

การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนก บัวสายและลูกผสมด้วยแฮตอาร์เอฟดี

Genetic Relationship Assessment and Identification of *Nymphaea* sp. and their Hybrids Using HAT-RAPD

สุรฤทธิ สุขสกุล และธีระชัย ธานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธานันต์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Surakrit Suksakul and Theerachai Thanananta

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Narumol Thanananta*

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,
Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

บทคัดย่อ

บัวสายได้รับการขนานนามว่าเป็นราชินีแห่งไม้น้ำ ปัจจุบันนิยมนำมาปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับและมีการปรับปรุงพันธุ์อย่างแพร่หลาย ทำให้การจำแนกพันธุ์ด้วยลักษณะสัณฐานมีความยุ่งยากและสับสนง่าย งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของบัวสาย 25 พันธุ์/สายพันธุ์ จากปางอุบล สวนบัว จังหวัดนนทบุรี ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด แล้วคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน ซึ่งคัดเลือกไพรเมอร์ได้ 17 ชนิด เมื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวสายทั้งหมดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอปรากฏแถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 226 แถบ ขนาดประมาณ 200-3,000 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย 223 แถบ (98.67 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์และเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.47-0.88 และสามารถแบ่งบัวสายเป็น 3 กลุ่ม โดยผลงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์บัวสายต่อไป

คำสำคัญ : บัวสาย; แฮตอาร์เอฟดี; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การจำแนก

Abstract

Nymphaea, known as the queen of aquatic plants, has been currently cultivated as an ornamental flower with a widespread breeding. Therefore, its morphological classification seems to be difficult and confusing. This research investigated the relationships among 25 *Nymphaea* sp. and their hybrids from Pangubol Suan Bua in Nonthaburi province using high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD) technique. In a total of 72 primers used, 17 primers which gave obvious amplified PCR products, were selected. Then, the selected primers were used for polymerase chain reaction (PCR) and resulted in 226 DNA bands ranging from 200 to 3,000 bp. The number of polymorphic bands was 223 (98.67 %). The dendrogram was constructed using UPGMA by the NTSYS-pc ver. 2.01e program based on similarity coefficient, which ranging from 0.47 to 0.88, and resulted in three major groups. This research could be useful in the conservation and the breeding program.

Keywords: *Nymphaea*; high annealing temperature-random amplified polymorphic DNA (HAT-RAPD); genetic relationship; identification

1. คำนำ

บัวสายเป็นพืชน้ำชนิดหนึ่ง มีลำต้นใต้ดินเป็นหัวหรือเหง้า ลักษณะคล้ายหัวเผือก ใบเดี่ยวแตกจากเหง้า ก้านใบยาวและอ่อน ส่องใบขึ้นมาลอยบนผิวน้ำ แผ่นใบค่อนข้างกลม ผิวใบด้านบนเรียบเป็นมัน ด้านล่างมีขนละเอียด ดอกเป็นดอกเดี่ยว ก้านดอกเหมือนก้านใบ ภายในมีเยื่อใสและห่ออากาศมาก ก้านดอกเรียกลายบัว ซึ่งบางชนิดรับประทานได้ (ชยันต์, 2548) พืชวงศ์บัวสายพบได้ทั้งในเขตร้อนและเขตหนาว มีอายุหลายปี ประกอบไปด้วย 6 สกุล คือ สกุล *Nymphaea* หรือสกุลบัวสาย ซึ่งมีสมาชิกมากที่สุดในวงศ์นี้ สกุล *Barclaya* หรือไส้ปลาไหล สกุล *Nuphar* หรือบัวญี่ปุ่น สกุล *Ondinea* สกุล *Euryale* หรือบัวถาด และสกุล *Victoria* หรือบัวกระดัง (ณัฐกานต์, 2557)

การจัดจำแนกพืชในสกุลบัวสายด้วยลักษณะสัณฐานในปัจจุบันยังเป็นที่สับสน และไม่ชัดเจนในบางสกุล เนื่องจากลักษณะสัณฐานนั้นอาจมีการเปลี่ยนแปลงได้จากสภาพแวดล้อม ทำให้สิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกันมีการพัฒนาลักษณะ

บางประการขึ้นมามากคล้ายหรือเหมือนกัน จึงน่าจะเกิดความผิดพลาดได้ง่าย รวมทั้งในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงพันธุ์บัวสายกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งส่งผลต่อความหลากหลายทางชนิด/พันธุ์เป็นอย่างมาก ด้วยเหตุผลดังกล่าว การจัดจำแนกบัวสายแต่ละกลุ่มให้ออกจากกันได้อย่างชัดเจนและถูกต้อง จึงมีความจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลจากดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกกันมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นข้อมูลที่ละเอียดเพียงพอและสามารถสืบหาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ด้วย (ณัฐกานต์, 2557)

ด้วยความสำคัญดังกล่าว จึงมีแนวคิดที่จะรวบรวมพันธุ์บัวสายในประเทศไทย เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) โดยเลือกศึกษาบัวสายในสกุล *Nymphaea* ซึ่งเป็นบัวสายที่มีความสวยงามและนิยมปลูกเพื่อประดับกันอย่างแพร่หลาย โดยใช้แฮตอาร์เอพีดี (HAT-RAPD, high annealing temperature - random amplified polymorphic DNA) สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

(PCR, polymerase chain reaction) ทำได้อย่างสะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับดีเอ็นเอมาก่อน และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าเทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น ๆ (จุฑาทิพย์ และคณะ, 2559)

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัวสาย 25 พันธุ์/สายพันธุ์ ด้วยแอตอาร์เอฟพีดี ซึ่งข้อมูลที่ได้จากผลการวิจัยครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเก็บรักษาพันธุ์ การอนุรักษ์พันธุกรรม และการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 บัวสาย

เก็บตัวอย่างใบบัวสายจาก ปางอุบลสวนบัว จังหวัดนนทบุรี (<http://thaiwaterlily.com/index.php>) จำนวน 25 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยเก็บเป็น 5 กลุ่มครอบครัว แสดงดังตารางที่ 1

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากใบบัวสายประมาณ 3 กรัม ด้วยวิธี CTAB ประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) ตามวิธีของ ปิยดา และคณะ (2558) แล้วนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และทำเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้เกิดการเรืองแสงด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคแอตอาร์เอฟพีดี

ขั้นตอนแรก คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอบัวสายรวม 25

พันธุ์ มาเจือจางให้ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ผสมลงในหลอดเดียวกัน แล้วนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอร์เลส โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) 6 ชุด รวม 72 ชนิด (Wako Company, Japan) โดยปฏิกิริยาในหลอดสำหรับทำปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอร์เลสมีปริมาตรสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร (จุฑาทิพย์ และคณะ, 2559) ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ได้แก่ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที บ่มที่ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และบ่มที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (นฤมล และคณะ, 2555)

ขั้นตอนที่สอง นำไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอร์เลสกับดีเอ็นเอบัวสายทั้ง 25 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยดำเนินการภายใต้สภาวะของปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน ดังกล่าวข้างต้น

โดยตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พหุริเมอร์เลสด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและถ่ายภาพ

2.4 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวสายระหว่างแต่ละพันธุ์/สายพันธุ์จากภาพถ่าย โดยเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp Plus DNA Ladder, Vivantis Technology Sdn. Bhd., Malaysia)

2.5 การวิเคราะห์ผล

คำนวณหาความสัมพันธ์ด้วยการเปรียบเทียบ

ตารางที่ 1 ตัวอย่างบัวสาย 25 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษา

No.	Group	Cultivar/Line	Subgenus	Parental
1	1	N. 'Supranee Pink'	Nymphaea	Mother
2		N. 'Nangkwang Fah'	Brachyceras	Father
3		N. 'Queen sirikit'	Inter Subgeneric ISG	N. 'Supranee Pink' x N. 'Nangkwang Fah'
4		N. 'Bua Rapee'	Nymphaea	N. 'Supranee Pink' x _
5		N. 'Sranlarp'	Nymphaea	N. 'Supranee Pink' x _
6	2	N. 'LuangPoonsub'	Brachyceras	Mother
7		N. 'Ninvaree'	Brachyceras	Father
8		N. 'Viboonlarb'	Brachyceras	N. 'LuangPoonsub' x N. 'Ninvaree'
9		N. 'Cherdlarb'	Brachyceras	N. 'LuangPoonsub' x N. 'Ninvaree'
10		N. 'Varoonlarb'	Brachyceras	N. 'LuangPoonsub' x N. 'Ninvaree'
11	3	N. 'Ranu'	Nymphaea	Mother
12		N. 'Tangzanite'	Brachyceras	Father
13		N. 'CL5826-01'	Inter Subgeneric ISG	N. 'Ranu' x N. 'Tangzanite'
14		N. 'CL5826-02'	Inter Subgeneric ISG	N. 'Ranu' x N. 'Tangzanite'
15		N. 'CL5826-03'	Inter Subgeneric ISG	N. 'Ranu' x N. 'Tangzanite'
16		N. 'CL5826-05'	Inter Subgeneric ISG	N. 'Ranu' x N. 'Tangzanite'
17	4	N. 'Mae Ploy'	Lotos	Mother
18		N. 'Thongsook'	Brachyceras	Father
19		N. 'F1-1CL5759'	Inter Subgeneric ISG	N. 'Mae Ploy' x N. 'Thongsook'
20		N. 'F1-2CL5759'	Inter Subgeneric ISG	N. 'Mae Ploy' x N. 'Thongsook'
21		N. 'F1-3CL5759'	Inter Subgeneric ISG	N. 'Mae Ploy' x N. 'Thongsook'
22	5	N. 'Green Smoke'	Brachyceras	Mother
23		N. 'Ampla'	Brachyceras	Father
24		N. 'CL5805-2'	Brachyceras	N. 'Green Smoke' X N. 'Ampla'
25		N. 'CL5805-3'	Brachyceras	N. 'Green Smoke' X N. 'Ampla'

เทียบความเหมือนและความต่างของแถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ดีเอ็นเอทั้งหมดของบัวสายทั้ง 25 พันธุ์/สายพันธุ์ ถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าเป็น 1 และถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้ค่าเป็น 0 แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) และสร้างเป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic

mean) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e (Rohlf, 2002)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัวสายเมื่อวิเคราะห์ด้วยแฮตอาร์เอพีดี

การคัดเลือกไพรเมอร์ของแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ที่

สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัวสายมี 40 ชนิด คิดเป็น 55.56 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน พบว่ามี 17 ชนิด ได้แก่ A22, A24, A27, A29, A30, B21, C28, C29, C31, D23, D31, E22, E24, E32, F23, F25 และ F31 ซึ่งเมื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวสายทั้ง 25 พันธุ์/

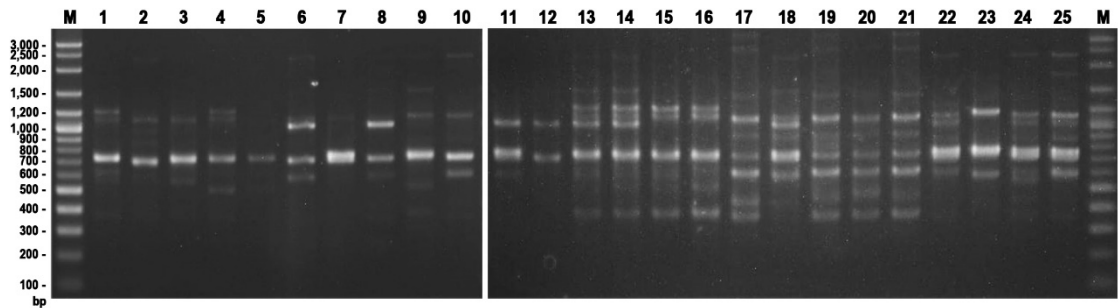
สายพันธุ์ พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 226 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายรูป 223 แถบ คิดเป็น 98.67 เปอร์เซ็นต์ และแถบดีเอ็นเอที่ไม่มี ความหลากหลายรูป 3 แถบ คิดเป็น 1.33 เปอร์เซ็นต์ โดยมีขนาด 200-3,000 คู่เบส (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ด้วยไพรเมอร์แบบสุ่มของแอตอาร์เอฟที 18 ชนิด

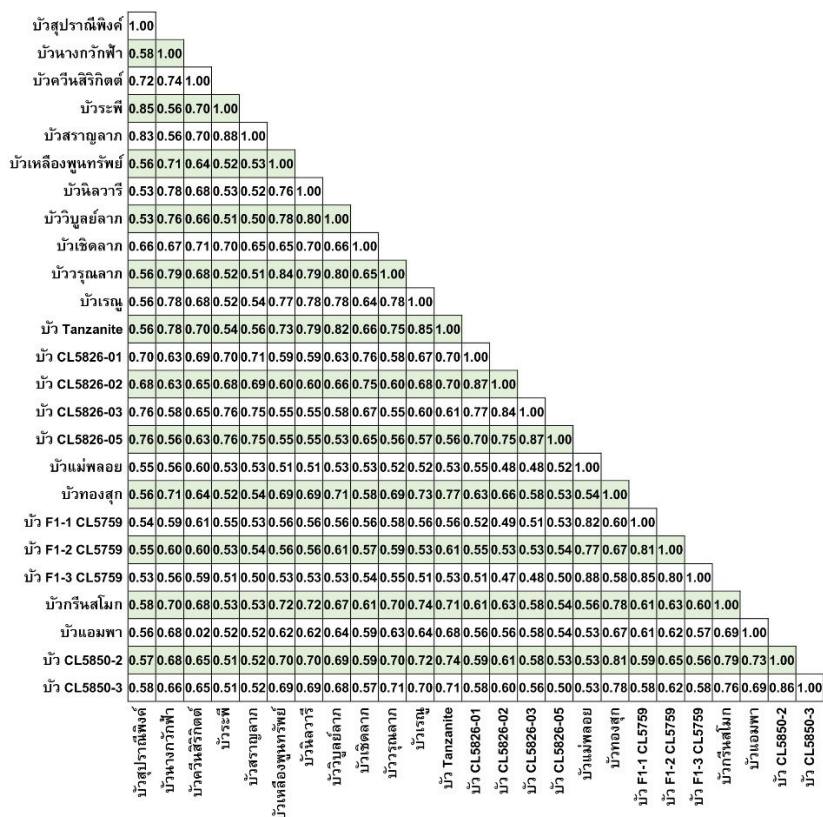
No.	Random primer	Nucleotide Sequence (5'→3')	Total bands	Polymorphic loci	Monomorphic loci	% Polymorphic
1	A22	GCCTGCCTCACG	11	11	0	100.00
2	A24	CTCCTGCTGTTG	15	15	0	100.00
3	A27	ATCGCGGAATAT	14	14	0	100.00
4	A29	GGTTCGGGAATG	12	11	1	91.67
5	A30	GACCTGCGATCT	11	11	0	100.00
6	B21	AAGCCTATACCA	17	16	1	94.12
7	C28	GTCGACGCATCA	10	10	0	100.00
8	C29	GTCGCCTTACCA	11	11	0	100.00
9	C31	TCTGCTGACCGG	13	13	0	100.00
10	D23	ACCATCAAACGG	15	15	0	100.00
11	D31	GGAGGTCGACCA	13	13	0	100.00
12	E22	GGAATGGAACCG	14	13	1	92.86
13	E24	CCGGAGTGGATG	16	16	0	100.00
14	E32	CAGGAACAGCAA	13	13	0	100.00
15	F23	CCATCCGCACGA	14	14	0	100.00
16	F25	CCAGATCCGAAT	14	14	0	100.00
17	F31	ATCGTGACGCCG	13	13	0	100.00
Total			226	223	3	98.67

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ของแอตอาร์เอฟที 17 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ B21 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 17 แถบ (รูปที่ 1) และไพรเมอร์ C28 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 10 แถบ

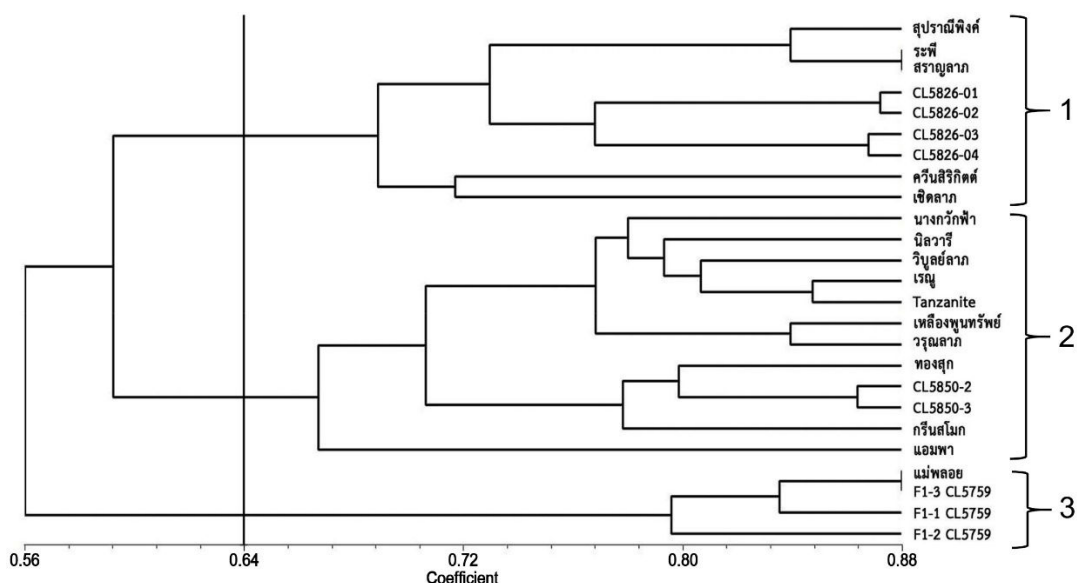
การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัวสาย โดยวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งหมดด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e และเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่าค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.47 ถึง 0.88 ดังรูปที่ 2 และเมื่อสร้าง



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากแอสตาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ B21 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp Plus DNA Ladder, Vivantis Technology Sdn. Bhd., Malaysia), หมายเลข 1-25 คือ (1) บัวสุปรางค์เฟิงค์ (2) บัวนางกวักฟ้า (3) บัวควีนสิริกิตต์ (4) บัวระพี (5) บัวสรายุกลาก (6) บัวเหลืองพุนทรพ์ (7) บัวนิลวารี (8) บัววิบูลย์ลาก (9) บัวเชิดลาก (10) บัววรรณลาก (11) บัวเรณู (12) บัว Tanzanite (13) บัว CL5826-01 (14) บัว CL5826-02 (15) บัว CL5826-03 (16) บัว CL5826-05 (17) บัวแม่พลอย (18) บัวทองสุข (19) บัว F1-1 CL5759 (20) บัว F1-2 CL5759 (21) บัว F1-3 CL5759 (22) บัวกรีนสโมก (23) บัวแอมพา (24) บัว CL5850-2 (25) บัว CL5850-3



รูปที่ 2 ค่าดัชนีความเหมือนที่วิเคราะห์จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวสาย 25 พันธุ์/สายพันธุ์ ซึ่งสร้างโดยเทคนิคแอสตาร์เอพีดี



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของบัวสาย 25 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่สร้างจากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

แผนภูมิความสัมพันธ์ (รูปที่ 3) พบว่าถ้าพิจารณาค่าดัชนีความเหมือนที่ 0.64 สามารถแบ่งบัวสายเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกมีสมาชิก 9 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ บัวสุปราณีพิงค์ บัวระพี บัวสรณูลาภ บัว CL5826-01 บัว CL5826-02 บัว CL5826-03 บัว CL5826-04 บัวควีนสิริกิตต์ และบัวเชิดลาภ กลุ่มสองมีสมาชิก 12 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ บัวนางกวักฟ้า บัวนิลวารี บัววิบูลย์ลาภ บัวเรณู บัว Tanzanite บัวเหลืองพูนทรัพย์ บัววรณูลาภ บัวทองสุข บัว CL5805-2 บัว CL5805-3 บัวกรีนสโมก และบัวแอมพา กลุ่มสามมีสมาชิก 4 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ บัวแม่พลอย บัว F1-1 CL5759 บัว F1-2 CL5759 และบัว F1-3 CL5759 โดยบัวสายที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากที่สุด คือ บัวระพีกับบัวสรณูลาภ มีค่าดัชนีความเหมือน 0.88 ส่วนบัวสายที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดน้อยที่สุด คือ บัว CL5826-02 กับบัว F1-3CL5759 มีค่าดัชนีความเหมือน 0.47

3.2 อภิปรายผล

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัวสายด้วยแฮตอาร์เอพีดีโดยวิเคราะห์แผนภูมิ

ความสัมพันธ์ ที่ค่าดัชนีความเหมือน 0.64 แบ่งบัวสายเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วยสมาชิก 9 พันธุ์/สายพันธุ์ ซึ่งมี 2 กลุ่มย่อย ในกลุ่มย่อยแรกจะเห็นได้ว่าบัวระพีและบัวสรณูลาภมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูงมาก ซึ่งเมื่อตรวจสอบก็พบว่าลักษณะสัณฐานทุกอย่างเหมือนกัน ยกเว้นเพียงสีก้านใบที่ต่างกัน อีกทั้งบัวทั้ง 2 พันธุ์ นี้เกิดจากแม่เดียวกัน คือ บัวสุปราณีพิงค์ โดยจากแผนภูมิความสัมพันธ์ยังเห็นว่าบัวระพีและบัวสรณูลาภมีความใกล้ชิดกับบัวสุปราณีพิงค์ที่เป็นต้นแม่ และสอดคล้องกับลักษณะสัณฐาน กลุ่มย่อยที่สองพบว่า เป็นกลุ่มของบัวลูกผสมที่เกิดจากบัวเรณู (แม่) กับ บัว Tanzanite (พ่อ) ซึ่งบัวทั้ง 4 สายพันธุ์ นี้มีลักษณะสัณฐานที่คล้ายคลึงกัน

กลุ่มที่สองประกอบด้วยสมาชิก 12 พันธุ์/สายพันธุ์ ซึ่งจากแผนภูมิความสัมพันธ์สามารถแยกเป็น 3 กลุ่มย่อย โดยบัว CL5805-2 บัว CL5805-3 ซึ่งเป็นลูกผสมที่เกิดจากบัวกรีนสโมก (แม่) และบัวแอมพา(พ่อ) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนบัววิบูลย์ลาภและบัววรณูลาภซึ่งเป็นลูกผสมที่เกิดจากบัว

เหลืองพุนทรัพย์ (แม่) และบัวนิลวารี (พ่อ) ก็จัดไว้ในกลุ่มเดียวกันเช่นกัน

กลุ่มสามประกอบด้วยสมาชิก 4 พันธุ์/สายพันธุ์ โดย บัว F1-1 CL5759 บัว F1-2 CL5759 และบัว F1-3 CL5759 เป็นบัวลูกผสมที่เกิดจากบัวแม่พลอย (แม่) และบัวทองสุก (พ่อ) อย่างไรก็ตามหากพิจารณาลักษณะพื้นฐานของบัวลูกผสมทั้ง 3 สายพันธุ์ จะพบว่ามีความใกล้เคียงกับแม่มากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับแผนภูมิความสัมพันธ์

งานวิจัยนี้เลือกใช้แฮตอาร์เอพีดีในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกพันธุ์/สายพันธุ์บัวสายและลูกผสม เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถจำแนกและแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชลูกผสมได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Chundet *et al.*, 2007) อีกทั้งยังใช้ประเมินความสัมพันธ์ของพืชและลูกผสมอย่างแพร่หลาย ได้แก่ ลิ้นจี่ลูกผสม (Chundet *et al.*, 2007) สเนกรวิลเลี่ยลูกผสม (Pharmawati *et al.*, 2013) กล้วยไม้ช้างและลูกผสม (นฤมล และคณะ, 2556) กล้วยไม้ช้างห้วย หมู่ในโกรเฮอร์ซูเรและลูกผสม (จุฑาทิพย์ และคณะ, 2559) เป็นต้น

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัวสายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์บัวสาย โดยการคัดเลือกและประเมินพันธุ์บัวสายที่มีลักษณะดีมาผสมกัน เพื่อให้ได้ลูกผสมพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะตามที่ต้องการ และเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการยืนยันพันธุ์บัวลูกผสมได้ด้วย

4. สรุป

แฮตอาร์เอพีดีมีประสิทธิภาพในการการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัวสายโดยเมื่อใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 17 ชนิด ที่คัดเลือกมาพบว่าสายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ให้แถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 226 แถบ ขนาดประมาณ 200-3,000 คู่เบส มีแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย 223 แถบ คิดเป็น

98.67 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e และเลือกการจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.47-0.88 และจัดกลุ่มบัวสายได้ 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะพื้นฐานและพันธุกรรม โดยผลการวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการวางแผนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.ต.ปริมลภ ชูเกียรติมัน เจ้าของปางอุบล สวนบัว จังหวัดนนทบุรี ผู้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างใบบัวสายและข้อมูลเกี่ยวกับบัวสำหรับงานวิจัย

6. รายการอ้างอิง

- ชยันต์ พิเชียรสุนทร, 2548, คู่มือเภสัชกรรมแผนไทยเล่ม 5 คณาเภสัช, พิมพ์ครั้งที่ 2, อัมรินทร์พรินตติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.
- นฤมล ธนาคันต์, วิทยารณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนาคันต์, 2555, การจำแนกบัวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1(2): 169-179.
- นฤมล ธนาคันต์, สุรีย์พร พุ่มเอี่ยม และธีระชัย ธนาคันต์, 2556, การจำแนกพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ช้างและลูกผสมด้วยเครื่องหมายแฮตอาร์เอพีดี, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 21(4): 360-370.
- ณัฐกานต์ โกเสนตอ, สุนิสา ณัฐพรนิชกุล และมลิวรรณ นาคขุนทด, 2557, การจัดจำแนกพืชวงศ์บัวสายโดยใช้คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ, ว. วิทยาศาสตร์บูรพา 19(3): 1-5.
- ปิยดา บุสดี, ธีระชัย ธนาคันต์ และนฤมล ธนาคันต์, 2558, การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* และ *rpoC1*, ว.

- วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23(6): 983-993.
- จุฑาทิพย์ พันธุ์ปัทมา, วีระชัย รัตนันต์ และนฤมล รัตนันต์, 2559, การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวายหมู่ไนโกรเฮอร์ชเชและลูกผสมด้วยแอตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 5(1): 77-87.
- Chundet, R., Cutler, R.W., Tasanon, M. and Anuntalabhochai, S., 2007, Hybrid detection in Lychee (*Litchee chinensis* Sonn.) cultivars using HAT-RAPD markers, Sci. Asia. 33: 307-311.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 11-15.
- Pharmawati, M. and Macfarlane, I.J., 2013, The genetic relationships of *Grevillea* hybrids determined by RAPD marker. HAYATI J. Biosci. 20(4): 196-200.
- Rohlf, F.J., 2002, NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Inc., New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.