



วิทยานิพนธ์

การศึกษาดายพิมพ์ดีเอ็นเอและการตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวหลวง

STUDY ON DNA FINGERPRINT AND HYBRID DETECTION
OF *Nelumbo nucifera* (Gaertn.)

นางสาวกนกวรรณ แดงสวัสดิ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

สาขา

พันธุศาสตร์

ภาควิชา

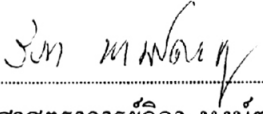
เรื่อง การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวหลวง

Study on DNA Fingerprint and Hybrid Detection of *Nelumbo nucifera* (Gaertn.)

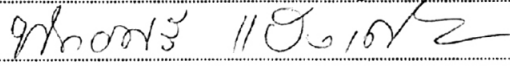
นามผู้วิจัย นางสาวกนกวรรณ แดงสวัสดิ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

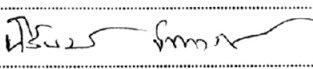
ประธานกรรมการ

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภา หงษ์ตระกูล, Ph.D.)

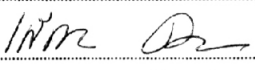
กรรมการ

( รองศาสตราจารย์นิศย์ศรี แสงเดือน, Ph.D.)

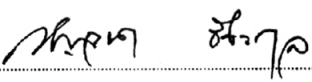
กรรมการ

( รองศาสตราจารย์นิรันดร์ จันทวงศ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

( รองศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 5 เดือน มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๕๑

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวหลวง

Study on DNA Fingerprint and Hybrid Detection of *Nelumbo nucifera* (Gaertn.)

โดย

นางสาวกนกวรรณ แดงสวัสดิ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2551

กนกวรรณ แดงสวัสดิ์ 2551: การศึกษาสายพืชมัลติเอ็นเอและการตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวหลวง
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ ประธาน
กรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภา หงษ์ตระกูล, Ph.D 139 หน้า

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวง 61 ตัวอย่าง ที่รวบรวมจากประเทศไทยและ
ต่างประเทศ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ 7 ชนิด พบว่าให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 61 แถบหรือ markers
เป็น polymorphic markers 85.25 เปอร์เซ็นต์ มีค่า PICs (Polymorphic Information Contents) อยู่ในช่วง
0.000-0.4994 และค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.2303 เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc- 2.20k
พบว่าสามารถแบ่งบัวหลวงทั้ง 61 ตัวอย่างได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ โดยบัวหลวงจากจีน ได้หวั่น และญี่ปุ่น
กระจายอยู่ในกลุ่มเดียวกับบัวหลวงของไทย ยังไม่สามารถแยกบัวหลวงของไทยและต่างประเทศได้ การ
วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวง 46 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคเอฟแอลพีโดยใช้ไพรเมอร์
EcoRI-MseI จำนวน 10 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 483 แถบหรือ markers เป็น polymorphic markers 117
markers มีค่า PICs อยู่ในช่วง 0.000-0.4915 และค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.0459 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง
พันธุกรรมและจัดกลุ่มบัวหลวงทั้ง 46 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างที่ศึกษาได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่ม
แรกเป็นบัวหลวงของประเทศไทย ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อย และกลุ่มที่ 2 แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย เป็นบัวหลวงจาก
ต่างประเทศ 2 กลุ่ม และเป็นกลุ่มลูกผสมอีก 1 กลุ่ม เครื่องหมายโมเลกุลประเภท Allele Specific - PCR
(AS-PCR) และ Single Strand Conformational Polymorphisms (SSCPs) ที่ถูกพัฒนาขึ้นมาให้จำเพาะกับยีน 4
ยีน ได้แก่ *chalcone synthase*, *storage protein*, *fruitfull protein* และบริเวณไอทีเอสของ *rRNA* (ITS of *rRNA*)
เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างบัวหลวง 40 ตัวอย่าง พบเฉพาะเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะ
กับ *fruitfull protein* เท่านั้น ที่ให้ความหลากหลายระหว่างตัวอย่างที่ศึกษา การตรวจสอบลูกผสมที่ได้จากพันธุ์
บัวหลวงปทุม สามร้อยยอด (พ่อ) กับบัวหลวงปทุมขจร คลองโยง (แม่) โดยเทคนิคอาร์เอพีดี แสดงความเป็นไป
ได้ของความเป็นลูกผสม เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างซันดิเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอส พบว่าพ่อมี
ลักษณะเป็นเฮเทอโรไซกัสและแม่มีลักษณะเป็นโฮโมไซกัส ให้ข้อมูลสนับสนุนความเป็นลูกผสมที่เกิดจากพ่อ
แมดังกล่าว การศึกษาความมีชีวิตของเรณูซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการผสมพันธุ์บัว พบว่าเปอร์เซ็นต์
ความมีชีวิตของเรณูลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังเก็บไว้ประมาณ 3, 6 และ 9-12 วัน ที่อุณหภูมิ 25 , 4 และ -20
องศาเซลเซียส ตามลำดับ

กนกวรรณ แดงสวัสดิ์

ลายมือชื่อนิติ

กนก แดงสวัสดิ์

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

24 / 05 / 51

Kanokwan Dangswat 2008: Study on DNA Fingerprint and Hybrid Detection of *Nelumbo nucifera* (Gaertn.). Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Assistant Professor Vipra Hongtrakul, Ph.D. 139 pages.

Genetic diversity among 61 lotus samples collected from Thailand and foreign countries was studied using 7 RAPD primers. A total of 61 bands or markers were generated. Polymorphic markers were 85.25%. Polymorphic Information Contents (PICs) ranged from 0.000-0.4994 with an average PIC score of 0.2303. Cluster analysis using computer program NTSYSpc-2.20k based on all RAPD data was determined and could classified all 61 lotus samples into 4 distinct groups. Samples from China, Taiwan, Japan Thailand were still clustered in the same group. Genetic diversity among 46 lotus samples was also estimated using 10 AFLP (*EcoRI-MseI*) primer pairs. A total of 483 bands or markers were produced. Among these markers 117 markers were found to be polymorphic. PICs ranged from 0.000-0.4915 with average PIC score of 0.0459. Genetic relationship among 46 lotus samples was analysed and could classified all 46 lotus samples into 2 major groups. Group I was composed of 3 subgroups, containing all lotus samples from Thailand. Group II was also composed of 3 subgroups. Subgroups I and II consisted of samples from foreign countries and subgroup III was all hybrid progenies. Allele Specific-PCR (AS-PCR) and Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) were developed specific for 4 specific *chalcone synthase*, *storage protein*, *fruitfull protein* and ITS of *rRNA* and used to estimate genetic variation among 40 selected lotus samples. *Fruitfull protein* specific marker was found to be polymorphic. Detection of lotus hybrids derived from Bua Laung Patum Samroi-yod and Bua Laung Buntharica Klongyong by RAPD technique showed the possibility of hybridity. From nuclear ribosomal internally transcribed spacer (nrITS) sequence information, male parent was shown to be heterozygous but female was homozygous and the sequences could be used to support the hybridity of their derived hybrid progenies. Study on one of important breeding factors, pollen viability, revealed that percent of viable pollen was 50% reduction after storing pollens for 3, 6 and 9-12 days at 25°C, 4°C and -20°C, respectively.

Kanokwan Dangswat

Student's signature

Vipra Hongtrakul

Thesis Advisor's signature

24 / 05 / 08

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้โดยได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ดร.วิภา หงษ์ตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาที่ได้แนะนำและให้คำปรึกษาถึงหัวข้อวิทยานิพนธ์ วิธีการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนการประเมินการทดลอง รวมถึงตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. นิตยศรี แสงเดือน รศ. ดร. นิรันดร์ จันทวงศ์ กรรมการ และ ผศ. พิรุณ จอมพุก ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความคิดเห็น ข้อเสนอแนะ และช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คณะอาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาสั่งสอนอบรม และถ่ายทอดวิชาความรู้อย่างดีเสมอมา

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่าน เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ในภาควิชาพันธุศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ ให้คำปรึกษาแนะนำ และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2547-48 และสำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีปี 2549 ที่ให้ทุนอุดหนุนงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ พ่อและแม่ ผู้เป็นที่รักและกำลังใจที่ยิ่งใหญ่ของข้าพเจ้าใน ทุก ๆ ด้านเสมอมา

กนกวรรณ แดงสวัสดิ์

กุมภาพันธ์ 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	33
อุปกรณ์	33
วิธีการ	41
ผลและวิจารณ์	61
สรุปและข้อเสนอแนะ	114
สรุป	114
ข้อเสนอแนะ	116
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	117
ภาคผนวก	126
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	139

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	รายชื่อพันธุ์บัวหลวงที่ใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี
2	รายชื่อพันธุ์ของบัวหลวงที่ใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี
3	รายชื่อพันธุ์บัวหลวงที่ใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอสเอสซีพี
4	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี
5	องค์ประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในเทคนิคอาร์เอพีดี
6	องค์ประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา preselective amplification
7	องค์ประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา selective amplification
8	ลำดับเบสของไพรเมอร์และ adapter ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี
9	องค์ประกอบที่ใช้ในการสังเคราะห์ปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อการตรวจสอบโดยเทคนิคเอสเอสซีพี
10	สารที่ใช้เตรียมเจล non-denaturing polyacrylamide ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์
11	องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ใช้ในการสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอทีเอส
12	องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ใช้ในการตรวจยืนยันชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในพลาสติกสายผสม
13	ความมีชีวิตของเรณู (pollen viability) ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25, 4 และ -20 องศาเซลเซียส ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
14	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับเทคนิคอาร์เอพีดี จำนวนแถบดีเอ็นเอจากแต่ละไพรเมอร์ และแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism
15	คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวงด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
16	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเทคนิคแอฟแฟลฟี่ จำนวนแถบ ดีเอ็นเอจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงทั้ง 46 ตัวอย่าง และจำนวนแถบ ดีเอ็นเอที่ทำให้ polymorphism	80
17	ไพรเมอร์จำเพาะของยีนที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบัวหลวง	93
18	สรุปจำนวนรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของยีน <i>chalcone synthase</i> , <i>storage protein</i> , <i>fruitfull protein</i> , ITS และ ITS2 ในบัวหลวง 40 ตัวอย่าง และค่า PICs ที่ได้จาก การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอสพีซีอาร์และเอสเอสซีพี	96
19	เปรียบเทียบชนิดของแอลลีลตามรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอทีเอส	113

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	บัวจำแนกตามสกุล นิลัมโบ (<i>Nelumbo</i>) สกุลนิมเฟีย (<i>Nymphaea</i>) และ สกุล วิกตอเรีย (<i>Victoria</i>)	6
2	ลักษณะดอกของบัวหลวงปทุม บัวหลวงจีน บัวหลวงสัตตบงกช บัวหลวง บุญทริก บัวหลวงสัตตบุษย์ บัวหลวงปักกิ่งสีขาว และ <i>Nelumbo lutea</i> Pers.	10
3	โครงสร้างของ rDNA repeat unit ในนิวเคลียส	30
4	บัวที่ใช้เป็นพ่อแม่ในการผสมพันธุ์ บัวแหลมแดง จากสามร้อยยอด จ.ประจวบคีรีขันธ์ และบัวแหลมขาว จาก อ. คลองโยง จ.นครปฐม	61
5	ฝักบัวที่ได้รับการผสม และต้นลูกผสมจากการเพาะเมล็ด	61
6	ความมีชีวิตของเรณูที่ย้อมด้วยอะซีโตคาร์มิน 1 เปอร์เซ็นต์ กำลังขยาย 400 เท่า	62
7	ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนวันที่เก็บตัวอย่างและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของ เรณูในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ	64
8	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์บัวหลวงพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งในประเทศและ ต่างประเทศ ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-01	68
9	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์บัวหลวงพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งในประเทศและ ต่างประเทศ ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-20	70
10	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์บัวหลวงพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งในประเทศและ ต่างประเทศ ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPF-19	72
11	Phylogenetic tree ของบัวหลวงสร้างโดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้ Neighbour - Joining ในโปรแกรม NTSYS pc-2.20k	74
12	Principal Component Analysis (PCA) ของบัวหลวงที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc-2.20k โดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคอาร์เอพีดี	76
13	รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี ของบัวที่ใช้เป็นพ่อ แม่ และ ลูกผสม	78

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์บัพห้วงพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ E-AAC และ M-CAT	83
15	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์บัพห้วงพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ E-ACT และ M-CAA	85
16	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์บัพห้วงพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ E-CAC และ M-AAT	87
17	Phylogenetic tree ของบัพห้วงสร้างโดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยใช้ Neighbour-joining ในโปรแกรม NTSYS pc-2.20k	89
18	Principal Component Analysis (PCA) ของบัพห้วงที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS pc-2.20k โดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคเอเอฟแอลพี	91
19	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัพห้วงพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งจากในประเทศและต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน <i>chalcone synthase</i> ด้วยเทคนิค AS-PCR และเทคนิคเอสเอสซีพี	97
20	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัพห้วงพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งจากในประเทศและต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน <i>storage protein</i> ด้วยเทคนิค AS-PCR และเทคนิคเอสเอสซีพี	99
21	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัพห้วงพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งจากในประเทศและต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับ ITS ด้วยเทคนิค AS-PCR และเทคนิคเอสเอสซีพี	101
22	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัพห้วงพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งจากในประเทศและต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับ ITS2 ด้วยเทคนิค AS-PCR และเทคนิคเอสเอสซีพี	103
23	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัพห้วงพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งจากในประเทศและ ต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน <i>fruitfull protein</i> ด้วย เทคนิค AS-PCR และเทคนิคเอสเอสซีพี	105

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
24	ลำดับเบสบางส่วน (598 เบส) ของยีน <i>chalcone synthase (chs)</i> ของบัวหลวง พระราชินี	107
25	ลำดับเบสบางส่วน (817 เบส) ของยีน <i>storage protein (sp)</i> ของบัวหลวง พระราชินี	107
26	Multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไอทีเอสทั้ง 11 แบบ	109
27	Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอลลีลของพ่อ แม่ และลูกผสม โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไอทีเอส	112

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFLP	=	Amplified Fragment Length Polymorphisms
AS-PCR	=	Allele specific-PCR
ISSR	=	Inter Simple Sequence Repeat
ITS	=	Internal Transcribed Spacer
nrITS	=	nuclear ribosomal Internally Transcribed Spacer
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PICs	=	Polymorphic Information Contents
RAPD	=	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	=	Restriction Fragment Length Polymorphism
SSCPs	=	Single Strand Conformation Polymorphisms
SSR	=	Simple Sequence Repeat
T _a	=	annealing temperature
T _m	=	melting temperature

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและการตรวจสอบพันธุ์ลูกผสมบัวหลวง

Study on DNA Fingerprint and Hybrid Detection of *Nelumbo nucifera* (Gaertn.)

คำนำ

บัวเป็นดอกไม้ที่เกี่ยวข้องกับพระพุทธศาสนาตั้งแต่สมัยพุทธกาล ชาวพุทธนิยมใช้ดอกบัวในพิธีกรรมทางศาสนา ถือเป็นสัญลักษณ์ของความบริสุทธิ์ ในประเทศไทยบัวนับเป็นดอกไม้ที่ตลาดมีความต้องการสม่ำเสมอและต้องการปริมาณมากโดยเฉพาะในวันพระหรือในวันสำคัญทางศาสนา นอกจากจะใช้ประโยชน์ในแง่ไม้ตัดดอกแล้ว ยังสามารถปลูกบัวเพื่อเก็บเมล็ด ขยายฝักอ่อน ขยายส่วนของไหลหรือรากบัว ขยายส่วนก้านใบ หรือสายบัว และยังนิยมปลูกเป็นไม้ประดับที่สวยงาม สรรพคุณของบัวมีมากมาย เหง้ามีรสหวาน ช่วยบำรุงหัวใจ แก้ร้อนใน ดอกมีรสฝาด ช่วยบำรุงครรภ์ แก้ไข้ เกสรมีรสฝาด แก้ท้องร่วง สมานแผล เมล็ดรสหวานมัน ช่วยบำรุงหัวใจ ดิบัวรสขม ช่วยขยายหลอดเลือดในหัวใจ บำรุงหัวใจ ใบอ่อน (ใบกลม) รสฝาดเปรี้ยว แก้ดีซ่าน ไหลบัว ช่วยบำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย นอกจากนี้ส่วนต่าง ๆ ของบวียังนำมาใช้ประกอบอาหารนานมาแล้ว เช่น สายบัว รากบัว ฝักบัว ใบอ่อนใช้รับประทานสดจิ้มน้ำพริก กลีบบัว เกสรบัวใช้ทำเครื่องดื่ม ใบโตเต็มที่ยกขึ้นข้างแก้ม ใช้ห่ออาหาร ข้าวห่อใบบัว (www.rspg.thaigov.net/homklindokmai/budhabot/bua.htm)

ในอดีตที่ผ่านมาเกษตรกรพยายามจะปลูกบัวหลวงขยายแต่ไม่เป็นที่แพร่หลาย ในขณะที่ปัจจุบันมีการนำเข้าเมล็ดบัวจากประเทศจีนจำนวนมาก เนื่องจากเมล็ดบัวในประเทศมีคุณภาพยังไม่ดีพอ เพราะเกษตรกรเก็บเมล็ดบัวที่เกิดในธรรมชาติ ซึ่งมีแมลงศัตรูพืชทำลายเป็นจำนวนมาก ถ้าได้มีการนำบัวหลวงมาพัฒนาพันธุ์ ปรับปรุงวิธีการปลูกที่ถูกต้อง จะกลายเป็นอาชีพที่ทำรายได้แก่เกษตรกรในประเทศได้ (พรณีย์, 2546)

บัวหลวงเป็นพืชที่มีประโยชน์ และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ข้อมูลด้านการผสมพันธุ์และการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อการตรวจสอบพันธุ์ ยังไม่มีผู้รายงานไว้ มีเพียงรายงานของกัญญา (2542) ที่ได้ศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์ ซึ่งเป็นเครื่องหมายโปรตีน (protein marker) ของบัวหลวง และพบว่าสามารถใช้เครื่องหมาย (marker) นี้ในการจำแนกพันธุ์บัวหลวงบางพันธุ์ได้ จึงน่าจะมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ มาตรวจสอบความจำเพาะของสายพันธุ์ สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

จำเพาะของบัวหลวงสายพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อการตรวจสอบพันธุ์ลูกผสม และทดลองผสมพันธุ์บัวหลวง
จากสายพันธุ์ดีที่มีอยู่ เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ และตรวจสอบพันธุ์ด้วยเครื่องหมาย
ดีเอ็นเอต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดลองผสมพันธุ์บัวหลวงสายพันธุ์ที่มีในประเทศไทย เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์
2. เพื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงจากในประเทศไทย และต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการตรวจสอบพันธุ์บัวหลวงลูกผสมในอนาคต

การตรวจเอกสาร

คนไทยรู้จักพรรณไม้น้ำที่เรียกว่า “บัว” มานานมาก มีการนำบัวมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายโดยเฉพาะพุทธศาสนิกชน นิยมนำดอกบัวมาใช้บูชาพระและประกอบพิธีทางศาสนา แม้แต่ในประเทศอินเดียซึ่งเป็นที่กำเนิดของศาสนาพุทธก็ใช้ดอกบัวเป็นดอกไม้ประจำศาสนาพุทธและประจำชาติด้วย จึงได้มีการตั้งชื่อว่า Sacred Lotus, Hindu lotus หรือ Indian lotus นอกจากนี้ยังได้มีการบันทึกในหนังสือจากประเทศจีนไว้ว่า บัวหลวงเป็นพืชที่มีมานานถึง 135 ล้านปีมาแล้ว กระจายอยู่ในทวีปใหญ่ ๆ ทั่วโลกคือ ทวีปเอเชีย ทวีปออสเตรเลีย ทวีปอเมริกาเหนือ และทวีปแอฟริกาใต้ สำหรับในเมืองไทยนั้น สามารถพบต้นบัวหลวงได้ตั้งแต่ภาคเหนือไปจนถึงภาคใต้ บัวสายก็เช่นกัน เป็นพืชที่มีกำเนิดมานานแล้วเป็นพันธุ์ไม้พื้นเมืองที่มีอยู่ทั่วโลก เมื่อประมาณ 4,000 ปีมาแล้วพบว่าในลุ่มแม่น้ำไนล์มีบัวชนิดต่าง ๆ ขึ้นอยู่ มีผู้พบดอกบัวสีขาวฝังอยู่ในสุสานของกษัตริย์รามาสและตุตันคาเมน ชาวอียิปต์พบเห็นดอกบัวและกอบัวแตกใบและดอกอยู่ตลอดเวลา ซึ่งเป็นสัญลักษณ์ของความอุดมสมบูรณ์ ถือว่าเป็นดอกไม้ประจำชาติของอียิปต์ และได้เป็นดอกไม้ศักดิ์สิทธิ์บูชาเทพเจ้า จึงได้ชื่อว่า “บัวศักดิ์สิทธิ์แห่งอียิปต์” (The Sacred Lotus of Egypt) พืชในวงศ์บัวเป็นกลุ่มพันธุ์พืชที่อยู่ในน้ำทั้งหมด เดิมนักพฤกษศาสตร์ได้รวมเอาบัวหลวงและบัวสายไว้ในวงศ์ Nymphaeaceae ซึ่งมี 7 สกุลคือ *Nymphaea*, *Nelumbo*, *Victoria*, *Barclaya*, *Nyphar*, *Euryale* และ *Ondinea* ขณะนี้นักพฤกษศาสตร์ได้แยกบัวหลวงออกเป็นวงศ์ Nelumbonaceae ส่วนสกุลอื่น ๆ นั้นยังคงอยู่ในวงศ์ Nymphaeaceae (สุชาติ, 2550)

1. การจำแนกประเภทของบัว

1.1 การจัดจำแนกตามถิ่นกำเนิด การเจริญเติบโต แบ่งได้ 2 ประเภท คือ

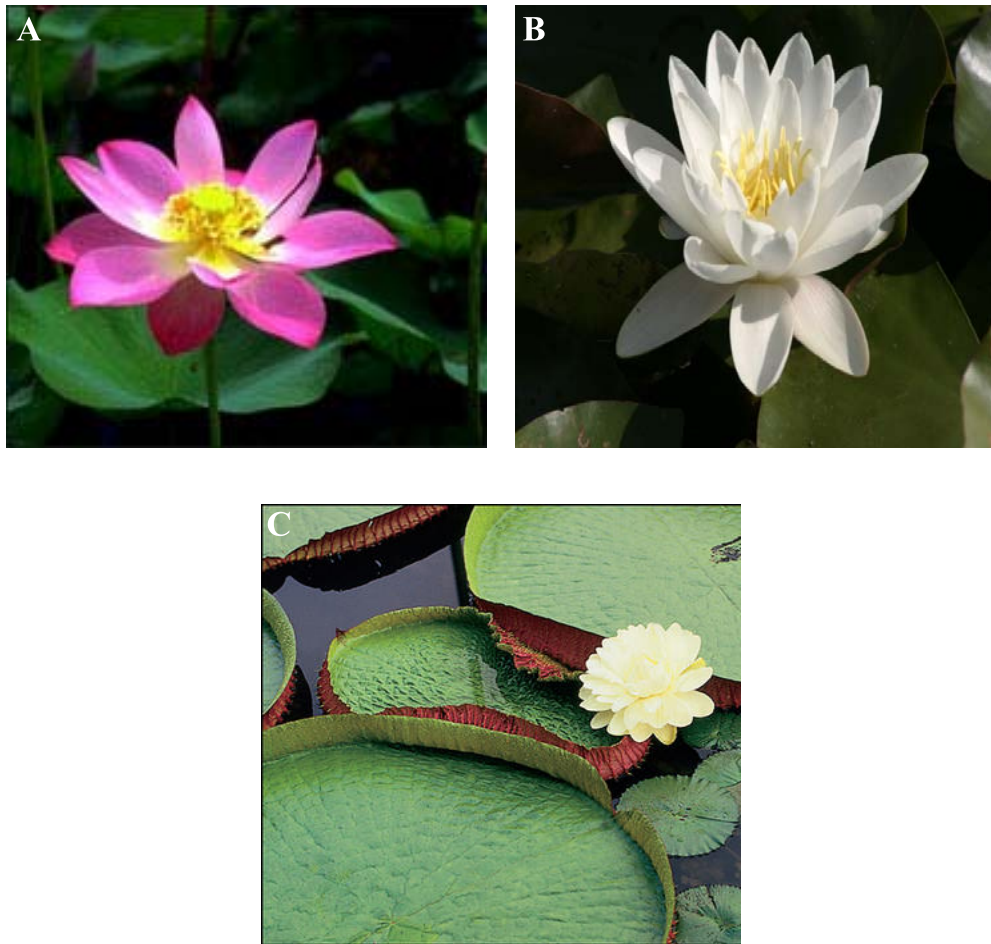
1.1.1 บัวที่เกิดจากการเจริญเติบโตในเขตอบอุ่นและเขตหนาว (Subtropical and temperate zones) เช่น ยุโรป อเมริกาเหนือ ภาคใต้ของอเมริกาใต้ ตอนเหนือของอินเดีย จีนและออสเตรเลีย บัวประเภทนี้มีเหง้าสะสมอาหารอยู่ในดิน เมื่อถึงฤดูหนาวผิวหน้าของน้ำเป็นน้ำแข็ง จะทิ้งใบและอาศัยอาหารในเหง้าเลี้ยงตัวเอง เมื่อเข้าฤดูใบไม้ผลิน้ำแข็งละลายหมดก็จะเจริญแตกหน่อเป็นต้นใหม่ และจะเจริญเติบโตออกดอกออกผลหมุนเวียนอยู่เช่นนี้เรื่อยไป เรียกบัวประเภทนี้ว่า Hardy type หรือ Hardy waterlily นักพฤกษศาสตร์จัดให้บัวประเภทนี้อยู่ในสกุลย่อย (subgenus) *Castalia* (<http://www.pamai.com/WaterLily/WaterLily.htm>)

1.1.2 บัวที่เกิดและเจริญเติบโตในเขตร้อน (Tropical zones) เช่น ทวีปเอเชีย

ตอนกลางและตอนใต้ แอฟริกา ออสเตรเลีย ตอนเหนือของอเมริกากลางและอเมริกาใต้ บัวประเภทนี้กำเนิดและเจริญเติบโตได้ในเขตร้อนเขตเดียว ถ้านำไปปลูกในเขตอบอุ่นหรือเขตหนาว เมื่อเข้าฤดูหนาวผิวหน้าของน้ำเป็นน้ำแข็งทำให้บัวตาย จึงเรียกบัวประเภทนี้ว่า Tropical type หรือ Tropical waterlily นักพฤกษศาสตร์จัดให้บัวประเภทนี้อยู่ในกลุ่ม Lotus group หรือ อุบลชาติประเภทลุ่มลูก (<http://www.pamai.com/WaterLily/WaterLily.htm>)

1.2 การจำแนกบัวตามสกุล โดยทั่วไปนักวิทยาศาสตร์ได้จัดแบ่งบัวออกเป็น 3 สกุล

ใหญ่ (คุณา, 2546) ได้แก่ สกุลนีลัมโบ (*Nelumbo*) จัดเป็นประเภทปทุมชาติ (Lotus หรือบัวหลวง) มีลักษณะเด่นคือ ใบชูเหนือน้ำ สกุลนิมเฟีย (*Nymphaea*) จัดเป็นประเภทอุบลชาติ (Waterlily) หรือ บัวสาย มีลักษณะเด่นคือ ใบลอยแตะผิวน้ำและไม่มีหนาม และสกุลวิกตอเรีย (*Victoria*) จัดเป็นประเภทบัววิกตอเรียหรือบัวกระดัง มีลักษณะเด่นคือ ใบลอยแตะผิวน้ำ มีขนาดใหญ่ขอบใบตั้งเป็นขอบคล้ายกระดังและมีหนาม (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 บัวจำแนกตามสกุล (A) สกุลนีลัมโบ (*Nelumbo*), (B) สกุลนิมเฟีย (*Nymphaea*) และ (C) สกุลวิกตอเรีย (*Victoria*)

ที่มา: บัลวี ศูนย์ธรรมชาติบำบัด (2551)

อนุกรมวิธานของบัวสกุลนีลัมโบ (*Nelumbo*) ประเภทบัวหลวง หรือปทุมชาติ *Nelumbo nucifera* Gaertn. หรือ Sacred lotus (<http://www.itis.usda.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt> และ <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	<i>Nelumbo</i> Adans. – Lotus
Species	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn. – Sacred Lotus <i>Nelumbo lutea</i> Pers – American Lotus

บัวหลวงมีถิ่นกำเนิดอยู่แถบเอเชีย เช่น ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน อินเดีย และไทย มีจำนวนโครโมโซม $2n = 16$ (ศิริลักษณ์, 2543) ลำต้นใต้ดินเป็นแบบเหง้า (rhizome) และไหล (stolon) ลำต้นใต้ดินเมื่อยังอ่อนลักษณะกลมเรียวยาว แต่เมื่อโตเต็มที่และแก่จะอวบอ้วนเนื่องจากสะสมอาหารไว้มาก เห็นข้อปล้องได้ชัดเจน ใบและดอกเกิดจากหน่อที่ข้อปล้องแล้วเจริญขึ้นมาที่ผิวน้ำหรือเหนือผิวน้ำ และส่วนของข้อปล้องนี้ก็เป็นส่วนที่เกิดราก ใบเป็นใบเดี่ยวแบบ peltate leaf ที่โคนก้านใบมีหูใบ ลักษณะเป็นกาบบางเรียวยาวสีน้ำตาล ดอกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ (<http://www.gpo.orth/herbal/group4/group04.htm>) บานในเวลากลางวัน ดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยงจำนวน 4-6 กลีบ ด้านนอกมีสีเขียวด้านในมีสีแดงกับกลีบดอก และกลีบดอกมีจำนวนมากแตกต่างกันไปตามแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งกลีบดอกมีสีขาว สีชมพู บางชนิดเป็นสีเหลือง มีเกสรเพศผู้เป็นจำนวนมากเป็นสีเหลือง บางพันธุ์มีเกสรเพศผู้คล้ายกลีบดอก ซึ่งพบว่ามีทั้งที่เป็นหมันและไม่เป็นหมัน สำหรับเกสรเพศเมียมีรังไข่แบบ superior ovary ที่มีลักษณะแบบ apocarpous โดยมีส่วนของฐานรองดอก (receptacle) บวมพองขยายใหญ่หรือเจริญขึ้นมาหุ้มรังไข่แต่ละอันไว้เรียกว่า “ฝักบัว (totus)” (<http://www.rspg.thaigov.net/homklindokmai/budhabot/bua.htm>)

บัวในสกุลนี้พบมีทั้งหมด 2 ชนิดด้วยกัน คือ

บัวหลวงพื้นเมือง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) บัวหลวงชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลักษณะโดยทั่ว ๆ ไป จะมีใบและดอกชูขึ้นเหนือน้ำ ก้านใบ และดอกมีผิวแข็ง เป็นหนามระคายมือ มีกลีบดอกซ้อน 2 – 3 ชั้น สีขาวและชมพู มีเกสรเพศผู้จำนวนมากสีเหลืองตรงปลายเป็นสีขาว เป็นบัวชนิดที่บานกลางวัน มีกลิ่นหอม เมื่อติดฝักขณะอ่อนมีสีเหลืองและมีสีเขียวเข้มเมื่อแก่จัด การติดเมล็ดมีมากน้อยแตกต่างกันไป ตัวอย่างพันธุ์บัวหลวงที่พบในประเทศไทย 6 พันธุ์ ตามลักษณะรูปร่างและสีของกลีบดอก (พาชินย์, 2538) ได้แก่

1. บัวหลวงพันธุ์ดอกสีชมพู มีชื่อเรียกกันว่า “ปทุม” หรือ “ปัทมา” หรือ “แหลมชมพู” เป็นพันธุ์บัวหลวงที่มีลักษณะใบและดอกขนาดใหญ่ รูปทรงดอกตูมเป็นรูปไข่ ดอกมีสีชมพู พบทั่ว ๆ ไปตามหนองหรือบึงต่าง ๆ (ภาพที่ 2A)
2. บัวหลวงพันธุ์ดอกสีชมพูเล็ก มีชื่อเรียกว่า “บัวหลวงจีน” หรือ “บัวปักกิ่ง ” หรือ “บัวเข็ม” หรือ “แหลมชมพูเล็ก” เป็นพันธุ์บัวหลวงที่มีลักษณะใบและดอกคล้ายกับพันธุ์แรก แต่มีขนาดเล็ก รูปทรงใบ และดอกเล็กกว่า ฝักมีขนาดเล็ก มีเมล็ดเพียง 4 -5 เมล็ดเท่านั้น (ภาพที่ 2B)
3. บัวหลวงพันธุ์ดอกสีชมพูซ้อน มีชื่อเรียกว่า “สัตตบงกช” หรือ “ฉัตรชมพู” เป็นพันธุ์บัวหลวงที่มีลักษณะใบและดอกเช่นเดียวกับพันธุ์แรก ผิดแต่ว่ารูปทรงดอกตูมป้อมกว่าเท่านั้น เมื่อบานกลีบดอกชั้นนอกมีลักษณะและสีเหมือนบัวหลวงพันธุ์แรกทุกประการ แต่จะเห็นมีกลีบเล็ก ๆ สีขาวชมพูซ้อนอยู่ข้างในใกล้ฝัก ซึ่งก็คือก้านเกสรเพศผู้ที่แผ่เป็นแผ่นทำให้แลดูคล้ายกับกลีบดอกเล็ก ๆ บัวหลวงพันธุ์นี้แม้จะมีฝักเจริญเติบโตแต่ไม่ค่อยมีเมล็ดหรือเมล็ดมีแต่ลีบเสีย (ภาพที่ 2C)
4. บัวหลวงพันธุ์ดอกสีขาว มีชื่อเรียกว่า “ปทุมทริก” หรือ “บุณทริก” หรือ “แหลมขาว” เป็นพันธุ์บัวหลวงที่มีลักษณะใบและดอกเช่นเดียวกับพันธุ์แรก แต่มีดอกเป็นสีขาว รูปทรงดอกตูมเป็นรูปไข่ ปลาย ๆ กลีบอาจมีสีชมพูระเรื่อ ๆ (ภาพที่ 2D)
5. บัวหลวงพันธุ์ดอกสีขาวซ้อน มีชื่อเรียกว่า “สัตตบุษย์” หรือ “ฉัตรขาว” เป็นพันธุ์บัวหลวงดอกสีขาวมีกลีบดอกเล็ก ๆ สีขาว ซึ่งก็คือเกสรเพศผู้ที่เปลี่ยนรูป กลีบดอกเล็ก ๆ ทั้งหมดซ้อนอยู่ข้างในและมากกว่าบัวสัตตบงกช บัวหลวงพันธุ์นี้มีกลิ่นหอม (ภาพที่ 2E)

6. บัวหลวงพันธุ์สีขาวเล็ก มีชื่อเรียกว่า “บัวหลวงจีน” หรือ “บัวปักกิ่งสีขาว” หรือ “บัวเข็มสีขาว” หรือ “แหลมขาวเล็ก” สีและรูปทรงดอกคล้ายพันธุ์บุณฑริก แต่มีขนาดดอกเล็กกว่า (ภาพที่ 2F)

นอกจากนี้ยังมีบัวหลวงพระราชินี ซึ่งสมเด็จพระนางเจ้าฯ พระบรมราชินีนาถทรงรับสั่งให้เจ้าหน้าที่ไปเก็บต้นพันธุ์บัวที่พระองค์ทรงโปรดจากจังหวัดเพชรบุรี ไปปลูกอนุรักษ์ที่ศูนย์การศึกษาพัฒนาพิภพทอง จังหวัดนราธิวาส เมื่อปี พ.ศ. 2543 บัวหลวงชนิดนี้มีใบคล้ายวงกลมสองวงทับกันข้างละ 1/3 ส่วนของวงที่ทับกันจะงอเป็นรูปเว้า หน้าใบสีเขียวเข้ม หลังใบสีเหลืองอมเทา ใบใหญ่เต็มที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใบถึง 50-60 เซนติเมตร ใบไม่จับน้ำ ก้านใบและก้านดอกแข็ง สีเขียวเหนียวคล้ายใบที่โคนก้าน เนื้อขึ้นมาจากโคนใบเป็นสีเขียว เมื่อแก่จะเปลี่ยนเป็นสีเกือบน้ำตาล มีหนามสั้นเล็ก ๆ ทั่วทั้งก้าน ก้านยาวเต็มที่ยาวได้ถึง 2 เมตร ดอกช่วงแรกสีเขียวอ่อน เมื่อแก่เต็มที่ก่อนจะเริ่มบานกลีบด้านนอกจะเริ่มอ่อนลงเป็นสีชมพูอ่อนเกือบขาว ปลายกลีบสีชมพูจะเด่นขึ้น กลีบดอกไม่ซ้อน มีกลิ่นหอมอ่อน ๆ อับเรณูและก้านอับเรณูมีสีเหลือง เกสรเพศเมียบานวันแรกสีเหลืองหลังจากนั้นค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลืองเขียวและเป็นสีเขียว เมื่อดอกโรย รังไข่ในฝักจะมีประมาณ 25-30 รัง (เมล็ด) (ปริมลาภ และเสริมลาภ, 2548)

บัวหลวงพันธุ์ต่าง ๆ เหล่านี้จะเป็นที่รู้จักกันดี เพราะเป็นบัวพันธุ์พื้นเมืองของไทย โดยเฉพาะพันธุ์บัวหลวงสีชมพูซึ่งมีดอกขนาดใหญ่ สามารถนำส่วนต่าง ๆ ของบัวมาใช้ประโยชน์ได้มากมาย

บัวหลวง *Nelumbo lutea* Pers. เป็นบัวหลวงชนิดที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกาเหนือ มีลักษณะดอกและใบคล้ายบัวหลวงไทย ต่างกันตรงสีของดอกจะเป็นสีเหลือง (ภาพที่ 2G) บัวชนิดนี้เคยมีผู้เคยนำมาปลูกในประเทศไทย แต่เนื่องจากทนต่อสภาพภูมิอากาศที่ร้อนไม่ได้จึงตายไป แต่ปัจจุบันได้มีทีมวิจัยทางวิทยาศาสตร์นำเอาเหง้าบัวหลวงนี้ไปฉายรังสีแกมมา ในขนาด 10 gray เพื่อทำการเปลี่ยนสภาพ ให้สามารถทนสภาพอากาศของเขตร้อนในประเทศไทย และได้นำไปปลูกที่จังหวัดเชียงรายกับท้องถื่นการสวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ (อสพ.) จังหวัดเชียงใหม่ ต้นบัวหลวงที่ผ่านการฉายรังสีสามารถออกดอกสีเหลืองได้เป็นครั้งแรกของประเทศไทย (<http://www.tint.or.th/nkc/nkc5004/nkc5004j.html>)



ภาพที่ 2 ลักษณะดอกของบัวหลวง (A) บัวหลวงปทุม, (B) บัวหลวงจีน, (C) บัวหลวงสัตตบงกช, (D) บัวหลวงบุญขริก, (E) บัวหลวงสัตตบุษย์, (F) บัวหลวงปักกิ่งสีขาว และ (G) *Nelumbo lutea* Pers.

ที่มา: นันท บวรศิริ (2540)

2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวง

ลำต้น มีลักษณะเป็นเหง้า (rhizome) อยู่ใต้ดิน มีรูปร่าง 2 แบบ (stem dimorphic) คือเป็นเหง้าทอดยาวขนานไปตามดิน กับเป็นเหง้าที่สะสมอาหาร สีขาวหรือค่อนข้างแดง รูปทรงกระบอก มีช่องอากาศ (air canal) ตลอดความยาวของเหง้า ตรงข้อมีกาบใบที่มีลักษณะเป็นแผ่นเล็ก

ใบ เป็นใบเดี่ยว ออกจากข้อของลำต้นแบบสลับ ใบลอยปริ่มน้ำหรือโผล่เหนือน้ำ ผิวใบนวล ใบอ่อนมีลักษณะม้วน และเมื่อใบโตเต็มที่ใบมีรูปร่างกลม (orbicular) ขอบใบเรียบ และสีเขียวเข้มหรือสีม่วง ก้านใบมีลักษณะก้นปัด มีหนามสั้น ๆ

ดอก มีลักษณะเป็นดอกเดี่ยว สมบูรณ์เพศ (perfect flower) อยู่สูงจากผิวน้ำ และก้านดอกมีลักษณะใกล้เคียงกับก้านใบ ดอกมีสีขาว ชมพู หรือชมพูเข้ม กลีบเลี้ยง (sepal) สีเขียว ร่วงง่าย มี 4-5 กลีบ กลีบดอก (petal) และเกสรเพศผู้มีจำนวนมากเรียงอยู่หลายชั้น ลักษณะของกลีบดอกเป็นรูปไข่กลับ (obovate)

เกสรเพศผู้จำนวนมาก ติดกับฐานรองดอกในตำแหน่งที่ต่ำกว่าเกสรเพศเมีย อับเรณู (anther) มีสีเหลือง 4 อันลักษณะเรียวยาว ปลายอับเรณูมีระยางค์ (appendage) สีขาวหรือขาวอมเหลือง

เกสรเพศเมีย ประกอบด้วยรังไข่ที่มีคาร์เพล (carpel) แยกออกจากกัน โดยแต่ละคาร์เพลฝังตัวอยู่ในตอนบนของฐานดอก (receptacle) ที่ขยายใหญ่เรียกว่า torus ก้านชูเกสรและยอดเกสรเพศเมียขนาดเล็กอยู่ทางด้านบน ในรังไข่แต่ละอันจะมีไข่อ่อนเพียง 1 เท่านั้น ติดอยู่ที่ผนังส่วนบนของรังไข่

ผล เป็นผลกลุ่ม (aggregate fruit) มีลักษณะเปลือกแข็งเมล็ดเดี่ยว ผลย่อยมีรูปร่างคล้ายรูปไข่

เมล็ดและการงอกของเมล็ด เปลือกเมล็ดชั้นนอก (testa) อ่อนนุ่ม ไม่มีเอนโดสเปิร์ม (endosperm) มีใบเลี้ยงหนา 2 ใบ ซึ่งเป็นที่สะสมอาหาร เมล็ดจะงอกส่วนของ epicotyl ออกมาก่อน ส่วนใบเลี้ยงยังคงอยู่ในเมล็ดซึ่งฝังอยู่ใต้ดิน (hypogeal-germination) (วาสนา, 2527)

3. การขยายพันธุ์

การแยกเหง้า บัวในเขตบ่อนและเขตหนาวที่มีลำต้นเป็นแบบเหง้าสามารถขยายพันธุ์ได้โดยวิธีแยกหน่อหรือต้นอ่อนจากเหง้าต้นแม่ไปปลูก โดยตัดแยกเหง้าที่มีหน่อหรือต้นอ่อนยาว 5-8 เซนติเมตร ตัดรากออกให้หมด ถ้าเป็นต้นอ่อน สามารถนำไปปลูกยังที่ต้องการได้เลย ถ้าเป็นหน่อให้นำไปปลูกในกระถางเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 20-25 เซนติเมตร ฝังดินให้ลึกประมาณ 3-5 เซนติเมตร กดดินให้แน่น ต้นอ่อนขึ้นจากตาและเจริญเป็นต้นใหม่ต่อไป

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

การแยกต้นอ่อนที่เกิดจากใบ บัวในเขตร้อนสกุลบัวสายบางชนิดจะแตกต้นอ่อนบนใบบริเวณกลางใบตรงจุดที่ต่อกับก้านใบหรือข้อใบ สามารถขยายพันธุ์ได้โดยการตัดใบที่มีต้นอ่อนโดยตัดให้มีก้านใบติดอยู่ 5-8 เซนติเมตร เสียบก้านลงในภาชนะที่ใช้ปลูกให้ข้อใบที่มีต้นอ่อนติดกับผิวดิน ใช้อิฐหรือหินทับแผ่นใบไม่ให้ลอย เติมน้ำให้ท่วมยอด 6-10 เซนติเมตร ประมาณ 2 สัปดาห์ต้นอ่อนจะแตกรากยึดติดกับผิวดิน และเจริญเติบโตต่อไป

การเพาะเมล็ด การขยายพันธุ์วิธีนี้ไม่ค่อยนิยมปฏิบัติเนื่องจากยุ่งยากและต้องใช้เวลานาน ยกเว้นบัวกระดังง์ที่ต้องขยายพันธุ์ด้วยวิธีการเพาะเมล็ดเท่านั้น นอกจากนี้การเพาะเมล็ดมักนิยมใช้กับเมล็ดบัวที่ได้จากการผสมบัวขึ้นมาใหม่แล้วเก็บเมล็ดมาเพาะ เพื่อสะดวกในการคัดแยกพันธุ์ วิธีการเพาะเมล็ดมีดังนี้ เตรียมดินเหนียวที่ไม่มีรากพืช ใสลงในภาชนะปากกว้างที่มีความลึกประมาณ 25-30 เซนติเมตร โดยใส่ดินให้สูงอย่างน้อย 10 เซนติเมตร ปรับแต่งหน้าดินให้เรียบและแน่น เติมน้ำให้สูงจากหน้าดินประมาณ 7-8 เซนติเมตร นำเมล็ดที่ใช้เพาะโรยกระจายบนผิวน้ำให้ทั่ว เมล็ดจะค่อย ๆ จมลงได้น้ำ สำหรับเมล็ดบัวหลวงและบัวกระดังง์เมล็ดมีขนาดใหญ่ ให้กดเมล็ดให้จมลงไปดินแล้วเติมน้ำให้สูงจากผิวดินประมาณ 15 เซนติเมตร นำภาชนะที่เพาะไปไว้ในที่มีแดดรำไร ประมาณ 1 เดือน เมล็ดจะเริ่มงอกเป็นต้นอ่อน เมื่อต้นอ่อนแข็งแรงและมีใบประมาณ 2-3 ใบ จึงแยกนำไปปลูกยังที่ต้องการ

4. การผสมพันธุ์

ดอกบัวจัดเป็นดอกสมบูรณ์เพศมีเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียอยู่ในดอกเดียวกัน เกสรเพศเมียจะบานก่อนเกสรเพศผู้ 1-2 วัน ดังนั้นเกสรเพศเมียจึงมักได้รับการผสมพันธุ์จากเกสรเพศผู้ดอกอื่น โดยมีลม และแมลงเป็นตัวช่วยในการผสมพันธุ์ แต่การผสมพันธุ์บัวเพื่อให้ได้บัวพันธุ์ใหม่ ที่มีสีสวยแปลกออกไปและเพื่อเป็นการพัฒนาสายพันธุ์จึงมักเป็นการผสมพันธุ์โดยมนุษย์ช่วยผสมพันธุ์ โดยคัดเลือกบัวพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่จะนำมาผสม ในกรณีของบัวประดับ เช่น Hardy waterlily ก่อนดอกแม่บาน 1-2 วัน ให้เปิดดอกแล้วใช้กรรไกรขลิบตัดเกสรเพศผู้ออกให้หมดแล้วคลุมดอกด้วยผ้ามุ้งตาถี่ ๆ เพื่อกันเกสรเพศผู้จากดอกอื่นที่ไม่ต้องการเข้ามาผสม เมื่อดอกแม่บานให้ขลิบตัดเอาเกสรเพศผู้จากดอกต้นพ่อพันธุ์และควรเป็นดอกที่บานแล้วประมาณ 2 วัน มาใส่บนเกสรเพศเมียของดอกแม่แล้วคลุมด้วยผ้ามุ้งตามเดิม ดอกแม่เมื่อได้รับการผสมแล้วถ้าผสมไม่ติดดอกจะลอยอยู่ปริ่มน้ำแล้วจะโรยไป ถ้าผสมติดดอกจะเริ่มกลายเป็นฝัก โดยดอกจะค่อย ๆ จมลงใต้น้ำประมาณ 2 สัปดาห์ เมื่อดอกเจริญเป็นฝักแก่และมีเมล็ดแก่ก็จะลอยขึ้นมาบนผิวน้ำใหม่อีกครั้ง จึงเก็บเอาฝักแก่มาแยกเอาเมล็ดนำไปเพาะเมล็ดต่อไป (www.panmai.com/WaterLily/WaterLily.htm) ในกรณีของบัวหลวง การผสมพันธุ์ก็เช่นเดียวกับบัวประดับ แต่เนื่องจากดอกบัวหลวงมีก้านชูที่แข็งแรงกว่าบัวประดับมาก การติดตามผลจากการผสมพันธุ์จึงเห็นได้ชัดเจนในขณะที่ดอกแม่กำลังผลิบาน ให้ตัดเกสรเพศผู้ออกให้หมด ใช้ปลายพู่กันแตะเรณู จากต้นพ่อซึ่งมีลักษณะเป็นฝุ่นสีเหลืองมาป้ายที่ยอดเกสรเพศเมียของต้นแม่ แล้วคลุมดอกด้วยถุงผ้ามุ้งตาถี่ ๆ หากการผสมพันธุ์ติดดอกจะกลายเป็นฝักที่มีเมล็ด เจริญเป็นเมล็ดใหญ่รอจนเมล็ดแก่จึงนำไปปลูกต่อไป

5. ความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ประเทศไทยมีพื้นที่การปลูกบัวหลวงประมาณ 5,000 ไร่ กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ เช่น นนทบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี อุบลราชธานี ขอนแก่น พิจิตร พะเยา นครสวรรค์ พิษณุโลก พัทลุง การผลิตบัวของไทยนั้นเป็นการผลิตเพื่อใช้ในประเทศเป็นส่วนใหญ่ ส่วนต่าง ๆ ของบัวสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น

ดอกบัว เป็นที่รู้จักกันดีของบุคคลทั่วไป นิยมนำมาใช้บูชาพระ ใช้ในการจัดตกแต่งสถานที่ จัดแจกัน สายพันธุ์ที่ใช้คือ บัวสัตตบงกช (ฉัตรขาว) และบัวสัตตบงกช (ฉัตรชมพู)

ฝักบัวสด (ฝักแก่) นิยมใช้บริโภคเมล็ดที่ยังมีสีเขียวสดอยู่ สายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการผลิตเพื่อรับประทานเมล็ดสดนั้น มักจะเป็นสายพันธุ์ที่มีรูปทรงดอกแหลมสีชมพู มีการเก็บจากธรรมชาติและการทำนาบัว พื้นที่การผลิตอยู่ที่จังหวัดนนทบุรี เชียงราย อุบลราชธานี และยโสธร

ฝักบัวสด (ฝักอ่อน) เริ่มมีการใช้ฝักอ่อนในการจัดดอกไม้เพิ่มขึ้นและในต่างประเทศมีการสั่งซื้อฝักบัวอ่อนและใบบัว เพื่อนำไปใช้ในรูปของลักษณะตัดใบ ใช้ร่วมในการจัดดอกไม้และจัดตกแต่ง

เมล็ดแห้ง มีการผลิตกันมากเพื่อทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ และสายพันธุ์ที่นิยมใช้ปลูกเพื่อเก็บเมล็ดส่วนมากมักเป็นบัวแหลมชมพู

ไหลบัว (stolon) มีการผลิตบ้างแต่ไม่แพร่หลายมากนัก ไหลบัวอ่อนใช้ในการทำอาหารคาว

เหง้าบัว (rhizome) มีความต้องการของตลาดมาก เพราะเหง้าบัว คือส่วนที่สะสมอาหารของบัวก่อนมีการพักตัว ทำให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูงมาก แต่การผลิตยังน้อยอยู่เนื่องจากเหง้าบัวของสายพันธุ์บัวในไทยยังมีขนาดเล็กไม่ใหญ่มากนัก

ใบบัว มีการนำมาใช้เป็นส่วนประกอบอย่างหนึ่งในธุรกิจร้านอาหาร คือนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทำข้าวห่อใบบัว และนำไปจัดตกแต่งสถานที่ซึ่งเป็นที่นิยมมากในต่างประเทศ ประเทศที่นำเข้าบัวหลวงจากประเทศไทยได้แก่ เนเธอร์แลนด์ ญี่ปุ่น สวิตเซอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา สำหรับในประเทศไทยมีการใช้กันน้อย ใบบัวที่ใช้ส่วนมากจะเป็นใบบัวที่ขึ้นเองตามแหล่งน้ำธรรมชาติ (www.doae.go.th/LIBRARY/html/detail/sacreslotus)

6. สารประกอบและสรรพคุณทางยาของบัวหลวง

สารประกอบที่พบในบัวหลวง

จากการศึกษาวิจัยพบสารชนิดต่างๆ ในส่วนประกอบของบัวหลวง ที่มีสรรพคุณในการบำรุงร่างกายหรือนำมาปรุงเป็นยารักษาโรค เช่น

ส่วนต่างๆ ของบัวหลวง คือ ดอก ใบ ก้านใบ ฝักบัว เมล็ด และโดยเฉพาะดีบัว มีสารอัลคาลอยด์ (alkaloids) หลายชนิด ที่มีฤทธิ์ต่อการขยายเส้นเลือดที่เลี้ยงหัวใจ

เกสรบัว (เพศผู้) พบสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

รากบัว เหง้าบัว และเปลือกผล พบสารพวกแทนนิน (tannin) เป็นสารฝาดสมานที่มีฤทธิ์ช่วยยับยั้งอาการท้องเดิน และรากบัวมีสารพวกแคลเซียม (calcium) ช่วยบำรุงร่างกาย

เมล็ดบัว มีสารไขมัน (lipid) ช่วยเพิ่มพลังงาน บำรุงไขข้อและเอ็น (www.kmitl.ac.th/agridata/Lotus/article/Lotus.pdf)

สรรพคุณทางยาของบัวหลวง ดังนี้

ใบอ่อน รสฝาดเปรี้ยว บำรุงร่างกายให้ชุ่มชื้น

ใบแก่ รสฝาดเปรี้ยวเล็กน้อย แก้ไข้ บำรุงโลหิต สูดแก้ริดสีดวงจมูก หัวใจเรอรั้ง ลดเสมหะ ลดความดันโลหิต และไขมันในเส้นเลือด (โคเรสเตอรอล) ถ้าเผาอบแล้วบดละเอียดผสมพิมเสน ใช้แทนยาหอม

ดอก รสฝาดหอม สรรพคุณแก้ไข้ แก้เสมหะและโลหิต บำรุงหัวใจ บำรุงโลหิต และบำรุงครรภ์ทำให้คลอดบุตรง่าย

เกสร รสฝาดหอมเย็น แก้ไข้ ไข้รากสาด แก้เสมหะ แก้อ่อนเพลีย แก้กลิ้นไส้ ใช้เป็นยาบำรุงครรภ์ เกสรเพศผู้มีรสฝาด มีกลิ่นหอม ใช้ปรุงเป็นยาหอม บำรุงหัวใจ บำรุงประสาท

เมล็ด รสหวานมัน บำรุงกำลัง ไขข้อ เส้นเอ็นและบำรุงประสาท แก้อ่อนใน กระหายน้ำ แก้เสมหะ พุพอง อาเจียน อ่อนเพลีย ช่วยเพิ่มพลังงานและไขมันในร่างกาย

ดีบัว รสขม ขยายหลอดเลือดหัวใจ แก้กระหายน้ำ และแก้อาเจียนเป็นโลหิต

ก้านดอก ตากแห้งสูบแก้ริดสีดวงจมูก

ก้านใบ มีฤทธิ์เป็นยาห้ามเลือดหรือทำให้เลือดหยุด

ราก รสหวานหอม แก้ไข้ แก้ท้องเสีย บำรุงกำลัง แก้เสมหะ แก้กระหาย อ่อนเพลีย
แก้อาเจียน พุพองและละลายยาแก้สะอึก

เหง้า รสหวานมัน บำรุงกำลัง แก้ร้อนในกระหายน้ำ แก้เสมหะ แก้ฝีพุพอง และแก้อาเจียน
ใช้เหง้าบวักดื่มน้ำ ดื่มน้ำแก้ไอ ขับเสมหะ ลดอาการอ่อนเพลีย ระงับอาการท้องร่วง ชาติไม่
ปกติในเด็ก

ทั้งต้น ใช้แก้พิษจากการรับประทานเห็ดพิษ และพิษจากอาการพิษสุราเรื้อรัง โดยใช้ทั้ง
ต้นขนาด 10-15 กรัม นำไปต้มน้ำให้รับประทาน (www.kmitl.ac.th/agridata/Lotus/article/Lotus.pdf)

7. พีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction :PCR)

พีซีอาร์ พัฒนาขึ้นโดย Mullis ในปี ค.ศ. 1985 เป็นปฏิกิริยาที่เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอใน
ส่วนที่ต้องการให้ได้ปริมาณเพิ่มขึ้นหลายเท่าตัวในเวลาอันสั้น โดยที่ดีเอ็นเอต้นแบบไม่จำเป็นต้อง
อยู่ในสภาพที่ดี (วิสุทธิ, 2536) ปัจจุบันเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากเป็นการเพิ่มปริมาณ
ดีเอ็นเอที่ต้องการซึ่งมีปริมาณไม่มากให้มีปริมาณมากพอที่จะใช้งานต่อไปได้

องค์ประกอบสำคัญของปฏิกิริยาประกอบด้วย

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งไม่จำเป็นต้องเป็นดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์มากนัก แต่ต้องมีดีเอ็นเอใน
ส่วนที่ต้องการรวมอยู่ด้วย

2. ไพรเมอร์เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ
ในบริเวณที่ต้องการ บนดีเอ็นเอทั้ง 2 สาย

3. เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (DNA polymerase) มักเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานใน
อุณหภูมิสูง ๆ ได้ เช่น เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus*

4. คือออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dGTP, dTTP, dCTP เพื่อใช้สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์

5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ก็เป็นสิ่งสำคัญในปฏิกิริยาพีซีอาร์ เนื่องจากพบว่าในการจำลองตัวเองของสิ่งมีชีวิตจะมีแมกนีเซียมเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยอาจเกี่ยวข้องกับการปรับสภาวะต่าง ๆ

ในปฏิกิริยาพีซีอาร์แต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

1. การทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบเสียสภาพแยกออกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 90 องศาเซลเซียส (°C)
2. การลดอุณหภูมิลงให้พอเหมาะเพื่อให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจับกับไพรเมอร์ (annealing) โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมจะพิจารณาจากลำดับเบสและจำนวนเบสของไพรเมอร์
3. ขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (extension) โดยปรับอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส หลังจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ดีเอ็นเอเป้าหมายจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น 2^n เท่า โดย n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา

พีซีอาร์ยังนำมาประยุกต์ใช้ในงานด้านอื่นอีกมากมาย เช่น ตรวจหาชิ้นหรือเครื่องหมายในจีโนม ตรวจสอบโรคทางพันธุกรรม การเปรียบเทียบจีโนมของสิ่งมีชีวิต เป็นต้น

8. เครื่องหมายโมเลกุล

ในการศึกษาที่เกี่ยวกับความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต หรือการบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิต จำเป็นต้องมีสิ่งที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่าง อาจเป็นลักษณะที่ปรากฏเห็นได้หรืออาจใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) หรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ดีคือ เป็นรูปแบบของดีเอ็นเอที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง หรือมีภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) สูง มีรูปแบบของการถ่ายทอดสู่รุ่นต่อไปอย่างง่าย (อมรา, 2542) ปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ถูกนำมาใช้ศึกษาพันธุกรรมของพืชและสัตว์กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากการศึกษาถึงลงไปในระดับโมเลกุล เป็นตัวควบคุมให้เกิดลักษณะต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต

เครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลายชนิด ทั้งที่เป็น dominant markers ได้แก่ Random Amplified Polymorphics DNA (RAPDs) และ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ซึ่งเป็น markers ที่ใช้ศึกษาโดยไม่มีความจำเป็นต้องรู้ข้อมูลของจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มาก่อนและศึกษาได้ครั้งละหลายตำแหน่ง (multilocus detection) และ co-dominant markers ได้แก่ Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs), Simple Sequence Repeats (SSRs) หรือ Microsatellites (MS) และ Single Strand Conformational Polymorphisms (SSCPs) ซึ่งจำเป็นต้องมีข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยจะมีความจำเพาะกับตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งในจีโนม เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้ได้ถูกนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชและสัตว์ และสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprints) ที่แสดงความจำเพาะกับพันธุ์แต่ละพันธุ์ เอสเอสซีพีและไมโครแซทเทลไลท์เป็น multi-allelic marker ที่ให้รูปแบบของแอลลีล (alleles) หรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (DNA fragments) หลายรูปแบบ (highly polymorphic) จึงทำให้เป็นที่นิยมใช้ในปัจจุบันในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ทำแผนที่จีโนม (genome mapping) และใช้ระบุความจำเพาะของพันธุ์ ไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ครอบคลุมส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ (repeat sequences) ซึ่งพบกระจายทั่วไปในจีโนมพืชและสัตว์ และสามารถถูกเพิ่มปริมาณเพื่อนำมาตรวจสอบได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสรอบข้าง (flanking sequence) ของลำดับเบสซ้ำ ๆ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ส่วนเอสเอสซีพีเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่นิยมพัฒนาขึ้นมาให้จำเพาะกับยีน โดยอาศัยลำดับเบสของยีนจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ มาเป็นข้อมูลเพื่อพัฒนาตำแหน่ง ของ specific primers และใช้ไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วย non- denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ในการศึกษาพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอนี้ สามารถศึกษาได้ในขณะที่ต้นพืชยังเป็นต้นกล้า หรือจากส่วนของเซลล์จากอวัยวะต่าง ๆ โดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย

9. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprints)

Jeffrey แห่งมหาวิทยาลัยเลสเตอร์ ประเทศอังกฤษ เป็นผู้ค้นพบว่าการเรียงลำดับเบสในส่วนที่เป็นดีเอ็นเอนี้มีรูปแบบเฉพาะในคนแต่ละคนเช่นเดียวกับลายพิมพ์นิ้วมือ ในปี ค.ศ.1984 ได้พัฒนาวิธีแสดงความแตกต่างของส่วนที่เป็นดีเอ็นเอโดยนำเอาดีเอ็นเอนี้มาย่อยเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วทำให้แต่ละชิ้นเคลื่อนที่แยกออกจากกันด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าและถ่ายรูปแถบที่แสดงการเรียงตัวของส่วนย่อยๆ ของดีเอ็นเอเหล่านั้น ภาพที่ได้เป็นขีดหลายๆ ขีดเรียงต่อกันเป็นแนวโดย

มีระยะห่างแตกต่างกัน ลักษณะเหมือนแถบรหัสแท่ง (bar code) ที่ใช้ในการกำหนดชนิดสินค้าในปัจจุบัน รูปแบบเฉพาะของแถบที่เกิดขึ้นจากการแยกส่วนของดีเอ็นเอ ของแต่ละคนนี้ รู้จักกันในชื่อของ “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” (www.rn.ac.th/ranee/genome.htm)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เป็นการศึกษาความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งมีความจำเพาะในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เดิมทีเมื่อกล่าวถึงลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะหมายถึงการทำ Southern hybridization โดยนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีการเคลื่อนสู่ขั้วไฟฟ้า (electrophoresis) แล้วย้ายดีเอ็นเอจากบนแผ่นเจลไปบนแผ่นเมมเบรน แล้วไฮบริไดซ์กับโพรบที่ติดฉลาก ซึ่งโพรบนี้มาจากดีเอ็นเอส่วนที่จำเพาะกับยีนหรือที่เป็นมินิแซเทลไลต์ (minisatellite) เกิดเป็นลายพิมพ์ที่มีความจำเพาะ (สุรินทร์, 2545) ต่อมามีการพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ จึงมีการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ เนื่องจากการทำ Southern hybridization สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูงมากและมีอันตรายหากใช้สารกัมมันตภาพรังสี การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการทำพีซีอาร์ จะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่มีลำดับเบสจำเพาะกับดีเอ็นเอหรือยีนช่วงหนึ่ง แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามปฏิกิริยาพีซีอาร์ เช่น ใน sugar beet ถั่วฝักยาว (*Phaseolus chamaecytisus*) และการจำแนกกล้วย 2 สายพันธุ์ คือ Montreux และ Connecticut King โดยใช้ PCR-based DNA marker 2 ชนิด (Yamagishi *et al.*, 2002)

ประเทศไทยได้นำเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้พัฒนาขึ้นมาตรวจสอบพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ได้แก่ การใช้เทคนิคเอสเอสซีพี ซึ่งมีความจำเพาะสูง สามารถให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้อย่างชัดเจน และที่สำคัญสามารถแสดงความแตกต่างระหว่างลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อแม่ได้อย่างแม่นยำ ข้าวโพดซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของไทย มีการปลูก ขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ใหม่ ๆ ขึ้นมาหลากหลายสายพันธุ์จากทั้งบริษัทเอกชนและหน่วยงานของรัฐ ซึ่งประสบปัญหาการขโมยพันธุ์ การปลอมปนเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก และการส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกภายในประเทศ ดังนั้นบริษัทเอกชนและหน่วยงานของรัฐที่ผลิตเมล็ดพันธุ์ต่าง ต้องมีการสร้างเอกลักษณ์พันธุ์กรรมสำหรับเมล็ดพันธุ์ของตนไว้เพื่อเป็นฐานข้อมูลอ้างอิง และจดทะเบียนพันธุ์เพื่อเป็นการยืนยันเมื่อมีการตรวจสอบสายพันธุ์

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของไทย มีการปลูกมาแต่อดีต พันธุ์ข้าวของไทยจึงมีมากมายหลายสายพันธุ์ พันธุ์ข้าวไทยที่นิยมมากคือ ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) มีการส่งออกเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันพันธุ์ข้าวไทยได้เริ่มมีการสร้างเอกลักษณ์พันธุ์กรรมไว้เป็นฐานข้อมูลเพื่อการอ้างอิงที่แน่ชัดบ้างแล้ว แต่ก็ยังมีปัญหาการปลอมปนของข้าวที่ส่งออกต่างประเทศ ทำให้เสื่อม

เสถียรภาพของการค้าข้าวของไทย นอกจากนี้ประเทศไทยได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวเหลืองจนได้ข้าวเหลืองหลากหลายสายพันธุ์ บางสายพันธุ์ก็ยังไม่มีการสร้างเอกลักษณ์พันธุกรรมเลย ประกอบกับในปัจจุบันมีการนำเข้าเมล็ดข้าวเหลืองจากต่างประเทศที่ให้ผลผลิตดีเข้ามามาก จึงอาจเกิดปัญหาทำให้สายพันธุ์ข้าวเหลืองเปลี่ยนแปลงไป การอาศัยลักษณะภายนอกอย่างเดียวไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ได้ดี ดังนั้นจึงต้องมีการสร้างเอกลักษณ์พันธุกรรม สำหรับข้าวเหลืองพันธุ์ต่าง ๆ ไว้เพื่อเป็นฐานข้อมูลอ้างอิงที่แน่ชัด เมื่อมีการตรวจสอบพันธุ์ต่อไป (<http://dnatec.kps.ku.ac.th>)

10. เทคนิคอาร์เอฟดี (Random Amplified Polymorphic DNA: RAPD)

อาร์เอฟดี เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลที่ใช้เทคนิคพีซีอาร์แบบหนึ่ง คิดค้นโดย William และคณะ (1990) อาร์เอฟดีอาจมีชื่อเรียกอื่นได้อีก เช่น Arbitrary-Primed PCR (AP-PCR) และ DNA Amplification Fingerprint (DAF) ซึ่งมีหลักการคล้าย ๆ กันคือใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้น ๆ ประมาณ 10 คู่เบสเพียงชนิดเดียว แล้วใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์เพิ่มปริมาณอย่างสุ่มทั้งจีโนม การเกิดแถบดีเอ็นเอจะเกิดเมื่อไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในทิศทางที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์เข้าหากันในระยะห่างที่ไม่มากนักประมาณ 3,000 คู่เบส (bp.) polymorphism ของอาร์เอฟดีเกิดจากระยะห่างของไพรเมอร์ 2 ไพรเมอร์มากเกินไปจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ หรือจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณที่ไพรเมอร์จับ อาจเป็นผลของการเพิ่มหรือขาดหายไปของเบสบางชนิด ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้จึงไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในบริเวณนั้น (สุรินทร์, 2545; William, 1990)

อาร์เอฟดีมีข้อที่ได้เปรียบเครื่องหมายโมเลกุลอื่น ๆ คือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว ให้ข้อมูลมากพอสมควร และไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบ จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในงานวิจัยสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่ได้ศึกษามากนัก อาร์เอฟดีจะให้ข้อมูลพื้นฐานได้ในระดับหนึ่ง แต่อาร์เอฟดีก็มีข้อด้อยอยู่ เนื่องจากการสุ่มเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของทั้งจีโนมและอาร์เอฟดีเป็นเทคนิคที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่าง ๆ มาก บางครั้งจึงทำซ้ำไม่ได้ผลเหมือนเดิม นอกจากนี้ อาร์เอฟดียังเป็นเครื่องหมายชนิด dominant marker ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจะเป็นลักษณะการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอเท่านั้นทำให้ไม่สามารถแยกลักษณะฮอโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสออกจากกันได้ (สุรินทร์, 2545; William, 1990)

11. เทคนิคเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphism :AFLP)

เอเอฟแอลพี เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่ง พื้นฐานของเอเอฟแอลพี คือ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยการเพิ่มปริมาณด้วย ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้นจึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิคอาร์เอฟแอลพี และประสิทธิภาพของ พีซีอาร์เข้าด้วยกัน การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มาจาก การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำได้โดยการ เชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ โดย adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่สั้น ๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียวเหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอ ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ ต่อไป ด้วยวิธีการดังกล่าวนี้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก็จะสามารถเพิ่ม ปริมาณขึ้นได้โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับส่วนของ adapter รวมกับส่วนของเบสที่ ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในคราว เดียวกันมีมากและไม่สามารถจะแยกจากกันหรือตรวจสอบโดยวิธีทั่ว ๆ ไป การสังเคราะห์ ไพรเมอร์ในการทำเอเอฟแอลพีจึงเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกว่าเข้าที่ปลาย 3' ต่อจากเบสที่ตำแหน่งตัด จำเพาะของเอนไซม์ เพื่อให้เลือกจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ต่อจากบริเวณตัดจำเพาะ สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์นั้นเท่านั้น ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้น ดีเอ็นเอเพียงบางส่วนและสามารถกำหนดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้โดยจำนวน เบสที่เพิ่มเข้าไป แบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์คู่หนึ่ง เรียกว่า ลายพิมพ์เอเอฟแอลพี (AFLP fingerprint) ดังนั้นเทคนิคเอเอฟแอลพีจึงเป็นวิธีตรวจสอบลายพิมพ์ ดีเอ็นเอวิธีหนึ่ง แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ของแต่ละตัวอย่างบ่งบอกถึงความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล เรียกว่า เครื่องหมาย เอเอฟแอลพี (AFLP marker) ใช้ศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต

11.1 หลักการทำเอเอฟแอลพี

ขั้นแรก คือนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด นิยมใช้เอนไซม์ที่มี ตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส เรียกว่า rare cutter ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส เรียกว่า frequent cutter แล้วเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ adapter ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด เพื่อให้เป็นตำแหน่ง ของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้นต่อไป การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะอาจใช้ชนิดที่เป็น rare cutter ทั้งสองชนิดก็ได้ แต่จะตรวจพบชิ้นดีเอ็นเอจำนวนน้อย เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้มีหลาย ชนิด แต่ที่นิยมใช้คือ เอนไซม์ *EcoRI* ร่วมกับ *MseI* เนื่องจาก *MseI* ตัดดีเอ็นเอได้ขนาดพอเหมาะ

สำหรับการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์และการแยกโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel ส่วน เอนไซม์ *EcoRI* มีราคาถูกและการตัดดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพดี โดยมีโอกาสพบการตัดไม่สมบูรณ์ได้น้อย

ขั้นที่สอง คือการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสทางปลาย 5' เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' อีกส่วนหนึ่งเพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วน จำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณลง การทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3' จะทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่า preselective amplification และการทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective

Amplification

การทำปฏิกิริยา preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบให้มากขึ้น และช่วยให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกต้อง การทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 ขั้น นอกจากเป็นการประกันว่าการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไปอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงสุดแล้ว ยังช่วยลด background ที่เป็นพื้นค่าในลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย นอกจากนี้ยังอาจทำ preselective amplification ด้วยไพรเมอร์ที่ไม่มีเบสคัดเลือก (ไพรเมอร์ +0) ได้ในกรณีการวิเคราะห์จีโนมขนาดเล็กที่ต้องใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกจำนวนน้อย เพื่อทำให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้นและสามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนขึ้น

ขั้นสุดท้าย คือการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้โดยทำ electrophoresis ใน denaturing polyacrylamide gel แบบเดียวกับที่ใช้หาลำดับเบสของดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการแยกโดยวิธีนี้อยู่ในช่วง 50-100 แถบ การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นใช้วิธีติดฉลาก ไพรเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งด้วยสารกัมมันตรังสี หลังจากทำ electrophoresis เสร็จแล้ว ตรวจสอบโดยการทำภาพรังสีในตัว (autoradiograph) หรืออาจใช้วิธีติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ตรวจสอบโดยใช้เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติก็ได้ การที่ต้องตรวจสอบผลการทำเอเอฟแอลพีโดยใช้สารกัมมันตรังสีหรือใช้เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ ทำให้เกิดข้อจำกัดในห้องปฏิบัติการหลายอย่าง จึงมีการประยุกต์ใช้วิธีตรวจสอบเอเอฟแอลพีด้วยการไฮบริไดเซชัน โดยใช้โพรบที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี (non radioactive label) หรือวิธีย้อมเจลดด้วยซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO_3) ซึ่งให้ผลเป็นที่น่าพอใจ และสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทางดีเอ็นเอทั่วไป

11.2 ที่มาของความแตกต่างระหว่างลายพิมพ์เอเอฟแอลพี

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำเอเอฟแอลพีมีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใด ๆ ก็ได้ ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ที่เหมาะสมได้โดยปรับจำนวนเบสคัดเลือกว่า 3' ของไพรเมอร์ที่ใช้ แม้ว่าวิธีการทำเอเอฟแอลพีจะค่อนข้างยุ่งยาก แต่ผลที่ได้สามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) และสามารถเลือกคู่ผสมของไพรเมอร์ได้หลายแบบ ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์คู่หนึ่งนั้นจะเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากในเวลาเดียวกัน แบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างที่เกิดขึ้นมาจากการเปลี่ยนแปลงเบส (point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไปหรือเกิดขึ้นใหม่ หรือการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตรงส่วนที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกว่า 3' ของไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังกล่าวแล้วแต่กรณี หรืออาจเกิดจากมีชิ้นดีเอ็นเอสั้น ๆ ขาดหายไป หรือสอดแทรกเข้ามาในระหว่างตำแหน่งจดจำเฉพาะของเอนไซม์ก็ได้ ผลที่เกิดขึ้นคือการมีแถบดีเอ็นเอ หรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น ๆ หรือชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเปลี่ยนไป การถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากการทำเอเอฟแอลพีจึงมีทั้งแบบที่แสดงลักษณะเด่น (dominance) โดยปรากฏเป็นการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ และแบบที่แสดงลักษณะข่มร่วมกัน (codominance) โดยปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยทั่วไปจะพบเครื่องหมายเอเอฟแอลพี แบบที่เป็นลักษณะข่มมากกว่า (สุรินทร์, 2545)

11.3 การใช้ประโยชน์จากเทคนิคเอเอฟแอลพี

มีการนำเทคนิคเอเอฟแอลพีมาใช้ประโยชน์กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเทคนิคเอเอฟแอลพีมีข้อได้เปรียบกว่าเทคนิคอื่น ๆ คือ การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพีไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเช่นเดียวกับเทคนิคอาร์เอพีดี จึงทำได้อย่างกว้างขวาง ทำให้รวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวนน้อย ทำให้เกิด polymorphism ได้จำนวนมาก จึงสามารถใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างได้ดี ใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต การจดทะเบียนลิขสิทธิ์ การตรวจสอบความเป็นลูกผสม ใช้กับสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดเล็กก็ได้ โดยการปรับจำนวนเบสที่ใช้คัดเลือกว่า 3' ของไพรเมอร์ แม้จะมีการนำเทคนิคเอเอฟแอลพีมาใช้อย่างกว้างขวาง แต่เทคนิคเอเอฟแอลพีก็มีข้อจำกัดเช่นกัน คือค่าใช้จ่ายค่อนข้าง

สูง วัสดุหลายอย่างมีราคาแพง แอบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่แสดงการข่มแบบ dominance ซึ่งทำให้วิเคราะห์ผลได้ยากกว่าเครื่องหมายแบบที่เป็น codominance เนื่องจากการทำปฏิกิริยารั้งหนึ่ง ๆ เกิดแอบดีเอ็นเอจำนวนมาก และมีขนาดใกล้เคียงกัน บางครั้งแอบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันอาจมาจากซันดิเอ็นเอคนละตำแหน่ง ทำให้การวิเคราะห์ผลผิดพลาดได้ ไม่เหมาะสำหรับใช้เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันมาก ๆ เพราะจะมีแอบดีเอ็นเอที่เหมือนกันจำนวนน้อย ทำให้การวิเคราะห์ผลในแง่การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการผิดพลาดได้ สิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกันมากก็ไม่เหมาะสมเช่นกัน เพราะจะพบแอบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวนน้อย (สุรินทร์, 2545)

12. เทคนิคเอสเอสซีพี (Single Strand Conformational Polymorphism :SSCP)

เอสเอสซีพีเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างระดับ 1 นิวคลีโอไทด์ หรือ point mutation ได้ โดยอาศัยสมบัติการสร้างโครงรูปทุติยภูมิที่แตกต่างกันของดีเอ็นเอสายเดี่ยวภายใต้สภาพ non-denaturation ความแตกต่างของลำดับเบสเพียง 1 ตัว ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงมีผลทำให้มีโครงสร้างทุติยภูมิแตกต่างกัน เป็นผลให้การเคลื่อนที่ใน non-denaturing polyacrylamide gel ต่างกัน ตรวจสอบความแตกต่างโดยย้อมดีเอ็นเอด้วยซิลเวอร์ไนเตรต เอสเอสซีพีอาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ และเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ตรวจสอบ Single strand nucleotide polymorphism (SNP) แต่ปัญหาของเอสเอสซีพี คือสามารถตรวจสอบได้เฉพาะซันดิเอ็นเอขนาดเล็ก ๆ เท่านั้น ประมาณ 0.3 – 0.7 กิโลเบส (kb) ถ้าซันดิเอ็นเอมีขนาดใหญ่เกินไป จะต้องนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะให้มีขนาดเล็กลงแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอสเอสซีพี เรียกเทคนิคนี้ว่า PCR-RF-SSCP หรือ Restriction endonuclease fingerprinting-SSCP (Ref-SSCP) (Slabaugh *et al.*, 1997)

เทคนิคเอสเอสซีพี ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อใช้ตรวจสอบ polymorphism ของดีเอ็นเอมนุษย์ขึ้นเป็นครั้งแรกโดย Orita *et al.* (1989) โดยย่อยจีโนมิกดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วทำให้เสียสภาพเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวด้วยสารละลาย alkaline แล้วนำไปทำ electrophoresis ใน neutral polyacrylamide gel ตรวจสอบด้วยโพรบที่จำเพาะต่อซันดิเอ็นเอที่เกิดการกลาย ชนิดการแทนที่นิวคลีโอไทด์ (nucleotide substitution) ซึ่งซันดิเอ็นเอที่เกิดการสร้างโครงรูปทุติยภูมิแตกต่างไปจากดีเอ็นเอปกติ จากผลการตรวจสอบพบความหลากหลายของแอลลีล ตรงตามกฎของเมนเดล

13. การใช้ประโยชน์จากเครื่องหมายโมเลกุล

จากสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอต่าง ๆ ที่มีทั้งข้อดีและข้อด้อยได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมกับงานวิจัย เช่น การศึกษาความหลากหลายของข้าวบาร์เลย์ 16 พันธุ์ที่มาจากต่างพื้นที่กัน โดยใช้ bulked analyses และเทคนิคอาร์เอพีดีและ Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) (Fernandez *et al.*, 2002) การหาแผนที่พันธุกรรมของไผ่ตง เพื่อหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่บ่งชี้และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีและเทคนิคเอเอฟแอลพี ซึ่งพบว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถบ่งชี้ความสัมพันธ์ของไผ่ที่ไม่ทราบสายพันธุ์มาก่อนเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ที่อ้างอิงมาแล้ว (http://www.sut.ac.th/ird/VIJAI_Content/finished/Research%20project/Abstract/SUT3-304-43-24-33.pdf) เทคนิคอาร์เอพีดีและเทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถประยุกต์ใช้ในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่บ่งชี้และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ได้ เช่น การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและเทคนิคเอเอฟแอลพีในการจัดจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลัง สามารถใช้แยกความแตกต่างของพันธุ์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการแบ่งกลุ่มลักษณะทางสัณฐานวิทยา (สุพัตรา, 2549) งานทดลองที่นำเทคนิคเอเอฟแอลพีไปใช้มีหลายด้านทั้งใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต เช่น มะกอกโอลีฟที่ปลูกในประเทศไทย (ปิติชัย, 2547) และปรังสกุล *Cycas* (Mekanawakul *et al.*, 2003) และ ปรังสกุล *Cycas* และ *Zamia* ในประเทศไทย (สจี, 2547) นอกจากนี้มีการนำไปศึกษาเพื่อประโยชน์ทางการเกษตร เช่น ศึกษาลักษณะทนเค็มในข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum spontaneum*) (Pakniyat *et al.*, 1997) ศึกษาหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคขอบใบแห้งของข้าวพันธุ์ Near Isogenic Lines (NILs) (กาญจนา, 2544) ศึกษาหาเครื่องหมายโมเลกุลที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว (วารุณี, 2544) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วหรั่ง (*Vigna subterranean* (L.) Verdc.) พบว่าสามารถจัดกลุ่มถั่วหรั่งโดยส่วนใหญ่สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยอาศัยแหล่งพันธุ์และการจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงคุณภาพบางลักษณะ (อัญชนา, 2549) การวิเคราะห์กรดไขมันและประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในข้าวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันโดยใช้เทคนิค Allele Specific-PCR (AS-PCR), SSCP และ microsatellite markers พบว่า สามารถจัดกลุ่มข้าวออกเป็น 7 กลุ่ม และสามารถแยกข้าวป่าที่มีชุดจีโนม A^m A^m CC CCDD และ HHJJ ออกจากข้าวปลูกและข้าวป่าที่มีชุดจีโนม AA ได้อย่างชัดเจน (ไวพจน์, 2547) การจำแนกสายพันธุ์และตรวจสอบความแปรปรวนของพืชที่เกิดจากการผสมภายในชนิดเดียวกัน (Intraspecific variation) โดยการพัฒนาเทคนิค PCR-Ref-SSCP (Sato and Nishio, 2002)

งานวิจัยที่ศึกษาโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจสอบความเป็นลูกผสม

วาริน (2545) ใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรวจสอบยางกราด ยางพลวง และยางที่คาดว่า เป็นลูกผสม ชนิดละ 5 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล sequence-related amplified polymorphism (SRAP) พบว่าผลการศึกษาสถิติฐานวิทยาร่วมกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอแสดงเป็นค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ค่าความต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) และ phylogenetic tree ซึ่งสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่มได้อย่างชัดเจนคือ กลุ่มยางกราด กลุ่มยางพลวง และกลุ่มยางที่คาดว่า เป็นลูกผสม และไม่ปรากฏว่าตัวอย่างของยางที่คาดว่า เป็นลูกผสมอยู่ในกลุ่มของยางพลวงหรือยางกราด จึงคาดว่ายางทั้ง 3 กลุ่ม เป็นคนละชนิดกัน

Anuntalabhochai *et al.* (2007) ศึกษาการตรวจลูกผสมในสายพันธุ์ *Curcuma spp.* โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD (High Annealing temperature Rapid Amplified Polymorphic DNA) ใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาด 10 คู่เบส จำนวน 11 ชนิด ในการเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยาพีซีอาร์กับ *Curcuma* สายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 20 ตัวอย่าง จากนั้นเลือกแถบดีเอ็นเอที่สนใจนำไปพัฒนาเป็น Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) marker ซึ่งจะได้แถบดีเอ็นเอที่ขนาด 600 คู่เบส จะพบในพันธุ์ปทุมมาและลูกผสมระหว่างปทุมมาเท่านั้น จึงสามารถใช้ตรวจสอบลูกผสมที่เกิดจากปทุมมาได้

Shasany *et al.* (2005) ใช้เทคนิคอาร์เอฟพีดีและเทคนิคเอเอฟแอลพี ในการตรวจสอบ *Mentha* ลูกผสมที่เกิดขึ้นภายในสายพันธุ์เดียวกันและลูกผสมที่เกิดขึ้นระหว่างสายพันธุ์ซึ่งได้แก่ลูกผสมที่เกิดจาก *M. arvensis* CIMAP/C18 x *M. arvensis* CIMAP/C17, *M. spicata* CIMAP/C30 x *M. spicata* CIMAP/C33 และ *M. arvensis* CIMAP/C17 x *M. spicata* CIMAP/C33 พบว่าเทคนิคอาร์เอฟพีดีสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอร่วมระหว่างพ่อ แม่ และลูกผสมที่เกิดขึ้นคือ ไพรเมอร์ OPJ 01, MAP 06, OPT 08 และ OPO 01 ตรวจพบในสายพันธุ์ *M. arvensis* ไพรเมอร์ OPJ 05, OPJ 14, OPO 19 และ OPT 09 ตรวจพบในสายพันธุ์ *M. spicata* และไพรเมอร์ OPJ 07, OPJ 10, OPJ 11, OPJ 14 และ OPO 02 ตรวจพบในสายพันธุ์ *M. arvensis* x *M. spicata* ส่วนเทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอร่วมระหว่างพ่อ แม่ และลูกผสมที่เกิดขึ้นคือ ตรวจพบในสายพันธุ์ *M. arvensis* 40 แถบ, สายพันธุ์ *M. spicata* 32 แถบ และสายพันธุ์ *M. arvensis* x *M. spicata* 41 แถบ และพบว่าค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างพ่อ แม่ และลูกผสมมีค่ามากกว่าค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างพ่อและแม่

งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัว

วัชร (2543) ศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แหยมแก้ว และพันธุ์ลูกผสมด้วยเทคนิค polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้ก้านอ่อนและใบอ่อนที่ได้จากการใช้ส่วนของเอ็มบริโอของเมล็ดมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตรวจวิเคราะห์ไอโซไซม์ 2 ชนิดคือ Esterase (EST) และ Peroxidase (PEX) จากการทดลองพบว่าในเอ็นไซม์ EST ปรากฏรูปแบบไอโซไซม์ที่ต่างกัน 7 รูปแบบ และในเอ็นไซม์ PEX ปรากฏรูปแบบไอโซไซม์ที่ต่างกัน 5 รูปแบบ ในการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ พบว่าบัวหลวงแหยมแก้ว และบัวหลวงพันธุ์ลูกผสมมีความใกล้เคียงกับบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก

อรรณ (2542) ศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในบัวประดับจำนวน 5 พันธุ์คือ บัวฝรั่ง บัวผืนนางกวักสีน้ำเงินคราม บัวสายชมพูชิลอน บัวผืนงอกต้นบนใบ และบัวผืนยงลาก ด้วยเทคนิค polyacrylamide gel electrophoresis ชิ้นส่วนของบัวประดับที่ใช้คือ ก้านใบและใบอ่อน จากการวิเคราะห์ไอโซไซม์ 6 ระบบ ผลปรากฏว่าสามารถตรวจจับกิจกรรมของเอ็นไซม์ได้ 2 ระบบคือ Esterase (EST) และ Glutamic Oxaloacetic Transaminase (GOT) ในการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์บัวทั้ง 5 พันธุ์ได้

Guo *et al.* (2007) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงจำนวน 65 ตัวอย่างจากประเทศจีน พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์ 17 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 195 แถบ เป็น polymorphic band 66.7 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ OPC 05, OPG10, OPN 20, OPP 09 และ OPS 17 ให้ polymorphic band 100 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.45-0.85 ค่า Nei's gene diversity (h) เท่ากับ 0.30 และเมื่อนำมาจัดกลุ่มสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่ม *Nelumbo nucifera* Gaertn. และกลุ่มที่ 2 เป็นพันธุ์ที่ปลูกได้เฉพาะถิ่น หรือเป็นพันธุ์ลูกผสมของ *Nelumbo lutea* Pers.

Podoplelova *et al.* (2005) ศึกษาการจำแนกทางวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogenetic) ของพืชดอกในกลุ่มที่อาศัยอยู่ในน้ำ (*Nymphaeales*) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS2-4 ของคลอโรพลาสต์ พบว่าให้ผลสอดคล้องกับการจำแนกทางอนุกรมวิธาน สามารถแบ่งได้ 2 วงศ์ ได้แก่ *Cobombaceae* (ประกอบด้วย สกุล *Cobomba* และ *Brasenia*) และ *Nymphaeaceae* (ประกอบด้วย สกุล *Barclaya*, *Euryale*, *Nuphar*, *Nymphaea*, *Ondinea* และ *Victoria*)

Jianhua *et al.* (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ปลูก ในจังหวัด Heilongjiang ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี และไอเอสเอสอาร์ (ISSR) พบว่า ลักษณะภูมิศาสตร์มีผลต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น

Han *et al.* (2007) ศึกษาประชากรบัวหลวงจากทะเลสาบ 3 แห่ง ได้แก่ Baoan, Liangzi และ Niushang ในบริเวณตอนกลางของประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไอเอสเอสอาร์ จำนวน 12 ไพรเมอร์ พบความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรสูงกว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร และเมื่อมีการจัดกลุ่มพบว่ามีบางตัวอย่างในบางประชากรกระจายอยู่ในกลุ่มประชากรอื่น อันเนื่องมาจากเกิด gene flow ในประชากรที่ศึกษาจากทะเลสาบหนึ่งไปทะเลสาบหนึ่ง และในปีเดียวกันนี้ Han *et al.* (2007) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ *Nelumbo nucifera* Gaertn. หรือถูกผสมระหว่าง *Nelumbo nucifera* Gaertn. กับ *Nelumbo lutea* (willd) Pers. โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nuclear ribosomal internally transcribed spacer (nrITS) ร่วมกับเทคนิคอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์ พบว่าจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nrITS บัวหลวงจากจีนมีความเหมือนทางพันธุกรรมสูงกับบัวหลวงจากญี่ปุ่น ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์ และนอกจากนี้เทคนิคอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์ ยังสามารถแบ่งบัวหลวงออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม *Nelumbo nucifera* Gaertn. กับกลุ่ม *Nelumbo lutea* (willd) Pers. และในกลุ่ม *Nelumbo nucifera* Gaertn. สามารถแบ่งเป็นกลุ่มจากเหง้าและกลุ่มจากดอก ส่วนกลุ่มจากเมล็ดกระจายอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับกลุ่มจากดอก

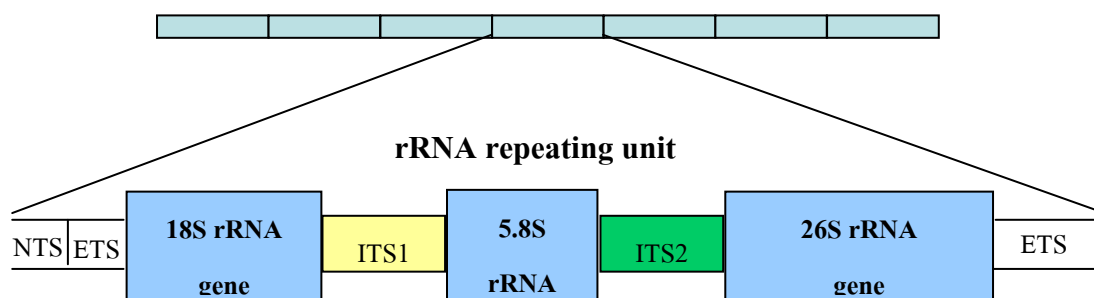
14. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing analysis)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นเทคนิคที่สำคัญที่สุดสำหรับนักชีวโมเลกุล เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นข้อมูลที่ชัดเจนและเป็นเอกลักษณ์ นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์สามารถนำไปใช้ในการศึกษาในงานด้านชีววิทยาโมเลกุลได้อย่างกว้างขวาง

วิธีการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ใช้หลักการทำให้เกิดชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน 1 เบส โดยใช้ปฏิกิริยาที่ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดที่ตำแหน่งที่มีเบสจำเพาะ หรือสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายเป็นเบสจำเพาะทั้ง 4 ชนิด แล้วจึงแยกชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวโดยวิธี electrophoresis ต่อไป (สุรินทร์, 2545) โดยทั่วไปมีวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ 2 วิธี การหาลำดับเบส

โดยวิธีทางเคมี (chemical sequencing) และการหาลำดับเบสโดยวิธีใช้เอนไซม์ (enzymatic sequencing) ในปัจจุบันมีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ (automated DNA sequencing) ใช้หลักการติดฉลากเบสของดีเอ็นเอด้วยสารเรืองแสงที่แตกต่างกัน แล้วนำเบสเหล่านี้เข้าไปแทรก (incorporate) ในสายดีเอ็นเอใหม่โดยใช้ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส จากนั้นจึงนำไปเคลื่อนผ่านเจลที่มีความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าด้วยหลักการ electrophoresis ทำให้เกิดแถบสีของสารเรืองแสงเรียงกันตามลำดับของสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะถูกรวบรวมด้วยเครื่องรับสัญญาณแสงแล้วแปลงเป็นสัญญาณดิจิทัล ส่งไปวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ โดยกระบวนการทั้งหมดจะเกิดขึ้นอย่างอัตโนมัติภายใต้การทำงานของเครื่องหาลำดับเบส (DNA sequencer) (http://bsu.biotec.or.th/sequeneing_overview.php)

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถศึกษาได้หลายตำแหน่งเช่น ดีเอ็นเอในนิวเคลียส ไมโทคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ การศึกษาในไมโทคอนเดรียและคลอโรพลาสต์อยู่ภายใต้อิทธิพลของพันธุกรรมที่ได้รับจากฝ่ายแม่เพียงฝ่ายเดียว (maternally inherited) จึงต้องมีผลสนับสนุนจากดีเอ็นเอในนิวเคลียสร่วมด้วย (Lucchini, 2003) การศึกษาโดยใช้ตำแหน่งไอทีเอส (ITS, Internal Transcribed Spacer) เป็นส่วนของชุดยีนที่ควบคุมการสร้าง 18S-5.8S-26S RNA ในนิวเคลียส (ภาพที่ 3) ยีนที่สังเคราะห์ ribosomal rRNA อยู่ในรูปของ tandem repeats ซึ่งมีจำนวนซ้ำถึง 1,000 ซ้ำ Alvarez and Wendel (2003) ระบุว่าการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่าครั้งนิยมใช้ไอทีเอส เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่อยู่บนจีโนมในนิวเคลียส และพบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับที่เหมาะสมแก่การนำมาศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้เป็นอย่างดี สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ในระดับตระกูล (family) ระดับสกุล (genus) และระดับชนิดพันธุ์ (species)



ITS = internal transcribed spacer

NTS = nontranscribed spacer

ETS = external transcribed spacer

ภาพที่ 3 โครงสร้างของ rDNA repeat unit ในนิวเคลียส

งานวิจัยที่ศึกษาโดยใช้การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์

จักรพันธ์ (2549) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิดในประเทศไทยโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งไอทีเอสพบว่าการจัดกลุ่มที่สอดคล้องกับการจัดแบ่งโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งแบ่งเป็น 2 สกุลย่อยคือ *Paphiopedilum* และ *Brachypetalum* อย่างไรก็ตามรองเท้านารีช่องอ่างทองแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเข้ากับสกุลย่อย *Paphiopedilum* ซึ่งแตกต่างจากการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อย *Brachypetalum* การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ารองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองอุดร และรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกันสูงมากสอดคล้องกับการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาที่กำหนดให้ใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ร่วมกันว่า *Paphiopedilum concolor*

นันทนา และคณะ (2550) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปอสา จำนวน 12 ตัวอย่างจากพื้นที่ที่แตกต่างกัน 10 จังหวัด คือ จังหวัดเชียงใหม่ แพร่ น่าน สุโขทัย นครราชสีมา เลย ลพบุรี สระบุรี กาญจนบุรี ราชบุรี และปอสาญี่ปุ่น โดยใช้ลำดับเบสไอทีเอสบนสายดีเอ็นเอของปอสาและโปรแกรม genebee มาวิเคราะห์ พบว่าปอสาไทยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ปอสาจากจังหวัดเชียงใหม่ แพร่ น่าน สุโขทัย กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ลพบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี สระบุรี

สุรินทร์ และคณะ (2548) ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยโคลนส่วนของ ITS มาหาลำดับเบส และ ออกแบบไพรเมอร์ แล้วนำไพรเมอร์ที่ได้มาตรวจสอบกับตัวอย่างกล้วยไม้สกุลหวายจำนวน 47 ตัวอย่าง โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 6 ชนิด พบว่าสามารถแยกตัวอย่างกล้วยไม้พันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์การค้าได้เกือบทั้งหมด

Devos *et al.* (2005) ใช้ไอทีเอสและ external transcribed spacers (ETS) ศึกษากล้วยไม้สกุล *Dactylorhiza* 4 ชนิด ได้แก่ *D. fuchsia*, *D. saccifera*, *D. foliosa* และ *D. maculate* จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยวิธี parsimony พบว่าตัวอย่างทั้งหมดของกล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม โดยที่ 3 กลุ่มมีความชัดเจนได้แก่กลุ่ม *D. saccifera*, *D. foliosa* และ *D. maculate* (กลุ่ม B,C และ D ตามลำดับ) ในขณะที่ *D. fuchsia* (กลุ่ม A) มีการกระจายอยู่ในกลุ่มอื่นทั้ง 3 กลุ่ม ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *D. fuchsia* ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมแบบดิพลอยด์ และ *D. maculate* ซึ่งมีจำนวนชุดโครโมโซมแบบเทตราพลอยด์ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดเป็นพิเศษกับ *D. foliosa* การทดลองนี้ทำให้เกิดสมมติฐานใหม่เพิ่มขึ้นว่า *D. foliosa* อาจจะเป็นบรรพบุรุษของ *D. maculate* ซึ่งมีความแตกต่างกันของจำนวนชุดโครโมโซม

Ro *et al.* (2007) ศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดที่รับประทานได้สายพันธุ์ *Pleurotus eryngii* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไอทีเอส เทคนิคอาร์เอพีดี และ ลักษณะทางสรีรวิทยา พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S rDNA-ITS2 ของ *Pleurotus* sp. ทั้ง 24 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบไปด้วย 22 สายพันธุ์ของ *P. eryngii* และสายพันธุ์ควบคุม (control) อีก 2 สายพันธุ์คือ *P. ostreatus* และ *P. ferulae* มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณนี้เหมือนกันถึง 99 เปอร์เซ็นต์ จึงไม่สามารถใช้ตรวจสอบสายพันธุ์เห็ดที่มีความใกล้ชิดกันได้ ส่วนเทคนิคอาร์เอพีดี สามารถแยกเห็ด *P. eryngii* 22 สายพันธุ์ออกจากเห็ด *P. ostreatus* และ *P. ferulae* การวิเคราะห์ลักษณะทางสรีรวิทยาของ fruiting bodies ในเห็ด ให้ผลการจัดกลุ่มเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

Tsai *et al.* (2004) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกล้วยไม้สกุลหวายจากการวิเคราะห์ ลำดับเบสส่วนไอทีเอส ในกล้วยไม้ของไต้หวันจำนวน 12 ชนิด และจากการหาค่าความต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) พบว่าควรแยก *D. furcatopedicellatum* และ *D. somai* ออกจากกล้วยไม้สกุลหวาย

Xu *et al.* (2006) ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไอทีเอสในการตรวจสอบส้ม Huyou (*Citrus changshanensis*) ซึ่งเป็นส้มลูกผสมในธรรมชาติที่ยังไม่ทราบที่มาของพ่อและแม่พันธุ์ ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไอทีเอสของส้มแมนดาริน 3 ตัวอย่าง ส้มหวาน 1 ตัวอย่าง ส้มเปรี้ยว 1 ตัวอย่าง และส้มโอ 1 ตัวอย่าง พบว่าที่ตำแหน่งไอทีเอส 1 ของส้ม huyou มีความยาว 250 คู่เบส มี 8 ตำแหน่งที่มีลำดับเบสแตกต่าง ซึ่งให้ผลตรงกับส้มเปรี้ยวและส้มโอ ทำให้ทราบว่าส้ม huyou น่าจะเป็นลูกผสมระหว่างส้มเปรี้ยวและส้มโอ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างบัวหลวง

รวบรวมพันธุ์บัวหลวงจากแหล่งต่าง ๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ (ตารางที่ 1-3) นำมาปลูกเพื่อสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนและผสมพันธุ์

ตารางที่ 1 รายชื่อตัวอย่างบัวหลวงที่ใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

รหัส	ชื่อและแหล่งที่มา	รหัส	ชื่อและแหล่งที่มา
1.	ฉัตรขาว มก.	32.	แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว
2.	ฉัตรชมพู พิพิธภัณฑสถานแห่งชาติ	33.	แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว
3.	แหลมชมพู พระราชินี	34.	แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว
4.	แหลมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด)	35.	แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว
5.	แหลมชมพู พิจิตร	36.	บัวหลวง มก.
6.	แหลมขาว พิจิตร	37.	แหลมชมพู จีน ลาดหลุมแก้ว
7.*	แหลมชมพู สามร้อยยอด ประจวบฯ	38.	แหลมชมพู จีน ลาดหลุมแก้ว (เมล็ด)
8.*	แหลมขาว คลองโยง นครปฐม	39.	บัวหลวง มก.
9.	แหลมชมพู จีน ดอกสีแดง	40.	แหลมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด)
10.	แหลมชมพู จีน ดอกสีแดง (เมล็ด)	41.	แหลมชมพู พิจิตร
11.	ได้หัววัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด)	42.	แหลมขาว พิจิตร
12.	ได้หัววัน-2 White thousand petals (เมล็ด)	43.	แหลมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด)
13.	ได้หัววัน-4 Hunan white (เมล็ด)	44.	แหลมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด)
14.	ได้หัววัน-8 Hunan white (เมล็ด)	45.	ได้หัววัน-5 (เมล็ด)
15.	แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด)	46.	ได้หัววัน-7 (เมล็ด)
16.	แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด)	47.	ได้หัววัน-9 (เมล็ด)
17.	แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด)	48.	ฉัตรขาว มก.
18.	ฉัตรชมพู จตุจักร (เมล็ด)	49.	ฉัตรชมพู มก.
19.	แหลมขาว ปทุมธานี	50.	จีน ดอกซ้อนแดง (พันธุ์เหง้า)
20.	แหลมชมพู ปทุมธานี	51.	ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง
21.	แหลมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด)	52.	แหลมชมพู สระบุรี
22.	แหลมขาว พิพิธภัณฑสถานแห่งชาติ	53.	แหลมชมพู สระบุรี
23.	ฉัตรขาว พิพิธภัณฑสถานแห่งชาติ	54.	ฉัตรชมพู สระบุรี
24.	แหลมชมพู พิพิธภัณฑสถานแห่งชาติ	55.	ฉัตรชมพู สระบุรี
25.	ฉัตรขาว ปทุมธานี	56.	แหลมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม
26.	ฉัตรชมพู ปทุมธานี	57.	ได้หัววัน-2 (เมล็ด)
27.	ฉัตรชมพู ปทุมธานี	58.	ได้หัววัน-4 (เมล็ด)
28.	แหลมชมพู ปทุมธานี	59.	ได้หัววัน-6 (เมล็ด)
29.	ฉัตรขาว มก.	60.	ฉัตรชมพู ปทุมธานี
30.	แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว	61.	แหลมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด)
31.	แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว		

* ตัวอย่างบัวที่ใช้ผสมพันธุ์

ตารางที่ 2 รายชื่อตัวอย่างของบัวหลวงที่ใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอเอฟแอลพี

รหัส	ชื่อและแหล่งที่มา	รหัส	ชื่อและแหล่งที่มา
1.	ฉัตรขาว มก.	24.	แหลมชมพู พุทธรณชาติ นครปฐม (เมล็ด)
2.	ฉัตรชมพู พิพิธภัณฑสถาน	25.	ฉัตรชมพู มก.
3.	แหลมชมพู พระราชินี	26.	แหลมชมพู สระบุรี
4.	แหลมชมพู กรุงเทพฯ	27.	ฉัตรชมพู สระบุรี
5.	แหลมชมพู พิจิตร	28.	ฉัตรชมพู สระบุรี
6.	แหลมขาว พิจิตร	29.	แหลมชมพู พุทธรณชาติ นครปฐม
7.*	แหลมแดง สามร้อยยอด ประจวบฯ	30.	ฉัตรชมพู ปทุมธานี
8.*	แหลมขาว คลองโยง นครปฐม	31.	ไต้หวัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด)
9.	แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด)	32.	ไต้หวัน-2 White thousand petals (เมล็ด)
10.	แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด)	33.	ไต้หวัน-4 Hunan white (เมล็ด)
11.	แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด)	34.	ไต้หวัน-8 Hunan white (เมล็ด)
12.	ฉัตรชมพู จตุจักร (เมล็ด)	35.	ไต้หวัน-5 (เมล็ด)
13.	แหลมชมพู ปทุมธานี	36.	ไต้หวัน-7 (เมล็ด)
14.	แหลมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด)	37.	ไต้หวัน-9 (เมล็ด)
15.	แหลมขาว พิพิธภัณฑสถาน	38.	จีน ดอกสีแดง
16.	ฉัตรขาว พิพิธภัณฑสถาน	39.	จีน ดอกสีแดง (เมล็ด)
17.	แหลมชมพู พิพิธภัณฑสถาน	40.	จีน ดอกซ้อนแดง (พันธุ์เห้ง)
18.	ฉัตรขาว ปทุมธานี	41.	จีน Wuhan กวางเจา (เมล็ด)
19.	ฉัตรชมพู ปทุมธานี	42.	ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง
20.	บัวหลวง ลาดหลุมแก้ว	43.	ลูกผสม 1-1
21.	บัวหลวง มก.	44.	ลูกผสม 1-2
22.	บัวหลวง มก.	45.	ลูกผสม 1-3
23.	แหลมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด)	46.	ลูกผสม 1-4

* ตัวอย่างบัวที่ใช้ผสมพันธุ์

ตารางที่ 3 รายชื่อตัวอย่างบัวหลวงที่ใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคเอสเอสซีพี

รายชื่อบัวหลวงพื้นเมืองในไทย		รายชื่อบัวหลวงจากต่างประเทศ	
รหัส	ชื่อและแหล่งที่มา	รหัส	ชื่อและแหล่งที่มา
1.	บัวหลวง มก.	24.	ไต้หวัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด)
2.	ฉัตรชมพู พิพิธภัณฑสถานแห่งชาติ	25.	ไต้หวัน-2 White thousand petals (เมล็ด)
3.	แหลมชมพู พระราชินี	26.	ไต้หวัน-4 Hunan white (เมล็ด)
4.	แหลมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด)	27.	ไต้หวัน-8 Hunan white (เมล็ด)
5.	แหลมชมพู พิจิตร	28.	ไต้หวัน-5 (เมล็ด)
6.	แหลมขาว พิจิตร	29.	ไต้หวัน-7 (เมล็ด)
7.*	แหลมชมพู สามร้อยยอด ประจวบฯ	30.	ไต้หวัน-9 (เมล็ด)
8.*	แหลมขาว คลองโยง นครปฐม	31.	จีน ดอกสีแดง (เมล็ด)
9.	แหลมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด)	32.	จีน ดอกซ้อนแดง พันธุ์เหง้า
10.	แหลมขาว พิพิธภัณฑสถานแห่งชาติ	33.	จีน Wuhan กวางเจา (เมล็ด)
11.	ฉัตรขาว พิพิธภัณฑสถานแห่งชาติ	34.	ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง
12.	แหลมชมพู พิพิธภัณฑสถานแห่งชาติ	35.	จีน ดอกเล็ก
13.	แหลมชมพู ตลาดหลุมแก้ว	36.	ไต้หวันดอก สีแดง (เมล็ด)
14.	แหลมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด)	37.	ไต้หวัน (เมล็ด)
15.	แหลมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด)	38.	ไต้หวัน Genetic resource (เมล็ด)
16.	แหลมชมพู สระบุรี	39.	ไต้หวัน Genetic resource (เมล็ด)
17.	ฉัตรชมพู สระบุรี	40.	ไต้หวัน (เมล็ด)
18.	แหลมชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์		
19.	ฉัตรชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์		
20.	ฉัตรขาว มก.		
21.	บัวหลวง		
22.	แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด)		
23.	ฉัตรชมพู จตุจักร (เมล็ด)		

* ตัวอย่างบัวที่ใช้ผสมพันธุ์

2. อุปกรณ์ที่ใช้ทดลอง

2.1 อุปกรณ์การผสมพันธุ์บัว

ปากคืบ กรรไกร ถูงตาข่าย ป้ายชื่อ

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกบัว

กระถาง ดิน ปุ๋ย

2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.3.1 โกร่งบดตัวอย่าง

2.3.2 เครื่องแก้ว เช่น กระบอกตวง และบีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ เป็นต้น

2.3.3 เครื่องเขย่า (shaker) รุ่น KS 125B บริษัท IKA Labortechnik Stufen, Germany

2.3.4 เครื่องคอมพิวเตอร์ที่เชื่อมต่อกับ Internet

2.3.5 เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) และภาพถ่าย (gel documentation)

รุ่น DOC-PRINT-1000/26M บริษัท Vilber Lourmat, France

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

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

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

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

2.3.10 ชุดเครื่องมือ agarose gel electrophoresis

2.3.11 ชุดเครื่องมือ acrylamide gel electrophoresis รุ่น protein® II xi cell บริษัท Biorad, USA

2.3.12 ตู้เย็น รุ่น TH-890 บริษัท Sharp ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (บริษัท Mirage และ ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส รุ่น 8558 S/N 86939-206 Bio-freezer® บริษัท Forma Scientific, USA

2.3.13 ตู้อบที่ปรับอุณหภูมิได้ (oven) บริษัท Gallenkamp, Japan

2.3.14 ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้ บริษัท Gilson, France พร้อม tip ขนาด 10, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (μ l) นึ่งฆ่าเชื้อ

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

2.3.16 หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ml) และหลอดใส่สารขนาด 15 ml

2.3.17 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Memmert, Germany

2.3.18 หลอดสำหรับตั้งเครื่องพีซีเอ็นเอ (PCR tube)

2.3.19 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น กระดาษซังสาร ซ้อนดักสาร ปากคีบ ถังมือ ถังพลาสติกใส แผ่นพลาสติกใส แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ ถาดพลาสติก และแผ่น cellophane เป็นต้น

3. สารเคมีและเอนไซม์

3.1 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

3.1.1 ไนโตรเจนเหลว

3.1.2 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)

3.1.3 polyvinylpyrrolidone (PVP)

3.1.4 β – Mercaptoethanal

3.1.5 10% CTAB ในสารละลาย 100 ml (CTAB 10 g และ 5 M NaCl 28 ml)

3.1.6 คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1)

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

3.1.8 เอทานอล 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์

3.1.9 RNase บริษัท US Biological, USA

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำ agarose gel electrophoresis

3.2.1 agarose บริษัท Research Organics, USA

3.2.2 1X Tris-borate EDTA (TBE) buffer ซึ่งเตรียมจาก Stock 10X TBE (Tris base 108 g, boric acid 55 g และ 500 mM EDTA pH 8.0 40 ml)

3.2.3 bromophenol blue

3.2.4 xylene cyanol

3.2.5 แลปดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder mix) ของบริษัท GeneRuler™, USA

3.3 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์

3.3.1 PCR buffer

3.3.2 MgCl₂

3.3.3 dNTP บริษัท Fermentas, USA

3.3.4 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase บริษัท Invitrogen Life Technology, Brazil

3.3.5 primers

3.3.6 ultra pure water

3.4 สารเคมีและเอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เทคนิคเอเอฟแอลพีและเอสเอสซีพี

3.3.7 acrylamide บริษัท Pharmacia Biotech, Sweden

3.3.8 methylene bisacrylamide บริษัท Pharmacia Biotech, Sweden

3.3.9 10% ammonium persulphate (APS)

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

3.3.11 1X TBE buffer

3.4.10 ซิลเวอร์ไนเตรด

3.3.10 1 N และ 10 N NaOH

3.3.11 เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

3.3.12 formamide

3.3.13 formaldehyde

3.3.14 bromophenol blue

3.3.15 xylene cyanol

3.3.16 glacial acetic acid

3.3.17 restriction enzyme บริษัท Fermentas, USA

3.5 สารเคมีที่ใช้ในการในการโคลน

3.5.1 อาหาร Luria-Bertani Medium (LB) และ Luria-Agar Medium (LA) สำหรับเลี้ยงเชื้อ

3.5.2 polyethylene glycol (PEG) 8000

3.5.3 $MgCl_2$

3.5.4 dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.5.5 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D galactoside (X-gal)

3.5.6 isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG)

3.5.7 ampicillin

4. โปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลทางอณูชีววิทยานบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

4.1 โปรแกรม blast จาก <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/blast> สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างสายนิวคลีโอไทด์ หรือโปรตีนที่สนใจกับฐานข้อมูล

4.2 โปรแกรม ClustalW 1.82 จาก <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> สำหรับเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือโปรตีนที่กำลังศึกษา

4.3 โปรแกรม NTSYSp-2.20k ใช้ในการสร้าง phylogenetic tree จากข้อมูลการใช้เครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี

4.4 โปรแกรม Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA version 3.1) ใช้ในการสร้าง phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอตรงตำแหน่งไอทีเอส

วิธีการ

1. การผสมพันธุ์บัว

ต้นแม่พันธุ์: จากดอกเริ่มบานวันแรก ซึ่งดอกจะส่งกลิ่นหอม ดึงเกสรเพศผู้ทิ้งในช่วงเช้า (6:30 น.) บริเวณยอดเกสรเพศเมีย (stigma) ของเกสรเพศเมียจะมีสีเหลือง หรือเหลืองอมเขียว

ต้นพ่อพันธุ์: ใช้ปลายพู่กันแตะเกสรเพศผู้ของดอกที่บานเต็มที่ 2 วันจากต้นพ่อพันธุ์ เรณูมีลักษณะเป็นฝุ่นสีเหลือง ใช้ปลายพู่กันที่มีเกสรเพศผู้ติดอยู่ไปป้ายบริเวณยอดเกสรเพศเมียของต้นแม่ จากนั้นคลุมด้วยถุงตาข่ายป้องกันแมลงนำละอองเกสรจากต้นอื่นมาผสม เมื่อเมล็ดแก่ เก็บเมล็ดลูกผสมนำมาเพาะเมล็ดทำโดยนำเมล็ดสมบูรณ์มาฝนกับกระดาษทรายชนิดหยาบแล้วแช่น้ำไว้ เมล็ดจะพองจนน้ำและงอกภายใน 2-5 วัน จากนั้นรอนต้นกล้าเจริญพอสมควร (ประมาณ 1-3 อาทิตย์) จึงนำไปปลูกลงดิน เพื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมในระดับดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลต่อไป

2. การศึกษาความมีชีวิตของเรณู (pollen viability) ของบัวหลวง

เก็บดอกบัวหลวงแหลมชมพูที่บานวันแรก จากแหล่งปลูกพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม ตัดเกสรเพศผู้และเก็บเรณู (pollen) ของดอกบัว นำมาห่อด้วยอูมูมินัมฟอยล์เป็นห่อเล็ก ๆ หลาย ๆ ห่อ เก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้

1. อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง)
2. อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

นำตัวอย่างออกมาทีละห่อ ศึกษาความมีชีวิตของเรณูทุก 1-3 วัน เป็นเวลาประมาณ 1 เดือน โดยวิธีย้อมสีเรณูด้วยอะซิโตคาร์มิน1 เปอร์เซนต์ บนแผ่นสไลด์ ใช้ไม้เล็ก ๆ คนให้เรณูกระจายให้ทั่วสีย้อมปิดด้วยกระจก cover slide นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกข้อมูลโดยการสุ่มนับจำนวนเรณูใน 10 fields และหาค่าเฉลี่ยของเรณูที่ย้อมติดสีและไม่ติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์

กำลังขยาย 100 เท่า เรณูที่ย้อมติดสีแดงเข้มสม่ำเสมอบริเวณส่วนไซโทพลาซึมและมีรูปร่างกลมไม่บิดเบี้ยวจะเป็นเรณูที่มีชีวิต ส่วนเรณูที่ย้อมไม่ติดสีหรือย้อมติดสีจาง ติดสีไม่สม่ำเสมอ จะเป็นเรณูที่ไม่มีชีวิต (ผ่องพรรณ, 2538) วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณู} = \frac{\text{จำนวนเรณูที่ย้อมติดสี}}{\text{จำนวนเรณูทั้งหมดที่สุ่มนับ}} \times 100$$

3. วิธีสกัดดีเอ็นเอ

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ ใช้วิธีที่ปรับปรุงมาจากวิธีจากของ Molecular Biology Laboratory Protocols (2002) (<http://eipotato.org/Trainin/Materials/Molecularl.pdf>) มีรายละเอียดดังนี้

3.1.1 เตรียม 3X CTAB ใส่หลอด 15 ml หลอดละ 5 ml และ β – mercaptoethanol 5 μ l เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 45 นาที

3.1.2 บดตัวอย่างในไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่าง 2 กรัม ใส่หลอด เขย่าให้เข้ากัน

3.1.3 แบ่งใส่หลอด 1.5 ml หลอดละ 750 μ l (ได้ประมาณ 6 หลอด) บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส 45 นาทีขึ้นไป

3.1.4 นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เดิมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 : 1) 750 μ l กลับหลอดไปมาประมาณ 5-10 นาที

3.1.5 ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบ/นาที (rpm) 15 นาที

3.1.6 ควบน้ำใสตอนบน 500 μ l ใส่หลอดใหม่ เดิม 10% CTAB 50 μ l ผสมให้เข้ากัน เดิมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ 500 μ l กลับหลอดไปมา 5- 10 นาที

3.1.7 ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบ/นาที 15 นาที

3.1.8 ควบน้ำใสตอนบนหลอดละ 300 μ l ใส่ในหลอด 1.5 ml รวมแต่ละหลอดให้มีปริมาตร 600 μ l (ได้ทั้งหมด 3 หลอดต่อตัวอย่าง)

3.1.9 ตกตะกอนด้วยเอธานอลสัมบูรณ์ 600 μ l กลับหลอดไปมาเบา ๆ แช่ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

3.1.10 ถัดตะกอนเยาะเกี่ยวดีเอ็นเอ (hook) ถัดตะกอนน้อยปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที 10 นาที

3.1.11 ถัดตะกอนด้วยเอธานอล 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

3.1.12 ปล่อยตะกอนให้แห้ง ละลายใน TE buffer 80-120 μ l (ขึ้นกับปริมาณตะกอน) เติม RNaseA 2 μ l/หลอด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน เก็บที่เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส พร้อมใช้ต่อไป

3.2 การวิเคราะห์คุณภาพและความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ

3.2.1 agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ (V) เป็นเวลาประมาณ 45 นาที แล้วย้อมเจลด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (μ g/ml) นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ สะอาดนาน 5 นาที ดูผลเจลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) เพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ การแตกหักของดีเอ็นเอ การปนเปื้อนจากอาร์เอ็นเอ โปรตีน และสารอื่น ๆ และคาดคะเนปริมาณ ดีเอ็นเออย่างหยาบ ๆ

3.2.2 spectrophotometry ใช้เครื่อง lamda UV/VIS spectrophotometer วัดการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ของดีเอ็นเอที่สกัดได้เพื่อคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอและคุณภาพของดีเอ็นเอ

3.2.3 การคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอ มีหลักการว่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต ของกรดนิวคลีอิกจะอยู่ในช่วงความยาวคลื่นสูงสุดที่ 260 นาโนเมตร (nm) โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร (mg/ μ l) มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (absorbance, A_{260}) เท่ากับ 20 หน่วย absorbance (A_{260})

$$\begin{aligned}\text{กรดนิวคลีอิก หน่วยไมโครกรัมต่อไมโครลิตร } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) &= A_{260} \times 1/20 \\ \text{กรดนิวคลีอิก หน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร } (\text{ng}/\mu\text{l}) &= A_{260} \times 1/20 \times 1000 \\ &= A_{260} \times 50\end{aligned}$$

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

3.2.4 การหาคุณภาพของดีเอ็นเอ ค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 กับ 280 nm (A_{260}/A_{280}) ใช้บอกคุณภาพดีเอ็นเอว่ามีการปนเปื้อนหรือไม่ ถ้ามีค่าอยู่ระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอนั้นบริสุทธิ์ เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ต่อไป ถ้าค่าสูงกว่า 1.85 แสดง

ว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเออยู่มาก และถ้าได้ค่าต่ำกว่า 1.65 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนอยู่มาก

4. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

4.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่จะใช้ในการทำอาร์เอพีดีนั้นจะทดสอบเบื้องต้นว่าไพรเมอร์นั้นสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้โดยใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดีทั้งหมด 216 ชนิด (ตารางที่ 4) กับตัวอย่างบัวหลวงหมายเลข 7 (แหลมชมพู สามร้อยยอด ประจวบคีรีขันธ์) คัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และชัดเจน

4.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยวิธีพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอบัวหลวงที่ละลายใน TE buffer มาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม โดยมีส่วนประกอบต่าง ๆ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

ชุดไพร์เมอร์	หมายเลขไพร์เมอร์	ที่มา
AA	01, 03, 07, 09, 11, 16, 18, 19, 20	Operon Technology
AB	01, 04, 05, 06, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technology
AC	02, 03, 05, 07, 08, 09, 10, 13, 14, 15, 19	Operon Technology
AD	02, 03, 05, 06, 11, 19, 20	Operon Technology
AF	04, 06, 07	Operon Technology
AH	01, 02, 09, 11, 12, 16, 17, 18, 19	Operon Technology
AI	05, 08, 11, 12, 13, 14, 15, 16	Operon Technology
AP	11	Operon Technology
APG	03	Operon Technology
APW	01, 02	Operon Technology
E	15	Bioprobe
O	08	Bioprobe
OPA	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technology
OPB	02, 06, 08	Operon Technology
OPC	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technology
OPD	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technology
OPE	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technology
OPF	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technology
OPH	02	Operon Technology
OPI	03, 04, 10, 12, 14, 18	Operon Technology
OPJ	05	Operon Technology
OPK	02, 14, 16	Operon Technology
OPL	12, 13, 19	Operon Technology
OPN	03, 04, 04, 20	Operon Technology
OPR	02, 03, 05	Operon Technology Operon
OPV	01	Technology
OPX	04, 05	Operon Technology Operon
OPY	02, 03	Technology
PRR	01, 02	Chen <i>et al.</i> (1997)
RS	01	Chen <i>et al.</i> (1997)
RSR	01, 02, 03	Chen <i>et al.</i> (1997)
TPXR	01, 02	Chen <i>et al.</i> (1997)
U.B.C.	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14	Thseng <i>et al.</i> (1999)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในเทคนิคอาร์เอพีดี

สารที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (μl)
จีโนมิกดีเอ็นเอ 50 ng/μl	1.0
อาร์เอพีดีไพรเมอร์ 5 พิโคโมล (pmol)	1.5
10X PCR buffer	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	1.0
dNTP mix (2 mM)	2.0
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/μl)	0.2
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	16.8
ปริมาตรรวม	25.0

โปรแกรมการทำพีซีอาร์ ประกอบด้วย 1 รอบสำหรับการคลายเกลียวและแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที 40 รอบสำหรับปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที รอบสุดท้ายเพื่อให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.1 วิธีการตรวจสอบผลของการทำพีซีอาร์

4.2.1 เตรียม agarose gel เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำ electrophoresis

4.2.2 หยอดผลผลิตของพีซีอาร์ 10 μl ผสมกับ loading dye 2 μl แล้วหยอดลงช่องใน agarose gel

4.2.3 ต่อเครื่องทำ electrophoresis กับแหล่งกำเนิดที่ให้ความต่างศักย์ 110 โวลต์

4.2.4 ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์นาน 10 นาที

4.2.5 ส่องดูใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

5. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP) (Vos *et al.*, 1995)

5.1 ย่อยดีเอ็นเอของบัวหลวงด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดพร้อมกัน คือ *EcoRI* ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความถี่ในการตัดต่ำ มีตำแหน่งจดจำขนาด 6 คู่เบส และเอนไซม์ *MseI* ซึ่งมีความถี่ในการตัดสูง มีตำแหน่งจดจำขนาด 4 คู่เบส แล้วเชื่อมต่อปลายดีเอ็นเอทั้งสองด้านด้วย adapter 2 ชนิด คือ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter

5.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 2 ขั้นตอน ดังนี้

5.2.1 Preselective amplification เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เฉพาะส่วนที่ต้องการ (ตารางที่ 6) โดยนำดีเอ็นเอที่ต่อกับ adapter เรียบร้อยแล้วมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ *EcoRI* ไพรเมอร์และ *MseI* ไพรเมอร์ ที่ต่ออยู่กับเบส 1 ตัวที่ปลาย 3' (primer E+1, primer M+1) (ตารางที่ 8) ผลที่ได้จากการทำ preselective amplification คือ จะเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *EcoRI* และปลายอีกด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *MseI* ซึ่งในขั้นตอนนี้จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการได้ถึง 16 เท่า ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ในขั้นตอนนี้จะเป็ยดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ selective amplification ต่อไป

ตารางที่ 6 องค์ประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา preselective amplification

สารที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (μl)
ดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อ adapter	2.0
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	15.15
dNTP mix (2 mM)	2.5
10x PCR buffer	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	0.75
Primer E+1 (E-A)/(E-C)	1.0
Primer M+1 (M-C)/(M-A)	1.0
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/μl)	0.1
รวม	25.0

ผสมสารต่าง ๆ ให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้โปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1	อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	เวลา	30 วินาที	} 25 รอบ
ขั้นที่ 2	อุณหภูมิ	56	องศาเซลเซียส	เวลา	60 วินาที	
ขั้นที่ 3	อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	เวลา	60 วินาที	

แบ่งส่วนของสารละลายมาทำ electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และเจือจาง 20 เท่าด้วย TE buffer เพื่อเป็นต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นต่อไป

5.2.2 Selective amplification เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (ตารางที่ 7) โดยใช้ *EcoRI* ไพรมเมอร์ และ *MseI* ไพรมเมอร์ที่ต่ออยู่กับเบส 3 ตัวที่ปลาย 3' (primer E+3, primer M+3)

ตารางที่ 7 องค์ประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยา selective amplification

สารที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (μl)
ดีเอ็นเอจากการทำ preselective amplification	5.0
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	8.3
dNTP mix (2 mM)	2.0
10X PCR buffer	2.0
MgCl ₂ (50 mM)	0.6
Primer E+3 (E-ANN)/(E-CNN)	1.0
Primer M+3 (M-CNN)/(M-ANN)	1.0
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/μl)	0.1
รวม	20.0

ผสมสารต่าง ๆ ให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้โปรแกรม touch down 1 รอบ

ขั้นที่ 1	อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	เวลา	30 วินาที	} 1 รอบ
ขั้นที่ 2	อุณหภูมิ	65	องศาเซลเซียส	เวลา	30 วินาที	
ขั้นที่ 3	อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	เวลา	60 วินาที	

ลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย

ขั้นที่ 1	อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	เวลา	30	วินาที	} 35 รอบ
ขั้นที่ 2	อุณหภูมิ	56	องศาเซลเซียส	เวลา	30	วินาที	
ขั้นที่ 3	อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	เวลา	60	วินาที	

จากนั้นแบ่งผลผลิตพีซีอาร์ มาตรวจสอบด้วย electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ นำผลผลิตพีซีอาร์มาเติม AFLP loading buffer (98 % formamide, 10 mM EDTA, 0.1% bromophenol และ 0.1% xylene cyanol) จำนวน 20 µl นำไปป้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่พร้อมสำหรับทำ acrylamide gel electrophoresis

ตารางที่ 8 ลำดับเบสของไพรเมอร์และ adapter ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ
บัวหลวงด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

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

5.3 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดย denaturing polyacrylamide gel

5.3.1 เตรียมกระจกสำหรับเทเจล โดยเช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silene

(bind silene 1 μ l, glacial acetic acid 2.5 μ l และ ethanol 500 μ l) และเช็ดกระจกแผ่นหน้าด้วย repel silene ปหล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที จากนั้นนำกระจกทั้งสองแผ่นมาประกอบเข้าชุด วาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่าง โดยหันด้านที่ทา bind silene และ repel silene เข้าหากัน

5.3.2 เตรียม acrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ โดยมีส่วนประกอบดังนี้

urea 27 g, 10X TBE 6 ml, 10% APS 600 μ l, TEMED 30 μ l, 30% acrylamide (29% acrylamide และ 1% methylene bisacrylamide) 12 ml และน้ำกลั่น 21 ml ผสมเข้าด้วยกัน เทเจลลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม แล้วใส่หัวลงไปด้านบน ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

5.3.3 เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ใช้น้ำล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด ดึงหัวออกและ

ประกอบเข้ากับชุด sequencing gels เติมน้ำสารละลาย 1X TBE buffer ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง

5.3.4 ต่อสายไฟเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าทำ pre-run โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า

1,500 โวลต์ เป็นเวลา 20-30 นาที แล้วปิดเครื่อง ใช้เข็มฉีดยาคูคัพเฟอร์มาล้างผิวหน้าของเจล

5.3.5 หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 3-5 μ l ลงในแต่ละช่อง ปิดเครื่องโดยใช้แรงเคลื่อนเท่าเดิม

คือ 1,500 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

5.3.6 ปิดเครื่อง คูดัพเฟอร์จากช่องด้านบนออก นำกระจกออกและนำเจลที่

ได้ไปย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรดเพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

5.4 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ โดยวิธีย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรด

คัดแปลงมาจากวิธีของ Caetano-Anolles (1997)

5.4.1 เพื่อทำให้แถบดีเอ็นเอปรากฏ นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่แช่ในสารละลาย

fixative (10% acetic acid) เป็นเวลา 20 นาที เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่า

5.4.2 ล้างในน้ำกลั่น 30 นาที ล้างซ้ำอีกครั้ง 5 นาที

5.4.3 นำแผ่นกระจกมาเชื่อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ในเตรตความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำแผ่นเจลออกมาจุ่มลงในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว (10 วินาที) เพื่อล้างซิลเวอร์ในเตรตส่วนเกินออก

5.4.4 นำมาทำให้แถบดีเอ็นเอปรากฏบนกระจกเจลโดยย้ายแผ่นเจลมาแช่ในสารละลาย 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

6. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคเอสเอสซีพี

6.1 การพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะกับยีน

รวบรวมข้อมูลลำดับเบสของยีนที่สนใจจากพืชต่าง ๆ จากฐานข้อมูล GenBank นำมาเปรียบเทียบและพัฒนาไพรเมอร์ที่บริเวณอนุรักษ์

6.2 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ใช้ไพรเมอร์จำเพาะทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ตารางที่ 9) กับจีโนมดีเอ็นเอของบัวหลวง

ตารางที่ 9 องค์ประกอบที่ใช้ในการสังเคราะห์ปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อการตรวจสอบโดยเทคนิค เอสเอสซีพี

สารที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (μl)
จีโนมิกดีเอ็นเอ 50 ng/μl	2.0
dNTP (2.5 mM)	1.0
10X PCR buffer	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	1.0
Primer F (5 pmol/μl)	2.0
Primer R (5 pmol/μl)	2.0
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	14.3
Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.2
รวม	25.0

6.3 การเตรียมดีเอ็นเอสภาพสายเดี่ยว

นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 3 -5 μl ใส่หลอดพีซีอาร์เดิม loading buffer (95% formamide, 0.01M NaOH, bromphenol blue และ 0.05% xylene cyanol) 9 μl ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันทีเพื่อให้ ดีเอ็นเอคงอยู่ในสภาพสายเดี่ยว ก่อนนำไปทำ electrophoresis

6.4 การทำ electrophoresis ในสภาพเดี่ยว

เตรียม acrylamide gel ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ชนิดที่ไม่มีส่วนผสมของสารที่ทำให้ ดีเอ็นเอเสียสภาพ (non-denaturing polyacrylamide gel) (ตารางที่ 10) ใช้แผ่นเจลแนวตั้งขนาด 16x20x0.1 เซนติเมตร โดยเตรียมเจลไว้ล่วงหน้าประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็งตัวสม่ำเสมอ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้เสียสภาพที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่ ในน้ำแข็งทันที มาทำ electrophoresis แนวตั้งในสารละลาย 1X TBE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 300 โวลต์ นาน 3-7 ชั่วโมง ทั้งนี้ระยะเวลาจะอยู่กับความยาวของชิ้นดีเอ็นเอ

ตารางที่ 10 สารที่ใช้เตรียมเจล non-denaturing polyacrylamide ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์

สารที่ใช้ในการเตรียมสาร	ปริมาณ
30% acrylamide (acrylamide 29 g ต่อ bis-acrylamide 1 g ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 ml)	9.0 ml
6X TBE buffer	4.5 ml
10% APS	180.0 μ l
TEMED	36.0 μ l
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	31.5 ml
รวม	45.0 ml

6.5 การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรต

6.5.1 แยกแผ่นเจลออกจากแผ่นกระจกอย่างระมัดระวัง ใส่ในถาดพลาสติก

6.5.2 เติม fixer (10% ethanol ใน 0.5% acetic acid) ให้ท่วมเยาะเบา ๆ นาน 5 นาที

6.5.3 เท fixer ออก แล้วย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต (0.6% silver nitrate ในสารละลาย fixer) เยาะเบา ๆ นาน 30 นาที

6.5.4 เทสารละลายซิลเวอร์ไนเตรตทิ้ง (เก็บในภาชนะที่เฉพาะ)

6.5.5 ล้างด้วยน้ำกลั่น 20 วินาที และ 1 นาที 2 ครั้งตามลำดับ

6.5.6 เติมสารละลาย developer ปริมาตร 300 ml (10 N NaOH 15 ml, 37% formaldehyde 1.5 ml) เยาะเบา ๆ เมื่อเจลเริ่มเปลี่ยนสีให้เท developer เติมทิ้ง แล้วเติม developer ใหม่ลงไป เยาะต่อไปจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน

6.5.7 เท developer ทิ้ง แล้วเติม fixer ลงไปให้ท่วมเยาะเบา ๆ นาน 10 นาที แล้วเท fixer ทิ้ง

6.5.8 ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ ครั้ง

6.5.9 วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากแผ่นเจล ในกรณีที่ต้องการนำไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้นใหม่ด้วยวิธีพีซีอาร์เพื่อนำไปหาลำดับเบสต่อไป สามารถบ่มแถบเจลที่ตัดมาใน TE buffer แช่ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ถ้าต้องการเก็บแผ่นเจล

ไว้ให้น้ำแผ่น cellophane ที่เปียกประกบกับแผ่นเจลทั้งสองด้าน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ซึ่งแผ่นเจลให้ตั้งทุกด้าน แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

7. การวิเคราะห์ผลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มาจากเทคนิคอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี

7.1 บันทึกแถบดีเอ็นเอของบั้งที่ปรากฏโดยอ่านแถบที่ปรากฏบนแผ่นเจลและบันทึกเป็นสัญลักษณ์ “1” กับการเกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” กับการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS)pc version 2.20k ซึ่งจะคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างบั้งหลวงแต่ละตัวอย่างและสร้างเป็น phylogenetic tree เพื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (clustal analysis) ด้วยวิธี Neighbour- Joining (Saitou และ Nei, 1987) และ Principal Component Analysis (PCA) การคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) ใช้วิธีของ Sneath และ Sokal (1973) ดังสมการ

$$S_{ij} = a+d/(a+b+c+d)$$

เมื่อ S_{ij} = ค่า similarity ระหว่างพันธุ์ i และพันธุ์ j
 a = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้ง 2 พันธุ์
 b = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์ i แต่ไม่พบในพันธุ์ j
 c = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์ j แต่ไม่พบในพันธุ์ i
 d = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่เกิดขึ้นในทั้ง 2 พันธุ์

และ คำนวณค่า Polymorphic Information Contents (PICs) ของแต่ละแถบดีเอ็นเอ หรือแต่ละ marker จากสูตร

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

โดย P_i คือความถี่ของแอลลีลที่ i ซึ่ง P_i ประกอบด้วย P_a (absent allele) และ P_p (present allele) ค่า PICs เป็นค่าที่บอกโอกาสที่จะพบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง ที่เลือกมาแบบสุ่ม

8. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของพ่อ แม่ และลูกผสม โดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nuclear ribosomal internally transcribed spacer (nrITS)

8.1 การออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

ใช้ฐานข้อมูล NCBI เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งไอทีเอส (Internal Transcribed Spacer, ITS) ของพืชใบเลี้ยงคู่ซึ่งมีขนาดประมาณ 870 คู่เบส จากนั้นนำข้อมูลนิวคลีโอไทด์ของพืชใบเลี้ยงคู่มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม ClustalW เพื่อหาบริเวณที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อนุรักษ์ เหมาะสมที่จะนำมาออกแบบคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อไป

8.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยมีองค์ประกอบดังตารางที่ 11 และใช้ไพรเมอร์ที่ได้จากข้อ 8.1

ตารางที่ 11 องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ใช้ในการสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอทีเอส

สารที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (μl)
จีโนมิกดีเอ็นเอ 50 ng/μl	2.0
dNTP (2.5 mM)	1.0
10X PCR buffer	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	1.0
Primer F (5 pmol/μl)	2.0
Primer R (5 pmol/μl)	2.0
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	14.3
Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.2
รวม	25.0

ผสมสารต่าง ๆ ให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้โปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1	อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	เวลา	3	นาที	} 35 รอบ
ขั้นที่ 2	อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	เวลา	30	วินาที	
ขั้นที่ 3	อุณหภูมิ	59	องศาเซลเซียส	เวลา	60	วินาที	
ขั้นที่ 4	อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	เวลา	2	นาที	
ขั้นที่ 5	อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	เวลา	5	นาที	
เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส							

8.3 การโคลนยีนที่ต้องการเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนเข้าสู่พลาสมิดใช้ชุด pGEM-T Easy Vector System I kit (Promega, USA) ซึ่งมาพร้อมกับพลาสมิด pGEM-Teasy vector โดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จากข้อ 8.2 ปริมาตร 3 μ l มาเติม 2X rapid buffer ปริมาตร 5 μ l จากนั้นเติมสารละลายพลาสมิด pGEM-Teasy vector ความเข้มข้น 50 ng/ μ l ปริมาตร 1 μ l และเติมเอนไซม์ T4 DNA ligase ปริมาตร 1 μ l ทั้งหมดมีปริมาตรรวมทั้งสิ้น 10 μ l ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือข้ามคืน

8.4 การนำพลาสมิดเวกเตอร์เข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน (host) เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสม

8.4.1 การเตรียม competent cell เพื่อให้เชื้อ *E. coli* มีความพร้อมในการรับพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสม ทำได้โดยนำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 blue มา streak ใน plate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแอมพิซิลลิน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง หรือข้ามคืน เลือก single colony ใส่ในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 3 ml นำเชื้อไปเลี้ยงใน incubator shaker ที่แกว่งด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง หรือข้ามคืน เจือจางเชื้อด้วยอัตราส่วน 1: 100 ด้วยอาหาร Luria-Bertani Medium (LB) แล้วนำเชื้อไปเลี้ยงใน incubator shaker ที่แกว่งด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ถ่ายใส่หลอด centrifuge นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที แล้วปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วย LB แล้วนำไปปั่นตกตะกอนอีกครั้งจำนวน 2 รอบในที่เย็น ล้างตะกอนด้วย Transformation storage solution (TSS) ที่เย็นจัดปริมาตร 0.5-1 ml ใช้ปลายทูปเขี่ยเชื้อเบา ๆ ให้แยก

ออกจากกัน แล้วดูดแบ่งเก็บใส่หลอด 1.5 ml หลอดละ 100 μ l นำไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส (เก็บได้ 1-2 เดือน)

8.4.2 การนำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน โดยวิธี CaCl_2 heat shock transformation (Sambrook *et al.*, 1989) ทำได้โดยนำ competent cell จากตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส ที่เตรียมไว้ออกมาแช่น้ำแข็งประมาณ 5-10 นาที เพื่อให้ละลายแล้วดูด competent cell ปริมาตร 50 μ l ใส่ลงในหลอด reaction mix ที่ได้จากขั้นตอนในข้อ 8.3 จากนั้นผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่น้ำแข็งไว้เป็นเวลา 15 นาที แช่น้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ประมาณ 90 วินาที จากนั้นย้ายลงน้ำแข็งทันที แช่ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำมาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 950 μ l แล้วนำไปเลี้ยงต่อที่ incubator shaker อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที นาน 1 ชั่วโมง spread plate ด้วยสาร X-gal บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแอมพิซิลลิน นำเชื้อที่เลี้ยงครบ 1 ชั่วโมง มาปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทอาหารทิ้งให้เหลือประมาณ 100 μ l ใช้ pipette ดูดเบา ๆ เพื่อให้เชื้อแยกออกจากกัน แล้ว spread เชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมพิซิลลิน และ X-gal เคลือบอยู่ นำไปบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง หรือเลี้ยงข้ามคืน

8.5 การตรวจยืนยันชั้นดีเอ็นเอหรือยีนที่อยู่ในพลาสมิดสายผสม หลังจากเพิ่มปริมาณในเซลล์เจ้าบ้าน โดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ (Sambrook *et al.*, 1989)

เลือก single colony สีขาว ใส่หลอดที่เติมน้ำกลั่นไว้แล้ว 30 μ l ละลายให้เข้ากันแล้วดูดมา 5 μ l เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชั้นดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์โดยมีองค์ประกอบดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ใช้ในการตรวจยืนยันจีนดิเอ็นเอที่อยู่ในพลาสมิดสายผสม

สารที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (μl)
ดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณ	5.0
dNTP (2.5 mM)	1.0
10X PCR buffer	1.0
MgCl ₂ (50 mM)	1.0
Primer T7(5 pmol/μl)	0.5
Primer SP6 (5 pmol/μl)	0.5
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	0.95
Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.05
รวม	10.0

ผสมสารต่าง ๆ ให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยใช้โปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1	อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	เวลา	5 นาที	} 30 รอบ
ขั้นที่ 2	อุณหภูมิ	94	องศาเซลเซียส	เวลา	60 วินาที	
ขั้นที่ 3	อุณหภูมิ	45	องศาเซลเซียส	เวลา	60 วินาที	
ขั้นที่ 4	อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	เวลา	60 วินาที	
ขั้นที่ 5	อุณหภูมิ	72	องศาเซลเซียส	เวลา	10 นาที	

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำผลผลิตพีซีอาร์ไปตรวจสอบผลด้วยการทำ electrophoresis ใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

8.6 การสกัดแยกพลาสมิดให้บริสุทธิ์

เลือก single colony ที่ตรวจสอบผลว่ามีชิ้นส่วนของจีนดิเอ็นเอหรือยีนแล้ว มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน incubator shaker ที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบคทีเรียเข้าบ้านด้วยชุดสกัด Gene JET™ Plasmid Miniprep Kit (บริษัท Fermentas) ตรวจสอบผลภายหลังการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI ก่อนการ electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

8.7 การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของซีดีเอ็นเอหรือยีนที่ศึกษา

นำสารละลายในข้อ 8.6 ส่งบริษัท First BASE Laboratories Sdn Bhd. เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายของซีดีเอ็นเอ

วิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์ภายหลังตัดส่วนของลำดับเบสของพลาสมิดและไพรเมอร์ นำซีดีเอ็นเอทั้งสองสายมาประกอบให้เป็นสายเดี่ยว เปรียบเทียบความเหมือนหรือแตกต่างของนิวคลีโอไทด์แต่ละตำแหน่ง เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพ่อ แม่ และลูกผสม โดยใช้โปรแกรม ClustalW (version 1.82) และ Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA version 3.1)

9. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

10. ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

เริ่มการทดลอง ตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2548 สิ้นสุดการทดลอง เดือนตุลาคม 2550

ผลและวิจารณ์

การผสมพันธุ์บัวหลวง

จากการผสม บัวแหลมชมพู จากสามร้อยยอด จ.ประจวบคีรีขันธ์ (พ่อ) กับบัวแหลมขาว จาก อ. คลองโยง จ.นครปฐม (แม่) (ภาพที่ 4) เมื่อวันที่ 9 กันยายน 2548 ให้ฝักที่ติดเมล็ดสมบูรณ์ 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4 A-B) และวันที่ 11 ตุลาคม 2548 นำเมล็ดที่แก่จัดทั้งหมดเพาะให้งอก ประมาณ 2 อาทิตย์ (ภาพที่ 5C) ก่อนนำไปปลูกลงดินในกระถางเพื่อตรวจสอบลูกผสม



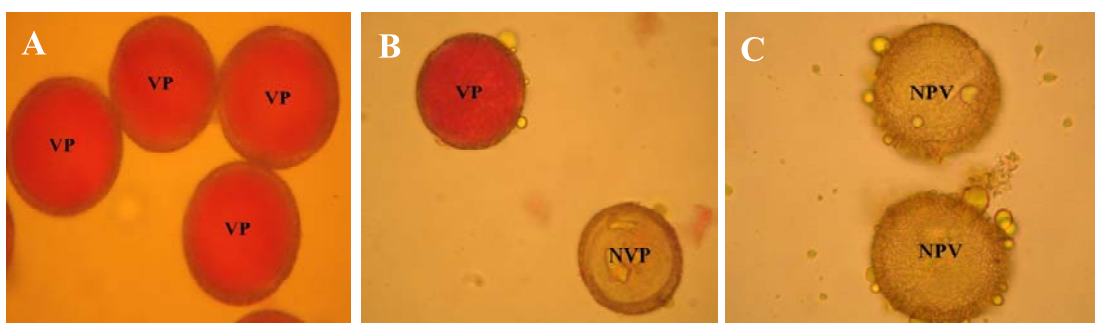
ภาพที่ 4 บัวที่ใช้เป็นพ่อแม่ในการผสมพันธุ์ (A) บัวแหลมชมพู จากสามร้อยยอด จ.ประจวบฯ และ (B) บัวแหลมขาว จาก อ. คลองโยง จ.นครปฐม



ภาพที่ 5 ฝักบัวที่ได้รับการผสม (A-B) และต้นลูกผสมจากการเพาะเมล็ด (C)

การศึกษาความมีชีวิตของเรณู (pollen viability) ของบัวหลวง

เก็บเรณูของบัวหลวงแหลมชมพู พันธุ์จากพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม นำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิห้อง) 4 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นศึกษาความมีชีวิตของเรณู (pollen viability) โดยวิธีการย้อมสีเรณูด้วยอะซีโตคาร์มินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เรณูที่ย้อมติดสีแดงเข้ม รูปร่างกลม จัดเป็นเรณูที่มีชีวิต ส่วนเรณูที่ย้อมไม่ติดสี เป็นเรณูที่ไม่มีชีวิต (ภาพที่ 6) ผลการศึกษาพบว่าความมีชีวิตของเรณูหรือ pollen จะลดลงไปเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างไว้ (ตารางที่ 13) การเก็บเรณูที่อุณหภูมิ 25 และ 4 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูจะสูงในวันที่ 1-3 หลังจากวันที่ 3 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และวันที่ 6 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่สามารถวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูได้เนื่องจากตัวอย่างขึ้นรา เพราะความชื้นที่มาจากเรณูของดอกบัวที่เก็บมาทำให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดี การเก็บเรณูที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูจะสูงในวันแรก ๆ และจะลดลงเป็นลำดับ เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ในเวลาประมาณ 3 วันที่เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 6 วันที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และประมาณ 9-12 วันที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 7) ซึ่งสอดคล้องงานวิจัยของ Gibernau *et al.* (2003) ที่ได้มีการศึกษาในพืชสกุล *Arum* 2 ชนิด พบว่าโดยทั่วไปตามธรรมชาติเรณูจะมีชีวิตอยู่ได้ 2 วัน และถ้าเก็บไว้ในที่เย็นจะช่วยยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาได้นานขึ้น



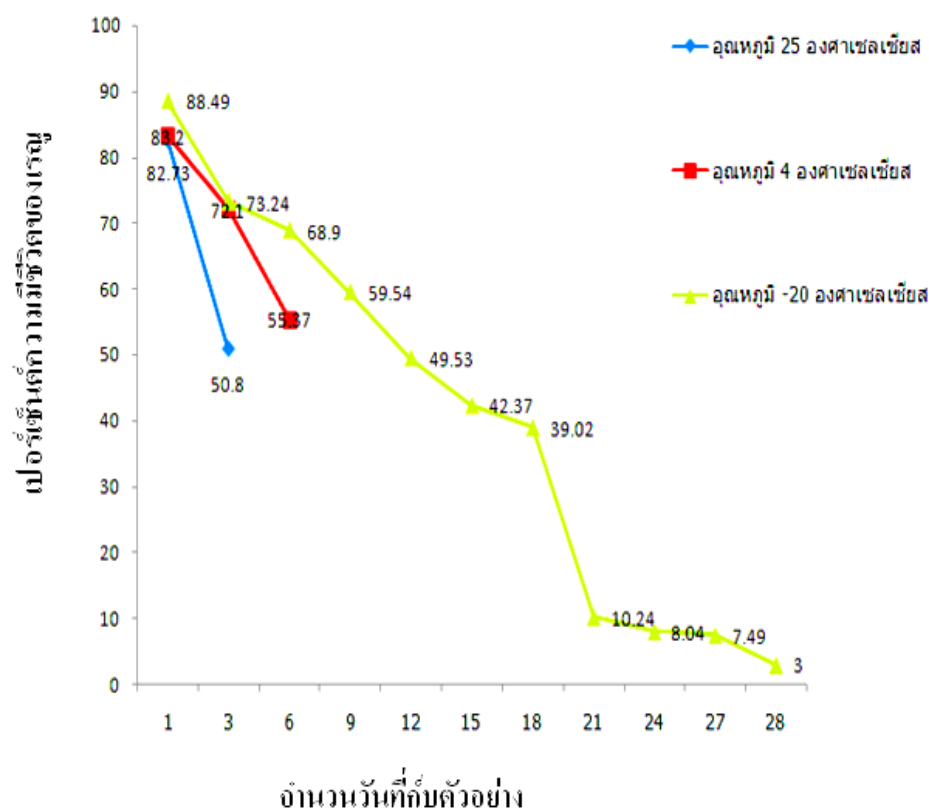
ภาพที่ 6 ความมีชีวิตของเรณูที่ย้อมด้วยอะซีโตคาร์มินเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ กำลังขยาย 400 เท่า

- (A) เรณูของบัวหลวงที่มีชีวิต เก็บมาวันแรก (ติดสีแดงรูปร่างกลม)
- (B) เรณูของบัวหลวงที่มีชีวิต (ติดสีแดงรูปร่างกลม) และไม่มีชีวิต (ไม่มีสี)
- (C) เรณูของบัวหลวงที่ไม่มีชีวิต (ไม่ติดสี)

ตารางที่ 13 ความมีชีวิตของเรณู (pollen viability) ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25, 4 และ -20 องศาเซลเซียส ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

วันที่	อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส			อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส			อุณหภูมิห้อง -20 องศาเซลเซียส		
	จำนวน เรณู ทั้งหมด	จำนวน เรณูที่มี ชีวิต	% ความ มีชีวิต ของเรณู	จำนวน เรณู ทั้งหมด	จำนวน เรณู ที่มี ชีวิต	% ความ มีชีวิต ของ เรณู	จำนวน เรณู ทั้งหมด	จำนวน เรณู ที่มี ชีวิต	% ความ มีชีวิต ของ เรณู
1	110	91	82.73	125	104	83.20	113	100	88.49
3	116	59	-	129	93	72.10	112	82	73.24
6	-	-	-	121	67	55.37	119	82	68.90
9	-	-	-	-	-	-	131	78	59.54
12	-	-	-	-	-	-	107	53	49.53
15	-	-	-	-	-	-	118	50	42.37
18	-	-	-	-	-	-	123	48	39.02
21	-	-	-	-	-	-	127	13	10.24
24	-	-	-	-	-	-	112	9	8.04
27	-	-	-	-	-	-	124	9	7.49
28	-	-	-	-	-	-	110	4	3.00

หมายเหตุ เครื่องหมาย (-) คือไม่มีข้อมูลเนื่องจากตัวอย่างขึ้นรา



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนวันที่เก็บตัวอย่างและเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตเรณูในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบบัว

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนบัวหลวงจำนวน 61 ตัวอย่าง วิเคราะห์คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ โดย agarose gel electrophoresis และวัดการดูดกลืนแสง UV ที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 nm (A_{260}/A_{280}) พบว่าได้ ดีเอ็นเอ มีคุณภาพค่อนข้างดี โดยมีค่า (A_{260}/A_{280}) อยู่ระหว่าง 1.8-1.9 คำนวณปริมาณดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm (A_{260}) พบว่าได้ ปริมาณดีเอ็นเอในแต่ละตัวอย่างเฉลี่ยประมาณ 1,295 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักสด

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่มีความยาว 10 - 15 นิวคลีโอไทด์จำนวน 216 ชนิด คัดเลือกไพรเมอร์ 7 ชนิด (ตารางที่ 14) ที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์บัวเหลมชมพู จากสามร้อยยอด จ.ประจวบคีรีขันธ์ (พ่อ) และบัวเหลมขาว จาก อ. คลองโยง จ.นครปฐม (แม่) และไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของบัวหลวงได้ดี เกิดแถบดีเอ็นเอชัดเจน นำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในตัวอย่างบัวหลวงทั้ง 61 ตัวอย่าง

ตารางที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับเทคนิคอาร์เอพีดี จำนวนแถบดีเอ็นเอจากแต่ละไพรเมอร์ และแถบดีเอ็นเอที่ให้ polymorphism

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'—3')	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวน polymorphism band	% polymorphism band
OPA-1	(5'-CAGGCCCTTC-3')	7	5	71.43
OPA-20	(5'-GTTGCGATCC-3')	11	11	100
OPF-9	(5'-CCAAGCTTCC-3')	8	6	75
OPF-12	(5'-ACGGTACCAG-3')	10	9	90
OPF-19	(5'-CCTCTAGACC-3')	5	4	80
OPX-04	(5'-CCGCTACCGA-3')	10	8	80
AI05	(5'-GTCGTAGCGG-3')	10	10	100
รวม		61	52	

จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เข้มชัดและเข้มปานกลางของแต่ละไพรเมอร์ พบอยู่ระหว่าง 5-11 แถบ (ตารางที่ 14) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 7 ชนิด กับตัวอย่างบัว 61 ตัวอย่าง ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 61 แถบหรือ markers เฉลี่ย 8.71 แถบต่อชนิดของไพรเมอร์ เป็น polymorphic markers จำนวน 52 แถบ และ monomorphic markers จำนวน 9 แถบ โดยไพรเมอร์ OPA-20 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ 11 แถบ และไพรเมอร์ OPF-19 ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ 5 แถบ ขนาดดีเอ็นเอที่พบอยู่ในช่วงประมาณ 0.3-2 กิโลเบส (ภาพที่ 8-10)

ค่า PICs ของแถบดีเอ็นเอทั้ง 61 แถบหรือ markers มีค่าอยู่ในช่วง 0.0000 – 0.4994 โดยมีค่า PIC เฉลี่ย เท่ากับ 0.2303 เมื่อคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมโดยวิธี Simple matching ของ Sneath และ Sokal (1973) พบค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) ตั้งแต่ 0.3561-0.9859 และความต่างทางพันธุกรรม (genetic dissimilarity) ตั้งแต่ 0.0141-0.6439 (ตารางภาคผนวกที่ 1) เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์และสร้าง phylogenetic tree โดยใช้ Neighbour-Joining ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS- pc เวอร์ชัน 2.20k สามารถแบ่งตัวอย่างที่ศึกษาได้เป็น 4 กลุ่ม ใหญ่ ๆ (ภาพที่ 11) ได้แก่

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มตัวอย่างบัวหลวงฉัตรขาว (1) ฉัตรชมพู (2) แหลมขาว (6, 8, 15, 16) แหลมชมพู (4, 5, 7, 9, 10) บัวหลวงพระราชินี (3) และบัวหลวงจากไต้หวัน (11, 12, 13, 14)

กลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วยกลุ่มบัวหลวงฉัตรขาว (23, 25, 29) ฉัตรชมพู (18, 26, 27) แหลมขาว (17, 19, 21, 22) และแหลมชมพู (20, 24, 28, 30, 31, 32)

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยกลุ่มบัวหลวงแหลมขาว (42) แหลมชมพู (33, 34, 35, 37, 38, 41, 43, 44) และบัวหลวงจากไต้หวัน (40, 45, 46, 47)

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยกลุ่มบัวหลวงฉัตรชมพู (49, 54, 55, 60) แหลมชมพู (52, 53, 56) จินดอกซ้อนแดง (50) ญี่ปุ่นดอกซ้อนแดง (51) ไต้หวัน (57, 58, 59) ฉัตรขาว (48) และแหลมขาว (61)

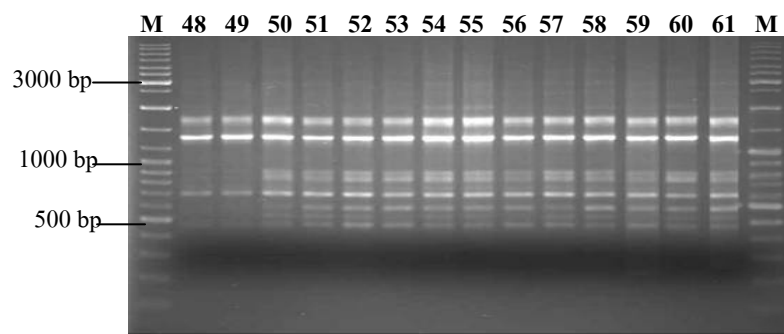
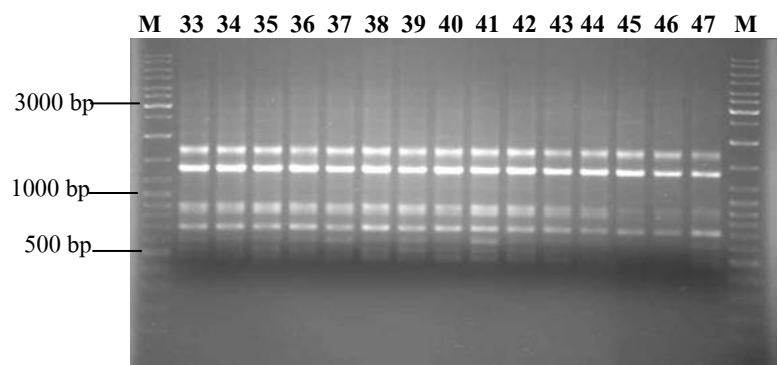
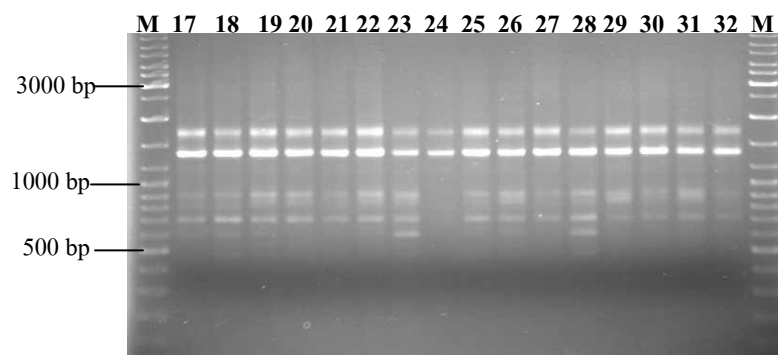
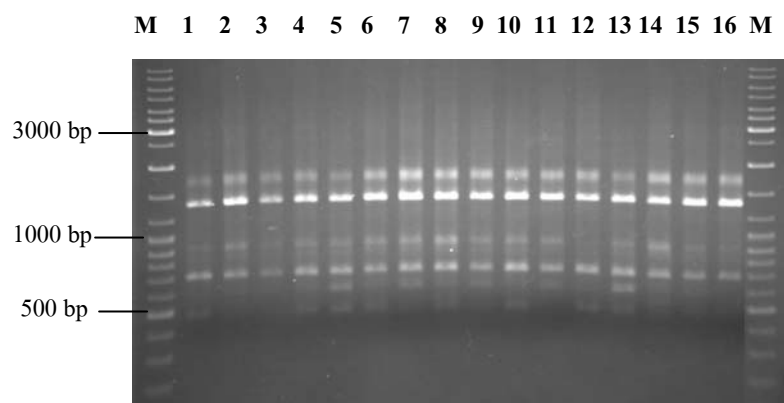
เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี Principal Component Analysis (PCA) ให้ผลที่สอดคล้องกับ phylogenetic tree ที่ได้คือ สามารถจำแนกบัวออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้เช่นกัน (ภาพที่ 12) โดยมีค่า PCA 1 = 19.86 เปอร์เซ็นต์ PCA 2 = 15.86 เปอร์เซ็นต์ PCA 3 = 10.86 เปอร์เซ็นต์ PCA 1 ถึง 3 คลอบคลุมประมาณ 46.58 เปอร์เซ็นต์ ของความแปรปรวนทั้งหมด

การจำแนกกลุ่มบัวหลวงทั้ง 61 ตัวอย่าง โดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดี ยังไม่สามารถแบ่งกลุ่มบัวหลวงตามชนิดพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากจำนวน markers ที่ใช้ในการวิเคราะห์การจัดกลุ่มยังมีจำนวนน้อย ประกอบกับบัวหลวงเป็นพืชผสมข้าม โดยอาศัยแมลงช่วยในการผสมเกสร (ปริมาตร และเสริมมาตร, 2548) ตัวอย่างที่มาจากเมล็ดจึงมีโอกาสดที่ได้ต้นใหม่ที่ไม่เหมือนต้นแม่ แต่จะเป็นการผสมระหว่างพันธุ์ต่าง ๆ ที่ปลูกอยู่ในบริเวณเดียวกัน ทำให้ลักษณะ

ทางสัณฐานวิทยาของบัวหลวงมีลักษณะคล้ายคลึงหรือมีลักษณะร่วมระหว่างบางพันธุ์ที่เห็นชัดเจนได้แก่ ลักษณะสีดอกและจำนวนกลีบดอก เป็นต้น วัชระ (2543) ได้ศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในบัวหลวงแหลมขาว (บุญทริก) บัวหลวงแหลมแก้ว ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับแหลมขาว แต่กลีบดอกจะมีสีเขียวมากกว่า และบัวลูกผสม พบว่าบัวหลวงทั้ง 3 พันธุ์ มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก และลูกผสมมีบางรูปแบบไอโซไซม์เหมือนกับบัวหลวงพันธุ์บุญทริก

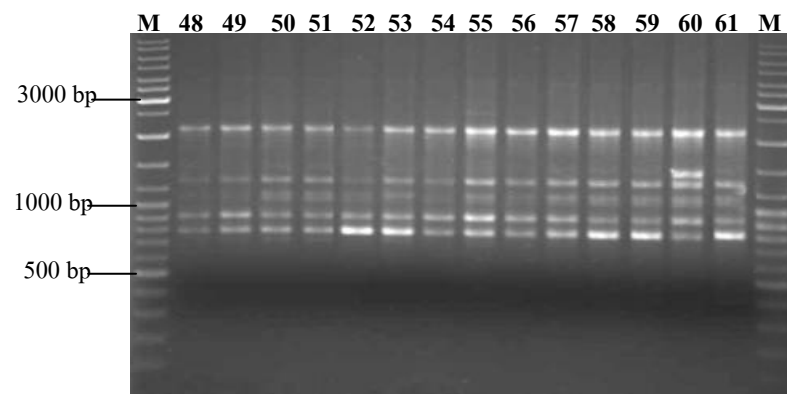
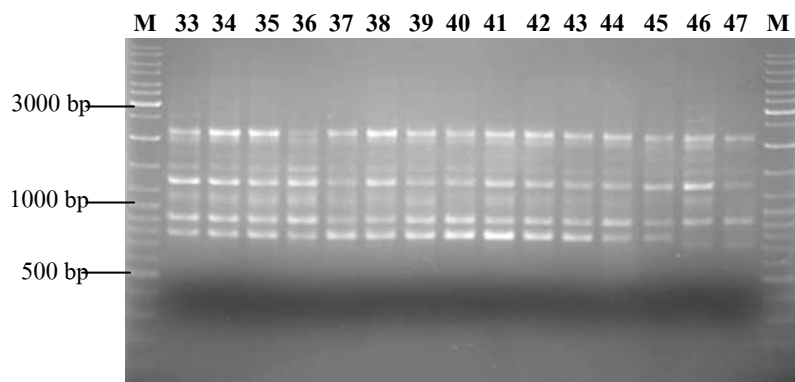
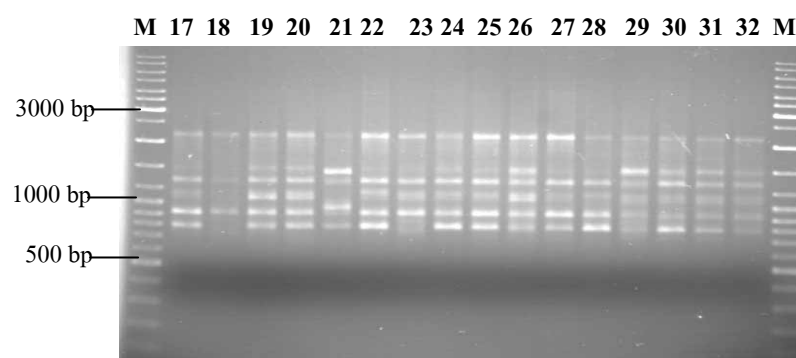
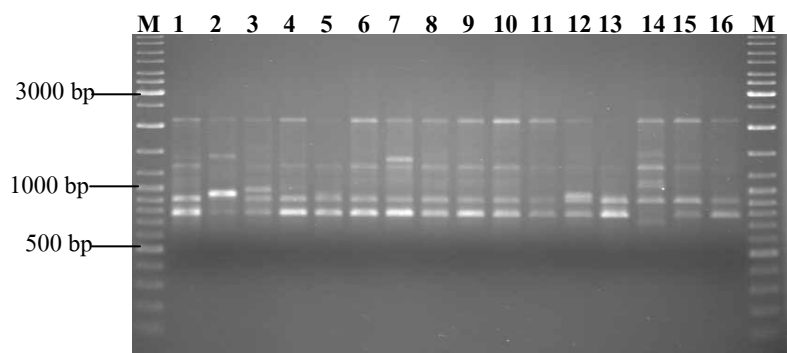
ภาพที่ 8 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์บัพทลงตัวอย่างต่าง ๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-01 (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน) (ฉัตรขาว มก. (1), ฉัตรชมพู พิพิธภัณฑสถาน (2), แหยมชมพู พระราชินี (3), แหยมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด) (4), แหยมชมพู พิจิตร (5), แหยมขาว พิจิตร (6), แหยมชมพู สามร้อยยอด ประจวบคีรีขันธ์ (7*), แหยมขาว คลองโยง นครปฐม (8*), แหยมชมพู จีน ดอกสีแดง (9), แหยมชมพู จีน ดอกสีแดง (เมล็ด) (10), ใต้หวัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด) (11), ใต้หวัน-2 White thousand petals (เมล็ด) (12), ใต้หวัน-4 Hunan white (เมล็ด) (13), ใต้หวัน-8 Hunan white (เมล็ด) (14), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (15), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (16), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (17), ฉัตรชมพู จตุจักร (เมล็ด) (18), แหยมขาว ปทุมธานี (19), แหยมชมพู ปทุมธานี (20), แหยมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (21), แหยมขาว พิพิธภัณฑสถาน (22), ฉัตรขาว พิพิธภัณฑสถาน (23), แหยมชมพู พิพิธภัณฑสถาน (24), ฉัตรขาว ปทุมธานี (25), ฉัตรชมพู ปทุมธานี (26), ฉัตรชมพู ปทุมธานี (27), แหยมชมพู ปทุมธานี (28), ฉัตรขาว มก. (29), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (30), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (31), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (32), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (33), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (34), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (35), บัพทลง มก. (36), แหยมชมพู จีน ลาดหลุมแก้ว (37), แหยมชมพู จีน ลาดหลุมแก้ว (เมล็ด) (38), บัพทลง มก. (39), แหยมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด) (40), แหยมชมพู พิจิตร (41), แหยมขาว พิจิตร (42), แหยมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด) (43), แหยมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด) (44), ใต้หวัน-5 (เมล็ด) (45), ใต้หวัน-7 (เมล็ด) (46), ใต้หวัน-9 (เมล็ด) (47), ฉัตรขาว มก. (48), ฉัตรชมพู มก. (49), จีน ดอกซ้อนแดง (พันธุ์เห้ง) (50), ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง (51), แหยมชมพู สระบุรี (52), แหยมชมพู สระบุรี (53), ฉัตรชมพู สระบุรี (54), ฉัตรชมพู สระบุรี (55), แหยมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (56), ใต้หวัน-2 (เมล็ด) (57), ใต้หวัน-4 (เมล็ด) (58), ใต้หวัน-6 (เมล็ด) (59), ฉัตรชมพู ปทุมธานี (60), แหยมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (61))

* พันธุ์บัวที่ใช้ผสมพันธุ์



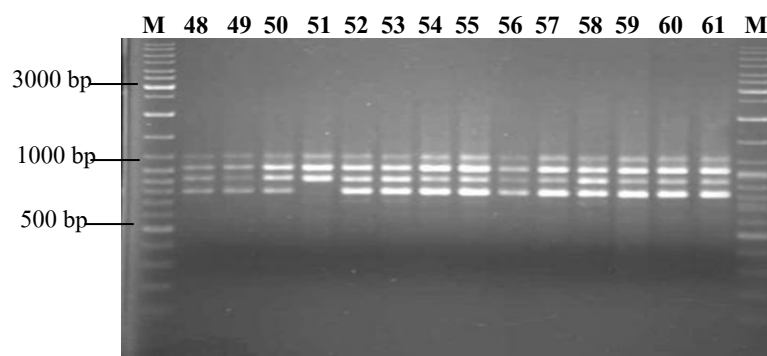
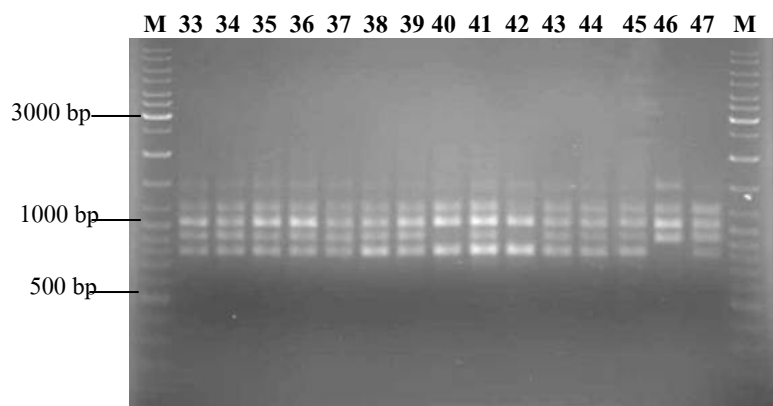
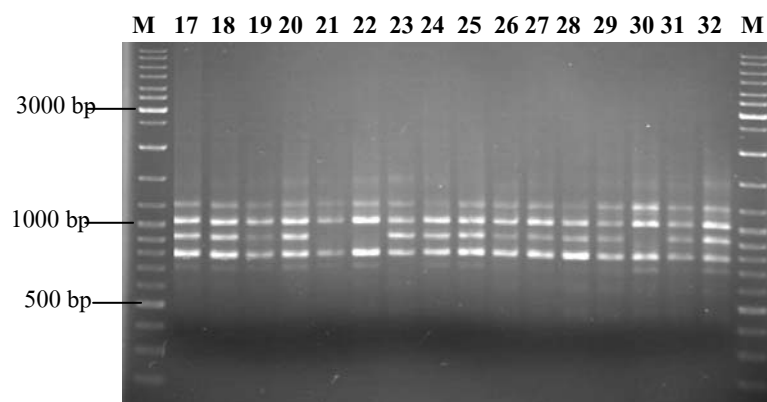
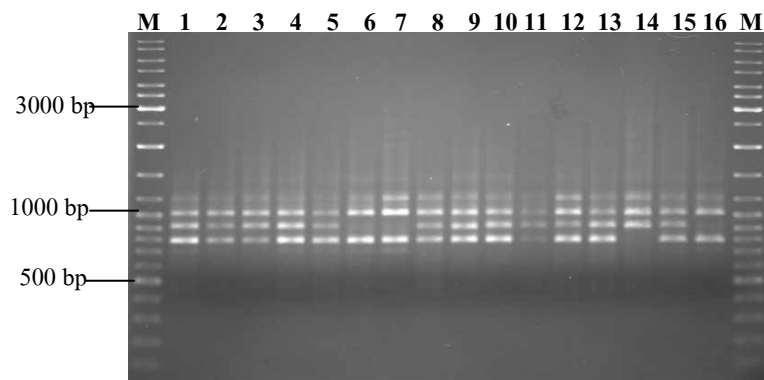
ภาพที่ 9 รูปแบบของแถบสีเอนเอกจากการวิเคราะห์บัวหลวงตัวอย่างต่าง ๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ด้วยเทคนิคอาร์เอฟอี โดยใช้โปรแกรม OPA-20 (M = แถบสีเอนเอนมาตรฐาน) (นัศรขาว มก. (1), นัศรชมพู พิพิธภัณฑสถาน (2), แหลมชมพู พระราชินี (3), แหลมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด) (4), แหลมชมพู พิจิตร (5), แหลมขาว พิจิตร (6), แหลมชมพู สามร้อยยอด ประจวบคีรีขันธ์ (7*), แหลมขาว คลองโยง นครปฐม (8*), แหลมชมพู จีน ดอกสีแดง (9), แหลมชมพู จีน ดอกสีแดง (เมล็ด) (10), ได้หัววัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด) (11), ได้หัววัน-2 White thousand petals (เมล็ด) (12), ได้หัววัน-4 Hunan white (เมล็ด) (13), ได้หัววัน-8 Hunan white (เมล็ด) (14), แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (15), แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (16), แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (17), นัศรชมพู จตุจักร (เมล็ด) (18), แหลมขาว ปทุมธานี (19), แหลมชมพู ปทุมธานี (20), แหลมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (21), แหลมขาว พิพิธภัณฑสถาน (22), นัศรขาว พิพิธภัณฑสถาน (23), แหลมชมพู พิพิธภัณฑสถาน (24), นัศรขาว ปทุมธานี (25), นัศรชมพู ปทุมธานี (26), นัศรชมพู ปทุมธานี (27), แหลมชมพู ปทุมธานี (28), นัศรขาว มก. (29), แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว (30), แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว (31), แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว (32), แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว (33), แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว (34), แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว (35), บัวหลวง มก. (36), แหลมชมพู จีน ลาดหลุมแก้ว (37), แหลมชมพู จีน ลาดหลุมแก้ว (เมล็ด) (38), บัวหลวง มก. (39), แหลมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด) (40), แหลมชมพู พิจิตร (41), แหลมขาว พิจิตร (42), แหลมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด) (43), แหลมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด) (44), ได้หัววัน-5 (เมล็ด) (45), ได้หัววัน-7 (เมล็ด) (46), ได้หัววัน-9 (เมล็ด) (47), นัศรขาว มก. (48), นัศรชมพู มก. (49), จีน ดอกซ้อนแดง (พันธุ์เห้ง) (50), ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง (51), แหลมชมพู สระบุรี (52), แหลมชมพู สระบุรี (53), นัศรชมพู สระบุรี (54), นัศรชมพู สระบุรี (55), แหลมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (56), ได้หัววัน-2 (เมล็ด) (57), ได้หัววัน-4 (เมล็ด) (58), ได้หัววัน-6 (เมล็ด) (59), นัศรชมพู ปทุมธานี (60), แหลมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (61))

* พันธุ์บัวที่ใช้ผสมพันธุ์



ภาพที่ 10 รูปแบบของแถบดิเอ็นเอนจากการวิเคราะห์บัวหลวงตัวอย่างต่าง ๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPF-19 (M = แถบดิเอ็นเอนมาตรฐาน) (นัศรขาว มก. (1), นัศรชมพู พิพิธภัณฑสถาน (2), แหยมชมพู พระราชินี (3), แหยมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด) (4), แหยมชมพู พิจิตร (5), แหยมขาว พิจิตร (6), แหยมชมพู สามร้อยยอด ประจวบคีรีขันธ์ (7*), แหยมขาว คลองโยง นครปฐม (8*), แหยมชมพู จีน ดอกสีแดง (9), แหยมชมพู จีน ดอกสีแดง (เมล็ด) (10), ได้หัววัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด) (11), ได้หัววัน-2 White thousand petals (เมล็ด) (12), ได้หัววัน-4 Hunan white (เมล็ด) (13), ได้หัววัน-8 Hunan white (เมล็ด) (14), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (15), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (16), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (17), นัศรชมพู จตุจักร (เมล็ด) (18), แหยมขาว ปทุมธานี (19), แหยมชมพู ปทุมธานี (20), แหยมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (21), แหยมขาว พิพิธภัณฑสถาน (22), นัศรขาว พิพิธภัณฑสถาน (23), แหยมชมพู พิพิธภัณฑสถาน (24), นัศรขาว ปทุมธานี (25), นัศรชมพู ปทุมธานี (26), นัศรชมพู ปทุมธานี (27), แหยมชมพู ปทุมธานี (28), นัศรขาว มก. (29), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (30), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (31), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (32), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (33), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (34), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (35), บัวหลวง มก. (36), แหยมชมพู จีน ลาดหลุมแก้ว (37), แหยมชมพู จีน ลาดหลุมแก้ว (เมล็ด) (38), บัวหลวง มก. (39), แหยมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด) (40), แหยมชมพู พิจิตร (41), แหยมขาว พิจิตร (42), แหยมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด) (43), แหยมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด) (44), ได้หัววัน-5 (เมล็ด) (45), ได้หัววัน-7 (เมล็ด) (46), ได้หัววัน-9 (เมล็ด) (47), นัศรขาว มก. (48), นัศรชมพู มก. (49), จีน ดอกซ้อนแดง (พันธุ์เหง้า) (50), ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง (51), แหยมชมพู สระบุรี (52), แหยมชมพู สระบุรี (53), นัศรชมพู สระบุรี (54), นัศรชมพู สระบุรี (55), แหยมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (56), ได้หัววัน-2 (เมล็ด) (57), ได้หัววัน-4 (เมล็ด) (58), ได้หัววัน-6 (เมล็ด) (59), นัศรชมพู ปทุมธานี (60), แหยมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (61))

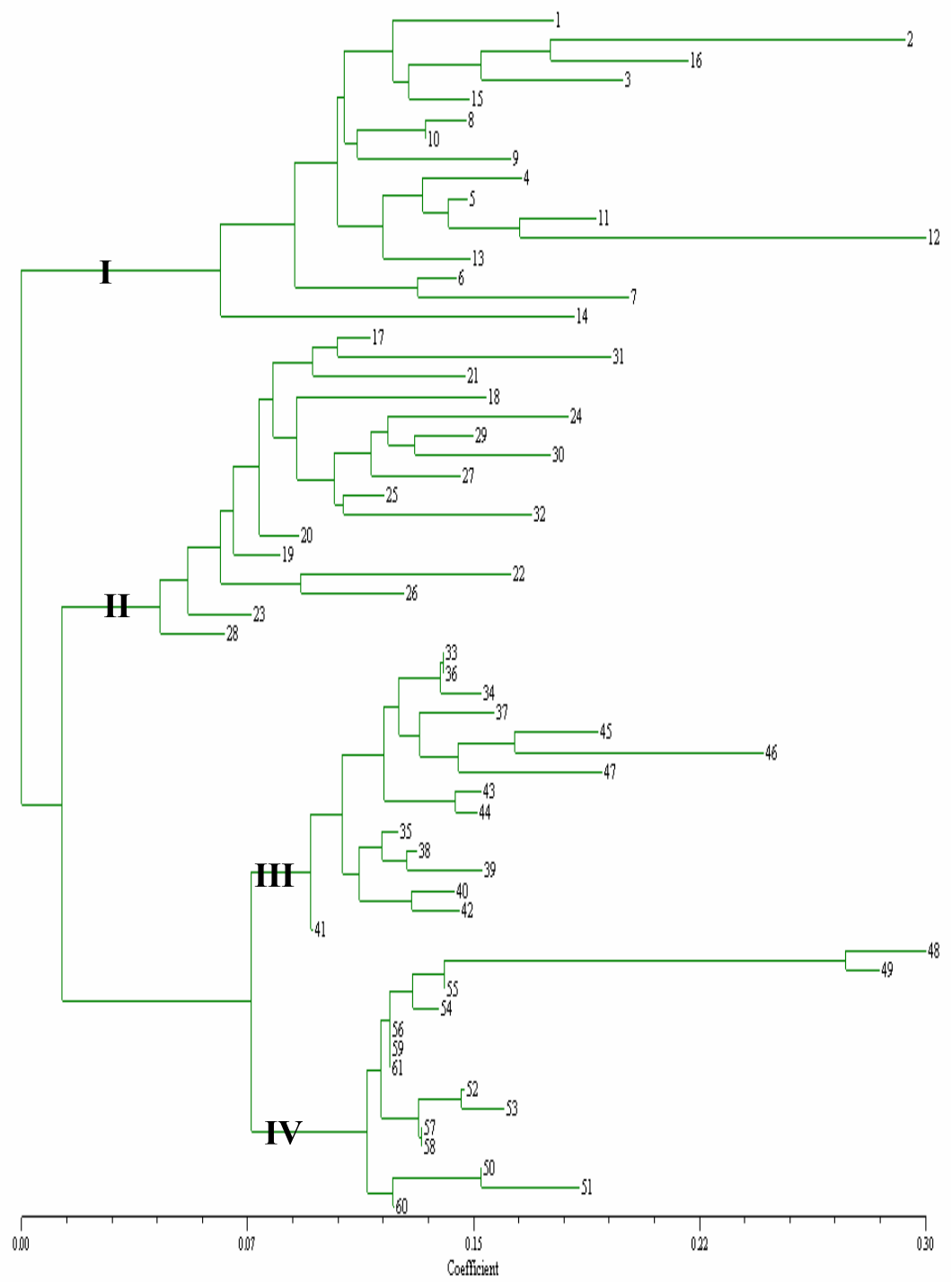
* พันธุ์บัวที่ใช้ผสมพันธุ์



ภาพที่ 11 Phylogenetic tree ของบัวหลวงสร้างโดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคอาร์เอพีดีโดยใช้

Neighbour - Joining ในโปรแกรม NTSYS pc-2.20k (นัศรขาว มก. (1), นัศรชมพู พิพิธภัณฑสถาน (2), แหยมชมพู พระราชินี (3), แหยมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด) (4), แหยมชมพู พิจิตร (5), แหยมขาว พิจิตร (6), แหยมชมพู สามร้อยยอด ประจวบคีรีขันธ์ (7*), แหยมขาว คลองโยง นครปฐม (8*), แหยมชมพู จีน ดอกสีแดง (9), แหยมชมพู จีน ดอกสีแดง (เมล็ด) (10), ใต้หวัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด) (11), ใต้หวัน-2 White thousand petals (เมล็ด) (12), ใต้หวัน-4 Hunan white (เมล็ด) (13), ใต้หวัน-8 Hunan white (เมล็ด) (14), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (15), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (16), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (17), นัศรชมพู จตุจักร (เมล็ด) (18), แหยมขาว ปทุมธานี (19), แหยมชมพู ปทุมธานี (20), แหยมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (21), แหยมขาว พิพิธภัณฑสถาน (22), นัศรขาว พิพิธภัณฑสถาน (23), แหยมชมพู พิพิธภัณฑสถาน (24), นัศรขาว ปทุมธานี (25), นัศรชมพู ปทุมธานี (26), นัศรชมพู ปทุมธานี (27), แหยมชมพู ปทุมธานี (28), นัศรขาว มก. (29), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (30), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (31), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (32), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (33), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (34), แหยมชมพู ลาดหลุมแก้ว (35), บัวหลวง มก. (36), แหยมชมพู จีน ลาดหลุมแก้ว (37), แหยมชมพู จีน ลาดหลุมแก้ว (เมล็ด) (38), บัวหลวง มก.(39), แหยมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด) (40), แหยมชมพู พิจิตร (41), แหยมขาว พิจิตร (42), แหยมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด) (43), แหยมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด) (44), ใต้หวัน-5 (เมล็ด) (45), ใต้หวัน-7 (เมล็ด) (46), ใต้หวัน-9 (เมล็ด) (47), นัศรขาว มก. (48), นัศรชมพู มก. (49), จีน ดอกซ้อนแดง (พันธุ์เห้ง) (50), ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง (51), แหยมชมพู สระบุรี (52), แหยมชมพู สระบุรี (53), นัศรชมพู สระบุรี (54), นัศรชมพู สระบุรี (55), แหยมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (56), ใต้หวัน-2 (เมล็ด) (57), ใต้หวัน-4 (เมล็ด) (58), ใต้หวัน-6 (เมล็ด) (59), นัศรชมพู ปทุมธานี (60), แหยมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (61))

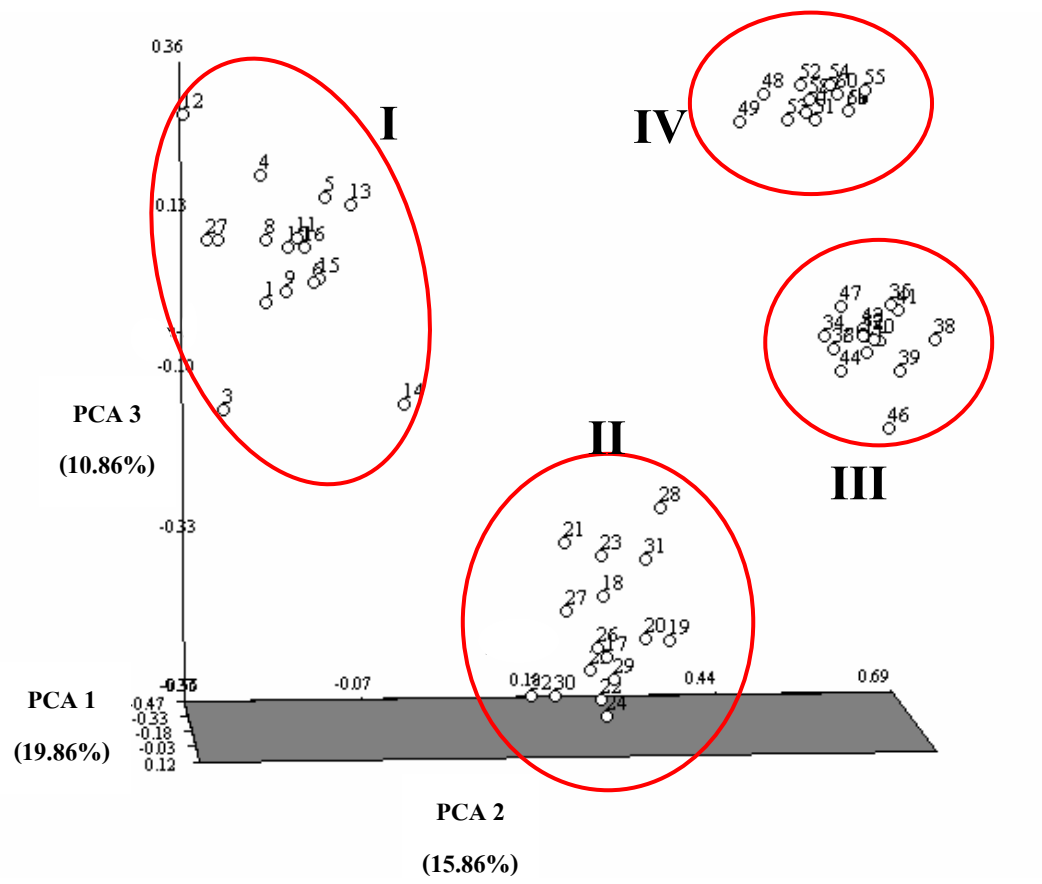
* พันธุ์บัวที่ใช้ผสมพันธุ์



ภาพที่ 12 Principal Component Analysis (PCA) ของบัวหลวงที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม

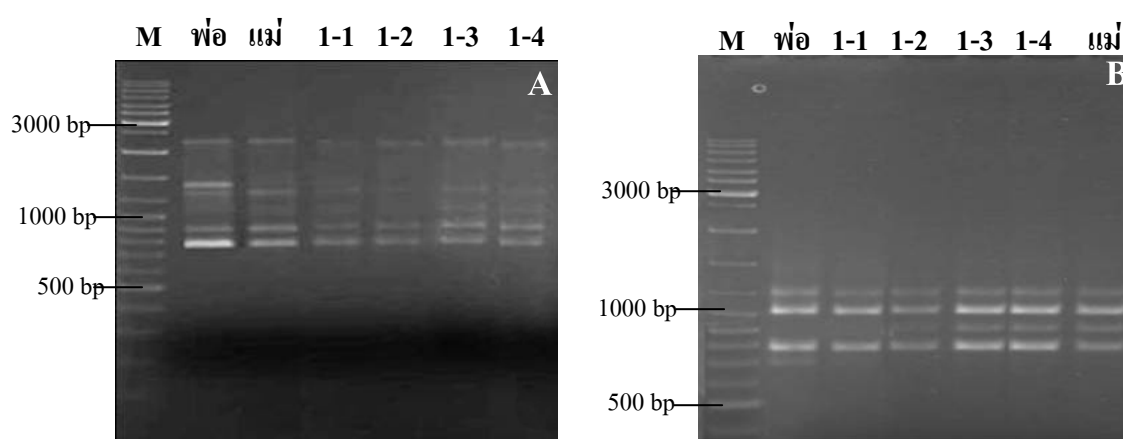
NTSYSpc-2.20k โดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคอาร์เอพีดี (นักรขาว มก. (1), นักรชมพู พิพิธภัณฑสถาน (2), แหลมชมพู พระราชินี (3), แหลมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด) (4), แหลมชมพู พิจิตร (5), แหลมขาว พิจิตร (6), แหลมชมพู สามร้อยยอด ประจวบคีรีขันธ์ (7*), แหลมขาว คลองโยง นครปฐม (8*), แหลมชมพู จีน ดอกสีแดง (9), แหลมชมพู จีน ดอกสีแดง (เมล็ด) (10), ใต้หวัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด) (11), ใต้หวัน-2 White thousand petals (เมล็ด) (12), ใต้หวัน-4 Hunan white (เมล็ด) (13), ใต้หวัน-8 Hunan white (เมล็ด) (14), แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (15), แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (16), แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (17), นักรชมพู จตุจักร (เมล็ด) (18), แหลมขาว ปทุมธานี (19), แหลมชมพู ปทุมธานี (20), แหลมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (21), แหลมขาว พิพิธภัณฑสถาน (22), นักรขาว พิพิธภัณฑสถาน (23), แหลมชมพู พิพิธภัณฑสถาน (24), นักรขาว ปทุมธานี (25), นักรชมพู ปทุมธานี (26), นักรชมพู ปทุมธานี (27), แหลมชมพู ปทุมธานี (28), นักรขาว มก. (29), แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว (30), แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว (31), แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว (32), แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว (33), แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว (34), แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว (35), บัวหลวง มก. (36), แหลมชมพู จีน ลาดหลุมแก้ว (37), แหลมชมพู จีน ลาดหลุมแก้ว (เมล็ด) (38), บัวหลวง มก.(39), แหลมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด) (40), แหลมชมพู พิจิตร (41), แหลมขาว พิจิตร (42), แหลมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด) (43), แหลมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด) (44), ใต้หวัน-5 (เมล็ด) (45), ใต้หวัน-7 (เมล็ด) (46), ใต้หวัน-9 (เมล็ด) (47), นักรขาว มก. (48), นักรชมพู มก. (49), จีน ดอกซ้อนแดง (พันธุ์เห้ง) (50), ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง (51), แหลมชมพู สระบุรี (52), แหลมชมพู สระบุรี (53), นักรชมพู สระบุรี (54), นักรชมพู สระบุรี (55), แหลมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (56), ใต้หวัน-2 (เมล็ด) (57), ใต้หวัน-4 (เมล็ด) (58), ใต้หวัน-6 (เมล็ด) (59), นักรชมพู ปทุมธานี (60), แหลมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (61))

* พันธุ์บัวที่ใช้ผสมพันธุ์



การตรวจสอบสายพันธุ์พ่อ-แม่ และลูกผสมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-20 และ OPF-19

จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-20 และ OPF-19 กับพ่อ แม่ และลูกผสม 4 ดัน ให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่น่าจะเป็นลูกผสมที่แท้จริง (ภาพที่ 13) การมีแถบดีเอ็นเอปรากฏในพ่อหรือแม่สามารถเป็นไปได้ว่าทั้ง 2 แอลลีลที่ตำแหน่งนั้น ๆ ให้แถบดีเอ็นเอ หรือเพียงแอลลีลเดียวเท่านั้นที่ให้แถบดีเอ็นเอ อีกแอลลีลไม่ให้แถบดีเอ็นเอ ทำให้การบ่งชี้ความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลประเภท dominant marker ไม่สามารถระบุได้ชัดเจน เนื่องจากไม่ใช่แยกความแตกต่างระหว่างสอโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ การบ่งชี้ความเป็นลูกผสมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลประเภท co-dominant marker จะมีประสิทธิภาพดีกว่า เช่น กรณีพ่อมีแอลลีล 2 รูปแบบ ให้แถบดีเอ็นเอ 2 รูปแบบ เป็นเฮเทอโรไซกัส และแม่มีเพียงแอลลีลชนิดเดียวเป็นสอโมไซกัส ขนาดของแถบดีเอ็นเอต่างจากแถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่ปรากฏในพ่อ ลูกที่ได้จะมีแถบดีเอ็นเอที่มาจากพ่อแถบหนึ่งและแม่อีกแถบหนึ่ง จากรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี ไม่พบสภาพที่ในลูกผสมพบแถบดีเอ็นเอ ขณะที่ในพ่อและแม่ทั้งคู่ไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ จึงสรุปได้ว่าลูกผสมที่ได้ทั้ง 4 ดัน น่าจะเป็นลูกผสมจริง และควรเพิ่มเติมข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเครื่องหมายโมเลกุลประเภท co-dominant marker เพื่อให้การวิเคราะห์พ่อ แม่ ลูก มีความถูกต้องมากขึ้น ดวงพร (2543) ได้ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการตรวจสอบแวนด้าลูกผสม ให้ผลบ่งชี้ความน่าจะเป็นลูกผสม แต่ยังไม่สามารถบ่งชี้ลูกผสมได้ชัดเจน



ภาพที่ 13 รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี ของบั่วที่ใช้เป็นพ่อ แม่ และลูกผสม 1-1, 1-2, 1-3 และ 1-4 (A)ไพรเมอร์ OPA-20 และ (B)ไพรเมอร์ OPF-19 (B)
(M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และตรวจสอบลูกผสมด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

จากการทดสอบไพรเมอร์ระหว่าง E+3 และ M+3 ทั้งหมด 82 คู่ กับตัวอย่างดีเอ็นเอ 2 ตัวอย่าง คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและชัดเจนจำนวน 10 คู่ (ตารางที่ 15) มาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในตัวอย่างบัวหลวง 46 ตัวอย่าง เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ *EcoRI* adapter 4 ไพรเมอร์ และ *MseI* adapter 9 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 15 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวงด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

คู่ไพรเมอร์	E-AAC	E-AAG	E-ACT	E-CAA	E-CAC	E-CAG	E-ACA	E-ACC	E-AGC	E-AGG	E-ACG
M-CAA	✓	X	X	O	O	O	X	X	X	X	X
M-CAC	✓	✓	X	O	O	O	X	X	X	X	X
M-CAG	✓	X	X	O	O	O	X	X	X	X	X
M-CAT	✓	X	X	O	O	O	X	X	X	X	X
M-CTC	X	X	X	O	O	O	X	X	X	X	X
M-AGA	O	O	O	✓	X	X	O	O	O	O	O
M-ATA	O	O	O	X	✓	X	O	O	O	O	O
M-AAG	O	O	O	✓	X	X	O	O	O	O	O
M-AAT	O	O	O	X	✓	X	O	O	O	O	O
M-CTA	✓	X	X	O	O	O	X	X	X	X	X
M-CTG	X	X	X	O	O	O	X	X	X	X	X
M-CTT	X	X	X	O	O	O	X	X	X	X	X
M-ACG	O	O	O	X	X	X	O	O	O	O	O
M-AGG	O	O	O	X	X	X	O	O	O	O	O

หมายเหตุ O คู่ไพรเมอร์ที่ไม่ได้ตรวจสอบ

X คู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มชิ้นดีเอ็นเอได้น้อยและไม่ชัดเจน

✓ คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ และเลือกมาใช้ในการทดลอง

ตารางที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับเทคนิคแอฟแอลพี จำนวนแถบดีเอ็นเอ
จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงทั้ง 46 ตัวอย่าง และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้
polymorphism

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด	จำนวน polymorphic band	% polymorphism band
E-CAA/ M-AGA	5' -GACTGCGTACCAATTCAAC- 3' 5' -GATGAGTCCTGAGTAAAGA- 3'	67	5	7.46
E-CAC/ M-ATA	5' -GACTGCGTACCAATTCCAC- 3' 5' -GATGAGTCCTGAGTAAATA- 3'	55	10	18.18
E-CAA/ M-AAG	5' -GATGAGTCCTGAGTAACAA- 3' 5' -GATGAGTCCTGAGTAAAG- 3'	59	13	22.03
E-CAC/ M-AAT	5' -GACTGCGTACCAATTCAC- 3' 5' -GATGAGTCCTGAGTAAAT- 3'	50	12	24
E-AAC/ M-CAC	5' -GACTGCGTACCAATTCAC- 3' 5' -GATGAGTCCTGAGTAACAC- 3'	32	6	18.75
E-AAC/ M-CAG	5' -GACTGCGTACCAATTCAC- 3' 5' -GATGAGTCCTGAGTAACAG- 3'	53	3	5.67
E-AAC/ M-CAT	5' -GACTGCGTACCAATTCAC- 3' 5' -GATGAGTCCTGAGTAACAT- 3'	47	23	48.93
E-AAC/ M-CTA	5' -GACTGCGTACCAATTCAC- 3' 5' -GAT GAGTCCTGAGTAACTA- 3'	48	13	27.08
E-ACT/ M-CAA	5' -GACTGCGTACCAATTCAC- 3' 5' -GATGAGTCCTGAGTAACAA- 3'	37	7	18.91
E-AAG/ M-CAC	5' -GACTGCGTACCAATTCAG- 3' 5' -GATGAGTCCTGAGTAACAC- 3'	35	18	51.42
รวม		483	117	

จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เข้มชัดเจนและเข้มปานกลางจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวหลวงแต่ละ
คู่ไพรเมอร์ (ภาพที่ 14-16) พบอยู่ระหว่าง 32-67 แถบหรือ markers ได้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด
483 แถบ เฉลี่ย 48.3 แถบต่อชนิดของไพรเมอร์ เป็น polymorphic markers จำนวน 117 แถบ และ
monomorphic markers จำนวน 366 แถบ โดยไพรเมอร์ E-CAA/M-AGA ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ
มากที่สุดคือ 67 แถบ และไพรเมอร์ E-AAC/M-CAC ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ 32 แถบ ไพรเมอร์
ที่ให้เปอร์เซ็นต์ polymorphic band มากที่สุดคือ E-AAG/M-CAC (ตารางที่ 16)

ค่า PICs ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 483 แถบหรือ markers จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแอฟแฟลคมีค่าอยู่ในช่วง 0.000-0.4915 ค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.0459 เมื่อคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมโดยวิธี simple matching ของ Sneath และ Sokal (1973) พบว่าค่าความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.9468-0.9955 และค่าความต่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.0045-0.0532 (ตารางภาคผนวกที่ 2) เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์และสร้าง phylogenetic tree โดยใช้ Neighbour- Joining ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpc- 2.20k พบว่าสามารถจำแนกตัวอย่างบั่วออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ 6 กลุ่มย่อย (ภาพที่ 17) ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อย เป็นกลุ่มบั่วหลวงในประเทศไทยซึ่งได้แก่ บัวฉัตรชมพู (2, 12, 19, 25, 27, 28, 30) ฉัตรขาว (1, 16, 18) แหลมชมพู (4, 5, 7, 13, 17, 23, 24, 26, 29) แหลมขาว (6, 8, 9, 10, 11, 14, 15) และบัวพระราชินี (3)

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อยเช่นกัน โดยกลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วยบั่วหลวงจากไต้หวัน 2 ตัวอย่าง (31, 32)

กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วยบั่วหลวงลูกผสม (43, 44, 45, 46) ระหว่างบั่วหลวงแหลมชมพู (7) และแหลมขาว (8) จากประเทศไทย และบั่วหลวงจาก Wuhan (41) ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนซึ่งเป็นบัวที่นำมาปลูกและปล่อยให้มีการผสมโดยธรรมชาติ น่าจะมีโอกาสได้รับการผสมกับบั่วหลวงไทยที่ปลูกในบริเวณข้างเคียง โดยตัวอย่างที่นำมาศึกษาได้มาจากการเพาะเมล็ดที่เก็บมาจากแปลงปลูก

กลุ่มย่อยที่ 3 ประกอบด้วยกลุ่มบั่วหลวงจากต่างประเทศทั้งหมด ได้แก่ จีน (38, 39, 40) ไต้หวัน (34, 35, 36, 37) และญี่ปุ่น (42)

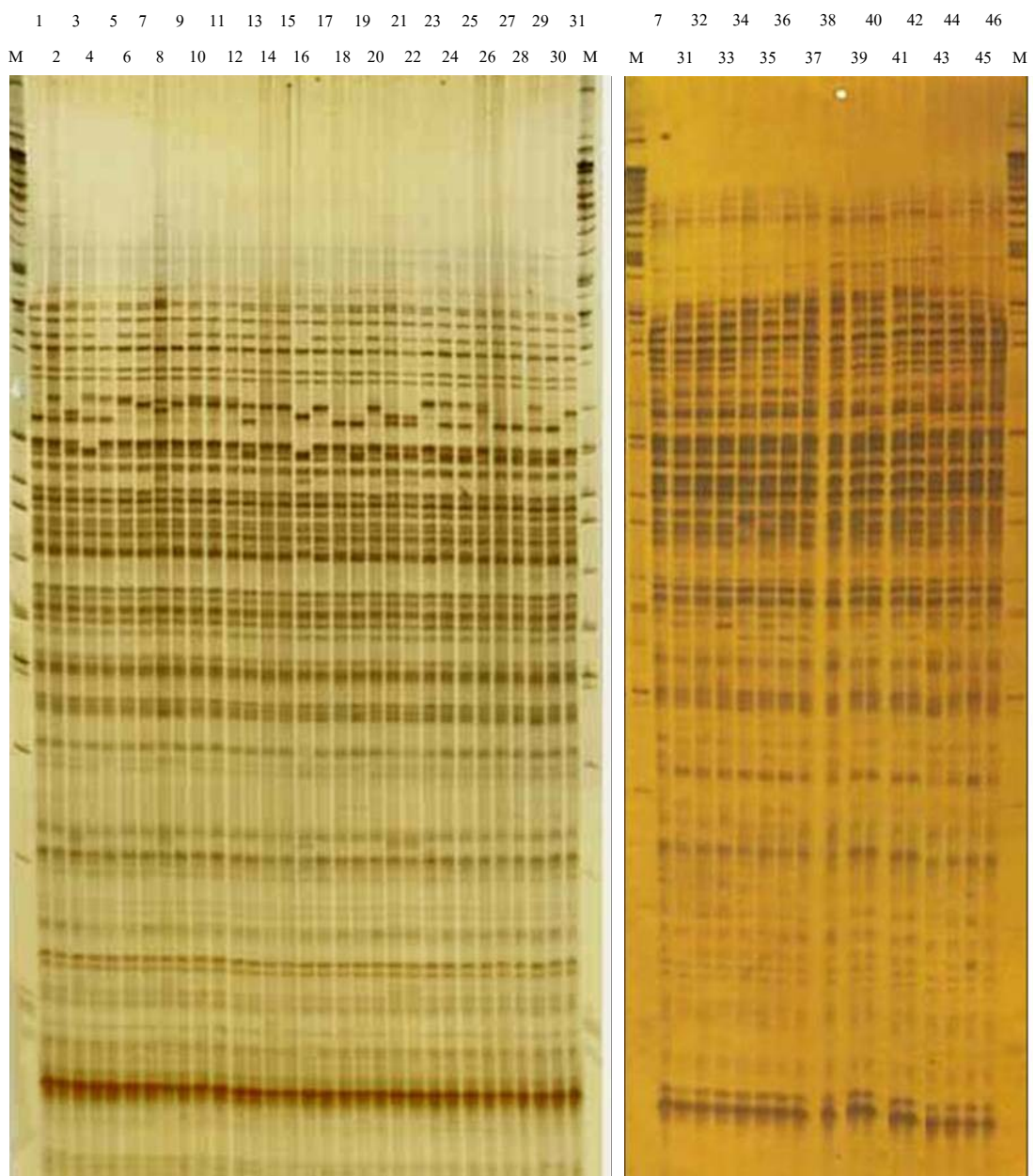
การวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี PCA สามารถแบ่งบั่วได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ (ภาพที่ 18) เมื่อเปรียบเทียบกับ phylogenetic tree กลุ่มที่ 1 จะประกอบด้วยกลุ่มบั่วหลวงในประเทศไทย กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยบั่วหลวงจากต่างประเทศกลุ่มย่อยที่ 1 และกลุ่มย่อยที่ 3 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยบั่วหลวงลูกผสมจากไทยทั้งหมด และกลุ่มที่ 4 เป็นบั่วหลวงจาก Wuhan ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน โดยมีค่า PCA 1 = 76.83 เปอร์เซ็นต์ PCA 2 = 2.62 เปอร์เซ็นต์ PCA 3 = 2.22

เปอร์เซ็นต์ ค่า PCA 1-3 ครอบคลุมประมาณ 81.68 เปอร์เซ็นต์ ของความแปรปรวนทั้งหมด ผลการศึกษาพบว่าบัวหลวงที่นำมาศึกษามีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน

เมื่อเปรียบเทียบผลจากเทคนิคอาร์เอพีดีและเทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่าเทคนิคอาร์เอพีดียังไม่สามารถจำแนกกลุ่มบัวหลวงในประเทศไทยออกจากกลุ่มบัวหลวงต่างประเทศได้ ส่วนเทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถจำแนกบัวหลวงทั้ง 2 กลุ่มนี้ออกจากกันได้ ทั้งนี้เนื่องมาจากวิธีอาร์เอพีดีเป็นการใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มได้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าเทคนิคเอเอฟแอลพี การที่เทคนิคเอเอฟแอลพีทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอปริมาณมาก เนื่องจากตำแหน่งการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดคือ *EcoRI* ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส และ *MseI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส จากความเหมาะสมของตำแหน่งการตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์ทั้ง 2 ซึ่งจะกระจายได้ทั่วทั้งจีโนม (genome) และมีจำนวนจุดตัดมากมาย ทำให้ได้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับการวิเคราะห์ผลจำนวนมาก และเมื่อทดลองซ้ำก็ให้ผลเหมือนเดิม วิธีอาร์เอพีดีแม้จะไม่ให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนเดิมในบางครั้งแต่แถบดีเอ็นเอที่เข้มมากและเข้มปานกลาง (major band and intermediate band) ก็ยังปรากฏอยู่เมื่อทดลองซ้ำเป็นส่วนใหญ่ (สุรินทร์, 2545) ดังนั้นในเทคนิคอาร์เอพีดีจึงควรเพิ่มจำนวนไพรเมอร์ในการศึกษาให้มากขึ้น

ภาพที่ 14 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการวิเคราะห์บัพทลงตัวอย่างต่าง ๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ E-AAC และ M-CAT (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน) (ฉัตรขาว มก. (1), ฉัตรชมพู พิพิธภัณฑสถาน (2), แหยมชมพู พระราชินี (3), แหยมชมพู กรุงเทพฯ (4), แหยมชมพู พิจิตร (5), แหยมขาว พิจิตร (6), แหยมชมพู สามร้อยยอด ประจวบคีรีขันธ์ (7*), แหยมขาว คลองโยง นครปฐม (8*), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (9), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (10), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (11), ฉัตรชมพู จตุจักร (เมล็ด) (12), แหยมชมพู ปทุมธานี (13), แหยมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (14), แหยมขาว พิพิธภัณฑสถาน (15), ฉัตรขาว พิพิธภัณฑสถาน (16), แหยมชมพู พิพิธภัณฑสถาน (17), ฉัตรขาว ปทุมธานี (18), ฉัตรชมพู ปทุมธานี (19), บัพทลง ลาดหลุมแก้ว (20), บัพทลง มก. (21), บัพทลง มก. (22), แหยมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด) (23), แหยมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด) (24), ฉัตรชมพู มก. (25), แหยมชมพู สระบุรี (26), ฉัตรชมพู สระบุรี (27), ฉัตรชมพู สระบุรี (28), แหยมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (29), ฉัตรชมพู ปทุมธานี (30), ใต้หวัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด) (31), ใต้หวัน-2 White thousand petals (เมล็ด) (32), ใต้หวัน-4 Hunan white (เมล็ด) (33), ใต้หวัน-8 Hunan white (เมล็ด) (34), ใต้หวัน-5 (เมล็ด) (35), ใต้หวัน-7 (เมล็ด) (36), ใต้หวัน-9 (เมล็ด) (37), จีน ดอกสีแดง (38), จีน ดอกสีแดง (เมล็ด) (39), จีน ดอกซ้อนแดง (พันธุ์เห้ง) (40), จีน Wuhan กวางเจา (เมล็ด) (41), ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง (42), ลูกผสม 1-1 (43), ลูกผสม 1-2 (44), ลูกผสม 1-3 (45), ลูกผสม 1-4 (46))

* ตัวอย่างบัวที่ใช้ผสมพันธุ์

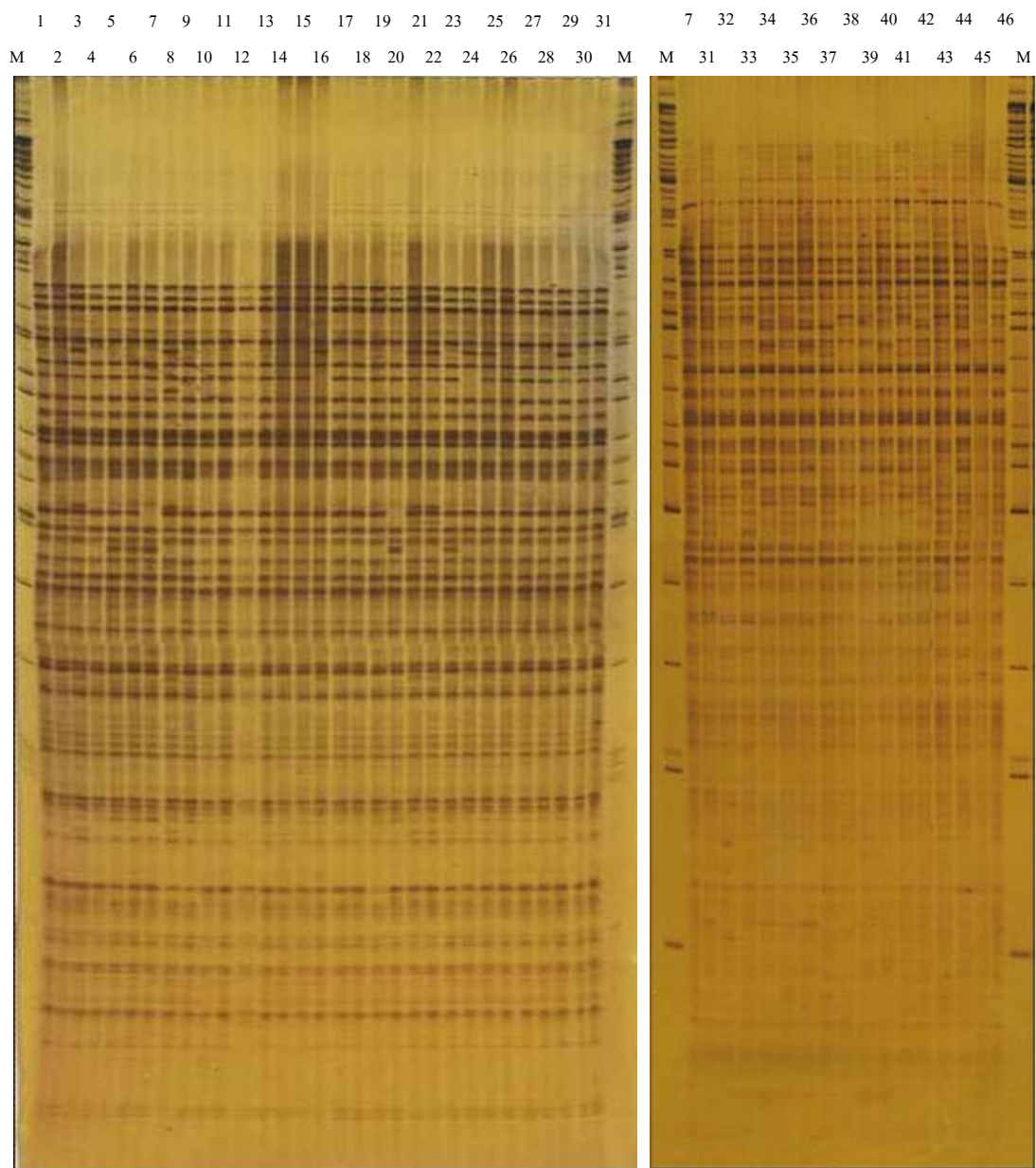


E-AAC ແລະ M-CAT

ภาพที่ 15 รูปแบบของแถบสีเอน์จากการวิเคราะห์บัวหลวงตัวอย่างต่าง ๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ด้วยเทคนิคเอฟแอลพี โดยใช้โปรแกรม E-ACT และ M-CAA

(M = แถบสีเอน์มาตรฐาน) (นั้รขาว มก. (1), นั้รชมพู พื้พื้กัณั้เกษตร (2), แหล่มชมพู พระราชินี (3), แหล่มชมพู กรุงเทพฯ (4), แหล่มชมพู พื้จิตร (5), แหล่มขาว พื้จิตร (6), แหล่มชมพู สามร้อยยอด ประจวบคีรีขันธ์ (7*), แหล่มขาว คลองโยง นครปฐม (8*), แหล่มขาว จตุจักร (เมล็ด) (9), แหล่มขาว จตุจักร (เมล็ด) (10), แหล่มขาว จตุจักร (เมล็ด) (11), นั้รชมพู จตุจักร (เมล็ด) (12), แหล่มชมพู ปทุมธานี (13), แหล่มขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (14), แหล่มขาว พื้พื้กัณั้เกษตร (15), นั้รขาว พื้พื้กัณั้เกษตร (16), แหล่มชมพู พื้พื้กัณั้เกษตร (17), นั้รขาว ปทุมธานี (18), นั้รชมพู ปทุมธานี (19), บัวหลวง ลาดหลุมแก้ว (20), บัวหลวง มก. (21), บัวหลวง มก. (22), แหล่มชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด) (23), แหล่มชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด) (24), นั้รชมพู มก. (25), แหล่มชมพู สระบุรี (26), นั้รชมพู สระบุรี (27), นั้รชมพู สระบุรี (28), แหล่มชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (29), นั้รชมพู ปทุมธานี (30), ใต้หวัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด) (31), ใต้หวัน-2 White thousand petals (เมล็ด) (32), ใต้หวัน-4 Hunan white (เมล็ด) (33), ใต้หวัน-8 Hunan white (เมล็ด) (34), ใต้หวัน-5 (เมล็ด) (35), ใต้หวัน-7 (เมล็ด) (36), ใต้หวัน-9 (เมล็ด) (37), จีน ดอกสีแดง (38), จีน ดอกสีแดง (เมล็ด) (39), จีน ดอกซ้อนแดง (พันธุ์เห้ง) (40), จีน Wuhan กวางเจา (เมล็ด) (41), ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง (42), ลูกผสม 1-1 (43), ลูกผสม 1-2 (44), ลูกผสม 1-3 (45), ลูกผสม 1-4 (46))

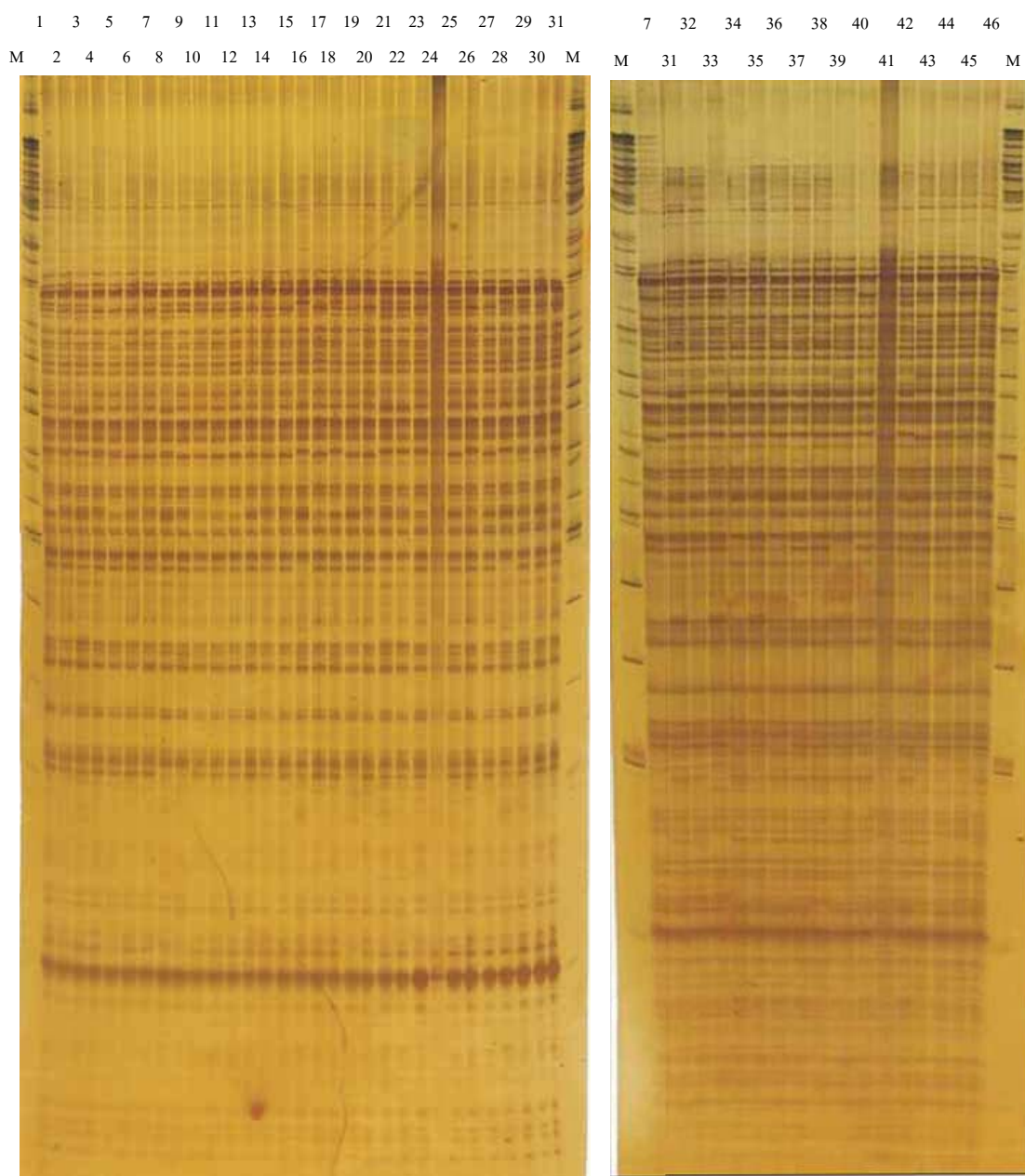
* ตัวอย่างบัวที่ใช้ผสมพันธุ์



E-ACT และ M-CAA

ภาพที่ 16 รูปแบบของแถบสีเอน์จากการวิเคราะห์บัวหลวงตัวอย่างต่าง ๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ด้วยเทคนิคเอฟแอลพี โดยใช้โปรแกรม E-CAC และ M-AAT (M = คีเอ็นเอมาตรฐาน) (ฉัตรขาว มก. (1), ฉัตรชมพู พิพิธภัณฑสถาน (2), แหยมชมพู พระราชินี (3), แหยมชมพู กรุงเทพฯ (4), แหยมชมพู พิจิตร (5), แหยมขาว พิจิตร (6), แหยมชมพู สามร้อยยอด ประจวบคีรีขันธ์ (7*), แหยมขาว คลองโยง นครปฐม (8*), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (9), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (10), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (11), ฉัตรชมพู จตุจักร (เมล็ด) (12), แหยมชมพู ปทุมธานี (13), แหยมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (14), แหยมขาว พิพิธภัณฑสถาน (15), ฉัตรขาว พิพิธภัณฑสถาน (16), แหยมชมพู พิพิธภัณฑสถาน (17), ฉัตรขาว ปทุมธานี (18), ฉัตรชมพู ปทุมธานี (19), บัวหลวง ลาดหลุมแก้ว (20), บัวหลวง มก. (21), บัวหลวง มก. (22), แหยมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด) (23), แหยมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด) (24), ฉัตรชมพู มก. (25), แหยมชมพู สระบุรี (26), ฉัตรชมพู สระบุรี (27), ฉัตรชมพู สระบุรี (28), แหยมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (29), ฉัตรชมพู ปทุมธานี (30), ใต้หัว-6 East Indian Lotus (เมล็ด) (31), ใต้หัว-2 White thousand petals (เมล็ด) (32), ใต้หัว-4 Hunan white (เมล็ด) (33), ใต้หัว-8 Hunan white (เมล็ด) (34), ใต้หัว-5 (เมล็ด) (35), ใต้หัว-7 (เมล็ด) (36), ใต้หัว-9 (เมล็ด) (37), จีน ดอกสีแดง (38), จีน ดอกสีแดง (เมล็ด) (39), จีน ดอกซ้อนแดง (พันธุ์เห้ง) (40), จีน Wuhan กวางเจา (เมล็ด) (41), ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง (42), ลูกผสม 1-1 (43), ลูกผสม 1-2 (44), ลูกผสม 1-3 (45), ลูกผสม 1-4 (46))

* ตัวอย่างบัวที่ใช้ผสมพันธุ์

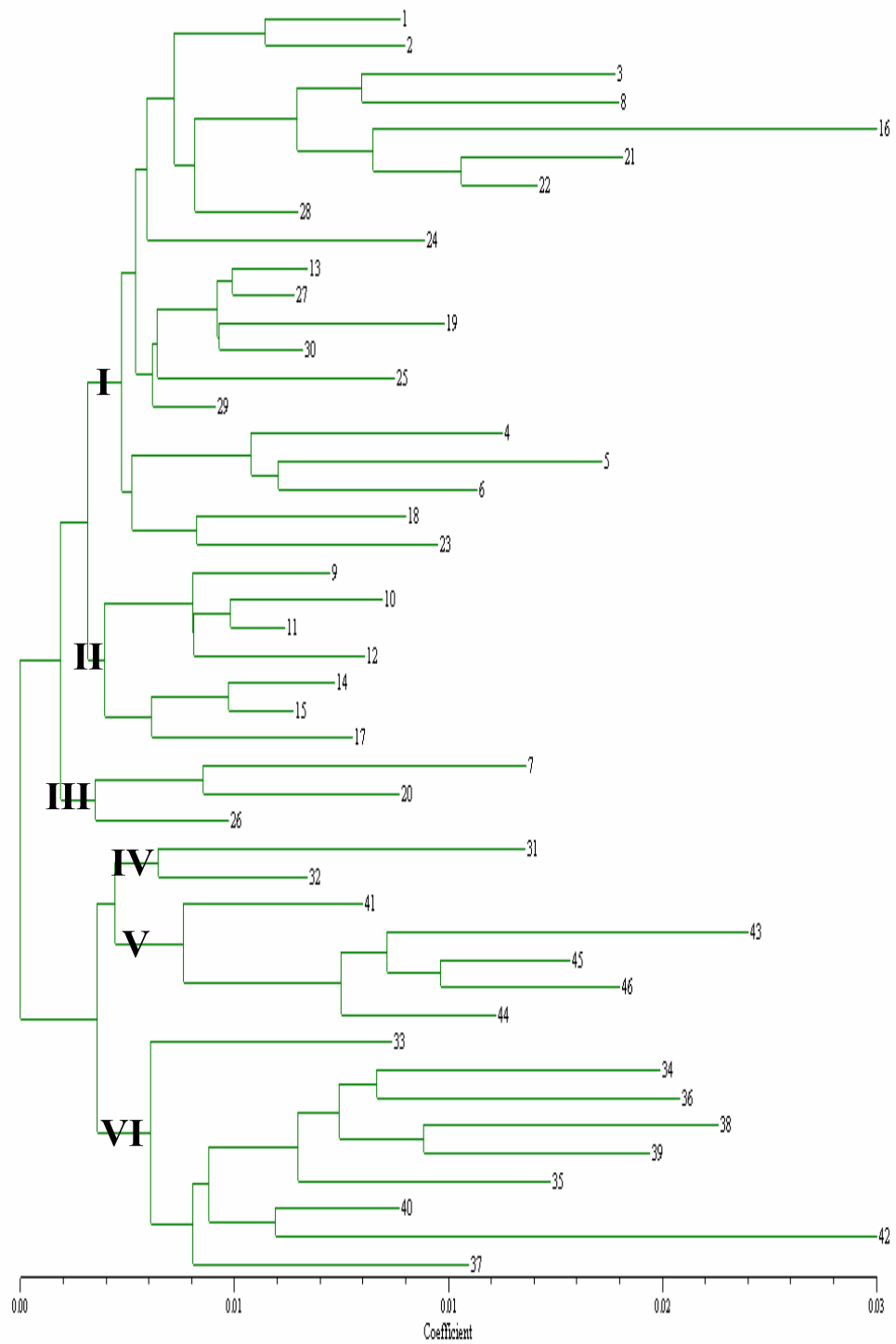


E-CAC and M-AAT

ภาพที่ 17 Phylogenetic tree ของบัวหลวงสร้างโดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยใช้

Neighbour-joining ในโปรแกรม NTSYSp-2.20k (นัตรขาว มก. (1), นัตรชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร (2), แหลมชมพู พระราชินี (3), แหลมชมพู กรุงเทพฯ (4), แหลมชมพู พิจิตร (5), แหลมขาว พิจิตร (6), แหลมชมพู สามร้อยยอด ประจวบคีรีขันธ์ (7*), แหลมขาว คลองโยง นครปฐม (8*), แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (9), แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (10), แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (11), นัตรชมพู จตุจักร (เมล็ด) (12), แหลมชมพู ปทุมธานี (13), แหลมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (14), แหลมขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร (15), นัตรขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร (16), แหลมชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร (17), นัตรขาว ปทุมธานี (18), นัตรชมพู ปทุมธานี (19), บัวหลวง ลาดหลุมแก้ว (20), บัวหลวง มก. (21), บัวหลวง มก. (22), แหลมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด) (23), แหลมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด) (24), นัตรชมพู มก. (25), แหลมชมพู สระบุรี (26), นัตรชมพู สระบุรี (27), นัตรชมพู สระบุรี (28), แหลมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (29), นัตรชมพู ปทุมธานี (30), ใต้หวัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด) (31), ใต้หวัน-2 White thousand petals (เมล็ด) (32), ใต้หวัน-4 Hunan white (เมล็ด) (33), ใต้หวัน-8 Hunan white (เมล็ด) (34), ใต้หวัน-5 (เมล็ด) (35), ใต้หวัน-7 (เมล็ด) (36), ใต้หวัน-9 (เมล็ด) (37), จีน ดอกสีแดง (38), จีน ดอกสีแดง (เมล็ด) (39), จีน ดอกซ้อนแดง (พันธุ์เหง้า) (40), จีน Wuhan กวางเจา (เมล็ด) (41), ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง (42), ลูกผสม 1-1 (43), ลูกผสม 1-2 (44), ลูกผสม 1-3 (45), ลูกผสม 1-4 (46))

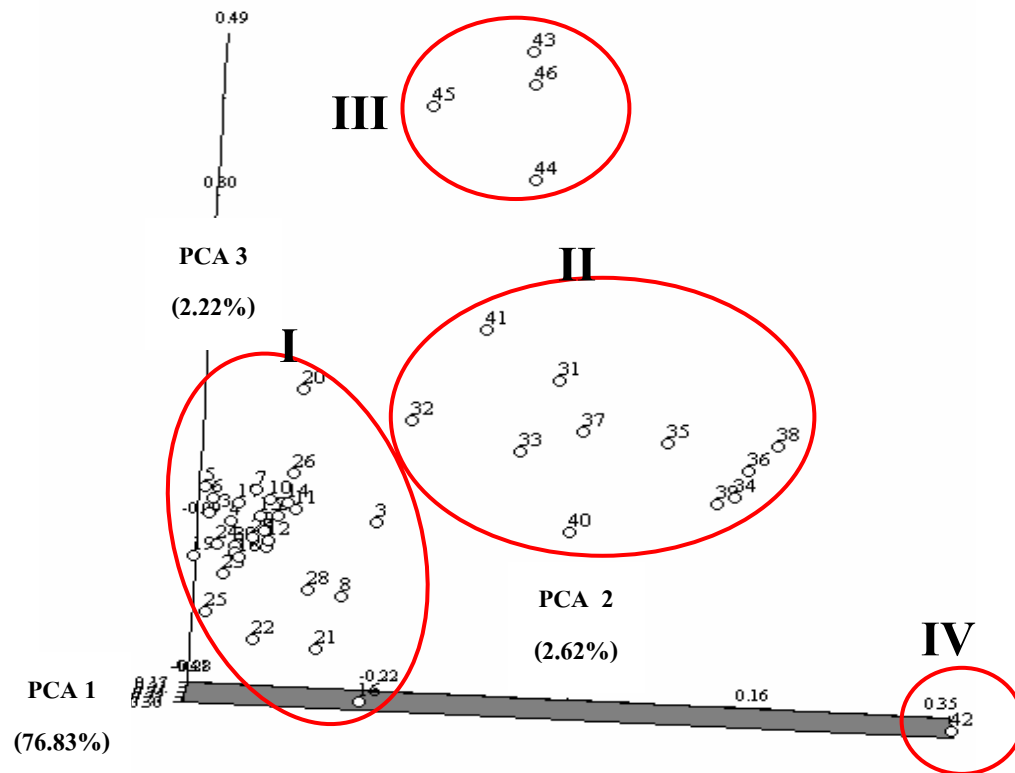
* ตัวอย่างบัวที่ใช้ผสมพันธุ์



ภาพที่ 18 Principal Component Analysis (PCA) ของบัวหลวงที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม

NTSYSp-2.20k โดยอาศัยข้อมูลจากเทคนิคเอฟแอลพี (นักรขาว มก. (1), นักรชมพู พิพิธภัณฑสถาน (2), แหลม ชมพู พระราชินี (3), แหลมชมพู กรุงเทพฯ (4), แหลมชมพู พิจิตร (5), แหลมขาว พิจิตร (6), แหลมชมพู สามร้อยยอด ประจวบคีรีขันธ์ (7*), แหลมขาว คลองโยง นครปฐม (8*), แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (9), แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (10), แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (11), นักรชมพู จตุจักร (เมล็ด) (12), แหลมชมพู ปทุมธานี (13), แหลมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (14), แหลมขาว พิพิธภัณฑสถาน (15), นักรขาว พิพิธภัณฑสถาน (16), แหลมชมพู พิพิธภัณฑสถาน (17), นักรขาว ปทุมธานี (18), นักรชมพู ปทุมธานี (19), บัวหลวง ลาดหลุมแก้ว (20), บัวหลวง มก. (21), บัวหลวง มก. (22), แหลมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด) (23), แหลมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด) (24), นักรชมพู มก. (25), แหลมชมพู สระบุรี (26), นักรชมพู สระบุรี (27), นักรชมพู สระบุรี (28), แหลมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (29), นักรชมพู ปทุมธานี (30), ใต้หวัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด) (31), ใต้หวัน-2 White thousand petals (เมล็ด) (32), ใต้หวัน-4 Hunan white (เมล็ด) (33), ใต้หวัน-8 Hunan white (เมล็ด) (34), ใต้หวัน-5 (เมล็ด) (35), ใต้หวัน-7 (เมล็ด) (36), ใต้หวัน-9 (เมล็ด) (37), จีน ดอกสีแดง (38), จีน ดอกสีแดง (เมล็ด) (39), จีน ดอกซ้อนแดง (พันธุ์เหง้า) (40), จีน Wuhan กวางเจา (เมล็ด) (41), ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง (42), ลูกผสม 1-1 (43), ลูกผสม 1-2 (44), ลูกผสม 1-3 (45), ลูกผสม 1-4 (46))

* ตัวอย่างบัวที่ใช้ผสมพันธุ์



การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ด้วยเทคนิคเอสเอสซีพี

การพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะ

รวบรวมข้อมูลลำดับเบสของยีนที่สนใจจากพืชต่าง ๆ จากฐานข้อมูล GenBank นำมาเปรียบเทียบและพัฒนาไพรเมอร์ที่บริเวณอนุรักษ์ของแต่ละยีน ได้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ไพรเมอร์จำเพาะของยีนที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมบัวหลวง

ชื่อยีน	T _a * (°C)	ขนาด (bp)	ลำดับเบสของไพรเมอร์
<i>chalcone synthase</i>	57	636	CHS-F : 5' -TGACTACCAGCTCACCAA-3' CHS-R : 5' -TCCGCATCTCATCCAATATG-3'
<i>storage protein</i>	59	1,100	SP-F : 5' -GATTGAGCTTGAGCGAAGTG-3' SP-R : 5' -TACATCACATGGATCATATCC-3'
<i>fruitfull protein (ful)</i>	60	1,200	FUL-F : 5'-TTCTTATGCAGAGCGAGAGC-3' FUL-R : 5'-GATTGAGATGACACCTCTGC-3'
ITS (nrRNA)	59	870	18S-F : 5'-TCGCTCCTACCGATTGAATG -3' 26S-R : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'
ITS2 (nrRNA)	57	400	5.8S-F : 5'-TACTTGGTGTGAATTGCAGAA -3' 26S-R : 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'

* T_a = annealing temperature

ยีน *chalcone synthase (chs)* เมื่อถูกเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 636 คู่เบส (ภาพที่ 19) ซึ่งยีน *chs* นี้เป็นเอนไซม์ที่สำคัญต่อกระบวนการสร้างสารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการรวม malonyl-CoA 3 โมเลกุลกับ 4-coumaroyl-CoA 1 โมเลกุล เพื่อสร้าง naringenin chalcone ที่เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสร้างสารต่าง ๆ ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ สารกลุ่มฟลาโวนอยด์มีหน้าที่สำคัญในการสร้างสารสีในดอก ป้องกันรังสียูวี และการป้องกันเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค (phytopathogen) ต่างๆ ในพืช รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของส่วนของยีน *chs* จากเทคนิค AS-PCR และเทคนิคเอสเอสซีพี ปรากฏเพียง 1 รูปแบบในทุก ตัวอย่างที่ศึกษาทั้ง 40 ตัวอย่าง มีค่า PICs เท่ากับ 0 (ตารางที่ 18) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ji *et al.* (2006) ที่เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *chs* จากพืชชนิดต่าง ๆ และพบว่า

มีความเหมือนกันค่อนข้างสูง ยีน *chs* ส่วนใหญ่ประกอบด้วย 2 exons และ 1 intron โดยตำแหน่งของ intron ก็ถูกอนุรักษ์เช่นกัน

ยีน storage protein (*sp*) เมื่อถูกเพิ่มปริมาณในปฏิกริยาฟิชอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนขึ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส (ภาพที่ 20) ซึ่งยีน *sp* เป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับโปรตีนที่เกิดขึ้นในระหว่างการพัฒนาเมล็ดและเป็นแหล่งให้ไนโตรเจนสำหรับการพัฒนาของเอ็มบริโอ (embryo) ในระหว่างการงอก โดยเฉลี่ยแล้วเมล็ดธัญพืชมีโปรตีนอยู่ 10-15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ในใบมีเพียง 3-5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากจะพบในเมล็ดแล้ว ยังพบในรากและในหัว เช่น มันฝรั่ง รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของส่วนของยีน *sp* จากเทคนิค AS-PCR และเทคนิค เอสเอสซีพี ปรากฏเพียง 1 รูปแบบในทุก ๆ ตัวอย่างที่ศึกษาเช่นเดียวกับที่พบในยีน *chs* (ตารางที่ 18)

ส่วนของ ITS และ ITS 2 ของ nrRNA เมื่อถูกเพิ่มปริมาณในปฏิกริยาฟิชอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนให้ขึ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 870 และ 400 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 21, 22) ITS เป็นขึ้นส่วนของอาร์เอ็นเอที่ไม่ได้ทำหน้าที่ มีตำแหน่งอยู่ระหว่างส่วนของ ribosomal RNAs (rRNA) อาร์เอ็นเอที่ยังไม่ผ่านกระบวนการตัดแต่ง จะประกอบด้วยส่วน 5' external transcribed sequence (5' ETS), 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA และ 3' ETS ในระหว่างกระบวนการ rRNA maturation บริเวณส่วน ETS และ ITS ที่ไม่ได้ทำหน้าที่จะถูกตัดทิ้งไป ยีน rRNA อยู่ในสภาพ tandem repeats ซึ่งมีจำนวนซ้ำมากอาจถึง 1,000 ซ้ำ จากการวิเคราะห์บริเวณ ITS และ ITS 2 ได้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค AS-PCR และเทคนิค เอสเอสซีพี ปรากฏเพียง 1 รูปแบบในทุกๆ ตัวอย่างที่ศึกษา (ตารางที่ 18)

ยีน *fruitfull protein (ful)* เมื่อถูกเพิ่มปริมาณในปฏิกริยาฟิชอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนให้ขึ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส (ภาพที่ 23) ยีน *ful* มีหน้าที่เกี่ยวกับการแตกของผล อับเรณู และอับสเปอร์ พบมีการแสดงออกของยีน *ful* ในเนื้อเยื่อที่เป็นเกสรเพศเมีย พืชที่มีการกลายของยีน *ful* จะพบว่าเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ดังกล่าวไม่สามารถเปลี่ยนสภาพไปเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่เฉพาะได้ และมีผลต่อการพัฒนาภายหลังจากปฏิสนธิ (Ferrandiz *et al.*, 2000) รูปแบบของแถบดีเอ็นเอของส่วนของยีน *ful* จากเทคนิค AS-PCR พบ 1 รูปแบบในทุก ๆ ตัวอย่างที่ศึกษาจากเทคนิค เอสเอสซีพี ปรากฏ 3 รูปแบบ มีค่า PICs เท่ากับ 0.30 (ตารางที่ 18) ตัวอย่างบัวหลวงทุกตัวอย่างพบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเพียง 1 รูปแบบ แสดงให้เห็นว่าตำแหน่งนั้นมีเพียงแอลลีลเดียว มีสภาพเป็นโฮโมไซกัส

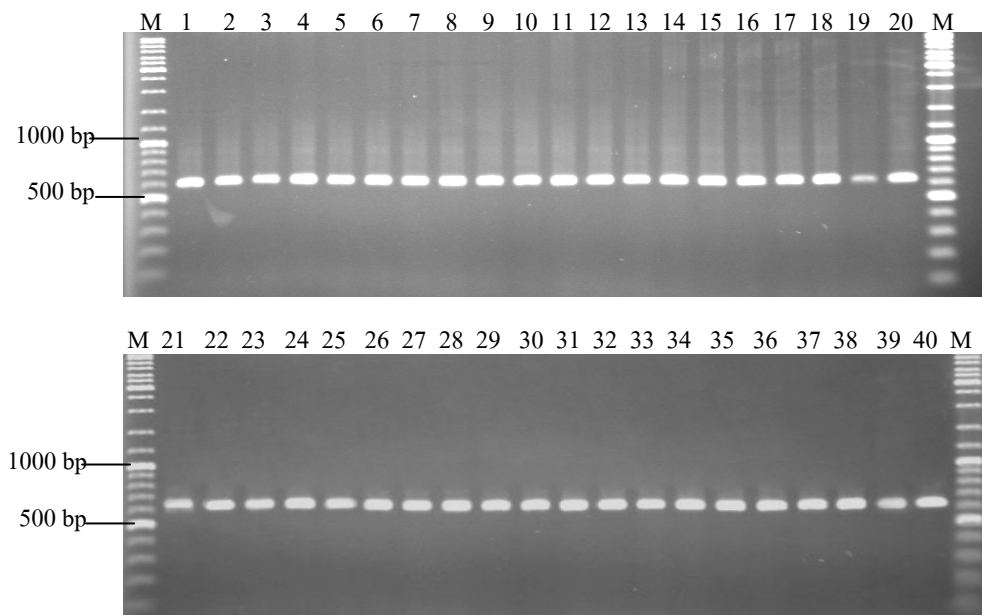
รูปแบบที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอสเอสซีพีกับยีน *chalcone synthase, storage protein, fruitfull protein* และบริเวณ ITS และ ITS2 นี้ยังไม่สามารถจัดจำแนกตามพันธุ์ หรือแบ่งกลุ่มบัวหลวงในประเทศและบัวหลวงจากต่างประเทศออกจากกันได้ชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากขนาดยีนที่ใช้ในการศึกษานี้มีความยาวมากกว่า 300 คู่เบส ทำให้ประสิทธิภาพในการตรวจสอบลดลง เพราะความไวของการตรวจเอสเอสซีพี นอกจากจะผันแปรตามลำดับเบสของดีเอ็นเอแล้วยังขึ้นอยู่กับความยาวด้วย หากความยาวของดีเอ็นเอที่ตรวจสอบมีความยาวมาก จะทำให้การตรวจสอบความแตกต่างของดีเอ็นเอที่มีความต่างกันเพียงเล็กน้อย เช่น เพียง 1 เบส เป็นไปได้ยาก ซึ่งอาจแก้ไขได้โดยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์จำเพาะ (restriction enzyme) ให้มีขนาดเล็กลงจึงแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอสเอสซีพี ซึ่งเรียกเทคนิคนี้ว่า Restriction endonuclease fingerprinting-SSCP (Ref-SSCP) (Slabaugh *et al.*, 1997) นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการตรวจจะต่ำถ้าเกิดการกลายหรือการเปลี่ยนแปลงแบบ transversion (G→ C, C→ G) (กุลสุดา, 2550) ดังนั้นจึงควรเพิ่มจำนวนยีนในการศึกษาบัวหลวงให้มากขึ้น ควรออกแบบไพรเมอร์จำเพาะให้ครอบคลุมส่วนที่เป็น intron ของยีน และหากเป็นไปได้ควรตรวจสอบความแตกต่างของผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ agarose gel electrophoresis จะทำให้การตรวจสอบง่ายและรวดเร็วขึ้น (Slabaugh *et al.*, 1997; Hongtrakul *et al.*, 1998) ดังนั้นในการจำแนกบัวหลวงที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันมาก จึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคอื่น ๆ ที่สามารถแยกความแตกต่างเพื่อการตรวจสอบพันธุ์และจำแนกพันธุ์บัวหลวงที่ชัดเจน ควรมีการเพิ่มเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจวิเคราะห์ให้มากขึ้น โดยเฉพาะเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถตรวจสอบความหลากหลายและระบุความจำเพาะของพันธุ์ได้สูงเช่น เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ เป็นต้น

ตารางที่ 18 สรุปจำนวนรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของยีน *chalcone synthase*, *storage protein*, ITS, ITS2 และ *fruitfull protein* ในบัวหลวง 40 ตัวอย่าง และค่า PICs ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอสพีซีอาร์และเอสเอสซีพี

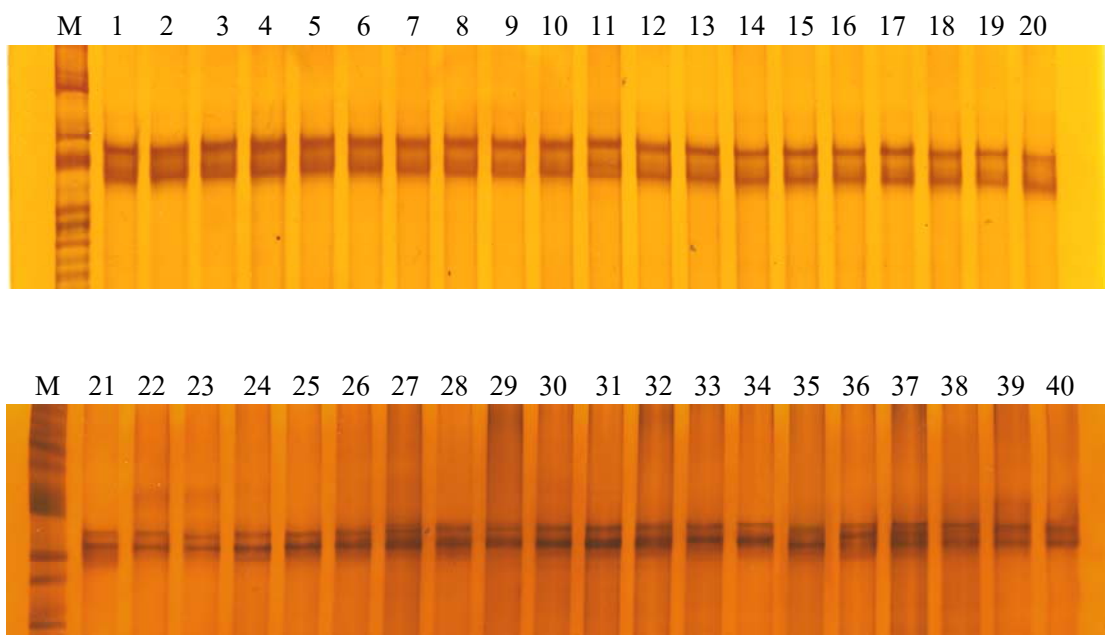
ชื่อยีน	ขนาด (คู่เบส)	จำนวนรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ		ค่า PICs	
		AS-PCR	SSCP	AS-PCR	SSCP
<i>chalcone synthase</i>	636	1	1	0	0
<i>storage protein</i>	1,100	1	1	0	0
ITS	870	1	1	0	0
ITS2	400	1	1	0	0
FUL	1,200	1	3	0	0.30

ภาพที่ 19 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บัพห้วงตัวอย่างต่าง ๆ ทั้งจากในประเทศและต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *chalcone synthase* ด้วย (A) เทคนิค AS-PCR และ (B) เทคนิคเอสเอสซีพี (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน) (บัพห้วง มก. (1), นัตถรชมพู่ พืชรักกันท์เกษตร (2), แหลมชมพู่ พระราชินี (3), แหลมชมพู่ กรุงเทพฯ (เมล็ด) (4), แหลมชมพู่ พิจิตร (5), แหลมขาว พิจิตร (6), แหลมชมพู่ สามร้อยยอด ประจวบคีรีขันธ์ (7*), แหลมขาว คลองโยง นครปฐม (8*), แหลมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (9), แหลมขาว พืชรักกันท์เกษตร (10), นัตถรขาว พืชรักกันท์เกษตร (11), แหลมชมพู่ พืชรักกันท์เกษตร (12), แหลมชมพู่ ลาดหลุมแก้ว (13), แหลมชมพู่ นครสวรรค์ (เมล็ด) (14), แหลมชมพู่ พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด) (15), แหลมชมพู่ สระบุรี (16), นัตถรชมพู่ สระบุรี (17), แหลมชมพู่ ปทุมธานี เกษตรแฟร์ (18), นัตถรชมพู่ ปทุมธานี เกษตรแฟร์ (19), นัตถรขาว มก. (20), บัพห้วง (21), แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (22), นัตถรชมพู่ จตุจักร (เมล็ด) (23), ใต้หวัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด) (24), ใต้หวัน-2 White thousand petals (เมล็ด) (25), ใต้หวัน-4 Hunan white (เมล็ด) (26), ใต้หวัน-8 Hunan white (เมล็ด) (27), ใต้หวัน-5 (เมล็ด) (28), ใต้หวัน-7 (เมล็ด) (29), ใต้หวัน-9 (เมล็ด) (30), จีน ดอกสีแดง (เมล็ด) (31), จีน ดอกซ้อนแดง พันธุ์เหง้า (32), จีน Wuhan กวางเจา (เมล็ด) (33), ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง (34), จีน ดอกเล็ก (35), ใต้หวันดอก สีแดง (เมล็ด) (36), ใต้หวัน (เมล็ด) (37), ใต้หวัน Genetic resource (เมล็ด) (38), ใต้หวัน Genetic resource (เมล็ด) (39), ใต้หวัน (เมล็ด) (40))

* ตัวอย่างบัพที่ใช้ผสมพันธุ์



(A)



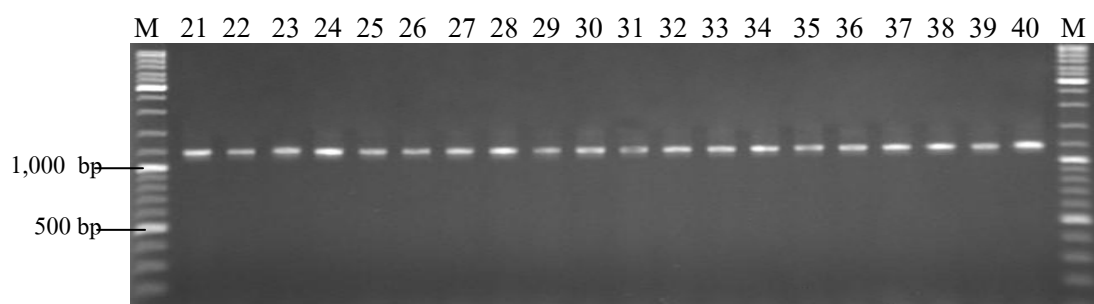
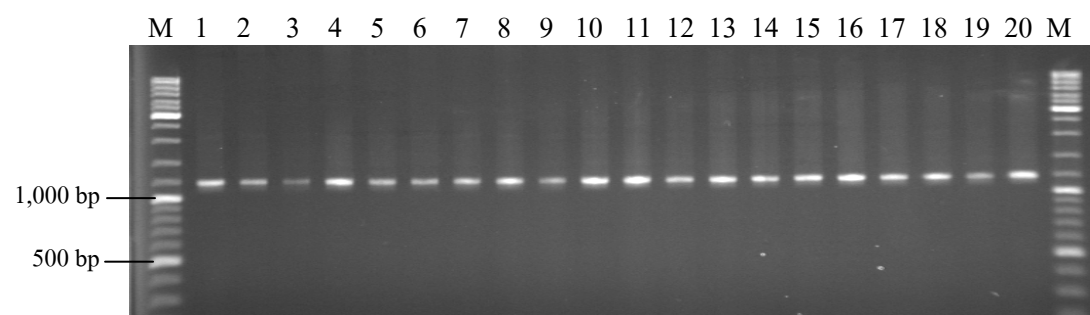
(B)

ภาพที่ 20 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บั่วหลวงตัวอย่างต่าง ๆ ทั้งจากในประเทศและต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *storage protein* ด้วย

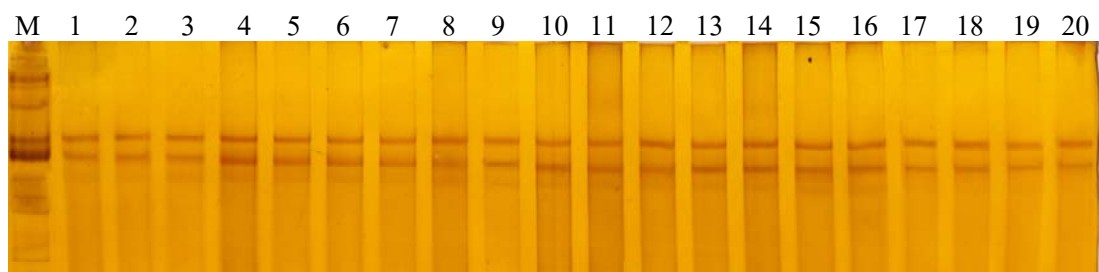
(A) เทคนิค AS-PCR และ (B) เทคนิคเอสเอสซีพี (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน)

(บั่วหลวง มก. (1), นัตถรมพ พืชรักชัณท์เกษตร (2), แผลมชมพ พรวราชินี (3), แผลมชมพ กรุงเทพฯ (เมล็ด) (4), แผลมชมพ พิจิตร (5), แผลมขาว พิจิตร (6), แผลมชมพ สามร้อย ยอด ประจวบคีรีขันธ์ (7*), แผลมขาว คลองโยง นครปฐม (8*), แผลมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (9), แผลมขาว พืชรักชัณท์เกษตร (10), นัตถขาว พืชรักชัณท์เกษตร (11), แผลมชมพ พืชรักชัณท์เกษตร (12), แผลมชมพ ลาดหลุมแก้ว (13), แผลมชมพ นครสวรรค์ (เมล็ด) (14), แผลมชมพ พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด) (15), แผลมชมพ สระบุรี (16), นัตถชมพ สระบุรี (17), แผลมชมพ ปทุมธานี เกษตรแฟร์ (18), นัตถชมพ ปทุมธานี เกษตรแฟร์ (19), นัตถขาว มก. (20), บั่วหลวง (21), แผลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (22), นัตถชมพ จตุจักร (เมล็ด) (23), ใต้หวัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด) (24), ใต้หวัน- 2 White thousand petals (เมล็ด) (25), ใต้หวัน-4 Hunan white (เมล็ด) (26), ใต้หวัน-8 Hunan white (เมล็ด) (27), ใต้หวัน-5 (เมล็ด) (28), ใต้หวัน-7 (เมล็ด) (29), ใต้หวัน-9 (เมล็ด) (30), จีน ดอกสีแดง (เมล็ด) (31), จีน ดอกช่อนแดง พันธุ์เหง้า (32), จีน Wuhan กวางเจา (เมล็ด) (33), ญี่ปุ่น ดอกช่อนแดง (34), จีน ดอกเล็ก (35), ใต้หวันดอก สีแดง (เมล็ด) (36), ใต้หวัน (เมล็ด) (37), ใต้หวัน Genetic resource (เมล็ด) (38), ใต้หวัน Genetic resource (เมล็ด) (39), ใต้หวัน (เมล็ด) (40))

* ตัวอย่างบั่วที่ใช้ผสมพันธุ์



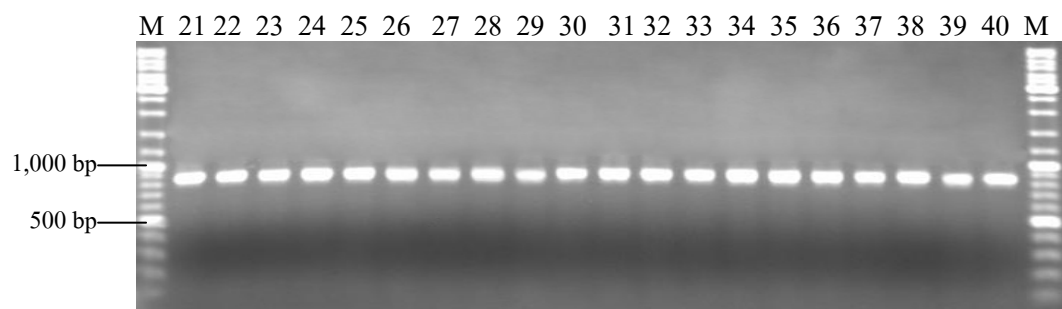
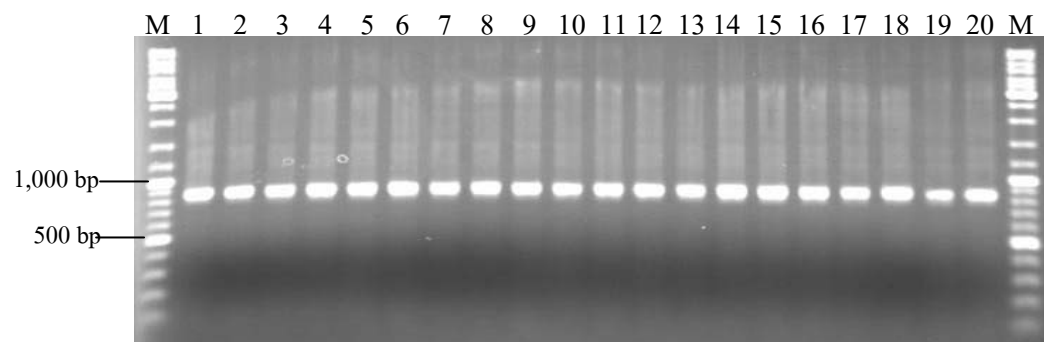
(A)



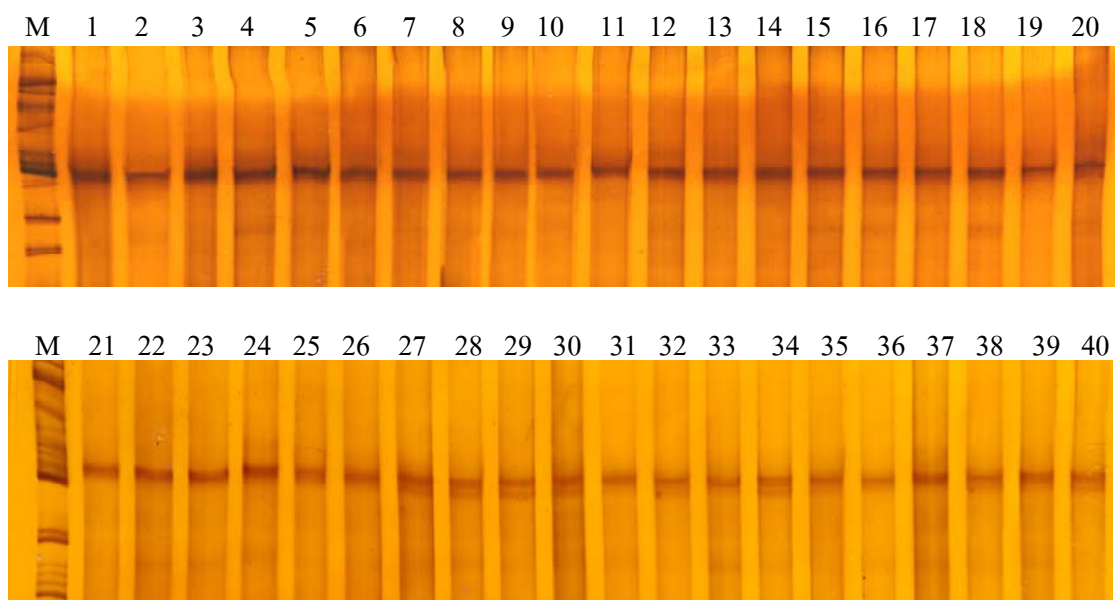
(B)

ภาพที่ 21 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บั่วหลวงตัวอย่างต่าง ๆ ทั้งจากในประเทศและต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับ ITS ด้วย (A) เทคนิค AS-PCR และ (B) เทคนิคเอสเอสซีพี (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน) (บั่วหลวง มก. (1), นัตรชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร (2), แหลมชมพู พระราชินี (3), แหลมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด) (4), แหลมชมพู พิจิตร (5), แหลมขาว พิจิตร (6), แหลมชมพู สามร้อย ยอด ประจวบคีรีขันธ์ (7*), แหลมขาว คลองโยง นครปฐม (8*), แหลมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (9), แหลมขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร (10), นัตรขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร (11), แหลมชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร (12), แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว (13), แหลมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด) (14), แหลมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด) (15), แหลมชมพู สระบุรี (16), นัตรชมพู สระบุรี (17), แหลมชมพู ปทุมธานี เกษตร (18), นัตรชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์ (19), นัตรขาว มก. (20), บั่วหลวง (21), แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (22), นัตรชมพู จตุจักร (เมล็ด) (23), ใต้หวัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด) (24), ใต้หวัน- 2 White thousand petals (เมล็ด) (25), ใต้หวัน-4 Hunan white (เมล็ด) (26), ใต้หวัน-8 Hunan white (เมล็ด) (27), ใต้หวัน-5 (เมล็ด) (28), ใต้หวัน-7 (เมล็ด) (29), ใต้หวัน-9 (เมล็ด) (30), จีน ดอกสีแดง (เมล็ด) (31), จีน ดอกซ้อนแดง พันธุ์ เหง้า (32), จีน Wuhan กวางเจา (เมล็ด) (33), ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง (34), จีน ดอกเล็ก (35), ใต้หวันดอก สีแดง (เมล็ด) (36), ใต้หวัน (เมล็ด) (37), ใต้หวัน Genetic resource (เมล็ด) (38), ใต้หวัน Genetic resource (เมล็ด) (39), ใต้หวัน (เมล็ด) (40))

* ตัวอย่างบั่วที่ใช้ผสมพันธุ์



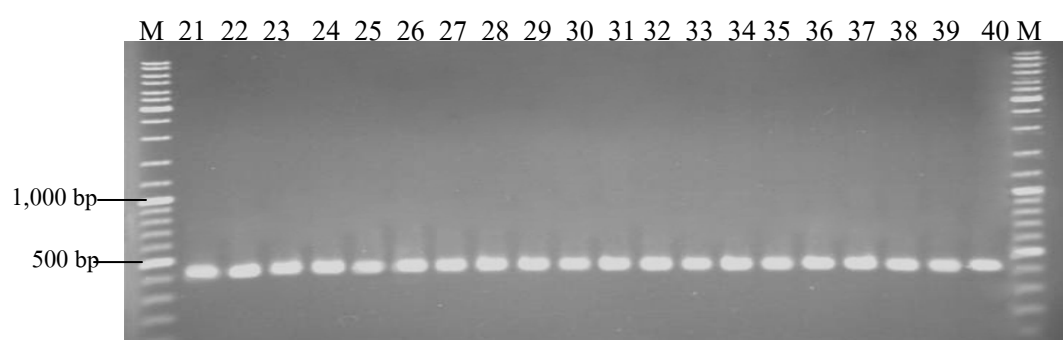
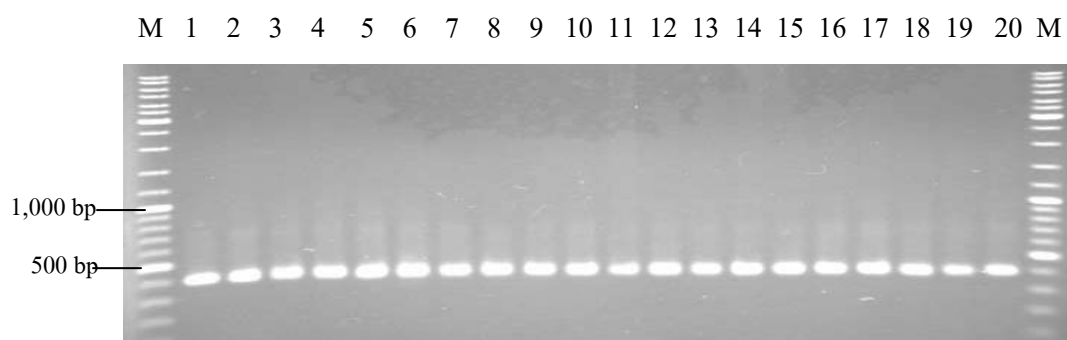
(A)



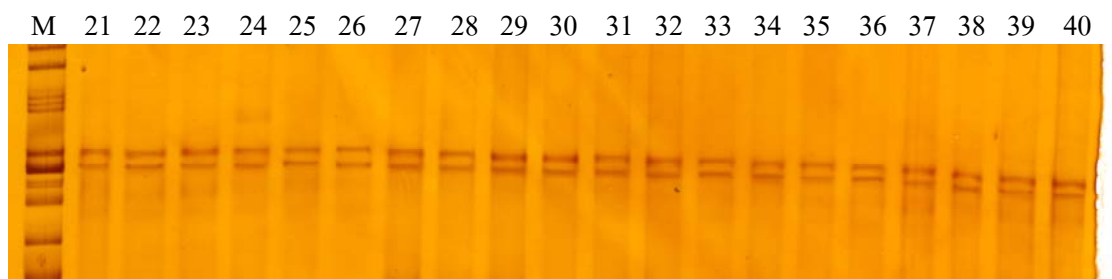
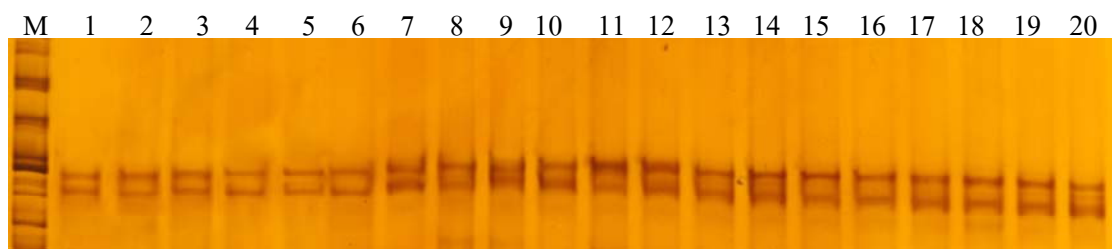
(B)

ภาพที่ 22 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บั่วหลวงตัวอย่างต่าง ๆ ทั้งจากในประเทศและต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับ ITS2 ด้วย (A) เทคนิค AS-PCR และ (B) เทคนิคเอสเอสซีพี (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน) (บั่วหลวง มก. (1), นัตรชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร (2), แหลมชมพู พระราชินี (3), แหลมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด) (4), แหลมชมพู พิจิตร (5), แหลมขาว พิจิตร (6), แหลมชมพู สามร้อย ยอด ประจวบคีรีขันธ์ (7*), แหลมขาว คลองโยง นครปฐม (8*), แหลมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (9), แหลมขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร (10), นัตรขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร (11), แหลมชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร (12), แหลมชมพู ลาดหลุมแก้ว (13), แหลมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด) (14), แหลมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด) (15), แหลมชมพู สระบุรี (16), นัตรชมพู สระบุรี (17), แหลมชมพู ปทุมธานี เกษตร (18), นัตรชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์ (19), นัตรขาว มก. (20), บั่วหลวง (21), แหลมขาว จตุจักร (เมล็ด) (22), นัตรชมพู จตุจักร (เมล็ด) (23), ใต้หวัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด) (24), ใต้หวัน- 2 White thousand petals (เมล็ด) (25), ใต้หวัน-4 Hunan white (เมล็ด) (26), ใต้หวัน-8 Hunan white (เมล็ด) (27), ใต้หวัน-5 (เมล็ด) (28), ใต้หวัน-7 (เมล็ด) (29), ใต้หวัน-9 (เมล็ด) (30), จีน ดอกสีแดง (เมล็ด) (31), จีน ดอกซ้อนแดง พันธุ์เหง้า (32), จีน Wuhan กวางเจา (เมล็ด) (33), ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง (34), จีน ดอกเล็ก (35), ใต้หวันดอก สีแดง (เมล็ด) (36), ใต้หวัน (เมล็ด) (37), ใต้หวัน Genetic resource (เมล็ด) (38), ใต้หวัน Genetic resource (เมล็ด) (39), ใต้หวัน (เมล็ด) (40))

* ตัวอย่างบั่วที่ใช้ผสมพันธุ์



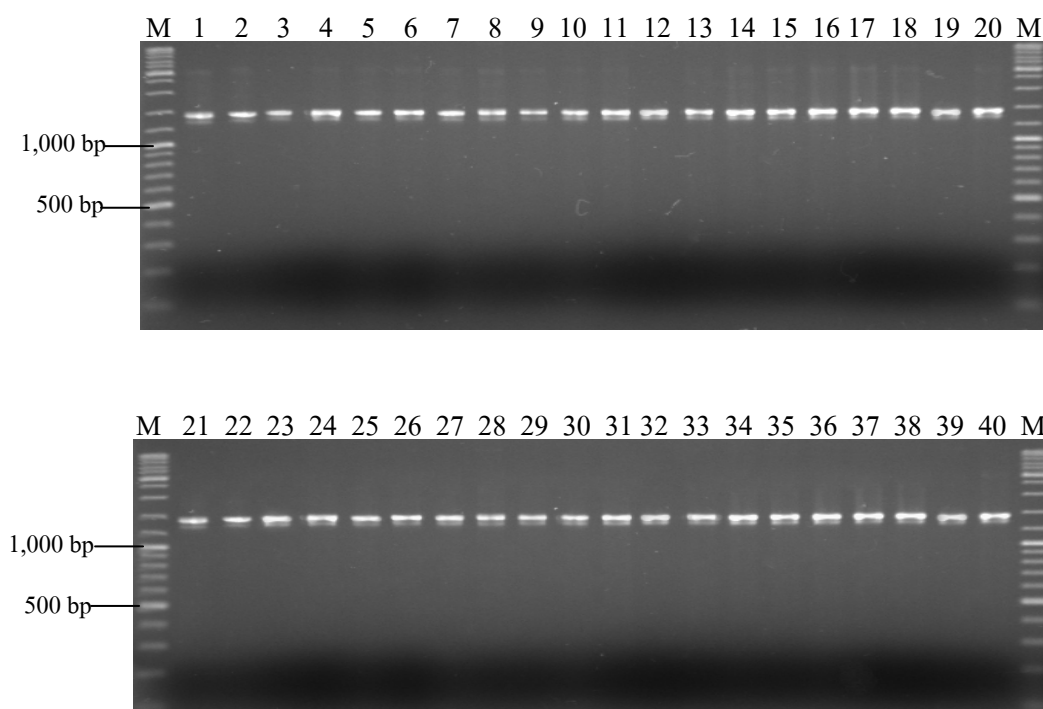
(A)



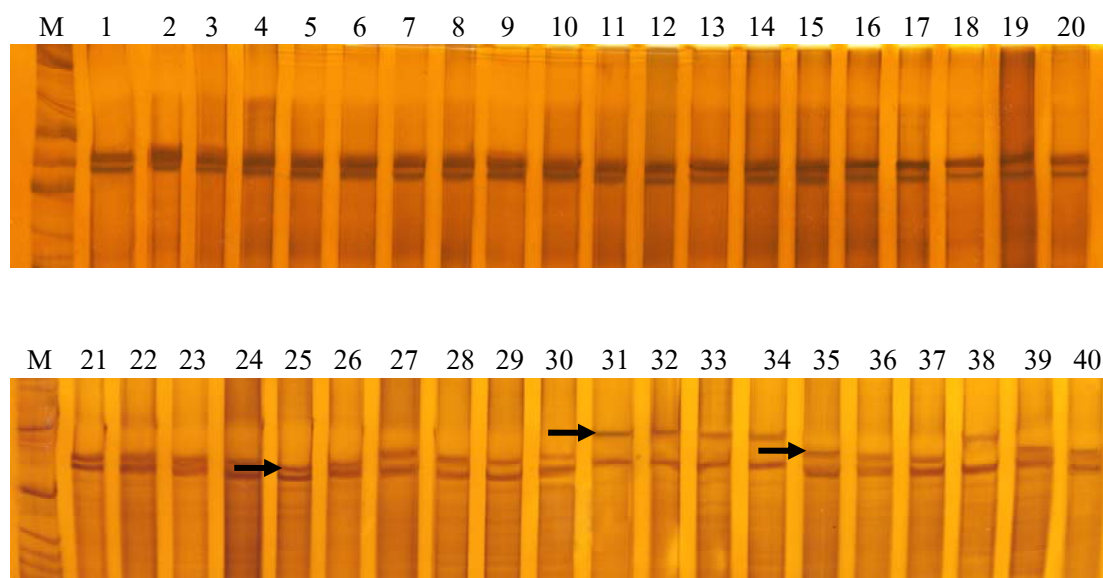
(B)

ภาพที่ 23 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ จากการวิเคราะห์บั่วหลวงตัวอย่างต่าง ๆ ทั้งจากในประเทศและต่างประเทศ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะสำหรับยีน *fruitfull protein* ด้วย (A) เทคนิค AS-PCR และ (B) เทคนิคเอสเอสซีพี (M = แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน) (บั่วหลวง มก. (1), นัตระชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร (2), แหยมชมพู พระราชินี (3), แหยมชมพู กรุงเทพฯ (เมล็ด) (4), แหยมชมพู พิจิตร (5), แหยมขาว พิจิตร (6), แหยมชมพู สามร้อยยอด ประจวบคีรีขันธ์ (7*), แหยมขาว คลองโยง นครปฐม (8*), แหยมขาว กำแพงแสน นครปฐม (เมล็ด) (9), แหยมขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร (10), นัตระขาว พิพิธภัณฑ์เกษตร (11), แหยมชมพู พิพิธภัณฑ์เกษตร (12), แหยมชมพู ถาดหลุมแก้ว (13), แหยมชมพู นครสวรรค์ (เมล็ด) (14), แหยมชมพู พุทธมณฑล นครปฐม (เมล็ด) (15), แหยมชมพู สระบุรี (16), นัตระชมพู สระบุรี (17), แหยมชมพู ปทุมธานี เกษตร (18), นัตระชมพู ปทุมธานี เกษตรแฟร์ (19), นัตระขาว มก. (20), บั่วหลวง (21), แหยมขาว จตุจักร (เมล็ด) (22), นัตระชมพู จตุจักร (เมล็ด) (23), ใต้หวัน-6 East Indian Lotus (เมล็ด) (24), ใต้หวัน- 2 White thousand petals (เมล็ด) (25), ใต้หวัน-4 Hunan white (เมล็ด) (26), ใต้หวัน-8 Hunan white (เมล็ด) (27), ใต้หวัน-5 (เมล็ด) (28), ใต้หวัน-7 (เมล็ด) (29), ใต้หวัน-9 (เมล็ด) (30), จีน ดอกสีแดง (เมล็ด) (31), จีน ดอกซ้อนแดง พันธุ์ เหง้า (32), จีน Wuhan กวางเจา (เมล็ด) (33), ญี่ปุ่น ดอกซ้อนแดง (34), จีน ดอกเล็ก (35), ใต้หวันดอก สีแดง (เมล็ด) (36), ใต้หวัน (เมล็ด) (37), ใต้หวัน Genetic resource (เมล็ด) (38), ใต้หวัน Genetic resource (เมล็ด) (39), ใต้หวัน (เมล็ด) (40))

* ตัวอย่างบั่วที่ใช้ผสมพันธุ์



(A)



(B)

การหาลำดับเบสของยีน *chalcone synthase* และ *storage protein* บางส่วนของบัวหลวงพระราชินี

นำผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *chalcone synthase* และ *storage protein* จากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PCR Purification kit (บริษัท Mo Bio Laboratories, Inc. America) แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ไพรเมอร์ CHS-F และ SP-F (ตารางที่ 17) ตามลำดับ ได้ลำดับเบสบางส่วนของยีน *chs* ขนาด 589 เบส (ภาพที่ 24) จากความยาวของผลผลิตพีซีอาร์ 636 เบส เมื่อนำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับ GenBank พบว่ามีความเหมือนกับ mRNA ของยีน *chs* ของบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* accession number gb AY749045 99.5 เปอร์เซ็นต์) โดยลำดับเบสของยีน *chs* ที่ได้เป็นส่วน coding sequence เพียงอย่างเดียว

```
AGAGACTCATGATGTACCAACAAGGATGCTTCGCCGAGGCACAGTCCTTCGCCTGGCCAAGGACCTTGCAGAGAA
CAACAGAGGGCGCCCGTGTCTTGTCTGCTCAGAGCTCACTGCTGTTACCTTCCGTGGCCCAAGTGATACTCAC
CTCGACAGTCTTGTAGGCCAGGCACCTCTCGGGGATGGAGCAGCCGAGTTATTGTGGGTGCAGACCCGGTGCCCG
GTGTAGAAAAGCCTTTTGTGAGTTGGTGTGCGCAGCCAGACAATTCTCCAGACAGCCATGGCGCCATTGACGG
GCACCTGAGAGAGGTTGGACTTACCTTCCACCTGCTCAAGGATGTGCCCGGGCTCATCTCAAAGAACATCGAGAAG
AGCCTGGTGGAGGCATTCCAGCCTCTGGGCATCTCCGACTGGAACCAATTTCTGGATCGCCACCCCTGGTGGTC
CAGCCATCCTAGACCAAGTGGAAGAAAAGCTGGCCCTTAAGCCCGAGAAGCTAAGCGCCACACGACACATCCTGAG
CGAGTATGGAAACATGTCAAGTGCTTGTGTGATGTTTCATATTGGATGAGATGCGGAA
```

ภาพที่ 24 ลำดับเบสบางส่วน (598 เบส) ของยีน *chalcone synthase (chs)* ของบัวหลวงพระราชินี

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *sp* ได้ลำดับเบสขนาด 817 เบส จากความยาวผลผลิตพีซีอาร์ประมาณ 1,100 เบส (ภาพที่ 25) เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับ mRNA ของยีน *sp* ของบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* accession number gb M83668.1) โดยลำดับเบสที่ได้เป็นส่วนของ exon ของยีน *sp* ซึ่งเหมือนกับ 102 เบส (12.5 เปอร์เซ็นต์) mRNA ของยีน *sp* ในฐานข้อมูล 100 เปอร์เซ็นต์ และเป็นส่วนของ intron 715 เบส (87.5 เปอร์เซ็นต์)

```
TCCGCTTCTTCATTTCAACTTATGATTCTTGTGCATACAATGTTTAGCAGCTCTGAGTGTTCACATGCTACCACTG
TCCATTTCTTCCATCATGCGCAAGTGTTGAGTAGAGAAGACGACCCAGAATTAATCATTCGTTAATTCGTTTCTTT
AATTGTTTGCATAAATTGTGACAGTTGTGTATTGATATTTGTTTTGTTAATTATTAGTGGGCAGGGTCGTTTTGTG
CGTCAGAAAAAGGTTGTGCTTCCCAAACACAGGAATGGTTTCGAGGAATTCAGTGTGCATGGCCTCTTTCCATG
CTCCAGTAGTGGGACCAGACTGATGAAGTGTGATCGAGGCAACTCTTTAGATCTGTGCGAGGTATGTATTTTCTTC
TTCTATCTTCTCATCAAGAGCTACGTCGTACAAACTTGTATTAAATTTCCCTGCTATATATATGATGATATCGA
TCGATATCGCTTTTTTCATGGTGTAGATAACAGGCCTGCTTCACACAATGCAACGCAAATGGCCGTGCTATTCATGT
CCAAGCAGCGACAGCACACCGTTCTGGGCTCACGAGTGGTCCAAGCATGGCACCTGCTCACTCTCTGTCTTCGATG
GTCAATACGATTACTTTAAAGCAGGTCTCGACTTGAAAGGACAAAGTGAATATCCTCCAGATCCTCAAAAAAGGAA
GGTAATATTATATTGTTGACGGCATGAAGATAAAATTCAGTTTTCTTAATTATCACTTATATATGTAGCATAATA
ATGATGCAGGGATTTAACCCCTATGGGCAGTACTACACTCGAGAAATCACACAATCC
```

ภาพที่ 25 ลำดับเบสบางส่วน (817 เบส) ของยีน *storage protein (sp)* ของบัวหลวงพระราชินี

การตรวจสอบสายพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสม ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nrITS

จากการหาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ในส่วนของไอทีเอสของยีน *rRNA* ของพ่อแม่ แหลมชมพู สามร้อยยอด (P7) แม่ แหลมขาว คลองโยง (P8) และลูก F1.1-1.4 รวม 6 ตัวอย่าง จำนวน 23 โคลน ตัวอย่างละ 4 โคลน ยกเว้นตัวอย่างที่ P8 มี 3 โคลน นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบ และจัดกลุ่มโดยโปรแกรม ClustalW version 1.8.2 ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอทีเอส 11 แบบ (ภาพที่ 26) ตัวอย่างละ 2 แบบ หรือ 2 แอลลีล (allele) ยกเว้นตัวอย่างที่ P8 ที่มีเพียง 1 แบบ หรือ 1 แอลลีล แสดงว่าทั้ง 5 ตัวอย่างอยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัส และตัวอย่างที่ P8 อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส ที่ตำแหน่งไอทีเอสนี้ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 11 แบบ มาสร้าง phylogenetic tree โดย Neighbour-Joining (ภาพที่ 27) สามารถแบ่งกลุ่มแอลลีลทั้ง 11 แบบ ได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแอลลีลจากพ่อแม่ P7 โคลนที่ 3 (P7-3) และลูก F1 ต้นที่ 1 โคลนที่ 2 (F1.1-2) ด้วยความเหมือนทางพันธุกรรมในกลุ่มคือ 0.998

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแอลลีลจากแม่ P8 โคลนที่ 2 (P8-2) และลูก F1.1-1, F1.3-2, F1.4-1 และ F1.2-4 ด้วยความเหมือนทางพันธุกรรมในกลุ่มคือ 1

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยแอลลีลจากพ่อแม่ P7-2 และลูก F1.2-2, F1.4-2, F1.3-3 และ F1.5-3 ด้วยความเหมือนทางพันธุกรรมในกลุ่มคือ 0.994-1

```

003NG7-3      TTAAATTCAGCGGGTGGCCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAAGGCAGGCTCCGTCAACAACG 60
009NG1.1-2    TTAAATTCAGCGGGTGGCCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAAGGCAGGCTCCGTCAACAACG 60
020NG1.4-1    TTAAATTCAGCGGGTGGCCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAAGGCAGGCTCCGTCAACAACG 60
017NG1.3-2    TTAAATTCAGCGGGTGGCCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAAGGCAGGCTCCGTCAACAACG 60
015NG1.2-4    TTAAATTCAGCGGGTGGCCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAAGGCAGGCTCCGTCAACAACG 60
008NG1.1-1    TTAAATTCAGCGGGTGGCCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAAGGCAGGCTCCGTCAACAACG 60
006NG8-2      TTAAATTCAGCGGGTGGCCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAAGGCAGGCTCCGTCAACAACG 60
002NG7-2      TTAAATTCAGCGGGTGGCCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAAGGCAGGCTCCGTCAACAACG 60
018NG1.3-3    TTAAATTCAGCGGGTGGCCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAAGGCAGGCTCCGTCAACAACG 60
021NG1.4-2    TTAAATTCAGCGGGTGGCCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAAGGCAGGCTCCGTCAACAACG 60
013NG1.2-2    TTAAATTCAGCGGGTGGCCCCGCCTGACCTGGGGTCGCAAGGCAGGCTCCGTCAACAACG 60
*****

003NG7-3      GATCCCTCATCGGGTCACACACTCGACACCCCAATGACAACACAACGTGCACGACGTCCA 120
009NG1.1-2    GATCCCTCATCGGGTCACACACTCGACACCCCAATGACAACACAACGTGCACGACGTCCA 120
020NG1.4-1    GATCCCTCATCGGGTCACACACTCGACACCCCAATGACAACACAACGTGCACGACGTCCA 120
017NG1.3-2    GATCCCTCATCGGGTCACACACTCGACACCCCAATGACAACACAACGTGCACGACGTCCA 120
015NG1.2-4    GATCCCTCATCGGGTCACACACTCGACACCCCAATGACAACACAACGTGCACGACGTCCA 120
008NG1.1-1    GATCCCTCATCGGGTCACACACTCGACACCCCAATGACAACACAACGTGCACGACGTCCA 120
006NG8-2      GATCCCTCATCGGGTCACACACTCGACACCCCAATGACAACACAACGTGCACGACGTCCA 120
002NG7-2      GATCCCTCATCGGGTCACACACTCGACACCCCAATGACAACACAACGTGCACGACGTCCA 120
018NG1.3-3    GATCCCTCATCGGGTCACACACTCGACACCCCAATGACAACACAACGTGCACGACGTCCA 120
021NG1.4-2    GATCCCTCATCGGGTCACACACTCGACACCCCAATGACAACACAACGTGCACGACGTCCA 120
013NG1.2-2    GATCCCTCATCGGGTCACACACTCGACACCCCAATGACAACACAACGTGCACGACGTCCA 120
*****

003NG7-3      GCATTCCACCACCTAAGATTGAACCACCAACCGTCGTGGCACTTTATTGTCTGGGGGCCAT 180
009NG1.1-2    GCATTCCACCACCTAAGATTGAACCACCAACCGTCGTGGCACTTTATTGTCTGGGGGCCAT 180
020NG1.4-1    GCATTCCACCACCTAAGATTGAACCACCAACCGTCGTGGCACTTTATTGTCTGGGGGCCAT 180
017NG1.3-2    GCATTCCACCACCTAAGATTGAACCACCAACCGTCGTGGCACTTTATTGTCTGGGGGCCAT 180
015NG1.2-4    GCATTCCACCACCTAAGATTGAACCACCAACCGTCGTGGCACTTTATTGTCTGGGGGCCAT 180
008NG1.1-1    GCATTCCACCACCTAAGATTGAACCACCAACCGTCGTGGCACTTTATTGTCTGGGGGCCAT 180
006NG8-2      GCATTCCACCACCTAAGATTGAACCACCAACCGTCGTGGCACTTTATTGTCTGGGGGCCAT 180
002NG7-2      GCATTCCACCACCTAAGATTGAACCACCAACCGTCGTGGCACTTTATTGTCTGGGGGCCAT 180
018NG1.3-3    GCATTCCACCACCTAAGATTGAACCACCAACCGTCGTGGCACTTTATTGTCTGGGGGCCAT 180
021NG1.4-2    GCATTCCACCACCTAAGATTGAACCACCAACCGTCGTGGCACTTTATTGTCTGGGGGCCAT 180
013NG1.2-2    GCATTCCACCACCTAAGATTGAACCACCAACCGTCGTGGCACTTTATTGTCTGGGGGCCAT 180
*****

003NG7-3      CATTTGGGCCAACCGCACCAAAACGGAACGAGAGGCCAACATCTGCACCAACTCTCCAAC 240
009NG1.1-2    CATTTGGGCCAACCGCACCAAAACGGAACGAGAGGCCAACATCTGCACCAACTCTCCAAC 240
020NG1.4-1    CATTTGGGCCAACCGCACCAAAACGGAACGAGAGGCCAACATCTGCACCAACTCTCCAAC 240
017NG1.3-2    CATTTGGGCCAACCGCACCAAAACGGAACGAGAGGCCAACATCTGCACCAACTCTCCAAC 240
015NG1.2-4    CATTTGGGCCAACCGCACCAAAACGGAACGAGAGGCCAACATCTGCACCAACTCTCCAAC 240
008NG1.1-1    CATTTGGGCCAACCGCACCAAAACGGAACGAGAGGCCAACATCTGCACCAACTCTCCAAC 240
006NG8-2      CATTTGGGCCAACCGCACCAAAACGGAACGAGAGGCCAACATCTGCACCAACTCTCCAAC 240
002NG7-2      CATTTGGGCCAACCGCACCAAAACGGAACGAGAGGCCAACATCTGCACCAACTCTCCAAC 240
018NG1.3-3    CATTTGGGCCAACCGCACCAAAACGGAACGAGAGGCCAACATCTGCACCAACTCTCCAAC 240
021NG1.4-2    CATTTGGGCCAACCGCACCAAAACGGAACGAGAGGCCAACATCTGCACCAACTCTCCAAC 240
013NG1.2-2    CATTTGGGCCAACCGCACCAAAACGGAACGAGAGGCCAACATCTGCACCAACTCTCCAAC 240
*****

003NG7-3      ACCAAATGGG-AAAGGGAGGGAAGGGCAACGATGCGTGACGCCCAGGCAGGCGTGCCCTT 299
009NG1.1-2    ACCAAATGGG-AAAGGGAGGGAAGGGCAACGATGCGTGACGCCCAGGCAGGCGTGCCCTT 299
020NG1.4-1    ACCAAATGGG-AAAGGGAGGGAAGGGCAACGATGCGTGACGCCCAGGCAGGCGTGCCCTT 299
017NG1.3-2    ACCAAATGGG-AAAGGGAGGGAAGGGCAACGATGCGTGACGCCCAGGCAGGCGTGCCCTT 299
015NG1.2-4    ACCAAATGGG-AAAGGGAGGGAAGGGCAACGATGCGTGACGCCCAGGCAGGCGTGCCCTT 299
008NG1.1-1    ACCAAATGGG-AAAGGGAGGGAAGGGCAACGATGCGTGACGCCCAGGCAGGCGTGCCCTT 299
006NG8-2      ACCAAATGGG-AAAGGGAGGGAAGGGCAACGATGCGTGACGCCCAGGCAGGCGTGCCCTT 299
002NG7-2      ACCTAACGGGGAAGGGAGGGAGGGGCAACGATGCGTGACGCCCAGGCAGGCGTGCCCTT 300
018NG1.3-3    ACCTAACGGGGAAGGGAGGGAGGGGCAACGATGCGTGACGCCCAGGCAGGCGTGCCCTT 300
021NG1.4-2    ACCTAATGGGGAAGGGAGGGAGGGGCAACGATGCGTGACGCCCAGGCAGGCGTGCCCTT 300
013NG1.2-2    ACCTAATGGGGAAGGGAGGGAGGGGCAACGATGCGTGACGCCCAGGCAGGCGTGCCCTT 300
*** **

```

ภาพที่ 26 Multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไอทีเอสทั้ง 11 แบบ

```

003NG7-3      GGCTCAAAGGCCTCGGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCA 359
009NG1.1-2    GGCTCAAAGGCCTCGGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCA 359
020NG1.4-1    GGCTCAAAGGCCTCGGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCA 359
017NG1.3-2    GGCTCAAAGGCCTCGGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCA 359
015NG1.2-4    GGCTCAAAGGCCTCGGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCA 359
008NG1.1-1    GGCTCAAAGGCCTCGGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCA 359
006NG8-2      GGCTCAAAGGCCTCGGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCA 359
002NG7-2      GGCCCAGGGGCCTTAGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCA 360
018NG1.3-3    GGCCCAGGGGCCTTAGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCA 360
021NG1.4-2    GGCCCAGGGGCCTTAGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCA 360
013NG1.2-2    GGCCCAGGGGCCTTAGGCGCAACTTGC GTTCAAAGACTCGATGGTTACGGGATTCTGCA 360
*** ** *****

003NG7-3      ATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCG 419
009NG1.1-2    ATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCG 419
020NG1.4-1    ATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCG 419
017NG1.3-2    ATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCG 419
015NG1.2-4    ATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCG 419
008NG1.1-1    ATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCG 419
006NG8-2      ATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCG 419
002NG7-2      ATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCG 420
018NG1.3-3    ATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCG 420
021NG1.4-2    ATTCACACCAAGTATCGCATTTTCGCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCG 420
013NG1.2-2    ATTCACACCAAGTATCGCATTTTCTACGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCGAGATATCCG 420
*****

003NG7-3      TTGCCGAGAGTCGTTTTTTGAATATAGAGGCAAACACCCAACAATGTTGGGATTATGCA 479
009NG1.1-2    TTGCCGAGAGTCGTTTTTTGAATATAGAGGCAAACACCCAACAATGTTGGGATTATGCA 479
020NG1.4-1    TTGCCGAGAGTCGTTTTTTGAATATAGAGGCAAACACCCAACAATGTTGGGATTATGCA 479
017NG1.3-2    TTGCCGAGAGTCGTTTTTTGAATATAGAGGCAAACACCCAACAATGTTGGGATTATGCA 479
015NG1.2-4    TTGCCGAGAGTCGTTTTTTGAATATAGAGGCAAACACCCAACAATGTTGGGATTATGCA 479
008NG1.1-1    TTGCCGAGAGTCGTTTTTTGAATATAGAGGCAAACACCCAACAATGTTGGGATTATGCA 479
006NG8-2      TTGCCGAGAGTCGTTTTTTGAATATAGAGGCAAACACCCAACAATGTTGGGATTATGCA 479
002NG7-2      TTGCCGAGAGTCGTTTTTTGAATATAGAGGCAAACACCCAACAATGTTGGGATTATGCA 479
018NG1.3-3    TTGCCGAGAGTCGTTTTTT-GAATACAGAGGCAAACACCCAACAATGTTGGGATTATGCA 479
021NG1.4-2    TTGCCGAGAGTCGTTTTTT-GAATACAGAGGCAAACACCCAACAATGTTGGGATTATGCA 479
013NG1.2-2    TTGCCGAGAGTCGTTTTTT-GAATACAGAGGCAAACACCCAACAATGTTGGGATTATGCA 479
*****

003NG7-3      CCCTTCCATGGAGATTCCTTGGCGCCATCCGCGCCCGGAGTTGGTTGTTAGCTAGGAGGC 539
009NG1.1-2    CCCTTCCATGGAGATTCCTTGGCGCCATCCGCGCCCGGAGTTGGTTGTTAGCTAGGAGGC 539
020NG1.4-1    CCCTTCCATGGAGATTCCTTGGCGCCATCCGCGCCCGGAGTTGGTTGTTAGCTAGGAGGC 539
017NG1.3-2    CCCTTCCATGGAGATTCCTTGGCGCCATCCGCGCCCGGAGTTGGTTGTTAGCTAGGAGGC 539
015NG1.2-4    CCCTTCCATGGAGATTCCTTGGCGCCATCCGCGCCCGGAGTTGGTTGTTAGCTAGGAGGC 539
008NG1.1-1    CCCTTCCATGGAGATTCCTTGGCGCCATCCGCGCCCGGAGTTGGTTGTTAGCTAGGAGGC 539
006NG8-2      CCCTTCCATGGAGATTCCTTGGCGCCATCCGCGCCCGGAGTTGGTTGTTAGCTAGGAGGC 539
002NG7-2      CCCTTCCATGGAGATTCCTTGGCGCCATCCGCGCCCGGAGTTGGTTGTTAGCTAGGAGGC 539
018NG1.3-3    CCCTTCCATGGAGATTCCTTGGCGCCATCCGCGCCCGGAGTTGGTTGTTAGCTAGGAGGC 539
021NG1.4-2    CCCTTCCATGGAGATTCCTTGGCGCCATCCGCGCCCGGAGTTGGTTGTTAGCTAGGAGGC 539
013NG1.2-2    CCCTTCCATGGAGATTCCTTGGCGCCATCCGCGCCCGGAGTTGGTTGTTAGCTAGGAGGC 539
*****

003NG7-3      CACGAGACAATGTGTGCGAGAGCAACCCCTAACAAAGCGAGAGGCGGCCATGGAGGTCAT-A 598
009NG1.1-2    CACGAGACAATGTGTGCGAGAGCAACCCCTAACAAAGCGAGAGGCGGCCATGGAGGTCAT-A 598
020NG1.4-1    CACGAGACAATGTGTGCGAGAGCAACCCCTAACAAAGCGAGAGGCGGCCATGGAGGTCAT-A 598
017NG1.3-2    CACGAGACAATGTGTGCGAGAGCAACCCCTAACAAAGCGAGAGGCGGCCATGGAGGTCAT-A 598
015NG1.2-4    CACGAGACAATGTGTGCGAGAGCAACCCCTAACAAAGCGAGAGGCGGCCATGGAGGTCAT-A 598
008NG1.1-1    CACGAGACAATGTGTGCGAGAGCAACCCCTAACAAAGCGAGAGGCGGCCATGGAGGTCAT-A 598
006NG8-2      CACGAGACAATGTGTGCGAGAGCAACCCCTAACAAAGCGAGAGGCGGCCATGGAGGTCAT-A 598
002NG7-2      CACGAGACTATGTGTCAAGCGCAACCCCTAACAAAGCGAGAGATGGCCATGGAGGTCATTA 599
018NG1.3-3    CACGAGACTATGTGTCAAGCGCAACCCCTAACAAAGCGAGAGATGGCCATGGAGGTCATTA 599
021NG1.4-2    CACGAGACTATGTGTCAAGCGCAACCCCTAACAAAGCGAGAGATGGCCATGGAGGTCATTA 599
013NG1.2-2    CACGAGACTATGTGTCAAGCGCAACCCCTAACAAAGCGAGAGATGGCCATGGAGGTCATTA 599
*****

```

```

003NG7-3      CCCCAGACCACCCCTCATGGGCCCTTGCGGGCATCACATGTTACAGGTCTTTCCGTGG 658
009NG1.1-2    CCCCAGACCACCCCTCATGGGCCCTTGCGGGCATCACATGTTACAGGTCTTTCCGTGG 658
020NG1.4-1    CCCCAGACCACCCCTCATGGGCCCTTGCGGGCATCACATGTTACAGGTCTTTCCGTGG 658
017NG1.3-2    CCCCAGACCACCCCTCATGGGCCCTTGCGGGCATCACATGTTACAGGTCTTTCCGTGG 658
015NG1.2-4    CCCCAGACCACCCCTCATGGGCCCTTGCGGGCATCACATGTTACAGGTCTTTCCGTGG 658
008NG1.1-1    CCCCAGACCACCCCTCATGGGCCCTTGCGGGCATCACATGTTACAGGTCTTTCCGTGG 658
006NG8-2      CCCCAGACCACCCCTCATGGGCCCTTGCGGGCATCACATGTTACAGGTCTTTCCGTGG 658
002NG7-2      CCCCAGGACCACCCCTCATGGGCCCTTGCGGGCATCACATGTTACAGGTCTTTCCGTGG 659
018NG1.3-3    CCCCAGGACCACCCCTCATGGGCCCTTGCGGGCATCACATGTTACAGGTCTTTCCGTGG 659
021NG1.4-2    CCCCAGGACCACCCCTCATGGGCCCTTGCGGGCATCACATGTTACAGGTCTTTCCGTGG 659
013NG1.2-2    CCCCAGGACCACCCCTCATGGGCCCTTGCGGGCATCACATGTTACAGGTCTTTCCGTGG 659
*****

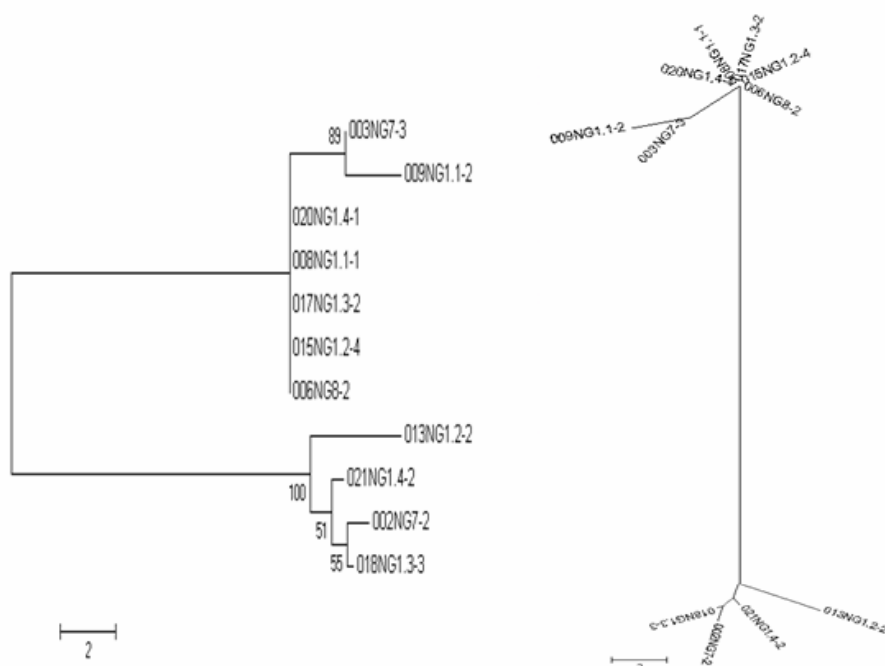
003NG7-3      GG-CAGGCATCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGACTTC 717
009NG1.1-2    GG-CAGGCATCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGACTTC 717
020NG1.4-1    GG-CAGGCATCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGACTTC 717
017NG1.3-2    GG-CAGGCATCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGACTTC 717
015NG1.2-4    GG-CAGGCATCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGACTTC 717
008NG1.1-1    GG-CAGGCATCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGACTTC 717
006NG8-2      GG-CAGGCATCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGACTTC 717
002NG7-2      GGGCAGGCATCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGACTTC 719
018NG1.3-3    GGGCAGGCATCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGACTTC 719
021NG1.4-2    GGGCAGGCATCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGACTTC 719
013NG1.2-2    GGGCAGGCATCGACAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAACCTTGTTACGACTTC 719
** *****

003NG7-3      TCCTTCCTCTAAATGATAAGGTTTCAGTGGACTTCTCGCGACGTCGCGAGCGGCGAACCGC 777
009NG1.1-2    TCCTTCCTCTAAATGATAAGGTTTCAGTGGACTTCTCGCGACGTCGCGAGCGGCGAACCGC 777
020NG1.4-1    TCCTTCCTCTAAATGATAAGGTTTCAGTGGACTTCTCGCGACGTCGCGAGCGGCGAACCGC 777
017NG1.3-2    TCCTTCCTCTAAATGATAAGGTTTCAGTGGACTTCTCGCGACGTCGCGAGCGGCGAACCGC 777
015NG1.2-4    TCCTTCCTCTAAATGATAAGGTTTCAGTGGACTTCTCGCGACGTCGCGAGCGGCGAACCGC 777
008NG1.1-1    TCCTTCCTCTAAATGATAAGGTTTCAGTGGACTTCTCGCGACGTCGCGAGCGGCGAACCGC 777
006NG8-2      TCCTTCCTCTAAATGATAAGGTTTCAGTGGACTTCTCGCGACGTCGCGAGCGGCGAACCGC 777
002NG7-2      TCCTTCCTCTAAATGATAAGGTTTCAGTGGACTTCTCGCGACGTCGCGAGCGGCGAACCGC 779
018NG1.3-3    TCCTTCCTCTAAATGATAAGGTTTCAGTGGACTTCTCGCGACGTCGCGAGCGGCGAACCGC 779
021NG1.4-2    TCCTTCCTCTAAATGATAAGGTTTCAGTGGACTTCTCGCGACGTCGCGAGCGGCGAACCGC 779
013NG1.2-2    TCCTTCCTCTAAATGATAAGGTTTCAGTGGACTTCTCGCGACGTCGCGAGCGGCGAACCGC 779
*****

003NG7-3      CCACGTCGCCGCGATCCGAACACTTCACCGGAC 810
009NG1.1-2    CCACGTCGCCGCGATCCGAACACTTCACCGGAC 810
020NG1.4-1    CCACGTCGCCGCGATCCGAACACTTCACCGGAC 810
017NG1.3-2    CCACGTCGCCGCGATCCGAACACTTCACCGGAC 810
015NG1.2-4    CCACGTCGCCGCGATCCGAACACTTCACCGGAC 810
008NG1.1-1    CCACGTCGCCGCGATCCGAACACTTCACCGGAC 810
006NG8-2      CCACGTCGCCGCGATCCGAACACTTCACCGGAC 810
002NG7-2      CCACGTCGCCGCGATCCGAACACTTCACCGGAC 812
018NG1.3-3    CCACGTCGCCGCGATCCGAACACTTCACCGGAC 812
021NG1.4-2    CCACGTCGCCGCGATCCGAACACTTCACCGGAC 812
013NG1.2-2    CCACGTCGCCGCGATCCGAACACTTCACCGGAC 812
*****

```

ภาพที่ 26 (ต่อ)



ภาพที่ 27 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ระหว่างแอลลีลของพ่อ แม่ และลูกผสม โดยอาศัย ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไอทีเอส

สรุปแอลลีลของพ่อ แม่ และลูก อาศัยค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) หรือความต่างทางพันธุกรรม (genetic dissimilarity) (ตารางภาคผนวกที่ 3) ได้ตั้งตารางที่ 19 โดยที่ ลูกผสมทั้ง 4 ตัวอย่าง (F1.1-1.4) เป็นลูกผสมของพ่อแม่คู่นี้จริง แม้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 810-812 เบส จะไม่เหมือนกันทั้งหมดทุกเบสในบางแบบ (ภาพที่ 26) เนื่องจากยีน *rRNA* เป็นกลุ่มยีนที่มีหลายซ้ำ และการหาลำดับเบสได้มาจากการโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณไอทีเอส จึงเป็นไปได้ว่าในแต่ละซ้ำอาจมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บางตำแหน่ง แต่อย่างไรก็ตามลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละแอลลีลของพ่อ แม่ และลูกผสม จัดได้ว่ามีความเหมือนกันมากในแต่ละกลุ่ม โดยเฉพาะในกลุ่มแอลลีลของพ่อ แม่ และลูกผสม F1.1-F1.4 ที่มีความเหมือนของแอลลีล 0.994-1 ปัจจุบันได้มีการตรวจสอบและระบุความเป็นลูกผสมของพืชหลายชนิดโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล และลำดับนิวคลีโอไทด์ Les *et al.* (2004) ได้ตรวจสอบลูกผสมของบัวสายระหว่าง *Nymphaea colorata* Peter และ *Nymphaea gigantea* Hook โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งไอทีเอส และ *trnK* ที่มีตำแหน่งในคลอโรพลาสต์ ซึ่งสามารถระบุความเป็นลูกผสมได้ดี

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบชนิดของแอลลีลตามรูปแบบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอทีเอส

ตัวอย่าง	แอลลีล (allele)	ตัวอย่าง	แอลลีล (allele)	ค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity)
พ่อ (P7)	7-2/7-3	ลูก F1.1	1-1/1-2	1-1 และ 8-2 = 1
				1-2 และ 7-3 = 0.998
แม่ (P8)	8-2/8-2	ลูก F1.2	2-2/2-4	2-2 และ 7-2 = 0.994
				2-4 และ 8-2 = 1
		ลูก F1.3	3-2/3-3	3-2 และ 8-2 = 1
				3-3 และ 7-2 = 0.999
		ลูก F1.4	4-1/4-2	4-1 และ 8-2 = 1
				4-2 และ 7-2 = 0.999

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. ในการผสมพันธุ์บัวหลวงแหลมชมพู (ปทุม) สามร้อยยอด (พ่อ) กับบัวหลวงแหลมขาว (ปทุมทริก) คลองโยง (แม่) ให้ฝักที่ติดเมล็ดสมบูรณ์ 100 เปอร์เซ็นต์ และได้ลูกผสมทั้งหมด 4 ต้น

2. การศึกษาความมีชีวิตของเรณู (pollen) โดยการย้อมด้วยอะซีโตคาร์มิน 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเรณูจะสูงในวันแรก ๆ และจะลดลงเป็นลำดับ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาเรณูได้ดีที่สุด

3. การสกัดดีเอ็นเอจากบัวหลวง ทำโดยใช้ CTAB ซึ่งดัดแปลงวิธีการมาจาก Molecular Biology Laboratory Protocols (2002) และควรสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อน จะได้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ดีกว่าใบแก่เนื่องจากใบแก่มีโพลีแซคคาไรด์มาก

4. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบัวหลวงใน 61 ตัวอย่างโดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดี จากไพรเมอร์ 7 คู่ ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 61 แถบ เฉลี่ย 8.86 แถบต่อชนิดไพรเมอร์ เป็น polymorphic band จำนวน 52 แถบ และ monomorphic band จำนวน 9 แถบ มีค่า PICs อยู่ในช่วง 0.000-0.4994 ค่า PIC เฉลี่ย เท่ากับ 0.2303 เมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpc-2.20k สามารถแบ่งตัวอย่างที่ศึกษาได้เป็น 4 กลุ่ม โดยบัวหลวงจากสาธารณรัฐประชาชนจีน ได้หัววัน และญี่ปุ่น จะกระจายอยู่เป็นกลุ่มเดียวกันกับบัวหลวงของไทย จึงไม่สามารถแยกบัวหลวงไทยและต่างประเทศได้ ซึ่งสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วยวิธี PCA

5. การตรวจสอบลูกผสมโดยเทคนิคอาร์เอฟดี จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-20 และ OPF-19 กับพ่อ แม่ และลูกผสมที่ได้ ปรากฏรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่น่าจะแสดงความเป็นลูกผสมที่แท้จริง

6. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในบัวหลวง 46 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค เอเอฟแอลพีจากไพรเมอร์ 10 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 483 แถบ เฉลี่ย 48.3 แถบต่อคู่ ไพรเมอร์ เป็น polymorphic markers จำนวน 117 แถบ และ monomorphic markers จำนวน 366 แถบ มีค่า

PICs อยู่ในช่วง 0.000-0.4915 ค่าเฉลี่ย PIC เท่ากับ 0.0459 เมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYSpc-2.20k สามารถจำแนกตัวอย่างบั่วออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ 6 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อย เป็นกลุ่มบั่วหลวงในประเทศไทย กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อยเช่นกัน กลุ่มย่อยแรกเป็นบั่วหลวงจากไต้หวัน กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วยบั่วหลวงลูกผสมจากประเทศไทยและบั่วหลวงจาก Wuhan ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน กลุ่มย่อยที่ 3 ประกอบด้วยกลุ่มบั่วหลวงจากต่างประเทศทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยวิธี PCA สามารถแบ่งบั่วได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบกับ phylogenetic tree กลุ่มที่ 1 จะประกอบด้วยกลุ่มบั่วหลวงในประเทศไทย กลุ่มย่อยที่ 1-3 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยบั่วหลวงจากต่างประเทศกลุ่มย่อยที่ 1 และ 3 กลุ่มที่ 3 ประกอบไปด้วยบั่วหลวงลูกผสมทั้งหมด และกลุ่มที่ 4 เป็นบั่วหลวงจาก Wuhan ประเทศจีนสาธารณรัฐประชาชนจีน

7. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบั่วหลวง 40 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิคเอสเอสซีพี ที่จำเพาะกับยีน *chalcone synthase*, *storage protein*, *fruitfull protein* และบริเวณไอทีเอส พบว่ารูปแบบแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่ที่ได้ไม่มีความแตกต่าง ยกเว้นแถบดีเอ็นเอที่ได้จากยีน *fruitfull protein*

8. การตรวจสอบลูกผสมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไอทีเอส ด้วยวิธีการโคลน ผลผลิตพีซีอาร์ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 23 โคลน (ตัวอย่างละประมาณ 4 โคลน) นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละตัวอย่าง ได้รูปแบบของลำดับนิวคลีโอไทด์ 11 แบบ ตัวอย่างละ 2 แบบ หรือ 2 แอลลีล (allele) ยกเว้นตัวอย่างที่ P8 ที่มีเพียง 1 แบบ หรือ 1 แอลลีล แสดงว่าทั้ง 5 ตัวอย่างอยู่ในสภาพเฮเทอโรไซกัส และตัวอย่างที่ P8 อยู่ในสภาพโฮโมไซกัส ที่ตำแหน่งไอทีเอสนี้ ลูกผสมทั้ง 4 ตัวอย่าง เป็นลูกผสมของพ่อแม่คู่นี้จริง โดยลูกได้แอลลีลหนึ่งมาจากพ่อ และแอลลีลหนึ่งมาจากแม่

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาความมีชีวิตของเรณู ควรมีการศึกษาประสิทธิภาพการงอกของเรณู ภายหลังการเก็บรักษา

2. การจัดจำแนกบัวหลวงในประเทศไทยและต่างประเทศ สามารถใช้เทคนิค เอเอฟแอลพี และนอกจากนี้สามารถใช้เทคนิคเอสเอสซีพีได้ในบางตัวอย่างของบัวหลวง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2550. บัวหลวง. การผลิตไม้ดอกไม้ประดับ. แหล่งที่มา: <http://www.doae.go.th/LIBRARY/html/detail/sacreslotus>, 30 เมษายน 2551.
- กลุ่มบัณฑิตศึกษาหลักสูตรการแพทย์แผนไทยรุ่นที่ 6. 2546. บัวพิชมหัตถกรรม. ฐานข้อมูลในประเทศไทย. แหล่งที่มา: www.kmitl.ac.th/agridata/Lotus/article/Lotus.pdf, 30 เมษายน 2551.
- กัญญา แซ่เตียว. 2542. การศึกษาแบบแผนของไอโซไซม์ของบัวหลวง (Study on isozyme patterns of lotus). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สถาบันเทคโนโลยีพระเจ้าเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- กุลสุดา ชมวิสูตรกุล. 2550. การใช้เทคนิค PCR-SSCP เพื่อตรวจสอบการกลายพันธุ์ของยีนคาร์เทปซินดีและยีนไวเทลอเจนิน ในบัว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กาญจนา กล้าแข็ง. 2544. การตรวจหาเครื่องหมายเชิงโมเลกุลที่บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคขอบใบแห้งของข้าวด้วยวิธีเอเอฟแอลพี (AFLP) ของพันธุ์ Near Isogenic Line. คุษณินพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- คุณา นนทพัฒน์. 2546. การปลูกบัวประดับพืชปลูกง่าย สร้างรายได้งาม. พิมพ์ครั้งที่ 1. คอมแพคพรีนท์จำกัด. บริษัทซีเอ็ดดูเคชั่นจำกัด (มหาชน), กรุงเทพฯ.
- จักรพันธ์ วนิชกุล. 2549. การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี และการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีบางชนิดในประเทศไทยโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งไอทีเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชุมนุมแพทย์แผนไทย และสมุนไพรแห่งชาติ ครั้งที่ 5. 2546. บัณฑิตหัตถ์จรรยา. แหล่งที่มา: http://www.anamai.moph.go.th/healthteeb/env/env_07.html, 9 พฤษภาคม 2548.

ดวงพร อังสุมาลี. 2543. การจำแนกแวนด้าฟ้ามูย แวนด้าแซนเดอเรียนา และแวนด้าลูกผสมโดย **RAPD**. ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันทนา แจ่มสุวรรณ. 2550. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลำดับเบสไอทีเอสของปอสาไทย, น.187-190. ใน การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 15. สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, มหาวิทยาลัยทักษิณ.

นันท์ บุณศิริ. 2540. บัวหลวง. ไม้ดอกไม้ประดับ. แหล่งที่มา: <http://www.search-this.com/lotus2/lotusindx/lotus.html>, 30 มกราคม 2548.

บรรจบ ชุณหสวัสดิกุล และ ลลิตา ชีระศิริ. 2551. คนไทยใช้ประโยชน์จากบัวได้ทุกส่วน. บัณฑิตวิทยาลัยบัณฑิต. แหล่งที่มา: www.balavi.com/content_th/nanasara/Con00128.asp, 5 มีนาคม 2548.

ปริมลาก และเสริมลาก วสุวัต. 2548. บัวประดับในประเทศไทย. บริษัทเนชั่นบุ๊คส์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, กรุงเทพฯ

ปิติชัย พรสรายุทธ. 2547. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะกอกโอลีฟ (*Olea europaea* L.) ที่ปลูกในประเทศไทยโดยใช้ AFLP markers. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ผ่องพรรณ จรัสจินดารัตน์. 2538. การงอกและการเจริญของละอองเรณูของข้าว *Oryza* หลังจากการผสมตัวเองและผสมข้ามชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฝ่ายประชาสัมพันธ์ สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน). 2550. บัวหลวงสีเหลือง. แหล่งที่มา: <http://www.tint.or.th/nkc/nkc5004/nkc5004j.html>, 30 เมษายน 2551.

พรรณไม้ไทย. 2545. บัว **Waterlily**. ไม้ประดับยอดนิยม. แหล่งที่มา: <http://www.panmai.com/WaterLily/WaterLily.html> 18, 24 เมษายน 2548.

พรรณนิษฐ์ วิชชาชู. 2546. สันทนาประสาธสิกร. **กลีกร**. 76 (3): 30-41.

เพชรวิทย์ เหมือนวงศ์ญาติ. 2548. บัว บัวหลวง. ไม้พุทธประวัติ. แหล่งที่มา: <http://www.rspg.thaigov.net/homklindokmai/budhabot/bua.htm>, 20 มีนาคม 2550.

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

เร็กซ์ดี กลิ่นพยอม. 2548. **กลีกลีบบัว**. แหล่งที่มา: <http://www.ku.ac.th/e-magazine/august44/agri/bua1.html>, 16 มกราคม 2548.

โรงเรียนราชินีบูรณะ. 2548. **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ**. ดีเอ็นเอ Fingerprinting. แหล่งที่มา: <http://www.rn.ac.th/ranee/genome.html>, 5 มิถุนายน 2548.

วาริน วรรณประไพ. 2545. **การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอตรวจสอบยางกราด ยางพลวง และยางที่คาดว่าเป็นลูกผสม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วารุณี โสมนัส. 2544. **การหาเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว โดยการวิเคราะห์แบบ bulked segregant**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วาสนา มิตรานนท์. 2527. **การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุลบัวหลวง (Nelumbo Adans.)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัชร บัญญัติ. 2543. **การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในบัวหลวงพันธุ์บุณฑริก แหยมแก้ว และพันธุ์ลูกผสม**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, ภาควิชาพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระเจ้าเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิสุทธิ ใบไม้. 2536. พันธุศาสตร์. เจ้าพระยาระบบการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ไวพจน์ กันจู. 2547. การวิเคราะห์กรดไขมันและการประเมินค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในข้าวโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะสำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริลักษณ์ ตรากิจชรกุล. 2543. การศึกษาจำนวนโครโมโซมของบัวหลวง. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, ภาควิชาพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระเจ้าเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สจี อิ่มแดง. 2547. การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้บ่งชี้ลักษณะเพศและความหลากหลายทางชีวภาพของปรังสุกุล *Cycas* และ *Zamia* โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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.

สุพัตรา คงสมมาตย์. 2549. การใช้เทคนิค RAPD และ AFLP ในการจัดจำแนกสายพันธุ์มันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

องค์การเกษตรกรรม. 2541. บัวหลวง. สมุนไพร. แหล่งที่มา: <http://www.gpo.or.th/herbal/group4/group041.html>, 25 พฤษภาคม 2548.

อมรา คัมภีรานนท์. 2542. พันธุศาสตร์มนุษย์. เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.

อรรณ ช้างพันธ์. 2542. การศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในบัวประดับ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, ภาควิชาพืชสวน สถาบันเทคโนโลยีพระเจ้าเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อัญญา รอดรังนก. 2549. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วหรั่ง (*Vigna subterranean* (L.) Verdc.) โดยใช้เทคนิค AFLP และลักษณะทางสัณฐานบางประการ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Alvarez, I. and J. F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. **Mol. Phylogenet. Evol.** 29: 417-434.

Anutalabhocchai, S., S. Sitthiphrom, W. Thongtaksin, M. Sanguansermisri and R.W. Cutler. 2007. Hybrid detection and characterization of *Curcuma spp.* using sequence characterized DNA markers. **Scientia Hort.** 111: 389-393.

Biotech. 2005. **Automated DNA Sequencing**. Bioservice unit, Available source; http://bsu.biotec.or.th/sequeneing_overview.php, March 3, 2008.

Caetano-Anolles, G. 1997. Resolving DNA amplification products using polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining, pp. 119-134. In R.M. Micheli and R. Bova, eds. **Fingerprinting methods methods base on PCR**. Springer-Verlag, Heidelberg

Devos, N., S. Oh, O. Raspe, A. Jacquemart and P. S. Manos. 2005. Nuclear ribosomal DNA sequence variation and evolution of spotted marsh-orchids (*Dactylorhiza maculate* group). **Molec. Phylogenet. Evol.** 36: 568-580.

DNA Technology Laboratory National of Genetic engineerig and biotechnology at Kasetsart University Kamphangsaeen. 2003. **DNA Fingerprinting Service (DFS)**. Available source: <http://DNA tec.kps.ku.ac.th>, May 23, 2005.

- Fernandez, M.E., Figueiras, A.M. and Bennito, C. 2002. The use of ISSR and RADP markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. **Theor. Appl. Genet.** 104: 845-851.
- Gibernau, M and D. Macquart. 2004. Pollen Viability and Longevity in Two Species of *Arum*. **AROIDEANA** 26: 58-62.
- 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. Teng, S. Zhong, M. Zhou, Z. Hu, Y. Song. 2007. Genetic variation and clonal diversity in populations of *N. nucifera* (Nelumbonaceae) in central China detected by ISSR marker. **Aquatic Botany** 86: 69-75.
- _____, 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. **Aquatic Botany** 87: 141-146
- Hongtrakul, V., M.B. Slabaugh, and S.J. Knapp. 1998. DFLP, SSCP, and SSR markers for Δ^9 -stearoyl-acyl carrier protein desaturases strongly expressed in developing seeds of sunflower: intron lengths are polymorphic among elite inbred lines. **Mol. Breeding** 4: 195-203.
- 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. **Chinese Science Bulletin** 51: 505-509

- Jianhua, X., Z. Lihuan, Z. Shiliang. 2006. Genetic diversity and geographic pattern of wild lotus (*Nelumbo nucifera*) in Heilongjiang Province. **Chinese Science Bulletin** 51: 421-432
- Les, D. H., M. L. Moody, and A. S. Doran. 2004. A genetically confirmed intersubgeneric hybrid in *Nymphaea* L. (Nymphaeaceae Salisb.). **HortScience** 39: 219-222.
- Lucchini, V. 2003. AFLP : a useful tool for biodiversity conservation and management. **C. R. Biologies** 326: 43-48.
- Mekanawakul, M., C.L.M. Thongtham, P. Chalermglin, P. Srifah and N. Juntawong. 2003. Diversity and genetics variation among population of Thai cycads revealed by AFLP marker. **Suranaree J. Sci. Technol.** 10(4): 317-328.
- Nelumbo nucifera* *Nelumbonaceae* *Gordon Daida*. Available source; <http://www.holoweb.com/cannon/sacred.htm>, May 25, 2005
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi and T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis us single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 86: 2766-2770.
- Pakniyat, H., W. Powell, E. Baird, L.L. Handley, D. Robinson, C.M. Scrimgeour, E. Nevo, C.A. Hackett, P.D.S. Caligari and B.P. Forster. 1997. AFLP variation in wild barley (*Hordeum spontaneum* KOCH, C.) with reference to salt tolerance and associated ecogeography. **Genome.** 40: 332-341.
- Peteducation. 2005. **Lotus Selection and Care**. Available source: www.peteducation.com/article, March 5, 2008.

- Podoplelova, Y. and G. Ryzhakov. 2005. Phylogenetic analysis of the order *Nymphaeales* base on the nucleotide sequences of the chloroplast ITS2-4 region. **Plant Science** 169: 606-611.
- Ro, H., S.S. Kim, J.S. Ryu, C.O. Jeon, T.S. Lee and H. Lee. 2007. Comparative studies on the diversity of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*: ITS sequence analysis, RAPD fingerprinting and physiological characteristics. **Mycological Research** 111: 710-715
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The Neighbor Joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4: 406-425.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Manistis. 1989. **Molecular Cloning : A Laboratory Manual**. 2d ed., Cold Spring Habor Laboratory Press, New York. 545 p.
- Sato, Y. and T. Nishio. 2002. Efficient detection of DNA polymorphism in cabbage and rice cultivars by PCR-RF-SSCR (PRS). **Plant Cell Rep.** 21: 276-281
- 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. **Journal of Heredity** 96: 542-549
- Slabaugh M.B., G.M. Huestis, J. Leonard, J.L. Holloway, C. Rosato, V. Hongtrakul, N. Martini, R. Toepfer, M. Voetz, J. Schell and S.J. Knapp. 1997. Sequence-based genetic markers for genes and gene families: single-strand conformational polymorphism for the fatty acid synthesis genes of *Cuphea*. **Theor. Appl. Genet.** 94: 400-408.
- Sneath. P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. **Numerical taxonomy**. Freeman. San Francisco, USA.

The International Potato Center (CIP). 1999. **Molecular Biology Laboratory Protocols.**

Available Source <http://www.cipotato.org/training/Materials/Molecular/Molecular.htm>, April, 2002.

Tsai, C.C., C.I. Peng, S.C. Huang, P.L. Huang and C.H. Chou. 2004. Determination of the genetic relationship of *Dendrobium* species (Orchidaceae) in Taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA. **Scientia Hort.** 101: 315-325.

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.

Willam, J.G.K., Kuberlik, A.R., Livak, K.I., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acid. R.** 18:6231-6235.

Xu, C. J., L. Bao, B. Zhang, Z. M. Bei, X. Y. Ye, S. L. Zhang and K. S. Chen. 2006. Parentage analysis of huyou (*Citrus changshanensis*) based on internal transcribed spacer sequences. **Plant Breeding** 125: 519-522.

Yamagishi, M., Abe, H., Nakano, M. and Nakatsuka, A. 2002. PCR-based molecular markers in Asiatic hybrid lily. **Sci. Hort.** 96: 225-234.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ค่า dissimilarity index คำนวณจากแถบดีเอ็นเอของบัวหลวง 61 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วย
เทคนิคอาร์เอฟดี โดยใช้โปรแกรม NTSYSp-2.20k

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	0.0000																							
2	0.1638	0.0000																						
3	0.1537	0.1573	0.0000																					
4	0.1210	0.2288	0.1495	0.0000																				
5	0.0949	0.2076	0.1573	0.0589	0.0000																			
6	0.1674	0.2425	0.1632	0.1007	0.1371	0.0000																		
7	0.1292	0.2688	0.2223	0.1270	0.1635	0.0819	0.0000																	
8	0.1029	0.2425	0.1632	0.0709	0.0726	0.1144	0.1109	0.0000																
9	0.1069	0.2147	0.1354	0.1354	0.1093	0.1491	0.2083	0.0866	0.0000															
10	0.0892	0.2288	0.1495	0.0572	0.0589	0.1007	0.1270	0.0137	0.0729	0.0000														
11	0.1976	0.1146	0.1432	0.1081	0.0843	0.1933	0.2196	0.1218	0.0940	0.1081	0.0000													
12	0.2380	0.2469	0.1924	0.1573	0.1335	0.2425	0.2688	0.2061	0.1783	0.1924	0.1584	0.0000												
13	0.1288	0.2076	0.1924	0.0906	0.0317	0.1371	0.1974	0.1043	0.1093	0.0906	0.1207	0.1699	0.0000											
14	0.1876	0.3058	0.2162	0.2162	0.2288	0.1960	0.2562	0.1632	0.1682	0.1495	0.2173	0.3891	0.2288	0.0000										
15	0.0790	0.1918	0.1076	0.0748	0.0826	0.1213	0.1476	0.0885	0.1274	0.0748	0.1048	0.2310	0.1177	0.2129	0.0000									
16	0.1530	0.1619	0.1438	0.1438	0.1619	0.1575	0.1839	0.1575	0.1675	0.1438	0.1535	0.2897	0.1619	0.3042	0.0691	0.0000								
17	0.2156	0.3456	0.2078	0.2819	0.2622	0.2579	0.2842	0.2579	0.2301	0.2442	0.2538	0.3901	0.2622	0.2819	0.2072	0.2607	0.0000							
18	0.2449	0.3889	0.2735	0.2735	0.2554	0.2872	0.3135	0.2872	0.3002	0.2735	0.2932	0.4377	0.2554	0.3143	0.1987	0.3040	0.0816	0.0000						
19	0.2450	0.4195	0.2736	0.2736	0.2524	0.2509	0.2773	0.2509	0.2595	0.2372	0.2833	0.4195	0.2524	0.2736	0.2366	0.3346	0.0602	0.0771	0.0000					
20	0.2086	0.3750	0.2372	0.2736	0.2524	0.2509	0.2773	0.2509	0.2595	0.2372	0.2833	0.4195	0.2524	0.2736	0.1988	0.2901	0.0294	0.0771	0.0290	0.0000				
21	0.2688	0.3255	0.1796	0.2565	0.2385	0.2310	0.2966	0.2702	0.2424	0.2565	0.2318	0.3720	0.2385	0.2974	0.1818	0.1961	0.0646	0.1262	0.1291	0.0940	0.0000			
22	0.3498	0.4473	0.3014	0.3391	0.3195	0.2436	0.3050	0.2787	0.2873	0.2650	0.3536	0.4473	0.3195	0.3014	0.3444	0.3623	0.1197	0.2102	0.1174	0.1174	0.1569	0.0000		
23	0.2498	0.3328	0.2094	0.2094	0.1844	0.1585	0.2494	0.1903	0.2292	0.1766	0.2836	0.3328	0.1844	0.2433	0.2036	0.2887	0.1013	0.1521	0.0701	0.0701	0.135	0.0979	0.0000	
24	0.3021	0.4053	0.2507	0.3733	0.3588	0.3036	0.3707	0.3444	0.3166	0.3307	0.3561	0.4541	0.3588	0.3307	0.2985	0.3692	0.0641	0.1218	0.0935	0.0935	0.1425	0.1552	0.1346	0.0000
25	0.2305	0.3606	0.2227	0.2591	0.2380	0.2013	0.2628	0.2364	0.2450	0.2227	0.2688	0.4050	0.2380	0.2227	0.2221	0.3201	0.0774	0.0965	0.0443	0.0751	0.1510	0.1347	0.0855	0.0790

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
26	0.3075	0.3606	0.2227	0.2968	0.2772	0.2364	0.3369	0.2364	0.2086	0.2227	0.2688	0.4050	0.2772	0.2227	0.2613	0.3201	0.1102	0.1679	0.0751	0.1069	0.1510	0.1029	0.0855	0.1129
27	0.2449	0.2980	0.1965	0.2735	0.2554	0.2102	0.3135	0.2480	0.2202	0.2343	0.2488	0.3889	0.2554	0.2735	0.1987	0.2575	0.0816	0.1054	0.1110	0.1110	0.1262	0.1739	0.1182	0.0854
28	0.2683	0.4050	0.2968	0.2227	0.2002	0.2013	0.2628	0.2013	0.2450	0.1876	0.2688	0.3606	0.2002	0.2968	0.2221	0.3201	0.1102	0.0965	0.0443	0.0751	0.1510	0.1347	0.0556	0.1480
29	0.2926	0.3456	0.2078	0.3211	0.3031	0.2579	0.3612	0.2956	0.2678	0.2819	0.2964	0.4366	0.3031	0.2442	0.2464	0.3051	0.0625	0.1530	0.1247	0.0919	0.0997	0.1197	0.1013	0.0980
30	0.2613	0.3588	0.2129	0.3307	0.3144	0.2266	0.2907	0.3036	0.2758	0.2899	0.3096	0.4541	0.3144	0.2507	0.2559	0.2739	0.0641	0.1595	0.1274	0.0935	0.1048	0.1213	0.1346	0.1018
31	0.3201	0.3851	0.3042	0.3952	0.3363	0.3623	0.4352	0.3623	0.2901	0.3486	0.3358	0.4904	0.3363	0.3486	0.3204	0.3514	0.1003	0.2130	0.1675	0.1298	0.1535	0.1953	0.1709	0.1869
32	0.2086	0.3325	0.2021	0.2736	0.2524	0.2509	0.3136	0.2509	0.2595	0.2372	0.2833	0.4195	0.2524	0.2372	0.2366	0.3346	0.0919	0.1461	0.1214	0.0896	0.1655	0.1819	0.1307	0.1274
33	0.2828	0.4195	0.3113	0.2736	0.2524	0.2873	0.3514	0.2509	0.2595	0.2372	0.2833	0.4195	0.2524	0.2736	0.2758	0.3811	0.1586	0.2202	0.1542	0.1542	0.2032	0.2509	0.1625	0.2366
34	0.2968	0.4336	0.3254	0.2513	0.2665	0.2650	0.3277	0.2650	0.2736	0.2513	0.2974	0.4336	0.2665	0.2877	0.2899	0.3952	0.1727	0.2343	0.1682	0.1682	0.2173	0.2650	0.1766	0.2507
35	0.3239	0.4606	0.3525	0.2783	0.2558	0.2920	0.3547	0.2570	0.3006	0.2433	0.3244	0.4162	0.2558	0.3147	0.3169	0.4222	0.1998	0.2613	0.1625	0.1625	0.2443	0.2231	0.1411	0.2777
36	0.2828	0.4195	0.3113	0.2736	0.2524	0.2873	0.3514	0.2509	0.2595	0.2372	0.2833	0.4195	0.2524	0.2736	0.2758	0.3811	0.1586	0.2202	0.1542	0.1542	0.2032	0.2509	0.1625	0.2366
37	0.3075	0.4515	0.3769	0.3361	0.2772	0.3105	0.3761	0.3105	0.2828	0.2968	0.3113	0.4515	0.2772	0.3361	0.3021	0.4154	0.1792	0.2449	0.1736	0.1736	0.2280	0.2728	0.1808	0.2613
38	0.3769	0.5289	0.4055	0.3254	0.3058	0.3014	0.3654	0.3014	0.3506	0.2877	0.3844	0.4801	0.3058	0.3646	0.3307	0.4439	0.2078	0.2343	0.1354	0.1682	0.2565	0.2299	0.1448	0.2507
39	0.3361	0.4801	0.3646	0.3254	0.3058	0.3391	0.4047	0.3014	0.3113	0.2877	0.3399	0.4801	0.3058	0.3254	0.3307	0.4439	0.2078	0.2343	0.1354	0.1682	0.2565	0.2650	0.1766	0.2507
40	0.3628	0.5148	0.3914	0.3113	0.2917	0.2873	0.3514	0.2873	0.3365	0.2736	0.3703	0.4660	0.2917	0.3506	0.3592	0.4299	0.2301	0.2594	0.1542	0.1881	0.2424	0.2158	0.1625	0.2758
41	0.3361	0.4801	0.3646	0.2877	0.2665	0.2650	0.3277	0.2650	0.3113	0.2513	0.3399	0.4336	0.2665	0.3254	0.2899	0.3952	0.1727	0.2343	0.1354	0.1354	0.2173	0.1960	0.1140	0.2507
42	0.3759	0.5367	0.4045	0.3211	0.3031	0.2579	0.3219	0.2956	0.3479	0.2819	0.3874	0.4854	0.3031	0.3620	0.3298	0.4004	0.2384	0.2708	0.1586	0.1937	0.2538	0.2215	0.1658	0.2872
43	0.3447	0.4541	0.3733	0.3307	0.3144	0.3036	0.3707	0.3036	0.3166	0.2899	0.3561	0.5054	0.3144	0.3307	0.2985	0.3692	0.2072	0.2395	0.1625	0.1988	0.2651	0.3036	0.2036	0.2559
44	0.3180	0.4700	0.3466	0.3058	0.2877	0.2802	0.3458	0.2802	0.2917	0.2665	0.3255	0.4700	0.2877	0.3058	0.2718	0.3851	0.1853	0.2146	0.1432	0.1783	0.2385	0.2802	0.1844	0.2310
45	0.4023	0.4208	0.3399	0.3844	0.3720	0.3981	0.4709	0.3981	0.3703	0.3844	0.3716	0.5261	0.3720	0.4309	0.3096	0.3358	0.1738	0.2062	0.2032	0.2032	0.1892	0.3111	0.2443	0.2226
46	0.4511	0.5833	0.4309	0.4797	0.4721	0.4446	0.5197	0.4446	0.4168	0.4309	0.4769	0.6439	0.4721	0.2974	0.4049	0.4984	0.2130	0.2488	0.2424	0.2424	0.2763	0.3536	0.2836	0.2651
47	0.3606	0.4700	0.3891	0.3466	0.2877	0.3603	0.4292	0.3603	0.3325	0.3466	0.3255	0.4700	0.2877	0.3058	0.3144	0.4363	0.2230	0.2146	0.2147	0.2147	0.2385	0.3195	0.2195	0.3144
48	0.3965	0.4715	0.4251	0.3763	0.3174	0.3900	0.4651	0.3900	0.3622	0.3763	0.3683	0.4175	0.3174	0.4764	0.3503	0.3866	0.3328	0.3852	0.4110	0.3622	0.3170	0.4388	0.3568	0.4016
49	0.3848	0.4032	0.3668	0.3668	0.3079	0.3361	0.4534	0.3805	0.3527	0.3668	0.3540	0.4032	0.3079	0.4621	0.3386	0.3696	0.3233	0.3710	0.3993	0.3527	0.3052	0.3805	0.3068	0.3386
50	0.2828	0.4195	0.3914	0.2736	0.2524	0.2509	0.2773	0.2509	0.2973	0.2372	0.3258	0.4195	0.2524	0.2736	0.2758	0.3346	0.2678	0.3002	0.2231	0.2231	0.2833	0.2873	0.1953	0.3592

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
51	0.3334	0.4854	0.4490	0.3211	0.3031	0.2956	0.3219	0.2956	0.3479	0.2819	0.3874	0.4854	0.3031	0.2442	0.3298	0.4004	0.3185	0.3578	0.2678	0.2678	0.3409	0.3348	0.2348	0.4207
52	0.3075	0.4515	0.3769	0.2227	0.2380	0.2013	0.2628	0.2364	0.2828	0.2227	0.3113	0.4050	0.2380	0.3361	0.2613	0.3201	0.2926	0.3283	0.2450	0.2450	0.3113	0.3105	0.2147	0.3891
53	0.3220	0.4195	0.3506	0.2372	0.2524	0.1819	0.2773	0.2509	0.2973	0.2372	0.3258	0.4195	0.2524	0.3113	0.2758	0.3346	0.3071	0.3428	0.2595	0.2595	0.3258	0.2873	0.1953	0.3592
54	0.3334	0.4366	0.3620	0.2442	0.2230	0.2579	0.3219	0.2579	0.3071	0.2442	0.2964	0.3901	0.2230	0.3620	0.2464	0.3051	0.2776	0.2708	0.2301	0.2301	0.2538	0.2956	0.1998	0.3742
55	0.3220	0.4660	0.3914	0.2736	0.2524	0.2509	0.3136	0.2509	0.2973	0.2372	0.3258	0.4195	0.2524	0.3506	0.2758	0.3346	0.2678	0.3002	0.2231	0.2231	0.2833	0.2873	0.1953	0.3592
56	0.3075	0.4515	0.3769	0.2591	0.2380	0.2364	0.2991	0.2364	0.2828	0.2227	0.3113	0.4050	0.2380	0.3361	0.2613	0.3201	0.2533	0.2857	0.2086	0.2086	0.2688	0.2728	0.1808	0.3447
57	0.2926	0.4366	0.3620	0.2442	0.2230	0.2215	0.2842	0.2215	0.2678	0.2078	0.2964	0.3901	0.2230	0.3211	0.2464	0.3051	0.2776	0.3134	0.2301	0.2301	0.2964	0.2956	0.1998	0.3742
58	0.2926	0.4366	0.3620	0.2442	0.2230	0.2215	0.2842	0.2215	0.2678	0.2078	0.2964	0.3901	0.2230	0.3211	0.2464	0.3051	0.2776	0.3134	0.2301	0.2301	0.2964	0.2956	0.1998	0.3742
59	0.3075	0.4515	0.3769	0.2591	0.2380	0.2364	0.2991	0.2364	0.2828	0.2227	0.3113	0.4050	0.2380	0.3361	0.2613	0.3201	0.2533	0.2857	0.2086	0.2086	0.2688	0.2728	0.1808	0.3447
60	0.2828	0.4195	0.3914	0.2736	0.2524	0.2509	0.2773	0.2509	0.2973	0.2372	0.3258	0.4195	0.2524	0.3113	0.2758	0.3346	0.2678	0.3002	0.2231	0.2231	0.2833	0.2873	0.1953	0.3592
61	0.3075	0.4515	0.3769	0.2591	0.2380	0.2364	0.2991	0.2364	0.2828	0.2227	0.3113	0.4050	0.2380	0.3361	0.2613	0.3201	0.2533	0.2857	0.2086	0.2086	0.2688	0.2728	0.1808	0.3447

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

No.	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
25	0.0000																							
26	0.0606	0.0000																						
27	0.0626	0.0626	0.0000																					
28	0.0924	0.0924	0.0965	0.0000																				
29	0.1102	0.1102	0.0816	0.1441	0.0000																			
30	0.0790	0.1129	0.0854	0.1843	0.0641	0.0000																		
31	0.1922	0.1922	0.1705	0.1922	0.1003	0.1460	0.0000																	
32	0.0751	0.1397	0.1110	0.1736	0.1247	0.0935	0.2067	0.0000																
33	0.1736	0.2086	0.2202	0.1736	0.1937	0.2366	0.2475	0.1881	0.0000															
34	0.1876	0.2227	0.2343	0.1876	0.2078	0.2507	0.2616	0.2021	0.0141	0.0000														
35	0.2147	0.2147	0.2613	0.1480	0.2348	0.2777	0.2887	0.2292	0.0411	0.0552	0.0000													
36	0.1736	0.2086	0.2202	0.1736	0.1937	0.2366	0.2475	0.1881	0.0000	0.0141	0.0411	0.0000												
37	0.1942	0.2305	0.2449	0.1942	0.2156	0.2613	0.2330	0.2450	0.0443	0.0584	0.0556	0.0443	0.0000											
38	0.1876	0.1876	0.2343	0.1210	0.2442	0.2899	0.3042	0.2736	0.0729	0.0870	0.0270	0.0729	0.0584	0.0000										
39	0.1876	0.1876	0.2343	0.1537	0.2442	0.2899	0.3042	0.2372	0.0431	0.0572	0.0270	0.0431	0.0584	0.0282	0.0000									
40	0.2086	0.2086	0.2594	0.1397	0.2678	0.2758	0.3346	0.2595	0.0588	0.0729	0.0411	0.0588	0.1069	0.0431	0.0431	0.0000								
41	0.1876	0.1876	0.2343	0.1210	0.2078	0.2507	0.2616	0.2372	0.0431	0.0572	0.0270	0.0431	0.0584	0.0282	0.0572	0.0431	0.0000							
42	0.1792	0.1792	0.2300	0.1441	0.2776	0.2464	0.3516	0.2678	0.0919	0.1060	0.0705	0.0919	0.1102	0.0435	0.0743	0.0294	0.0435	0.0000						
43	0.1480	0.1843	0.1987	0.1843	0.2464	0.2559	0.2739	0.2366	0.0607	0.0748	0.1018	0.0607	0.0790	0.0748	0.0748	0.0935	0.0748	0.0641	0.0000					
44	0.1288	0.1638	0.1754	0.1638	0.2230	0.2310	0.2897	0.2147	0.0448	0.0589	0.0859	0.0448	0.0621	0.0589	0.0589	0.0766	0.0589	0.0471	0.0159	0.0000				
45	0.2280	0.2280	0.2062	0.2280	0.2130	0.2651	0.2405	0.2833	0.0940	0.1081	0.1351	0.0940	0.1146	0.1081	0.1081	0.1291	0.1081	0.1361	0.0684	0.0843	0.0000			
46	0.2688	0.2688	0.2488	0.2688	0.2130	0.2651	0.2870	0.3258	0.1291	0.1432	0.1702	0.1291	0.1510	0.1432	0.1432	0.1655	0.1432	0.1738	0.1425	0.1207	0.1092	0.0000		
47	0.2380	0.2772	0.2980	0.2380	0.2622	0.3144	0.2897	0.2917	0.0766	0.0906	0.1177	0.0766	0.0621	0.1234	0.1234	0.1432	0.0906	0.1489	0.1177	0.0984	0.1207	0.1207	0.0000	
48	0.4478	0.4478	0.3852	0.3477	0.3328	0.4016	0.2812	0.4623	0.2712	0.2853	0.2698	0.2712	0.2567	0.2853	0.3298	0.3157	0.2428	0.3328	0.3015	0.3174	0.2217	0.3170	0.2709	0.0000
49	0.3848	0.3848	0.3222	0.3382	0.3233	0.3874	0.3183	0.3993	0.2657	0.2798	0.2660	0.2657	0.2512	0.2798	0.3224	0.3083	0.2390	0.3233	0.2921	0.3079	0.2143	0.3540	0.2635	0.0371
50	0.2828	0.2828	0.3002	0.1736	0.3071	0.3592	0.3346	0.3365	0.1542	0.1682	0.1307	0.1542	0.1736	0.1354	0.1682	0.1542	0.1037	0.1586	0.1625	0.1783	0.2032	0.2424	0.1783	0.1878

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

No.	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
51	0.3334	0.3334	0.3578	0.2156	0.3185	0.3742	0.3516	0.3904	0.1937	0.2078	0.1658	0.1937	0.2156	0.1727	0.2078	0.1937	0.1388	0.2007	0.2072	0.2230	0.2538	0.2130	0.2230	0.1992
52	0.2683	0.2683	0.2857	0.1942	0.3334	0.3447	0.3666	0.3220	0.1397	0.1210	0.1162	0.1397	0.1591	0.1210	0.1537	0.1397	0.0892	0.1102	0.1129	0.1288	0.1887	0.2688	0.2002	0.2142
53	0.2450	0.2450	0.2594	0.2086	0.3071	0.3166	0.3811	0.2973	0.1542	0.1354	0.1307	0.1542	0.1736	0.1354	0.1682	0.1542	0.1037	0.1247	0.1274	0.1432	0.2032	0.2833	0.2147	0.2287
54	0.2926	0.2926	0.3134	0.1792	0.3185	0.3742	0.3516	0.3479	0.1247	0.1388	0.1013	0.1247	0.1441	0.1060	0.1388	0.1247	0.0743	0.1292	0.1330	0.1489	0.1361	0.2538	0.1489	0.1584
55	0.2828	0.2828	0.3002	0.1736	0.3071	0.3592	0.3346	0.3365	0.1214	0.1354	0.1000	0.1214	0.1397	0.1037	0.1354	0.1214	0.0729	0.1247	0.1274	0.1432	0.1655	0.2424	0.1783	0.1486
56	0.2683	0.2683	0.2857	0.1591	0.2926	0.3447	0.3201	0.3220	0.1069	0.1210	0.0855	0.1069	0.1252	0.0892	0.1210	0.1069	0.0584	0.1102	0.1129	0.1288	0.1510	0.2280	0.1638	0.1734
57	0.2533	0.2533	0.2708	0.1792	0.3185	0.3298	0.3516	0.3071	0.1247	0.1388	0.1013	0.1247	0.1441	0.1060	0.1388	0.1247	0.0743	0.0953	0.0980	0.1138	0.1738	0.2538	0.1853	0.1992
58	0.2533	0.2533	0.2708	0.1792	0.3185	0.3298	0.3516	0.3071	0.1247	0.1388	0.1013	0.1247	0.1441	0.1060	0.1388	0.1247	0.0743	0.0953	0.0980	0.1138	0.1738	0.2538	0.1853	0.1992
59	0.2683	0.2683	0.2857	0.1591	0.2926	0.3447	0.3201	0.3220	0.1069	0.1210	0.0855	0.1069	0.1252	0.0892	0.1210	0.1069	0.0584	0.1102	0.1129	0.1288	0.1510	0.2280	0.1638	0.1734
60	0.2828	0.2828	0.3002	0.1736	0.3071	0.3592	0.3346	0.3365	0.1214	0.1354	0.1000	0.1214	0.1397	0.1037	0.1354	0.1214	0.0729	0.1247	0.1274	0.1432	0.1655	0.2424	0.1783	0.1878
61	0.2683	0.2683	0.2857	0.1591	0.2926	0.3447	0.3201	0.3220	0.1069	0.1210	0.0855	0.1069	0.1252	0.0892	0.1210	0.1069	0.0584	0.1102	0.1129	0.1288	0.1510	0.2280	0.1638	0.1734

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

No.	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
49	0.0000												
50	0.1857	0.0000											
51	0.2363	0.0294	0.0000										
52	0.2104	0.0751	0.1102	0.0000									
53	0.1857	0.0896	0.1247	0.0145	0.0000								
54	0.1563	0.0602	0.0953	0.0457	0.0602	0.0000							
55	0.1479	0.0588	0.0919	0.0443	0.0588	0.0294	0.0000						
56	0.1712	0.0443	0.0774	0.0299	0.0443	0.0149	0.0145	0.0000					
57	0.1955	0.0602	0.0953	0.0149	0.0294	0.0308	0.0294	0.0149	0.0000				
58	0.1955	0.0602	0.0953	0.0149	0.0294	0.0308	0.0294	0.0149	0.0000	0.0000			
59	0.1712	0.0443	0.0774	0.0299	0.0443	0.0149	0.0145	0.0000	0.0149	0.0149	0.0000		
60	0.1857	0.0290	0.0602	0.0443	0.0588	0.0294	0.0290	0.0145	0.0294	0.0294	0.0145	0.0000	
61	0.1712	0.0443	0.0774	0.0299	0.0443	0.0149	0.0145	0.0000	0.0149	0.0149	0.0000	0.0145	0.0000

ตารางผนวกที่ 2 ค่า dissimilarity index คำนวณจากแถบสีเอ็นเอของบัวหลวง 46 ตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ด้วย
เทคนิคเอฟแอลพี โดยใช้โปรแกรม NTSYSpC-2.20k

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	0.0000																							
2	0.0091	0.0000																						
3	0.0193	0.0170	0.0000																					
4	0.0218	0.0195	0.0251	0.0000																				
5	0.0253	0.0253	0.0356	0.0196	0.0000																			
6	0.0242	0.0195	0.0322	0.0162	0.0173	0.0000																		
7	0.0311	0.0241	0.0367	0.0348	0.0288	0.0254	0.0000																	
8	0.0250	0.0250	0.0169	0.0286	0.0297	0.0286	0.0308	0.0000																
9	0.0184	0.0161	0.0286	0.0243	0.0255	0.0221	0.0242	0.0251	0.0000															
10	0.0172	0.0126	0.0275	0.0232	0.0243	0.0186	0.0254	0.0286	0.0104	0.0000														
11	0.0148	0.0125	0.0228	0.0207	0.0265	0.0207	0.0229	0.0239	0.0080	0.0068	0.0000													
12	0.0171	0.0194	0.0251	0.0254	0.0312	0.0254	0.0229	0.0216	0.0103	0.0138	0.0068	0.0000												
13	0.0171	0.0171	0.0251	0.0161	0.0218	0.0161	0.0229	0.0285	0.0126	0.0161	0.0114	0.0160	0.0000											
14	0.0195	0.0195	0.0274	0.0231	0.0266	0.0185	0.0230	0.0262	0.0126	0.0138	0.0114	0.0137	0.0091	0.0000										
15	0.0183	0.0206	0.0262	0.0242	0.0277	0.0196	0.0195	0.0227	0.0138	0.0150	0.0126	0.0126	0.0103	0.0057	0.0000									
16	0.0338	0.0314	0.0323	0.0304	0.0388	0.0377	0.0398	0.0310	0.0293	0.0377	0.0326	0.0350	0.0326	0.0351	0.0362	0.0000								
17	0.0161	0.0230	0.0310	0.0197	0.0231	0.0127	0.0266	0.0298	0.0185	0.0174	0.0149	0.0172	0.0103	0.0126	0.0115	0.0389	0.0000							
18	0.0126	0.0195	0.0228	0.0231	0.0266	0.0278	0.0300	0.0216	0.0196	0.0231	0.0183	0.0160	0.0183	0.0230	0.0172	0.0327	0.0173	0.0000						
19	0.0230	0.0230	0.0286	0.0196	0.0231	0.0197	0.0265	0.0251	0.0161	0.0197	0.0195	0.0195	0.0103	0.0173	0.0138	0.0364	0.0208	0.0173	0.0000					
20	0.0253	0.0207	0.0309	0.0266	0.0208	0.0173	0.0172	0.0274	0.0208	0.0197	0.0195	0.0242	0.0172	0.0196	0.0184	0.0412	0.0185	0.0289	0.0254	0.0000				
21	0.0239	0.0239	0.0181	0.0321	0.0356	0.0345	0.0343	0.0169	0.0263	0.0298	0.0274	0.0297	0.0251	0.0274	0.0286	0.0229	0.0310	0.0251	0.0286	0.0309	0.0000			
22	0.0205	0.0182	0.0170	0.0264	0.0299	0.0288	0.0310	0.0204	0.0206	0.0241	0.0217	0.0240	0.0194	0.0217	0.0252	0.0242	0.0276	0.0217	0.0229	0.0299	0.0079	0.0000		
23	0.0206	0.0229	0.0309	0.0219	0.0184	0.0173	0.0265	0.0227	0.0208	0.0196	0.0195	0.0195	0.0195	0.0219	0.0160	0.0362	0.0161	0.0149	0.0184	0.0230	0.0286	0.0229	0.0000	
24	0.0184	0.0161	0.0263	0.0243	0.0255	0.0221	0.0219	0.0298	0.0185	0.0197	0.0172	0.0196	0.0149	0.0196	0.0184	0.0293	0.0185	0.0219	0.0208	0.0185	0.0240	0.0206	0.0208	0.0000
25	0.0170	0.0170	0.0249	0.0205	0.0240	0.0228	0.0205	0.0260	0.0171	0.0205	0.0159	0.0159	0.0136	0.0205	0.0170	0.0299	0.0217	0.0159	0.0147	0.0263	0.0226	0.0193	0.0193	0.0194

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
26	0.0171	0.0171	0.0274	0.0207	0.0218	0.0184	0.0206	0.0239	0.0149	0.0184	0.0137	0.0183	0.0114	0.0137	0.0126	0.0326	0.0126	0.0183	0.0218	0.0126	0.0251	0.0217	0.0149	0.0172
27	0.0148	0.0171	0.0227	0.0183	0.0241	0.0183	0.0252	0.0238	0.0149	0.0183	0.0137	0.0183	0.0045	0.0114	0.0102	0.0301	0.0126	0.0160	0.0103	0.0195	0.0204	0.0194	0.0194	0.0126
28	0.0102	0.0125	0.0181	0.0183	0.0264	0.0230	0.0252	0.0215	0.0149	0.0183	0.0137	0.0183	0.0114	0.0160	0.0148	0.0231	0.0172	0.0137	0.0172	0.0218	0.0158	0.0125	0.0194	0.0149
29	0.0113	0.0113	0.0192	0.0148	0.0205	0.0171	0.0239	0.0226	0.0136	0.0171	0.0125	0.0170	0.0079	0.0148	0.0136	0.0288	0.0136	0.0125	0.0136	0.0182	0.0192	0.0159	0.0136	0.0113
30	0.0148	0.0148	0.0181	0.0183	0.0240	0.0206	0.0251	0.0238	0.0171	0.0183	0.0136	0.0182	0.0068	0.0136	0.0102	0.0324	0.0148	0.0136	0.0102	0.0217	0.0227	0.0193	0.0171	0.0148
31	0.0300	0.0276	0.0333	0.0337	0.0372	0.0290	0.0359	0.0320	0.0255	0.0267	0.0242	0.0265	0.0265	0.0242	0.0277	0.0436	0.0278	0.0336	0.0325	0.0278	0.0309	0.0299	0.0324	0.0326
32	0.0217	0.0217	0.0273	0.0276	0.0288	0.0253	0.0275	0.0261	0.0195	0.0230	0.0183	0.0206	0.0183	0.0183	0.0194	0.0373	0.0195	0.0229	0.0264	0.0218	0.0273	0.0240	0.0217	0.0241
33	0.0229	0.0229	0.0285	0.0312	0.0323	0.0289	0.0287	0.0319	0.0230	0.0265	0.0218	0.0241	0.0218	0.0241	0.0206	0.0409	0.0254	0.0241	0.0276	0.0253	0.0308	0.0275	0.0229	0.0254
34	0.0323	0.0323	0.0286	0.0407	0.0466	0.0408	0.0405	0.0320	0.0325	0.0337	0.0265	0.0311	0.0311	0.0312	0.0277	0.0458	0.0325	0.0335	0.0371	0.0348	0.0355	0.0345	0.0347	0.0372
35	0.0319	0.0295	0.0283	0.0378	0.0389	0.0379	0.0307	0.0248	0.0320	0.0332	0.0261	0.0261	0.0307	0.0308	0.0273	0.0427	0.0343	0.0308	0.0343	0.0296	0.0283	0.0318	0.0296	0.0343
36	0.0333	0.0333	0.0296	0.0394	0.0405	0.0418	0.0416	0.0284	0.0335	0.0324	0.0299	0.0369	0.0345	0.0346	0.0357	0.0444	0.0382	0.0369	0.0382	0.0335	0.0273	0.0309	0.0381	0.0406
37	0.0252	0.0252	0.0262	0.0288	0.0323	0.0265	0.0357	0.0319	0.0277	0.0242	0.0241	0.0264	0.0264	0.0218	0.0253	0.0433	0.0277	0.0311	0.0323	0.0276	0.0308	0.0298	0.0276	0.0300
38	0.0347	0.0323	0.0333	0.0432	0.0443	0.0409	0.0406	0.0344	0.0349	0.0338	0.0312	0.0335	0.0359	0.0360	0.0324	0.0532	0.0373	0.0360	0.0372	0.0372	0.0403	0.0393	0.0348	0.0397
39	0.0311	0.0288	0.0297	0.0372	0.0407	0.0421	0.0394	0.0309	0.0290	0.0302	0.0253	0.0276	0.0323	0.0301	0.0312	0.0495	0.0361	0.0324	0.0360	0.0360	0.0344	0.0334	0.0335	0.0361
40	0.0251	0.0251	0.0261	0.0288	0.0346	0.0288	0.0286	0.0250	0.0229	0.0265	0.0194	0.0217	0.0217	0.0171	0.0206	0.0384	0.0229	0.0287	0.0299	0.0261	0.0229	0.0274	0.0275	0.0253
41	0.0253	0.0229	0.0286	0.0266	0.0301	0.0266	0.0265	0.0320	0.0208	0.0243	0.0172	0.0218	0.0172	0.0172	0.0207	0.0410	0.0231	0.0289	0.0254	0.0230	0.0332	0.0275	0.0300	0.0231
42	0.0358	0.0382	0.0414	0.0443	0.0503	0.0468	0.0465	0.0402	0.0408	0.0444	0.0370	0.0418	0.0394	0.0371	0.0383	0.0447	0.0408	0.0419	0.0455	0.0431	0.0414	0.0428	0.0430	0.0432
43	0.0370	0.0346	0.0332	0.0383	0.0371	0.0384	0.0405	0.0390	0.0372	0.0361	0.0335	0.0382	0.0335	0.0335	0.0347	0.0531	0.0372	0.0383	0.0395	0.0277	0.0402	0.0416	0.0418	0.0372
44	0.0261	0.0261	0.0249	0.0274	0.0332	0.0344	0.0366	0.0260	0.0285	0.0297	0.0250	0.0273	0.0273	0.0273	0.0285	0.0440	0.0309	0.0297	0.0332	0.0262	0.0294	0.0307	0.0331	0.0309
45	0.0287	0.0263	0.0320	0.0323	0.0358	0.0324	0.0299	0.0354	0.0265	0.0300	0.0252	0.0299	0.0229	0.0252	0.0264	0.0468	0.0288	0.0323	0.0311	0.0241	0.0343	0.0332	0.0357	0.0288
46	0.0298	0.0275	0.0285	0.0358	0.0393	0.0382	0.0357	0.0389	0.0323	0.0335	0.0286	0.0357	0.0286	0.0310	0.0298	0.0504	0.0323	0.0334	0.0369	0.0276	0.0377	0.0367	0.0369	0.0323

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

No.	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
25	0.0000																					
26	0.0205	0.0000																				
27	0.0136	0.0137	0.0000																			
28	0.0113	0.0137	0.0091	0.0000																		
29	0.0101	0.0102	0.0056	0.0056	0.0000																	
30	0.0135	0.0136	0.0045	0.0090	0.0056	0.0000																
31	0.0309	0.0242	0.0288	0.0264	0.0228	0.0287	0.0000															
32	0.0227	0.0137	0.0182	0.0182	0.0124	0.0182	0.0172	0.0000														
33	0.0239	0.0194	0.0217	0.0194	0.0159	0.0216	0.0230	0.0194	0.0000													
34	0.0355	0.0288	0.0310	0.0264	0.0274	0.0286	0.0301	0.0264	0.0229	0.0000												
35	0.0283	0.0261	0.0284	0.0238	0.0249	0.0260	0.0227	0.0215	0.0181	0.0227	0.0000											
36	0.0366	0.0322	0.0321	0.0251	0.0308	0.0320	0.0288	0.0298	0.0287	0.0194	0.0169	0.0000										
37	0.0308	0.0241	0.0240	0.0240	0.0205	0.0263	0.0253	0.0194	0.0183	0.0253	0.0203	0.0217	0.0000									
38	0.0356	0.0312	0.0358	0.0311	0.0298	0.0310	0.0301	0.0288	0.0253	0.0230	0.0204	0.0218	0.0230	0.0000								
39	0.0297	0.0300	0.0323	0.0252	0.0263	0.0298	0.0289	0.0276	0.0288	0.0242	0.0238	0.0206	0.0264	0.0173	0.0000							
40	0.0261	0.0171	0.0194	0.0194	0.0181	0.0216	0.0229	0.0217	0.0182	0.0229	0.0180	0.0240	0.0159	0.0276	0.0241	0.0000						
41	0.0239	0.0172	0.0194	0.0217	0.0182	0.0217	0.0230	0.0171	0.0183	0.0277	0.0227	0.0264	0.0183	0.0254	0.0289	0.0206	0.0000					
42	0.0391	0.0370	0.0346	0.0323	0.0333	0.0368	0.0384	0.0369	0.0335	0.0335	0.0331	0.0346	0.0335	0.0360	0.0348	0.0241	0.0359	0.0000				
43	0.0402	0.0311	0.0334	0.0357	0.0321	0.0333	0.0324	0.0287	0.0323	0.0418	0.0296	0.0357	0.0299	0.0395	0.0406	0.0369	0.0253	0.0526	0.0000			
44	0.0317	0.0227	0.0273	0.0250	0.0215	0.0272	0.0193	0.0181	0.0261	0.0308	0.0214	0.0273	0.0215	0.0308	0.0297	0.0261	0.0170	0.0390	0.0170	0.0000		
45	0.0296	0.0229	0.0251	0.0275	0.0239	0.0274	0.0288	0.0251	0.0263	0.0381	0.0307	0.0368	0.0333	0.0382	0.0393	0.0309	0.0171	0.0464	0.0171	0.0158	0.0000	
46	0.0354	0.0240	0.0286	0.0286	0.0250	0.0262	0.0299	0.0240	0.0275	0.0322	0.0295	0.0332	0.0298	0.0346	0.0334	0.0297	0.0183	0.0452	0.0206	0.0146	0.0102	0.0000

ตารางผนวกที่ 3 ค่า genetic dissimilarity ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไอทีเอสทั้ง 11 แบบ ใน พ่อ
แม่ และลูกผสม

No.	7-3	1.1-2	1.4-1	1.3-2	1.2-4	1.1-1	8-2	7-2	1.3-3	1.4-2	1.2-2
7-3											
1.1-2	0.002										
1.4-1	0.002	0.005									
1.3-2	0.002	0.005	0.000								
1.2-4	0.002	0.005	0.000	0.000							
1.1-1	0.002	0.005	0.000	0.000	0.000						
8-2	0.002	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000					
7-2	0.032	0.034	0.029	0.029	0.029	0.029	0.029				
1.3-3	0.030	0.033	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.001			
1.4-2	0.030	0.033	0.028	0.028	0.028	0.028	0.028	0.001	0.002		
1.2-2	0.033	0.036	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.006	0.007	0.005	

สูตรอาหาร และสารเคมีสำหรับการโคลน

LB (Luria-Bertani Medium) สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli*

Bacto-tryptone	2.50	กรัม
Bacto yeast extract	1.25	กรัม
NaCl	2.50	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	250	มิลลิลิตร แล้ว autoclave

LA (Luria-Agar Medium) สำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli*

Bacto-tryptone	2.50	กรัม
Bacto yeast extract	1.25	กรัม
NaCl	2.50	กรัม
Agar (วุ้นผงบริสุทธิ์)	3.75	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	250	มิลลิลิตร แล้ว autoclave

5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ละลาย X-gal 20 มิลลิกรัม ใน dimethylformamide

ปรับปริมาตรให้ได้ 1 มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ไม่ควรเก็บนานเกิน 1 เดือน)

isopropyl- β -D thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ละลายให้มีความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ หรือ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

แอมพิซิลลิน

ละลายแอมพิซิลลิน 0.1 กรัม ในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

เก็บไว้เป็น stock ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

LB+แอมพิซิลลิน+X-gal+ IPTG agar plate

- หลอมอาหาร LB ที่ปราศจากเชื้อ
- เติมแอมพิซิลลินจาก stock ที่เข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ลงในอัตราส่วน

แอมพิซิลลิน 1 ไมโครลิตร ต่ออาหาร 2 มิลลิลิตร

- เทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อ จานละประมาณ 15- 20 มิลลิลิตร
- เมื่ออาหารแข็งแล้วเติมสารดังนี้

2% X-gal	40	ไมโครลิตร
2% IPTG	4	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้ว	6	ไมโครลิตร

สีย้อมสำหรับศึกษาความมีชีวิตของเรณู (pollen viability)

อะซีโตคาร์มินความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ต้มส่วนผสมของกรดอะซิดิกเข้มข้น 45 มิลลิตรกับน้ำกลั่น 55 มิลลิลิตร จนกระทั่งเดือด ค่อย ๆ เติมคาร์มิน 0.5 กรัมลงไป เขย่าให้เข้ากัน แล้วกรองใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็น

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวกนกวรรณ แดงสวัสดิ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	11 พฤษภาคม พ.ศ. 2524
สถานที่เกิด	จังหวัดนครราชสีมา
ประวัติการศึกษา	วท.บ. เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยรามคำแหง (พ.ศ. 2546)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานทางวิชาการ	- นำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์ แห่งชาติ ครั้งที่ 15 วันที่ 23-25 พ.ค.2550 เรื่องการผสม พันธุ์บัวหลวงเพื่อการปรับปรุงพันธุ์และการศึกษาลาย พิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อการตรวจสอบพันธุ์ - นำเสนอผลงานในการประชุม IWGS Annual Symposium 2007 วันที่ 19 ก.ค. 2550 เรื่องการศึกษาความ หลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงโดยใช้เทคนิค เอแอฟแอลพี - นำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 วันที่ 1 ก.พ. 2551 เรื่องการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ของบัวหลวงโดยใช้เทคนิคอาร์เอฟดีและเอแอฟแอลพี ทุนการศึกษาที่ได้รับ
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนอุดหนุนวิจัยจาก สำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย โครงการทุนวิจัยมหัณฐิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีปี 2549 ทุนอุดหนุนวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก. ปี 2547-48