

# การพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR เพื่อใช้ในการระบุชนิดบัวสายสกุล *Nymphaea* Development of RAPD-SCAR Markers for Waterlily in Genus *Nymphaea* Identification

มลิวรรณ นาคขุนทด\*, อิชยา แคนติ, ธิดา มาชัยงาม และนันทวิภา คำมา

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

Maliwan Nakkuntod\*, Itsaya Khaenti, Thida Machainam and Nantavipa Khamma

Department of Biology, Faculty of Science, Naresuan University, Tha Pho, Muang, Phitsanulok 65000

## บทคัดย่อ

การพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR สำหรับการระบุชนิดของบัวสายใน 3 สกุลย่อย ได้แก่ *Anecphya*, *Nymphaea* และ *Lotos* จำนวน 27 ตัวอย่าง จากการคัดเลือกอาร์เอพีดีไพรเมอร์ จำนวน 30 ชนิด พบอาร์เอพีดีไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมี 18 ไพรเมอร์ (60 %) และเมื่อพัฒนาเครื่องหมาย SCAR สำหรับบัวสายแต่ละสกุลย่อย พบว่าในสกุลย่อย *Anecphya* จำนวน 7 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกได้ 5 เครื่องหมาย โดยมี 2 เครื่องหมาย คือ NYM007 ที่มีความจำเพาะกับบัวสายชนิด *N. atrans* และ *N. immutabilis* และ NYM010 ที่มีความจำเพาะกับบัวสายชนิด *N. gigantea* var. *neorosea* ในสกุลย่อย *Nymphaea* จำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกได้ 2 เครื่องหมาย โดยมี 1 เครื่องหมาย ที่มีความจำเพาะต่อ *Nymphaea* ‘Sunrise’ และในสกุลย่อย *Lotos* จำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกได้ 3 เครื่องหมาย แต่ไม่มีเครื่องหมายใดที่จำเพาะต่อบัวสายในสกุลย่อยนี้เลย ดังนั้นสามารถพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR ทั้งหมด 3 เครื่องหมาย สำหรับใช้ระบุชนิดของบัวสายในสกุลย่อย *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 *Anecphyra* and *Nymphaea*.

**Keywords:** RAPD; DNA marker; waterlily; *Nymphaea*

## 1. บทนำ

พืชสกุลบัวสาย (*Nymphaea* L.) สามารถแพร่กระจายพันธุ์ไปได้ทั่วโลก ตั้งแต่เขตร้อนจนถึงเขตอบอุ่น ยกเว้นเขตอาร์คติก [1] เขตการกระจายพันธุ์และลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความหลากหลายสูงสามารถจัดจำแนกพืชสกุลบัวสายนี้ออกได้อีกเป็น 5 สกุลย่อย ซึ่งแต่ละสกุลย่อยก็มีลักษณะเฉพาะ เช่น ลักษณะขอบใบ รูปรางใบ และลักษณะของดอก [2,3] จากลักษณะสัณฐานวิทยาละเอียดของรูปร่างสามารถจำแนกบัวสายเขตอบอุ่นและเขตร้อนได้ชัดเจน จากลักษณะของผนังละอองเรณูและช่องเปิด [4] พืชสกุลบัวสายมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานเป็น  $n=x=14$  และพบลักษณะที่เป็นโพลีพลอยด์ที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดตั้งแต่ดิพลอยด์จนถึงเฮกซาเดคาพลอยด์ เนื่องจากจำนวนชุดของโครโมโซมที่แตกต่างกันนี้ทำให้เกิดบัวสายชนิดใหม่และลูกผสมใหม่ ๆ ขึ้นมากมายในปัจจุบัน

พืชในสกุลบัวสายประกอบด้วย 5 สกุลย่อย ได้แก่ สกุลย่อย *Anecphyra* หรือบัวออสเตรเลีย ที่มีการกระจายพันธุ์เฉพาะในประเทศออสเตรเลียเท่านั้น สกุลย่อย *Brachyceras* หรือบัวผัน บัวเผื่อน ที่มีการกระจายพันธุ์ทั่วโลก สกุลย่อย *Hydrocallis* ที่มีการกระจายพันธุ์ในทวีปอเมริกาใต้ สกุลย่อย *Nymphaea* หรือบัวฝรั่ง ที่มีการกระจายพันธุ์ในทวีปอเมริกาเหนือและสกุลย่อย *Lotos* หรือบัวกินสาย ที่มีการกระจายพันธุ์ในทวีปเอเชียเขตร้อน บัวสายในสกุลย่อยบัวออสเตรเลียนั้น ปัจจุบันนำเข้ามาปลูกแพร่หลายในประเทศไทย เพื่อความสวยงาม ประดับตกแต่งสถานที่

โดยมีลักษณะของรูปทรงดอกที่แตกต่างจากบัวสายชนิดอื่น และเกสรเพศผู้มีลักษณะยาว เรียว สีดอกมีทั้งสีชมพู ม่วง จนถึงน้ำเงิน ในบางชนิด เช่น *N. atrans* สามารถเปลี่ยนสีดอกได้ เมื่อดอกมีอายุแก่ก่อน ขณะที่บัวสายในสกุลย่อยบัวฝรั่ง ก็เป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่นิยมนำเข้ามาปลูกกันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะบัวลูกผสม เช่น *Nymphaea* 'Sunrise' ที่มีดอกสีเหลือง ขนาดใหญ่ นิยมปลูกในสระหรือทะเลสาบที่มีแสงแดดจัด [5] จึงเป็นที่ต้องการของตลาดในประเทศเขตร้อนอย่างประเทศไทย บัวฝรั่งนั้นมีลักษณะเด่นคือขอบใบเรียบ ยุกตัวในช่วงฤดูหนาวกลีบดอกหนา ทน ดอกสีขาว เหลือง และบัวสายในสกุลย่อยบัวกินสายนั้น คนไทยรู้จักและใช้ประโยชน์โดยนำมาประกอบอาหารกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งส่วนที่ใช้ก็คือสายบัวหรือก้านดอกนั่นเอง บัวกินสายเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี ที่มีส่วนของลำต้นใต้ดินที่เรียกว่า rhizome หรือ rootstock ยึดเกาะกับโคลนใต้น้ำ ดอกมีสีส้มสวยงาม ตั้งแต่สีขาว ขาวอมชมพู ชมพู จนถึงแดง และมีกลิ่นหอม จึงเป็นที่นิยมนำมาจัดแต่งสวน [6] และมีรายงานการพบบัวจงกลนี้ซึ่งเป็นบัวสายที่ยังหาข้อสรุปไม่ได้ว่าเป็นลูกผสมในธรรมชาติหรือเกิดจากการกลายพันธุ์ โดยบัวจงกลนี้มีลักษณะร่วมของทั้งบัวสายสกุลย่อย *Lotos* และสกุลย่อย *Brachyceras* แต่จากการตรวจสอบข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งบริเวณดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์และนิวเคลียส พบว่าบัวจงกลนี้นั้นมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับบัวสายสกุลย่อย *Brachyceras* มากกว่า *Lotos* [7-9] ดังนั้นจึงน่าจะเป็นบัวสายที่เกิดจากการกลาย

พันธุ์ในธรรมชาติมากกว่าจะเป็นลูกผสม ซึ่งจะเห็นว่าพืชสกุลบัวสายนั้นมีความหลากหลายสูง รวมทั้งมีลูกผสมจำนวนมาก นำไปสู่ความสับสนในการจัดจำแนกเพื่อระบุชนิดและพันธุ์ของบัวสายทั้งในระดับสกุลและสกุลย่อย เมื่ออาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ดังนั้นการนำข้อมูลทางดีเอ็นเอเข้ามาช่วยในการจัดจำแนกจึงเป็นอีกทางหนึ่ง เพื่อให้เกิดความถูกต้องชัดเจนมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด RAPD-SCAR ขึ้นมาช่วยในการจัดจำแนกและยืนยันชนิดพันธุ์พืชต่าง ๆ อีกด้วย

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีทีเรียกว่า RAPD-SCAR (random amplified polymorphic DNA - sequence characterized amplified region) สามารถนำไปพัฒนาเพื่อใช้ตรวจสอบและคัดเลือกสายพันธุ์พืชต่าง ๆ เช่น ภาริตา และเฉอมาลัย คัดเลือกพันธุ์โพล 2 กลุ่ม คือ โพลเหลืองหรือโพลปลูกเสกและไพรดำโดยใช้วิธีอาร์เอพีดี พบว่ามีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ 21 แถบ จาก 16 ไพรเมอร์ แล้วเลือกแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ 2 แถบ จาก 2 ไพรเมอร์ ของโพลแต่ละกลุ่ม นำมาออกแบบไพรเมอร์ SCAR ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบและแยกโพลทั้งสองกลุ่มออกจากกันอย่างชัดเจนด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ ดังกล่าว [10] นอกจากนั้น จันทรเพ็ญ ได้พัฒนาเครื่องหมาย SCAR เพื่อใช้ในการจำแนกลำไยลูกผสมระหว่างพันธุ์ดอ 27 กับสีชมพู โดยคัดเลือกจากอาร์เอพีดีไพรเมอร์ 50 ชนิด ซึ่งพบ 2 ไพรเมอร์ ที่เหมาะนำมาสร้างเครื่องหมาย SCAR และจากการตรวจสอบพบว่าเครื่องหมายนี้สามารถใช้ในการจำแนกลำไยพันธุ์สีชมพูและลูกผสมของพันธุ์สีชมพูได้ [11] และมีนักวิจัยจำนวนมากใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR ในการตรวจสอบชนิดพืชสมุนไพรต่าง ๆ อีกทั้งนำมาใช้เพื่อการระบุชนิดพืชได้ด้วย เช่น การจำแนกชนิดของ

*Commiphora wightii* และ *C. myrrha* ที่ใช้เป็นพืชสมุนไพรในประเทศอินเดีย เพื่อให้ใช้งานได้ถูกต้องและปลอดภัย โดยใช้เทคนิค RAPD-SCAR พบว่าสามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ 1 ชนิด ที่แยกพืชสองชนิดนี้ออกจากกัน [12]

การศึกษาพืชสกุลบัวสายในด้านเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการระบุชนิดนั้น มีการศึกษาโดยใช้เครื่องหมาย ISSR เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม การผสมพันธุ์ และการอนุรักษ์ประชากรบัวสายพันธุ์ *Nymphaea* x 'Panama Pacific' กับบัวสายพันธุ์อื่น ๆ ในทะเลสาบ Heviz จากการศึกษาพบว่าบัวสายที่มีขนาดประชากรเล็กจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ และพบลูกผสมจนถึงรุ่น F<sub>2</sub> ทั้งที่เป็นหมันและสืบพันธุ์ต่อไปได้ จากข้อมูลนี้ทำให้ทราบว่าบัวสายในทะเลสาบนี้สามารถจัดอยู่ใน 3 สกุลย่อย คือ *Brachyceras Lotos* และ *Nymphaea* [13] และยังมีการใช้ลำดับดีเอ็นเอในนิวเคลียสบริเวณ ITS และคลอโรพลาสต์บริเวณ *trnK-matK* เพื่อตรวจสอบลูกผสมข้ามสกุลย่อยระหว่าง *N. gigantea* 'Andre Leu' ในสกุลย่อย *Anecphyra* เป็นต้นแม่ และ *N. colorata* ดอกสีขาวในสกุลย่อย *Brachyceras* เป็นต้นพ่อ พบว่าลูกผสมที่ได้ลักษณะสัณฐานวิทยาบางลักษณะที่คล้ายคลึงทั้งพ่อหรือแม่ และมีบางลักษณะที่ปรากฏเฉพาะในลูกผสมด้วย และจากการตรวจสอบลำดับดีเอ็นเอสามารถระบุพ่อและแม่ได้ถูกต้อง [14] นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ค้นพบบัวสายชนิดใหม่ในประเทศไทย คือ *N. siamensis* จากการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยพบว่า *N. siamensis* นั้นมีลักษณะสัณฐานที่คล้ายคลึงกับ *Nymphaea* 'Nilubon' ไม่ว่าจะเป็นราก ลำต้น ใบ หรือแม้แต่การสร้างต้นใหม่ แต่ก็ยังมีความแตกต่างกันในส่วนของดอก ทั้งเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย และเมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจาก

เทคนิค RAPD พบว่ามี 34 แพลตตี้เอ็นเอ ที่คล้ายคลึงกันระหว่างบัวสาย 2 พันธุ์ นี้ ซึ่งแตกต่างจากบัวสายพันธุ์อื่นอย่างมาก ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า *N. siamensis* นั้นเป็นบัวสายชนิดใหม่ของประเทศไทย [15]

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD-SCAR เพื่อระบุชนิดของบัวสายใน 3 สกุลย่อย ได้แก่ สกุลย่อย *Aneuphya*, *Nymphaea* และ *Lotos* ที่พบปลูกเพื่อประดับและในธรรมชาติ เพื่อให้การระบุชื่อที่ถูกต้อง ชัดเจน รวมถึงการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอนุกรมวิธานและด้านอื่น ๆ เช่นการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บตัวอย่างบัวสาย 3 สกุลย่อย ได้แก่ สกุลย่อย *Aneuphya*, *Nymphaea* และ *Lotos* ที่พบในแหล่งธรรมชาติและที่นำมาปลูกเลี้ยง จำนวน 7, 10 และ 10 ตัวอย่าง (ตาราง 1) ตามลำดับโดยบัวสายในสกุลย่อย *Aneuphya* และ *Nymphaea* นั้นได้ตัวอย่างมาจากแหล่งเพาะปลูกในสวนหลวง ร.9 และสถาบัน

บัวราชชมงคลตะวันออกทั้งหมด เนื่องจากไม่มีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทย รวมไปถึง *N. lotus*1, *N. rubra* และ *N. spontanea* ด้วย ส่วนบัวสายที่เหลือเก็บตัวอย่างจากที่พบในแหล่งธรรมชาติ ได้แก่ หนอง บึง พุงนาในจังหวัดพิษณุโลก โดยเก็บตัวอย่างส่วนราก ลำต้น ใบ ดอก และผล (ถ้ามี) เพื่อใช้เป็น voucher specimen หรือเก็บเป็น living specimen ปลูกไว้ในเรือนเพาะชำ ณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก พร้อมทั้งแยกเก็บใบอ่อนใส่ silica gel เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป โดยตัวอย่างที่นำมาศึกษาจะบันทึกลักษณะต่าง ๆ ของราก ไรโซมหรือเหง้า ก้านใบ แผ่นใบ สีดอก ทรงดอกเวลาดอกบาน เป็นต้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดจำแนกเบื้องต้นด้วย

หลังจากนั้นนำใบอ่อนของบัวสายที่มีมาสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ โดยใช้วิธีการดัดแปลง CTAB method ถ้าเป็นตัวอย่างใบสด ซึ่งใบบัวจะหนาและมีปริมาณมากพอจะใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจาก Agrawal และคณะ [16] แต่ถ้าเป็นตัวอย่างใบแห้งที่

ตารางที่ 1 ตัวอย่างบัวสายที่ศึกษา 27 ตัวอย่าง

| บัวสายสกุลย่อย <i>Aneuphya</i>          | บัวสายสกุลย่อย <i>Nymphaea</i> | บัวสายสกุลย่อย <i>Lotos</i> |
|-----------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| <i>N. immutabilis</i>                   | <i>N. alba</i>                 | <i>N. lotus</i> 1           |
| <i>N. atrans</i>                        | <i>N. odorata</i>              | <i>N. lotus</i> 2           |
| <i>N. violacea</i> 1                    | <i>N. tuberosa</i>             | <i>N. pubescens</i> 1       |
| <i>N. violacea</i> 2                    | <i>N. maxicana</i> 1           | <i>N. pubescens</i> 2       |
| <i>N. violacea</i> x <i>N. atrans</i>   | <i>N. maxicana</i> 2           | <i>N. pubescens</i> 3       |
| <i>N. gigantea</i>                      | <i>N. tetragona</i>            | <i>N. pubescens</i> 4       |
| <i>N. gigantea</i> var. <i>neorosea</i> | <i>Nymphaea</i> 'Sunrise'      | <i>N. pubescens</i> 5       |
|                                         | <i>Nymphaea</i> sp. 1          | <i>N. pubescens</i> 6       |
|                                         | <i>Nymphaea</i> sp. 2          | <i>N. rubra</i>             |
|                                         | <i>Nymphaea</i> sp. 3          | <i>N. spontanea</i>         |

เก็บไว้ใน silica gel ซึ่งใบจะแห้งและมีปริมาณน้อยจะใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle [17] โดยสองวิธีการนี้เห็นผลความแตกต่างได้จริงจากการศึกษาของ วสันต์ [18]

แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณแบบสุ่มด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี จากไพรเมอร์ JAT01-30 ทั้งหมด 30 ชนิด จากการศึกษาคู่มือของ มลิวรรณ และปัทมา [19] แล้วคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้และให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน โดยสภาวะที่ใช้ คือ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นทำ 35 รอบ ของ 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

จากเทคนิคอาร์เอพีดี เลือกตัดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ของบัวสายแต่ละชนิด และแยกแถบดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience) แล้วนำมาสร้างดีเอ็นเอสายผสมโดยใช้ pTG19-T (Vivantis) และถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* JM109 จากนั้นคัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยสีของโคโลนีและการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ก่อนส่ง recombinant DNA ไปหาลำดับดีเอ็นเอที่บริษัท Macrogen (South Korea) ลำดับดีเอ็นเอที่ได้จะใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตัวอย่างนั้น ๆ โดยใช้เว็บไซต์

IDTdna จากนั้นนำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาทดสอบกับบัวสายทั้งหมดรวมถึงพืชสกุลอื่นด้วย

### 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการศึกษาแบบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของบัวสายในสกุลย่อย *Anecphyra* จำนวน 7 ตัวอย่าง ด้วย 30 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 12 ไพรเมอร์ และเมื่อนำมาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR พบว่าสามารถโคลน หาลำดับดีเอ็นเอ และสร้างเครื่องหมายชนิด SCAR ได้ 5 เครื่องหมาย จากนั้นนำมาทดสอบกับบัวสายชนิดต่าง ๆ พบว่ามีเพียง 2 เครื่องหมาย เท่านั้น (ตาราง 2) ที่แสดงถึงความจำเพาะเฉพาะชนิดของบัวสายนั้น ๆ โดยที่ ไพรเมอร์ NYM007 ที่พัฒนามาจากบัวสายชนิด *N. atrans* สามารถเพิ่มจำนวนได้ทั้ง *N. atrans* และ *N. immutabilis* ซึ่งอาจเนื่องมาจากบัวสายทั้ง 2 ชนิด นี้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมาก โดยเมื่อศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวสายในสกุลย่อยนี้พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ *Anecphyra* และ *Confluentes* โดยในกลุ่ม *Anecphyra* ยังสามารถแบ่งเป็นอีก 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มย่อย *N. gigantea* และกลุ่มย่อย *N. atrans* กับ *N. immutabilis* ซึ่งทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก แตกต่างกันเพียง *N. atrans* นั้นสีดอกจากเปลี่ยนเมื่อดอกแก่ ขณะที่ *N. immutabilis* ไม่เป็นเช่นนั้น [20] แต่ ไพรเมอร์ SCAR ชนิดนี้ไม่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน ดีเอ็นเอในตัวอย่างของ *N. violacea* x *N. atrans* ได้ อาจเนื่องมาจากบริเวณที่เพิ่มจำนวนอยู่ในส่วนของ extrachromosomal DNA ซึ่งในการผสมนี้ใช้ *N. violacea* เป็นต้นแม่ และ *N. atrans* เป็นต้นพ่อ ขณะที่ไพรเมอร์ NYM010 ที่จำเพาะต่อ *N. gigantea* var. *neorosea* เพราะฉะนั้นแสดงว่าบัวสายพันธุ์นี้มี

ความแตกต่างจาก *N. gigantea* อย่างชัดเจน ซึ่งอาจสามารถนำมาตั้งเป็นชนิดใหม่ได้ในอนาคต จึงควรมีการศึกษาข้อมูลให้มากกว่านี้ และไพรเมอร์ SCAR อีก 3 คู่ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณได้ในตัวอย่างอื่น ๆ อีกหลายชนิด แม้แต่บัวที่ไม่ได้อยู่ในสกุลบัวสาย

ผลการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของบัวสายในสกุลย่อย *Nymphaea* 10 ตัวอย่าง จากไพรเมอร์จำนวน 30 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 5 ไพรเมอร์ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band) จำนวน 11 แถบ และเมื่อนำมาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR พบว่าสามารถโคลนและหาลำดับดีเอ็นเอได้จำนวน 2 ชิ้น โดยเมื่อนำไปสร้างเครื่องหมายชนิด SCAR แล้วนำมาทดสอบ

กับบัวสายชนิดต่าง ๆ รวมถึงพืชชนิดอื่นด้วย พบว่ามีเพียง 1 เครื่องหมาย เท่านั้น (ตาราง 3) ที่แสดงถึงความจำเพาะเฉพาะชนิดของบัวสายนั้น ๆ โดยที่ ไพรเมอร์ NYM005 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 2 ตัวอย่าง คือ *Nymphaea* 'Sunrise' และ *Nymphaea* sp. 1 ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะภายนอกทั้งใบ ดอก เกสรเพศผู้ และเกสรเพศเมียของ 2 ตัวอย่าง มีความคล้ายคลึงกันมาก แต่เก็บจากคนละแหล่งปลูก จึงน่าจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน และ *Nymphaea* sp. 2 และ 3 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์คู่ใด ขณะที่อีก 1 ไพรเมอร์ ไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอเป็นรอยเสมียรในทุกตัวอย่าง

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ SCAR สำหรับบัวสายสกุลย่อย *Anecphyra*

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

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ SCAR สำหรับบัวสายสกุลย่อย *Nymphaea*

| Primer<br>SCAR | Samples                   | Sequences<br>(5'→3')                               | GC<br>(%) | Tm<br>(°C) | Expected<br>size (bp) |
|----------------|---------------------------|----------------------------------------------------|-----------|------------|-----------------------|
| NYM005         | <i>Nymphaea</i> 'Sunrise' | F: CGGGATGTGAGTGTGTTGACC<br>R: TCGGTTCTTTCTCTTTCCC | 55<br>45  | 56<br>53.1 | 200                   |

ผลการศึกษารูปแบบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีของบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* 10 ตัวอย่าง จากไพรเมอร์จำนวน 30 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จำนวน 8

ไพรเมอร์ และเมื่อนำมาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR พบว่าสามารถโคลนและหาลำดับดีเอ็นเอได้จำนวน 3 ชิ้น โดยเมื่อนำไปสร้างเครื่องหมายชนิด SCAR แล้วนำมาทดสอบกับบัวสายชนิดต่าง ๆ พบว่า

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะสำหรับตัวอย่างนั้น ๆ ได้ แต่พบว่าเครื่องหมาย SCAR 2 เครื่องหมาย คือ NYM001 และ NYM003 สามารถใช้เป็น universal primer สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบัวสายชนิดอื่น ๆ ได้ด้วย สำหรับไพรเมอร์ SCAR อีก 1 ไพรเมอร์ (NYM 002) นั้น สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในทุกตัวอย่างของบัวสายในสกุล *Nymphaea* จึงจัดให้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับบัวสายในสกุลนี้ได้ แต่ยังไม่สามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR สำหรับบัวสายสกุลย่อย *Lotos* ได้ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสกุลย่อยบัวกีนสายนี้มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันมาก นอกจากนี้แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากเทคนิคอาร์เอฟดีก็คล้ายคลึงกัน จึงหาแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะยากมาก ดังนั้นบัวสายในสกุลย่อยนี้จึงควรมีการศึกษาในรายละเอียด โดยใช้เทคนิคหรือเครื่องหมายดีเอ็นเออื่น เช่น ISSR เพื่อให้สามารถจำแนกชนิดที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

#### 4. สรุป

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SCAR จากแถบดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี เพื่อใช้ในการระบุชนิดของบัวสายใน 3 สกุลย่อย ได้แก่ บัวออสเตรเลีย (*Anecphyta*) บัวฝรั่ง (*Nymphaea*) และบัวกีนสาย (*Lotos*) นั้น สามารถพัฒนาได้ 3 เครื่องหมาย สำหรับสกุลย่อย *Anecphyta* และ *Nymphaeae* คือ เครื่องหมาย SCAR สำหรับ *N. atrans* และ *N. immutabilis* เครื่องหมายดีเอ็นเอ SCAR สำหรับ *N. gigantea* var. *neorosea* และ เครื่องหมาย SCAR สำหรับ *Nymphaea* ‘Sunrise’ สำหรับบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* ก็ควรมีการพัฒนาต่อไป อาจใช้เทคนิคอื่นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เช่น SRAP (sequence related amplified polymor-

phic) เพื่อให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมากขึ้น แล้วนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อไป

#### 5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน (แบบปกติ) ประจำปีงบประมาณ 2559 มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่โครงการ R2559 B055 และความอนุเคราะห์สถานที่ รวมถึงอุปกรณ์ในการทำวิจัยจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พร้อมกันนี้ ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ คุณหญิงสุชาติา ศรีเพ็ญ และคุณวิรญา บุญเตี้ย จากสวนหลวง ร.9 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณ นพชัย ชาญศิลป์ สถาบันบัวราชชมคลตะวันตก มหาวิทยาลัยราชชมคลตะวันตก ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างบัวสาย และให้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ขอขอบคุณ Prof. Khidir W. Hilu ณ Virginia Polytechnic Institute and State University ประเทศสหรัฐอเมริกา สำหรับตัวอย่างดีเอ็นเอบัวสาย

#### 6. 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 *trnT-trnL* region, Int. J. Pl. Sci. 168: 639-671.
- [3] Volkova, 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, การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของละอองเรณูในบัวสายเขตบ่อนและเขตร้อน, ว.วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม 12: 60-73.
- [5] Slocum, P.D., 2005, Waterlilies and Lotuses: Species, Cultivars, and New Hybrids, Portland, Oregon, 265 p.
- [6] Sharma, S., 1993. The 1837-1838 famine in U.P.: Some dimensions of popular action, Ind. Econ. Soc. Hist. Rev. 30: 337-372.
- [7] มลิวรรณ นาคขุนทด และวสันต์ เอื้อมณัฏฐ์, 2555, การจัดจำแนกพืชสกุลบัวสาย (Genus *Nymphaea* L.) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *trnT-L*, ว.วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร 6: 11-20.
- [8] มลิวรรณ นาคขุนทด และณัฐวุฒิ วงศ์อนันต์, 2556, ความหลากหลายของรูปแบบนิวคลีโอไทด์บริเวณ ribosomal DNA ในบัวกินสาย, น. 322, การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 5, มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา.
- [9] มลิวรรณ นาคขุนทด, 2557, ชีสเต็มมาติกระดับโมเลกุลของบัวสายสกุลย่อย *Lotos* โดยใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์และนิวเคลียส, น. 69, การประชุมวิชาการพฤกษศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 8, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- [10] ภริตา ต้นสายเพชร และเมธอมลย์ วงศ์ขาวจันทร์, 2555, การพัฒนาเครื่องหมาย RAPD-SCAR เพื่อใช้ในการคัดเลือกพันธุ์โพล, น. 406-412, การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50 : สาขาส่งเสริมการเกษตรและคหกรรมศาสตร์ สาขาพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- [11] จันทรเพ็ญ สระระ, ฉันทนา วิชรรัตน์, อีรนุช เจริญกิจ และแสงทองพงษ์เจริญกิต, 2556, การพัฒนาเครื่องหมาย SCAR เพื่อใช้ในการจำแนกลำไยลูกผสมระหว่างพันธุ์ดอ 27 และสีชมพู, น. 244-247, การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 18, โรงแรมแอมบาสเตอร์ สุขุมวิท, กรุงเทพฯ.
- [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. 2016: Article ID 1482796.
- [13] Pocza, 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 inter-subgeneric 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, การจัดจำแนกพืชสกุล บัวสาย (Genus *Nymphaea* L.) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยนเรศวร, นเรศวร, 90 น.
- [19] มลิวรรณ นาคขุนทด และปัทมา เสนทอง, 2552, การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของสับปะรดในประเทศไทยด้วยวิธีอาร์เอฟดี, 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.