การศึกษารายละเอียดลักษณะพันธุกรรมบัวหลวงไทย (DNA Fingerprint)

นางสาวกิ่งกาญจน์ พิชคุน[๑/] นายสุรไกร สังฆสุรรณ์[๒/] นางนลินี จาริกภากร[๒/]
นายปัญญา ธยามานนท์[๓/] นายธวัชชัย นิ่มกิ่งรัตน์[๔] นายดนัย นาคประเสริฐ[๕] นายพิชิต สพโชค[๖/]

บทคัดย่อ

โครงการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์บัวหลวง ดำเนินการระหว่างปีงบประมาณ ๒๕๕๔ ถึง ๒๕๕๖ มี ๓ กิจกรรมหลักประกอบด้วย ๑) การสำรวจและรวบรวมพันธุ์บัวหลวง ๒) การศึกษาเปรียบเทียบศักยภาพพันธุ์บัวหลวงที่รวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย๓) การศึกษารายละเอียดลักษณะพันธุกรรมบัวหลวงไทย (DNA Fingerprint) ผลการวิจัยสำรวจ รวบรวมพันธุ์บัวหลวง จากแหล่งปลูกต่าง ๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคใต้ และภาคเหนือ จำนวน ๑๐๙ ตัวอย่าง จาก ๓๓ จังหวัด ดังนี้ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้พันธุ์บัวหลวงจาก จ.ยโสธร จ.สกลนคร จ.อำนาจเจริญ จ.ศรีสะเกษ จ.อุดรธานี จ.กาฬสินธุ์ จ.มุกดาหาร จ.นครพนม จ.อุบลราชธานี จ. ร้อยเอ็ด จ. บุรีรัมย์ จ.สุรินทร์ จ. ขอนแก่น จ.มหาสารคาม ภาคเหนือจาก จ.สุโขทัย จ. พิจิตร จ.พิษณุโลก จ.อุตรดิตถ์ จ.นครสวรรค์ จ.แพร่ ภาคใต้จาก จ.ประจวบคีรีขันธ์ จ.พังงา จ.กระบี่ จ.สตูล จ.นครศรีธรรมราช จ.พัทลุง จ.สงขลา จ.นราธิวาส ภาคกลางและภาคตะวันออก จาก จ.ลพบุรี จ.นนทบุรี จ.ปทุมธานี จ.ชลบุรี จ.จันทบุรี บัวหลวงที่รวบรวมได้ทั้งหมดปลูกทดลองในศูนย์วิจัยและพัฒนาจังหวัดของกรมวิชาการเกษตร กระถางปลูกขนาด ๖๐x๖๐x๖๐ ซม. วิจัยและบันทึกลักษณะประจำพันธุ์ตามรูปแบบบันทึกลักษณะประจำพันธุ์ของกรมวิชาการเกษตร (หลักเกณฑ์การตรวจสอบลักษณะพันธุ์บัว ปทุมชาติ; Test Guidelines Nelumbo) การตรวจสอบเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ดำเนินการสกัดดีเอ็นเอของบัวหลวง ๕๔ ตัวอย่างแรกด้วยวิธี CTAB นั้นได้ดีเอ็นเอคุณภาพดี เมื่อนำมาสร้างเอกลักษณ์พันธุกรรมขอบัวหลวง โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ๑๔ ไพรเมอร์ พบความแตกต่างของจำนวนอัลลีล ตั้งแต่ ๒ – ๑๓ อัลลีล เมื่อนำข้อมูลขนาดอัลลีลมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYS เวอร์ชั่น ๒.๑ m ปรากฏว่า สามารถจัดจำแนกบัวหลวงที่นำมาศึกษาได้เป็น ๒ กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ ๑ ประกอบด้วย ตัวอย่างที่ ๑, ๓, ๔, ๖, ๙, ๑๐,๑๑, ๑๒, ๑๔, ๑๕, ๒๗ และตัวอย่างที่ ๓๓ ส่วนตัวอย่างที่เหลือถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ ๒ ผลการจัดจำแนกที่ได้มีความสอดคล้องกับลักษณะของสีดอก โดยกลุ่มแรกส่วนใหญ่พบว่ามีสีดอกเป็นสีขาว ในขณะที่กลุ่มที่ ๒ ส่วนใหญ่พบว่ามีสีดอกเป็นสีชมพู

[๑/]สำนักเทคโนโลยีชีวภาพ

[๒/]สำนักผู้เชี่ยวชาญ

[๓/]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตร

[๔/]ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีษะเกษ

[๕/]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรเพชรบุรี

[๖/]ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพัทลุง

๖.คำนำ

บัวหลวง (*Nelumbo nuclfera* Gaertn.) เป็นพืชในวงศ์ Nymphaeaceae อยู่ในสกุล Nelumbo มีชื่อเรียกกันทั่วไปหลายชื่อได้แก่ ปทุมชาติ บุณฑริก ปุณฑริก ปทุม ปัทมา โกกระณต สัตตบุษย์ บัวฉัตรขาว สัตตบงกช บัวฉัตรชมพู โช้ค บัวอุบล บัวหลวงเป็นไม้น้ำและไม้ล้มลุกหลายฤดู มีถิ่นกำเนิดแถบเอเชีย เช่น จีน อินเดีย และไทย มีลำต้นใต้ดินแบบเหง้าและไหลอยู่ใต้ดิน ผังตัวอยู่ในโคลนเลน ใบเดี่ยวมีลักษณะกลมใหญ่สีเขียวอมเทา ใบอ่อนจะลอยปิ่มน้ำ ส่วนใบแก่จะชูพ้นน้ำ แผ่นใบเกือบกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง ๒๐-๕๐ ซม. ก้านใบแข็ง มีหนามเล็ก ๆ เมื่อหักเป็นสายใยและมีน้ำยางขาว ดอกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ มีสีขาวและสีชมพู มีทั้งดอกป้อมและดอกแหลม ก้านดอกแข็งมีหนามเล็ก ๆ ชูเหนือน้ำ กลีบดอกจำนวนมาก เรียงซ้อนกันหลายชั้น ดอกมีกลิ่นหอมอ่อน ๆ เมื่อดอกบานเส้นผ่านศูนย์กลาง ๑๕-๒๕ ซม. ดอกมีหลายรูปทรงและมีหลายสี เช่น สีขาว สีชมพู แล้วแต่พันธุ์ ผล รูปกลมรีสีเขียวนวล ผลมีจำนวนมากฝังอยู่ในส่วนที่เป็นรูปกรวย เมื่ออ่อนมีสีเหลือง รูปกรวยนี้เมื่อเป็นผลแก่จะขยายใหญ่ขึ้นมีสีเทาอมเขียวที่เรียกว่า "ฝักบัว" มีผลสีเขียวอ่อนฝังอยู่เป็นจำนวนมาก (ณรงค์, ๒๕๕๐) คนไทยใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่จากส่วนต่างๆ ของบัว นอกจากนำมาใช้บูชาพระและใช้ในพิธีทางศาสนา ใช้ในการจัดตกแต่งสถานที่แล้ว ฝักบัวสด (ฝักแก่) นิยมใช้บริโภค มีการเก็บจากธรรมชาติและการทำนาบัว พื้นที่การผลิตอยู่ที่จังหวัดนนทบุรี เชียงราย อุบลราชธานี และยโสธร ฝักบัวสด (ฝักอ่อน) เริ่มมีการใช้ฝักอ่อนในการจัดดอกไม้เพิ่มขึ้นและในต่างประเทศมีการสั่งซื้อฝักบัวอ่อนและใบบัว เพื่อนำไปใช้ในรูปของลักษณะตัดใบ เมล็ดแห้ง มีการผลิตกันมากเพื่อทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ ไหลบัว (หลดบัว) มีการใช้ในการทำอาหารคาว เหง้าบัว (รากบัว) มีความต้องการของตลาดมาก เพราะเหง้าบัว (รากบัว) คือส่วนที่สะสมอาหารของบัวก่อนมีการพักตัว ทำให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูงมาก แต่การผลิตยังน้อยอยู่เนื่องจากเหง้าบัวของสายพันธุ์บัวในไทยยังมีขนาดไม่ใหญ่มากนัก ใบบัว นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทำข้าวห่อใบบัว และนำไปจัดตกแต่งสถานที่ซึ่งเป็นที่นิยมมากในต่างประเทศ

ประเทศที่มีการบริโภครากบัวอย่างกว้างขวางได้แก่ จีน และญี่ปุ่น โดยจัดรากบัวเป็นผักชนิดหนึ่ง ประเทศญี่ปุ่นมีการบริโภคบัวประมาณ ๑% ของผักทั้งหมดที่มีการบริโภค และมีการนำเข้ารากบัวในรูปต่างๆ มากถึง ๑๘,๐๐๐ ตันต่อปี และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นตลอดเวลา รากบัวส่วนใหญ่นำเข้าจากประเทศจีนถึง ๑๕,๐๐๐ ตัน (Subhuti, ๒๐๐๒) สำหรับประเทศไทย มีพื้นที่การปลูกบัวหลวงประมาณ ๕,๐๐๐ ไร่ กระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ แหล่งปลูกบัวเพื่อเก็บเมล็ดที่สำคัญได้แก่ จังหวัดนครสวรรค์ พิจิตร และพิษณุโลก พันธุ์ที่นิยมปลูกได้แก่ บัวหลวงพันธุ์ปทุม ซึ่งให้ผลผลิตเมล็ดบัวแห้งประมาณ ๑๔๔-๑๘๐ กิโลกรัมต่อไร่ พันธุ์ของบัวหลวงในประเทศไทยมีรายงานแตกต่างกันตามแหล่งที่พบ เช่น วาสนา (๒๕๒๗) รายงานถึงพันธุ์บัวหลวงมี ๖ พันธุ์ คือ ๑. ปทุมมาหรือปัทมา ๒. ปุณฑริกหรือบุณฑริก ๓. บัวหลวงสีชมพูจีนหรือบัวปักกิ่งชมพู ๔. บัวหลวงจีนขาวหรือบัวปักกิ่งขาว ๕. สัตตบงกชหรือบัวฉัตรชมพู ๖. สัตตบุษย์หรือฉัตรทอง ขณะที่ ภัทราวุธ (๒๕๓๙) ศึกษาสัณฐานวิทยาของพันธุ์บัวในจังหวัดเชียงใหม่ พบบัวหลวงในแหล่งธรรมชาติหลายชนิด ได้แก่ บัวหลวงขาว ปทุมชาติ บุณฑริก บัวเข้มสีชมพู สัตตบุษย์ บัวฉัตรขาว ปทุม สัตตบงกช บัวไต้หวัน ปัทมา บัวหลวงป้อมแดง บัวแหลมขาว เป็นต้น อย่างไรก็ดีพบว่ายังไม่มีการพัฒนาพันธุ์บัวหลวงเพื่อใช้ในด้านต่างๆ เช่น ดอก เมล็ด หรือราก หรือมีคุณสรรพคุณทางด้านสมุนไพร เพื่อให้มีคุณภาพผลผลิตตรงตามความต้องการของผู้บริโภค จึงควรให้มีการรวบรวมศึกษาชนิดของพันธุ์บัวหลวงที่พบในประเทศไทย เพื่อใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปในอนาคต

การสร้างเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ของบัวเป็นสิ่งที่ควรจัดทำควบคู่ไปกับการอนุรักษ์พันธุ์บัวเช่นเดียวกัน เนื่องจากบัวแต่ละพันธุ์มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกัน แตกต่างกันเพียงสีและ รูปร่างของดอก ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากเทคโนโลยีในปัจจุบันทางด้านดีเอ็นเอจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถช่วยในการระบุและจำแนกบัวแต่ละพันธุ์ออกจากกันได้ โดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ใน

การสร้างเอกลักษณ์ทางพันธุกรรม การทำแผนที่จีโนม การตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตอย่างแพร่หลายทั้งใน คน สัตว์ และพืชโดยลำดับเบสชนิด ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หมายถึงลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงกันอยู่ต่อเนื่องที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ในจีโนม แต่ละชุดซ้ำประกอบด้วยเบส ๑-๖ เบส โดยลำดับเบสชนิดนี้มีการกระจายตัวทั่วจีโนม แต่มักอยู่ในบริเวณที่ไม่ใช่ยีน ความแตกต่าง หรือ พอลิมอร์ฟิซึมที่เกิดจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ คือความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ เนื่องจากจำนวนชุดซ้ำที่มีในไมโครแซทเทลไลท์ที่ตำแหน่งเดียวกันในตัวอย่างแต่ละตัวอย่างไม่เท่ากัน และยังสามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ (สุรินทร์, ๒๕๕๒) เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในบัวหลวงได้ถูกพัฒนาขึ้นโดย Pan *et al*.,๒๐๐๗ ; Tian *et al*., ๒๐๐๘ and Kubo *et al*., ๒๐๐๙ โดยได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์ ในบัวหลวงที่มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชีย ดังนั้น การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้มาใช้จึงมีความเหมาะสม อีกทั้งยังสะดวก และประหยัดเวลาอีกด้วย

๗. วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

๑. กระถาง ขนาด ๖๐ X ๖๐ X ๖๐ ซม.

๒. อุปกรณ์สำหรับเก็บตัวอย่างพืช เช่น กรรไกร คัตเตอร์ ถุงพลาสติก กระดาษหนังสือพิมพ์ กล่องเก็บความเย็น ปากกา กระดาษบันทึกข้อมูล

๓. กล้องถ่ายภาพ และฟิล์ม

๔. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ ใบบัว โกร่ง ไนโตรเจนเหลว สารละลาย CTAB สารละลายคลอโรฟอร์ม ๒๔ ส่วน: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ๑ ส่วน แอลกอฮอล์ สารละลาย $T_{๑๐}E_{๐.๑}$ หลอด micro tube หลอดขนาด ๑๕ ml. เครื่องดูดสารปริมาณน้อย

๖. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ได้แก่ เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (เครื่อง PCR) หลอด PCR, ไพรเมอร์จำนวน ๒๒ คู่, buffer, $MgCl_{๒}$, $dH_{๒}O$, Taq. DNA polymerase, DNA

บัวหลวง

๗. ชุดอุปกรณ์สำหรับตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอบน agarose gel ได้แก่ เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอ, agarose เข้มข้น ๑.๕ %, สารละลาย ๑xTBE buffer, เอทิเดียมโบรไมด์, Gel documentation

๘. โปรแกรม NTSYSpc. เวอร์ชั่น ๒.๑m

๙. อุปกรณ์สำหรับวัดปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ หลอดขนาด ๑.๕ ml. สารละลาย $T_{๑๐}E_{๐.๑}$ เครื่องวัดปริมาณ

สารพันธุกรรม

วิธีการทดลอง

๑. ตัวอย่างบัวหลวง

ตัวอย่างใบบัวหลวงที่ได้รับมาทั้งหมด ๕๘ ตัวอย่าง จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตรจำนวน ๔๕ ตัวอย่าง จากสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ ๘ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพัทลุง และสำนักผู้เชี่ยวชาญ จำนวน๑๓ ตัวอย่าง นำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

๒. การสกัดดีเอ็นเอ

๒.๑ล้างใบบัวด้วยน้ำประปาให้สะอาด ปล่อยให้แห้ง

๒.๒บดใบบัวในโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง

๒.๓ตักใบบัวที่บดละเอียดแล้วประมาณ ๒๐๐ กรัมลงในหลอด micro tube (หลอดขนาด ๑.๕ มิลลิลิตร) ที่มี ๒x CTAB buffer ๕๐๐ ไมโครลิตร

๒.๔บ่มที่อุณหภูมิ ๖๕ องศาเซลเซียส นาน ๓๐-๖๐ นาที กลับหลอดทุกๆ ๑๐ นาที

๒.๕เติมสารคลอโรฟอร์ม ๒๔ ส่วนต่อ ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ๑ ส่วน ปริมาตร ๕๐๐ ไมโครลิตร กลับหลอดทุก ๕-๑๐ นาที

๒.๖ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบต่อนาที นาน ๑๐ นาที

๒.๗ดูดของเหลวส่วนใสด้านบน ๒๐๐ ไมโครลิตร ใส่ในหลอด micro tube อันใหม่ และตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติมabsolute alcohol ๒๐๐ ไมโครรลิตร หลับหลอดเบาๆจะเห็นตะกอนดีเอ็นเอสีขาวขุ่น

๒.๘ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอ ที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบต่อนาที นาน ๑๐ นาที

๒.๙เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ ๗๐ % จำนวน ๒ ครั้งดูดแอลกอฮอล์๗๐ % ออก รอจนตะกอนแห้งประมาณ ๑ ชั่วโมงแล้วจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย $T_{๑๐}E_{๐.๑}$ buffer pH.๘

๒.๑๐ วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม

๓. การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

นำดีเอ็นเอบัวหลวงเข้มข้น ๕๐ นาโนกรัม จากตัวอย่างที่ ๑-๕๘ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่เป็นชุดซ้ำชนิดไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน ๒๒ คู่ (ตารางที่ ๑) และตรวจสอบขนาดของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis จากนั้นคัดเลือก คู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ชัดเจนมาติดฉลากด้วยสารเรืองแสง เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้งสำหรับนำส่งไปวิเคราะห์ขนาดด้วยเครื่อง ABI๓๑๐๐

ตารางที่ ๑ ไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จำนวน ๒๒ คู่

ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (๕'-๓')	ขนาด alleles (bp.)	จำนวน alleles	T_a (°C)	Repeat motif
๑	NS๐๑๐-F	TTGTAACCGCCGGAGACAAA	๑๑๓-๑๑๗	๓	๖๔	$(AG)_{๕}GG(AG)_{๑๑}$
	NS๐๑๐-R	CTC TAT ATC TCA GTC TCC GGC A				
๒	NS๐๑๒-F	GAGCTATTCGTCATTCAGAGAG	๑๑๒-๑๒๖	๕	๕๕	$(AG)_{๑๔}$
	NS๐๑๒-R	AAG TCC TCT CGC GCT GTA AT				
๓	NS๐๒๐-F	GCTGTGAAGAGGAAGGTGTTG	๑๒๙-๑๔๙	๔	๕๕	$(AG)_{๑๓}$
	NS๐๒๐-R	ACA GAT TGA ACC AGT CCA ACA G				
๔	NSh๐๒-F	GGTATCATTTGGTTGCAGCAAT	๑๒๑-๑๔๑	๔	๕๕	$(GA)_{๑๓}$
	NSh๐๒-R	GGG TAT AAA CGG AAA AGC CTC T				
๕	NS๐๓๔-F	AAA GCC AAG ACA TCC TCG AG	๙๘-๑๑๘	๕	๖๐	$(GA)_{๑๙}$
	NS๐๓๔-R	CGA TTC GAC CTG ATC GTG TT				
๖	NS๐๔๙-F	GTA GCA GTT GTG GTT TCA GTA AC	๒๖๑-	๕	๕๐	$(GA)_{๑๓}$

			๒๘๗			
	NS๐๔๙-R	ACACAGTTC ATC AGT ATT CTT CGT A				
๗	NS๐๕๐-F	CTG CCC TCC TGA AAT AGA TGA AA	๑๑๐-๑๔๓	๕	๖๐	$(GA)_{๑๙}$
	NS๐๕๐-R	GGC GGT GAA TCA TTT AGC AGA A				
๘	Nelumbo-๑๖-F	CGG TCA CTT GCT AAT TCA A	๒๐๑	๔	๕๐	$(GGT)_{๖}$
	Nelumbo-๑๖-R	AAG ACT ACC TTC ACC TCC C				

ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (๕'-๓')	ขนาด alleles (bp.)	จำนวน alleles	T_a (°C)	Repeat motif
๙	Nelumbo-๑๗-F	GTG GCA ATC CTT AAA GCT A	๒๑๒	๕	๕๐	(TG)๘(AG)๖
	Nelumbo-๑๗-R	TCT GTT TAG AAG CAA TGT G				
๑๐	Nelumbo-๑๘-F	TTG GGG ATT TCC TAA CTG GT	๒๘๖	๗	๕๕	(GA)๑๐GG(GA)๖
	Nelumbo-๑๘-R	TCA TTG TCT CAA CAA CTG GC				
๑๑	Nelumbo-๒๒-F	AGC TTA GGG CTT TTA TCT GCA C	๑๗๐	๖	๕๘	(CT)๑๓
	Nelumbo-๒๒-R	ATG GCA ATG ATA GAA AAG GGA G				
๑๒	Nelumbo-๒๗-F	TAAGCT AAG ATA GGA ATC CAA CTA G	๑๗๘	๔	๕๖	$(CT)_{๒๕}G(TC)_{๖}$
	Nelumbo-๒๗-R	AAAAGGATA GGA GAT TAG TAG GTG A				
๑๓	Nelumbo-๓๒-F	ATA ATG GAT TTT GGA GGT CTT G	๒๑๐	๕	๕๕	$(TC)_{๑๙}$
	Nelumbo-๓๒-R	CTC TTC TTC ATT CCT TTG GTT T				
๑๔	Nelumbo-๓๓-F	ACT ACT GGA ATC TGC TGC AAG C	๒๕๒	๕	๕๘	$(TC)_{๑๑}$
	Nelumbo-๓๓-R	CTG AAA GTG AAC AGG CAT CGT G				
๑๕	Nelumbo-๓๔-F	TGG TTG GCA CTG TAA TCT TC	๑๕๑	๖	๕๒	$(TC)_{๒๑}CCTCC(CT)_{๗}$
	Nelumbo-๓๔-R	CTG TTT CGA CTC TAG GCT TC				
๑๖	PR๐๑-F	TAC TAG TAG GCA GCA TGT GA	๑๓๑-๑๕๑	๔	๖๐	$(TAA)_{๓}+(TC)_{๑๖}$
	PR๐๑-R	AAA CAG TAT TTG CCC TAC AT				
๑๗	PR๐๒-F	CGG ATT TGT ACC CAT ACT GC	๙๒-๑๐๖	๔	๖๐	$(AG)_{๘}+(AG)_{๑๑}$
	PR๐๒-R	AGC AGT CAT GTC CTT GAG GT				
๑๘	PR๐๓-F	CCA CAC AGT CGT TGA GTA GA	๒๗๐-๓๔๐	๕	๖๐	$(GT)_{๒๕}AT(GT)_{๖}+(GA)_{๑๒}$
	PR๐๓-R	TGG GAT ATG TTG AAA GAA CC				
๑๙	PR๐๔-F	TCT TGT CAT TCT CCC TTT CC	๙๑-๑๕๐	๖	๕๘	$(TCT)_{๔}+(TCT)_{๒๓}$
	PR๐๔-R	TTG CCT TCG AAC ATT ATC AA				
๒๐	PR๐๕-F	GTT ACA GGA AAA TCC GTT CC	๑๑๐-๑๒๘	๔	๖๐	$(GA)_{๘}GG(GA)_{๙}$
	PR๐๕-R	GAG CAT CAA TTG AGC ATT TC				
๒๑	PR๑๐-F	AAA TCT CAC CCA GCG AAC AC	๑๐๒-	๕	๖๐	$(CT)_{๕}T_{๒}(CT)_{๑๑}$

			๑๕๖			
	PR๑๐-R	GCC AGT GCT TGA GTT TGT CA				
๒๒	PR๑๑-F	CCT TCC CGG AAA CAG ATG TA	๑๒๒-๒๐๔	๕	๖๐	$(AG)_{๒๓}$
	PR11-R	ACC ACC GAA CCC CTT CTT T				

๔. จัดจำแนกพันธุ์บัวโดยอาศัยความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYS v. ๒.๑m

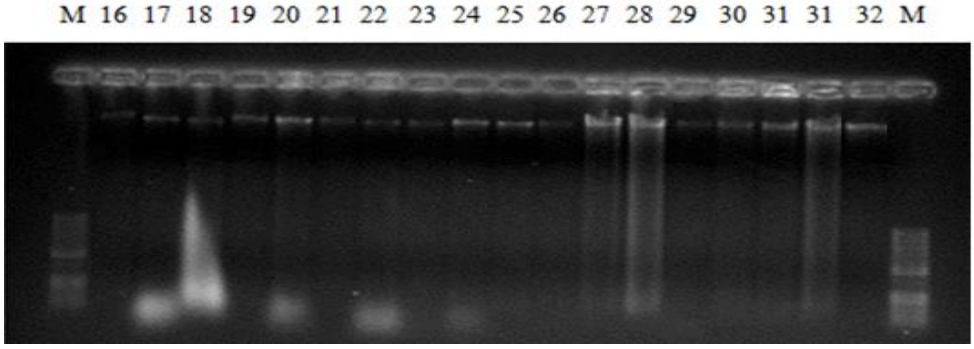
ระยะเวลาดำเนินการ เริ่มต้น ตุลาคม ๒๕๕๔ สิ้นสุด กันยายน ๒๕๕๖

สถานที่ดำเนินการ สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร (สทช.)
สำนักผู้เชี่ยวชาญ

๘. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสกัดและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

สกัดดีอ็นเอแล้วจำนวน ๕๘ ตัวอย่าง ได้ดีเอ็นเอคุณภาพดี มีความบริสุทธิ์ และมีปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ตั้งแต่ ๙๐๐ – ๕,๐๐๐ นาโนกรัม ดังตัวอย่างใน ภาพที่ ๑

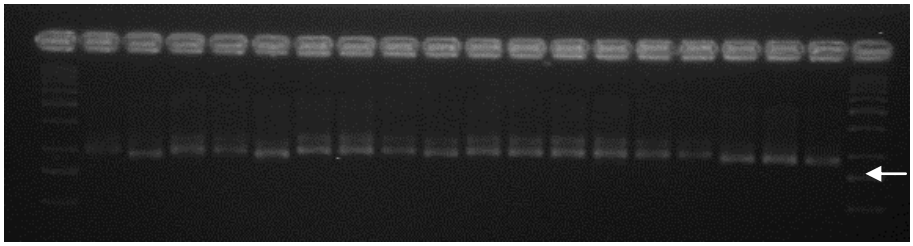


ภาพที่ ๑ แสดงตัวอย่างดีเอ็นเอบัวหลวงที่ใช้ในการทดลอง

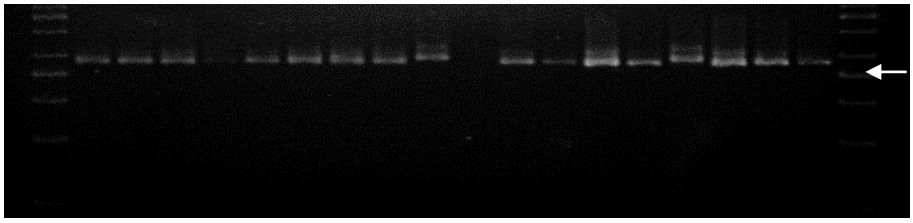
๒. การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์รวม ๒๒ คู่ ให้ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ชัดเจน ๑๙ ไพรเมอร์ ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ ๒-๔ แต่เมื่อติดฉลากแล้วนำไปเพิ่มปริมาณอีกครั้งพบว่ามีไพรเมอร์ที่ใช้ได้ ๑๔ ไพรเมอร์ จากนั้นส่งผลผลิตพีซีอาร์ไปวิเคราะห์ขนาด (ภาพที่ ๕) โดยผลการวิเคราะห์ขนาดอัลลีลของบัวหลวงแต่ละพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ติดฉลากที่ทราบผลแล้วนั้น มีจำนวนอัลลีลตั้งแต่ ๒-๘๐ อัลลีล ดังแสดงในตารางที่ ๒-๓

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M

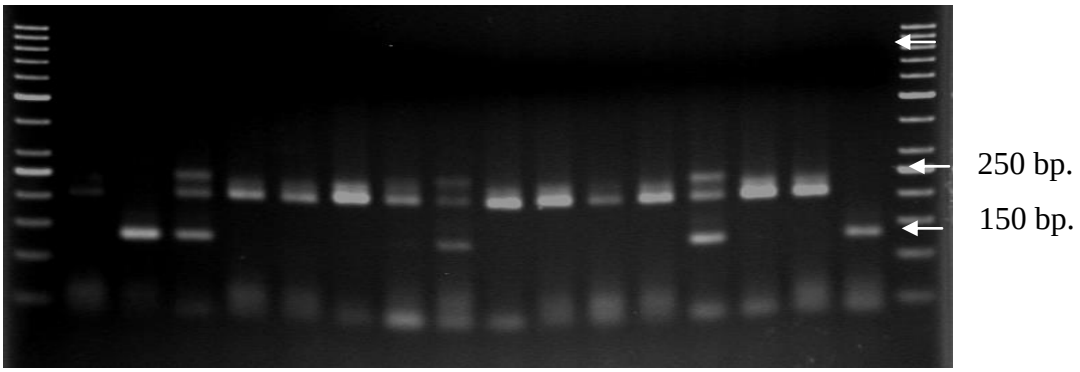


M 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 M

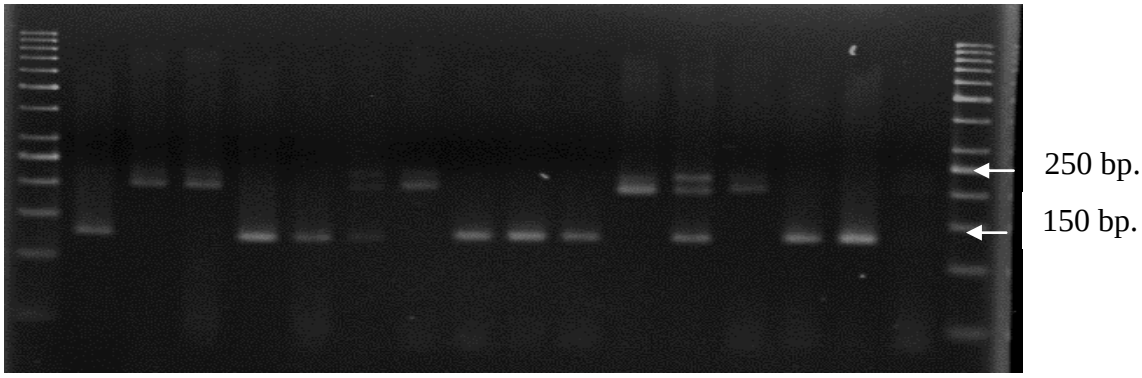


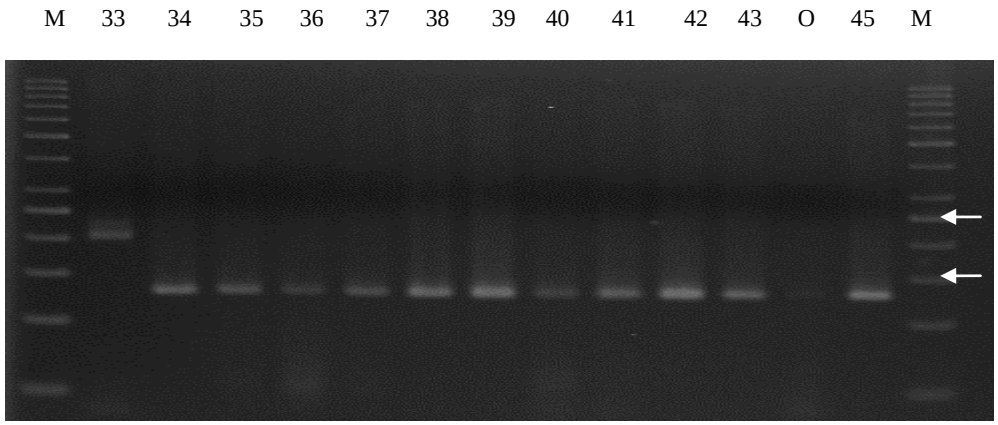
ภาพที่ ๒ แสดงตัวอย่างของผลการแยกขนาดดีเอ็นเอเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ Ns๐๔๙

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 M

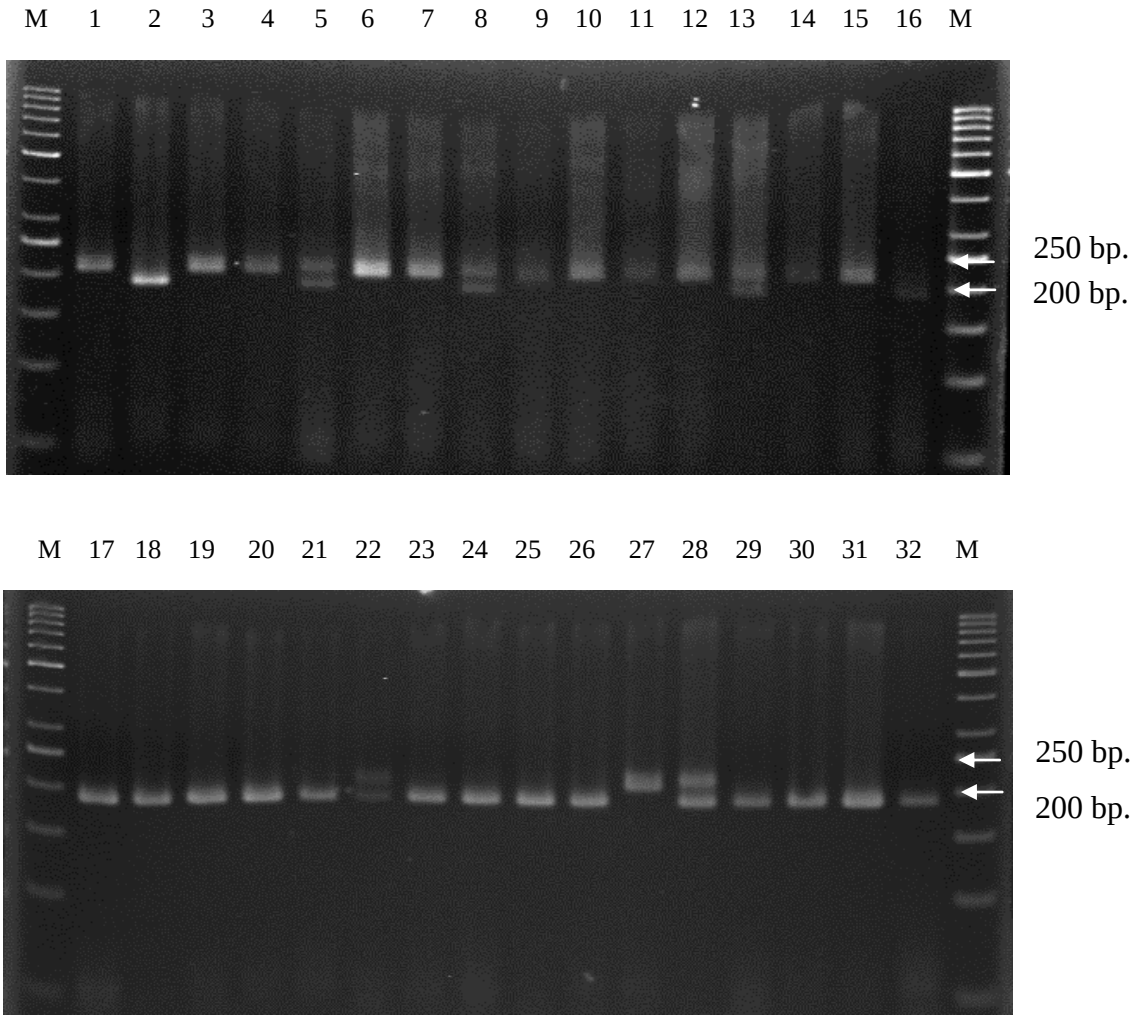


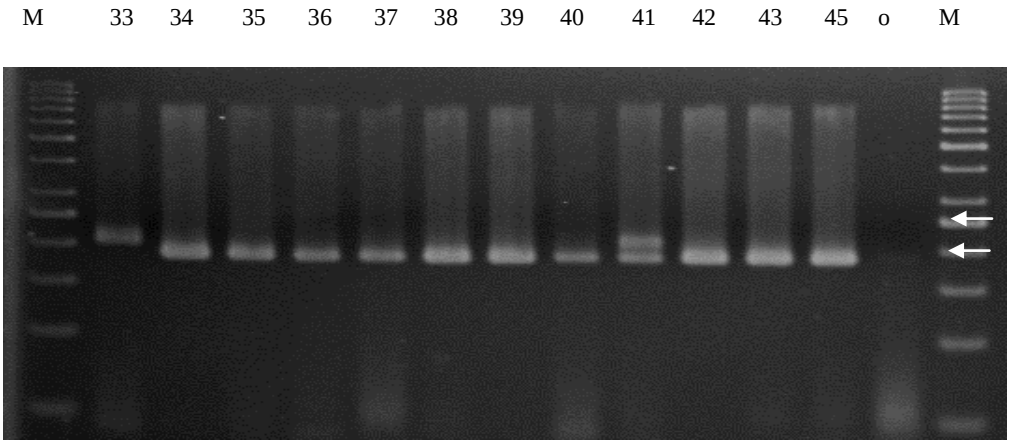
M 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 M



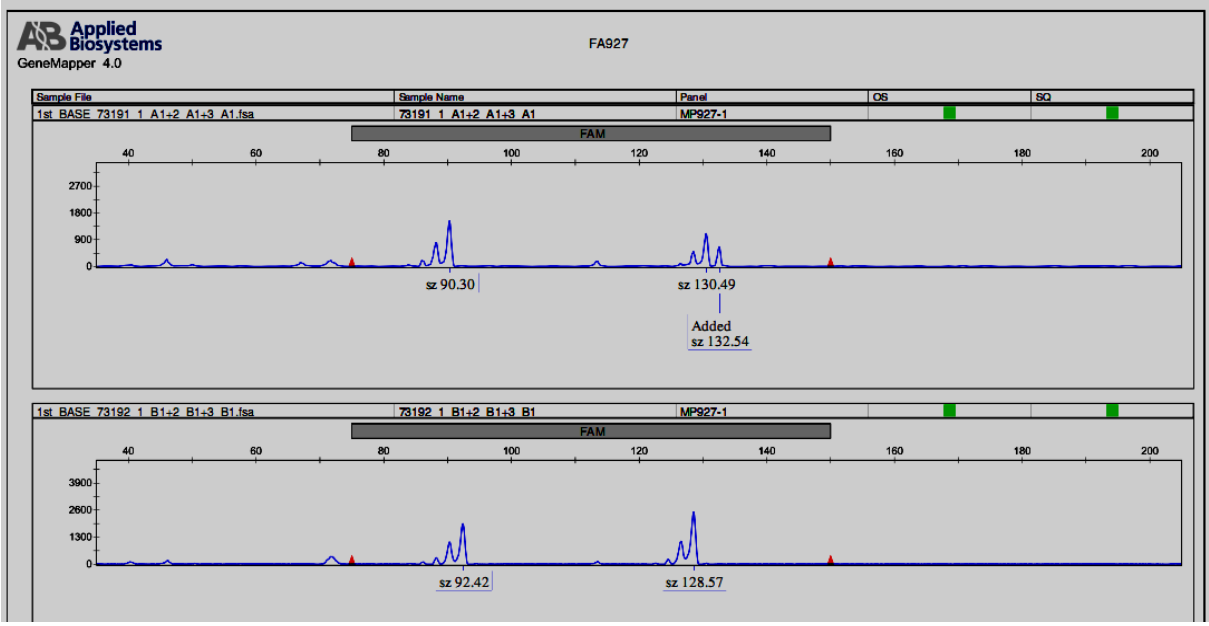


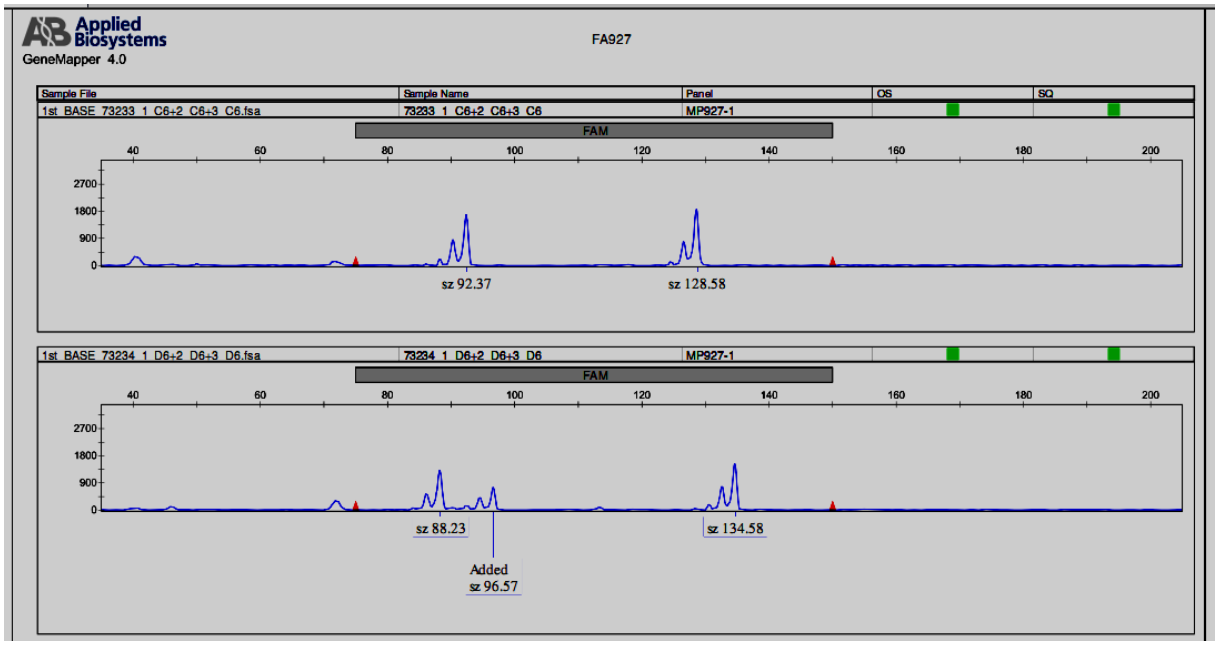
ภาพที่ ๓ แสดงตัวอย่างของผลการแยกขนาดดีเอ็นเอเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ PR๑





ภาพที่ ๔ แสดงตัวอย่างของผลการแยกขนาดดีเอ็นเอเมื่อทดสอบด้วยไพรเมอร์ PR๑๑





ภาพที่ ๕ แสดงตัวอย่างผลการจ้างวิเคราะห์ขนาด ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ที่ติดฉลากเรืองแสง

ตารางที่ ๒ แสดงผลการวิเคราะห์ขนาด alleles ของบัวหลวงทั้ง ๕๘ ตัวอย่าง จากไพรเมอร์ที่ ๑-๗

ตัวอย่างที่	ขนาด alleles (bp.) ของแต่ละไพรเมอร์						
	Nelumbo ๑๖	Nelumbo ๑๘	Nelumbo ๓๒	NS๐๑๐	NS๐๑๒	NS๐๓๔	NS๐๔๙
๑	๒๐๐	๒๙๒, ๒๙๖	๒๐๑	๑๑๘	๑๑๓, ๑๒๗	๑๐๒	๒๘๒
๒	๒๐๓	๒๘๘	๒๒๗	๑๑๒	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๓	๒๐๐, ๒๐๓	๒๘๘, ๒๙๓	๒๐๑, ๒๒๗	๑๑๒, ๑๑๘	๑๑๓, ๑๒๗	๑๐๐	๒๘๒
๔	๒๐๐	๒๙๒	๒๐๑	๑๑๘	๑๒๗	๑๐๒	๒๘๒
๕	๒๐๒	๒๘๙	๒๒๗	๑๑๔, ๑๒๐	๑๑๓	๙๘, ๑๐๔	๒๗๒
๖	๒๐๐	๒๙๒	๒๐๑	๑๑๘	๑๑๘	๑๑๗	๒๘๒
๗	๒๐๐	๒๙๒	๒๐๑	๑๒๐	๑๒๗	๑๐๒	๒๘๒
๘	๒๐๐	๒๙๒	๒๐๑	๑๑๘	๑๑๘	๑๑๔	๒๘๐
๙	๒๐๐	๒๙๒, ๒๙๖	๒๐๑	๑๑๘	๑๑๓, ๑๒๗	๑๐๒	๒๘๒
๑๐	๒๐๐, ๒๐๓	๒๙๒	๒๐๑, ๒๒๗	๑๑๒, ๑๒๐	๑๑๓, ๑๑๘	๑๐๐, ๑๒๘	๒๘๓
๑๑	๒๐๐	๒๙๒	๒๐๑	๑๒๒	๑๑๓	๑๑๒	๒๗๙
๑๒	๒๐๐	๒๙๒	๒๐๑	๑๑๘	๑๒๗	๑๐๒	๒๘๒
๑๓	๒๐๐	๒๙๒	๒๐๑	๑๑๘	๑๑๓	๑๐๒	๒๘๒
๑๔	๒๐๐	๒๙๒, ๒๙๖	๒๐๑	๑๑๘	๑๑๓, ๑๒๗	๑๐๐, ๑๐๒	๒๘๒
๑๕	๒๐๐, ๒๐๓	๒๘๘, ๒๙๒	๒๐๑, ๒๒๗	๑๑๔, ๑๒๐	๑๑๓	๑๐๐, ๑๐๒	๒๘๒
๑๖	๒๐๐	๒๙๒	๒๐๑	๑๑๘	๑๒๗	๑๐๒	๒๘๒
๑๗	๒๐๐	๒๙๒	๒๐๑	๑๑๘	๑๑๓	๑๐๒	๒๘๒
๑๘	๒๐๓	๒๙๑	๒๒๗	๑๑๒, ๑๑๔	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๑๙	๒๐๓	๒๙๑	๒๒๗	๑๑๒, ๑๑๔	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๒๐	๒๐๓	๒๘๙	๒๒๗	๑๑๒	๑๑๓	๙๘	๒๗๒
๒๑	๒๐๓	๒๘๘	๒๒๗	๑๑๖	๑๑๓	๙๘	๒๗๒
๒๒	๒๐๓	๒๘๘	๒๒๗	๑๑๒	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๒๓	๒๐๓	๒๘๙	๒๒๗	๑๑๒	๑๑๓	๙๘	๒๗๒
๒๔	๒๐๓	๒๘๘	๒๒๗	๑๑๒, ๑๑๔	๑๑๓	๙๘, ๑๐๐	๒๗๒
๒๕	๒๐๓	๒๙๑	๒๒๗	๑๑๒	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๒๖	๒๐๓	๒๙๑	๒๒๗	๑๑๒	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๒๗	๒๐๐	๒๙๑	๒๒๗	๑๑๒	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๒๘	๒๐๓	๒๙๑	๒๐๑, ๒๒๗	๑๑๒, ๑๑๔	๑๑๓, ๑๒๗	๙๘, ๑๐๐	๒๗๒
๒๙	๒๐๓	๒๙๑	๒๒๗	๑๑๒	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๓๐	๒๐๓	๒๙๑, ๓๐๔	๒๒๗	๑๑๒	๑๑๓, ๑๒๗	๑๐๐	๒๗๒, ๒๘๔
๓๑	๒๐๓	๒๙๑	๒๒๗	๑๑๔	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๓๒	๒๐๓	๒๙๑	๒๒๗	๑๑๒	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๓๓	๒๐๓	๒๘๘	๒๒๗	๑๑๒, ๑๑๔	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๓๔	๒๐๓	๒๘๘	๒๐๑, ๒๒๗	๑๑๒, ๑๑๔	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๓๕	๒๐๓	๒๙๑	๒๒๗	๑๑๒, ๑๑๔	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๓๖	๒๐๓	๒๙๑,๓๐๔	๒๐๑, ๒๒๗	๑๑๒, ๑๑๔	๑๑๓, ๑๒๗	๙๘, ๑๐๐	๒๗๒
๓๗	๒๐๓	๒๙๑	๒๒๗	๑๑๒, ๑๑๔	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒, ๒๘๒

๓๘	๒๐๓	๒๙๒	๒๒๗	๑๑๔	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒

ตารางที่ ๒ แสดงผลการวิเคราะห์ขนาด alleles ของบัวหลวงทั้ง ๕๘ ตัวอย่าง จากไพรเมอร์ที่ ๑-๗ (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ขนาด alleles (bp.) ของแต่ละไพรเมอร์						
	Nelumbo ๑๖	Nelumbo ๑๘	Nelumbo ๓๒	NS๐๑๐	NS๐๑๒	NS๐๓๔	NS๐๔๙
๓๙	๒๐๓	๒๘๘, ๒๙๑	๒๒๗	๑๑๒, ๑๑๔	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒, ๒๘๒
๔๐	๒๐๓	๒๘๘, ๒๙๑	๒๒๗	๑๑๒, ๑๑๔	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๔๑	๒๐๓	๒๘๘	๒๐๑	๑๑๔	๑๑๓	๑๐๐	๒๘๒
๔๒	๒๐๓	๒๘๘	๒๒๗	๑๑๒, ๑๑๔	๑๑๓	๙๘, ๑๐๐	๒๗๒
๔๓	๒๐๓	๒๙๑	๒๐๑, ๒๒๗	๑๑๔	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๔๔	๒๐๓	๒๘๙, ๒๙๑	๒๐๑	๑๑๒	๑๑๓	๙๘, ๑๐๐	๒๗๒
๔๕	๒๐๐	๒๙๓	๒๒๗	๑๑๘	๑๑๘	๑๑๒	๒๘๒
๔๖	๒๐๓	๒๘๙, ๒๙๒	๒๐๑	๑๑๖	๑๑๓	๑๐๐	๒๘๓
๔๗	๒๐๓	๒๘๙, ๒๙๒	๒๐๑	๑๑๔	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๓
๔๘	๒๐๓	๒๘๙	๒๐๑	๑๑๒	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๔๙	๒๐๓	๒๘๙	๒๐๑	๑๑๒	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๕๐	๒๐๓	๒๘๙	๒๐๑, ๒๒๗	๑๑๒, ๑๒๐	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๕๑	๒๐๓	๒๙๑	๒๐๑	๑๑๒	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๕๒	๒๐๓	๒๘๙	๒๐๑	๑๑๔	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๕๓	๒๐๓	๒๙๒	๒๐๑	๑๑๓	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๕๔	๒๐๓	๒๙๒	๒๐๑	๑๑๖	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๓
๕๕	๒๐๓	๒๘๘	-	๑๑๒	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๕๖	๒๐๓	๒๘๙	-	๑๑๒	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๕๗	๒๐๓	๒๙๑	-	๑๑๔	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
๕๘	๒๐๓	๒๙๑	-	๑๑๒	๑๑๓	๑๐๐	๒๗๒
รวมจำนวน alleles	๓	๗	๒	๘	๓	๘	๗

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ขนาด alleles ของบัวหลวงทั้ง 58 ตัวอย่าง จากไพรเมอร์ที่ 8-14

ตัวอย่างที่	ขนาด alleles (bp.) ของแต่ละไพรเมอร์						
	NS๐๕๐	Nsh๐๒	PR๑๐	PR๑๑	Nelumbo ๑๗	Nelumbo ๒๒	Nelumbo ๓๓
๑	๙๐, ๑๓๐	๑๓๙	๑๖๖	๒๑๐	๒๑๔	๑๗๐, ๑๗๑	๒๕๒, ๒๕๖
๒	๙๒, ๑๒๘	๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๒	๒๕๖
๓	๘๘, ๑๓๔	๑๓๗	๑๙๘	๒๐๘	๒๑๔, ๒๑๘	๑๗๐	๒๕๖
๔	๙๐, ๑๓๔	๑๓๙	๑๖๘	๒๑๐	๒๑๔	๑๗๒	๒๕๖
๕	๙๐, ๑๒๘	๑๔๒	๑๗๐	๑๙๐, ๒๑๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒, ๒๕๖
๖	๑๐๐, ๑๓๒	๑๓๗	๑๖๖	๒๐๘	๒๑๔	๑๖๘	๒๕๖
๗	๑๐๐, ๑๓๒	๑๓๙	๑๙๘	๒๑๐	๒๑๔	๑๗๒	๒๕๖
๘	๘๘, ๑๓๐	๑๓๗	๑๖๘	๒๐๘	๒๑๔, ๒๑๘	๑๗๑	๒๕๖
๙	๙๐, ๑๓๐	๑๓๙	๑๖๖	๒๑๐	๒๑๔	๑๗๐, ๑๗๑	๒๕๖
10	88, 132	137	198	190	214	170	256
11	92, 130	137	198	210	214	171	256

ตารางที่ ๓ แสดงผลการวิเคราะห์ขนาด alleles ของบัวหลวงทั้ง ๕๘ ตัวอย่าง จากไพรเมอร์ที่ ๘-๑๔ (ต่อ)

ตัวอย่างที่	ขนาด alleles (bp.) ของแต่ละไพรเมอร์						
	NS๐๕๐	Nsh๐๒	PR๑๐	PR๑๑	Nelumbo ๑๗	Nelumbo ๒๒	Nelumbo ๓๓
๑๒	๙๐, ๑๓๒	๑๔๐	๑๙๘	๒๑๐	๒๑๔	๑๗๐, ๑๗๑	๒๕๖
๑๓	๙๐, ๑๓๐	๑๓๙	๑๖๖	๒๑๐	๒๑๔, ๒๑๘	๑๗๐, ๑๗๑	๒๕๖
๑๔	๙๐, ๑๓๐	๑๓๙	๑๖๖, ๑๙๘	๒๑๐	๒๑๔	๑๗๐, ๑๗๑	๒๕๖
๑๕	๘๘, ๑๓๐	๑๓๗	๑๗๒	๑๙๐, ๒๑๐	๒๑๔	๑๗๐	๒๕๖
๑๖	๙๔, ๑๓๔	๑๓๙	๑๙๘	๒๑๐	๒๑๘	๑๗๑	๒๕๖
๑๗	๙๐, ๑๓๐	๑๓๙	๑๖๖, ๒๐๑	๒๑๐	๒๑๘	๑๗๐, ๑๗๑	๒๕๖
๑๘	๙๒, ๑๒๘	๑๔๑	๑๗๒, ๑๙๘	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๗
๑๙	๙๒, ๑๒๘	๑๔๑	๑๙๘	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒
๒๐	๑๐๔, ๑๒๖	๑๔๒	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๗
๒๑	๙๒, ๑๒๘	๑๔๒	๑๗๒	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒
๒๒	-	๑๔๒	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๔, ๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒
๒๓	๑๐๔, ๑๒๖	๑๔๒	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๖
๒๔	๙๒, ๑๒๘	๑๔๒	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒, ๒๕๖
๒๕	๙๒, ๑๒๘	๑๔๒	๑๗๒	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒
๒๖	๙๒, ๑๒๘	๑๔	๑๗๒	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒

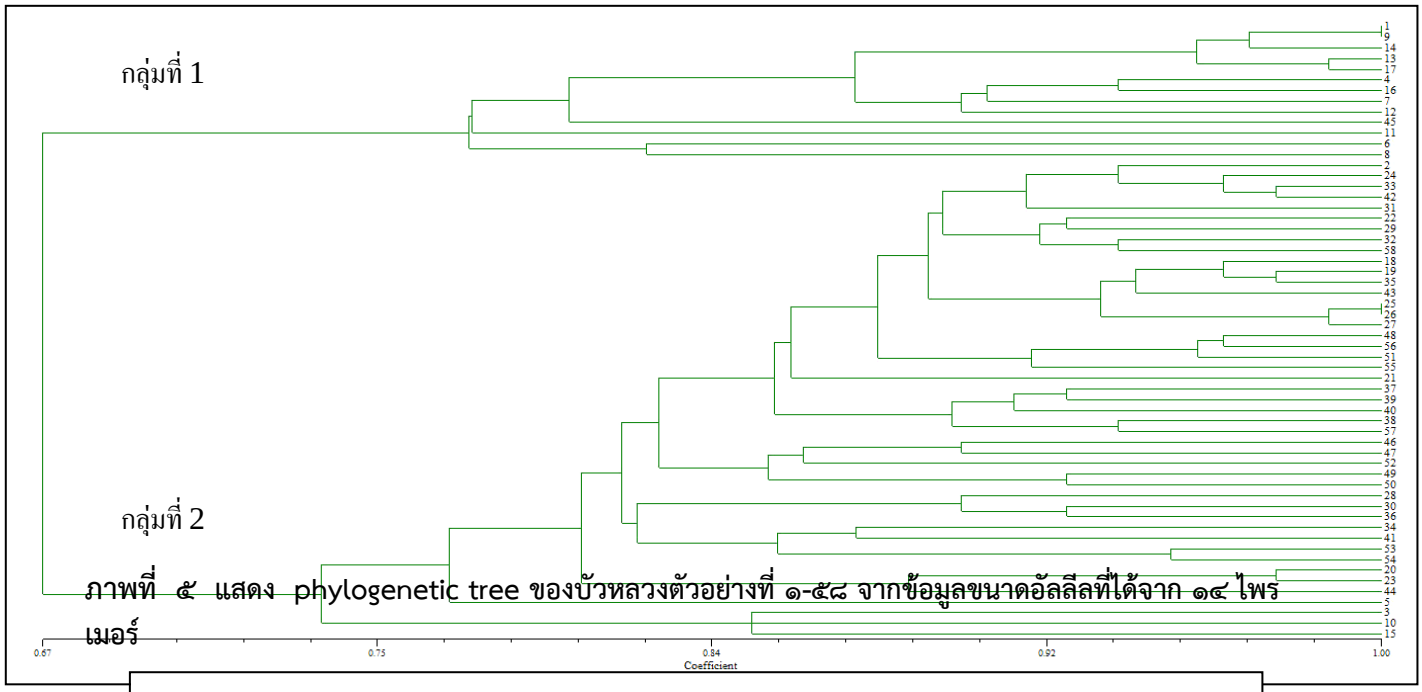
๒๗	๙๒, ๑๒๘	๑๔๒	๑๗๒	๑๙๐, ๒๐๘	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒
๒๘	๙๐, ๑๓๐	๑๓๙, ๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐, ๒๑๒	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒, ๒๕๖
๒๙	๙๖, ๑๓๔	๑๔๒	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๖
๓๐	๙๖, ๑๓๔	๑๓๙, ๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐, ๒๑๒	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒, ๒๕๖
๓๑	๙๒, ๑๒๘	๑๓๙	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๖
๓๒	๑๒๘	๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒
๓๓	๙๒, ๑๒๘	๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๔	๑๗๐	๒๕๒, ๒๕๖
๓๔	๙๖, ๑๓๔	๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐, ๒๑๒	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๖
๓๕	๙๒, ๑๒๘	๑๔๑	๑๗๒	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒
๓๖	๙๖, ๑๓๔	๑๓๙, ๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐, ๒๐๘	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒, ๒๕๖
๓๗	๘๘, ๑๒๘	๑๓๗, ๑๔๑	๑๙๘	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒, ๒๕๖
๓๘	๙๖, ๑๓๔	๑๓๗, ๑๔๑	๑๗๒, ๑๙๘	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒
๓๙	๘๘, ๑๓๔	๑๓๗	๑๗๒	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒, ๒๕๖
๔๐	๘๘, ๑๓๔	๑๓๗	๑๙๘	๑๙๐, ๒๐๘	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒
๔๑	๙๖, ๑๓๔	๑๔๑	๑๗๒	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๒, ๒๕๖
๔๒	๙๒, ๑๒๘	๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๖
๔๓	๙๒, ๑๒๘	๑๔๑	๑๗๒	๑๙๐	๒๑๘	-	๒๕๒
๔๔	๑๐๔, ๑๒๖	๑๓๙	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	๒๕๑, ๒๕๖
๔๕	๙๐, ๑๓๔	๑๓๙	๑๖๖	๒๐๘	๒๑๔	๑๗๑	๒๕๖

ตารางที่ ๓ แสดงผลการวิเคราะห์ขนาด alleles ของบัวหลวงทั้ง ๕๘ ตัวอย่าง จากไพรเมอร์ที่ ๘-๑๔ (ต่อ)

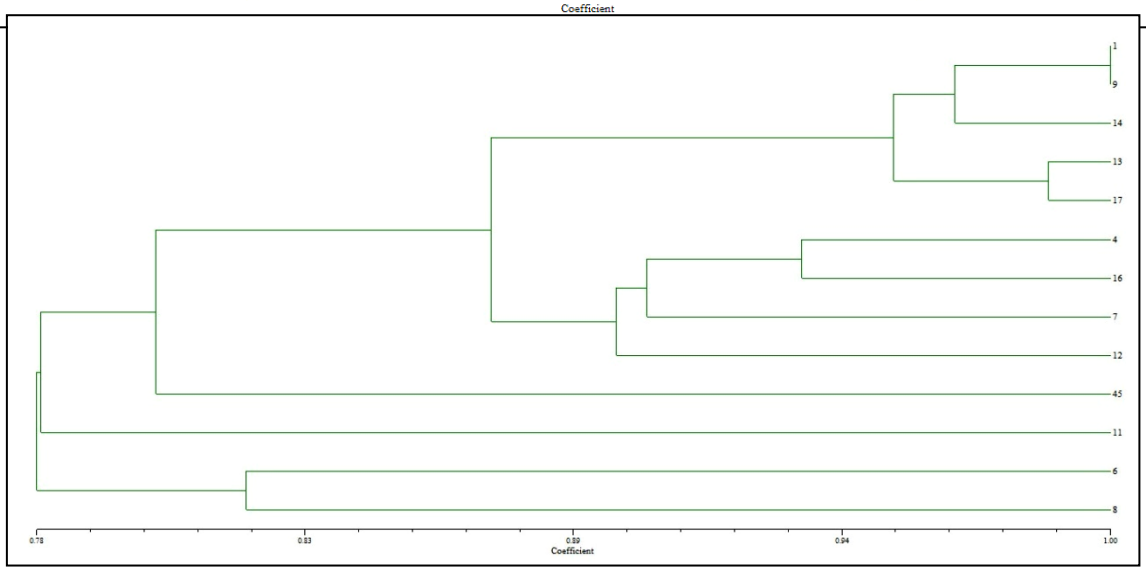
ตัวอย่างที่	ขนาด alleles (bp.) ของแต่ละไพรเมอร์						
	NS๐๕๐	Nsho๒	PR๑๐	PR๑๑	Nelumbo ๑๗	Nelumbo ๒๒	Nelumbo ๓๓
๔๖	๙๒, ๑๒๘	๑๔๑	๑๗๒	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐, ๑๗๒	252, 256
๔๗	๙๒, ๑๒๘	๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๑, ๑๗๒	252, 256
๔๘	๙๒, ๑๒๘	๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๒	252
๔๙	๙๒, ๑๒๘	๑๓๗, ๑๔๑	๑๙๘	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๒	252, 256
๕๐	๙๒, ๑๓๐	๑๓๗, ๑๔๑	๑๙๘	๑๙๐, ๒๐๘	๒๑๘	๑๗๑, ๑๗๒	252, 256
๕๑	๙๒, ๑๒๘	๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๖๘	252
๕๒	๑๒๖	๑๔๑	๑๗๒	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๑	252
๕๓	๙๖, ๑๒๔	๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	256
๕๔	๙๖, ๑๒๔	๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	256
๕๕	๙๔, ๑๒๘	๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๖๘, ๑๗๒	252, 256
๕๖	๙๒, ๑๒๘	๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๖๘	252
๕๗	๘๘, ๑๓๔	๑๓๗, ๑๔๑	๑๗๒	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	252
๕๘	๘๘, ๑๓๔	๑๔๑	๑๗๐	๑๙๐	๒๑๘	๑๗๐	252, 256
รวมจำนวน alleles	๑๔	๕	๙	๔	๒	๔	๔

๓. **จัดจำแนกพันธุ์บัวโดยอาศัยความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม**

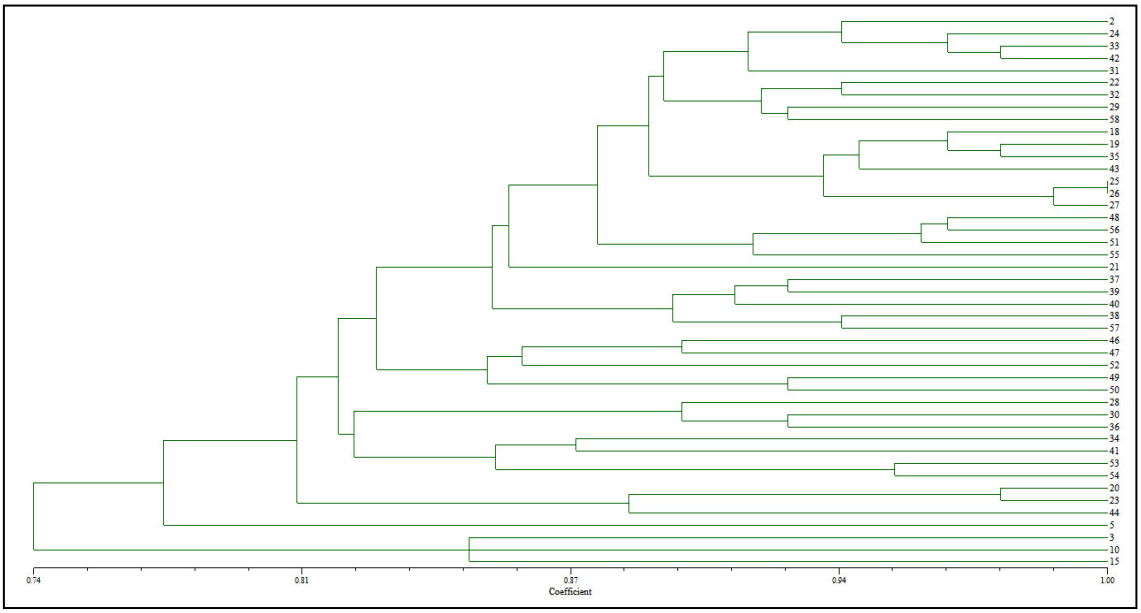
บัวหลวงที่นำมาศึกษาสามารถจักจำแนกได้เป็น ๒ กลุ่มใหญ่ที่ค่า coefficient เท่ากับ ๐.๒ โดยกลุ่มที่ ๑ ประกอบด้วย ตัวอย่างที่ ๑, ๔, ๖, ๗, ๘, ๙, ๑๑, ๑๒, ๑๓, ๑๔, ๑๖, ๑๗ และตัวอย่างที่ ๔๕ ส่วนตัวอย่างที่เหลือถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ ๒ ดังแสดงในภาพที่ ๕



ภาพที่ ๕ แสดง phylogenetic tree ของบัวหลวงตัวอย่างที่ ๑-๕๘ จากข้อมูลขนาดอัลลีลที่ได้จาก ๑๔ ไพรเมอร์



ภาพที่ ๖ แสดง phylogenetic tree ของบัวหลวงกลุ่มย่อยที่ ๑ จากข้อมูลขนาดอัลลีลที่ได้จาก ๑๔ ไพรเมอร์



ภาพที่ ๗ แสดง phylogenetic tree ของบัวหลวงกลุ่มย่อยที่ ๒ จากข้อมูลขนาดอัลลีลที่ได้จาก ๑๔ ไพรเมอร์

ในกลุ่มหลักทั้งสองกลุ่มสามารถแบ่งออกเป็น subgroups ได้อีกดังนี้

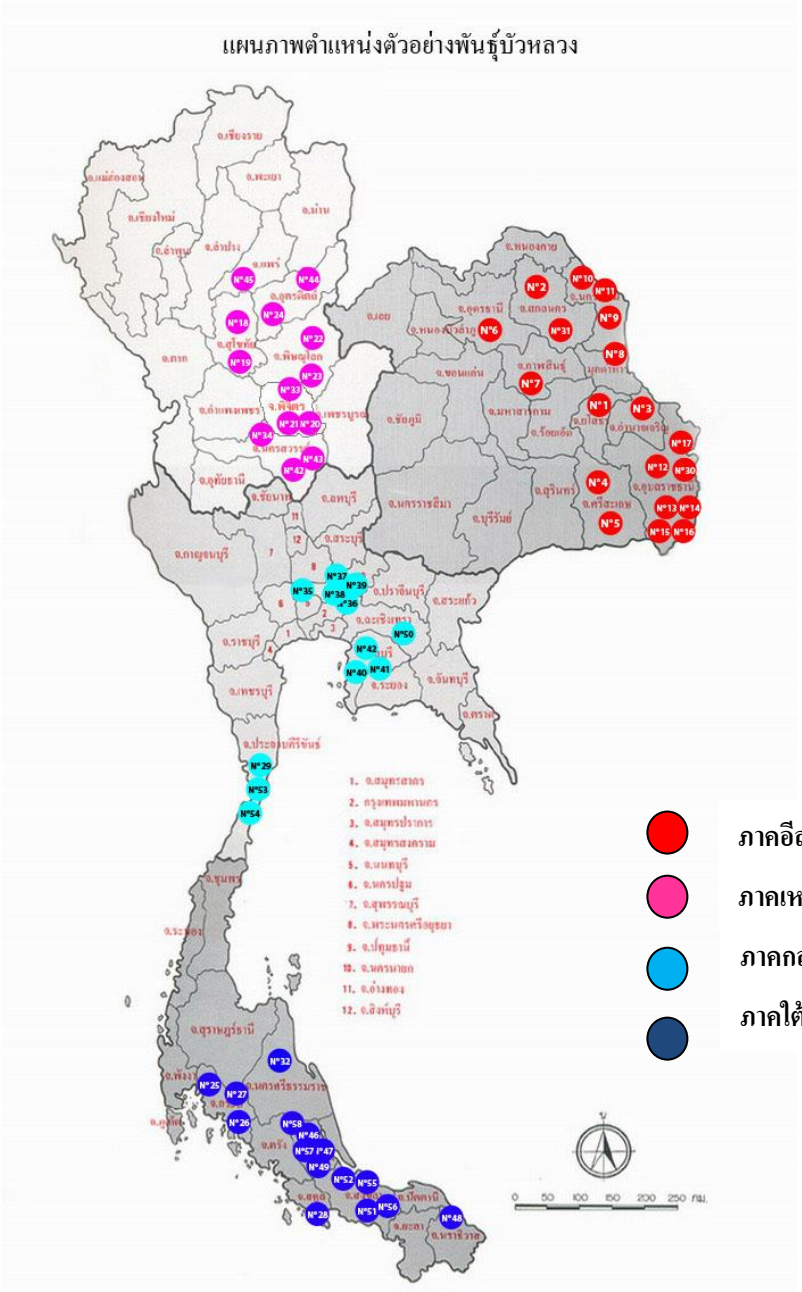
กลุ่มที่ ๑ สามารถแบ่งออกเป็นอีก ๒ subgroups และตัวอย่างที่ไม่เข้าพวกคือ

- ๑, ๙, ๑๓, ๑๔, ๑๗
- ๔, ๗, ๑๒, ๑๖
- ๖, ๘
- 11
- 45

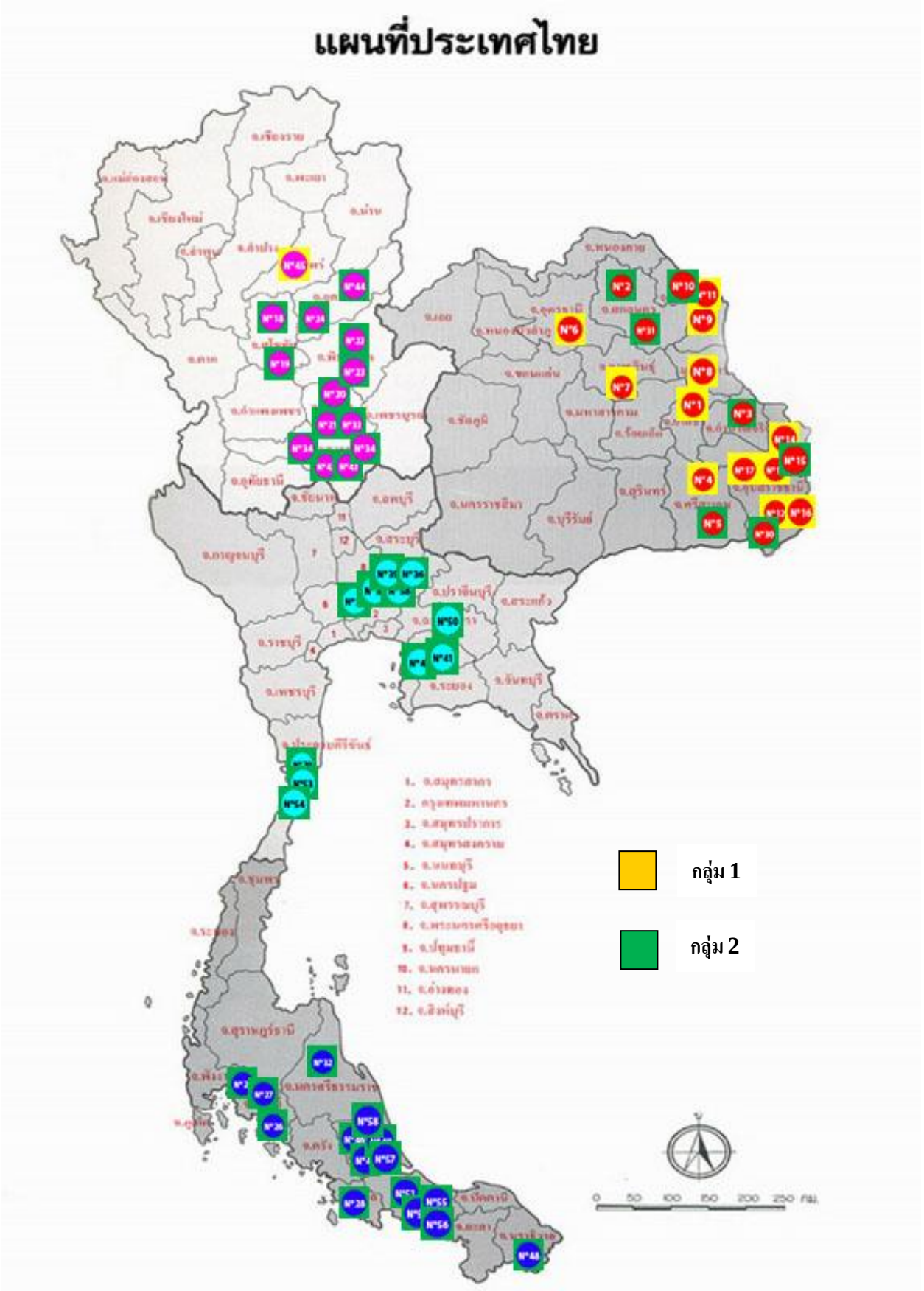
กลุ่มที่ ๒ สามารถแบ่งออกเป็นอีก ๘ subgroups และตัวอย่างที่ไม่เข้าพวก คือ

- ๒, ๒๒, ๒๔, ๒๙, ๓๑, ๓๒, ๓๓, ๔๒, ๕๘
- ๒๘, ๓๐, ๓๔, ๓๖, ๔๑, ๕๓, ๕๔
- ๑๘, ๑๙, ๒๕, ๒๖, ๒๗, ๓๕, ๔๓
- ๓๗, ๓๘, ๓๙, ๔๐, ๕๗
- ๔๖, ๔๗, ๔๙, ๕๐, ๕๒
- ๔๘, ๕๑, ๕๕, ๕๖
- ๒๐, ๒๓, ๔๔
- ๓, ๑๐, ๑๕
- ๒๑
- ๕

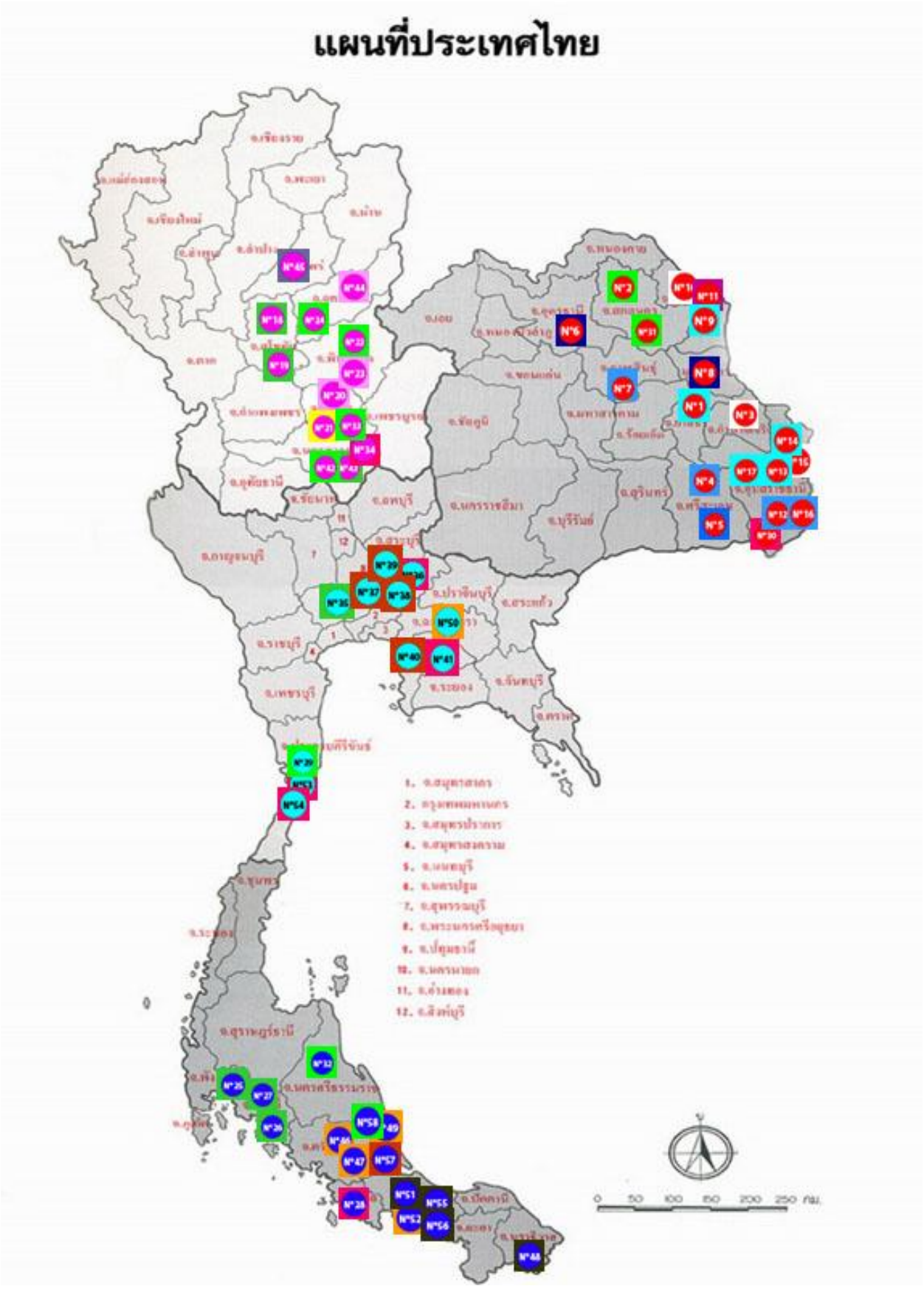
๔. จัดจำแนกพันธุ์บัวโดยอาศัยความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับแหล่งอาศัย



ภาพที่ ๘ แสดงตำแหน่งตัวอย่างพันธุ์บัวหลวงจากทั่วทุกภาคของประเทศ



ภาพที่ ๙ แสดงการกระจายตัวของพันธุ์บัวโดยอาศัยความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับแหล่งอาศัย



ภาพที่ ๑๐ แสดงการกระจายตัว subgroup ของพันธุ์บัวโดยอาศัยความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับแหล่งอาศัย (สีเดียวกัน บ่งบอกถึง subgroup เดียวกัน)

จะเห็นได้ว่า ตัวอย่างบัวหลวงจากทั่วประเทศแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ๆ กลุ่มที่ ๑ กระจุกตัวอยู่บริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และมีการกระจายตัวไม่มาก กลุ่มที่ ๒ กระจายตัวอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ และมีการกระจายตัวมากกว่ากลุ่มที่ ๑ โดยกลุ่มที่ ๑ ประกอบด้วยลักษณะดอกจำเพาะคือมีสีขาว และกลุ่มที่ ๒ มีลักษณะดอกจำเพาะคือสีชมพู โดยมีทั้งที่เป็นบัวแหลม และบัวฉัตร

นอกจากนี้บัวหลวงทั้งสองกลุ่มนี้ สามารถแยกออกจากกันได้โดย Specific primer NS๐๑๐ โดยการเปรียบเทียบขนาดอัลลีล โดยกลุ่มที่ ๑ มีขนาด อัลลีล ๑๑๘ bp. ยกเว้นตัวอย่างเบอร์ ๗

๑๐. **การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์**

ได้ลักษณะทางพฤกษศาสตร์และพันธุกรรมของบัวหลวงรวมแล้วไม่น้อยกว่า ๔๐ สายพันธุ์ เพื่อใช้เป็นฐานใน การพัฒนาปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงที่มีลักษณะดีเด่นด้านการเจริญเติบโต การให้ดอกและฝักที่ดี เหมาะสมกับการปลูกในพื้นที่

๑๑. เอกสารอ้างอิง

ณรงค์ โฉมเฉลา. ๒๕๕๐. ศัพท์บัว. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ บว. ๑/๒๕๕๐. เครือข่ายพืชปลูกพื้นเมืองไทย ร่วมกับ สำนักงานพัฒนานโยบายและแผนพัฒนาธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. ๙๐ หน้า.

ภัทราวุธ ศุภศานต์. ๒๕๓๙. การศึกษาสัณฐานวิทยาของพันธุ์บัวในจังหวัดเชียงใหม่. ปัญหาพิเศษ ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

วาสนา มิตรานนท์. ๒๕๒๗. การศึกษาลักษณะพฤษศาสตร์ของพืชสกุลบัวหลวงในประเทศไทย. ปัญหาพิเศษ ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.t

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. ๒๕๕๒. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ๒๖๙ หน้า.

Kubo, N., M. Hirrai, A. Kaneko, D. Tanaka and K. Kasumi.๒๐๐๙. Development and characterization of simple aequence repeat (SSR) markers in the water lotus (*Nelumbo nucifera*). Aquatic Botany ๙๐: ๑๙๑-๑๙๔.

Subhuti Dharmananda. ๒๐๐๒. Lotus Seed: Food and Medicine. Available at: http://www.itmonline.org/arts/lotus.htm

Pan, L., Z. QUAN, S. Li, H. Liu, X. Huang, W. Ke and Y. Ding. ๒๐๐๗. Isolation and characterization of microsatellite markers in the sacred lotus (*Nelumbo nucifera Gaertn.*). Molecular Ecology Notes ๗:๑๐๕๔-๑๐๕๖.

Tian, H., X. Chen, J. Xue, J. Wen, G Mitchell and S. Zhou. ๒๐๐๘. Development and characterization of microsatellite loci for lotus (*Nelumbo nucifera*). Conserv Genet. ๙:๑๓๘๕-๑๓๘๘.