อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2558C210

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ เรื่อง การพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR เพื่อใช้ในการตรวจสอบบัวสายสกุลย่อย *Lotos*

Development of RAPD-SCAR Markers for Waterlily in Subgenus *Lotos* Detection

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 1 มี.ค. 2562
เลขทะเบียน 1023008
เลขเรียกหนังสือ QK 495 .L52 ม214ร 2559

สนับสนุนโดย
งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ 2559

Executive Summary

พืชในสกุลบัวสาย (*Nymphaea*) จัดอยู่ในกลุ่มของ Basal angiosperm หรือที่เรียกว่า Paleoherb เนื่องจากพืชในกลุ่มนี้เมื่อจัดลำดับสายวิวัฒนาการ จัดได้ว่าอยู่ล่างสุดหรือวิวัฒนาการมาก่อนพืชมีดอกชนิดอื่นๆ พืชในสกุลนี้แบ่งออกเป็น 5 สกุลย่อยที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่มีความแตกต่างกัน ไม่ว่าจะเป็นลักษณะใบ ขอบใบ กลีบดอก เกสรเพศผู้ รังไข่ และเขตการกระจายพันธุ์ โดย 5 สกุลย่อยมีดังนี้ สกุลย่อย *Anecphya* หรือบัวออสเตรเลีย สกุลย่อย *Nymphaea* หรือบัวฝรั่ง สกุลย่อย *Hydrocallis* สกุลย่อย *Brachyceras* หรือบัวผัน บัวเผื่อน และ *Lotos* หรือบัวกินสาย ถึงแม้ลักษณะในแต่ละสกุลย่อยแตกต่างกันชัดเจน แต่บัวสายแต่ละชนิดในสกุลย่อยนั้นมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก ทำให้จัดจำแนกยากมากในระดับชนิด นอกจากนี้บัวในสกุลนี้ยังมีความสามารถในการผสมข้ามชนิดระหว่างสกุลย่อยด้วย ทำให้ในปัจจุบันพบบัวสายลูกผสมที่มีลักษณะสวยงาม คงทนต่างๆ มากมาย ซึ่งลักษณะของบัวสายลูกผสมนั้นดูจากลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียวนั้นทำได้ยากมากในการระบุพ่อแม่พันธุ์

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR (sequence characterizied amplified region) จากอาร์เอพีดี เพื่อการระบุชนิดของบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* ควบคู่ไปกับการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้ในอีก 2 สกุลย่อยคือ *Anecphya* และ *Nymphaea* ที่ซึ่งมีการผลิตลูกผสมระหว่างชนิดและสกุลย่อยเป็นจำนวนมาก โดยแต่ละสกุลย่อยแยกการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี การโคลนและการตรวจสอบ รวมไปถึงการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR สำหรับพืชแต่ละชนิดด้วย

ผลการศึกษาพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีและมีแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะในแต่ละชนิด แต่เมื่อนำไปโคลนและหาลำดับดีเอ็นเอ เพื่อสังเคราะห์ไพรเมอร์ SCAR พบว่าในสกุลย่อย *Anecphya* สามารถพัฒนาได้ 2 เครื่องหมายสำหรับ *N. atrans* กับ *N. immutabillis* และ *N. gigantea* var. *neorosea* สำหรับสกุลย่อย *Nymphaea* นั้นสามารถพัฒนาได้ 1 เครื่องหมายสำหรับบัวสายลูกผสมพันธุ์ *Nymphaea* ‘Sunrise’ ขณะที่สกุลย่อย *Lotos* ไม่สามารถพัฒนาเครื่องหมายที่เฉพาะชนิดได้ แต่สามารถพัฒนาเครื่องหมายเฉพาะบัวสายสกุล *Nymphaea* เท่านั้น ดังนั้นจะเห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR สามารถใช้ระบุชนิดหรือกลุ่มได้

Title	Development of RAPD-SCAR markers for waterlily identification
Author	Maliwan Nakkuntod

Abstract

RAPD-SCAR markers were developed for waterlily species identification among 27 samples of three subgenera, namely *Anecphya*, *Nymphaea* and *Lotos*. Thirty RAPD primers were screened and 18 primers (60%) showed polymorphic bands. Four SCAR markers were obtained for 7 waterlily samples in subgenus *Anecphya*. NYM007 primer provides a specific band for *N. atrans* and *N. immutabilis* while the NYM010 could amplify only *N. gigantea* var. *neorosea*. Two SCAR markers were used for 10 waterlily samples in subgenus *Nymphaea* and NYM005 provides a specific band for *Nymphaea* 'Sunrise'. The other two SCAR markers were developed for 10 waterlily samples in subgenus *Lotos* but no marker was obtained to specify this subgenus. Therefore, this study provides three RAPD-SCAR markers for identifying waterlily species in subgenus *Anecphya* and *Nymphaea*.

Keyword: RAPD, DNA markers, waterlily, *Nymphaea*

สารบัญ

หน้า

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ.. 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย.. 1

ขอบเขตของงานวิจัย... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.. 2

สถานที่ทำการวิจัย.. 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชสกุลบัวสาย.. 3

Polymerase Chain Reaction (PCR)... 6

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)........................ 7

Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)................ 7

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างบัวสายที่ใช้ศึกษา.. 9

การสกัดดีเอ็นเอ.. 9

การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส.......................... 11

การคัดเลือกไพรเมอร์จากเทคนิคอาร์เอพีดี.. 11

การทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์.. 12

การโคลนยีน.. 13

การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรีย.. 15

การตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดตำเพาะ... 16

การพัฒนาเครื่องหมาย Sequence characterized amplified
region (SCAR)... 16

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

การสกัดดีเอ็นเอ.. 17

การคัดเลือกไพรเมอร์จากเทคนิคอาร์เอพีดี.. 18

หน้า

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการจากเทคนิคอาร์เอพีดี........ 27
การพัฒนาเครื่องหมาย Sequence characterized amplified region (SCAR)........ 31
สรุปผลการวิจัย........ 33
เอกสารอ้างอิง........ 34
ภาคผนวก........ 37
Output ที่ได้จากโครงการ........ 38

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ตัวอย่างบัวสายที่ทำการศึกษา 27 ตัวอย่าง	9
2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ของอาร์เอพีดี	12
3 สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี	12
4 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง (Similarity index) โดยที่ 1-7 คือ บัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* (ตาราง 1)	28
5 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง (Similarity index)	29
6 ไพรเมอร์ SCAR สำหรับบัวสายสกุลย่อย *Anecphya*	31
7 ไพรเมอร์ SCAR สำหรับบัวสายสกุลย่อย *Nymphaea*	32

สารบัญภาพ

ภาพ หน้า

1 ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่พบหลังจากการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB medthod ที่ดัดแปลงจาก Agrawal *et al.* (1992) โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Thermo Scientific) และ 1-10 คือ ตัวอย่างของบัวสายในสกุลย่อย *Nymphaea* (ตาราง 1)................ 17

2 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT02 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-7 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* (ตาราง 1)................ 18

3 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT10 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-7 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* (ตาราง 1)................ 18

4 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT17 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-7 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* (ตาราง 1)................ 19

5 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT19 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-7 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* (ตาราง 1)................ 19

6 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT20 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-7 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* (ตาราง 1)................ 20

7 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ JAT17 โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Thermo Scientific) และ 1-10 คือตัวอย่างของบัวสายในสกุลย่อย *Nymphaea* (ตาราง 1)................ 21

8 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ JAT19 โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Thermo Scientific) และ 1-10 คือตัวอย่างของบัวสายในสกุลย่อย *Nymphaea* (ตาราง 1)................ 21

ภาพ	หน้า

9 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ JAT21 โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Thermo Scientific) และ 1-10 คือตัวอย่างของบัวสายในสกุลย่อย *Nymphaea* (ตาราง 1).................................... 22

10 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ JAT26 โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Thermo Scientific) และ 1-10 คือตัวอย่างของบัวสายในสกุลย่อย *Nymphaea* (ตาราง 1).................................... 22

11 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ JAT29 โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Thermo Scientific) และ 1-10 คือตัวอย่างของบัวสายในสกุลย่อย *Nymphaea* (ตาราง 1).................................... 22

12 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT01 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1).. 23

13 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT02 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1).. 23

14 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT03 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1).. 24

15 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT07 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1).. 24

16 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT12 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1).. 25

17 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT15 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1).. 25

ภาพ **หน้า**

18 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT16 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1)........ 26

19 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT26 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1)........ 26

20 Phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเทคนิคอาร์เอพีดีของบัวสายสกุลย่อย *Anecphya* ทั้ง 7 ตัวอย่าง........ 28

21 Phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเทคนิคอาร์เอพีดีของบัวสายสกุลย่อย *Nymphaea* ทั้ง 10 ตัวอย่าง........ 29

22 Phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเทคนิคอาร์เอพีดีของบัวสายสกุลย่อย *Lotos* ทั้ง 10 ตัวอย่าง........ 30

มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

พืชในสกุลบัวสาย (*Nymphaea* L.) ประกอบด้วย 5 สกุลย่อย ได้แก่ สกุลย่อย *Anecphya* หรือบัวออสเตรเลีย ที่มีการกระจายพันธุ์เฉพาะในประเทศออสเตรเลียเท่านั้น สกุลย่อย *Brachyceras* หรือบัวผัน บัวเผื่อน ที่มีการกระจายพันธุ์ทั่วโลก สกุลย่อย *Hydrocallis* ที่มีการกระจายพันธุ์ในทวีปอเมริกาใต้ สกุลย่อย *Nymphaea* หรือบัวฝรั่ง ที่มีการกระจายพันธุ์ในทวีปอเมริกาเหนือ และ สกุลย่อย *Lotos* หรือบัวกินสาย ที่มีการกระจายพันธุ์ในทวีปเอเซียเขตร้อน โดยคนไทยนำพืชในสกุลนี้มาทั้งปลูกประดับ เป็นยาพื้นบ้าน หรือแม้แต่นำมาประกอบอาหาร โดยเฉพาะบัวสายในสกุลย่อยบัวกินสายที่ใช้ส่วนสายบัวหรือก้านดอกมาประกอบอาหารเช่นแกงสายบัวปลาทู เป็นต้น พืชในสกุลบัวสายเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี ที่มีส่วนของลำต้นใต้ดินที่เรียกว่า rhizome หรือ rootstock ยึดเกาะกับโคลนใต้น้ำ ดอกมีสีสรรสวยงามแล้วแต่สกุลย่อย โดยสกุลย่อยบัวกินสายมีสีดอกตั้งแต่สีขาว ขาวอมชมพู ชมพู จนถึงแดง และมีกลิ่นหอม สกุลย่อยบัวออสเตรเลียมีสีดอกตั้งแต่ชมพู ขาว จนถึงม่วง บางชนิดเปลี่ยนสีได้เมื่อดอกแก่ ขณะที่บัวฝรั่งจะมีสีดอกเป็นสีขาวหรือเหลือง จึงเป็นที่นิยมนำมาจัดแต่งสวน (Sharma, 1993) สำหรับสุกลย่อยบัวกินสาย (*Lotos*) ดอกจะบานเวลากลางคืน และมีรายงานการพบบัวจงกลณี ซึ่งเป็นบัวสายที่ยังหาข้อสรุปไม่ได้ว่าเป็นลูกผสมในธรรมชาติหรือเกิดจากการกลายพันธุ์ โดยบัวจงกลนีนี้มีลักษณะร่วมของทั้งบัวสายสกุลย่อย *Lotos* และสกุลย่อย *Brachyceras* แต่จากการตรวจสอบข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งบริเวณดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์และนิวเคลียส พบว่าบัวจงกลนีนั่นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับบัวสายสกุลย่อย *Brachyceras* มากกว่า *Lotos* (มลิวรรณ นาคขุนทด และ วสันต์ เอื้อมลฉัตร, 2555; มลิวรรณ นาคขุนทด และ ณัฐวุฒิ วงศ์อนันต์, 2556, มลิวรรณ นาคขุนทด, 2557) ดังนั้นจึงน่าจะเป็นบัวสายที่เกิดจากการกลายพันธุ์ในธรรมชาติมากกว่าจะเป็นลูกผสม บัวสายสกุลย่อยบัวออสเตรเลีย (*Anecphya*) มีถิ่นกำเนิดในประเทศออสเตรเลีย ดอกมีหลายสี บางชนิดมีลักษณะของสีที่เปลี่ยนแปลงไปตามอายุของดอก ดอกบานในเวลากลางวัน ผนังรังไข่แยกออกจากกัน ไม่มีก้านชูเกสรเพศเมีย มีเกสรเพศผู้จำนวนมากและหนาแน่นที่บริเวณฐานรองดอก แต่ก้านชูอับเรณูแคบและสั้น อับเรณูโค้งและไม่มีรยางค์ที่ปลายเกสรเพศผู้ เมล็ดมีขนาดใหญ่ และบัวสายในสกุลย่อยบัวฝรั่ง (*Nymphaea*) ดอกจะบานในตอนกลางวัน เป็นพืชที่นิยมนำมาปลูกเป็นพืชประดับ เนื่องจากดอกมีความสวยงามและสามารถบานซ้ำได้จนกว่าดอกจะโรยร่วงไป รวมทั้งบางชนิดมีกลิ่นหอม ลำต้นใต้ดินหรือเหง้าจะเจริญตามแนวนอน ใบมีลักษณะกลม ขอบใบเรียบ จึงทำให้ปัจจุบันนี้ได้รับความนิยมอย่างมากในการนำมาปลูก เพราะนอกจากสีและลักษณะของดอกจะสวยงามแล้วการปลูกและการดูแลรักษาก็ไม่ยุ่งยาก

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าปัจจุบันประเทศไทยได้มีการนำเข้าบัวสายจากต่างประเทศมาปลูกกันอย่างแพร่หลาย และนักผสมพันธุ์บัวก็ได้ผสมพันธุ์ใหม่เพิ่มขึ้นหลายสายพันธุ์ เช่นการผสมข้ามสกุลย่อย และการผสมข้ามชนิด เพื่อให้ได้บัวสายสายพันธุ์ใหม่ๆที่มีดอกที่สวยกว่าเดิม เพื่อใช้ในการประกวดแข่งขันหรือเพิ่มมูลค่าทางด้านเศรษฐกิจ เนื่องจากความคล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นพืชสกุลย่อยนี้ ทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดในระยะต้นอ่อนได้และต้องใช้เวลานานจนกระทั่งออกดอกจึงจะสามารถบ่งบอกชนิดได้ ผู้ซื้ออาจถูกเอาเปรียบในการปลอมปนต้นอ่อนของพืชในสกุลเดียวกันที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจที่ต่ำกว่า การพยายามศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมและการผสมพันธุ์เพื่อให้ได้ลักษณะตรงตามความ

ต้องการของผู้บริโภคให้มากที่สุด ทำให้ในปัจจุบันเราไม่สามารถแยกบัวสายได้ว่าต้นใดคือบัวสายสายพันธุ์แท้หรือบัวสายลูกผสมได้หรือแม้แต่ยังไม่สามารถบอกได้ว่าพ่อและแม่พันธุ์เป็นบัวสายชนิดใดกันแน่ ซึ่งการนำบัวสายไปใช้ในด้านการค้าหรือการส่งออกนั้นจำเป็นต้องรู้ลักษณะของทั้งลำต้น ใบและดอกที่จะเกิดขึ้นอย่างชัดเจน เพื่อให้ผู้ที่ซื้อไปได้รับความพึงพอใจความหลายหลากและความสับสนที่เกิดขึ้นนี้นำไปสู่ความสับสนในการจัดจำแนกเพื่อระบุชนิดและสายพันธุ์ของบัวสายทั้งในระดับสกุล สกุลย่อยและชนิด เมื่ออาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ดังนั้นการนำข้อมูลทางดีเอ็นเอเข้ามาใช้ช่วยในการจัดจำแนกจึงเป็นอีกทางหนึ่ง เพื่อให้เกิดความถูกต้องชัดเจนมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด RAPD-SCAR ขึ้นมาช่วยในการจัดจำแนกและยืนยันชนิดพันธุ์บัวกินสายในสกุลย่อย Anecphya, Nymphaea และ *Lotos* อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาเครื่องหมาย SCAR ที่จำเพาะกับบัวสาย 3 สกุลย่อย ได้แก่ *Anecphya Nymphaea* และ *Lotos*

2. เพื่อนำแบบแผนที่เกิดจากเทคนิคอาร์เอพีดีมาประเมินความแปรผันทางพันธุกรรมของบัวสายทั้ง 3 สกุลย่อย

ขอบเขตของงานวิจัย

คัดเลือกไพรเมอร์แบบสุ่มด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีที่ให้ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างของบัวสายใน 3 สกุลย่อย ได้แก่ *Anecphya Nymphaea* และ *Lotos* จากนั้นนำมาชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณด้วยการโคลน และพัฒนาเครื่องหมาย SCAR เพื่อนำมาตรวจสอบบัวสายแต่ละชนิดหรือแต่ละสายพันธุ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD-SCAR เพื่อใช้ตรวจสอบสายพันธุ์บัวสายหรือระบุชนิดบัวสายใน 3 สกุลย่อย ได้แก่ *Anecphya Nymphaea* และ *Lotos*

2. ประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวสายทั้ง 3 สกุลย่อยเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยพันธุศาสตร์และชีววิทยาโมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชสกุลบัวสาย

บัว เป็นพันธุ์ไม้น้ำชนิดหนึ่งที่เจริญเติบโตท่ามกลางโคลนตม มีดอกสวยงามทั้งสีสันและรูปร่าง อีกทั้งดอกมีขนาดใหญ่ เมื่อบานจะเด่นสะดุดตาสำหรับผู้ที่ผ่านมาพบเห็น บางชนิดมีกลิ่นที่หอมชื่นใจ ให้ทั้งความสวยงามและประโยชน์อื่นๆอีกมากมายจนได้รับการขนานนามว่า “ราชินีแห่งพันธุ์ไม้น้ำ” ประเทศไทยรู้จักบัวกันมานานแล้ว ซึ่งได้รับอิทธิพลมาจากประเทศอินเดียโดยผ่านเข้ามาทางพุทธศาสนา (วิเชษฐ ค้าสุวรรณ, 2537) ในศาสนาพุทธ ดอกบัวนั้นจัดว่าเป็นดอกไม้ประจำพระพุทธศาสนา ทั้งนี้ในพุทธประวัติดอกบัวได้มีส่วนเกี่ยวข้องกับพระพุทธเจ้า ตั้งแต่ ประสูติ ตรัสรู้ และปรินิพพาน เช่น เมื่อพระพุทธเจ้าทรงประสูติก็มีดอกบัวผุดขึ้นมารองรับพระบาท และเมื่อตรัสรู้เป็นองค์สัมมาสัมพุทธเจ้า ไม่ว่าจะไปประทับ ณ ที่ใด ก็จะมีดอกบัวมารองรับทั้งสิ้นและพระพุทธเจ้าก็ทรงมีหลักคำสอนเปรียบเทียบมนุษย์กับดอกบัว 4 เหล่า ซึ่งบัวเป็นสัญลักษณ์ของความบริสุทธิ์และคุณงามความดีตามคตินิยมของชาวพุทธ (คุณา นนทพัฒน์, 2546) โดยเฉพาะบัวหลวงพันธุ์สีชมพูซึ่งดอกมีขนาดใหญ่ สีชมพูสวย มีกลิ่นหอม นิยมนำไปไหว้พระหรือประกอบพิธีอื่นๆ ในพระพุทธศาสนา ในสมัยก่อนคนไทยไม่นิยมปลูกบัวไว้ในเขตรั้วบ้าน เพราะมีความเชื่อว่า บัวนั้นเป็นดอกไม้สูงศักดิ์ ดังนั้นสมัยนั้นจึงนิยมปลูกเฉพาะในเขตพระราชฐานหรือตามวัดวาอาราม เท่านั้น แต่เมื่อยุคสมัยเปลี่ยนแปลงไป ความเชื่อต่างๆเหล่านั้นก็มีการเปลี่ยนแปลงไปด้วยตามความคิดของคนรุ่นใหม่ ดังนั้นในสมัยนี้จึงมักเห็นผู้ที่รักการปลูกพืช นำบัวมาปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับบริเวณบ้านเรือนมากขึ้น เนื่องจากบัวขยายพันธุ์ได้เร็ว และสามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ง่าย จึงทำให้การปลูกบัวเป็นไม้ดอกไม้ประดับแพร่หลายออกไปอย่างกว้างขวาง รวมทั้งการนำบัวไปประกอบเป็นธุรกิจค้าขายมากขึ้นด้วย

นอกจากบัวจะสามารถนำมาเป็นไม้ดอกไม้ประดับได้แล้ว ประโยชน์ของบัวยังมีอย่างอื่นอีกมากมาย อาทิ การปลูกบัวเพื่อวัตถุประสงค์อื่นๆ เช่น การปลูกเพื่อเก็บเมล็ด ขายฝักอ่อน ขายส่วนของไหลบัวหรือรากบัว ขายส่วนก้านใบหรือสายบัว การนำมาทำเมล็ดบัวเชื่อม เมล็ดบัวกวน เมล็ดบัวต้มน้ำตาล และที่นิยมมากในปัจจุบันคือการปลูกบัวเป็นไม้ตัดดอก ซื้อขายต้นอ่อน ทำให้ตลาดการค้าขายบัวกำลังเป็นที่นิยมมากขึ้น

บัวเป็นพันธุ์ไม้น้ำที่ผูกพันกับชีวิตมนุษย์มาตั้งแต่สมัยโบราณ ซึ่งได้ปรากฏหลักฐานทางประวัติศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับบัวในบริเวณที่เป็นแหล่งอารยธรรมของโลก เช่น ในแหล่งอารยธรรมบริเวณลุ่มแม่น้ำไนล์ มีการค้นพบดอกบัวแห้งในสุสานของกษัตริย์รามาเลสและตุตันคาเมนแห่งอียิปต์ ซึ่งมีอายุราว 3,000 – 4,000 ปีมาแล้ว ชาวอียิปต์เรียกดอกบัวว่า “บัวศักดิ์สิทธิ์แห่งลุ่มแม่น้ำไนล์” (The sacred lotus of the nile) เดิมเข้าใจกันว่าเป็นบัวหลวง แต่นักอนุกรมวิธานจำแนก พบว่าบัวอียิปต์เป็นบัวอุบลชาติจำพวกบัวสาย จึงให้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Nymphaea lotus* (คุณา นนทพัฒน์, 2546)

บัว สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วงศ์ คือ Nelumbonaceae (บัวหลวง) และ Nymphaeaceae (บัวสาย) ซึ่งพืชในวงศ์บัวหลวงมีเพียง 1 สกุล ในขณะที่ พืชวงศ์บัวสายมีทั้งหมด 6 สกุล ทำให้เป็นที่น่าสนใจอย่างมากที่จะนำมาศึกษานอกจากบัวแล้วนั้น ยังมีพืชที่มีความใกล้ชิดกับบัวอีก 2 ชนิด ที่น่าสนใจ คือ พืชวงศ์บัวสาหร่าย ได้แก่ *Cabomba caroliniana* และ *Brasenia schreberi*

ซึ่ง *Brasenia schreberi* จะมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับบัวมากกว่า *Cabomba caroliniana* ตาม Phylogenetic tree ของ วสันต์ เอื้อมลฉัตร (2555) ดังนั้นพืชทั้งสองชนิดนี้จึงมีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการนำมาทำการศึกษาร่วมด้วย โดยให้เป็นพืชนอกกลุ่ม

พืชวงศ์บัวสายเป็นพืชล้มลุกที่ขึ้นในน้ำพบได้ทั้งในเขตร้อนและเขตหนาวมีอายุหลายปีประกอบไปด้วย 6 สกุล คือสกุล *Barclaya* หรือไส้ปลาไหล มีลำต้นอยู่ใต้ดินเป็นแบบเหง้าใบเจริญอยู่ในน้ำเป็นรูปทรงกระบอกยาวเป็นคลื่น ดอกเป็นดอกเดี่ยวแบบสมบูรณ์เพศ เจริญเหนือผิวน้ำ ผลเป็นผลเดี่ยวแบบผลสด ภายในมีเมล็ดจำนวนมาก สกุล *Nuphar* หรือบัวญี่ปุ่นมีลำต้นใต้ดินเป็นเหง้าขนาดใหญ่เจริญลึกอยู่ในโคลน ใบรูปกลมหรือรูปหอก มีทั้งใบใต้น้ำและใบเหนือน้ำ ดอกมีขนาดเล็กรูปถ้วย เจริญอยู่เหนือผิวน้ำ มีสีเหลือง เมื่อได้รับการผสมผลจะเจริญเหนือน้ำ สกุล *Ondinea* มีหัวอยู่ใต้ดินขนาดเล็ก ใบขนาดใหญ่รูปไข่มีทั้งใบลอยน้ำและใบใต้น้ำดอกบานเหนือน้ำในเวลากลางวันและมีกลิ่นหอม สกุล*Euryale* หรือบัวถาด ลำต้นเป็นหัวอยู่ใต้ดิน ใบกลมลอยติดผิวน้ำ ดอกเดี่ยวสมบูรณ์เพศ เจริญเหนือผิวน้ำบานในเวลากลางวัน สกุล *Victoria* หรือบัวกระด้ง ลำต้นเป็นเหง้าขนาดใหญ่เจริญอยู่ใต้ดิน ใบกลมขนาดใหญ่และหนาขอบใบตั้งลอยที่ผิวน้ำ ดอกขนาดใหญ่บานที่ผิวน้ำ มีผลสดแบบ berry ขนาดใหญ่ มีเมล็ดจำนวนมาก

พืชในสกุลบัวสาย (*Nymphaea* L.) จัดเป็นพืชน้ำที่อยู่ในวงศ์ Nymphaeaceae พบประมาณ 50 ชนิด มีการแพร่กระจายพันธุ์ทั่วโลก สามารถแบ่งบัวสายได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มบัวสายยักษ์ออสเตรเลียซึ่งเป็นบัวสายพื้นเมืองของประเทศออสเตรเลีย มีลักษณะเด่น คือ การมีเกสรเพศผู้เป็นเส้นจำนวนมาก ใบสีเขียวมีลักษณะปลายใบมน โคนใบเปิด ขอบใบจักห่างไม่เป็นระเบียบ มีกลีบดอกจำนวนมาก กลีบดอกมีหลายสี เช่น ขาว ชมพู ฟ้า รู้จักกันดีในชื่อบัวไจแกนเทีย (*Nymphaea gigantea* Hook. f.) เป็นต้น กลุ่มบัวสายเขตอบอุ่นหรือบัวสายฝรั่งเป็นบัวที่มีถิ่นกำเนิดในแถบอเมริกา ลักษณะรากและลำต้นคล้ายกับบัวสายของไทย แต่สามารถปรับตัวอยู่ในประเทศเขตร้อนได้ มีลักษณะใบค่อนข้างกลม ปลายใบมน โคนใบเปิดขอบใบเรียบใบมีหลายสี เช่น เขียว ม่วง แดง ลักษณะดอกจะบานกลางวัน ทรงดอกเมื่อบานจะเป็นรูปถ้วย กลีบดอกมีจำนวนมาก ปลายกลีบดอกจะมน เกสรเพศผู้มีจำนวนมาก และกลุ่มบัวสายเขตร้อน ซึ่งมีลักษณะทั่วไปคล้ายกับบัวสายฝรั่ง แต่ทรงกลีบดอกเมื่อบานจะมีลักษณะครึ่งวงกลมหรือเกินครึ่งวงกลม ใบรูปหัวใจหรือกลม ขอบใบจักซี่ฟัน สีของใบและกลีบดอกมีความหลากหลายแล้วแต่ชนิดของบัวสายนั้นๆ โดยในกลุ่มของบัวสายเขตร้อนยังแบ่งย่อยได้เป็นอีก 2 กลุ่ม คือ กลุ่มบัวสายที่มีช่วงการบานของดอกเวลากลางคืน (18.00น. ถึง 11.00 น.) เกสรเพศผู้เป็นแผงเรียงรอบรังไข่ ปลายเกสรเพศผู้ไม่มีรยางค์ ขอบใบจักเป็นระเบียบ และกลุ่มบัวสายที่มีช่วงการบานของดอกเวลากลางวัน (05.30 น. ถึง 18.00 น.) หรือเรียกว่า บัวผัน บัวเผื่อน มีเกสรเพศผู้จำนวนมากรอบรังไข่ ปลายเกสรเพศผู้มีรยางค์ขอบใบจักซี่ฟันไม่เป็นระเบียบ (มลิวรรณ นาคขุนทด , 2554) บัวสายสกุล *Nymphaea* มีสมาชิกมากที่สุดในวงศ์ Nympheaeceae (ณัฐกานต์ โกเสนตอและคณะ, 2557; วสันต์ เอื้อมลฉัตร, 2555) ได้แก่ บัวสายสกุลย่อยที่มีช่วงการบานของดอกในเวลากลางคืน คือ บัวสายสกุลย่อย *Lotos* หรือ บัวกินสาย ดอกจะมีลักษณะผนังรังไข่ที่เชื่อมกันอย่างสมบูรณ์ ก้านดอกอวบอ้วนชูขึ้นเหนือผิวน้ำ 10-30 เซนติเมตร กลีบเลี้ยง 7-13 กลีบ และมีเส้นใบเด่นชัด เกสรเพศผู้แทรกตัวอยู่เหนือกลีบดอก ละอองเรณูเรียบ ก้านเกสรเพศเมียเป็นเส้นตรง มีขนบริเวณก้านใบ ใต้ใบ และก้านชูดอก เมล็ดขนาดเล็ก มีขนเป็นเส้นตามยาวขนาดสั้นๆ บัวสายสกุลย่อย *Hydrocallis* ดอกบานติดกับผิวน้ำ ผนังรังไข่เชื่อมติดกันอย่างสมบูรณ์ เส้นใบบนกลีบเลี้ยงไม่เห็นเด่นชัด กลีบดอกรวมกันเป็นกระจุก 4 กลีบ แบบ Whorls เรียงสลับกับกลีบเลี้ยงและกลีบดอกชั้นอื่นๆ โดยกลีบดอกด้านนอกสุดจะมี 4-8 กลีบ(อาจมากกว่าหรือน้อยกว่า) เกสรเพศผู้แทรกอยู่ในชุดของ

กลีบดอก ซึ่งมีเกสรเพศผู้ที่เปลี่ยนไปเป็นกลีบดอก (Petaloid) แทรกอยู่ในวงของกลีบดอกด้วย อับเรณูแตกออกพร้อมกัน ก้านชูเกสรเพศเมียรูปร่างเรียว เมล็ดขนาดเล็ก มีขนยาวจำนวนมาก ขอบใบทั้งหมดเป็นแบบซี่ฟัน มีลำต้นใต้ดินเป็นเหง้าตรง และจะแห้งในช่วงฤดูพักตัว สกุลย่อยนี้เป็นที่รู้จักทางแถบอเมริกาใต้ ไม่พบในประเทศไทย และบัวสายสกุลย่อยที่มีช่วงการบานของดอกในเวลากลางวัน คือ บัวสายสกุลย่อย *Nymphaea* หรือ บัวฝรั่ง ผนังรังไข่เชื่อมติดกันอย่างสมบูรณ์ โดยปกติดอกจะลอยอยู่เสมอน้ำ เส้นใบบนกลีบเลี้ยงไม่เห็นเด่นชัด เกสรเพศผู้แทรกอยู่ในชุดของกลีบดอก และมีการจัดเรียงลำดับทั้งขนาดและรูปร่าง ก้านชูอับเรณูด้านในสุดจะแคบ ในขณะที่ก้านชูเกสรเพศเมียเป็นเส้นตรง ใบทั้งหมดมีรูปร่างกลมขอบใบเรียบ ลำต้นใต้ดินสามารถงอกได้ในสภาพอากาศหนาวเย็น เมล็ดเรียบ ปัจจุบันมีการนำมาปลูกในประเทศไทยจำนวนมาก (สมเกียรติ ตั้งกิจวานิชย์, 2556) บัวสายสกุลย่อย *Brachyceras* หรือ บัวผัน-บัวเผื่อน ผนังรังไข่แยกออกจากกัน มีก้านชูเกสรเพศเมียสั้นและแข็ง มีเกสรเพศผู้จำนวนมาก อับเรณูอาจยาวมากกว่าหรือน้อยกว่ารยางค์ เชื่อมต่อกับก้านชูอับเรณูลักษณะแบนหรือกลม มีรยางค์ที่ปลายเกสรเพศผู้ เมล็ดมีขนาดเล็ก (มลิวรรณ นาคขุนทด, 2554)

Conard (1905) ได้ทำการจัดจำแนกพืชสกุลบัวสายโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรังไข่ โดยสามารถที่จะจัดจำแนกบัวสายทั้งหมด 5สกุลย่อย ออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีผนังรังไข่แยกจากกัน ซึ่งพบ 2 สกุลย่อยคือ สกุลย่อย *Barchyceras*และสกุลย่อย *Anecphya* และกลุ่มที่สองคือกลุ่มที่มีผนังรังไข่เชื่อมติดกัน ซึ่งพบ 3 สกุลย่อยคือ สกุลย่อย *Nymphaea* สกุลย่อย *Hydrocallis* และสกุลย่อย *Lotos* ต่อมา Poczai *et al.* (2011) ศึกษาบัวสาย 3 ตัวอย่าง ได้แก่ *N. alba* , *N. caerulea* และ *Nymphaea* cv. 'Panama Pacific' ด้วยเครื่องหมาย ISSR พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 199 แถบ โดยเป็นแถบที่มีลักษณะแตกต่างกันจำนวน 175 แถบ (87.95%) ซึ่งโดยเฉลี่ยแล้วพบ 24 แถบดีเอ็นเอต่อ 1 ไพรเมอร์ และจากเครื่องหมาย ISSR นี้ยังสามารถสรุปได้ว่า *Nymphaea* cv. 'Panama Pacific' มีความแปรผันทางพันธุกรรมมากที่สุด โดยมีค่าความแปรปรวนสูงถึง 90 (45.23%) ขณะที่ *N. alba* และ *N. caerulea* จะมีความผันแปรทางพันธุกรรมระดับปานกลาง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเครื่องหมาย ISSR นั้นสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลยืนยันการเป็นลูกผสมได้ ซึ่งความเป็นลูกผสมนี้ส่วนใหญ่จะตกอยู่ในรุ่น F-2 จึงจะแสดงให้เห็นความถี่ของจีโนไทป์ที่แตกต่างได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

ปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกพืชสกุลบัวสายโดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและนิเวศวิทยา ซึ่งได้จำแนกพืชสกุลบัวสายออกเป็น 2 กลุ่ม คือ บัวสายที่พบในเขตอบอุ่นหรือเขตหนาว (hardy waterlilies) ได้แก่ สกุลย่อย *Nymphaea* และบัวสายที่พบในเขตร้อน (tropical waterlilies) ประกอบไปด้วย 4 สกุลย่อย ได้แก่ บัวสายสกุลย่อย *Anecphya*, *Brachyceras*, *Hydrocallis* และ *Lotos* นอกจากนี้ยังมีการใช้ช่วงเวลาการบานของดอกมาใช้ในการจัดจำแนกด้วย คือ การบานของดอกในเวลากลางคืน (night-blooming) ซึ่งประกอบไปด้วยบัวสายสกุลย่อย *Hydrocallis* และ *Lotos* การบานของดอกในเวลากลางวัน (day-blooming) ได้แก่ บัวสายสกุลย่อย *Nymphaea*, *Brachyceras* และ *Anecphya* อีกทั้งยังมีการใช้ลักษณะของผนังรังไข่มาจัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีผนังรังไข่แยกจากกัน (apocarpiae) คือสกุลย่อย *Anecphya* และ *Brachyceras* กลุ่มที่มีผนังรังไข่เชื่อมติดกัน (syncarpiae) คือ สกุลย่อย *Hydrocallis*, *Lotos* และ *Nymphaea* (วิชาญ เอียดทอง, 2556; Slocum, 2005) ด้วยลักษณะที่คล้ายคลึงกันมากของบัวสายแต่ละชนิด แต่ละสายพันธุ์ อีกทั้งลักษณะบางอย่างที่ใช้ในการจำแนกจะต้องอาศัยระยะเวลายาวนานในการเจริญเติบโต ข้อมูลที่ใช้ในการจำแนกโดยอาศัยสัณฐานวิทยาและนิเวศวิทยาจึงยังไม่เพียงพอและครอบคลุมมากนัก และเพื่อเป็นการย่นระยะเวลาใน

การศึกษา จึงมีการคิดค้นวิธีอื่นๆ เพื่อนำมาใช้ในการจัดจำแนกเพิ่มเติม เพื่อให้ข้อมูลเหล่านั้นมีความน่าเชื่อถือเพิ่มมากขึ้นโดยมลิวรรณ นาคขุนทด (2553) ได้ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของละอองเรณูบัวสายเขตอบอุ่นและบัวสายเขตร้อนทั้งหมด 24 สายพันธุ์มาเปรียบเทียบกัน พบว่าละอองเรณูของบัวสายทุกสายพันธุ์มีลักษณะเป็นละอองเรณูเดี่ยวที่มีช่องเปิดคล้ายวงแหวนรอบละอองเรณูแบบ zonasulculate ยกเว้นบัวสายยักษ์ออสเตรเลีย (*Nymphaea gigantean* Hook f.) ที่ไม่มีช่องเปิดโดยรูปร่างของละอองเรณูมีความผันแปรจากค่อนข้างกลม (suboblate) ถึงกึ่งรี (subprolate) และยังพบว่าลวดลายบนผนังละอองเรณูของบัวสายเขตอบอุ่นมีลักษณะของส่วนที่ยื่นนูนออกมา ซึ่งมีทั้งลักษณะแหลมท่อนและกลมแตกต่างจากบัวสายเขตร้อนอย่างชัดเจนซึ่งผนังละอองเรณูจะค่อนข้างเรียบหรือมีรู ทำให้มองเห็นช่องเปิดได้ชัดเจนบางสายพันธุ์ช่องเปิดมีความกว้างมากทำให้มองดูคล้ายแฮมเบอร์เกอร์ ทำให้สามารถจำแนกพืชในสกุลบัวสายให้มีความชัดเจนขึ้นได้อีกระดับหนึ่ง นอกจากนี้ยังมีการนำข้อมูลทางดีเอ็นเอมาใช้ในการจัดจำแนก เนื่องจากใช้ส่วนใดของพืชมาศึกษาก็ได้และใช้ตัวอย่างปริมาณน้อยๆ ซึ่งปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางโดย วสันต์ เอื้อมลฉัตร (2555) ได้จัดจำแนกพืชสกุลบัวสาย โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอในคลอโรพลาสบริเวณ *trnT-L-F* พบว่าพืชในสกุลบัวสายถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรกประกอบไปด้วยบัวสายสกุลย่อย *Hydrocallis, Lotos* และ *Nymphaea petersiana* กลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วยบัวสายสกุลย่อย *Nymphaea*, *Anecphya* และ *Brachyceras* การศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ในบางสกุลย่อยได้เนื่องจากมีตัวอย่างพืชบางสกุลย่อยที่น้อย ต่อมาณัฐกานต์โกเสนตอ และคณะ(2557) นำลำดับดีเอ็นเอในคลอโรพลาสมาใช้ในการจัดจำแนกพืชวงศ์บัวสายโดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้ข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอบริเวณยีน *trn*K ร่วมกับยีน *muteraseK* (*matK*) และบริเวณระหว่างยีน *trn*L-F ในคลอโรพลาสต์พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 1180-1209 คู่เบสและ 991-1095 คู่เบส ตามลำดับผลการศึกษาพบว่าสามารถจำแนกพืชในวงศ์บัวสายออกได้เป็น 3 กลุ่มคือกลุ่มบัวญี่ปุ่น (*Nuphar*) จะแยกออกมาเป็นกลุ่มแรกและกลุ่มไส้ปลาไหล (*Barclaya*) จะแยกออกมาเป็นกลุ่มที่สอง ขณะที่กลุ่มใหญ่จะประกอบไปด้วยบัวสาย (*Nymphaea*) บัวกระด้ง (*Victoria*) ยูริอาเร่ (*Euryale*) และออนดิเนีย (*Ondinea*) เนื่องจากดีเอ็นเอในพืชสามารถพบได้ในหลายส่วน ได้แก่ดีเอ็นเอในนิวเคลียส ดีเอ็นเอในคลอโรพลาส และดีเอ็นเอในไมโทรคอนเดีย จึงทำให้เป็นที่น่าสนใจอย่างมากในปัจจุบัน และได้มีการศึกษากันอย่างมากมายเพื่อหาความหลากหลายของพืช หรือใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างกันของพืชตามที่ต้องการได้

Polymerase Chain Reaction (PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction) หรือ PCR เป็นเทคนิคที่นำหลักการทำงานจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมภายในเซลล์มาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งอยู่ในสารละลาย การทำพีซีอาร์เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสซ้ำกันหลายๆรอบเพื่อให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีเบสคู่สมกับปลายทั้งสองด้านของบริเวณดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยใช้ไพรเมอร์เข้าเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3’ ในทิศทางเข้าหากัน ดังนั้นการทำพีซีอาร์จึงจำเป็นต้องทราบลำดับเบสดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ เพื่อใช้ในการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีทำพีซีอาร์คือ สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์นำมาใส่รวมกับไพรเมอร์ บัฟเฟอร์ ดีออกซีนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้ความร้อน

95 องศาเซลเซียส แล้วลดอุณหภูมิลง เพื่อให้ไพรเมอร์ที่มีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ามาจับคู่กับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) โดยใช้อุณหภูมิ 35-65 องศาเซลเซียส ขั้นสุดท้ายจึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรส 72 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้ทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปจนครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลของดีเอ็นเอเป้าหมายจะมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า ดังนั้นถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลายรอบ ก็จะทำให้ได้ดีเอ็นเอเป้าหมายปริมาณมาก (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

เทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA) เป็นวิธีการหาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR : Polymerase Chain Reaction) โดยการใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotides) ที่มีลำดับเบสสั้นๆ เพียง 8-10 นิวคลีโอไทด์ โดยให้จับกับสายดีเอ็นเอแบบสุ่มก็จะได้ดีเอ็นเอ ที่เป็นผลผลิตของพีซีอาร์ (PCR product) สามารถนำไปใช้หาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ เทคนิคนี้สามารถทำได้สะดวก ขั้นตอนในการทำการทดลอง รวดเร็วและง่าย ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสที่ใช้ ในการตรวจเช็คผลจะใช้รูปถ่ายภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (ultraviolet) แทนการใช้สารกัมมันตรังสี ในปฏิกิริยาจำเป็นต้องมีการควบคุมองค์ประกอบของปฏิกิริยาให้เหมาะสม (จอมสุดา ตวงวงษา, 2546) โดยมลิวรรณ นาคขุดทด และ ปัทมา เสนทอง (2552) ได้ทำการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในประเทศไทยด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี จากตัวอย่างทั้งหมด 46 ตัวอย่างที่รวบรวมจากศูนย์วิจัยพืชไร่นครราชสีมา โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จำนวน 60 ไพรเมอร์แบบสุ่ม พบว่ามี 12 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนจำนวน 64 แถบ และเมื่อวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc. Version 2.2 วิเคราะห์แบบ UPGMA แสดงผลในรูปของ dendrogram พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มของสบู่ดำได้เป็น 3 กลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ต่อมา Omalsaad *et al.* (2014) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกระเจี๊ยบแดงและปอแก้วโดยใช้วิธีเทคนิคอาร์เอพีดี โดยมีการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบอ่อนของ กระเจี๊ยบแดง 9 ตัวอย่าง และปอแก้ว 7 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ 2 ไพรเมอร์จากคลอโรพลาสต์และ 1 ไพรเมอร์จากไมโทคอนเดรีย ผลการศึกษาพบว่าให้ผลดีเอ็นเอที่ต่างกันทั้งหมด 62 แถบ เมื่อนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์พบว่าสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างทั้ง 16 ตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่ม 1 เป็นกลุ่มของปอแก้ว 5 ตัวอย่าง ขณะที่กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยตัวอย่างของ กระเจี๊ยบแดง 9 ตัวอย่างและปอแก้ว 2 ตัวอย่าง และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าประสบความสำเร็จในการแยกความแตกต่างระหว่างพืช 2 ชนิดนี้โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

Sequence Characterized Amplified Region(SCAR)

เทคนิค SCAR เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบความแปรผันทางพันธุกรรมโดยการตรวจสอบจากแถบของดีเอ็นเอ ที่ประยุกต์มาจากเทคนิคอาร์เอพีดีหรือเทคนิคอื่นที่เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอแบบสุ่มหลายตำแหน่ง จากนั้นนำมาทำการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง เพื่อ

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแถบนั้นๆ ในตัวอย่างเดิมเพียงแถบเดียว โดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ ดังนั้นผลที่ได้จึงมีความแม่นยำพร้อมทั้งมีความคงที่สม่ำเสมอ และสามารถตรวจสอบได้เมื่อมีการทำการทดลองซ้ำ (วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์, 2554) โดย Kim *et al.* (2000) ได้ทำการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR เพื่อทำการระบุสายพันธุ์ของสาลี่ (*Pyrus pyriflora* L.) จำนวน 19 สายพันธุ์ โดยออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะจำนวน 7 คู่ ที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทป์ของไพรเมอร์อาร์เอพีดี 6 ชนิด ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน ทำให้สามารถจำแนกสาลี่ทั้ง 19 สายพันธุ์ได้จากแถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยวิเคราะห์จากขนาดและแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ต่อมา Wang *et al.* (2007) ทำการตรวจสอบพันธุ์ของสตรอเบอรี่จำนวน 32 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาโมเลกุลชนิด RAPD และ SCAR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดีจำนวน 8 ไพรเมอร์และให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 71 แถบ จึงสามารถจำแนกสตรอเบอรี่ได้เป็นจำนวน 25 สายพันธุ์ และยังพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลชนิด SCAR ที่พัฒนาจากเครื่องหมายอาร์เอพีดีจำนวน 2 ชนิดนั้นให้ผลที่สอดคล้องกับผลของอาร์เอพีดีและสามารถจำแนกสตรอเบอรี่จำนวน 25 สายพันธุ์ได้

รวมไปถึงงานวิจัยของจันทร์เพ็ญ สะระ และคณะ (2556) มีแนวคิดในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อใช้คัดเลือกลูกผสม โดยในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาเครื่องหมาย SCAR มาช่วยในการคัดเลือกลูกผสมระหว่างลำไยพันธุ์ดอ27 กับลำไยพันธ์สีชมพู โดยเริ่มจากการคัดเลือกไพรเมอร์ RAPD จำนวน 50 ไพรเมอร์ พบว่ามี 2 ไพรเมอร์ คือไพรเมอร์ N-04 และ BPS 5 เป็นไพรเมอร์ที่เมื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วแสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างลำไยทั้งสองสายพันธุ์ จากนั้นทำการแยกแถบดีเอ็นเอบริสุทธิ์จากลำไยสีชมพูเพื่อสร้างดีเอ็นเอสายผสมเพื่อทำการโคลน จากนั้นจึงทำการหาลำดับดีเอ็นเอเพื่อนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งจะจำเพาะกับลำไยพันธุ์สีชมพู โดยจะให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 200 คู่เบส ซึ่งเครื่องหมาย SCAR นี้สามารถใช้ในการจำแนกลำไยพันธุ์สีชมพูและลูกผสมของพันธุ์สีชมพูได้ และ Cheng *et al.* (2014) ได้ทำการตรวจสอบลิ้นจี่ชนิด *Litchi chinensis* จากการทำอาร์เอพีดีแล้วพัฒนาเครื่องหมาย SCAR ที่มีเสถียรภาพจาก 3 โคลน คือ L7-16, L9-6 และL11-26 ซึ่งเมื่อนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วจะได้ดีเอ็นเอขนาด 222, 648 และ 369 คู่เบสตามลำดับ และจากการตรวจสอบพบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอจาก 24 ตัวอย่าง ซึ่งมี 6 ตัวอย่างที่เป็นตัวอย่างของ *L. chinensis* และตัวอย่างที่เหลือคือพืชอื่นๆ โดยเมื่อทำการตรวจสอบแล้วพบว่าเครื่องหมาย SCAR ชนิด L9-6 มีความเฉพาะเจาะจงสำหรับทุกตัวอย่างของ *L. chinensis* เครื่องหมาย SCAR ชนิด L11-26 มีความเฉพาะเจาะจงสำหรับ 5 ตัวอย่างของ *L. chinensis* และเครื่องหมาย SCAR ชนิด L7-16 มีความเฉพาะเจาะจงสำหรับกลุ่มตัวอย่างจากเมือง Luzhou เท่านั้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเครื่องหมาย SCAR สามารถใช้ในการระบุความแตกต่างประจำสายพันธุ์ได้

วิธีดำเนินงานวิจัย

ตัวอย่างบัวสายที่ใช้ศึกษา

เก็บตัวอย่างบัวสาย 3 สกุลย่อยได้แก่ สกุลย่อย *Anecphya* *Nymphaea* และ *Lotos* ที่พบในแหล่งธรรมชาติและที่นำมาปลูกเลี้ยง จำนวน 7, 10 และ 10 ตัวอย่าง (ตาราง 1) ตามลำดับ โดยบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* และ *Nymphaea* นั้นได้ตัวอย่างมากจากแหล่งเพาะปลูกในสวนหลวง ร.9 และสถาบันบัวราชมงคลตะวันออกทั้งหมด เนื่องจากไม่มีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทศ รวมไปถึง *N. lotus*1 *N. rubra* และ *N. spontanea* ด้วย ส่วนบัวสายที่เหลือเก็บตัวอย่างจากที่พบในแหล่งธรรมชาติ ได้แก่ หนอง บึง ทุ่งนาในจังหวัดพิษณุโลก โดยเก็บตัวอย่างส่วนราก ลำต้น ใบ ดอก และผล (ถ้ามี) เพื่อใช้เป็น Voucher specimens หรือเก็บเป็น living specimens ปลูกไว้ในเรือนเพาะชำ ณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก พร้อมทั้งแยกเก็บใบอ่อนใส่ silica gel เพื่อนำไปใช้ในการสกัดดีเอ็นเอต่อไป โดยตัวอย่างที่นำมาศึกษาจะทำการบันทึกลักษณะต่างๆ ของราก ไรโซม หรือเหง้า ก้านใบ แผ่นใบ สีดอก ทรงดอกเวลาดอกบาน เป็นต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดจำแนกเบื้องต้นด้วย

ตาราง 1 ตัวอย่างบัวสายที่ทำการศึกษา 27 ตัวอย่าง

บัวสายสกุลย่อย *Anecphya*	บัวสายสกุลย่อย *Nymphaea*	บัวสายสกุลย่อย *Lotos*
N. immutabilis	*N. alba*	*N. lotus* 1
N. atrans	*N. odorata*	*N. lotus* 2
N. violacea 1	*N. tuberose*	*N. pubescens* 1
N. violacea 2	*N. maxicana* 1	*N. pubescens* 2
N. violacea x *N. atrans*	*N. maxicana* 2	*N. pubescens* 3
N. gigantean	*N. tetragona*	*N. pubescens* 4
N. gigantea var. *neorosea*	*Nymphaea* 'Sunrise'	*N. pubescens* 5
	Nymphaea sp. 1	*N. pubescens* 6
	Nymphaea sp. 2	*N. rubra*
	Nymphaea sp. 3	*N. spontanea*

การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนของตัวอย่างบัวสายทั้งหมดมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงมาจากของ Agrawal *et al.* (1992) โดยมีขั้นตอนการสกัดมีดังต่อไปนี้

1. นำใบอ่อนของบัวสายประมาณ 0.5 กรัม มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นย้ายตัวอย่างที่บดใส่หลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่เติม 1X CTAB buffer 6 มิลลิลิตร และ mercaptoethanol 20 ไมโครลิตร

2. บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยกลับหลอดไปมาทุกๆ 10นาที

3. เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

5. เตรียมหลอดเซนตริฟิวส์หลอดใหม่ จากนั้นทำการดูดส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดใหม่ เติม Isopropanol 2 ใน 3 ส่วนของสารละลายที่ดูดมาได้จากหลอดเดิม กลับหลอดไปมาเบาๆ

6. นำไปแช่ในตู้ที่มีอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน แล้วตากตะกอนให้แห้ง

8. ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน จากนั้นตากตะกอนให้แห้ง

10. ละลายตะกอนใน TE buffer 500 ไมโครลิตร จากนั้นย้ายสารลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

11. เติม RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

12. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

13. เติม Phenol : chloroform (24 : 1) ปริมาตร 300 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน

14. นำไปปั่นเหวี่ยงทีความเร็ว 10,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที

15. ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

16. เติม 3 M Sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติม Absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารที่มี

17. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

18. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีจากนั้น สารละลายทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน

19. ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

20. นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

21. ดูดสารละลายทิ้งให้หมด จากนั้นทิ้งตะกอนให้แห้งในอากาศที่อุณหภูมิห้อง

22. ละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

23. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งาน แล้วตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

เป็นวิธีที่ใช้กระแสไฟฟ้าช่วยในการแยกสารชีวโมเลกุลต่างๆ ออกจากกัน โดยอาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันบางประการ เช่น ขนาด รูปร่าง ประจุ เป็นต้น โดยจะแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมากซึ่งมีประจุเป็นลบที่ pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก มักนิยมย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ แล้วเมื่อนำไปส่องดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตจะเห็นแถบดีเอ็นเอ ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1. เตรียมถาดรองเจลหรือหวีวางบนพื้นที่เรียบ

2. ชั่งผงอะกาโรสเจล 0.8 กรัม สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนดใหญ่ และ 1 กรัม สำหรับชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ในขวดรูปชมพู่แล้วเติม 1X TAE buffer 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3. หลอมอะกาโรสเจลโดยใช้ไมโครเวฟ เขย่าให้อะกาโรสละลายจนหมด

4. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้อุณหภูมิของน้ำวุ้นลดลงเหลือประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วจึงทำการเติมเอธิเดียมโบร์ไมด์ จากนั้นจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ เทหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร ปล่อยให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

5. เมื่ออะกาโรสเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึงหวีออกแล้วนำไปวางในเครื่องอิเล็กโทรโฟริซิส

6. เติม 1X TAE buffer ให้ท่วม โดยให้สูงกว่าผิวของอะกาโรสเจล

7. ดูดสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในช่องในแผ่นอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้

8. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นานประมาณ 30 นาที หรือปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่จนกว่าสี bromophenol blue จะเคลื่อนที่จนไปถึง 3 ใน 4 ส่วนของแผ่นอะกาโรสเจล

9. นำอะกาโรสเจลมาย้อมในเอธิเดียมโบร์ไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที

10. นำอะกาโรสเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต แล้วทำการถ่ายภาพ

การคัดเลือกไพรเมอร์จากเทคนิคอาร์เอพีดี

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ในเทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ JAT-01 ถึง JAT-30 จำนวนทั้งหมด 30 ไพรเมอร์ซึ่งเป็นไพรเมอร์แบบสุ่ม โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยาและสภาวะที่เหมาะสมแสดงดังตาราง 2-3 ซึ่งดัดแปลงจาก Williams *et al.* (1990)

ตาราง 2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ของอาร์เอพีดี

สารเคมี	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Distilled water	-	39.3
10X *Taq* buffer	1X	5
50 mM $MgCl_2$	1.5 mM	1.5
10 mMdNTPs	0.2 mM	1
RAPD Primer	0.4 pM	2
5U *Taq* DNA Polymeras (RBC)	1U / μl	0.2
DNA Template	50 – 100 ng	1
ปริมาตรรวม		50

ตาราง 3 สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	
Initial denaturation	94	5	
Denaturation	94	1	35 รอบ
Annealing	35	1	35 รอบ
Extension	72	2	35 รอบ
Final extension	72	7	

จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟริซีสโดยใช้อะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1 XTAE buffer และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปส่องด้วยเครื่องส่องเจลภายใต้แสงยูวี (UV transilluminator) และบันทึกภาพ เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป โดยเลือกตัดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ของบัวสายแต่ละชนิด เพื่อนำมาใช้สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR ต่อไป

การทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์

เมื่อได้แถบดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว นำมาทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ Hiyield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit บริษัท RBC Bioscience โดยมีขั้นตอนตามวิธีมาตรฐานของบริษัท ดังนี้

1. นำผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีส โดยใช้ 1X TAE buffer ที่เตรียมใหม่

2. นำเจลไปส่องภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต เพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ แล้วทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าไว้แล้ว

3. นำหลอด microcentrifuge ที่ใส่ชิ้นเจลไปชั่งน้ำหนักอีกครั้งเพื่อหาน้ำหนักของเจล

4. เติม DF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

5. จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีหรือจนกว่าเจลจะละลาย

6. นำ DF column ใส่ใน collection tube

7. นำสารละลายเจลใส่ลงใน DF column

8. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทของเหลวใน collection tube ทิ้ง

9. เติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทของเหลวใน collection tube ทิ้ง

10. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที

11. จากนั้นย้าย DF column ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

12. เติม elution buffer ปริมาตร 20-30 ไมโครลิตร ตรงกลาง column โดยให้ตรงกับแผ่นเมมเบรนพอดี เพื่อละลายดีเอ็นเอ

13. บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

14. นำไปตรวจสอบขนาดและความเข้มข้นด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีสบนอะกาโรสจลความเข้มข้น 1%

การโคลนยีน

โดยใช้วิธีการโคลนยีนที่ดัดแปลงจาก Sambrook *et al.* (1989) ที่มีขั้นตอนการโคลนดังต่อไปนี้

<u>1. การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการกับเวคเตอร์</u>

นำเอาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์เชื่อมกับเวคเตอร์พลาสมิด pTG 19-T (Vivantis) เพื่อนำเข้าไปยังเซลล์เจ้าบ้าน แล้วทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนที่ต้องการต่อไป ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังนี้

1.1 นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์มาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์พลาสมิดในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ที่มีส่วนประกอบดังนี้

pTG 19-T Vector (25ng/µl)	2	µl
PCR product (50 ng)	6	µl
10X buffer ligation	1	µl
T4 DNA ligation	1	µl

1.2 ผสมให้เข้ากันด้วยการดูดขึ้นลงหลายๆ ครั้ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นเก็บไว้ที่ 4 องศาสเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

2. การเตรียม competent cell

เป็นการเตรียมเซลล์เจ้าบ้านให้พร้อมที่จะรับ recombinant DNA เข้าไป โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1 ทำการ streak เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธ์ JM109 บนอาหารแข็ง LB แล้วจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว (single colony)

2.2 จากนั้นย้ายโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเหลว LB ที่มีปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2.3 ปิเปตอาหารเหลว LB 3 มิลลิลิตรลงไปในอาหารเหลว LB ที่มีปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง

2.4 นำหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตรไปแช่ในน้ำแข็งให้เย็น

2.5 เทอาหารเหลว LB ลงในหลอดเซนตริฟิวส์จนเต็ม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,790 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ทำซ้ำจนกระทั่งอาหารเหลว LB หมด

2.6 เทสารละลายทิ้ง แล้วเติม 100mM $CaCl_2$ ที่ผสมใหม่ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.7 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.8 เทสารละลายทิ้งจากนั้นเติม 100mM $CaCl_2$ ที่เย็น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที

2.9 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

2.10 เติม 100mM $CaCl_2$ ที่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการผสมโดยการดูดขึ้นลงหลายๆ ครั้ง

2.11 แบ่งใส่หลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ในน้ำแข็งจนกว่าจะใช้ต่อไป

3. การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี Heat shock

เป็นขั้นตอนการนำพลาสมิดที่เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Recombinant DNA) เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell: *E. coli* JM109) โดยอาศัยอุณหภูมิ ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1 เติมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เชื่อต่อกับพลาสมิดแล้วลงในหลอดที่มี competent cell 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยไมโครปิเปตเบาๆ

3.2 นำหลอด competent cell ไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งทันที ต่ออีกเป็นเวลา 5 นาที

3.3 เติม SOC ลงไปในหลอดเซนตริฟิวส์ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.4 จากนั้นนำเชื้อไปเซนตริฟิวส์ เท supernatant ทิ้ง แล้วนำเชื้อไป spread ลงบนอาหารแข็ง LB ที่มี amplicilin โดยเติม X-gal และ IPTG เพื่อตรวจสอบโดยวิธี white-blue colony selection แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรีย

การสกัดเอาพลาสมิดที่อยู่ในเซลล์เจ้าบ้านออกมา เพื่อทำการตรวจสอบหาชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการต่อไป มีขั้นตอนการทำดังต่อไปนี้

1. เขี่ยเชื้อจากจานเลี้ยงเชื้อ 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มี amplicilin ปริมาตร 3-5 แล้วเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2. ย้ายเชื้อที่เลี้ยงไว้ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ทำซ้ำจนเชื้อที่เลี้ยงไว้หมด

3. นำตะกอนเชื้อมาเติม solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8 และ 10 mM EDTA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไป vortex จนเซลล์กระจายหมด

4. ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม solution II (0.2 N NaOH และ 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทำการผสมโดยการกลับหลอดเบาๆ หลังจากนั้นนำไปแช่น้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที

5. เติม solution III (3 M KOAc, pH 5.2) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที

6. ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดเซนติฟิวส์ 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ปริมาตรประมาณ 400-500 ไมโครลิตร

7. เติม absolute ethanol ที่เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ ลบ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที

9. ล้างตะกอนพลาสมิดด้วย 70% ehanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

10. ตากตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

11. เติม RNaseA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

12. ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจลมีความเข้มข้น 1% ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์

การตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดตำเพาะ

นำพลาสมิดที่สกัดออกมาจาดเซลล์เจ้าบ้าน แล้วนำมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อนำเอาชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เราต้องการออกมา เพื่อส่งวิเคราะห์ต่อไป มีขั้นตอนการทำต่อไปนี้

1. นำพลาสมิดที่สกัดได้มา 3 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ 1.5 มิลลิลิตร เติมบัปเฟอร์สำหรับเอ็นไซม์ *Hin*dIII 1 ไมโครลิตร เอ็นไซม์ *Hin*dIII 0.1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 5.9 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยการ vortex

2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

3. นำสารละลายมา 5 ไมโครลิตรผสมกับ 6X loading dye 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจสอบผลบนอะกาโรสเจล 1% โดยใช้กระแสไฟฟ้าแรงดัน 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

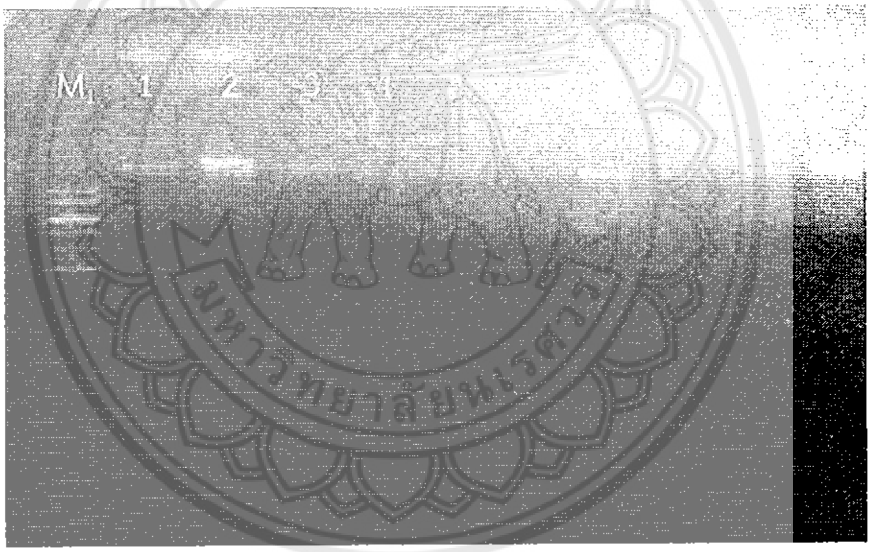
การพัฒนาเครื่องหมาย Sequence characterized amplified region (SCAR)

หลังจากการโคลนแล้ว ส่งพลาสมิดที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอที่บริษัท Macrogen (South Korea) เพื่อนำมาทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมต่อบัวสายทั้ง 3 สกุลย่อย โดยใช้เวปไซด์ IDTdna จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาทดสอบกับบัวสายทั้งหมด โดยการปรับส่วนประกอบและสภาวะให้เหมาะสมกับแต่ละไพรเมอร์ จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟริซีสโดยใช้อะกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1%

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

การสกัดดีเอ็นเอ

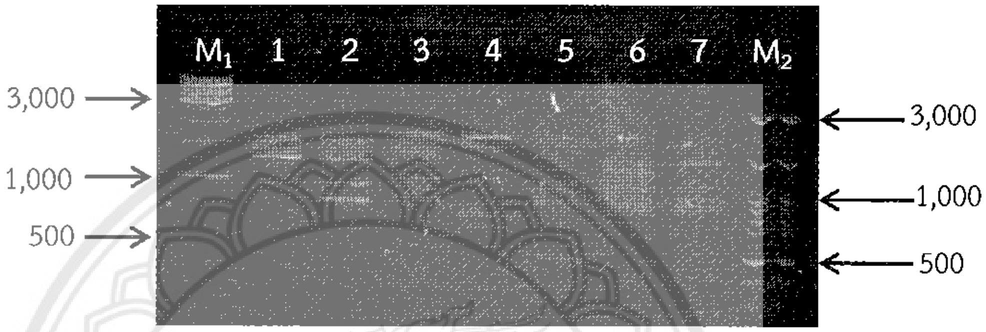
จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบสดของบัวสาย สำหรับขั้นตอนการดึงโปรตีนด้วย chloroform: isoamyl alcohol (24: 1) พบว่าบางตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการดึงโปรตีนออกแล้วมีลักษณะใส แสดงให้เห็นถึงความสะอาดของดีเอ็นเอที่ได้ แต่บางตัวอย่างมีสีน้ำตาลอ่อนหรือสีเหลืองอ่อน แสดงว่ามีการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอล ซึ่งอาจจะต้องใส่ β-mercaptoethanol มากขึ้น และเมื่อตกตะกอนดีเอ็นเอพบว่าตัวอย่างที่มีตะกอนมากจะละลายได้ยาก ต้องอาศัยเวลาและเพิ่ม TE buffer ซึ่งในการทำให้ละลาย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตปนเปื้อนอยู่ และเมื่อทำการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้น 0.8% พบว่าทุกตัวอย่างปรากฏแถบของดีเอ็นเอทั้งหมด ซึ่งมีขนาดมากกว่า 10 กิโลเบส (ภาพ 1) และมีดีเอ็นเอในทุกตัวอย่างมีแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบเท่านั้น แสดงว่าไม่มีการแตกหักของดีเอ็นเอที่สกัดได้เลยและสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ก็มีปริมาณมากพอที่จะใช้ในการทำอาร์เอพีดีต่อไป



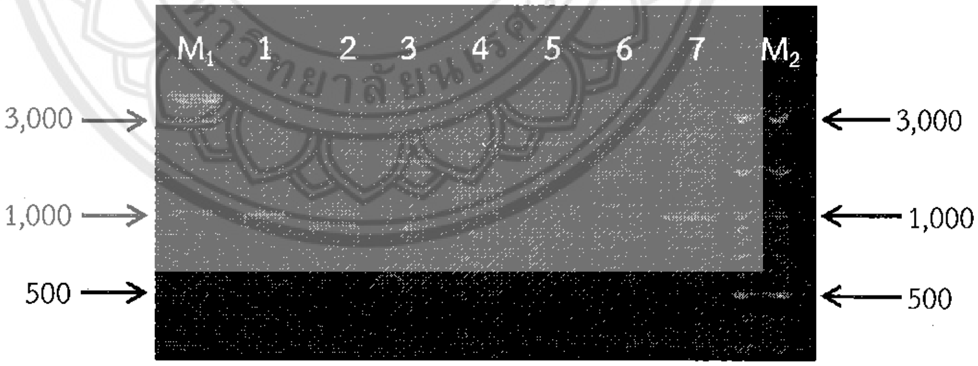
ภาพ 1 ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่พบหลังจากการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB medthod ที่ดัดแปลงจาก Agrawal *et al.* (1992) โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Thermo Scientific) และ 1-10 คือตัวอย่างของบัวสายในสกุลย่อย *Nymphaea* (ตาราง 1)

การคัดเลือกไพรเมอร์จากเทคนิคอาร์เอพีดี

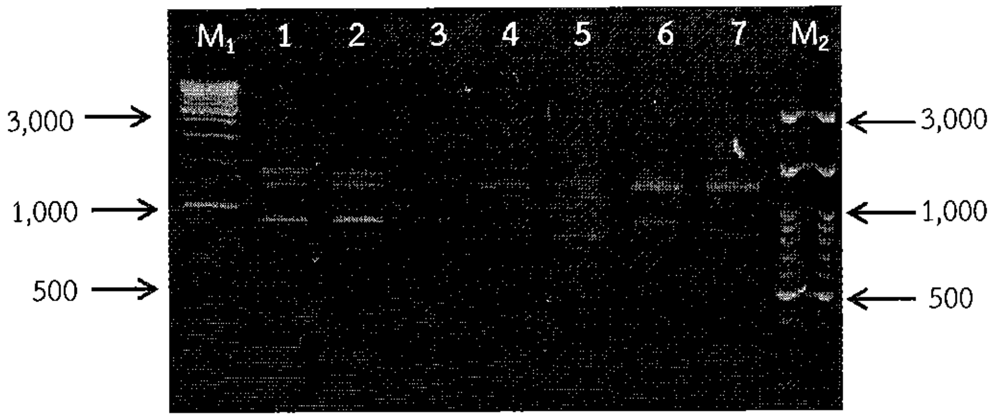
สำหรับบัวสายสกุลย่อย *Anecphya* ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะต้องนำดีเอ็นเอมาทำการเจือจางที่ 5 เท่า ก่อนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เนื่องจากมีความเข้มข้นมาก จากผลการตรวจสอบหาขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% อะกาโรสเจลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ โดยใช้ไพรเมอร์ 30 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 12 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แต่มีไพรเมอร์เพียง 5 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกตัวอย่างและมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมีความชัดเจน (20%) ได้แก่ ไพรเมอร์ JAT02, JAT10, JAT17, JAT19 และ JAT20 มีขนาดตั้งแต่ประมาณ 300-3,000 คู่เบส (ภาพ 2-6)



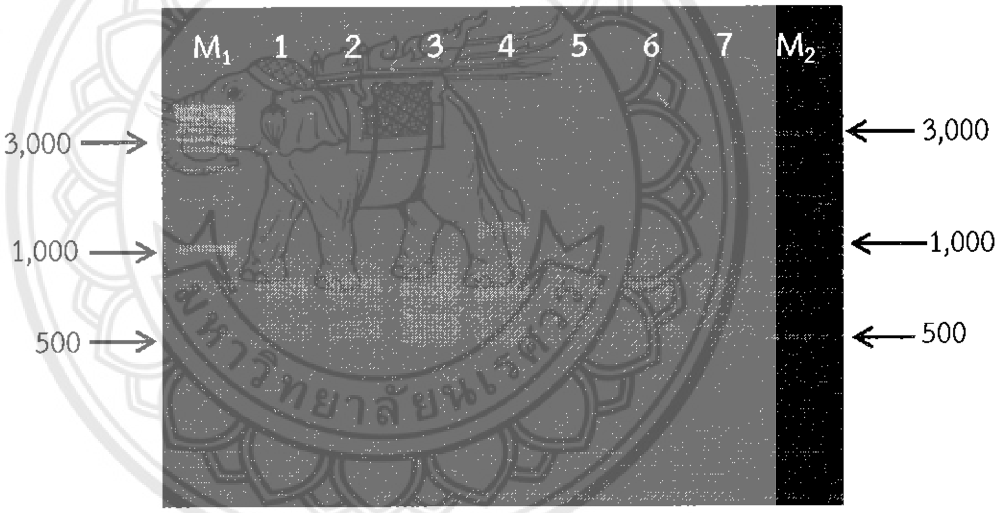
ภาพ 2 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT02 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-7 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* (ตาราง 1)



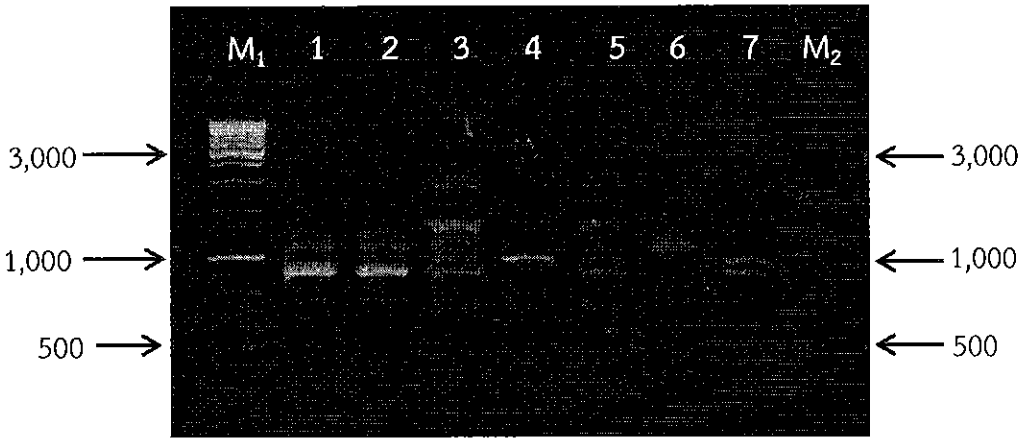
ภาพ 3 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT10 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-7 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* (ตาราง 1)



ภาพ 4 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT17 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-7 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* (ตาราง 1)



ภาพ 5 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT19 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-7 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* (ตาราง 1)



ภาพ 6 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT20 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-7 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* (ตาราง 1)

สำหรับบัวสายสกุลย่อย *Nymphaea* ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ขนาดสั้นแบบสุ่มที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้ง 10 ตัวอย่าง จากการคัดเลือกทั้งหมด 30 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัวสายได้มีจำนวน 20 ไพรเมอร์ แต่พบเพียง 5 ไพรเมอร์เท่านั้นที่ให้แถบดีเอ็นเอปริมาณมากและแตกต่างกัน โดยแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 250–3000 คู่เบส และพบแถบดีเอ็นเอทั้งหมดจำนวน 45 แถบ

แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ JAT17 พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 11 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (monomorphic bands) ปรากฏในทุกตัวอย่างจำนวน 1 แถบ ขนาดประมาณ 1000 คู่เบส ส่วนแถบดีเอ็นเออีก 10 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่พบในบางตัวอย่างเท่านั้น (polymorphic bands) แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากไพรเมอร์นี้มีขนาดตั้งแต่ 250–2400 คู่เบส ซึ่งผลจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์นี้ให้ผลแถบดีเอ็นเอมากที่สุด (ภาพ 7)

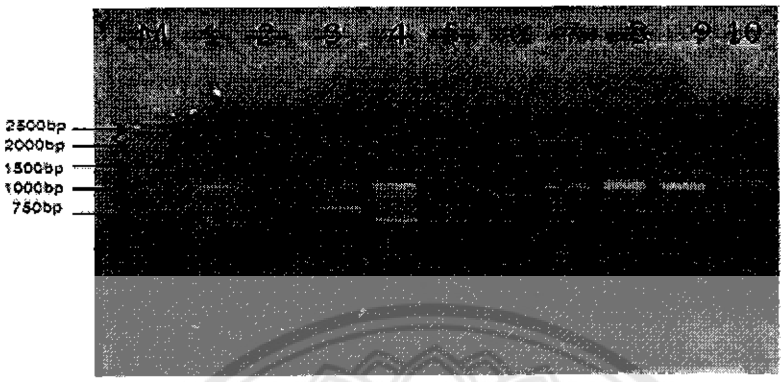
แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ JAT19 พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 10 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่พบในบางตัวอย่างเท่านั้น (polymorphic bands) โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากไพรเมอร์นี้มีขนาดตั้งแต่ 250–1100 คู่เบส (ภาพ 8)

แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ JAT21 พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 9 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่พบในบางตัวอย่างเท่านั้น (polymorphic bands) โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากไพรเมอร์นี้มีขนาดตั้งแต่ 500–1600 คู่เบส (ภาพ 9)

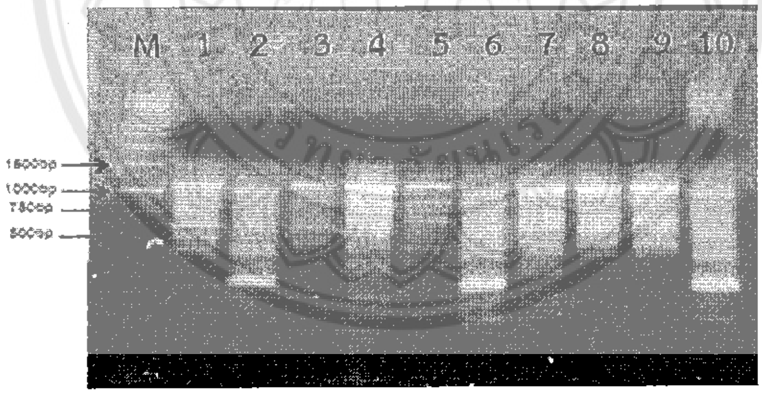
แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ JAT26 พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 10 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่พบในบางตัวอย่างเท่านั้น (polymorphic bands) โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากไพรเมอร์นี้มีขนาดตั้งแต่ 500–2300 คู่เบส (ภาพ 10)

แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีจากไพรเมอร์ JAT29 พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 5 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (monomorphic bands) ปรากฏในทุกตัวอย่าง

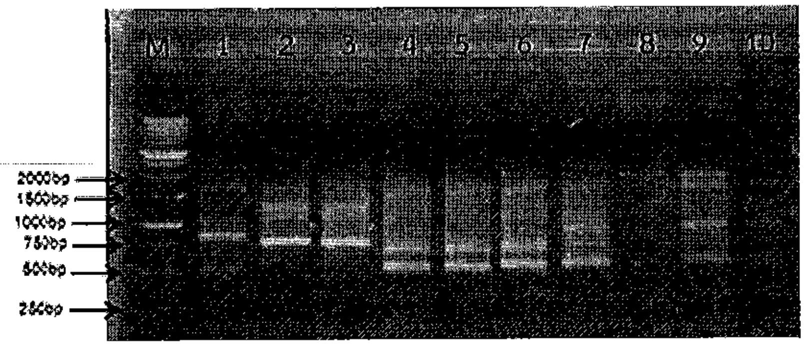
จำนวน 4 แถบ ขนาดประมาณ 900-3000 คู่เบส ส่วนแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่พบในบางตัวอย่างเท่านั้น (polymorphic bands) มีขนาดตั้งแต่ 3000 คู่เบส (ภาพ 11)



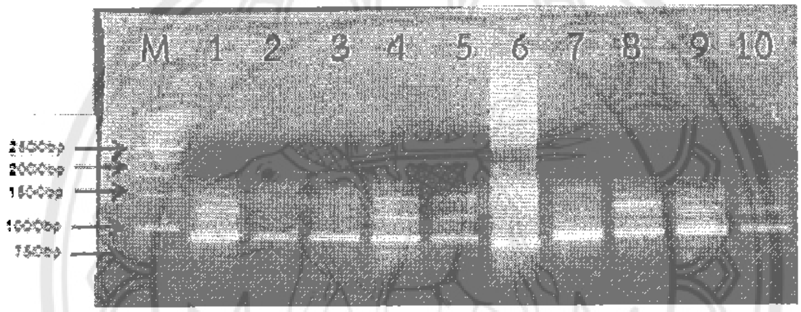
ภาพ 7 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ JAT17 โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Thermo Scientific) และ 1-10 คือตัวอย่างของบัวสายในสกุลย่อย *Nymphaea* (ตาราง 1)



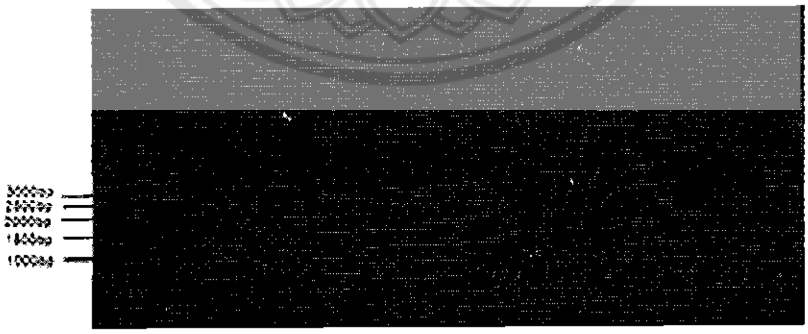
ภาพ 8 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ JAT19 โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Thermo Scientific) และ 1-10 คือตัวอย่างของบัวสายในสกุลย่อย *Nymphaea* (ตาราง 1)



ภาพ 9 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ JAT21 โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Thermo Scientific) และ 1-10 คือตัวอย่างของบัวสายในสกุลย่อย *Nymphaea* (ตาราง 1)

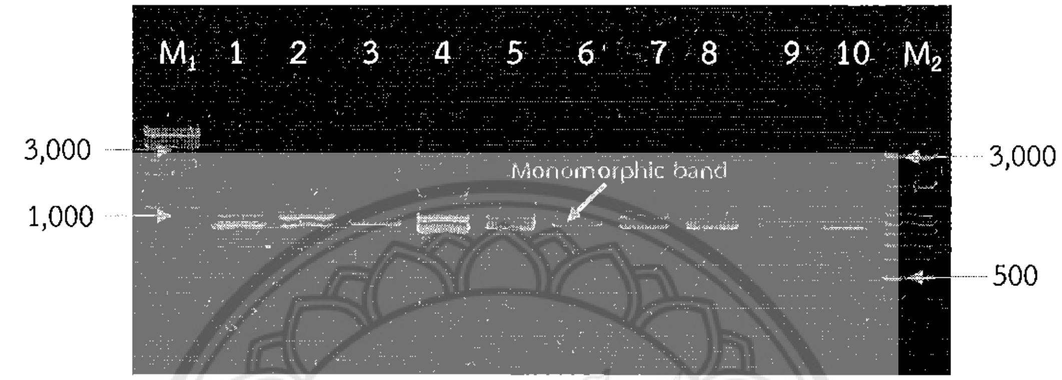


ภาพ 10 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ JAT26 โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Thermo Scientific) และ 1-10 คือตัวอย่างของบัวสายในสกุลย่อย *Nymphaea* (ตาราง 1)

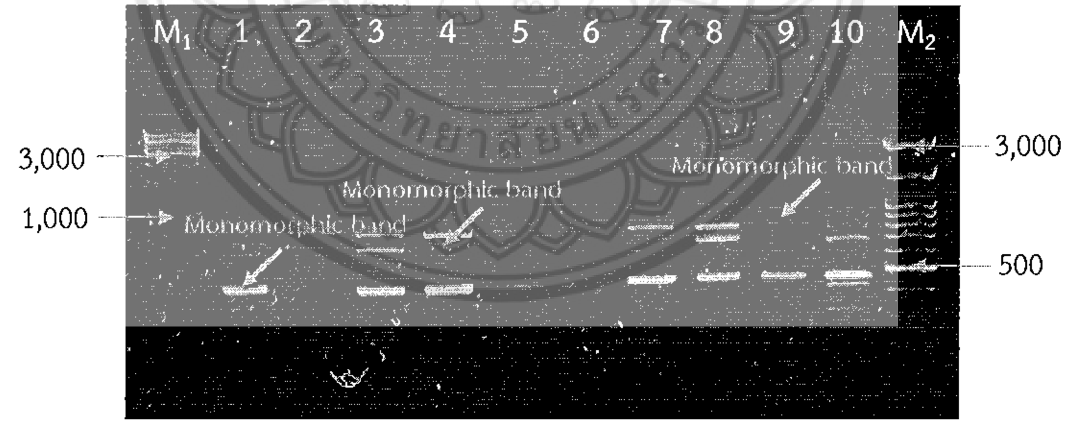


ภาพ 11 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ JAT29 โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Thermo Scientific) และ 1-10 คือตัวอย่างของบัวสายในสกุลย่อย *Nymphaea* (ตาราง 1)

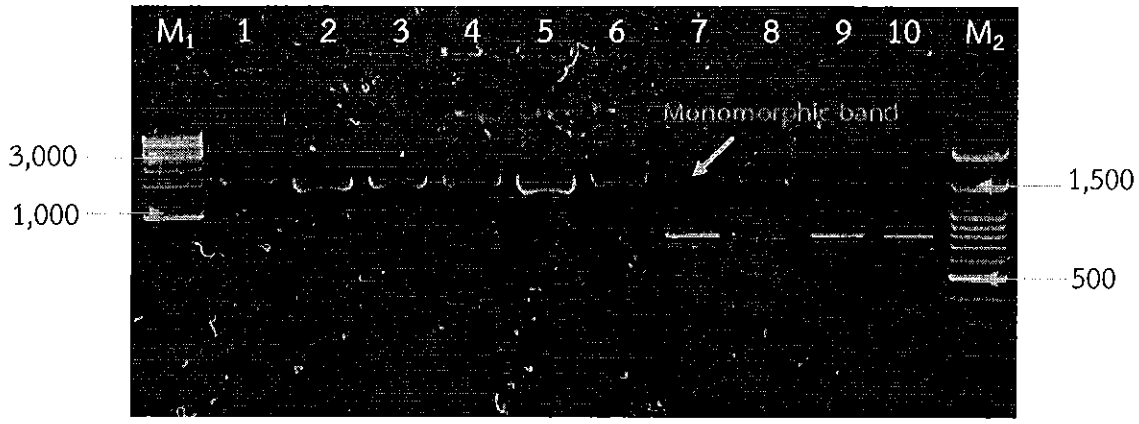
สำหรับบัวสายในสกุลย่อย Lotos นั้น จากชุดไพรเมอร์ JAT ทั้งหมด 30 ไพรเมอร์พบว่ามีทั้งหมด 21 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างมาตรวจสอบกับตัวอย่างทั้งหมด พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 8 ไพรเมอร์ได้แก่ JAT01, JAT02, JAT03, JAT07, JAT12, JAT15, JAT16 และ JAT28 (ภาพ 12-19) ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างและชัดเจน โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200-6000 คู่เบส



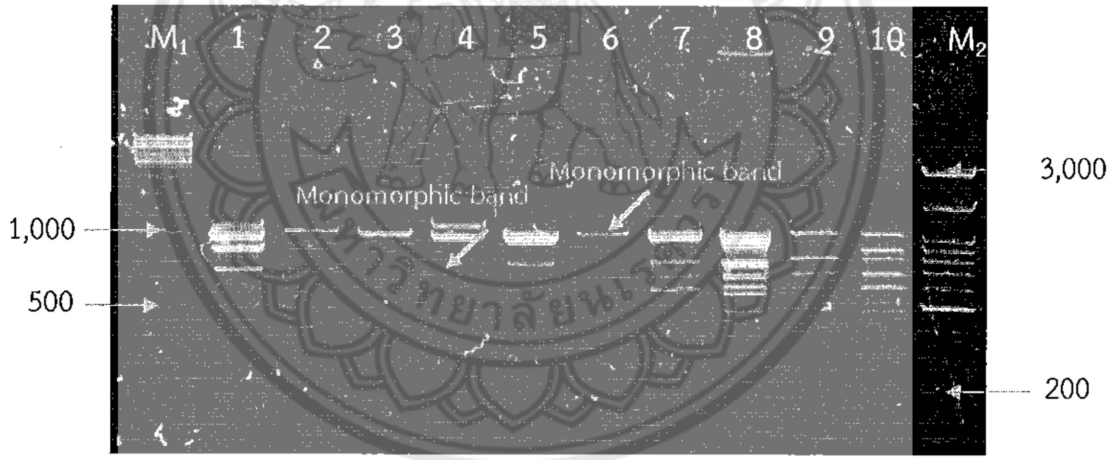
ภาพ 12 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT01 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1)



ภาพ 13 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT02 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1)

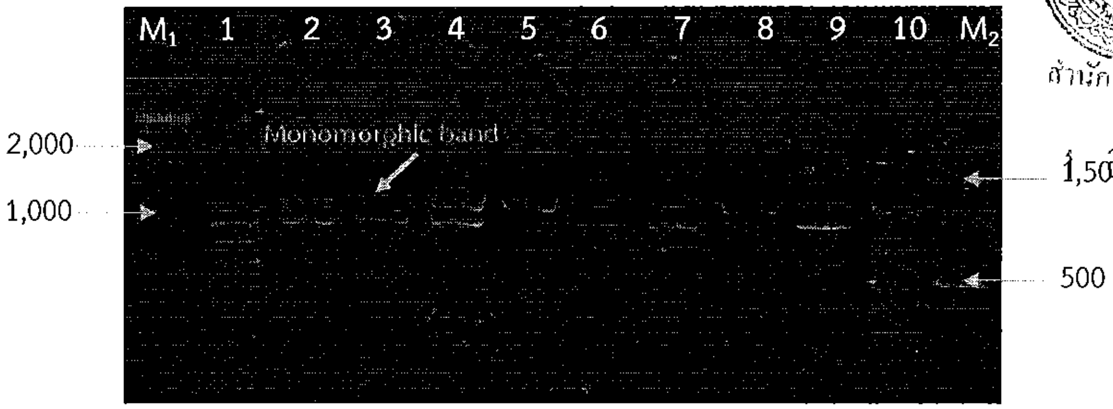


ภาพ 14 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT03 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1)

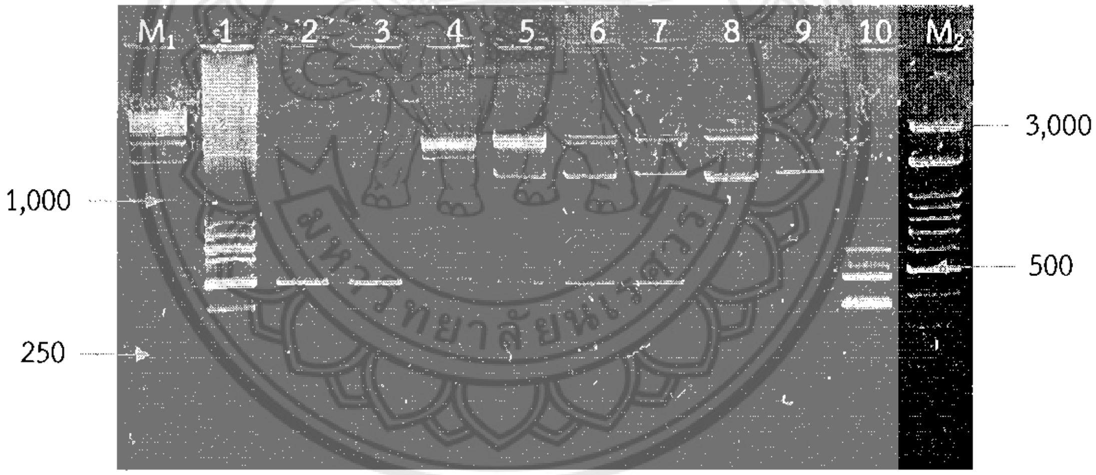


ภาพ 15 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT07 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1)

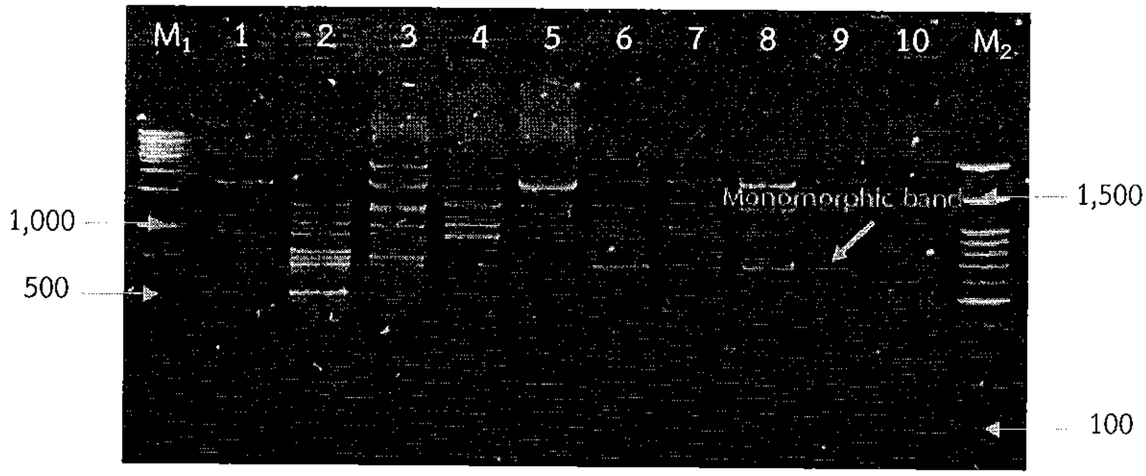
1023008
สำนักหอสมุด
3 ก.ค. 2562



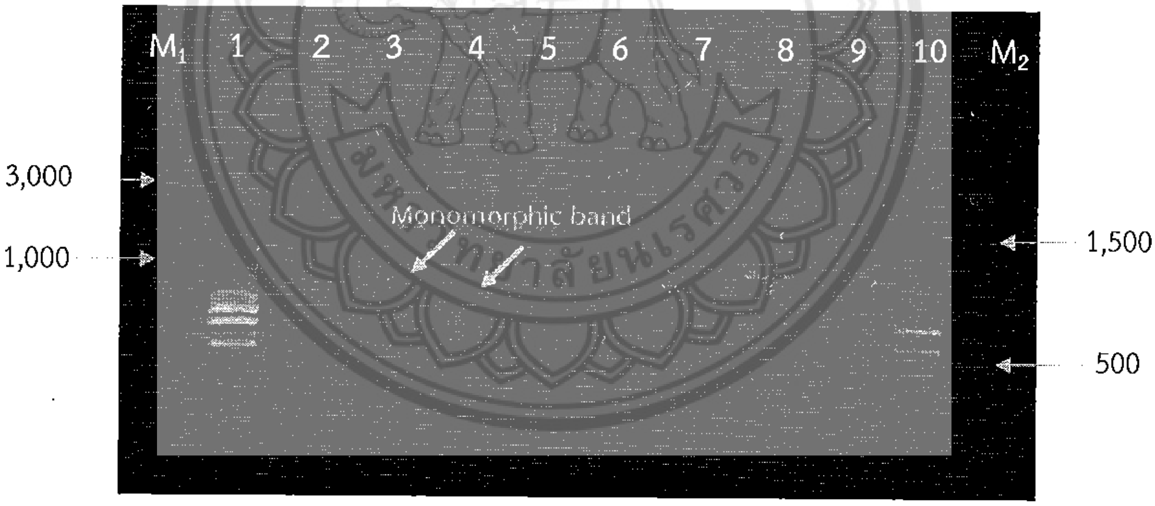
ภาพ 16 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT12 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1)



ภาพ 17 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT15 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1)



ภาพ 18 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT16 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1)



ภาพ 19 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์ JAT28 โดยที่ M_1 = 1Kb DNA Ladder Thermo Scientific; M_2 = 100bp DNA Ladder GeneDirex; 1-10 คือ ตัวอย่างบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* (ตาราง 1)

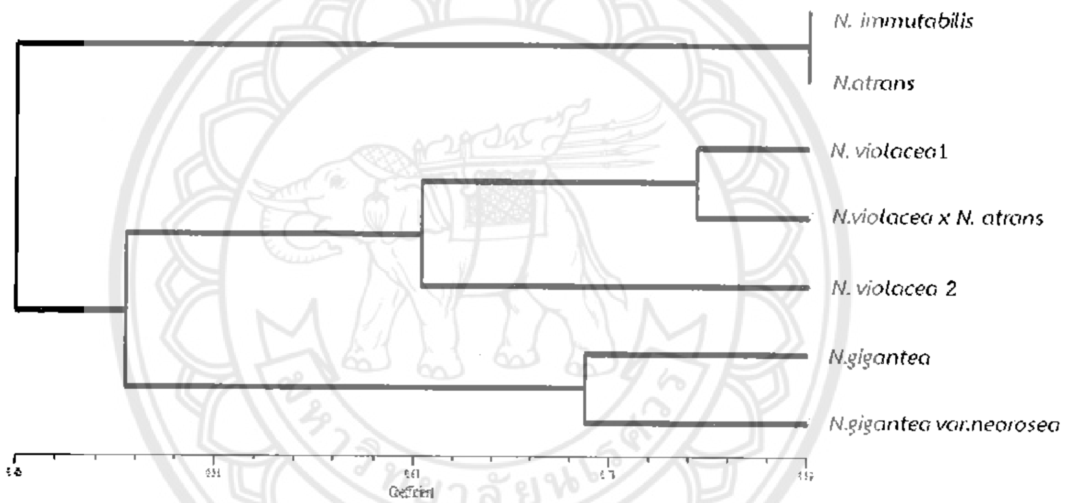
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการจากเทคนิคอาร์เอพีดี

การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวสายวกุลย่อย *Anecphya* โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc.version 2.2e แบบ UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) ออกมาในรูปค่าสัมประสิทธ์ความคล้ายคลึง (ตาราง 4) เพื่อแสดงผลในรูปของ dendrogram (ภาพ 20) พบว่า *N. Immutabilis* และ *N. atrans* มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันมากที่สุด คือ 0.885 *N. atrans* และ *N. violacea*1 มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันน้อยที่สุด คือ 0.402 จากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มบัวสายสกุลย่อย *Anecphya* ออกเป็น 3 กลุ่ม ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง 65% โดยกลุ่มแรกคือ บัวสายชนิด *N. Immutabilis* และ *N. atrans* ซึ่งทั้งสองมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมาก และผลเป็นไปตาม dichotomous key ของ Jacobs and Hellquist (2011) ที่อธิบายไว้ว่า ทั้ง 2 ชนิดมีลำต้นเป็นหัวที่เจริญในแนวตั้งใต้ดิน ดอกชูขึ้นเหนือน้ำชัดเจน มีช่องว่างระหว่างกลีบเลี้ยงและกลีบดอก ก้านชูอับเรณูมีลักษณะเป็นทรงกระบอก ขอบใบหยักซี่ฟันไม่สม่ำเสมอ เมล็ดมีขนาดใหญ่มากกว่า 2.5 มิลลิเมตร มีจำนวนกลีบดอกมากกว่า 10 กลีบ มีเกสรเพศผู้ตั้งแต่ 50-100 อัน แต่มีสิ่งที่แตกต่างกัน คือ *N. immutabilis* เมล็ดส่วนใหญ่จะเป็นรูปไข่แบบ Ovate กลีบเลี้ยงมักจะมีสีเขียวหรือสีฟ้า กลีบดอกวงนอกพบได้ทั้งสีฟ้า สีม่วงหรือสีชมพู สีดอกมักจะสม่ำเสมอทั้งดอก พบบ่อยในทิศตะวันออกเฉียงเหนือของรัฐ Queensland ส่วน *N. atrans* เมล็ดส่วนใหญ่จะเป็นรูปไข่แบบ Oblong กลีบดอกมีหลายสี มักเปลี่ยนแปลงจากสีชมพู ไปเป็นสีชมพูเข้ม และสีแดงในที่สุด พบมากที่ Lakefield National Park, Capeyorkและ รัฐ Queenslandแต่เป็นไปได้ว่า บัวสายออสเตรเลียทั้ง 2 ชนิดนี้อาจจะเป็นบัวสายชนิดเดียวกันตามรายงานการวิจัยของ Borsch, *et al.* (2007) กลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วย *N. violacea*1 ,*N. violacea*2 และ *N.violacea* x *N. atrans* จากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้น บัวสายลูกผสม *N. violacea x N. atrans* มีความใกล้ชิดกับ *N. violacea*1 ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า บัวสายลูกผสมชนิดนี้เป็นลูกผสมที่เกิดจาก *N. violacea*1 แต่เนื่องจากบัวสายลูกผสมชนิดนี้เป็นลูกผสมกับ *N. atrans* ด้วย จากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้นไม่ได้มีความใกล้ชิดกันเลย จึงสันนิษฐานว่าบัวสายลูกผสมชนิดนี้มี *N. violacea* เป็นแม่พันธุ์เพราะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และมี *N. atrans* เป็นพ่อพันธุ์ เพราะดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการวิจัยนั้นสกัดได้มาจากหลายส่วน ซึ่งมีทั้งดีเอ็นเอในนิวเคลียส ดีเอ็นเอในคลอโรพลาส ดีเอ็นเอในไมโทรคอนเดียในสารละลายดีเอ็นเอของ *N. violacea* x *N. atrans* อาจมีดีเอ็นเอที่อยู่ในคลอโรพลาสสูง เพราะการถ่ายทอดดีเอ็นเอของคลอโรพลาสนั้นจะได้รับการถ่ายทอดมาจากทางแม่ รวมถึงดีเอ็นเอในไมโทรคอนเดียด้วย กลุ่มที่ 3 ได้แก่ *N. gigantea* และ *N. gigantea* var. *neorosea* เนื่องจากเป็นบัวสายชนิดเดียวกันแต่มีสีดอกที่แตกต่างกัน จึงมีความสมเหตุสมผลที่บัวสายทั้ง 2 ตัวอย่างจะมีความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกัน

แต่จะเห็นได้ว่าที่ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง 47% บัวสายชนิด *N. violacea* และ *N. gigantea* มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกัน เนื่องจากบัวสายทั้ง 2 ชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางอย่างที่เหมือนกัน คือ มีลำต้นเป็นเหง้าลักษณะตั้งตรง มีกลีบดอกหลายสี ทั้งสีขาว ฟ้า และม่วง

ตาราง 4 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง (Similarity index) โดยที่ 1-7 คือ บัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* (ตาราง 1)

	1	2	3	4	5	6	7
1	1.000						
2	0.885	1.000					
3	0.425	0.402	1.000				
4	0.471	0.425	0.678	1.000			
5	0.506	0.414	0.828	0.690	1.000		
6	0.517	0.540	0.517	0.517	0.506	1.000	
7	0.517	0.540	0.540	0.540	0.575	0.7710	1.000

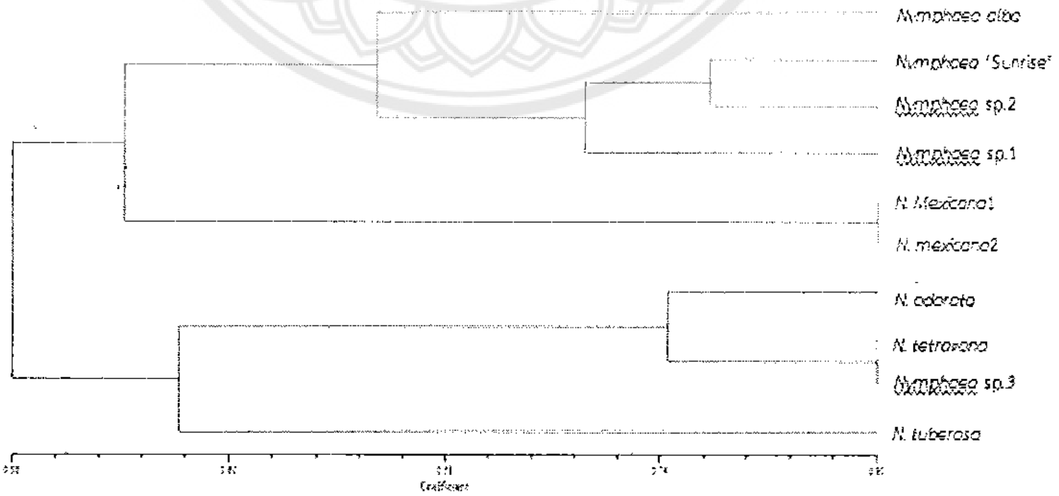


ภาพ 20 Phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเทคนิคอาร์เอพีดีของบัวสายสกุลย่อย *Anecphya* ทั้ง 7 ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวสายวกุลย่อย *Nymphaea* จากแถบดีเอ็นเอที่ได้สามารถใช้แยกความแตกต่างของบัวสายแต่ละตัวอย่าง และบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างตัวอย่างได้ โดยการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น จากข้อมูลที่ได้นี้สามารถนำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc. Version 2.2e แสดงผลในรูปของตารางแสดงค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันด้วย (ตาราง 5) จากนั้นนำไป วิเคราะห์ผลให้อยู่ในรูปของ dendrogram (ภาพ 21) จากตารางพบว่าตัวอย่าง *N. mexicana*1 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกับ *N. mexicana*2 มากที่สุดถึง 0.795 เนื่องจากเป็นตัวอย่างชนิดเดียวกัน และตัวอย่างที่มีค่าสัมประสิทธ์ความคล้ายคลึงกันน้อยที่สุดคือตัวอย่าง *N. odorata* กับตัวอย่างของ *N. Mexicana*1 มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเพียง 0.364 เนื่องจากมีความสัมพันธ์ใกล้กันน้อยที่สุด

ตาราง 5 ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง (Similarity index)

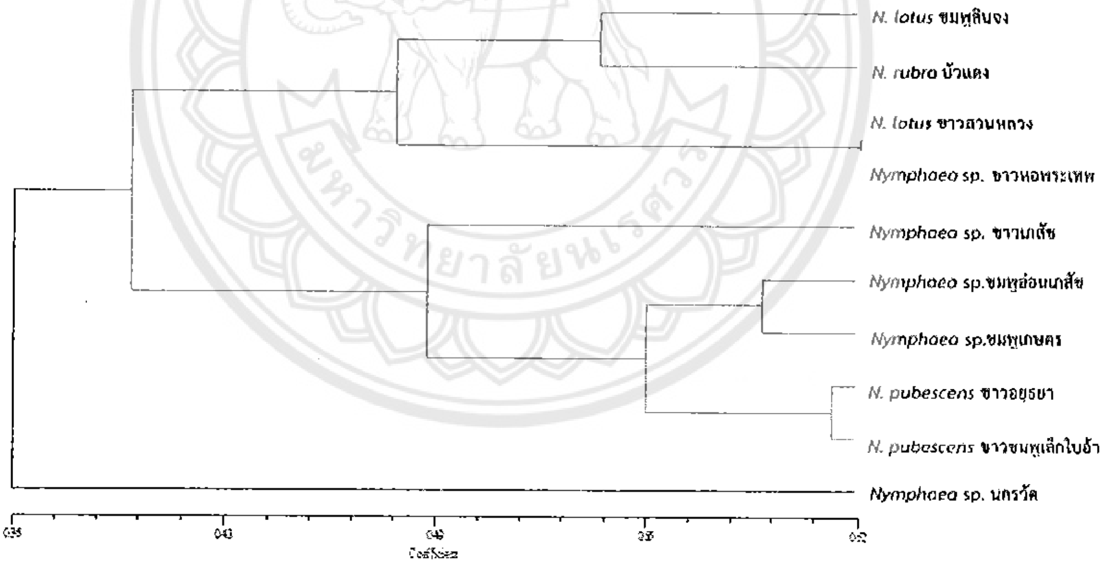
	N. alba	*N. odorata*	*N. tuberosa*	*N. mexicana1*	*N. mexicana2*	*N. tetragona*	Nymphaea 'Sunrise'	*Nymphaea sp.1*	*Nymphaea* sp.2	*Nymphaea* sp.3
N. alba	1.000									
N. odorata	0.523	1.000								
N. tuberosa	0.591	0.705	1.000							
N. mexicana1	0.523	0.364	0.477	1.000						
N. mexicana2	0.545	0.523	0.636	0.795	1.000					
N. tetragona	0.409	0.750	0.545	0.523	0.692	1.000				
N. 'Sunrise'	0.659	0.545	0.614	0.545	0.659	0.568	1.000			
Nymphaea sp.1	0.591	0.569	0.636	0.523	0.591	0.545	0.705	1.000		
Nymphaea sp.2	0.727	0.477	0.545	0.659	0.682	0.545	0.750	0.727	1.000	
Nymphaea sp.3	0.614	0.727	0.568	0.591	0.705	0.795	0.591	0.569	0.614	1.000



ภาพ 21 Phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเทคนิคอาร์เอพีดีของบัวสายสกุลย่อย *Nymphaea* ทั้ง 10 ตัวอย่าง

จาก dendrogram ข้างต้น พบว่า สามารถจัดกลุ่มบัวสายสกุลย่อย *Nymphaea* จากทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ออกเป็น 2 กลุ่มที่ความเหมือนประมาณ 58% โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 6 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่าง *N. alba*, *Nymphaea 'Sunrise'*, *Nymphaea* sp.2, *Nymphaea* sp.1, *N. mexicana*1, *N. mexicana*2 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 4 ตัวอย่าง คือ *Nymphaea odorata*, *N. tetragona*, *Nymphaea* sp.3 *และ N. tuberosa*ซึ่งผลที่ปรากฏดังกล่าวนี้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Borsch et al. (2007) ที่ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชสกุลบัวสายโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ส่วนคลอโรพลาสต์ดีเอนเอบริเวณ *trnT-trnF* เนื่องจาก *Nymphaea odorata* และ*N. tuberosa* นั้นถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และแยกออกห่างจาก *N. maxicana* อย่างชัดเจน

การวิเคราะห์ผลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวสายวกุลย่อย *Lotos* จากการคัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 30 ไพรเมอร์ พบว่ามี 8 ไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจานวนมากชัดเจนและแตกต่างระหว่างตัวอย่างบัวกินสาย วิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Genetic Relationship) คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) ตามวิธีของ Jaccard (1908) พบว่าบัวกินสายทั้ง 10 ตัวอย่างมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วงระหว่าง 0.288-0.617 วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่ม *N. lotus* - *N. rubra* กลุ่ม *N. pubescens* และกลุ่ม *Nymphaea* sp. นครวัด (ภาพ 22)



ภาพ 22 Phylogenetic tree จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเทคนิคอาร์เอพีดีของบัวสายสกุลย่อย *Lotos* ทั้ง 10 ตัวอย่าง

การพัฒนาเครื่องหมาย Sequence characterized amplified region (SCAR)

ผลการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* จำนวน 7 ตัวอย่าง ด้วย 30 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 12 ไพรเมอร์ และเมื่อนำมาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR พบว่าสามารถโคลน หาลำดับดีเอ็นเอ และสร้างเครื่องหมายชนิด SCAR ได้ 5 เครื่องหมาย จากนั้นนำมาทดสอบกับบัวสายชนิดต่างๆ พบว่ามีเพียง 2 เครื่องหมายเท่านั้น (ตาราง 6) ที่แสดงถึงความจำเพาะเฉพาะชนิดของบัวสายนั้นๆ โดยที่ไพรเมอร์ NYM007 ที่พัฒนามาจากบัวสายชนิด *N. atrans* สามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้ง *N. atrans* และ *N. immutabilis* ซึ่งอาจเนื่องมาจากบัวสายทั้ง 2 ชนิดนี้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมาก โดยเมื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวสายในสกุลย่อยนี้พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ *Anecphya* และ *Confluentes* โดยในกลุ่ม *Anecphya* ยังสามารถแบ่งออกได้เป็นอีก 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มย่อย *N. gigantea* และ กลุ่มย่อย *N. atrans* กับ *N. immutabilis* ซึ่งทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมา แตกต่างกันเพียง *N. atrans* นั้นสีดอกจากเปลี่ยนเมื่อดอกแก่ ขณะที่ *N. immutabilis* ไม่เป็นเช่นนั้น (Lohne et al., 2008) แต่ไพรเมอร์ SCAR ชนิดนี้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตัวอย่างของ *N. violacea* x *N. atrans* ได้ อาจจะเนื่องมาจากบริเวณที่เพิ่มจำนวนอยู่ในส่วนของ extrachromosomal DNA ซึ่งในการผสมนี้ใช้ *N. violacea* เป็นต้นแม่ และ *N. atrans* เป็นต้นพ่อ ขณะที่ไพร์เมอร์ NYM010 ที่จำเพาะต่อ *N. gigantea* var. *neorosea* เพราะฉะนั้นแสดงว่าบัวสายพันธุ์นี้มีความแตกต่างจาก *N. gigantea* อย่างชัดเจน ซึ่งอาจสามารถนำมาตั้งเป็นชนิดใหม่ได้ในอนาคต จึงควรมีการศึกษาข้อมูลให้มากกว่านี้ และไพรเมอร์ SCAR อีก 3 คู่ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณได้ในตัวอย่างอื่นๆ อีกหลายชนิด แม้แต่บัวที่ไม่ได้อยู่ในสกุลบัวสาย

ตาราง 6 ไพรเมอร์ SCAR สำหรับบัวสายสกุลย่อย *Anecphya*

Primer SCAR	Samples	Sequences 5'-3'	GC (%)	Tm (°C)	Expected size (bp)
NYM007	*N. atrans*	F: CGCATTGTCAGGGGTGGAAC	60	62.5	465
	N. immutabilis	R: ACGTTCATGGGGCATTTGAC	55	55.8	
NYM010	*N. gigantea*	F: CCTGATCCAGCACAACTA	52.6	52.8	785
	var. *neorosea*	R: TGTCGCCGTCACTATTGATG	50	54.9	

ผลการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของบัวสายในสกุลย่อย *Nymphaea* 10 ตัวอย่าง จากไพรเมอร์จำนวน 30 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 5 ไพรเมอร์ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic band) จำนวน 11 แถบ และเมื่อนำมาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR พบว่าสามารถโคลนและหาลำดับดีเอ็นเอได้จำนวน 2 ชิ้น โดยเมื่อนำไปสร้างเครื่องหมายชนิด SCAR แล้วนำมาทดสอบกับบัวสายชนิดต่างๆ รวมถึงพืชชนิดอื่นด้วย พบว่ามีเพียง 1 เครื่องหมายเท่านั้น (ตาราง 7) ที่แสดงถึงความจำเพาะเฉพาะชนิดของบัวสายนั้นๆ โดยที่ไพรเมอร์ NYM005 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 2 ตัวอย่าง คือ *Nymphaea* 'Sunrise' และ

Nymphaea sp.1 ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะภายนอกทั้งใบ ดอก เกสรเพศผู้ และเกสรเพศเมียของ 2 ตัวอย่างมีความคล้ายคลึงกันมาก แต่เก็บจากคนละแหล่งปลูก จึงน่าจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน และ *Nymphaea* sp.2 และ 3 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์คู่ได้ ขณะที่อีกหนึ่งไพรเมอร์ไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แถบดีเอ็นเอเป็นรอยสเมียร์ในทุกตัวอย่าง

ตาราง 7 ไพรเมอร์ SCAR สำหรับบัวสายสกุลย่อย *Nymphaea*

Primer SCAR	Samples	Sequences 5’-3’	GC (%)	Tm (°C)	Expected size (bp)
NYM005	*Nymphaea* ‘Sunrise’	F : CGGGATGTGAGTGTTTGACC R: TGCGTTCTTTTCTCTTTCCC	55 45	56 53.1	200

ผลการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* 10 ตัวอย่าง จากไพรเมอร์จำนวน 30 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 8 ไพรเมอร์ และเมื่อนำมาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR พบว่าสามารถโคลนและหาลำดับดีเอ็นเอได้จำนวน 3 ชิ้น โดยเมื่อนำไปสร้างเครื่องหมายชนิด SCAR แล้วนำมาทดสอบกับบัวสายชนิดต่างๆ พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะสำหรับตัวอย่างนั้นๆ ได้ แต่พบว่าเครื่องหมาย SCAR 2 เครื่องหมายคือ NYM001 และ NYM003 สามารถใช้เป็น universal primer สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบัวสายชนิดอื่นๆ ได้ด้วย สำหรับไพรเมอร์ SCAR อีก 1 ไพรเมอร์ (NYM 002) นั้น สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในทุกตัวอย่างของบัวสายในสกุล *Nymphaea* จึงจัดให้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับบัวสายในสกุลนี้ได้ แต่ยังไม่สามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR สำหรับบัวสายสกุลย่อย *Lotos* ได้ ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเนื่องมาจากสกุลย่อยบัวกินสายนี้มีความสัมพันธ์ทางวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันมาก นอกจากนี้แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากเทคนิคอาร์เอพีดีก็คล้ายคลึงกัน จึงหาแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะยากมาก ดังนั้นบัวสายในสกุลย่อยนี้จึงควรมีการศึกษาในรายละเอียด โดยใช้เทคนิคหรือเครื่องหมายดีเอ็นเออื่น เช่น ISSR เพื่อให้สามารถจำแนกชนิดที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

สรุปผลการวิจัย

การสกัดดีเอ็นเอ

ในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบของบัวสายทั้ง 3 สกุลย่อยด้วยวิธีดัดแปลง CTAB method ของ Agrawal *et al.* (1992) สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณมากและเมื่อตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอและคุณภาพของดีเอ็นเอมีคุณภาพดีและปริมาณมากพอสำหรับใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

การคัดเลือกไพรเมอร์จากเทคนิคอาร์เอพีดี

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อทำการคัดเลือกไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมกับตัวอย่างของบัวสายทั้ง 3 สกุลย่อย โดยคัดเลือกจากไพรเมอร์ทั้งหมด 30 ไพรเมอร์ซึ่งเป็นไพรเมอร์แบบสุ่ม ซึ่งพบว่ามีไพรเมอร์แบบสุ่มที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างตัวอย่างของบัวสายในแต่ละสกุลย่อยได้

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการจากเทคนิคอาร์เอพีดี

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว พบแถบดีเอ็นเอทั้งที่เป็น monomorphic bands และ polymorphic bands ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของแต่ละตัวอย่างได้ โดยเมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่าในทั้งบัวสาย 3 สกุลย่อยดังกล่าวให้แบบแผนที่ชัดเจนและมีความคล้ายคลึงกันในระดับปานกลาง แสดงให้เห็นว่าบัวสายใน 3 สกุลย่อยนี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมในระดับปานกลางเช่นเดียวกัน

การพัฒนาเครื่องหมาย Sequence characterized amplified region (SCAR)

จากการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR จากแถบดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อใช้ในการระบุชนิดของบัวสายใน 3 สกุลย่อย ได้แก่ บัวออสเตรเลีย (*Anecphya*) บัวฝรั่ง (*Nymphaea*) และบัวกินสาย (*Lotos*) นั้น สามารถพัฒนาได้ 3 เครื่องหมายสำหรับสกุลย่อย *Anecphya* และ *Nymphaeae* คือ เครื่องหมาย SCAR สำหรับ *N. atrans* และ *N. immutabilis* เครื่องหมายดีเอ็นเอ SCAR สำหรับ *N. gigantea* var. *neorosea* และเครื่องหมาย SCAR สำหรับ *Nymphaea* 'Sunrise' สำหรับบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* ก็ควรมีการพัฒนาต่อไป อาจจะใช้เทคนิคอื่นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เช่น SRAP (Sequence related amplified polymorphic) เพื่อให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมากขึ้น แล้วนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อไป

เอกสารอ้างอิง

คุณา นนทพัฒน์, 2546, การปลูกบัวประดับ, พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ พี พี เวิลด์ มีเดีย จำกัด.

จอมสุดา ตวงวงษา, 2546, ความแปรผันทางพันธุกรรมกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) จากประเทศไทยและพม่า โดยการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

จันทร์เพ็ญ สะระ, ฉันทนา วิชรัตน์, ธีรนุช เจริญกิจ และแสงทองพงษ์เจริญกิต, 2556, การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR เพื่อใช้ในการจำแนกลำไยลูกผสมระหว่างพันธุ์ดอ 27 และสีชมพู, รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 18, น. 244-247.

ณัฐกานต์ โกเสนตอ สุณิสา ณัฐพรณิชกุล และ มลิวรรณ นาคขุนทด, 2557, การจัดจำแนกพืชวงศ์บัวสายโดยใช้คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ, วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลับบูรพา, 1-5.

มลิวรรณ นาคขุนทด, 2553, การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของละอองเรณูในบัวสายเขตอบอุ่นและเขตร้อน, ว.วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม, 12: 60-73.

มลิวรรณ นาคขุนทด , 2554, รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการ เรื่อง การจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของบัวสาย (Nymphaea L.) ในประเทศไทย โดยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล, มหาวิทยาลัยนเรศวร

มลิวรรณ นาคขุนทด, 2557, ซิสเต็มมาติกระดับโมเลกุลของบัวสายสกุลย่อย *Lotos* โดยใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์และนิวเคลียส. รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 8, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, น. 69.

มลิวรรณ นาคขุนทด และณัฐวุฒิ วงศ์อนันต์, 2556, ความหลากหลายของรูปแบบนิวคลีโอไทด์บริเวณ ribosomal DNA ในบัวกินสาย, รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 5, มหาวิทยาลัยพะเยา, น. 322.

มลิวรรณ นาคขุนทด และปัทมา เสนทอง, 2552, การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในประเทศไทยด้วยวิธีอาร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, 6: 55-65.

มลิวรรณ นาคขุนทด และ วสันต์ เอื้อมลฉัตร, 2555, การจัดจำแนกพืชสกุลบัวสาย (Genus *Nymphaea* L.) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*T-L, ว.วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, 6: 11-20.

วลัยลักษณ์ หัตถบูรณ์, 2554, การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจจากจังหวัดจันทบุรี ปริญญานิพนธ์ : 19–35 น.

วสันต์ เอื้อมลฉัตร, 2555, การจัดจำแนกพืชสกุลบัวสาย (Genus *Nymphaea* L.) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยนเรศวร, 90 น.

วิชาญ เอียดทอง, 2556, ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชสกุลบัวสาย, เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการและอุทยานบัวในวัฒนธรรมไทย, สำนักพิพิธภัณฑ์และวัฒนธรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิเชษฐ ค้าสุวรรณ, 2537, การปลูกบัว, พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ: ไทยวัฒนาพานิช จำกัด.

สมเกียรติ ตั้งกิจวานิชย์, 2556, สารคดี ฝันของนักผสมพันธุ์บัว, กรุงเทพฯ วิริยะธุรกิจ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545, จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการณ์อาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Borsch, T., Hilu, K.W., Wiersema, J.H., Lohne, C., Barthlott, W. and Wildes, V., 2007, Phylogeny of *Nymphaea* (Nymphaeaceae) : evidence from substitutions and microstructure changes in the chloroplast *trn*T-*trn*L region, Int. J. Pl. Sci. 168: 639-671.

Conard, H.S. (1905).The Waterlilies: A Monograph of the Genus *Nymphaea*. Washington: Carnegie listitution.

Cheng, J., Yan, L., Md. Asaduzzaman, K., ChunliWei, S.F. and Junjiang, F., 2014, Development and significance of RAPD-SCAR markers for the identification of *Litchi chinensis*Sonn. by improved RAPD amplification and molecular cloning. Electronic Journal of Biotechnology.18: 35–39.

Jaccard, P., 1908, Nouvelles recherches sur la distribution florale, Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat. 44: 223-270.

Jacobs, S.W.L. and Hellquist, C.B., 2011, New species, possible hybrids and intergrades in Australian *Nymphaea* (Nymphaeaceae) with a key to all species, Telopea 13: 233–243.

Kim, C., Lee, G., Han, D., Ryu, K. and Lee, C., 2000, SCARs marker Derived form RAPD for Cultivar Identification in Pyruspyrifolia, Journal of the Korean Society for Horticultural Science. 41(2): 125-128.

Lohne, C., Borsch, T., Jacobs, S.W.L., Hellquist, C.B. and Wiersema, J.H., 2008, Nuclear and plastid DNA sequences reveal complex reticulate patterns in Australian waterlilies (*Nymphaea* subgenus *Anecphya*, Nymphaeaceae), Austral. Syst. Bot. 21: 229-250.

Omalsaad, A. K. M., Aminul, I., Murshida, A.J., Zahira, Y. and Mohamad, O., 2014, Genetic relationship between roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) accessions through optimization of PCR based RAPD method,

Journal ofof Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bangabandhu Sheikh MujiburRahman Agricultural University

Poczai, P., Matyas, K.K., Szabo, I., Varga, I., Hyvonen, J., Cernak, I., Gorji, A.M., Decsi, K. and Taller, J., 2011, Genetic variability of Thermal *Nymphaea* (Nymphaeaceae) populations based on ISSR markers: Implications on relationships, hybridization and conservation, Plant Mol. Biol. Rep. 29: 906-918.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual.2nd ed. Cold Spring Habor Laboratory Press, New York.

Sharma, S., 1993. The 1837–38 famine in U.P.: Some dimensions of popular action. Indian Economic and Social History Review 30: 337–372.

Slocum, P.D., 2005, Waterlilies and Lotuses: Species, Cultivars, and New Hybrids. Portland, Oregon, USA, 265 p.

Wang, Z., ZHANG, Z., LI, H., GAO, X., DU, G. and TAN, C., 2007, Identification of Strawberry Cultivars by RAPD and SCAR Marker, Acta Horticulturaesinica. Retrieved May 30,2015from http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTALYYXB200703011.htm

Williams, G.K.J., Kubelik, R.A., Livak, J.K., Rafalski, J.A. and Tingey. V.S., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genrtic markers. Nucleic Acids Research.18: 6531-6535.

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันที่ 30 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2560

เรื่อง ตอบรับการตีพิมพ์บทความ

เรียน ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด

สิ่งที่ส่งมาด้วย

ความเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 1
ความเห็นของผู้ทรงคุณวุฒิท่านที่ 2

ตามที่ท่านได้ส่งบทความชื่อ การพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR เพื่อใช้ในการระบุชนิดบัวสาย เพื่อขอรับการพิจารณาตีพิมพ์ในวารสาร วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี บัดนี้ ผู้ทรงคุณวุฒิได้อ่านและให้ความเห็นต่อบทความของท่านแล้ว มีความเห็น "ให้ตีพิมพ์บทความโดยไม่ต้องแก้ไข"

ในการนี้ กองบรรณาธิการจึงมีความยินดีจะแจ้งให้ท่านทราบว่าบทความของท่านจะได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ขอให้ท่านดำเนินการในขั้นตอนมอบลิขสิทธิ์ผ่านระบบ TU-OSS เป็นขั้นตอนสุดท้าย กองบรรณาธิการจะเผยแพร่บทความของท่านผ่านหน้าเวบไซต์ http://tuoss.research.tu.ac.th/forthcoming/list?code=urfwpn1u ก่อนดำเนินการจัดพิมพ์เป็นเล่มต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(รศ.ดร.ธีระชัย ธนานันต์)
บรรณาธิการ

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผลการประเมินบทความ การพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR เพื่อใช้ในการระบุชนิดบัวสาย

ชื่อเรื่อง	ควรระบุชื่อสกุลที่ศึกษาในครั้งนี้
บทคัดย่อ	กระชับได้ใจความ ควรแก้ไขการใช้คำว่า "มีการพัฒนา" โดยใช้คำอื่นที่สื่อความหมายว่าผู้วิจัยได้คัดเลือก หรือทดสอบแล้ว
คุณค่าในการนำไปใช้ประโยชน์ของบทความ	มีประโยชน์ต่อการนำ marker ใช่บ่งชี้ชนิดของบัวสาย
วิธีการศึกษา/ระเบียบวิธีที่ใช้/แนวทางการศึกษา	ระเบียบวิจัยตามมาตรฐาน
ความเชื่อถือได้ของข้อมูล/การวิเคราะห์ข้อมูล	ปานกลาง ควรมีรูปเจลแสดงคุณภาพของข้อมูล เพื่อการรีวิว แต่ไม่จำเป็นต้องใช้ตีพิมพ์
ภาษาที่ใช้/แนวทางและรูปแบบการนำเสนอ	ระดับดี แต่ยังมีการใช้คำฟุ่มเฟือย เช่น "ทำการ" และ "ซึ่ง" ควรปรับให้กระชับ
การสรุปผล/การอภิปรายผล/การสังเคราะห์งาน	สรุปได้ชัดเจนตามข้อมูลงานวิจัย
การอ้างอิง	
สรุปผลการพิจารณา	เหมาะสมที่จะลงพิมพ์ได้โดยต้องมีการแก้ไขเพิ่มเติมในส่วนที่ได้แนะนำในผลงาน โดยไม่จำเป็นต้องส่งกลับมาให้ตรวจอีก
ข้อเสนอแนะอื่นๆ	1. มีข้อเสนอแนะสำหรับการการแก้ในไฟล์ที่แนบ
ไฟล์เพิ่มเติมจากผู้อ่าน	แสดง

ผลการประเมินบทความ การพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR เพื่อใช้ในการระบุชนิดบัวสาย

ชื่อเรื่อง	การพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR เพื่อใช้ในการระบุชนิดบัวสาย
บทคัดย่อ	
คุณค่าในการนำไปใช้ประโยชน์ของบทความ	เป็นบทความที่มีแนวคิดในการพัฒนาและใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล มาใช้ในการจำแนกพืชในกลุ่มบัว สามารถนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้ในอนาคต
วิธีการศึกษา/ระเบียบวิธีที่ใช้/แนวทางการศึกษา	
ความเชื่อถือได้ของข้อมูล/การวิเคราะห์ข้อมูล	
ภาษาที่ใช้/แนวทางและรูปแบบการนำเสนอ	
การสรุปผล/การอภิปรายผล/การสังเคราะห์งาน	
การอ้างอิง	
สรุปผลการพิจารณา	เหมาะสมที่จะลงพิมพ์ได้โดยไม่ต้องแก้ไขหรือเพิ่มเติม
ข้อเสนอแนะอื่นๆ	1. ตรวจสอบการแก้ไขตามเอกสารแนบ
ไฟล์เพิ่มเติมจากผู้อ่าน	แสดง

บทความเผยแพร่ใน วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR เพื่อใช้ในการระบุชนิดบัวสายสกุล *Nymphaea*

Development of RAPD-SCAR markers for waterlily in genus *Nymphaea* identification

มลิวรรณ นาคขุนทด* อิษยา แคนติ ธิดา มาชัยงาม และ นันทวิภา คำมา

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก 65000

Maliwan Nakkuntod* Itsaya Khaenti Thida Machainam and Nantavipa Khamma

Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000

บทคัดย่อ

การพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR สำหรับการระบุชนิดของบัวสายใน 3 สกุลย่อย ได้แก่ *Anecphya Nymphaea* และ *Lotos* จำนวน 27 ตัวอย่าง จากการคัดเลือกอาร์เอพีดีไพรเมอร์จำนวน 30 ชนิด พบอาร์เอพีดีไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมี 18 ไพรเมอร์ (60%) และเมื่อทำการพัฒนาเครื่องหมาย SCAR สำหรับบัวสายแต่ละสกุลย่อย พบว่าในสกุลย่อย *Anecphya* จำนวน 7 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกได้ 5 เครื่องหมาย โดยมี 2 เครื่องหมายคือ NYM007 ที่มีความจำเพาะกับบัวสายชนิด *N. atrans* และ *N. immutabilis* และ NYM010 ที่มีความจำเพาะกับบัวสายชนิด *N. gigantea* var. *neorosea* ในสกุลย่อย *Nymphaea* จำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกได้ 2 เครื่องหมาย โดยมี 1 เครื่องหมายที่มีความจำเพาะต่อ *Nymphaea* 'Sunrise' และในสกุลย่อย *Lotos* จำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกได้ 3 เครื่องหมาย แต่ไม่มีเครื่องหมายใดที่จำเพาะต่อบัวสายในสกุลย่อยนี้เลย ดังนั้นสามารถพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR ทั้งหมด 3 เครื่องหมายสำหรับใช้ระบุชนิดของบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* และ *Nymphaea* ได้

คำสำคัญ: อาร์เอพีดี, เครื่องหมายดีเอ็นเอ, บัวสาย

Abstract

RAPD-SCAR markers were developed for waterlily species identification among 27 samples of three subgenera, namely *Anecphya*, *Nymphaea* and *Lotos*. Thirty RAPD primers were screened and 18 primers (60%) showed polymorphic bands. Four SCAR markers were obtained for 7 waterlily samples in subgenus *Anecphya*. NYM007 primer provides a specific band for *N. atrans* and *N. immutabilis* while the NYM010 could amplify only *N. gigantea* var. *neorosea*. Two SCAR markers were used for 10 waterlily samples in subgenus *Nymphaea* and NYM005 provides a specific band for *Nymphaea* 'Sunrise'. The other two SCAR markers were developed for 10 waterlily samples in subgenus *Lotos* but no marker was obtained to specify this subgenus. Therefore, this study provides three RAPD-SCAR markers for identifying waterlily species in subgenus *Anecphya* and *Nymphaea*.

Keyword: RAPD, DNA markers, waterlily, *Nymphaea*

บทนำ

พืชสกุลบัวสาย (*Nymphaea* L.) สามารถแพร่กระจายพันธุ์ไปได้ทั่วโลก ตั้งแต่เขตร้อนจนถึงเขตอบอุ่น ยกเว้นเขตอาร์คติก [1] เขตการกระจายพันธุ์และลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความหลากหลายสูงสามารถจัดจำแนกพืชสกุลบัวสายนี้ออกได้อีกเป็น 5 สกุลย่อย ซึ่งแต่ละสกุลย่อยก็มีลักษณะเฉพาะ เช่น ลักษณะขอบใบ รูปร่างใบ และลักษณะของดอก [2,3] จากลักษณะสัณฐานวิทยาละอองเรณูสามารถจำแนกบัวสายเขตอบอุ่นและเขตร้อนได้ชัดเจน จากลักษณะของผนังละอองเรณูและช่องเปิด [4] พืชสกุลบัวสายมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเป็น n=x=14 และพบลักษณะที่เป็นโพลิพลอยด์ที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดตั้งแต่ดิพลอยด์จนถึงเฮกซาเดคาพลอยด์ เนื่องจากจำนวนชุดของโครโมโซมที่แตกต่างกันนี้ทำให้เกิดบัวสายชนิดใหม่และลูกผสมใหม่ๆ ขึ้นมากมายในปัจจุบัน

พืชในสกุลบัวสายประกอบด้วย 5 สกุลย่อย ได้แก่ สกุลย่อย *Anecphya* หรือบัวออสเตรเลีย ที่มีการกระจายพันธุ์เฉพาะในประเทศออสเตรเลียเท่านั้น สกุลย่อย *Brachyceras* หรือบัวผัน บัวเผื่อน ที่มีการกระจายพันธุ์ทั่วโลก สกุลย่อย *Hydrocallis* ที่มีการกระจายพันธุ์ในทวีปอเมริกาใต้ สกุลย่อย *Nymphaea* หรือบัวฝรั่ง ที่มีการกระจายพันธุ์ในทวีปอเมริกาเหนือ และ สกุลย่อย *Lotos* หรือบัวกินสาย ที่มีการกระจายพันธุ์ในทวีปเอเชียเขตร้อน บัวสายในสกุลย่อยบัวออสเตรเลียนั้น ปัจจุบันนำเข้ามาปลูกแพร่หลายในประเทศไทยเพื่อความสวยงาม ประดับตกแต่งสถานที่ โดยมีลักษณะของรูปทรงดอกที่แตกต่างจากบัวสายชนิดอื่น และเกสรเพศผู้มีลักษณะยาว เรียว สีดอกมีทั้งสีชมพู ม่วง จนถึงน้ำเงิน ในบางชนิด เช่น *N. atrans* สามารถเปลี่ยนสีดอกได้ เมื่อดอกมีอายุแก่อ่อน ขณะที่บัวสายในสกุลย่อยบัวฝรั่ง ก็เป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่นิยมนำเข้ามาปลูกกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะบัวลูกผสม เช่น Nymphaea 'Sunrise' ที่มีดอกสีเหลือง ขนาดใหญ่ นิยมปลูกในสระหรือทะเลสาบที่มีแสงแดงจัด [5] จึงเป็นที่ต้องการของตลาดในประเทศเขตร้อนอย่างประเทศไทย บัวฝรั่งนั้นมีลักษณะเด่นคือขอบใบเรียบ ยุบตัวในช่วงฤดูหนาวกลีบดอกหนา ทน ดอกสีขาว เหลือง และบัวสายในสกุลย่อยบัวกินสายนั้น คนไทยรู้จักและใช้ประโยชน์โดยนำมาประกอบอาหารกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งส่วนที่ใช้ก็คือสายบัวหรือก้านดอกนั่นเอง บัวกินสายเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี ที่มีส่วนของลำต้นใต้ดินที่เรียกว่า rhizome หรือ rootstock ยึดเกาะกับโคลนใต้น้ำ ดอกมีสีสรรสวยงาม ตั้งแต่สีขาว ขาวอมชมพู ชมพูจนถึงแดง และมีกลิ่นหอม จึงเป็นที่นิยมนำมาจัดแต่งสวน [6] และมีรายงานการพบบัวจงกลณี ซึ่งเป็นบัวสายที่ยังหาข้อสรุปไม่ได้ว่าเป็นลูกผสมในธรรมชาติหรือเกิดจากการกลายพันธุ์ โดยบัวจงกลนีนี้มีลักษณะร่วมของทั้งบัวสายสกุลย่อย *Lotos* และสกุลย่อย *Brachyceras* แต่จากการตรวจสอบข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งบริเวณดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์และนิวเคลียส พบว่าบัวจงกลนีนั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับบัวสายสกุลย่อย *Brachyceras* มากกว่า *Lotos* [7,8,9] ดังนั้นจึงน่าจะเป็นบัวสายที่เกิดจากการกลายพันธุ์ในธรรมชาติมากกว่าจะเป็นลูกผสม ซึ่งจะเห็นว่าพืชสกุลบัวสายนั้นมีความหลายหลากสูง รวมทั้งมีลูกผสมจำนวนมาก นำไปสู่ความสับสนในการจัดจำแนกเพื่อระบุชนิดและพันธุ์ของบัวสายทั้งในระดับสกุลและสกุลย่อย เมื่ออาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ดังนั้นการนำข้อมูลทางดีเอ็นเอเข้ามาใช้ช่วยในการจัดจำแนกจึงเป็นอีกทางหนึ่ง เพื่อให้เกิดความถูกต้องชัดเจนมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด RAPD-SCAR ขึ้นมาช่วยในการจัดจำแนกและยืนยันชนิดพันธุ์พืชต่างๆ อีกด้วย

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีที่เรียกว่า RAPD-SCAR (Random Amplified Polymorphic DNA - Sequence Characterized Amplified Region) สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ตรวจสอบและคัดเลือกสายพันธุ์พืชต่างๆ เช่น ภริตา ต้นสายเพ็ชร และ เฌอมาลย์ วงศ์ชาวจันท์ ทำการคัดเลือกพันธุ์ไพล 2 กลุ่ม คือไพรเหลืองหรือไพลปลุกเสก และไพรดำโดยใช้วิธีอาร์เอพีดี พบว่ามีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ 21 แถบจาก 16 ไพรเมอร์ แล้วทำการเลือกแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ 2 แถบจาก 2 ไพรเมอร์ของไพลแต่ละกลุ่มนำมาออกแบบไพรเมอร์ SCAR ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบแยกไพรทั้งสองกลุ่มออกจากกันได้อย่างชัดเจนด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ดังกล่าว [10] นอกจากนั้นจันทร์เพ็ญ สะระและคณะ ก็ได้พัฒนาเครื่องหมาย SCAR เพื่อใช้ในการจำแนกลำไยลูกผสมระหว่างพันธุ์ดอ 27 กับสีชมพู โดยคัดเลือกจากอาร์เอพีดีไพรเมอร์ 50 ชนิด ซึ่งมี 2 ไพรเมอร์ที่เหมาะนำมาสร้างเครื่องหมาย SCAR และจากการตรวตสอบพบว่าเครื่องหมายนี้สามารถใช้ในการจำแนกลำไยพันธุ์สีชมพูและลูกผสมของพันธุ์สีชมพูได้ [11] และมีนักวิจัยจำนวนมากใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR ในการตรวจสอบชนิดพืชสมุนไพรต่างๆ อีกทั้งนำมาใช้เพื่อการระบุชนิดพืชได้ด้วย เช่น การจำแนกชนิดของ *Commiphora wightii* และ *C. myrrha* ที่ใช้เป็นพืชสมุนไพรในประเทศอินเดีย เพื่อให้ใช้งานได้ถูกต้องและปลอดภัย โดยใช้เทคนิค RAPD-SCAR พบว่าสามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ 1 ชนิดที่แยกพืชสองชนิดนี้ออกจากกัน [12]

การศึกษาพืชสกุลบัวสายทางด้านเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการระบุชนิดนั้นมีการศึกษาโดยใช้เครื่องหมาย ISSR เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม การผสมพันธุ์ และการอนุรักษ์ประชากรบัวสายพันธุ์ *Nymphaea* x 'Panama Pacific' กับบัวสายพันธุ์อื่นๆ ในทะเลสาบ Heviz จากการศึกษาพบว่าบัวสายที่มีขนาดประชากรเล็กจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ และพบลูกผสมจนถึงรุ่น F2 ทั้งที่เป็นหมันและสืบพันธุ์ต่อไปได้ จากข้อมูลนี้ทำให้ทราบว่าบัวสายในทะเลสาบนี้สามารถจัดอยู่ใน 3 สกุลย่อย คือ *Brachyceras Lotos* และ *Nymphaea* [13] และยังมีการใช้ลำดับดีเอ็นเอในนิวเคลียสบริเวณ ITS และคลอโรพลาสต์บริเวณ *trnK-matK* เพื่อตรวจสอบลูกผสมข้ามสกุลย่อยระหว่าง *N. gigantea* 'Andre Leu' .ในสกุลย่อย *Anecphya* เป็นต้นแม่ และ *N. colorata* ดอกสีขาวในสกุลย่อย *Brachyceras* เป็นต้นพ่อ พบว่าลูกผสมที่ได้ลักษณะสัณฐานวิทยาบางลักษณะที่คล้ายคลึงทั้งพ่อหรือแม่

และมีบางลักษณะที่ปรากฏเฉพาะในลูกผสมด้วย และจากการตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอสามารถระบุพ่อและแม่ได้ถูกต้อง [14] นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ค้นพบบัวสายชนิดใหม่ในประเทศไทยคือ *N. siamensis* จากการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยพบว่า *N. siamensis* นั้นมีลักษณะสัณฐานที่คล้ายคลึงกับ *Nymphaea* 'Nilubon' ไม่ว่าจะเป็นราก ลำต้น ใบ หรือแม้แต่การสร้างต้นใหม่ แต่ก็ยังมีความแตกต่างกันในส่วนของดอก ทั้งเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย และเมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD พบว่ามี 34 แถบดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกันระหว่างบัวสาย 2 พันธุ์นี้ ซึ่งแตกต่างจากบัวสายพันธุ์อื่นอย่างมาก ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า *N. siamensis* นั้นเป็นบัวสายชนิดใหม่ของประเทศไทย [15]

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD-SCAR เพื่อระบุชนิดของบัวสายใน 3 สกุลย่อย ได้แก่ สกุลย่อย *Anecphya Nymphaea* และ *Lotos* ที่พบปลูกเพื่อประดับและในธรรมชาติ เพื่อให้การระบุชื่อที่ถูกต้อง ชัดเจน รวมถึงการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอนุกรมวิธานและด้านอื่นๆ เช่นการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บตัวอย่างบัวสาย 3 สกุลย่อยได้แก่ สกุลย่อย *Anecphya Nymphaea* และ *Lotos* ที่พบในแหล่งธรรมชาติและที่นำมาปลูกเลี้ยง จำนวน 7, 10 และ 10 ตัวอย่าง (ตาราง 1) ตามลำดับ โดยบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* และ *Nymphaea* นั้นได้ตัวอย่างมากจากแหล่งเพาะปลูกในสวนหลวง ร.9 และสถาบันบัวราชมงคลตะวันออกทั้งหมด เนื่องจากไม่มีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทศ รวมไปถึง *N. lotus*1 *N. rubra* และ *N. spontanea* ด้วย ส่วนบัวสายที่เหลือเก็บตัวอย่างจากที่พบในแหล่งธรรมชาติ ได้แก่ หนอง บึง ทุ่งนาในจังหวัดพิษณุโลก โดยเก็บตัวอย่างส่วนราก ลำต้น ใบ ดอก และผล (ถ้ามี) เพื่อใช้เป็น Voucher specimens หรือเก็บเป็น living specimens ปลูกไว้ในเรือนเพาะชำ ณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก พร้อมทั้งแยกเก็บใบอ่อนใส่ silica gel เพื่อนำไปใช้ในการสกัดดีเอ็นเอต่อไป โดยตัวอย่างที่นำมาศึกษาจะทำการบันทึกลักษณะต่างๆ ของราก ไรโซมหรือเหง้า ก้านใบ แผ่นใบ สีดอก ทรงดอกเวลาดอกบาน เป็นต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดจำแนกเบื้องต้นด้วย

จากนั้นนำใบอ่อนของบัวสายที่มีมาสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ โดยใช้วิธีการดัดแปลง CTAB method ถ้าเป็นตัวอย่างใบสดซึ่งใบบัวจะหนาและมีปริมาณมากพอจะใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจาก Agrawal *et al.* [16] แต่ถ้าเป็นตัวอย่างใบแห้งที่เก็บไว้ใน silica gel ซึ่งใบจะแห้งและมีปริมาณน้อยจะใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle [17] โดยสองวิธีการนี้เห็นผลความแตกต่างได้จริงจากการศึกษาของวสันต์ เอื้อมลฉัตร [18]

ตาราง 1 ตัวอย่างบัวสายที่ทำการศึกษา 27 ตัวอย่าง

บัวสายสกุลย่อย *Anecphya*	บัวสายสกุลย่อย *Nymphaea*	บัวสายสกุลย่อย *Lotos*
N. immutabilis	*N. alba*	*N. lotus* 1
N. atrans	*N. odorata*	*N. lotus* 2
N. violacea 1	*N. tuberose*	*N. pubescens* 1
N. violacea 2	*N. maxicana* 1	*N. pubescens* 2
N. violacea x *N. atrans*	*N. maxicana* 2	*N. pubescens* 3
N. gigantean	*N. tetragona*	*N. pubescens* 4
N. gigantea var. *neorosea*	*Nymphaea* 'Sunrise'	*N. pubescens* 5
	Nymphaea sp. 1	*N. pubescens* 6
	Nymphaea sp. 2	*N. rubra*
	Nymphaea sp. 3	*N. spontanea*

แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี จากไพรเมอร์ JAT01-30 ทั้งหมด 30 ชนิดจากการศึกษาของมลิวรรณ นาคขุนทดและปัทมา เสนทอง [19] แล้วคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้และให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน โดยสภาวะที่ใช้คือ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นทำ 35 รอบของ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 32 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที แล้วสิ้นสุดด้วย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาแยก โดยให้เคลื่อนที่ภายใต้สนามไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (agarose gel electrophoresis) ความเข้มข้น 1.5% ในสารละลาย 1X TAE และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า

100 โวลต์ ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปส่องด้วยเครื่องส่องเจลภายใต้แสงยูวี (UV transilluminator) และบันทึกภาพ เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

จากเทคนิคอาร์เอพีดีเลือกตัดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ของบัวสายแต่ละชนิด และแยกแถบดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย HiYieldTM Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBCBioscience) แล้วนำมาสร้างดีเอ็นเอสายผสมโดยใช้ pTG19-T (Vivantis) และถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* JM109 จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยสีของโคโลนีและการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ก่อนส่ง recombinant DNA ไปหาลำดับดีเอ็นเอที่บริษัท Macrogen (South Korea) ลำดับดีเอ็นเอที่ได้จะใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตัวอย่างนั้นๆ โดยใช้เวปไซด์ IDTdna จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาทดสอบกับบัวสายทั้งหมดรวมถึงพืชสกุลอื่นด้วย

ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* จำนวน 7 ตัวอย่าง ด้วย 30 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 12 ไพรเมอร์ และเมื่อนำมาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR พบว่าสามารถโคลน หาลำดับดีเอ็นเอ และสร้างเครื่องหมายชนิด SCAR ได้ 5 เครื่องหมาย จากนั้นนำมาทดสอบกับบัวสายชนิดต่างๆ พบว่ามีเพียง 2 เครื่องหมายเท่านั้น (ตาราง 2) ที่แสดงถึงความจำเพาะเฉพาะชนิดของบัวสายนั้นๆ โดยที่ไพรเมอร์ NYM007 ที่พัฒนามาจากบัวสายชนิด *N. atrans* สามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้ง *N. atrans* และ *N. immutabilis* ซึ่งอาจเนื่องมาจากบัวสายทั้ง 2 ชนิดนี้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมาก โดยเมื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวสายในสกุลย่อยนี้พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ *Anecphya* และ *Confluentes* โดยในกลุ่ม *Anecphya* ยังสามารถแบ่งออกได้เป็นอีก 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มย่อย *N. gigantea* และ กลุ่มย่อย *N. atrans* กับ *N. immutabilis* ซึ่งทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมา แตกต่างกันเพียง *N. atrans* นั้นสีดอกจากเปลี่ยนเมื่อดอกแก่ ขณะที่ *N. immutabilis* ไม่เป็นเช่นนั้น [20] แต่ไพรเมอร์ SCAR ชนิดนี้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นส่วนดีเอ็นเอในตัวอย่างของ *N. violacea* x *N. atrans* ได้ อาจจะเนื่องมาจากบริเวณที่เพิ่มจำนวนอยู่ในส่วนของ extrachromosomal DNA ซึ่งในการผสมนี้ใช้ *N. violacea* เป็นต้นแม่ และ *N. atrans* เป็นต้นพ่อ ขณะที่ไพร์เมอร์ NYM010 ที่จำเพาะต่อ *N. gigantea* var. *neorosea* เพราะฉะนั้นแสดงว่าบัวสายพันธุ์นี้มีความแตกต่างจาก *N. gigantea* อย่างชัดเจน ซึ่งอาจสามารถนำมาตั้งเป็นชนิดใหม่ได้ในอนาคต จึงควรมีการศึกษาข้อมูลให้มากกว่านี้ และไพรเมอร์ SCAR อีก 3 คู่ไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณได้ในตัวอย่างอื่นๆ อีกหลายชนิด แม้แต่บัวที่ไม่ได้อยู่ในสกุลบัวสาย

ตาราง 2 ไพรเมอร์ SCAR สำหรับบัวสายสกุลย่อย *Anecphya*

Primer SCAR	Samples	Sequences 5'-3'	GC (%)	Tm (°C)	Expected size (bp)
NYM007	*N. atrans* *N. immutabilis*	F : CGCATTGTCAGGGGTGGAAC R: ACGTTCATGGGGCATTTGAC	60 55	62.5 55.8	465
NYM010	*N. gigantea* var. *neorosea*	F: CCTGATCCAGCACAACTA R: TGTCGCCGTCACTATTGATG	52.6 50	52.8 54.9	785

ผลการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของบัวสายในสกุลย่อย *Nymphaea* 10 ตัวอย่าง จากไพรเมอร์จำนวน 30 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 5 ไพรเมอร์ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่าง (polymorphic band) จำนวน 11 แถบ และเมื่อนำมาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR พบว่าสามารถโคลนและหาลำดับดีเอ็นเอได้จำนวน 2 ชิ้น โดยเมื่อนำไปสร้างเครื่องหมายชนิด SCAR แล้วนำมาทดสอบกับบัวสายชนิดต่างๆ รวมถึงพืชชนิดอื่นด้วย พบว่ามีเพียง 1 เครื่องหมายเท่านั้น (ตาราง 3) ที่แสดงถึงความจำเพาะเฉพาะชนิดของบัวสายนั้นๆ โดยที่ไพรเมอร์ NYM005 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 2 ตัวอย่าง คือ *Nymphaea* 'Sunrise' และ *Nymphaea* sp.1 ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะภายนอกทั้งใบ ดอก เกสรเพศผู้ และเกสรเพศเมียของ 2 ตัวอย่างมีความคล้ายคลึงกันมาก แต่เก็บจากคนละแหล่งปลูก จึงน่าจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน และ *Nymphaea* sp.2 และ 3 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์คู่ได้ ขณะที่อีกหนึ่งไพรเมอร์ไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แถบดีเอ็นเอเป็นรอยสเมียร์ในทุกตัวอย่าง

ตาราง 3 ไพรเมอร์ SCAR สำหรับบัวสายสกุลย่อย *Nymphaea*

Primer SCAR	Samples	Sequences 5'-3'	GC (%)	Tm (°C)	Expected size (bp)
NYM005	*Nymphaea* 'Sunrise'	F : CGGGATGTGAGTGTTTGACC R: TGCGTTCTTTTCTCTTTCCC	55 45	56 53.1	200

ผลการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* 10 ตัวอย่าง จากไพรเมอร์จำนวน 30 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 8 ไพรเมอร์ และเมื่อนำมาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR พบว่าสามารถโคลนและหาลำดับดีเอ็นเอได้จำนวน 3 ชิ้น โดยเมื่อนำไปสร้างเครื่องหมายชนิด SCAR แล้วนำมาทดสอบกับบัวสายชนิดต่างๆ พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะสำหรับตัวอย่างนั้นๆ ได้ แต่พบว่าเครื่องหมาย SCAR 2 เครื่องหมายคือ NYM001 และ NYM003 สามารถใช้เป็น universal primer สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบัวสายชนิดอื่นๆ ได้ด้วย สำหรับไพรเมอร์ SCAR อีก 1 ไพรเมอร์ (NYM 002) นั้น สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในทุกตัวอย่างของบัวสายในสกุล *Nymphaea* จึงจัดให้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับบัวสายในสกุลนี้ได้ แต่ยังไม่สามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR สำหรับบัวสายสกุลย่อย *Lotos* ได้ ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเนื่องมาจากสกุลย่อยบัวกินสายนี้มีความสัมพันธ์ทางวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันมาก นอกจากนี้แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากเทคนิคอาร์เอพีดีก็คล้ายคลึงกัน จึงหาแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะยากมาก ดังนั้นบัวสายในสกุลย่อยนี้จึงควรมีการศึกษาในรายละเอียด โดยใช้เทคนิคหรือเครื่องหมายดีเอ็นเออื่น เช่น ISSR เพื่อให้สามารถจำแนกชนิดที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

สรุป

จากการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR จากแถบดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อใช้ในการระบุชนิดของบัวสายใน 3 สกุลย่อย ได้แก่ บัวออสเตรเลีย (*Anecphya*) บัวฝรั่ง (*Nymphaea*) และบัวกินสาย (*Lotos*) นั้น สามารถพัฒนาได้ 3 เครื่องหมายสำหรับสกุลย่อย *Anecphya* และ *Nymphaeae* คือ เครื่องหมาย SCAR สำหรับ *N. atrans* และ *N. immutabilis* เครื่องหมายดีเอ็นเอ SCAR สำหรับ *N. gigantea* var. *neorosea* และเครื่องหมาย SCAR สำหรับ *Nymphaea* 'Sunrise' สำหรับบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* ก็ควรมีการพัฒนาต่อไป อาจจะใช้เทคนิคอื่นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เช่น SRAP (Sequence related amplified polymorphic) เพื่อให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างมากขึ้น แล้วนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน (แบบปกติ) ประจำปีงบประมาณ 2559 มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่โครงการ R2559B055 และความอนุเคราะห์สถานที่ รวมถึงอุปกรณ์ในการทำวิจัยจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พร้อมกันนี้ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ คุณหญิงสุชาดา ศรีเพ็ญ และคุณวีรญา บุญเตี้ย จากสวนหลวง ร.9 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณ นพชัย ชาญศิลป์ สถาบันบัวราชมงคลตะวันออก มหาวิทยาลัยราชมงคลตะวันออก ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างบัวสายและให้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ขอขอบคุณ Prof. Khidir W. Hilu มหาวิทยาลัย Virginia Polytechnic Institute and State University ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับตัวอย่างดีเอ็นเอบัวสาย

รายการอ้างอิง

[1] Verdcourt, B., 1989, Flora of tropical East Africa Nymphaeaceae. Balkema, Rotterdam, 14 p.

[2] Borsch, T., Hilu, K.W., Wiersema, J.H., Lohne, C., Barthlott, W. and Wildes, V., 2007, Phylogeny of *Nymphaea* (Nymphaeaceae) : evidence from substitutions and microstructure changes in the chloroplast *trn*T-*trn*L region, Int. J. Pl. Sci. 168: 639-671.

[3] Volkowa, P.A. and Shipunov, A.B., 2007, Morphological variation of *Nymphaea* (Nymphaeaceae) in European Russia. Nord. J. Bot. 25: 329-338.
[4] มลิวรรณ นาคขุนทด, 2554, การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของละอองเรณูในบัวสายเขตอบอุ่นและเขตร้อน, ว. วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม, 12: 60-73.
[5] Slocum, P.D., 2005, Waterlilies and Lotuses: Species, Cultivars, and New Hybrids. Portland, Oregon, USA, 265 p.
[6] Sharma, S., 1993. The 1837–38 famine in U.P.: Some dimensions of popular action. Indian Economic and Social History Review 30: 337–372.
[7] มลิวรรณ นาคขุนทด และวสันต์ เอื้อมลฉัตร, 2555, การจัดจำแนกพืชสกุลบัวสาย (Genus *Nymphaea* L.) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trn*T-L, ว.วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, 6: 11-20.
[8] มลิวรรณ นาคขุนทด และณัฐวุฒิ วงศ์อนันต์, 2556, ความหลากหลายของรูปแบบนิวคลีโอไทด์บริเวณ ribosomal DNA ในบัวกินสาย, รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 5, มหาวิทยาลัยพะเยา, น. 322.
[9] มลิวรรณ นาคขุนทด, 2557, ซิสเต็มมาติกระดับโมเลกุลของบัวสายสกุลย่อย *Lotos* โดยใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์และนิวเคลียส. รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 8, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, น. 69.
[10] ภริตา ต้นสายเพ็ชร และเฌอมาลย์ วงศ์ชาวจันท์, 2555, การพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR เพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์ไพล, รายงานสืบเนื่องการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50: สาขาส่งเสริมการเกษตรและคหกรรมศาสตร์ สาขาพืช, กรุงเทพฯ, น. 406-412.
[11] จันทร์เพ็ญ สะระ, ฉันทนา วิชรัตน์, ธีรนุช เจริญกิจ และแสงทองพงษ์เจริญกิต, 2556, การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR เพื่อใช้ในการจำแนกลำไยลูกผสมระหว่างพันธุ์ดอ 27 และสีชมพู, รายงานสืบเนื่องการประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 18, น. 244-247.
[12] Sairkar, P.K., Sharma, A. and Shukla, N.P., 2016, SCAR marker for identification and discrimination of Commiphora wightii and C. myrrha, Mol. Biol. Int. id 1482796, 10 p.
[13] Poczai, P., Matyas, K.K., Szabo, I., Varga, I., Hyvonen, J., Cernak, I., Gorji, A.M., Decsi, K. and Taller, J., 2011, Genetic variability of Thermal *Nymphaea* (Nymphaeaceae) populations based on ISSR markers: Implications on relationships, hybridization and conservation, Plant Mol. Biol. Rep. 29: 906-918.
[14] Les, D.H., Moody, M.L. and Doran, A.S., 2004, A genetically confirmed intersubgeneric hybrid in *Nymphaea* L. (Nymphaeaceae Salisb.), Hort. Science 39: 219-222.
[15] Puripunyavanich, V., La-ongsri, W., Boonsirichai, K. and Chukiatman, P., 2014, *Nymphaea siamensis*, The new species of waterlily in Thailand, Acta. Hort. 1035: 87-98.
[16] Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P., 1992, Isolation of DNA from *Cheorospondias asillaris* leaves. Biotech Biodiv. 2: 19-24.
[17] Doyle, J. and Doyle, J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11–15.
[18] วสันต์ เอื้อมลฉัตร, 2555, การจัดจำแนกพืชสกุลบัวสาย (Genus *Nymphaea* L.) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยนเรศวร, 90 น.
[19] มลิวรรณ นาคขุนทด และปัทมา เสนทอง, 2552, การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสบู่ดำในประเทศไทยด้วยวิธีอาร์เอพีดี, ว.วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, 6: 55-65.
[20] Lohne, C., Borsch, T., Jacobs, S.W.L., Hellquist, C.B. and Wiersema, J.H., 2008, Nuclear and plastid DNA sequences reveal complex reticulate patterns in Australian water lilies (*Nymphaea* subgenus *Anecphya*, Nymphaeaceae), Austral. Syst. Bot. 21: 229-250.

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ กิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ *Lotos*

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการมา	ผลที่ได้รับตลอดโครงการ
1. การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR สำหรับตรวจสอบบัวสายสกุลย่อย *Lotos*	พัฒนาเครื่องหมาย SCAR จากเทคนิค RAPD เพื่อใช้ตรวจสอบบัวสายในสกุลย่อย *Lotos*	เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD แล้วพัฒนาเครื่องหมาย SCAR ของบัวสายในสกุลย่อย Lotos แต่ผลปรากฏว่าไม่สามารถพัฒนาเครื่องหมาย SCAR ที่จะจำแนกเฉพาะพะชนิดของบัวกินสายในสกุลย่อย *Lotos* ได้ แต่สามารถสร้างเครื่องหมาย SCAR เพื่อแยกบัวสายสกุลย่อยนี้ออกจากสกุลอื่นได้ รวมถึงสามารถพัฒนาเครื่องหมาย SCAR สำหรับบัวสายสกุลย่อยอื่นได้อีก 2 สกุลย่อยคือ *Anecphya* และ *Nymphaea*	ได้เครื่องหมาย RAPD-SCAR สำหรับตรวจสอบบัวสายในสกุลย่อย *Anecphya* และ *Nymphaea* ได้บางชนิด
2. การประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวสายในสกุลย่อย *Lotos*	จากเทคนิค RAPD นำมาหาค่าความเหมือนของแต่ละชนิดและตัวอย่างของบัวกินสายในสกุลย่อย *Lotos*	ศึกษารูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากเทคนิค RAPD แล้วนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์หาค่าความเหมือนในสกุลย่อย *Lotos* ได้ พบว่าบัวกินสายในกลามนี้มีวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกันมาก และยังทราบถึงสายวิวัฒนาการของบัวสายในสกุลย่อยอื่นอีก 2 สกุลย่อยคือ *Anecphya* และ *Nymphaea* ด้วย	ทราบแบบแผนวิวัฒนาการของบัวสายทั้ง 3 สกุลย่อยคือ *Anecphya* *Nymphaea* และ *Lotos*