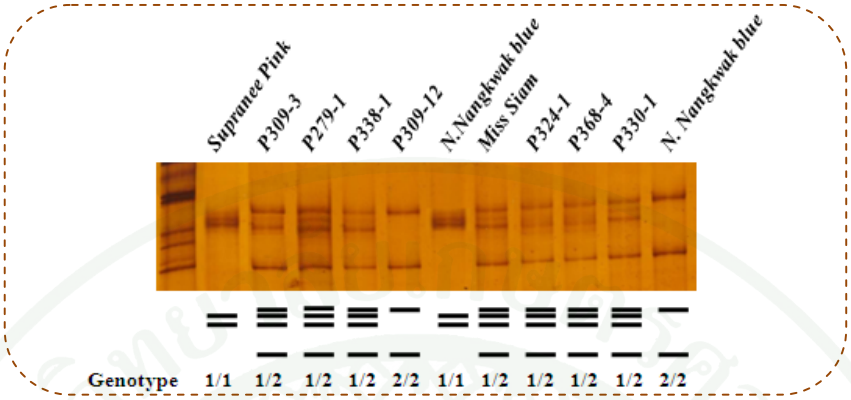
ภาพที่ 27 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของคู่ผสม ระหว่าง บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* กับสกุลย่อย *Brachyceras* (ภาพ A) คู่ผสมระหว่าง *N.* '*Supranee Pink'* กับ *N.* '*Nangkwak blue*' (ภาพ B) คู่ผสมระหว่าง *N.* 'Miss Siam' กับ *N.* '*Nangkwak blue*' ของลูกผสมที่ได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *pistillata (PI),* ด้วย เทคนิค DFLP และ SSCP (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

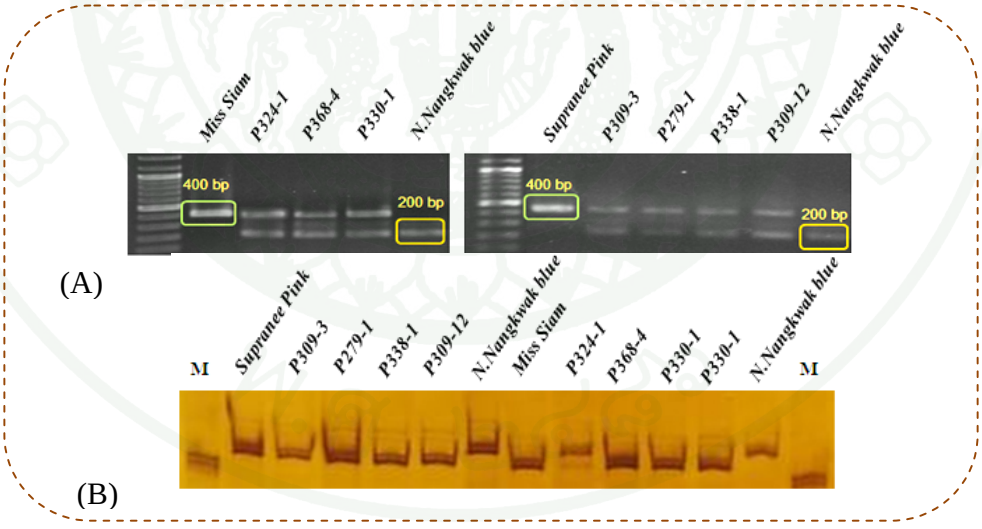


ภาพที่ 28 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของคู่ผสม ระหว่าง บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* (*N.* 'Miss Siam' และ *N.* '*Supranee Pink*') กับ สกุลย่อย *Brachyceras* (*N.* '*Nangkwak blue*') และลูกผสมที่ได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *Leafy protein (LFY)* ด้วย DFLP และ เทคนิค SSCP (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 29 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของคู่ผสม ระหว่าง บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* (*N.* 'Miss Siam' และ *N.* '*Supranee Pink*') กับ สกุลย่อย *Brachyceras* (*N.* '*Nangkwak blue*') และลูกผสมที่ได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับบริเวณ ITS ของยีน *rRNA* ด้วย เทคนิค SSCP



ภาพที่ 30 (ภาพ A) รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ multiplex PCR ของคู่ไพรเมอร์ E-AGG/M-CAT_B และคู่ไพรเมอร์ E-AAC/M-CTA_N ของคู่ผสมระหว่าง บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* (*N.* 'Miss Siam' และ *N.* '*Supranee Pink*') กับสกุลย่อย *Brachyceras* (*N.* '*Nangkwak blue*') และลูกผสมที่ได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง และ (ภาพ B) รูปแบบแถบดีเอ็นเอของยีนในจีโนมคลอโรพลาสต์โดยคู่ไพรเมอร์ E-AAC/M-CAT_N ด้วย เทคนิค SSCP (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจสอบยีนที่อยู่นอกนิวเคลียสซึ่งมีการถ่ายทอดแบบ maternal inheritance โดยคู่ไพรเมอร์ E-AAC/M-CAT_N ในคู่ผสมระหว่าง บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* (*N.* 'Miss Siam') กับสกุลย่อย *Brachyceras* (*N.* '*Nangkwak blue*') และลูกผสมที่ได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง พบว่าลูกผสมทุกตัวอย่างให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกับบัวในสกุลย่อย *Nymphaea* ยกเว้นลูกผสมหมายเลข P324-1 มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนบัวในสกุลย่อย *Brachyceras* ซึ่งจากผลการตรวจสอบยีนในนิวเคลียสที่จำเพาะกับยีน 3 ตำแหน่ง และจำเพาะกับพันธุ์ของทั้ง 2 สกุลย่อย สามารถยืนยันความเป็นลูกผสมได้ทุกตัวอย่าง แต่ในการตรวจสอบยีนนอกนิวเคลียสนั้น ลูกผสม P324-1 มีสารพันธุกรรมที่เหมือนบัวนางกวักนั่นคือในคู่ผสมนี้ บัวในสกุลย่อย *Brachyceras* เป็นแม่และบัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* เป็นพ่อ ส่วนในบัวลูกผสมอีก 6 ตัวอย่าง มาจากการผสมของบัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* เป็นแม่ และบัวประดับสกุลย่อย *Brachyceras* เป็นพ่อ

9. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่พัฒนาให้จำเพาะกับบัวหลวงและบัวประดับ

เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะกับยีนในตำแหน่งที่แสดง polymorphism ทุกตำแหน่งในบัวหลวงคือ *ful* และ *AG* และบัวประดับ คือ *LFY, PI* และบริเวณ ITS ของยีน *rRNA* มาโคลนในตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์ผสม เพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ผลที่ได้ทั้งหมดคือ

>allele 1_*ful*

TTATTGCTGCTGATTCCGAATCACAGGTACGACATTGGAACCACTCCAAAATACAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTACTGTCAACTTCTAAACCAAGTTTAAAGAAACTGTT
GTTATTGTGATTCAGTGCTATCATGTAGATGGCTCACTCTTTTGATTAATACTGTGCAG
GGAAATTGGTCTCTAGAGTACACAAAGCTTAAGAATAAAATTGAGATTTTACAGCGGA
ACCAAAGGTAGAGCCTGATGTCAAAGCAACAATGATAAAAGTGGGCAGGAAATTAAG
CTGACTTTGTCCCTGATGTTTCCAGGCATTATGTTGGAGAAGACCTCGAGTCCTTGAGT
CTGAAGGAGCTCCAGAATTTAGAGCAACAGCTTGACACTGCTCTCAAACAAATACGAA
CAAGAAAGGTTTGTTAACCTTGTTCCTCAAATTATTAGGCAATTTCAACAATTGGCTAA
TTACTTTAATAATTCTTTCCCTTGCAGAACCAACTCATTTACGACTCTATTTCAGAACTT
CAGAAAAAGGTAAGCCCATGCCTCAGGGATTATTACGATTAACAATTTAAATGGAGAA
GTAAATAGAACACAAAAACATATTGATTGTTCTGATAACCCTCATGTGGAAACAATGT
GAAATGCAGTTATTTCAACTCTCAGCGTTTCTAGGAATAAGGGTTGCTAATTGTTTCTA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

GGTTGATAAAGAGTAGTAGATTTTCCTTGTAAAACTAAGACAAAATTTCTCATCCCTCC
CAGTAAGTAAAAATGGCGACACACAAAATAAGTAAAAATGTTTTAGCAACCCAATATT
CTAAGGTGCACCATCTCACATTATCTACACTGATTGTGCTTTCTTTCTTACAGGAGAAA
GCGTTGCAGGAGCAAAACAACATACTGACTAAAAAGGTAAGTTTTTTATTACTTGCAT
GGGCTCACATGACAAAATCCTACCACATTCCGACTCATTACATATGTCAACCGTATATT
CCTCTTAAATAGCTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGAAGGAAAAGGAAAAGGCTCTGGCC
CAGCAGGCTCACTGGGACCAACAAAACCAAGGACAAAGCTCACCGTCCTTCCTGCTAT
CACAGCCACTTCCCTCACTTGCTATAAGGTCATTATCTCTCTCTCTTTCTCTCAACCAAC
CATTGCCCACTTGCTAAGGCTAAAACTTTCTATACATATGATTCAGTGGTACTTACCAG
GGAAGGGGCGCCGCATGCGATGATGAAGAAGCTCGCTCGCATGCTCGGACCAACTCAC
TTATGCCGCCTTGGATGCTCCGCCATTTGAATGAATAGAAGAACCAACTACAGTCTTCT
GTCTGATCAGCAGTTTTCGATCATTATGCTAGCTTGATGGAAATTGCCTTCATGGCGGG
AGAGGTGTCATCTCAATCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATA
TGGGAGAGCTCCCAACGCGTTG

>allele 2_*ful*

ACTTTTAGGTGAACTATAGAATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCC
ATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTAGTGATTGATTGAGATGACACCTC
TCCCGCCATGAAGGCAATTTCCATCAAGCTAGCATAATGATCGAAAACTGCTGATCAG
ACAGAAGACTGTAGTTGGTTCTTCTATTCATTCAAATGGCGGAGCATCCAAGGCGGCA
TAAGTGAGTTGGTCCGAGCATGCGAGCGAGGTTCTTCATCATCGCATGCGGCGCCCCTT
CCCTGGTAAGTACCACTGAATCATATGTATAGAAAGTTTTAGCCTTAGCAAGTGGGCA
ATGGTTGGTTGAGAGAAAGAGAGAGAGATAATGACCTTATAGCAAGTGAGGGAAGTG
GCTGTGATAGCAGGAAGGACGGTGAGCTTTGTCCTTGGTTTTGTTGGTCCCAGTGAGCC
TGCTGGGCCAGAGCCTTTTCCTTTTCCTTCTCCTTCTCCTTCTCCCTGAGCTATTTAAGA
GGAATATACGGTTGACATATGTAATGAGTCGGAATGTGGTAGGATTTTGTCATGTGAG
CCCATGCAAGTAATAAAAAACTTACCTTTTTAGTCAGTATGTTGTTTTGCTCCTGCAAC
GCTTTCACCTGTAAGAAAGAAAGCACAATCAGTGTAGATAATGTGAGATGGTGCACCT
TAGAATATTGGGTTGCTAAAACATTTTTACTTATTTTGTGTGTCGCCATTTTTACTTACT
GGGAGGGATGAGAAATTTTGTCTTAGTTTTACAAGGAAAATCTACTACTCTTTATCAAC

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

CTAGAAACAATTAGCAATCCTTATTCCTAGAAACGCTGAGAGTTGAAATAACTGCATT
TCACATTGTTTCCACATGAGGGTTATCAGAACAATCAATATGTTTTTGTGTTCTATTTAC
TTCTCCATTTAAATTGTTAATCGTAATAATCCCTGAGGCATGGGCTTACCTTTTTCTGAA
GTTCTGAAATAGAGTCGTAAATGAGTTGGTTCTGCAAGGGAAAGAATTATTAAAGTAA
TTAGCCAATTGTTGAAATTGCCTAATAATTTGAGGAACAAGGTTAACAAACCTTTCTTG
GTCGTATTTGGTTGAGAGCAGTGTCAAGCTGTTGCTCTAAATTCTGGAACTCCTTCAAA
CTCAAGGACTCGAGGTCTTCTCCAACATAATGCCTGGAAACATCAGGGACAAAGTCAG
CTTAATTTCCTGCCCACTTTTATCATTGTTGCTTTGACATCAGGCTCTACCTTTGGTTCC
GCTGTAAAATCTCAATTTTATTCTTAAGCTTTGTGTACTCTAGAGACCAATTTCCCTGCA
CAGTATTAATCAAAAGAGTGAGCCATCTACATGATAGCACTGAATCACAATAACAACA
GTTTCTTTAAACTTGGTTTAGAAGTTGACAGTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTG
TATTTTGGAGTGGTTCCAATGTCGTACCTGTGATTCGGAATCAGCAGCAATAAGCTCTC
GCTCTGCATAAGAAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGT
CGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATACATCCCCGG

>allele 3_*ful*

GATTGGCTCCTTTAGGCGAATGGCCCGAGTTGCATGTTCCGGCGCCATGCGGCCGCGG
AATTCGATAGTTGAAGGAGTCCAGATTTAGGCAACAGTTGACATTGTTTTCAACAAAT
CGGACAAGAAAGGTTTGTTACCTTGTTCCTCAAATTATTAGGCAATTTCAACAATTGGC
TAATTACTTTAATAATTCTTTCCCTTGCAGAACCAACTCATTTACGACTCTATTTCAGAA
CTTCAGAAAAAGGTAAGCCCATGCCTCAGGGATTATTACGATTAACAATTTAAATGGA
GAAGTAAATAGAACACAAAAACATATTGATTGTTCTGATAACCCTCATGTGGAAACAA
TGTGAAATGCAGTTATTTCAACTCTCAGCGTTTCTAGGAATAAGGATTGCTAATTGTTT
CTAGGTTGATAAAGAGTAGTAGATTTTCCTTGTAAAACTAAGACAAAATTTCTCATCCC
TCCCAGTAAGTAAAAATGGCGACACACAAAATAAGTAAAAATGTTTTAGCAACCCAAT
ATTCTAAGGTGCACCATCTCACATTATCTACACTGATTGTGCTTTCTTTCTTACAGGAG
AAAGCGTTGCAGGAGCAAAACAACATACTGACTAAAAAGGTAAGTTTTTTATTACTTG
CATGGGCTCACATGACAAAATCCTACCACATTCCGACTCATTACATATGTCAACCGTAT
ATTCCTCTTAAATAGCTCAAGGAGAAGGAGAAGGAGAAGGAAAAGGAAAAGGCTCTG
GCCCAGCAGGCTCACTGGGACCAACAAAACCAAGGACAAAGCTCACCGTCCTTCCTGC

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

TATCACAGCCACTTCCCTCACTTGCTATAAGGTCATTATCTCTCTCTCTTTCTCTCAACC
AACCATTGCCCACTTGCTAAGGCTAAAACTTTCTATACGTATGATTCAGTGGTACTTAC
CAGGGAAAGGGCGCCGCATGCGATGATGAAGAACCTCGCTCGCATGCTCGGACCAACT
CACTTATGCCGCCTTGGATGCTCCGCCATTTGAATGAATAGAAGAAACAACTACAGTC
TTCTGTCTGATCAGCAGTTTTCGATCATTATGCTAGCTTGATGGAAATTGCCTTCATGG
CGGGAGAGGTGTCATCTCAATCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGAC
CATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTG

>allele 4_*ful*

CAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTAGT
GATTTCTTATGCAGAGCGAGAGCTTATTGCTGCTGATTCCGAATCACAGGTACGACATT
GGAACCACTCCAAAATACAAAACACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTACTGTCAACT
TCTAAACCAAGTTTAAAGAAACTGTTGTAATTGTGATTCAGTGCTATCATGTAGATGGC
TCACTCTTTTGATTAATACTGTGCAGGGAAATTGGTCTCTAGAGTACACAAAGCTTAAG
AATAAAATTGAGATTTTACAGCGGAACCAAAGGTAGAGCCTGATGTCAAAGCAACAAT
GATAAAAGTGGGCTGGAAATTAAGCTGACTTTGTCCCTGATGTTTCCAGGCATTATGTT
GGAGAAGACCTTGAGTCCTTGAGTCTGAAGGAGCTCCAGAATTTAGAGCAACAGCTTG
ACACTGCTCTCAAACAAATACGAACAAGAAAGGTTTGTTAACCTTGTTCCTCAAATTAT
TAGGCAATTTCAACAATTGGCTAATTACTTTAATAATTCTTTCCCTTGCAGAACCCAAC
TCATTTATGACTCTATTTCAGAACTTCAGAAAAAGGTAAGCCCATGCCTCAGGGATTAT
TACGATTAACAATTTAAATGGAGAAGTAAATAGAACACAAAAACATATTGATTATTCT
GATAACCCTCATGTGGAAACAATGTGAAATGCAGTTATTTCAACTCTCAGCGTTTCTAG
GAATAGGGGTTGCTAATTGTTTCTAGGTTGATAAAGAGTAGTAGATTTTCCTTGTAAAA
CTAAGACAAAATTTCTCATCCCTCCCAGTAAGTAAAAATGGCGACACACAAAATAAGT
AAAAATGTTTTAGCAACCCAATATTCTAAGGTGCACCATCTCACATTATCTACACTGAT
TGTGCTTTCTTTCTTACAGGAGAAAGCGTTGCAGGAGCAAAACAACATACTGACTAAA
AAGGTAAGTTTTTTATTACTTGCATGGGCTCACATGACAAAATCCTACCACATTCCGAC
TCATTATATATATCAACCGTATATTCCTCTTAAATAGCTCAAGGAAAAGGAAAAGGAA
AAGGAAAAGGCTCTGGCCCAGCAGGCTCACTGGGACCAACAAAACCAAGGACAAAGC
TCACCGTCCTTCCTGCTATCACAGCCACTTCCCTCACTTGCTATAAGGTCATTATCTCTC

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

TCTCTTTCTCTCAACCAACCATTGCCCACTTGCTAAGGCTAAAACTTTCTATACATATG
ATTCAGTGGTACTTACCAGGGAAGGGGCGCCGCATGCGATGATGAAGAAGCTCGCTCG
CATGCTCGGACCAACTCACTTATGCCGCCTTGGATGCTCCGCCATTTGAATGAATAGAA
GAACCAACTACAGTCTTCTGTCTGATCAGCAGTTTTCGATCATTATGCTAGCTTGATGG
AAATTGCCTTCATGGCGGGAGAGGTGTCATCTCAATC

>Allele 1_*AG*

CCAAGATTTTTCCATTGCACCAAGCAATGGCCCCTATAATTTCCAATAGATACATATCA
AGAAAATTAAATAAATAAATAAAGACATCACATCACAACTATTAGTAGGGTCATTCCA
TCCATTTATACCTTTTCTTAATATTATCAATCGGCATATTCCGATTGACTCCAAGCACAT
CATAAGGGCAATCAACTTCAACTGCCATAATTCTTGTGACCTGTTCGAAACCGATGAA
ATCAATGGATAAGATAGAAAGCACCCTACAAAACAACCAGAAAAATAAACCAATACT
CCCTAATAACCTTACTACTACAATTTAAGCTGTCCTTAATTTCTCAAATACTGACAACT
CTACTGCCCAGCCATGATTAAAGGAATTCTAACCTCTTGCTAGTTGCTATCTACCACCT
CATTTACCTTTACCATGAATAAAAGAATTGAAGCCATGATAAACCAGCTTCAAGTCAC
TAGCTTTTATGTTATATATAAGAAATGTTTCCACATGCCCCTGTAGCTATGGAAAATGC
TGGGTGAAGGAAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGA
GCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGG
CGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACAC
AACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA
CTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCA
GCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCT
TCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATC
AGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAA
GAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCCCGTTGCT
GGCGTTTTTCCATAGGTCCCCCCCCCTGACAAGATTCCAAAAATCCACGCTCAGTCCAA
G

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

>Allele 2_*AG*

TAGGGTTTAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTTCCCTTTTTAAAGAACGTGGATTC
CAACGTCAAAGGGGGAAAAACCGTTTTTCAGGGGGATGGCCCATTACGTGAACCATCA
CCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCAATAAATCGGAACCCTAAAG
GGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAG
GGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGC
GCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCATTCGCCA
TTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCC
AGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTC
CCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGC
GAATTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTA
GCACATAAACTACGTCAGCCTAAGAGGCATAGCCAGCAGCTTCCGCATCAGGACAACG
TAGATTGCTAGCTTGGGGCCCGAGGTGCGGGCTCAAGAGGAGACCCCTCGGTACCCCA
TGACAGCCAACACCGATCACGCAGTGAAGAAGAAGCGGCAAGAAGGACCCCCGATCC
ACTTTGCCCCATCATTCGGAGCAAGATCGAGATACCTGACAACACTGAGGCTGGCAAC
ACTAGCAAAGAAGCAGCAGTGGCAACATCGTAAGACTCGCCGCTCCTCAGCAAGGAA
CAGCTCACCAGCGAAGCCCAGCCACCCGGTAGATCGAAGCCAAGAAAGAGAAGAGGT
AAGCTCTGTGGCTACGAGAATGGCGCCTGCTCTATTGAGCCAGCCATCCCCCTGTCATC
CGAGCACCTAGCGGCCCCTATGTCGAAAGATTTCAAGGTACCACCACTGAACAAGTAT
GATGGGTCTTTCGACCCCAATGATCACATAGACGCTTTCCAGTCCCATATGCATCTTGC
TAGC

>Allele 1_miss_*LFY*

CTCTCTCTCTCTCTCGTATACACCATACACTTGTCAATGGAGAAAACTGTCTATATTGTC
ATGATTTGTCTGCTCAGTGCCAATGAGCGCATGCATGACCAAGCAGCATTAGTGATGC
ACAAGCTATAAAAAAAGGAAGACGGAGAGAGAGAGAGAGACACACAATTTACGTGGT
TCGGTGTATCTTGACACCTACGTCCACAATCAGAAATTCTTCCACCTTACTTTGGTGAA
GATATGGCTTGATTATTTATAGCCTTGCAACATGATCTGGAATTAATTCCAGAATATTT
GAAGTAATTAGGACCTTTAATTACAGCGTCTGTTTTAGGATCAATCACTTGATTTGTTT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

GCTGACCAGAATTGTAGGCATGTATTGGCTCATTAACTGATAGCTTTGATGATGCAGG
GCAGTCTTGAATGAGTTCAATCGTAAAGGGATTTGGGCCAGCGTTTTCTTCATTATCTT
CTGCAGCTGGCTTTTTTAGACCACGCTGATTGAAGCCTGGAGTTATGGAGGATGAATC
ACCAATTTGATGATGCTGATTTCCAAAAACAGTTGTGGGCAGTTTGGTGAGATCACGA
CTGGATCTGATGACGTCAGGATTCCGTAGTGGTCTTGTCGATTCTTATTGATGATGCTT
ACCAAAGGTTGTTGAGGACAGGTTGGCGGTTGAACCAGTGCTGGCGTTAGTGGCCTTG
ATTGGGCTTGCCTTTTCATCCCCCCTCAAACTGGGCGGTGGTGGAGTCAAGCCCAGTTT
GTCCCGAAGTAAGGCAAGGGAATGTCCTGATAGGGCTTTAGTAAAGATATCCGCAAGC
TGATCGGAGGAGGGAACGTACTGTGTGACAAGTTGTCCAAGAGCGATCTTCTCCCTGA
GAAAATGATAGTCGAGCTCAACGTGTTTCATTCTGGAAGTGAAAGACCGGCTTAATAG
AAACTTGTAAGGCGGACATATTGTCACAATAAAGAATAGGAAGTCCTCCGAGATAAAT
GCCCAGATCTTTAAAAATGTATTGAAGCCAAGTGAGTCCGGCACCTGCGGAGGCCATG
GAGCGGTACTCTGCCTCGGTGGTGGATCTAGCAACCGTAGGTTGTTTCTTCGCCGACCA
GGAGATACAATTGGTCCCAATAAACGTGCAGTAGCCAGTAGTGGAGCGCCGAGTAGTG
TGGCAGCCGGCCCAATCCGAATCAGAAAAGGCATGAATCAAGAAGTCGGATTGGGGA
GAGAGGGAGCATCCAATCTCAATTGTGCCGCGAACATACCGAAGGATGCGCTTGACCA
TCTGAAAGTGGGTGACGGTTGGAGCCTGCATGAATTGGCTTACAAAGTTGACGCTGAA
GGAAAGATCCGGGCGTGTAAATGTCAAGTATTGGAGTCCCCCAACCAGGCTGCGATAC
ATCGTGGGATCTGAGAATGGTGGATCAGC

>Allele 1_Supranee_*LFY*

CCCAGGAAGGTCCCACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTTTCTTTCTGGTAGC
TCACCGTTCTTTAGAATCTTCTTTTCGAAACCGGCTTACAGATATTGCGTTTGTTGAATT
TGTCCAATGAAATTTTGGAACCATATTTCTCAATGTGGTATATGATTTTTTTCCGTGATT
GCAATCACTGTTTCGTTGAATATCCAGATTTCCTGTGAAGAAACTTCTTCATCCTTTTCA
TTTTTTTATATTTTTTCCGAGAACAGTGGCTTTTACCTTTTTATACACAAACAGAGAATC
CACACCGGCACGAGAAACCTACCAATTTAATTTCCACCAACGATCACCTCTTCGACATT
AAATGACAGAAGGCCATATTGGATGTATCTGTTAATCTATATTCGCTCTGGAACTGTGA
AAATTAAAAGATAAAGATGGGTTTCCAAAAGGGATAGTGAATCATGAAAAAAATGAT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

GACTGCTGTCTCTCTCTCTCTTTCTAATGGTGGTATCTTATTTGGCCATGGGTGGGTAGG
GCTGTCAGAGGAGCCGGTTCAGGGAGAAAAGGAGGGACGCGTGGGCGTTAACGGCGG
CGGAGGGGGAGGTTGGGAGGTGGTTGTGGAAGGGAAGAAAGGGCAGAGGCGGAGGA
GAAGCACAAGGGGACGTATCAACGGCGAGGGAGGTGGTGAGGATGGCGGAGACCGGC
AGCGAGAGCACCCCTTCATAGTGACGGAGCCCGGGGAGGTGGCCAGAGGAAAGAAGA
ACGGGCTGGACTACCTCTTCCACCTCTATGAGGAATGTAGAGGTTTCCTCATCCAGGTC
CAGAACATTGCGAAGGAGCGAGGGGAAAAGTGTCCCACCAAGGTGCCCTTTTCATCAA
AATGCTCGTACCTTTGTTTGCATTCACACGTTCCACCTTCTTCGATTATTTTGACTGAAA
GGGCAGTATGGTTAACTTGTCAGTGGTCGCCACTGGTGCCGTCAAGCCTGAGTTTGAC
GTTGAAGGTTAAAAACTTCAGCTGATTCTCTCATTAAAGAGATAGTGACAGCAAAAGT
ACCTAAAACTTCAGCTCTCCCTATAGAAAGCTGCCAAGTTTGAGAAAAAAAAAACACCC
AGGTGCCTGTCTCCATGTATCGTTTTGAAAAATAGAAATTGAAAAGGGTCCTCGCCTTT
CAGAAGGTTTCTGCAGAAACATGTTTTACTTTACAAGATTTGGTAAATTATCGCCATGG
CATATTTTCTGATGATCAAGCTTTCAGTTACATACTTTACATCTCAGTCAGACTCATCG
GCCATGGCCATGGTTGGTAGTGCAGG

>Allele 1_Nangkwak_*LFY*

CCCAGGAAGGTCCCACGTCTCCCTCCTTCTCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CTCTCTCTGGTAGCCCACCGTTCTTTTGAATCTTCTGATCGAAACCGGCCTCACAGATA
TCGCGTTTGTTCAATTTGTCCAATGAAATTTTGGAACCATATTTCTCAATGCGGTGTGA
ATTCTTTTCCCTGTGATTGCAGTCACTGTTTCGTTGAATATTCTGATTTCCTGTGAAGAA
TCTTCATCATCATTTTATACATTTTTTATGTTTTTCCAAGAACAGTGGCTTTATCTTTTCA
AACACAAACAGAGAAACTATACTGGCACGAGAAACCTACCAATTTAACGTCCACCAAC
GATCACCTCTTCGACATTAAGTGACAGAAGGCCATCATGAATGCATCTGTTAATCTTTA
TTCGCTTTTAATATTAAAGTGAAAATTAGAAGATAAAGATGGGCTTCCAAAAGGGATA
GATGAAACCAAAAAAAAATCAGAACTACTCTATTTCTGTCTGTCTCTGACGTTGGTATC
TTGTTTGGCCATGGGTGGGTAGGGTTGTCAGAGGAACCGGTTCAGGGGGAGAAGGTGG
GAGGCGTGGCCGGTAACGGCGGCGGAGGGGGAGGTTGGGAGGTGGTTGTGGAGGGAA
AGAAGGGGCAGAGGCGGAGGAGAGGCACGAGGGGCGGTATCAACGGCGAGGGATGT
GGCGACGACGGCGGAGACCGGCAGAGAGAGCACCCCTTCATTGTGACGGAACCCGGG

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

GAAGTGGCCAGAGGAAAGAAGAAAGGGCTGGACTACCTCTTCCACCTCTACAAGGAG
TGCAGAGGTTTCCTCATCCAGGTCCAGAACATTGCAAAGGAGCGAGGGGAAAAGTGCC
CCACCAAGGTGCCCTTTTTACCAAAGTGCCCATCCCTTCATTTGCTTTCTCACGTTCCTC
CTTCATCGATTATTTTGACTGAAAGGGCAGTCTGATAACTTCGTCAGCAATCGCCACTG
GTAACGTCAAGACATGAGTTGACGTTGAAGGTTAAAAACTCCATCTGATTCTCTCATG
AAAGAGATAGCGACAGCTAAAGTACCTAAAACTTAAGCTCTCCCCTATAGAAAGCTTC
CAAGTTTGAAAAAGAAAAGACCCAGATACCTGTGGGCATTAGTCACTTTAAAAAGTCG
AAATTGGAAATGGTCCTCACCTTTCAGAAGGTTTTTGCAGAACCATGCTTTACATTACA
AGGCTTTTGTAAATTATCACCATGGCATATTTTCGGATCATCAAGCTTTCAGTTACATA
TTTTACAGCTCAGTCAGATTGTTTGTGATTAGTCATCGGCCATGGCCATGGTGGTGCTG
CAGG

>ITS_miss

GTCCGGTGAAGTGTTCGGATCGCGGCGACGGAGGCGGTTCGCCGCCTACGACGTCGCG
AGAAGTTCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA
GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTTTCCTTAGATGACAGACCCGCGAACAAGTT
ATCATTGCTTTCTTCAAGCCGAGCGGAGCATCGTTTCCCACGGGAAAGGGTGATCTGTT
CTGCTTCTTGGCATGTGCCCGTCTTTTGCCATCCCCTTTGTGGTCGATTGCTTGAGCGGT
GTACTGCCAAAACAACAAAAACGGCGCTTTTAAGTGTCAAGGATCATTTATTGAATGA
AAGGGGGACATCCCGCCACAAAATGAGTGGTGGGAGAAGTGCCCCTTTGCCTTCTAAC
AAGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCCCGTCACGATGAAGAACGTAGCGAA
ATGCGATAGTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCGAGTTTTTGAACGCAAG
TTGCGCCCGAGGCCATTCGGCCAAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCTTAGCGTCG
CCCTCCCCAGGTCCTCGTGTTTTCGAACCGAGGCCGAGGGAGAGCGGAGGACTGGCCT
TCGGTGTCGCTTTCATCGGCGTCGTCGGCTGAAACTTTCGGCTCACGATCTGTTGTGCA
GCACAACAAGCGGTGGATTTCCAGTGAGTTGTTGTGTTTCACGTGGTCAAAGGGCCAT
GGGACTCGAGGCAAGGTTCTCATTTTCTTGCCTTAGCTTTGCGACCCCAGGTCAGGCGA
GACTACCCGCTGAGTTTAA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

>ITS_supranee Pink

GTCCGGTGAAGTGTTCGGATCGCGGCGACGGAGGCGGTTCGCCGCCTACGACGTCGCG
AGAAGTTCATTGAACCTTATCATTTAGAGGAAGGAGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTA
GGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGTCGTTTCCTTAGATGACAGACCCGCGAACAAGTT
ATCATTGCTTTCTTCAAGCCGAGCGGAGCATCGTTTCCCACGGGAAAGGGTGATCTGTT
CTGCTTCTTGGCATGTGCCCGTCTTTTGCCATCCCCTTTGTGGTCGATTGCTTGAGCGGT
GTACTGCCAAAACAACAAAAACGGCGCTTTTAAGTGTCAAGGATCATTTATTGAATGA
AAGGGGGACATCCCGCCACAAAATGAGTGGGGGGAGAAGTGCCCCTTTGCCTTCTAAC
AAGAACGACTCTCGGCAACGGATATCTTGGCTCCTGTCACGATGAAGAACGTAGCGAA
ATGCGATAGTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAATCATCGAGTTTTTGAACGCAAG
TTGCGCCCGAGGCCATTCGGCCAAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCTTAGCGTCG
CCCTCCCCAGGTCCTCGTGTTTTCGAACCGAGGCCGAGGGAGAGCGGAGGACTGGCCT
TCGGTGTCGCTTTCATCGGCGTCGTCGGCTGAAACTTTCGGCTCACGATCTGTTGTGCA
GCACAACAAGCGGTGGATTTCCAGTGAGTTGTTGTGTTTCACGTGGTCAAAGGGCCAT
GGGACTCGAGGCAAGGTTCTCATTTTCTTGCCTTAGCTTTGCGACCCCAGGTCAGGCGA
GACTACCCGCTGAGTTTAA

>ITS_Nangkwak

TTAAACTCAGCGGGTAATCTCGCCTGACCTGGGGTCGCTAAGGATGAAGCAAATAAAA
ATCAAAAGATATTAACTTGCATCAAAAGAGTCCCACGGGCCTTCTCGATCGGGTGAGG
CACAACGACTCACTGGGAAATCCACCGCTCGTTGTGCCGTCAACCAAAATCGTAGAGC
CAACTGTAATGTTTCAACCTACAACGCCATTGAAACTTGGCGCCGAAGGCCAATCCTC
CGCTCTCCCGAGGCCTTCTCGATTAACACGAGAACGTGGAGAGGGCGACGCATAGCTT
GACGCCCAGGCAGACGTGCCCTTGGCCGAATGGCCTCGGGCGCAACTTGCGTTCAAAA
ACTCGATGATTCACGGGATTCTGCAATTCACACCAAGTATCGCATTTCGCTACGTTCTT
CATCGTGGCGGGAGCCAAGATATCCGTTGCCGAGAGTCGTCATAGATTAAAGGGTGAA
AGGAACATCTCTCACCACTTCGTGGTTGGATGCCCTCCCCTTCTTTACAATGTTCCTTGA
CGCTTAAAAGCGCCGGATTTTTGTTTTTTTTTTTTGACCTACGCCGCTAAAGCCACCATC
CCCTTAACGAGTACGGTAAAAGCCAAGGCAAGCGCAGATCAAACAACAGAGAAAGGA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ACCACGCCATCAAGGCGTGATGCTCCCAACTCTGCATGAGTGAGAAAAGATAACATGT
TCGCCGGTCTGTCCAATAGGAAACAACAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAA
CCTTGTTACGACTTCTCCTTCCTCTAAATGATAAGGTTCAATGAACTTCTCGCGACGTC
GTAGGCAGCGAACCGCCTCCGTCGCCGCGATCCGAACACTTCACCGGAC

>Allele 1_Nang_*PI*

AACTCTGTGTTCAGATACTGTGCAATCATAGGATAGTGTAAGAATTCAAGAAGCAGAA
GCTAAAAGTTCCTTCAATGCTGAATGGGGAAGACATGAACTTTTTACCTCATGCCTAGC
ATCCCATAGCTTTTTCCCAGAAGTCTTCTGGTATCGAGTTAAAAGTTCCTTCAAGCTGC
AACATCAAGCAAAAGGAAACAGGAAAAGAGTCACATGTAAGGCAATGTAACAGTAGC
AAGAACATCGAGTTAAAAGTTCCTTCAAGCTGCAACATCAAGCAAAAGGAAACAGGA
AAAGAGTCACATGTAAGGCAATGTAACAGTAGCAAAAACATCGAGTTAAAAGTTCCTT
CAAGCTGCAACATCAAGCAAAAGGAAACAGGAAAAGAGTCACATGTAAGTCAATGTA
ACAGTAGCAAAACCATCGAGTTAAAAGTTCCTTCAAGCTGCAACATCAAGCAAAAGGA
ATCAGGAAAAGAGTCACATGCAAGGCAATGTAACAGCAGCAAAAACGTCGAGTTAAA
AGTTCCTTCAAGCTGCAACATCAAGCAAAAGGAATCAGGAAAAGAGTCACATGCAAG
GCAATGTAACAGCAGCAAAAACATCGAGTTAAAAGTTCCTTCAAGCTGCAACATCAAG
CAAAAGGAAACAGGAAAAGAGTCACATGTAAGGCAATGCAACAGTAGCAAAAATATC
CCTCACCCACCAAAAGAAATAGTACACGAGTCCAGCTGAAGCTAAAATCGAGGACCA
AAAATCTGAATGGATGCGCAGAAAAGCAGCAGATGGAAGAAACAAGTTGTACGTATA
AAACTACTCACAAAATATTCGATCAGCTCATCCGAAGAAGAAAAACCGTTTCAACATT
TTGAATGTGAGCCCGATATAGTATAAAACGATACAGGGAAAGAAGGGGACAGAGAAA
CATAACCAGATAAAAGAAAATAAACAACAGATCAGTGAGGTATATCTTTTAGCTACTT
AAATCCAAAAACAGAAAATCAAATAGATACCACCAACAACAAGGTCAAACGATTATC
TGACAAATATGACAAATCCAACAAAAATAGTAAACAATAAGCAAATGTAGAAAGCAA
TAAAAGCTCAAATTTCACATGCCAAGATGATGAATATCGACCAACAGGGAAAAAAAC
CGCTCTATGTGTATGTGTGTTTGCAAATAGTACCAAATGAAGCATCTTCAAAAGAG
ATCTAAAAGCCAGAGAGAGAGAGAGGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGTAGAA
GCCAAGGAAAACCTACTTAGTAGAAGGGGAACAGTACTCATTCAGCTTCCCAGCGCTA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

GAGAACAATAAGAGTGAGACCTGAGCGTCACAGAGAACACTGATTTCCCTAGCCTTCT
TCAGGATGCCCTGCTTCCTTTTGGAGAAGGTGACCTGCCTG

>Allele 2_330_*PI*

AACTCTGTGTTCAGATACTGTGCAATGATAAAATAGTGTAAGAATACGAGCTAACATG
AAATTCGAGAAGCACTAAAAATTCTTCCAATAGTGAATGGAGAATACATGAACCTTTT
ACCTCATGCCTAGCATCCCATAGCTTTTTCTCAGAAGTCTTCTGGTATCGAGTTAAAAG
TTCCTTCAAGCTTCAACATCCAGCAAAAAGAAACAGAAATAGAGTCACATGTAAAACA
ATGTAACGGCAGCAAAAAAAATCCCCCCACCCACCAAAAGAAGTAGCACAAAGTCCA
GCTGAAGCTAAAATCAAGGACCATGAATCTGAAAGCGGGCGCAGAAAAGCATCAGAT
GGAAGAGGAAACGATTTGTACGTATAAAATTGCTCACAGAATATTCGACCAGCTAAAG
CGGACCAAGAAAAACCGTCCCAACATTTTCGATGTGAGCTTGATATAGTAGAAAATAA
TACAGGCAAAGAAGAGGAAAGATAAATATCACCAGATAGAAGAAAATAAACAGCAG
ATCTACAGAAGGTAGTGAGATATATCCTTTAACCACTTAAATCTAAAAACAGAAAATC
AAATACATACCACCAACAACAAGGTCAAAGATCATCAGATAAATATGAAAATACAAC
AAAAATAGTAAAAAATATGAAAATGTAAAAAGCATGAAAAGCTCAAATTTCACATAC
CAAGATGATGAATATGGACAAACAGGGAAAAAAAACCGCTGTATATGTGTGCGTTTGT
GTGCCAATAGTACGAAATGAAGCATTTCAGACGAGATCTAAAGGCCAGAGAGAGAGA
GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCAGGAAAC
CCAGGAAAACCTACCTGGTAGAAGGGGAGCAGTACTCATTCAGCTTGCCAGCACTAGA
GAACAAGATGAGTGAGACTTGAGCGTCACAGAGGACACTGATCTCCCTTGCCTTCTTC
AGGATGCCCTGCTTCCTCTTGGAGAAGGTGACCTGCCTG

>Allele 3_368-4_*PI*

AACTCTGTGTTCAGATACTGTGCAATGATAAAATAGTGTAAGAATACGAGCTAACATG
AAATTCGAGAAGCACTAAAAATTCTTCCAATAGTGAATGGAGAATACATGAACCTTTT
ACCTCATGCCTAGCATCCCATAGCTTTTTCCCAGAAGTCTTCTGGTATCGAGTTAAAAG
TTCCTTCAAGCTTCAACATCCAGCAAAAAGAAACAGAAATAGAGTCACATGTAAAACA
ATGTAACGGCAGCAAAAACATCCCCCACCCACCAAAAGAAGTAGCACAAAGTCCAGC

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

TGAAGCTAAAATCAAGGACCACGAATCTGAAAGCGGGCGCAGAAAAGCATCAGATGG
AAGAGGAAACGATTTGTACGTATAAAATTGCTCACAGAATATTTGACCAGCTAAAGCG
GACCAAGAAAAACCGTCCCAACATTTTCGATGTGAGCTTGATATAGTAGAAAATAATA
CAGGCAAAGAAGAGGAAAGATAAATATCACCAGATAGAAGAAAATAAACAGCAGATC
TACAGAAGGTAGTGAGATATATCCTTTAACCACTTAAATCTAAAAACAGAAAATCAAA
TACATACCACCAACGACAAGGTCAAAGATCATCAGATAAATATGAAAATACAACAAA
AATAGTAAAAAATATGAAAATGTAAAAAGCATGAAAAAGCTCAAATTTCACATACCA
AGATGATGAATATGGACAAACAGGGAAAAAAACCGCTGTATATGTGTGCGTTTGTGTG
CCAATAGTACGAAATGAAGCATTTCAGACGAGATCTAAAGGCCAGAGAGAGAGAGAG
AGAGAGAGAGAGAGAGAGCAGGAAACCCAGGAAAACCTACCTGGTAGAAGGGGAGC
AGTACTCATTCAGCTTGCCAGCACTAGAGAACAAGATGAGTGAGACCTGAGCGTCACA
GAGGACACTGATCTCCCTTGCCTTCTTCAGGATGCCCTGCTTCCTCTTGGAGAAGGTGA
CCTGCCTG

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. การตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอในบัวหลวง 69 ตัวอย่างจากประเทศไทยและต่างประเทศโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีน 4 ตำแหน่งได้แก่ *chalone synthase, storage protein, fruitfull* และ *nr*ITS พัฒนาโดย กนกวรรณ แดงสวัสดิ์ (2551) พบมีเพียงไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *fruitfull* ที่ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันโดยเทคนิค SSCP ในเจล non-denaturing polyacrylamide โดยพบรูปแบบแถบดีเอ็นเอ 4 รูปแบบ ในตัวอย่างที่ศึกษาเป็น homozygote 41 ตัวอย่าง heterozygote 28 ตัวอย่าง และมีค่า PIC เท่ากับ 0.611

2. การพัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนทั้งหมด 10 ตำแหน่งในบัวหลวงพบว่ามี 8 ตำแหน่งที่สามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน ได้แก่ยีน *Waxy*, *AGAMOUS-like, alternative oxidase 1a, MADS-box transcription factor AP3*, *Glutathione peroxidase, ACC oxidase, Cu/Zn superoxide dismutase* และ *cationic peroxidase* โดยพบเป็น monomorphic marker ทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค DFLP แต่เมื่อตรวจสอบโดยเทคนิค SSCP พบเพียง 1 ตำแหน่งที่ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน คือตำแหน่ง *AGAMOUS-like* ซึ่งพบว่ามีรูปแบบแถบดีเอ็นเอ 2 รูปแบบ และในตัวอย่างที่ศึกษาเป็น homozygote 51 ตัวอย่าง heterozygote 18 ตัวอย่าง มีค่า PIC เท่ากับ 0.458

3. การสร้าง phylogenetic tree จากรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง 2 ตำแหน่งในบัวหลวงรวม 6 รูปแบบสามารถจำแนกตัวอย่างบัวหลวงเป็น 3 กลุ่มโดยยังไม่สามารถแยกบัวหลวงต่างๆ ได้ชัดเจนในกลุ่มที่หนึ่ง เป็นกลุ่มตัวอย่างบัวหลวงพระราชินี แหลมชมพูในไทยและไต้หวัน แหลมขาว ฉัตรชมพูในไทยและจีนและตัวอย่างบัวหลวงในจีน กลุ่มที่สอง เป็นกลุ่มตัวอย่างบัวหลวง ฉัตรขาว แหลมชมพู ฉวาง และ ตัวอย่างจากจีน Wuhan กลุ่มที่สาม เป็นกลุ่มตัวอย่างของบัวหลวงจากประเทศจีน คือ แหลมชมพู ฉัตรชมพู Taikong และฉัตรชมพู Hubai

4. การตรวจสอบความเป็นลูกผสมในบัวหลวงโดยเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน *fruitfull protein* พบว่าในตัวอย่างลูกผสม 31 ตัวอย่าง สามารถยืนยันความเป็นลูกผสมได้ 26 ตัวอย่าง ส่วนอีก 5 ตัวอย่างให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ไม่สอดคล้องกับพันธุ์พ่อแม่ อาจเนื่องมาจากได้รับการผสมจากเกสรตัวผู้จากต้นอื่นมาก่อน

5. จากการพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะกับยีนในบัวประดับ 5 ตำแหน่ง คือยีน *apetala 3, AGAMOUS-like, leafy, pistillata* และ *sepellata*1 พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ชัดเจนทุก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตำแหน่ง และทุกตำแหน่งเป็น monomorphic marker ยกเว้นตำแหน่งของยีน *leafy* และ *pitillata* ซึ่งให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอ 2 รูปแบบ มีค่า PIC เท่ากับ 0.444 และ 0.152 ตามลำดับ เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบใน non-denaturing polyacrylamide gel พบว่าทุกตำแหน่งเป็น polymorphic marker ยกเว้นตำแหน่งของยีน *AGAMOUS-like* ซึ่งตำแหน่ง *apetala 3, leafy, pistillata* และ *sepellata* มีค่า PIC เท่ากับ 0.219, 0.607, 0.607 และ 0.468 ตามลำดับ รวมถึงศึกษารูปแบบของแถบดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของยีน *rRNA* ในเจล non-denaturing polyacrylamide ซึ่งให้ค่า PIC เท่ากับ 0.290

6. การสร้าง phylogenetic tree จากรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 5 ตำแหน่งคือ *apetala 3, leafy, pistillata, sepellata* และบริเวณ ITS ของยีน *nrRNA* ในบัวประดับรวม 15 รูปแบบสามารถจำแนกตัวอย่างบัวประดับเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่หนึ่ง เป็นกลุ่มบัวประดับ hardy waterlily ได้แก่ *N.* ‘Mayla’ *N.* ‘Madame Wilfron Gonnère’, *N.* ‘Perry's Fire Opal’, *N.* ‘Sirius’ และลูกผสมระหว่าง hardy waterlily ได้แก่ *N.* ‘Tanpong’, *N.* ‘Siam Jasmine’, *N.* ‘Miss Siam’, *N.* ‘Supranee Pink’, *N.* ‘Pink Ribbon’, *N.* ‘Prapunt White’, และ *N.* ‘Tan-khwan’ และกลุ่มที่สอง เป็นบัวประดับสกุลย่อย *Brachyceras* คือ นางกวักฟ้าใบลาย

7. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวประดับเพื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้ศึกษาบริเวณ ITS ของยีน *nrRNA* โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP พบว่าสามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้ ในคู่ผสมระหว่างสกุลย่อย *Nymphaea* และ *Brachyceras* ทั้งหมด 2 คู่ผสมคือ *N.* ‘Supranee Pink’ กับ *N.* ‘Nangkwak blue’ และ *N.* ‘Miss Siam’ กับ *N.* ‘Nangkwak blue’ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I, *Mse*I และ *Rsa*I

8. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับพันธุ์ในบัวประดับโดยพัฒนาจากแถบดีเอ็นเอจำเพาะจากเทคนิค AFLP ได้ 5 คู่ไพรเมอร์จำเพาะกับพันธุ์บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* และ 1 คู่ไพรเมอร์จำเพาะกับพันธุ์บัวประดับสกุลย่อย *Brachyceras*

9. การตรวจสอบความเป็นลูกผสมในบัวประดับโดยเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับยีนพบ 1 ตำแหน่งที่ให้รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของตัวอย่างที่เป็นพ่อแม่พันธุ์ใน 1% agarose gelคือตำแหน่ง *pistillata* ซึ่งสามารถใช้ยืนยันความเป็นลูกผสมได้ในลูกผสมทั้ง 7 ตัวอย่าง ส่วนใน non-denaturing polyacrylamide gel พบมี 3 ตำแหน่งที่ให้รูปแบบของยีนที่แตกต่างกันของตัวอย่างที่เป็นพ่อแม่พันธุ์ คือตำแหน่ง *leafy, pistillata* และ ITS ของยีน *rRNA* ซึ่งทั้ง 3 ตำแหน่งสามารถใช้ยืนยันความเป็นลูกผสมได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10. การตรวจสอบความเป็นลูกผสมโดยคู่ไพรเมอร์ที่พัฒนาให้จำเพาะกับพันธุ์ หรือ SCAR marker ในบัวประดับสกุลย่อย *Brachyceras* (E-AGG/M-CAT_B) และจำเพาะกับพันธุ์บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* (EAAC/M-CTA_N) มาทำปฏิกิริยาแบบ multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งสองคู่พบว่าในลูกผสมมีแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์แม่และจำเพาะกับพันธุ์พ่อซึ่งสามารถยืนยันความเป็นลูกผสมได้เช่นเดียวกับเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับยีน การตรวจสอบยีนที่อยู่นอกนิวเคลียสพบว่า ลูกผสมทุกตัวอย่างมีบัวประดับสกุล *Nymphaea* เป็นแม่ยกเว้น ลูกผสมหมายเลข P324-1 ที่มีบัวประดับสกุลย่อย *Brachyceras* เป็นแม่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2550. **บัวหลวง**. การผลิตไม้ดอกไม้ประดับ. แหล่งที่มา: http://www.doae.go.th/LIBRARY/html/detail/sacreslotus, 30 เมษายน 2552.

กัญจนา แซ่เตียว. 2542. การศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์ของบัวหลวง, น. 337-342. ***ใน*** **เอกสารประกอบการประชุมทางวิชาการในงานนิทรรศการ 30 ปี เกษตรเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สาขาเทคโนโลยีการเกษตร)**. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

กนกวรรณ แดงสวัสดิ์. 2551. **การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวหลวง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____นิตย์ศรี แสงเดือน และ วิภา หงษ์ตระกูล. 2550a. การผสมพันธุ์บัวหลวงเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ และการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อการตรวจสอบพันธุ์. น. 155-159. ***ใน*** **รายงานการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 15 (สาขาพันธุศาสตร์กับการพัฒนาประเทศตามแนวทางเศรษฐกิจพอเพียง)**. มหาวิทยาลัยทักษิน, สงขลา.

_____วิภา หงษ์ตระกูล นิตย์ศรี แสงเดือน และ นิรันดร์ จันทวงศ์. 2550b. การศึกษาความหลากหลาย ทางพันธุกรรมของบัวหลวงโดยใช้เทคนิค AFLP. น. 19-24. ***ใน*** **รายงานการประชุมสัมมนา IWGS Annual Symposium 2007 เรื่องการพัฒนาบัวให้เป็นพืชเศรษฐกิจ ครั้งที่ 5.** สวนหลวง ร.9, กรุงเทพฯ.

_____วิภา หงษ์ตระกูล นิตย์ศรี แสงเดือน และ นิรันดร์ จันทวงศ์. 2551. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. น. 128-135. ***ใน*** **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 (สาขาวิทยาศาสตร์)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดวงจันทร์ เกรียงสุวรรณ. 2546. **บัวสายและบัวหลวง.** บทความวิทยุรายการสาระความรู้ทางการเกษตร. แหล่งที่มา**:** http://natres.psu.ac.th/radio/radio_article/radio45-46/45-460033.htm, 30 มกราคม 2555.

ดวงพร อังสุมาลี. 2543. **การจำแนกแวนด้าฟ้ามุ่ย แวนด้าแซนเดอเรียน่า และแวนด้าลูกผสมโดย RAPD**. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทีมข่าวการศึกษา. 2553. **สายพันธุ์ใหม่ของโลกบัวจันทร์โกเมนมีสามสีในหนึ่งดอก.** ไทยรัฐออนไลน์. แหล่งที่มา: http://www.korat3.go.th/index.php?option=com_content&view=article&id=100:3&catid=41:2010-01-08-20-06-06, 20 มิถุนายน 2553.

นันท์ บุรณศิริ. 2540. **บัวหลวง**. ไม้ดอกไม้ประดับ. แหล่งที่มา: http://www.searchthis.com/lotus2/ lotusindx/lotus.html, 30 มกราคม 2553.

บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล และ ลลิตา ธีระสิริ. 2551**. คนไทยใช้ประโยชน์จากบัวได้ทุกส่วน**. บัลวี ศูนย์ธรรมชาติบำบัด. แหล่งที่มา: www.balavi.com/content_th/ nanasara/Con00128.asp, 5 มีนาคม 2553.

ปางอุบล. 2540. **ไม้น้ำวงศ์บัว**. Thaiwaterlily.com. แหล่งที่มา: http://www.thaiwaterlily.com /knowledge.html, 26 กรกฎาคม 2552.

ปริมลาภ และเสริมลาภ วสุวัต. 2548. **บัวประดับในประเทศไทย**. บริษัทเนชั่นบุ๊คส์ อินเตอเนชั่นแนล จำกัด, กรุงเทพฯ.

ฝ่ายประชาสัมพันธ์ สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน). 2550. **บัวหลวงสีเหลือง**. แหล่งเรียนรู้วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. แหล่งที่มา: http://www.tint.or.th/nkc/nkc5004/nkc5004j.html, 6 ตุลาคม 2554.

พรรณไม้ไทย. 2545. **บัว Waterlily**. ไม้ประดับยอดนิยม. แหล่งที่มา: http://www.panmai.com/WaterLily/WaterLily.htm 18, 18 กุมภาพันธ์ 2551.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พาชินย์ ยศปัญญา. 2538. **รวมฮิตไม้ตัดดอกเมืองร้อน**. สำนักพิมพ์มติชน, กรุงเทพฯ.

ภาควิชาพฤกษาศาสตร์.2545. **การเจริญและการเติบโตของพืช.** Plant Biology. แหล่งที่มา**:** http://158.108.17.142/learn/student.php?lesson=lesson9&lesson_id=9&action=story_2_3&step=1, 21 กุมภาพันธุ์ 2555.

ภูริพันธ์ สุวรรณเมฆ. 2550. **บัวตอนที่ 1 การจำแนกบัวของไทย**.บัวพื้นเมืองของไทย. แหล่งที่มา: www.agriman.doae.go.th/home/news3/news3.../0014(Nelumbo).pdf, 7 ตุลาคม 2554.

มติชนกรุ๊ป. 2554. **ไม้ดอกไม้ประดับ**. มติชนบทเทคโนโลยีชาวบ้าน. แหล่งที่มา: http://info.matichon.co.th/techno/techno.php?srctag=05043150254&srcday=&search=no, 15 กุมภาพันธ์ 2554.

ลลิตา ธีระสิริ. 2551. **คนไทยใช้ประโยชน์จากบัวได้ทุกส่วน**. บัลวีศูนย์ธรรมชาติบำบัด. แหล่งที่มา: http://www.balavi.com/content_th/nanasara/Con00128.asp, 29 กรกฎาคม 2553.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2553. **สกุลบัวหลวง**. วิกิพีเดีย. แหล่งที่มา: http://th.wikipedia.org/wiki/สกุลบัวหลวง, 24 ธันวาคม 2553.

วัชระ บุญวิเศษ. 2543. **การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แหลมแก้ว และพันธุ์ลูกผสม**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, ภาควิชาพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิชัย ภูริปัญยาวานิช และ กนกพร บุญศิริชัย. 2550. **การศึกษาพันธุ์บัวฉายรังสี.** Wow with on web**.** แหล่งที่มา: http://www.wowthailand.org/index.php, 6 ตุลาคม 2554.

วิภา หงษ์ตระกูล กนกวรรณ แดงสวัสดิ์ เมทินี กลัดมุข ไพรัตน์ ทรงพานิช นิตย์ศรี แสงเดือน และนิรันดร์ จันทวงศ์. 2551. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงและการตรวจสอบลูกผสมในกลุ่มบัวหลวงและกลุ่มบัวประดับสกุลนิมเฟีย. น. 60-68. ***ใน* รายงานการประชุมสัมมนาวิชาการ เรื่อง "การพัฒนาบัวให้เป็นพืชเศรษฐกิจของชาติ" ครั้งที่ 6**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไวพจน์ กันจู. 2547. **การวิเคราะห์กรดไขมันและการประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในข้าวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะสำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สินันต์ธร. 2554. **"บัวประดับ" ...สวยแถมเสริมรายได้.** บทความส่งเสริมการเกษตร. แหล่งที่มา : pr.agritech.doae.go.th/article/2554/article%2017_sinuntorn.doc, 15 กรกฎาคม 2554.

เสริมลาภ วสุวัต. 2547. **บัวประดับในประเทศไทย**. บริษัทเนชั่นบุ๊คส์ อินเตอเนชั่นแนล จำกัด, กรุงเทพฯ.

สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2550. การจำแนกพันธุ์บัว, น 181-189. ใน **The Proceeding of IWGS Annual Symposium 2007**. ชมรมผู้รักบัวแห่งประเทศไทย, สวนหลวง ร.9.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**.พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Blair, M.W., O. Panaud and S.R. McCouch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice. **Theor. Appl. Genet**. 98: 780-792.

Borsch, T., C. Löhne, M. S. Mbaye and J. Wiersema. 2011. Towards a complete species tree of *Nymphaea*: shedding further light on subg. *Brachyceras* and its relationships to the Australian water-lilies. **Telopea.** 13(1–2): 193–217.

Busch, M.A., K. Bomblies and D. Weigel. 1999. Activity of a floral homeotic gene in Arabidopsis. **SCIENCE** 285: 585-587.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Caetano-Anolles, G. 1997. Resolving DNA Amplification Products using Polyacrylamide Gel Electriphoresis and Silver Staining, pp. 119-134. *In* R.M. Micheli and R. Bova, eds. **Fingerprinting methods based on PCR**. Springer-Verlag, Heidelberg.

Chen, Y., R. Zhou, X. Lin, K. Wu, X. Qian and S. Huang. 2008. ISSR analysis of genetic diversity in sacred lotus cultivars. **Aquat. Bot**. 89: 311-316.

Chenna, R., H. Sagawara, T. Koike, R. Lopez, T.J. Gibson, D.G. Higgins and J.D. Thompson. 2003. Multiple sequence alignment with the clustal series of programs**. Nucl. Acids Res**. 31: 3497-3500.

Dooner, H.K., T.P. Robbins and R.A. Jorgensen. 1991. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis**. Annu. Rev. Genet**. 25: 173-199.

Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 13-15.

Fang, D.Q. and M.L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. **Theor. Appl. Genet**. 95: 408-417.

Guo, H.B., S.M. Li, J. Peng and W.D. Ke. 2006. Genetic diversity of Nelumbo accessions revealed by RAPD. **Genet. Resour. Crop Evol**. 54:741-748.

Han, Y-C., C-Z. Teng, F-H. Chang, G. W.Robert, M-Q Zhou, Z-L. Hu and Y-C Song. 2000. Analyses of genetic relationships in *Nelumbo nucifera* using nuclear ribosomal ITS sequence data, ISSR and RAPD markers. **Aquat. Bot**. 80: 141-146.

_____, F. Chang, G.W. Robert, M. Zhou, Z. Hu, Y. Song. 2007. Analyses of genetic relationships in *Nelumbo nucifera* using nuclear ribosomal ITS sequence data, ISSR and RAPD makers. **Aquat. Bot**. 87: 141-146.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Intergrated Taxonomic Information System (ITIS). 2000. **Taxonomic Hierarchy**. Available source; http://www.itis.usda.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt, May 17, 2005.

Ji, Y. and G. Hongya. 2006. Duplication and divergent evolution of the *CHS* and *CHS*-like genes in the chalcone synthase (CHS) superfamily. **Chin. Sci. Bull.** 51: 505-509.

Kanazawa, A., S. Watanabe, T. Nakamoto, N. Tsutsumi and A. Hirai.1998. Phylogenetic relationships in the genus Nelumbo based on polymorphism and quantitative variations in mitochondrial DNA. **Genes Genet. Syst.** 73: 39-44.

Kubo, N., M. Hirai, A. Kaneko, D. Tanaka and K. Kasumi. 2009. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers in the water lotus (*Nelumbo nucifera*). **Aquat. Bot**. 90: 191-194.

Liu, Q., J. Feng, C. Buzin, C. Wen, G. Nozari, A. Mengos, V. Nguyen, J. Liu, L. Crawford, F. Fujimura and S. Sommer. 1999. Detection of virtually all mutations-SSCP (DOVAM-S): a rapid method for mutation scanning with virtually 100% sensitivity. **Biotechniques** . 26: 932-942.

Lto, Toshiro., K. Ng, T. Lim, Hao Yu and E. M. Meyerowitz. 2007. The Homeotic protein AGAMOUS controls late stamen development by regulating a jasmonate biosynthetic gene in Arabidopsis. **The Plant Cell** 19: 3516–3529.

Les, D. H., M. L. Moody, and A. S. Doran. 2004. A genetically cofirmed intersubgeneric hybrid in *Nymphaea* L. (Nymphaeaceae Salisb.). **Hortic. Sci.** 39: 219-222.

NA, A., G. Hong-bo and K. Wei-dong. 2009. Genetic variation in Rhizome Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.ssp.*nucifera*) germplasms from China assessed by RAPD markers. **GAAS**. 8(1): 31-39.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ouborg, N. J., W. P. Goodall-Copestake, P. Saumitou-Laprade, I. Bonnin and J. T. Epplen. 1999. Novel polymorphic microsatellite loci isolated from the yellow waterlily, *Nuphar lutea*. **Mol. Ecol**. 9: 489–504.

Pan, L., Z. Quan, S. Li, H. Liu, X. Huang, W. Ke and Y. Ding. 2007. Isolation and characterization of microsatellite markers in the sacred lotus (*Nelumbo nucefera* Gaertn.). **Mol. Ecol**. 7: 1054-1056.

Rai, S., A. Wahile, K. Mukherjee, B. P. Saha and P.K. Mukherjee. 2006. Antioxidant activation of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. **J. Ethnopharmacol**. 104: 322-327.

Shasany, A.K., M.P. Darokar, S. Dhawan, A.K. Gupta, A.K. Shukla, N.K. Patra and S.P.S. Khanuja. 2005. Use of RAPD and AFLP markers to identify inter- and Intraspecific hybrids of mentha. **J. Hered**.96: 542-549.

Samipak, S. 2009. The complex world of flower. **Thai J. Genet**. 2(2): 120-124.

Slocum, P.D. and P. Robinson.1996. Water Gardening: Water Lilies and Lotuses. Timber Press. Inc., Oregon. 322 p. **Theor. Appl. Genet**. 78: 321.

Songpanich, P. and V. Hongtrakul. 2010. Intersubgeneric cross in *Nymphaea spp*. L. to develop a blue hardy waterlily. **Sci. Hort.** 124: 475–481.

Tian, H-L., J-H. Xue, J. Wen, G. Mitchell and S-L. Zhou. 2008. Genetic diversity and relationships of lotus (*Nelumbo*) cultivars based on allozyme and ISSR markers. **Hortic. Sci**. 116: 421-429.

Davis, T. 2007. **Nymphaea_spontanea.** international Waterlily Collection, Available Source; http://www.internationalwaterlilycollection.com/The%20Plants/TropNight/spontanea/Nymphaea_spontanea.htm, December 20, 2011.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Viorela5. 2552. **Nymphaea lotus.** flickr yahoo, Available Source; http://www.flickr.com/photos/viorela5/3962171545/**,** December 20, 2011.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Fritjers, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nuc. Acid Res**. 23: 4407-4414

Wikipedia. 2007. **Nymphaea**. Nymphaea pubescens1MTFL.jpg, Available Source; http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nymphaea_pubescens1MTFL.jpg, December 20, 2011.

_____. 2007. **Nymphaea**. nymphaea rubra.jpg**,** Available Source; http://en.wikipedia.org/wiki/File:Nymphaea_pubescens1MTFL.jpg**,** December 20, 2011.

_____. 2012. **ABC model of flower development**. Wikipedia, the free encyclopedia**,** Available Source; http://en.wikipedia.org/wiki/ABC_model_of_flower_development, March 13, 2012.

Woods, K., K. W. Hilu, J. H. Wiersema, and T. Borsch. 2005. Pattern of variation and systematics of *Nymphaea odorata*: I. Evidence from morphology and inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs). **Syst. Botany**. 30(3): 471–480.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomes** 20:176-183.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวกที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับพันธุ์บัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* (N) และ *Brachyceras* (B) จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ AFLP (13 ลำดับนิวคลีโอไทด์)

>E-AAC/M-CAT_N_340

TCCGAAGAAAAAGAAAGAATTGTGAATTGGATGATCTGTACTAGACGATCCAAGGAGT
TCTATGGTAAGTTATTCGTATCTGGAAAAGGGGTAGTAGACCTTTTTTCATGCTTGAAC
CCTGATGGTGAGGCGATAAAGCATAAATAAAATGCCAGGAGTCCAAGGTAAGTATAT
GTGGATCATCGGGCGCTCTTCCTTTCTTATGCGTAGCCTCTCCAAGGTTACTACAGTAT
AAAGTTGTATCTACTCTACATAATAGCAGAACGACTCCCCCTTTGAACAGTAAAGAGG
GAAAGAAATAAAATAGGGATTGTTGCTCCTCATTGTAATATCCATAATG

>E-AAC/M-CTA_N_481

CCCAGCTGCAGACTTTGAGACTCCCGTCTGCCCCTCTACTGAACAACCATCTAATGTGA
AGGAGACCGGGAACTGCAATGTTCAAGAAAATGAAAATGAACGAGGAACAGCGGACA
CAGTGAATAATGTGAAAAAGAAGGATTCTCGTGACCAAAGACGGACTCGGGCCAACT
GCATACTTGAGGAGAAAAGGAAGAAAAGGCGGTTAGGGGGGAATGTGGCATCTCTTG
GTATGCAAGCACCTGCTGCAAATACTACTCAGGTGAGTGTATGTATATGGTTGTGGAT
GTGAGCATCCATGCATGCGTTTGGGGTTTCTACAAATATCTGTTCTTTGGTATAGCTAG
CAATTTTGAATATCTTTGGTTTTCTCTTCCGCTCAGGGAACGGCGATGCATGTAATGCC
CTGGGGTGTTCAATATTCCCAGCAAATGAGTACAACTGAAAACCCAAGGTATGGATAA
AATATATACTGTAATGC

>E-AAG/M-CAT_N_316

GTAATGCCTTTTGGACTGACAAATGCCCCTGCTACGTTTCAGTCATTGATGAATGATAT
TTTTCGACCCCATTTGGGACGCTTTGTGCTTGTGTTCCTCGACGGCATTCTGATTTACAG
CAAGAAGTGGGAAGATCATTGGGAACACCTTCGCATAGTTTTCCAGTTATTACTACAA
CATAAACTGTTTGCTAAGGGATCGAAGTGTGAACTAGCCAAAAAGGAAGTTGTATACC
TGGGACACATAATCAGCAATGGTGAAGTAAGGATGGAAAGAGATAAGGTCCAAGCCG
TACGGGGATGGCTGGCCCCAATGA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

>E-ACA/M-CTG_N_519

TCAACCAATGATTGCCTACTTATAAGAAGAAAAAGAACATCGAAAACTGGTAAAAAC
GTACAACACCTGCAGCCACGATATACTGAGCCCCTGATAGAGCAAGCACCGTGGCACA
AAGATGCATCAGGGAACGTACTTGTGCACCCCCATGCTGTTTGTTAGTTGTCACTCACA
TTCCGGTCTCAGTCATGGGGAAGCAGGCTAAGAAACGTCACAAGAAACTGATACAACA
TTAGAAAGGTAAACAAATAAAAATAAAAGGCATTTATATCCAAATTTCAGATATGGTC
TACTAAGATCTGAAACTGTGCAAAAGCTGCATCCTACTGCTTCATTATCTGCTGTAGCT
GCAATAAGCTCCATTTCCTCTCCATGATACTTGTTGAACAAATGGACTAGCATATGACA
GATTCACCAAATGAAGATATAAACAAGAAACTCCAAAACCAAGAATAAGAAAAAAAA
CACTCATGTATCAAC

>E-AGC/M-CAG_N_637

GCTTCATGGAGAGAAGAAGACTCTGCTTCCTTAGATACACTTGTTAGAAACGTCTGAA
AATCCAAAGAGAAATTATTATAACTAACCCAGCGATCTATAGGATGTCGAATCCGAGT
AGAGCGACGTAAAGAAACCTCATCGTTGACAGGATGAGCCCTACGAGAGTAAACATG
ATCAGAGAAACGTGAAGAACGTGAAGATGATGCAGACTGTGCTGTAAGAGTAGTATC
CTCATCATGTGGATCTCTATCAGAGTCTTGAGCTGTACTGTCTACCTGTAAGGGTGAAC
TTGTGGATCTCCAAGCATCATATAAAAGAGTCACTAAGCCATGGATCATAGCTTTCCTG
GGAATCTGAAGGAGGTACACCTTGTATTGCAAAGTTTGTATCATCAAAAATGACATTC
CTAGAGACCTGAATTTTACCTGTAATAGGATCATAGCATCGGTAGCCCTTGTACTCATC
TGCATATCCAAGAAATTTGCACTGTATTGCCCTATCTTGAAACTTGTTTCTTAGTGAAT
GATCAACATGAACATAACATACACAACCAAAAGGATGTAGGTCATCGTAGAGTGGAT
GTCGATTGTAGAGAGCATAATATAGTGATTGATCTTGAAGTATGTTCATAGGCAAC

>E-ACA/M-CAA_N_457

ACCACAACATGAGGCGCCAACACTACAATAGACCCAAAATCTCCCCCAGTAGGATGTG
AGTCAAGCCATCTGATCAACCTGCTGCCCCGGGTCTGCCAAAACCTGAAAAGTAAACA
ACGGAAGACTTAGCCTTCACAGTATGGTAGCATACCAGATAAATCCCTAACCCCCTAA
GGTAAGTGCTCAAATTGAAAAATGCAGCATATATAACAAACATATACACTATCACTTC
ATTCACATTCTTTTCACATACAATCTTTCAATTTCATTAGCTTTAGTGAATTGACAGTTC
CTGTGAGTGCAAACACAGGCACGTGCACACCACGAGCGACCTACAGTCGGGAGACAA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

CCCCCGTGGTGGCCCAAAACAATACGGATCCGTTCACACTGTAGCGGTAGAGCACTCG
TCCAAGGATAT

>E-ACA/M-CAG_N_197
GACGTTTTTTCTTTCTCATTATATTTCTAGACTTTTTTCCTTAGTTACGAATAAATGAAA
AGAATGTGTGATGCAGGGGAAGCACAATAAAGACGGGTCAGAATCAGATCCGGTATA
ATAATCGGATCCGTATCAAGGGTGTACCTCCTGGTAGGTATGT

>E-ACG/M-CTT_N_572
GATGAGTCCTGAGTAACTTAGGAGATGTGAGTTTTCAAAACATGAGACAAATTCATCT
CTCTCTATCTCTCACCACAAACCTCTCTCTCTCTCCCGTGCATTACGATTTTGTACCT
TTGAGCACTTTGTACTGCTTGTCTCTCTGCCTTTTAGGTTGTGAATATGCTGCAACATTA
TTCTTTGTCCTCAAGGTAGCATTTGCTGCGCGTCAGCTTTCACATCCAGCCGCGTGCAA
CTACTGTCATGGATTTCTCGGGCACCCATGACGCGCTTCAACAAGTACCTGGTAAACTA
ATCAAAACATGGTTCCATTCAGTTGGACTCGACTGGTTTACATGTATAGTGTCTCTCGA
GGCCATAATTCCTTCCTCAAACCCATAAGAAGAAGATCATTTGGGCCAAGCTAGCAAG
AAGTTTGAAGGGAAGGTATTCAATGCGCGGCCCGGAGTTGGATGACTTTTGGATCTTG
GTTGGTGGAAGAAGAGGTGTGTGAAAGATTCCATCGTCAATTTAGCCATCTAGTCATG
GACGGAGACCTTACCATCAAACCCGT

>E-AGG/M-CAG_N_500
GATGAGTCCTGAGTAACAGCAAAAGAGTCATAAGTACCACGCTCAAGTAACCAAGCCC
AATAGGTCTAACATACAAATTCAGCTGGTTACTACTTGACTTCAGGACACCAGTATCCA
ACAGTGAACAAACAACAATTTGAATTTTGATCAGAAAGGTTGCAAGTAAATAATAGAC
TAACCTTTTCCCTTCTGAGAAAATCCTTGTTGGCTGTTGTTGCAGAGATGATAGCCAAC
ATGACTATCAGCTTCATCGAACTTTACTTTGTTTTATCACTTGAATACCTATCAACAATT
TGAATTGGATTCTTTCGCTGATCATGCAAAGTGCAAATCTTTATCAGCTAGCAACTTCT
GCCTTCGATGTAAACCCCCTTATTGGTGATACCTAGTAGAAAGACTTTCTCCAAAAAAG
CTTCATCCAACATTCCTCCAGTGTGGAACCATTTCTTTTAGAACTTGTACAACCTAGTC
CTTCCCAGACCTGAATTGGTACGCAGTCA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

>E-AGG/M-CTG_N_648

GATGAGTCCTGAGTAACTGTCTAGATGCGTAGGCCACTACGCAGCCACGTTGCATCAG
TACACATCCATAACCGACCCCTGATGCATCGGTGTACACTACAAATCCAGAATGACCC
GAGGGAAGTGTCAAAACAGGTGCCGTGGTAAGTTTGTCCTTCAAAACTTGAAAACTCG
TTTCACATTCATCGTTCCAAACAAACTTTACTCCTTTTCTCAATAGCTTTGTCATGGGTG
CAGCTATTTTCGAAAAGTCTTGTATAAACCTGCGGTAATACCCTGCCAATCCCAAAAA
GCTCCTTATTTCAGTGATGTTGCATGGTGTCTTCCAATCCTGTACTGCCGACACCTTATC
TGGGTCGACTGAAACTCCATCCTTGGAAATCACGTGACCAAGGAAGTTTACCTTCTCTA
GCCAAAATTCGCATTTTGAATACTTGGCATACAATTTATGCTTGCGCAAGATACCTAAC
ACACTCCTCAAGTGATCCCGGTGCTCTGCCTCACTATCTGAGTATACCAAAATATCATC
CACGAAGACGATAACAGACCGATCCAAGCAGTCATGAAACACCCGATTCATGAGATCC
ATAAAAGCTGCAGGAGCATTGGTCAACCCAAATGGCATGACCCTGAATTGGTACGCAG
TCA

>E-AGG/M-CAT_B_286

GAGCCGCTGGTCGGATGGTGCTGGGTGTGGCCGATGTTCTTGAAGATCTTGAAGATGT
TGCTGACGCCGAAGAAGTGGTGGGCGTTGGGAAACTGCTTCTGCTGGTCAGGCGGTAA
GTAGCAAGGCACTTCCTGCGCTGGTATTTGCACGAGGCACAGGTCTGGCTACCATTGTC
GCCAGCCTTGCCATTGTCCAGAGGGTGCTGGAAGAGGACAGCTTCCTGAAGACGGTAA
AGCTTTGTTACCAGCAAGCTCTGTTCCTAGTAACTAACCAGAGCTCTGATACC

>E-ACG/M-CAA_293_B

TGAGTAACAACATGCTTCCAAACACACCACAAAGCAACTAGGTCTTGGTATGCCCATG
CTGAAGAGGCGACTGGGTCTCAGGCTACCTATGTCGGAGAAGCGACTAGGACTTCTCT
ACCCATGCCGAAGAGGCGATTGGATCTTATATTGTGTCGATGTCTTTTATCAACTTGAC
ACCATAACCCTTAGGCTCTGGGAGTGACTCGCGGTCCTCTCTCCAGTTCGTCATCCTTT
TTGATAAGCTCAATGATCTTGTGGACTTAGTAGTTTTTCAATTACGTTGGAGTCGTGAA

>E-AGC/M-CAT_287_B

ATCCTACAAAAGAAAATAAGAGATAAATTCAGTACCCATGTCACATATGTAATTTGTT
ATCATGTCAAATGACAAAAATATAATGGAAATATATGTTATTATAATACCTAAAACAT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ATCATCAAGTTCAACATTTTCATCATCATCATCCCTACTATTTGATTCTTCAGCCTCTTC
TAACAAGCTTGACCCTGAAGAAGCACCTAATAAGCTTGATCCCCCTACATACAATTGG
AAAATCTATTAGAGAAAAATCAATGAATCATATATGTTACTCAGGACTCATCA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวจีรภา ดาทอง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	18 สิงหาคม 2529
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) สาขาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต บางเขน (พ.ศ. 2552)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-ทุนบัณฑิตศึกษาคณะวิทยาศาสตร์ปี 2552-2553 -ทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2551-2552

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์