

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกและการประเมินพันธุกรรม ของดาวเรืองอเมริกันสายพันธุ์พ่อแม่โดยเทคนิคอาร์เอพีดี

Floral Morphology and Genotypic Evaluation of American Marigold Parental Lines using RAPD Technique

กฤษฎา สุขวิวัฒน์ จุฑามาส คุ่มชัย วิณัน บัณฑิตย และ ณัฐา โพธาภรณ์*
Krisada Sukwiwat, Jutamas Kumchai, Weenun Bundithya and Nuttha Potapohn*

ภาควิชาพืชศาสตร์และปฐพีศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200
Department of Plant and Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: natorchid@gmail.com

(Received: 31 March 2021; Accepted: 22 September 2021)

Abstract: Marigold (*Tagetes erecta* L.) is an ornamental plant in Asteraceae (Compositae) family. Marigold flowers are popularly used as an ornamental plant, cut flowers for making lei, and spiritual flowers. It can be grown all over the regions. However, information on research and improvement of marigolds in Thailand is limited. Twelve parental lines were studied using the morphological description of Supa (1991). The result showed that these parental lines could be divided according to 2 flower morphological characters 1) flower color: yellow and golden yellow and 2) flower form: fully double flower, single flower, and apetalous). RAPD banding pattern was employed to evaluate the genetic relationships of these parental lines. Twenty primers were used, and only six primers could yield polymorphic bands. Similarity coefficients were calculated, and a dendrogram was constructed by UPGMA using NTSYS (version 2.2). The results showed that the similarity index of 3 primer, OPA-02, OPD-11, and OPD-19 was 0.41-1.00, which could differentiate sterile female parents from male parents. Dendrogram of 6 primer products, OPA-02, OPA-04, OPD-05, OPD-07, OPD-011, and OPD-19, showed similarity coefficient ranging from 0.42 to 0.82, which could distinguish these parental lines into three groups according to flower form; fully double flower, single flower, and apetalous as found in the morphological study.

Keywords: *Tagetes erecta* L., floral morphology, RAPD technique, male sterility, apetalous

บทคัดย่อ: ดาวเรืองมีชื่อสามัญว่า marigold ชื่อวิทยาศาสตร์ *Tagetes erecta* L. อยู่ในวงศ์ Asteraceae (Compositae) นิยมใช้เป็น ไม้ดอกไม้ประดับ ตัดดอกทำเป็นมาลัยงานทางศาสนา หรืองานมงคลต่าง ๆ สามารถปลูกได้ทั่วประเทศทุกภูมิภาคของประเทศ อย่างไรก็ตามข้อมูลงานวิจัยและการพัฒนาพันธุ์ดาวเรืองในประเทศไทยมีค่อนข้างจำกัด จึงได้นำสายพันธุ์พ่อแม่ดาวเรือง 12 สายพันธุ์ มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอก ตามเกณฑ์ตรวจสอบลักษณะทางพันธุพืชของ Supa (1991) โดยศึกษา 2 ลักษณะ คือ ลักษณะสีดอก ได้แก่ สีเหลือง และสีเหลืองทอง และลักษณะดอก ได้แก่ ดอกซ้อน ดอกชั้นเดียว และดอกที่ไม่มีกลีบ ศึกษาพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ใช้ไพรเมอร์จำนวน 20 ไพรเมอร์ พบว่า มี 6 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และให้แถบที่มีความแตกต่างกัน ทำการคำนวณดัชนีความเหมือนด้วยโปรแกรม NTSYS (เวอร์ชัน 2.2) โดยวิธีจัดกลุ่ม UPGMA พบว่า ข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์จำนวน 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA-02, OPD-11 และ OPD-19 เมื่อคำนวณดัชนีความเหมือน อยู่ที่ 0.41 ถึง 1.00 และสามารถแยกกลุ่มสายพันธุ์แม่เกษตรผู้เป็นหมันออกจากสายพันธุ์พ่อได้ และเมื่อนำข้อมูลการปรากฏแถบของ 6 ไพรเมอร์ OPA-02, OPA-04, OPD-05, OPD-07, OPD-011 และ OPD-19 มาวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่า ดาวเรืองสายพันธุ์พ่อแม่ทั้ง 12 สายพันธุ์ มีค่าดัชนีความเหมือนที่ 0.42 ถึง 0.82 และสามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ ดอกซ้อน ดอกชั้นเดียว และไม่มีกลีบ สอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มลักษณะทางสัณฐานวิทยา

คำสำคัญ: ดาวเรือง สัณฐานวิทยาของดอก เทคนิคอาร์เอพีดี ความเป็นหมันของเกษตรผู้ ดอกที่ไม่มีกลีบ

คำนำ

ดาวเรืองมีชื่อสามัญว่า marigold ชื่อวิทยาศาสตร์ *Tagetes erecta* L. อยู่ในวงศ์ Asteraceae (Compositae) เป็น ไม้ดอกไม้ประดับของประเทศสหรัฐอเมริกาและเม็กซิโก ต่อมาได้แพร่กระจายไปยังแหล่งปลูกทั่วโลก ชนิดของสกุลนี้มีประมาณ 56 ชนิด และมีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่นิยมปลูก (Zhang *et al.*, 2011) ดาวเรืองอเมริกันหรือดาวเรืองอาฟริกัน สามารถปลูกได้ทั่วประเทศทุกภูมิภาคของประเทศ ในอดีตต้องนำเข้าเมล็ดพันธุ์มาจากสหรัฐอเมริกา แต่ในปัจจุบัน ประเทศไทยสามารถผลิตเมล็ดพันธุ์และสามารถส่งออกไปยังหลายประเทศ เช่น อินเดีย เวียดนาม และอินโดนีเซีย เป็นต้น เมล็ดพันธุ์ดาวเรืองที่มีคุณภาพดีสามารถขายได้กิโลกรัมละ 150,000 - 300,000 บาท (East West Seed, 2017) ดาวเรืองที่ได้รับความนิยมในประเทศไทยสามารถใช้ได้ตั้งแต่เป็นไม้ตัดดอกเพื่อใช้ทำมาลัย ในพิธีกรรมทางศาสนา แสดงความยินดีทางการเมือง ตลอดจนต้นเป็นไม้ประดับสถานที่

การผลิตเมล็ดพันธุ์ดาวเรืองใช้พ่อแม่พันธุ์ที่เป็น พันธุ์แท้ (inbred line) ต้องมีการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพ่อและแม่พันธุ์ที่จะนำมาใช้ในการผสมพันธุ์ รวมถึงลักษณะทางพันธุกรรมด้วยการประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยา เป็นการประเมินลักษณะ โดยมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมมาเกี่ยวข้องด้วย ในขณะที่การจัดจำแนกโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเป็นการประเมินเฉพาะพันธุกรรมของพืช ไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ได้มีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้อย่างกว้างขวาง ในการแยกพันธุกรรมในพืชหลายชนิด โดยเทคนิคที่มีการนำมาใช้กันมากคือ อาร์เอพีดี (RAPD) (Shahzadi *et al.*, 2016) มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรม ทั้งดาวเรือง และดอกไม้หลากหลายชนิด เช่น Modi *et al.* (2013) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของดาวเรืองฝรั่งเศส 12 สายพันธุ์ โดยเทคนิคอาร์เอพีดี ใช้ไพรเมอร์ 22 ไพรเมอร์ พบว่าเปอร์เซ็นต์ของแถบ polymorphic มีค่าระหว่าง 50 - 100 % มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 75.8 % มีความแตกต่างทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ส่วนค่าความคล้ายคลึง

อยู่ระหว่าง 0.42 ถึง 0.93 และสามารถแยกดาวเรือง
ฝรั่งเศสออกได้เป็นสามกลุ่ม โดยกลุ่มแรกมีดอกขนาดใหญ่
และมีสีที่แตกต่างกัน ประกอบไปด้วย 9 พันธุ์
กลุ่มที่สองดอกมีสีเหลืองเพียงสีเดียวมี 1 สายพันธุ์
และกลุ่มที่สามดอกมีขนาดใหญ่ ดอกสีส้มเข้มและ
สีแดง ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ ต่อมาจามีรายงานของ
Naz *et al.* (2015) ได้ศึกษาความหลากหลายทาง
พันธุกรรมของเบญจมาศ 21 ชนิด มีลักษณะดอก 3
ลักษณะ คือ ดอกชั้นเดียว ดอกกึ่งชั้น และ ดอกชั้น
โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า การใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม
สามารถแยกดอกเบญจมาศ 21 สายพันธุ์ ออกเป็น
สามกลุ่มใหญ่ตามลักษณะดอกได้

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้นำเอาพ่อแม่พันธุ์
ดาวเรืองมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอก
และใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการศึกษาจีโนไทป์ ผลที่ได้
จากการศึกษาสามารถนำมาใช้เพื่อเป็นประโยชน์ต่อ
งานปรับปรุงพันธุ์ดาวเรืองเพื่อสร้างลูกผสมเดี่ยวที่มี
ความดีเด่นเหนือกว่าสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่
(heterosis) ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

สายพันธุ์ดาวเรือง

ดาวเรืองตัดดอกสายพันธุ์แม่ที่เกษตรกรผู้
เป็นหมัน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ FY1502 และ FY1502AP
และสายพันธุ์พ่อ 10 สายพันธุ์ ได้แก่ MY1501, MY1502,
MG1503, MG1504, MG1505, MG1506, MG1507,
MG1508, MG1509 และ MG1510

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอก

นำเมล็ดพันธุ์ของดาวเรือง 12 สายพันธุ์
มาเพาะในวัสดุปลูก เมื่อต้นกล้าดาวเรืองอายุได้ 28
วัน ทำการย้ายปลูกลงแปลง ที่บริษัท อะเมริซีด
(อินเตอร์เนชันแนล) จำกัด โดยเริ่มปลูกตั้งแต่เดือน
เมษายน พ.ศ. 2558 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2558
วางแผนการทดลองแบบแลตทิซ (Lattice Designs)
แต่ละประชากรมี 2 ซ้ำ แต่ละซ้ำมี 20 ต้น บันทึก
ลักษณะสัณฐานวิทยาของดอกแต่ละพันธุ์ ตาม

เกณฑ์ตรวจสอบลักษณะทางพันธุพีซี ดัดแปลงจาก
Supa (1991)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

นำใบอ่อนของดาวเรืองแต่ละสายพันธุ์มา
สกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี CTAB (Doyle and Doyle,
1987) และไพรเมอร์ที่ใช้จำนวน 20 ไพรเมอร์ คือ
OPA-02, OPA-03, OPA-04, OPA-05, OPA-06,
OPA-08, OPA-09, OPA-10, OPA-11, OPA-12,
OPA-15, OPA-16, OPD-01, OPD-05, OPD-07,
OPD-08, OPD-11, OPD-14, OPD-17 และ OPD-19

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค
พีซีอาร์ ประกอบด้วยดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 µl ไพรเมอร์
ปริมาตร 1 µl PCR master mix (SOLLIS BIODYNE)
ปริมาตร 4 µl และ dH₂O ปริมาตร 14 µl ปริมาตรรวม
20 µl ปฏิกริยามี 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนที่ 1 ปุ่มที่
อุณหภูมิ 94 °C นาน 4 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2
ปุ่มที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที ตามด้วยอุณหภูมิ
37 °C นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 °C นาน 2 นาที รวม
44 รอบ ขั้นตอนที่ 3 ปุ่มที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 10 นาที
โดยใช้วิธีของ Taywiya *et al.* (2008)

การวิเคราะห์สายพิมพีดีเอ็นเอ

บันทึกข้อมูลสายพิมพีดีเอ็นเอของดาวเรือง
สายพันธุ์พ่อแม่ทั้ง 12 สายพันธุ์ ที่ได้จากเทคนิค
อาร์เอพีดี คำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity
coefficient) และวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis)
โดยสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วย
วิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group
method with arithmetic average) ด้วย โปรแกรม
NTSYS-pc version 2.2

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา
ของดอกดาวเรืองสายพันธุ์พ่อแม่ทั้ง 12 สายพันธุ์
พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะได้ 2 ลักษณะ คือ

1. สีของดอก แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ สีเหลือง มีจำนวน 4 ตัวอย่าง คือ FY1502AP (สีของกลีบดอกย่อยชั้นใน), FY1502, MY1501 และ MY1502 และกลุ่มสีเหลืองทอง มีจำนวน 8 ตัวอย่าง คือ MG1503, MG1504, MG1505, MG1506, MG1507, MG1508, MG1509 และ MG1510

2. ลักษณะดอก แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ ดอกที่ไม่มีกลีบดอก (apetalous flower) ได้แก่ FY1502AP ดอกซ้อน (fully double flower) ได้แก่ FY1502 และดอกชั้นเดียว (single flower) สายพันธุ์พ่อ ได้แก่ MY1501, MY1502, MG1503, MG1504, MG1505, MG1506, MG1507, MG1508, MG1509 และ MG1510

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์พ่อแม่ทั้ง 12 สายพันธุ์นั้นคล้ายคลึงกัน โดยรูปทรงกลีบดอกชั้นนอกส่วนใหญ่มีลักษณะรูปไข่ปลายข้างหนึ่งแหลม (ovoid) ยกเว้น MY1502 และ MG1505 มีลักษณะรูปสามเหลี่ยม (conical) ปลายกลีบดอกมีลักษณะโค้งเว้ามีพู่ (collared with neck) โคนกลีบดอกเรียบ (entire) ยกเว้น MG1506 และ MG1509 โคนกลีบมีพู่ 2 ชั้น (2 collared with neck) และส่วนใหญ่มีดอกย่อยชั้นในขนาดใหญ่ (large tubulate) ยกเว้น FY1502AP และ FY1502 มีดอกย่อยชั้นในขนาดเล็ก (Table 1, Figure 1)

Table 1. Flower morphology of 12 marigold parental lines

Item	Accession No.	Ray floret: Shape	Ray floret: Shape of the apex	Ray floret: Shape of the base	Ray floret: Longitudinal axis	Disc floret: Shape	Flower type	Flower color
1	FY1502AP	absent	absent	absent	absent	tiny tubulate	AP	Y
2	FY1502 Fully	ovoid	concave	entire	undulate	tiny tubulate	FD	Y
3	MY 1501	ovoid	collared with neck	entire	undulate	tiny tubulate	SF	Y
4	MY 1502	conical	collared with neck	entire	undulate	large tubulate	SF	Y
5	MG 1503	ovoid	collared with neck	entire	undulate	large tubulate	SF	GY
6	MG 1504	ovoid	collared with neck	entire	undulate	tiny tubulate	SF	GY
7	MG 1505	conical	collared with neck	entire	undulate	large tubulate	SF	GY
8	MG 1506	ovoid	collared with neck	2 collared with neck	undulate	tiny tubulate	SF	GY
9	MG 1507	ovoid	collared with neck	entire	undulate	large tubulate	SF	GY
10	MG 1508	ovoid	collared with neck	entire	dentate	large tubulate	SF	GY
11	MG 1509	ovoid	collared with neck	2 collared with neck	undulate	large tubulate	SF	GY
12	MG 1510	ovoid	collared with neck	entire	undulate	large tubulate	SF	GY

AP = apetalous flower, FD = fully double flower, SF = single flower, Y = yellow, GY = golden - yellow

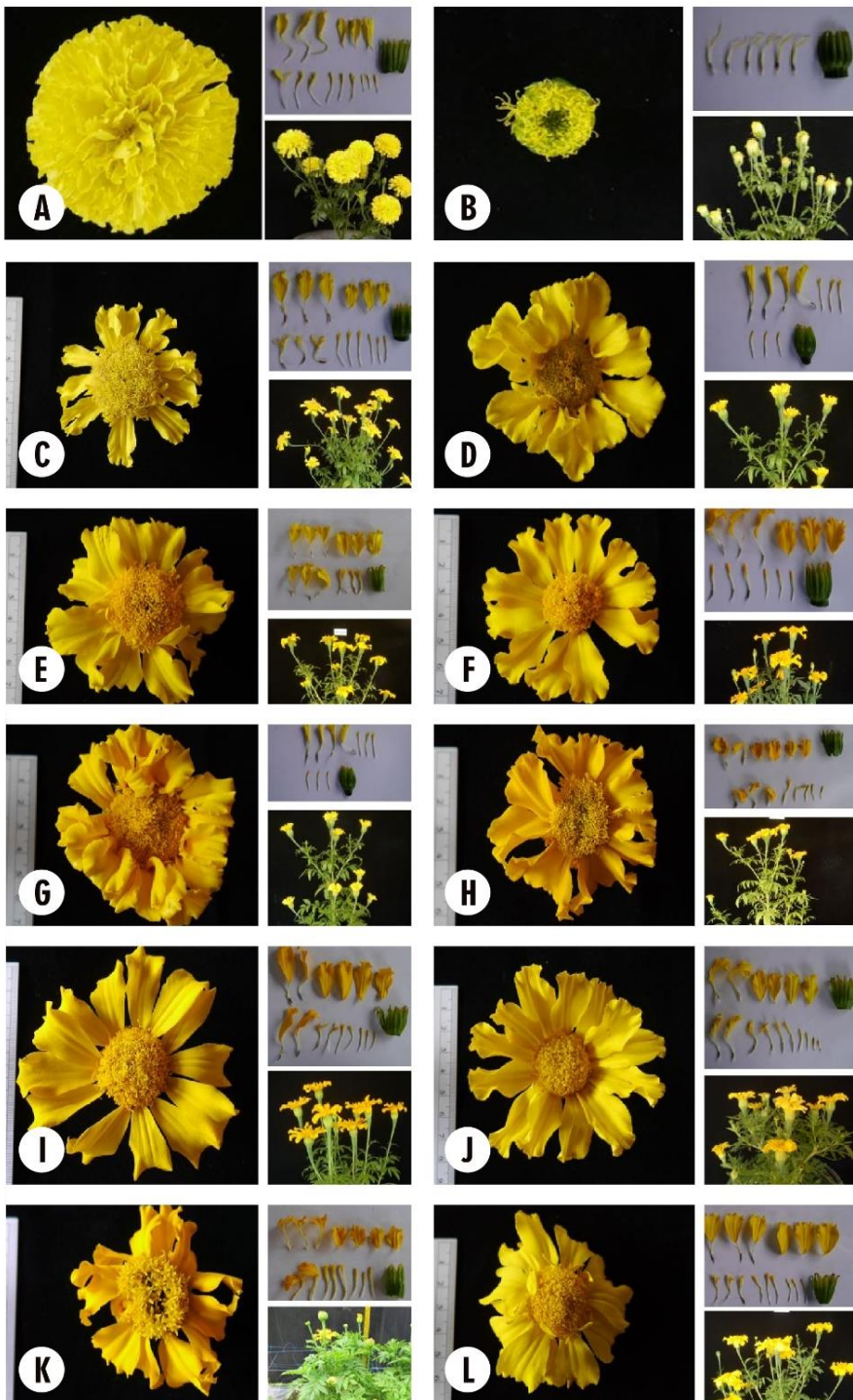


Figure 1. Flower, petals, and plant characters of 12 marigold parental line A) Female line FY1502, B) Female line FY1502AP, C) Male line MY1501, D) Male line MY1502, E) Male line MG1503, F) Male line MG1504, G) Male line MG1505, H) Male line MG1506, I) Male line MG1507, J) Male line MG1508, K) Male line MG1509, L) Male line MG1510

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในสายพันธุ์พ่อแม่ 12 สายพันธุ์ โดยใช้ 20 ไพร์เมอร์ พบว่ามี 6 ไพร์เมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ให้แถบรวม 61 แถบ เป็น polymorphic band 50 แถบ และ monomorphic band 11 แถบ ไพร์เมอร์ที่ให้จำนวนแถบมากที่สุด ได้แก่ OPD - 05 จำนวน 12 แถบ และไพร์เมอร์ที่ให้จำนวนแถบน้อยที่สุด ได้แก่ OPA - 02 จำนวน 8 แถบ โดยค่าเฉลี่ยของแถบต่อไพร์เมอร์เท่ากับ 10.16 แถบต่อไพร์เมอร์ ค่าเฉลี่ยของ polymorphic band เท่ากับ 8.33 แถบ เปอร์เซ็นต์ polymorphism อยู่ระหว่าง 63 - 100 % โดยที่ไพร์เมอร์ OPA - 02 มีเปอร์เซ็นต์ polymorphism สูงที่สุด คือ 100 % (Table 2)

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์พ่อแม่ดาวเรือง

เมื่อนำข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอจากการใช้ 3 ไพร์เมอร์ ได้แก่ OPA - 02, OPD - 11 และ OPD - 19 มาคำนวณดัชนีความเหมือน และเลือกการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่า ดาวเรือง 12 สายพันธุ์ สามารถ

จัดเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ สายพันธุ์แม่เกษตรเพศผู้เป็นหมัน 2 สายพันธุ์ คือ FY1502AP และ FY1502 มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ที่ 0.86 ทำให้เห็นถึงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันของสายพันธุ์แม่ทั้งสอง เนื่องจากสายพันธุ์แม่ FY1502AP พัฒนามาจากสายพันธุ์แม่ FY1502 โดยวิธีการผสมกลับ 5 ครั้ง ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย สายพันธุ์พ่อเกษตรเพศผู้ปกติ 10 สายพันธุ์ (Figure 2) โดยกลุ่มที่ 2 สามารถแบ่งออกได้เป็นอีก 2 กลุ่มย่อย เมื่อพิจารณา ค่าดัชนีความเหมือนที่ 0.66 ได้แก่ กลุ่มที่ 2.1 ประกอบด้วย สายพันธุ์พ่อ 7 สายพันธุ์ คือ MY1501, MG1504, MG1505, MG1507, MG1508, MG1509 และ MG1510 มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ที่ 0.68 ถึง 0.82 ส่วนกลุ่มย่อยกลุ่มที่ 2.2 ประกอบด้วย สายพันธุ์พ่อ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ MY1502, MG1503 และ MG1506 มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ที่ 0.72 ถึง 0.86 และเมื่อเปรียบเทียบค่าดัชนีความเหมือนระหว่างกลุ่มย่อยทั้งสองกลุ่ม พบว่า กลุ่มย่อยกลุ่มที่ 2.1 มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากกว่ากลุ่มย่อยกลุ่มที่ 2.2 (Table 3) ซึ่งความหลากหลายของสายพันธุ์มีความสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ดาวเรือง เนื่องจากลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์

Table 2. Nucleotide sequence of primer and number of total bands, number of polymorphic bands, and number of monomorphic bands of 12 marigold parental lines

Primer	Primer sequence	Total bands	Polymorphic bands	Monomorphic bands	Polymorphism (%)
	5' → 3'				
OPA - 02	5'-TGCCGAGCTG-3'	8	8	0	100 %
OPA - 04	5'-AATCGGGCTG-3'	10	7	3	70 %
OPD - 05	5'-TGAGCGGACA-3'	12	11	1	91 %
OPD - 07	5'-TTGGCACGGG-3'	10	8	2	80 %
OPD - 11	5'-AGCGCCATTG-3'	11	7	4	63 %
OPD - 19	5'-CTGGGGACTT-3'	10	9	1	90 %
Total		61	50	11	-
Average		10.16	8.33	1.83	82.3 %

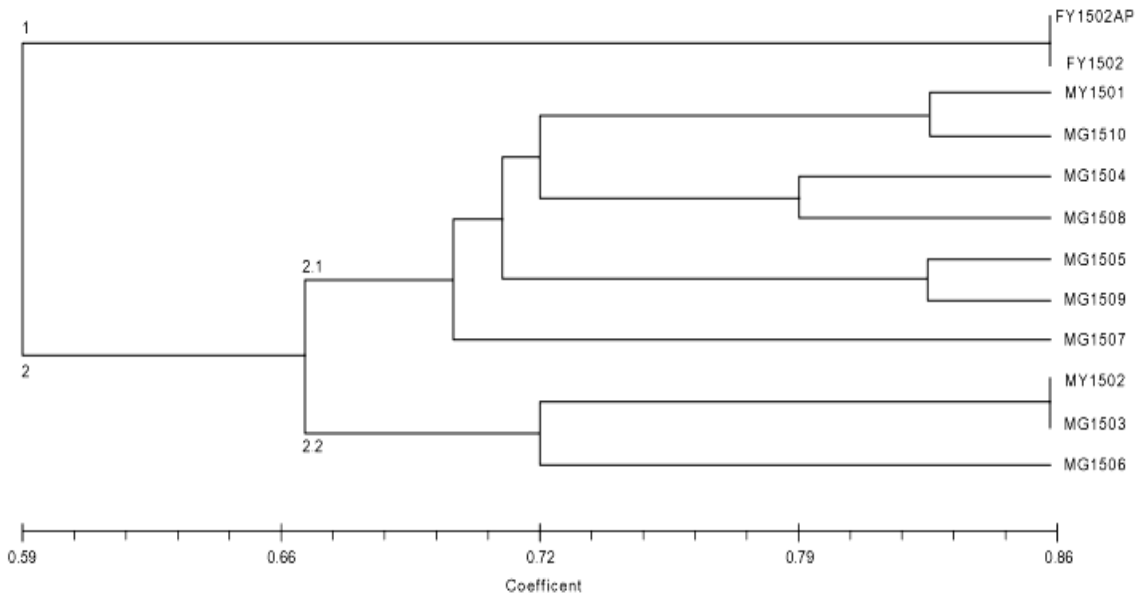


Figure 2. Dendrogram of 2 female and 10 male marigold parental lines from 3 primers OPA - 02, OPD - 11 and OPD - 19 by UPGMA

Table 3. Similarity coefficients of 12 marigold parental lines generated by RAPD - PCR using 3 primers, OPA - 02 OPD - 11, and OPD - 19

Inbred line	FY1502	FY1502AP	MY1501	MY1502	MG1503	MG1504	MG1505	MG1506	MG1507	MG1508	MG1509	MG1510
FY1502	1.00											
FY1502AP	0.86	1.00										
MY1501	0.79	0.72	1.00									
MY1502	0.51	0.52	0.65	1.00								
MG1503	0.45	0.45	0.58	0.86	1.00							
MG1504	0.68	0.69	0.75	0.62	0.69	1.00						
MG1505	0.65	0.65	0.72	0.72	0.65	0.75	1.00					
MG1506	0.41	0.41	0.55	0.69	0.75	0.58	0.62	1.00				
MG1507	0.62	0.55	0.76	0.62	0.55	0.65	0.69	0.65	1.00			
MG1508	0.62	0.55	0.76	0.68	0.68	0.79	0.69	0.79	0.72	1.00		
MG1509	0.62	0.55	0.69	0.75	0.68	0.72	0.82	0.65	0.72	0.72	1.00	
MG1510	0.69	0.55	0.82	0.75	0.68	0.65	0.75	0.65	0.65	0.72	0.65	1.00

ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมจะมีความดีเด่นของลูกผสมสูงกว่าคู่ผสมที่มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรม (Pornsuriya *et al.* 2015) ดังเช่น Modi *et al.* (2013) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของดาวเรืองฝรั่งเศสโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า เปอร์เซ็นต์ polymorphism อยู่ระหว่าง 50 % ถึง 100 % และมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ที่ 0.42 ถึง 0.93 แสดงให้เห็นว่ามีความหลากหลายในสายพันธุ์ดาวเรืองฝรั่งเศสและเทคนิคอาร์เอพีดีมีศักยภาพในการจำแนกพันธุกรรมของดาวเรือง สามารถใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างลูกผสมพันธุ์ที่ดีเด่นกว่าพ่อแม่ได้ นอกจากนี้ Phophan and Pooprompan (2020) ศึกษาการใช้ไพรเมอร์อาร์เอพีดี 520 ไพรเมอร์ในการคัดกรองลักษณะดอกดาวเรือง ดอกสมบูรณ์เพศและดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน พบว่า ไพรเมอร์อาร์เอพีดี OPA - 01 สามารถแยกลักษณะดอกสมบูรณ์เพศออกจากดอกเกสรเพศผู้เป็นหมันได้ และยังแสดงแถบดีเอ็นเอจำเพาะขนาด 700 bps ที่เชื่อมโยงกับลักษณะดอกเกสรเพศผู้เป็นหมัน ซึ่งผลการศึกษาดังกล่าวเป็นประโยชน์สำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์ดาวเรือง

เมื่อนำข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอจากใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 ไพรเมอร์ (Table 4) มาวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่า ดาวเรืองสายพันธุ์พ่อแม่ทั้ง 12 สายพันธุ์ สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยที่กลุ่มที่ 1 แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความเหมือนที่ 0.42 แต่ละกลุ่มมีลักษณะพื้นฐาน-วิทยาของดอกแตกต่างกันอย่างชัดเจน คือ กลุ่มที่ 1 ดอกที่ไม่มีกลีบดอก และดอกชั้นเดียว โดยกลุ่มที่ 1 สามารถแบ่งออกได้เป็นอีก 2 กลุ่มย่อย เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความเหมือนที่ 0.52 โดยสมาชิกกลุ่มที่ 1.1 ประกอบด้วย FY1502AP ซึ่งไม่มีกลีบดอก (apetalous flower) ส่วนกลุ่มที่ 1.2 ประกอบด้วยกลุ่มพ่อดอกชั้นเดียว (single flower) ทั้ง 10 สายพันธุ์ และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย FY1502 ซึ่งเป็นดอกซ้อน (fully double flower) โดยสอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มของการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมตามลักษณะของกลีบดอก (Figure 3) Nantaphoom *et al.*

(2020) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของดาวเรืองโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลแบบเอสเอสอาร์ 31 ไพรเมอร์ พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.64 ถึง 1.00 การวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่า ดาวเรืองสายพันธุ์แท้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะดอก คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ดาวเรืองที่มีดอกชั้นเดียว ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบไปด้วยสายพันธุ์ดาวเรืองที่เป็นดอกซ้อน ซึ่งลักษณะดอกสามารถคัดเลือกเป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อผลิตเป็นลูกผสมเดี่ยว (F1 hybrid) และคาดว่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมที่แตกต่างกันจะสร้างลูกผสมเดี่ยวที่มีความดีเด่นเหนือกว่าพ่อแม่และแม่ต่อไป (Nantaphoom *et al.*, 2020) โดยทั่วไปแล้วลักษณะดอกซ้อนมักมีมูลค่าทางการตลาดมากกว่าดอกชั้นเดียว และเป็นลักษณะเฉพาะที่เกิดจากการกลายพันธุ์ทางธรรมชาติ โดยกลายพันธุ์มาจากดอกชั้นเดียว ซึ่งการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะดอกแบบต่าง ๆ อาจควบคุมด้วยยีน 1 คู่หรือมากกว่า ดังนั้น การคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ที่เหมาะสมในการผลิตเมล็ดพันธุ์จึงเป็นสิ่งจำเป็น (Gaurav and Agnihotri, 2017) จากการศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของกลีบดอกดาวเรืองของ Chomvisarutkul and Kuanprasert (2005) พบว่า กลีบดอกย่อยวงนอกควบคุมด้วยยีนเดี่ยว 1 คู่ และเป็นลักษณะการข้ามสมบูรณ์ ส่วนลักษณะดอกย่อยกลางควบคุมด้วยยีน 1 คู่ และเป็นลักษณะการทำงานแบบบวกสะสม

ผลที่ได้จากการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยใช้ 3 ไพรเมอร์ และ 6 ไพรเมอร์ สามารถแยกความแตกต่างในกลุ่มสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่ออกจากกันได้อย่างชัดเจน สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงพันธุ์ โดยนักปรับปรุงพันธุ์สามารถที่จะคัดเลือกพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันหรือห่างกันด้วยการดูจากภาพ dendrogram แล้วนำข้อมูลพีโนไทป์มาประกอบการตัดสินใจก่อนการสร้างลูกผสม เพื่อให้เกิดความดีเด่นเหนือสายพันธุ์พ่อแม่ (Tanya, 2019)

Table 4. Similarity coefficients of 12 marigold parental lines generated by RAPD - PCR using 6 primers, OPA - 02, OPA - 04, OPD - 05, OPD - 07, OPD - 11, and OPD - 19

Inbred line	FY1502	FY1502AP	MY1501	MY1502	MG1503	MG1504	MG1505	MG1506	MG1507	MG1508	MG1509	MG1510
FY1502	1.00											
FY1502AP	0.51	1.00										
MY1501	0.64	0.50	1.00									
MY1502	0.45	0.40	0.68	1.00								
MG1503	0.48	0.38	0.60	0.82	1.00							
MG1504	0.56	0.48	0.70	0.67	0.71	1.00						
MG1505	0.55	0.47	0.65	0.70	0.70	0.76	1.00					
MG1506	0.47	0.37	0.55	0.60	0.71	0.56	0.58	1.00				
MG1507	0.56	0.38	0.59	0.56	0.57	0.62	0.61	0.59	1.00			
MG1508	0.58	0.47	0.68	0.65	0.70	0.75	0.70	0.71	0.64	1.00		
MG1509	0.46	0.35	0.56	0.66	0.63	0.73	0.72	0.54	0.61	0.67	1.00	
MG1510	0.62	0.36	0.60	0.61	0.62	0.57	0.63	0.54	0.64	0.62	0.55	1.00

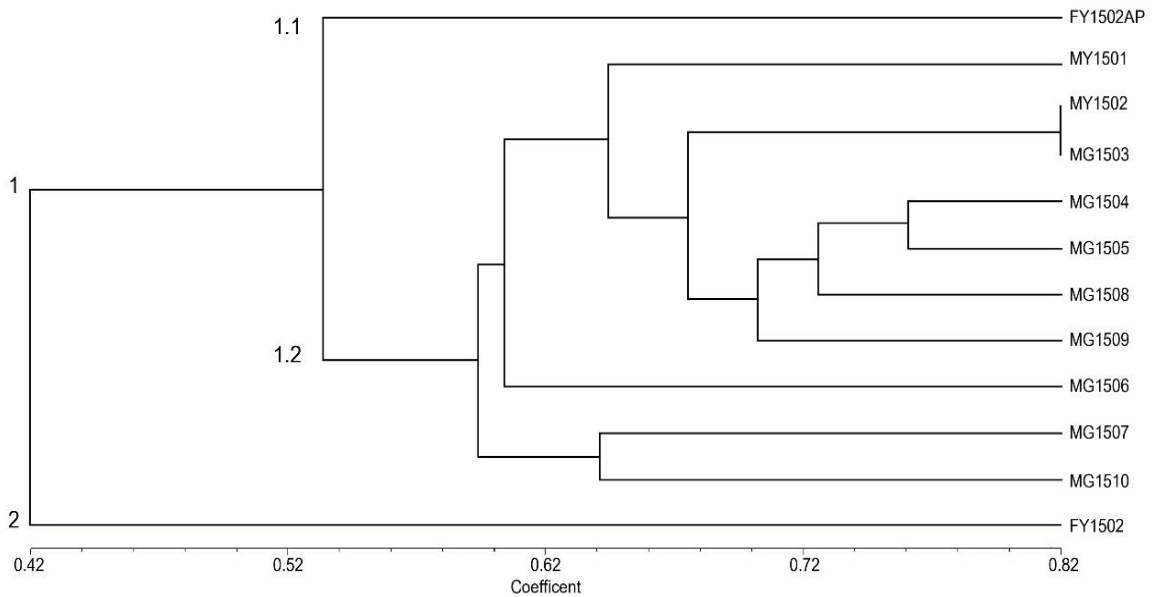


Figure 3. Dendrogram of 2 female and 10 male marigold parental lines from six primer, OPA - 02, OPA - 04, OPD - 05, OPD - 07, OPD - 11 and OPD - 19, by UPGMA

สรุป

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกสามารถจัดกลุ่ม ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) สีดอก คือ สีเหลือง และสีเหลืองทอง และ 2) ลักษณะดอก คือ ดอกที่ไม่มีกลีบ ดอกซ้อน และดอกชั้นเดียว จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในสายพันธุ์พ่อแม่ 12 สายพันธุ์ โดยใช้ 20 ไพรมเมอร์ พบว่า มี 6 ไพรมเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ เมื่อใช้ข้อมูลการปรากฏแถบดีเอ็นเอ โดยเลือกจาก 3 ไพรมเมอร์ มาคำนวณดัชนีความเหมือน อยู่ที่ 0.41 ถึง 1.00 โดยสามารถแยกกลุ่มสายพันธุ์แม่ เกสรเพศผู้เป็นหมัน ออกจากสายพันธุ์พ่อ เกสรเพศผู้ปกติได้ และเมื่อนำทั้ง 6 ไพรมเมอร์ มาวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ ด้วยวิธีการจัดกลุ่ม สามารถแยกกลุ่มสายพันธุ์พ่อแม่ได้ตามลักษณะของดอกที่ไม่มีกลีบดอกและเกสรเพศผู้เป็นหมัน ดอกที่มีกลีบดอกชั้นเดียวและมีเกสรเพศผู้ปกติ และดอกที่มีดอกซ้อนหลายชั้นและเกสรเพศผู้เป็นหมันได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม โครงการร่วมให้ทุนปริญญาเอกกาญจนาภิเษก 50 ปี - มช และ บริษัทอะเมริซิด อินเตอร์เนชั่นแนลจำกัด

เอกสารอ้างอิง

Chomvisarutkul, S. and N. Kuanprasert. 2005. Inheritance of marigold flower characteristics. *Journal of Agriculture* 21(2): 149-155. (in Thai)

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of

fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19(1): 11-15.

East West Seed. 2017. Accelerating imports of marigold seeds in Thailand (Online). Available: <http://www.eastwestseed.com/news/accelerating-import-of-marigold-seed-in-Thailand/> (July 3, 2017).

Gaurav, A.K. and R. Agnihotri. 2017. Strategies for the development of unique flower forms in ornamental crops: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6(6): 2474-2478.

Modi, P., D. Jain, S. Kachhwaha and S.L. Kothari. 2013. Analysis of genetic among *Tagetes patula* L. cultivars based on RAPD markers. *Indian Journal of Horticulture* 70(4): 549-554.

Nantaphoom, S., S. Peerapaskorn and P. Pooprompan. 2020. Phenotyping and genotyping analysis of inbred lines In American marigold (*Tagetes erecta* L.). *Rajabhat Agriculture Journal* 19(2): 31-37. (in Thai)

Naz, S., I. Shehzadi, K. Shahzadi and S. Ilyas. 2015. Assessment of genetic variability in different chrysanthemum varieties of Pakistan using RAPD markers. *The Journal of Animal and Plant Sciences* 25(2): 554-560.

Phophan, P. and P. Pooprompan. 2020. Inheritance and investigation of DNA marker associated with gene controlling male sterile in American marigold (*Tagetes erecta* L.). pp. 80-86. *In: Proceedings of the 2nd National Conference on Science, Technology and Innovation*. Loei Rajabhat University, Loei. (in Thai)

Pornsuriya, P., S. Boonsrinukul and P. Pornsuriya. 2015. Genetic divergence and correlations

- with heterosis of inter-varietal hybrids in waxy corn. Research Journal 8(1): 17-22. (in Thai)
- Shahzadi, I., R. Ahmad, U. Waheed and M.M. Shah. 2016. Genetic diversity analysis of *Tagetes* species using PCR based molecular markers. Pakistan Journal of Botany 48(4): 1593-1599.
- Supa, P.1991. Evaluation Characteristics and Population of Marigolds in Northern Thailand. M.S. Thesis. Chiang Mai University, Chiang Mai. 134 p. (in Thai)
- Tanya, R. 2019. Population Genetics for Breeding. Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom. 186 p. (in Thai)
- Taywiya, P., W. Bundithya and N. Potapohn. 2008. Analysis of the genetic relationship of genus *Phalaenopsis* by RAPD technique. Acta Horticulturae 788: 39-46.
- Zhang, P., L. Zeng, Y.X. Su, X.W. Gong and X.S. Wang. 2011. Karyotype studies on *Tagetes erecta* L. and *Tagetes patula* L. African Journal of Biotechnology 10(72): 16138-16144.
-