การจำแนกพันธุ์บัวหลวงด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี

Identification of Lotus Using AFLP Markers

นฤมล ธนานันต์

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 13180

ธีระชัย ธนานันต์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ต.คลองหนึ่ง อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ

ได้นำเทคนิคเอเอฟแอลพีมาตรวจสอบพันธุ์บัวหลวงในประเทศไทย โดยตรวจสอบบัวหลวง 5 พันธุ์ กับไพรเมอร์ 64 คู่ พบว่าไพรเมอร์ 22 คู่ หรือคิดเป็น 34.38 เปอร์เซ็นต์ ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงได้ ไพรเมอร์ 16 คู่ ให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันและให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับบัวหลวงแต่ละพันธุ์รวมทั้งสิ้น 23 แถบ เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพีในบัวหลวงแต่ละพันธุ์สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้และพบว่าพันธุ์บัวหลวงในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ

คำสำคัญ : การจำแนกพันธุ์ บัวหลวง เอเอฟแอลพี เครื่องหมายดีเอ็นเอ

Abstract

Amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique was used to identify lotus cultivars in Thailand. Five lotus cultivars have been collected. The total of 64 *Eco*RI-*Mse*I primer-pair combinations were screened and 22 primer combinations or 34.38 percent of them gave clear DNA fingerprint and could be potentially used for study the genetic diversity of lotus. Sixteen primer combinations showed clear differences of DNA pattern among the 5 lotus cultivars and gave 23 specific DNA markers in each of lotus cultivars. The evolutionary relationship among them was determined based on similarity coefficients from each lotus cultivar and the result showed narrow genetic diversity of lotus cultivars.

Keywords: Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaerth.), Amplified fragment length polymorphism (AFLP), DNA marker

1. คำนำ

บัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaerth.) เป็นพืชน้ำล้มลุกที่มีอายุยืนนานหลายปี ลำต้นเป็นเหง้า ไหล หรือหัวอยู่ในดินใต้น้ำ ใบเป็นใบเดี่ยวรูปร่างค่อนข้างกลมและกว้างซึ่งเจริญมาจากลำต้นและมีก้านใบส่งขึ้นมาจากใต้น้ำ ดอกเป็นดอกเดี่ยวที่สมบูรณ์เพศ โดยดอกมีรูปร่างและสีสันสวยงาม ดังนั้นจึงได้รับการขนานนามว่าเป็น “ราชินีแห่งไม้น้ำ” คนไทยนิยมปลูกบัวหลวงประดับตาม

วัดวาอาราม สถานที่สำคัญ และอาคารบ้านเรือนทั่วไปมาตั้งแต่สมัยโบราณ [1]

บัวหลวงเป็นพืชที่มีคุณูปการและอยู่คู่กับวิถีชีวิตของคนไทยมาตั้งแต่โบราณกาล โดยดอกบัวหลวงเป็นสัญลักษณ์ของความบริสุทธิ์และคุณงามความดีตามคตินิยมของพุทธศาสนิกชนทั่วไป จึงนิยมนำดอกบัวหลวงมาบูชาพระและประกอบพิธีทางศาสนา เหง้า ไหล และเมล็ดบัวหลวงใช้ประกอบอาหาร นอกจากนี้บัวหลวงยังทรงคุณค่าด้านสมุนไพรอย่างยิ่ง ส่วนที่เป็นยาหรือประกอบเครื่องสมุนไพร ได้แก่ เมล็ด ต้นอ่อน ฝัก ก้าน เหง้า ใบ ดอก เกสรตัวผู้ เป็นต้น [2]

เนื่องจากความสำคัญของบัวหลวงดังกล่าวจึงได้มีแนวความคิดที่จะรวบรวมพันธุ์บัวหลวงพื้นเมืองของไทยนำมาศึกษาและจำแนกพันธุ์ด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล (Molecular Genetics) เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) และตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่สามารถจำแนกพันธุ์บัวหลวงได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการคุ้มครองพันธุกรรมบัวหลวงพื้นเมืองของไทยให้รอดพ้นจากการแอบอ้างถือสิทธิ์ครอบครองโดยต่างชาติ นอกจากนี้ยังมีบทบาทต่อการปรับปรุงพันธุ์บัวหลวงในอนาคต เนื่องจากเครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบสายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำโดยไม่ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโต อีกทั้งยังบ่งชี้ความเหมือนหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้อย่างชัดเจน ดังนั้นปัจจุบันโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชหรือสัตว์จึงนิยมใช้กันมากขึ้น [3]

เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP, amplified fragment length polymorphism) เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งในคราวเดียวกัน ซึ่ง Zabeau และ Vos ได้ประยุกต์จากเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP, restriction fragment length polymorphism) และเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, random amplified polymorphic DNA) โดยหลักการคือเป็นการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ (PCR, polymerase chain reaction) แล้วแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) หลังจากนั้นจึงตรวจสอบด้วยวิธีออโตเรดิโอกราฟ (autoradiograph) หรือการใช้สารเรืองแสง (fluorescent detection) หรือการย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate) หรือการไฮบริไดซ์ (hybridization) โดยรูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (DNA pattern) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์คู่หนึ่งๆ คือลายพิมพ์เอเอฟแอลพี (AFLP fingerprint) ซึ่งแถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ของแต่ละตัวอย่างจะบ่งชี้ความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ เรียกว่าเครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP marker) [3,4]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวงพื้นเมืองของไทยด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี และตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถจำแนกพันธุ์บัวหลวงได้

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 บัวหลวงพื้นเมืองของไทย

เก็บรวบรวมบัวหลวงพื้นเมืองของไทย 5 พันธุ์ ได้แก่ บัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ และสัตตบงกช โดยเก็บพันธุ์ละ 5 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ สถานที่เพาะปลูก และตลาดจำหน่าย

2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากบัวหลวง

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบบัวหลวงด้วยวิธีประยุกต์จาก Agrawal และคณะ [5] หลังจากนั้นจึงตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ และตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) [6]

2.3 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวงด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี [3]

รวมดีเอ็นเอบัวหลวงทั้ง 5 ตัวอย่าง ในแต่ละพันธุ์เป็นตัวอย่างเดียวกัน แล้วนำไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ (1) การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับอะแดพเตอร์ (adapter) โดยตัดดีเอ็นเอ 250 นาโนกรัม (ng) ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I ชนิดละ 2.5 ยูนิต (unit) ในบัฟเฟอร์ (buffer) (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate และ 50 mM potassium acetate) แล้วนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาเชื่อมต่อเข้ากับ *Eco*RI adapter และ *Mse*I adapter (ตารางที่ 1) ชนิดละ 250 และ 2,500 นาโนโมลาร์ (nM) ตามลำดับ โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (1 mM ATP, 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT และ 50 ng/ml BSA) แล้วเจือจางให้เป็น 20 เท่า ด้วยบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของอะแดพเตอร์และไพรเมอร์

อะแดพเตอร์หรือไพรเมอร์	ลำดับเบส
*Eco*RI adapter	5′-CTCGTAGACTGCGTACC-3′ 3′-CATCTGACGCATGGTTAA-5′
*Mse*I adapter	5′-GACGATGAGTCCTGAG-3′ 3′-TACTCAGGACTCAT-5′
E-A	5′-GACTGCGTACCAATTCA-3′
M-C	5′-GATGAGTCCTGAGTAAC-3′

(2) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ขั้นตอน คือ preselective amplification และ selective amplification นำชิ้นดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับอะแดพเตอร์และเจือจางมา 2.5 ไมโครลิตร แล้วเพิ่มปริมาณด้วย preselective primer 2 ชนิด คือ E-A และ M-C (ตารางที่ 1) ชนิดละ 200 นาโนโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 1.5 mM $MgCl_2$) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 160 ไมโครโมลาร์ (μM) ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร (μl) โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.5 ยูนิต แล้วทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, 52°C เป็นเวลา 1 นาที และ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 20 รอบ หลังจากนั้นจึงเจือจาง preselective amplification ด้วยบัฟเฟอร์ TE ให้เป็น 20 เท่า

นำ preselective amplification ที่เจือจางมา 5 ไมโครลิตร แล้วเพิ่มปริมาณด้วย selective primer ทีละ 2 ชนิด คือ E-ANN และ M-CNN (N คือ A, C, G หรือ T) (ตารางที่ 2) ชนิดละ 250 นาโนโมลาร์ ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ และมีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 0.5 ยูนิต ซึ่งงานวิจัยนี้ใช้ selective primer ทั้งหมด 64 คู่ ทำปฏิกิริยา touch down PCR ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, 65°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 12 รอบ แต่ละรอบจะลดอุณหภูมิ annealing จาก 65°C ลงรอบละ 0.7°C จนถึง 56°C หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, 56°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 23 รอบ

(3) ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะคริลาไมด์ 6 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

2.4 การวิเคราะห์ผล

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวง 5 พันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพีและตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง จากนั้นหาค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด โดยวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average)

3. ผลและวิจารณ์

การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวงด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ 64 คู่ ทดสอบกับดีเอ็นเอบัวหลวงปัทมา พบว่าไพรเมอร์ 22 คู่ หรือคิดเป็น 34.38 เปอร์เซ็นต์ ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสามารถใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงได้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวงด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยใช้ไพรเมอร์ 64 คู่

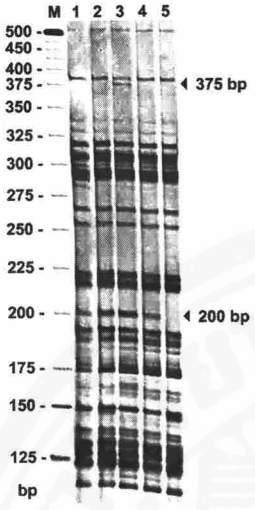
ไพรเมอร์สำหรับ *Eco*RI adapter	ไพรเมอร์สำหรับ *Mse*I adapter							
	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG	M-CTT
E-AAC	X	X	X	X	X	X	X	X
E-AAG	O	O	O	O	O	O	O	O
E-ACA	O	O	O	O	O	O	O	O
E-ACC	O	O	O	O	O	O	O	O
E-ACG	O	O	O	O	O	O	O	O
E-ACT	O	O	O	O	O	O	O	O
E-AGC	X	X	X	X	X	X	X	X
E-AGG	X	X	X	X	X	X	O	O

X คือให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจน, O คือไม่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหรือให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอไม่ชัด

เมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวง 5 พันธุ์ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ 22 คู่ ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1,066 แถบ และมีแถบดีเอ็นเอ 23 แถบ ขนาดประมาณ 80-475 คู่เบส (bp) (ตารางที่ 3) ซึ่งให้ความแตกต่างในลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากไพรเมอร์ 16 คู่ โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละคู่ไพรเมอร์พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์บัวหลวง 1-2 แถบ ซึ่งสามารถใช้แถบดีเอ็นเอนี้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจำแนกพันธุ์บัวหลวงได้

ตัวอย่าง เช่น คู่ไพรเมอร์ E-AAC + M-CTG ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบดีเอ็นเอจำเพาะ 2 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 375 คู่เบส จำเพาะกับบัวหลวงปัทมา และแถบดีเอ็นเอขนาด 200 คู่เบส จำเพาะกับบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา และสัตตบุษย์ (ภาพที่ 1)

ดังนั้นเทคนิคเอเอฟแอลพีที่พัฒนาขึ้นมาในครั้งนี้จึงสามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์บัวหลวงได้เช่นเดียวกับบทความวิจัยอื่นๆ ที่เคยมีผู้รายงานในยูคาลิปตัส ไผ่ กล้วย มะม่วง เป็นต้น [7,8,9,10] นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของบัวหลวงได้ด้วย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนจัดการอนุรักษ์พันธุ์บัวหลวงได้อย่างเหมาะสมต่อไป



ภาพที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-AAC/M-CTG ซึ่งให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีแถบดีเอ็นเอจำเพาะ 2 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 375 คู่เบส จำเพาะกับบัวหลวงปัทมา และแถบดีเอ็นเอขนาด 200 คู่เบส จำเพาะกับบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา และสัตตบุษย์ [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 25 bp DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-5 คือดีเอ็นเอบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก ปัทมา สัตตบุษย์ และสัตตบงกช ตามลำดับ]

ตารางที่ 3 แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับพันธุ์บัวหลวงซึ่งพบในลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี

คู่ไพรเมอร์	ขนาดแถบดีเอ็นเอ (คู่เบส)	พันธุ์บัวหลวงที่ตรวจพบแถบดีเอ็นเอ
E-AAC + M-CAC	340 330	บุณฑริก บัวหลวงพระราชินี
E-AAC + M-CAG	350	บุณฑริกและสัตตบุษย์
E-AAC + M-CTA	130 120	บัวหลวงพระราชินี ปัทมา
E-AAC + M-CTC	215	บัวหลวงพระราชินี, บุณฑริก, ปัทมา และสัตตบงกช
E-AAC + M-CTG	375 200	ปัทมา บัวหลวงพระราชินี, บุณฑริก, ปัทมา และสัตตบุษย์
E-AAC + M-CTT	230	บุณฑริก, ปัทมา, สัตตบุษย์ และสัตตบงกช
E-AGC + M-CAA	210	บุณฑริก, ปัทมา, สัตตบุษย์ และสัตตบงกช
E-AGC + M-CAG	190 80	บัวหลวงพระราชินี, บุณฑริก และสัตตบุษย์ บุณฑริก
E-AGC + M-CAT	265	บัวหลวงพระราชินี
E-AGC + M-CTA	235 155	บัวหลวงพระราชินี บัวหลวงพระราชินี, บุณฑริก, สัตตบุษย์ และสัตตบงกช
E-AGC + M-CTC	230	บัวหลวงพระราชินี, บุณฑริก, ปัทมา และสัตตบุษย์
E-AGC + M-CTG	260	บัวหลวงพระราชินี
E-AGG + M-CAA	210	บัวหลวงพระราชินี
E-AGG + M-CAG	255	บัวหลวงพระราชินี, บุณฑริก, สัตตบุษย์ และสัตตบงกช
E-AGG + M-CAT	450 145	บุณฑริก บัวหลวงพระราชินี, บุณฑริก และสัตตบงกช
E-AGG + M-CTA	475 300	บุณฑริก, สัตตบุษย์ และสัตตบงกช สัตตบงกช

เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวง 5 พันธุ์ ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 แบบ UPGMA โดยคำนวณค่าดัชนีความเหมือนและแสดงผลในรูปของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่าบัวหลวงมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในกลุ่มค่อนข้างต่ำ มีค่าดัชนีความเหมือน 0.87-0.96 (ภาพที่ 2)

เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความเหมือนสามารถแบ่งบัวหลวงออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ บัวหลวงพระราชินี บุณฑริก และปัทมา มีค่าดัชนีความเหมือนภายในกลุ่ม 0.91-0.96 และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ บัวหลวงสัตตบุษย์และสัตตบงกช มีค่าดัชนีความเหมือนภายในกลุ่ม 0.94 (ภาพที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะจำนวนกลีบดอกของบัวหลวง โดยบัวหลวงพระราชินี บุณฑริก และปัทมามีจำนวนกลีบดอกซ้อนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับบัวหลวงสัตตบุษย์และสัตตบงกช นอกจากนี้ยังพบว่าสอดคล้องกับลักษณะทางสรีรวิทยาด้วย โดยถ้าปลูกบัวหลวงในภาชนะขนาดเล็กแล้ว บัวหลวงพระราชินีจะออกดอกยากกว่าบัวหลวงบุณฑริกและปัทมา [1]

	บัวหลวงพระราชินี	บุณฑริก	ปัทมา	สัตตบุษย์	สัตตบงกช
บัวหลวงพระราชินี	1.00				
บุณฑริก	0.94	1.00			
ปัทมา	0.91	0.96	1.00		
สัตตบุษย์	0.89	0.91	0.92	1.00	
สัตตบงกช	0.87	0.89	0.89	0.94	1.00

ภาพที่ 2 ค่าดัชนีความเหมือนของบัวหลวงซึ่งคำนวณจากแถบดีเอ็นเอบัวหลวงทั้งหมดที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอลพี

4. สรุป

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวหลวงพื้นเมืองของไทย 5 พันธุ์ ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีพบว่าสามารถแยกความแตกต่างของบัวหลวงแต่ละพันธุ์ได้ โดยพบแถบดีเอ็นเอจำเพาะกับบัวหลวงแต่ละพันธุ์รวม 23 แถบ ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้จำแนกพันธุ์บัวหลวงได้

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ที่ให้การสนับสนุนสารเคมี อุปกรณ์ เครื่องมือและห้องปฏิบัติการตลอดงานวิจัยนี้

6. เอกสารอ้างอิง

[1] ปริมลาภ ชูเกียรติมั่น และ เสริมลาภ วสุวัต, บัวประดับในประเทศไทย, บริษัท เนชั่นบุ๊คส์ อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด, กรุงเทพฯ, 2547.

[2] อุไรรัตน์ สิงหนาท, บัว...พืชมหัศจรรย์, ใน ชุมนุมแพทย์แผนไทยและสมุนไพรแห่งชาติ ครั้งที่ 5 : สุขภาพดีได้ด้วยแพทย์แผนไทย, สำนักการแพทย์แผนไทย กรมพัฒนาการแพทย์แผนไทยและการแพทย์ทางเลือก กระทรวงสาธารณสุข, นนทบุรี, 2546.

[3] สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2545.

[4] Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.V., Hornes, M., Frijiters, A., Pot, J., Pleleman, J., Kuiper, M. and Zebeau, M., AFLP : A New Technique for DNA Fingerprinting. Nucl. Acids Res. Vol. 23; pp. 4407-4414, 1995.

[5] Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P., Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* Leaves, Biotech. Biodiv. Lett. Vol. 2; pp. 19-24, 1992.

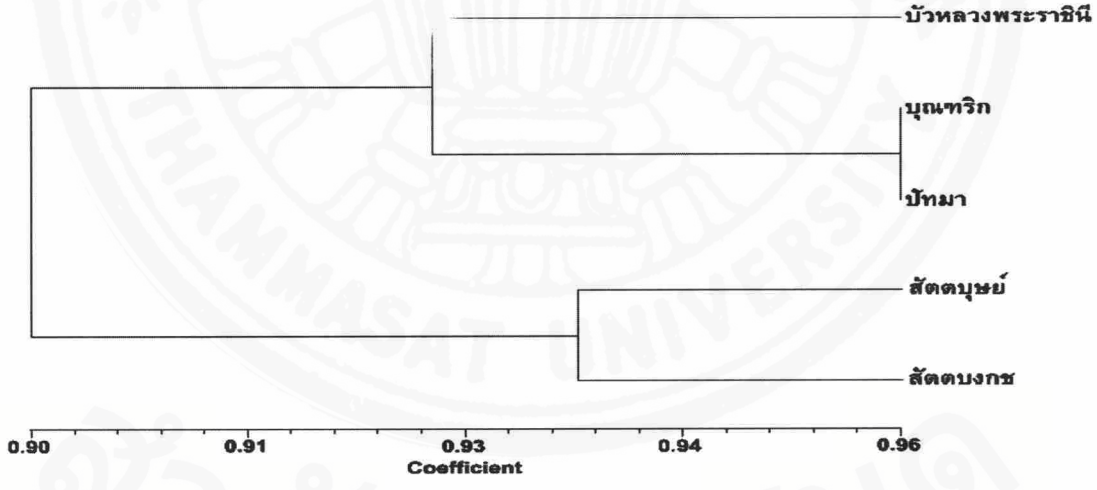
[6] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Melecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.

[7] Marques, C.M., Araújo, J.A., Ferreira, J.G., Whetten, R., O'Malley, D.M., Liu, B.H. and Sederroff, R., AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E. tereticornis*, Theor. Appl. Genet. Vol. 96; pp. 727-737, 1998.

[8] Loh, J.P., Kiew, R., Set, O., Gan, L.H. and Gan, Y.Y.,A Study of Genetic Variation and Relationships within the Bamboo Subtribe Bambusinae Using Amplified Fragment Length Polymorphism, Ann. Bot. Vol. 85; pp. 607-612, 2000.

[9] Wong, C., Kiew, R., Loh, J.P., Gan, L.H., Set, O., Lee, S.K., Lum, S. and Gan, Y.Y., Genetic Diversity of the Wild Banana *Musa acuminata* Colla in Malaysia as Evidenced by AFLP, Ann. Bot. Vol. 88; pp. 1017-1025, 2001.

[10] Kashkush, K., Jinggui, F., Tomer, E., Hillel, J. and Lavi, U., Culture Identification and Genetic Map of Mango (*Mangifera indica*), Euphytica Vol. 122; pp. 129-136, 2001.



ภาพที่ 3 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวหลวงที่ได้จากเทคนิคเอเอฟแอพี