การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกบัวสายและลูกผสมด้วยเครื่องหมายสก๊อต

Genetic Relationship Assessment and Identification of *Nymphaea* sp. and their hybrids Using SCoT Markers

สุรกฤษฎิ์ สุขสกุล และธีระชัย ธนานันต์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนานันต์*

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

ปัจจุบันบัวสายนิยมปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับและปรับปรุงพันธุ์อย่างแพร่หลาย ส่งผลให้บัวสายมีความหลากหลายทางพันธุกรรมและชนิด/พันธุ์จำนวนมาก การจำแนกพันธุ์บัวสายตามลักษณะสัณฐานจึงมีความยุ่งยากและสับสน งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของบัวสาย 25 พันธุ์/สายพันธุ์ จากปางอุบล สวนบัว จังหวัดนนทบุรี ด้วยเทคนิคสก๊อต จากการใช้ไพรเมอร์สก๊อตรวม 80 ชนิด ตรวจสอบเบื้อต้น พบว่าคัดเลือกไพรเมอร์ได้ 17 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจน เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัวสายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 224 แถบ ขนาดประมาณ 300-2,500 คู่เบส แถบดีเอ็นเอที่ได้มีความหลากรูป 220 แถบ (98.21 เปอร์เซ็นต์) เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์และเลือกการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน 0.40-0.91 และแบ่งกลุ่มบัวสายได้ 3 กลุ่ม โดยงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการอนุรักษ์พันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : บัวสาย; สก๊อต; แผนภูมิความสัมพันธ์; ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม; การจำแนก

Abstract

Currently, *Nymphaea* is widely used as ornamental flowers and for breeding, therefore the classification by morphology is difficult and confusing. This research, the relationships among 25

**Corresponding author: narumolpla@yahoo.com*
DOI: 10.14456/tjst.2018.52

Nymphaea sp. and their hybrids from Pangubol Suan Bua in Nonthaburi province were investigated using start codon targeted (SCoT) technique. In the total of 80 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 224 DNA bands ranging from 300 to 2,500 bp. The number of polymorphic bands was 220 (98.21 %). A dendrogram was constructed using UPGMA by the NTSYS-pc ver. 2.01e program based on similarity coefficient, which ranging from 0.40-0.91, and resulting in three major groups. This research could be used as a guideline for conservation and breeding in the future.

Keywords: *Nymphaea*; start codon targeted (SCoT); dendrogram; genetic relationship; identification

1. คำนำ

บัวสายที่อยู่ในสกุลนิมเฟีย (*Nymphaea*) แบ่งเป็น 5 สกุลย่อย (subgenus) คือ *Nymphaea, Lotos, Brachyceras, Hydrocallis* และ *Anecphya* พบการกระจายพันธุ์ทั่วโลก 45 ชนิด (species) โดยสามารถแบ่งตามลักษณะภูมิอากาศที่พบได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ (1) บัวสายเขตอบอุ่นหรือบัวสายเขตหนาว (hardy waterlily) และ (2) บัวสายเขตร้อน (tropical waterlily) (ไชยา, 2547)

บัวสายจัดเป็นพืชน้ำที่มีมูลค่ามากที่สุด มีศักยภาพในการผลิตเป็นไม้ตัดดอกเพื่อการค้า เนื่องจากมีสีสันและรูปทรงหลากหลาย ปัจจุบันมีการผลิตบัวสายในเชิงพาณิชย์กันอย่างแพร่หลาย ทั้งผลิตเพื่อขายภายในประเทศและผลิตเพื่อส่งออกต่างประเทศ บัวสายมีแนวโน้มเป็นสินค้าส่งออกที่ดี และตลาดต่างประเทศมีความต้องการสูง ในปี พ.ศ. 2553 บัวสกุล *Nymphaea* มีสถิติการส่งออกมากใน 5 อันดับแรกของพันธุ์ไม้น้ำ โดยมีการส่งออกจำนวน 39,760 ตัน คิดเป็นมูลค่า 1,144,090 บาท Chomchalom (2007) กล่าวว่าไทยเป็นหนึ่งในประเทศที่มีชื่อเสียงในการผลิตบัวสาย ปัจจุบันจึงมีการปรับปรุงพันธุ์บัวสายให้มีสีสันสวยงามตามความต้องการของตลาด ซึ่งสามารถเพิ่มศักยภาพทางการค้า พบว่ามีการส่งออกบัวสายลูกผสมของไทยไปจำหน่ายยังต่างประเทศและยังมีความต้องการของตลาดต่างประเทศเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (ภูรินทร์, 2553) ดังนั้นบัวสายลูกผสมในประเทศไทยที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์จึงเกิดขึ้นใหม่มากมาย มีลักษณะที่ดี ได้แก่ มีสีสันสวยงาม ดอกซ้อนมาก กลิ่นหอม ปลูกง่าย ให้ดอกมาก มีใบสวยงาม เป็นต้น นอกจากนั้น บัวสายลูกผสมในประเทศไทยหลายพันธุ์ยังนำไปประกวดบัวโลก IWGS สมาคมไม้น้ำสากล ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งได้รางวัลชนะเลิศจำนวนมากอีกด้วย

โดยในการจัดจำแนกพืชในสกุลบัวสาย (*Nymphaea*) ด้วยลักษณะสัณฐาน (morphology) ปัจจุบันยังเป็นที่สับสนและไม่ชัดเจนในบางสกุล เนื่องจากลักษณะสัณฐานอาจมีการผันแปรได้จากสภาพแวดล้อม โดยสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกันอาจพัฒนาลักษณะบางประการขึ้นมาคล้ายคลึงหรือเหมือนกัน จึงอาจเกิดความผิดพลาดได้ง่าย รวมทั้งปัจจุบันได้มีการปรับปรุงพันธุ์บัวสายกันแพร่หลาย ส่งผลต่อความหลากหลายทางชนิด/พันธุ์/สายพันธุ์เป็นอย่างมาก ดังนั้นการจัดจำแนกบัวสายแต่ละกลุ่มให้ออกจากกันอย่างชัดเจนและถูกต้องนั้น จึงจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลจากดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมที่นำมาใช้ในการจัดจำแนกกันมาก เนื่องจากให้ข้อมูลที่ละเอียดมากเพียงพอ และสามารถสืบหาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้อีกด้วย (ณัฐกานต์, 2557)

ด้วยความสำคัญดังกล่าว จึงมีแนวคิดที่จะรวบรวมพันธุ์บัวสายในประเทศไทย เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationship) โดยเลือกศึกษาบัวสายในสกุล *Nymphaea* ซึ่งเป็นบัวสายที่มีความสวยงามและนิยมปลูกเพื่อใช้ประดับกันอย่างแพร่หลาย โดยใช้เทคนิคสก๊อต (SCoT, start codon targeted) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดที่พัฒนาขึ้นโดย Collard และ Mackill (2009) หลักการ คือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) เพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยไพรเมอร์ (primer) เดี่ยว ขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งไพรเมอร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ATG ที่เป็นรหัสเริ่มต้น (start codon) ประกอบอยู่ด้วย เทคนิคสก๊อตให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนและมีความหลากรูป (polymorphism) สูง นอกจากนั้น ยังเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ ประหยัดค่าใช้จ่าย และให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะกับแต่ละพันธุ์ (นฤมล และคณะ, 2560)

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายสก๊อตที่สามารถจำแนกและบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์บัวสาย 25 พันธุ์/สายพันธุ์ รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัวสายซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการรักษาพันธุกรรม การอนุรักษ์พันธุ์ และการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 บัวสาย

เก็บตัวอย่างใบบัวสายจาก ปางอุบล สวนบัว 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 และทำเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (eletrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซนต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้เกิดการเรืองแสงด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อตรวจดูแถบดีเอ็นเอ (Sambrook *et al.*, 1989)

2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคสก๊อต

2.3.1 การตรวจหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยรวมดีเอ็นเอบัวสายและลูกผสม 25 พันธุ์/สายพันธุ์ เข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยการใช้ไพรเมอร์จำนวน 80 ชนิด ซึ่งมีขนาด 18 นิวคลีโอไทด์ (Luo *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2013) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.1), 0.1 % Triton™ X-100 และ 2.5 mM $MgCl_2$) และมีนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์ 250 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis technologies Sdn Bhd., Malaysia) 1 ยูนิต (Unit) ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร (นฤมล, 2555) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาทีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศา เซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศา

ตารางที่ 1 ตัวอย่างบัวสาย 25 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ใช้ในการศึกษา

No.	Group	Caltivar/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'

เซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ และบันทึกภาพเก็บไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอต่อไป (นฤมล, 2555)

2.3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของบัวสายและลูกผสม 25 พันธุ์/สายพันธุ์ โดยคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอบัวสายและลูกผสม 25 พันธุ์/สายพันธุ์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส แล้วตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเจลไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที และตรวจสอบด้วยเครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (gel documentation) (นฤมล, 2555)

ตารางที่ 2 จำนวนแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์สก๊อตแต่ละชนิด

No.	SCoT primer	Nucleotide Sequence 5′→3′	Total bands	Polymorphic loci	Monomorphic loci	% Polymorphic
1	SCoT13	ACGACATGGCGACCATCG	11	10	1	90.91
2	SCoT15	ACGACATGGCGACCGCGA	15	15	0	100
3	SCoT16	ACCATGGCTACCACCGAC	15	15	0	100
4	SCoT18	ACCATGGCTACCACCGCC	12	12	0	100
5	SCoT20	ACCATGGCTACCACCGCG	13	13	0	100
6	SCoT21	ACGACATGGCGACCCACA	14	14	0	100
7	SCoT22	AACCATGGCTACCACCAC	12	12	0	100
8	SCoT39	ACGACATGGCGACCAGCG	14	14	0	100
9	SCoT40	ACGACATGGCGACCACGT	11	11	0	100
10	SCoT47	ACAATGGCTACCACTGCC	14	14	0	100
11	SCoT67	ACCATGGCTACCAGCGGC	12	12	0	100
12	SCoT72	CCATGGCTACCACCGCCC	17	15	2	88.23
13	SCoT73	CCATGGCTACCACCGGCT	15	15	0	100
14	SCoT74	CCATGGCTACCACCGGCA	12	12	0	100
15	SCoT76	CCATGGCTACCACTACCG	14	14	0	100
16	SCoT77	CCATGGCTACCACTACCC	13	12	1	92.31
17	SCoT79	CCATGGCTACCACTAGCT	10	10	0	100
Total			224	220	4	98.21

2.4 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™) ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบภายใต้แสงอัตราไวโอเลต

2.5 การวิเคราะห์ผล

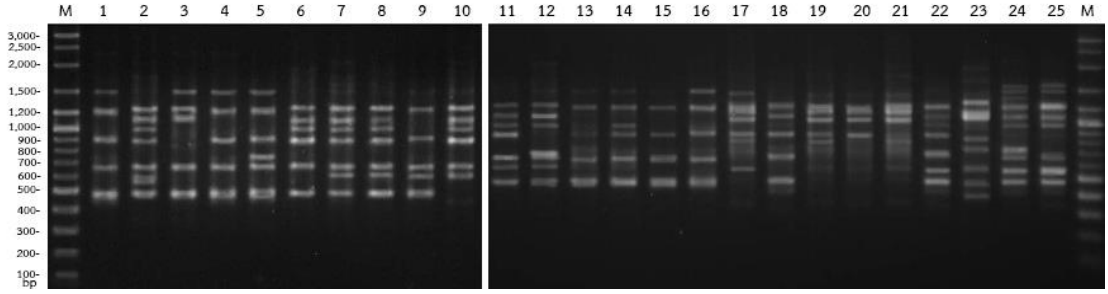
หาความสัมพันธ์โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอบัวสายทั้ง 25 พันธุ์/สายพันธุ์ ถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 0 แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity coefficient) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) ด้วยการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e (Rohlf, 2002)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของบัวสายด้วยเทคนิคสก๊อต

การคัดเลือกไพรเมอร์สก๊อตเบื้องต้นโดย

การใช้ไพรเมอร์สก๊อต จำนวน 80 ชนิด กับดีเอ็นเอของบัวสายทั้ง 25 พันธุ์/สายพันธุ์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ พอลิเมอเรส พบว่าไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอของบัวสายมี 40 ชนิด คิดเป็น 50.00 เปอร์เซ็นต์ แล้วคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มผลผลิตดีเอ็นเอได้ดีและให้แถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนได้ 17 ชนิด ได้แก่ SCoT13, SCoT15, SCoT16, SCoT18, SCoT20, SCoT21, SCoT22, SCoT39, SCoT40, SCoT47, SCoT67, SCoT72, SCoT73, SCoT74, SCoT76, SCoT77 และ SCoT79 โดยนำไปสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 224 แถบ ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูปจำนวน 220 แถบ คิดเป็น 98.21 เปอร์เซ็นต์ และแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีความหลากรูปจำนวน 4 แถบ คิดเป็น 1.79 เปอร์เซ็นต์ ขนาดอยู่ระหว่าง 300-2,500 คู่เบส (ตารางที่ 2) ผลการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์สก๊อตจำนวน 17 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ SCoT72 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 17 แถบ (รูปที่ 1) และไพรเมอร์ SCoT79 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด คือ 10 แถบ



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายสก๊อตโดยใช้ไพรเมอร์ SCoT72 [M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific™) หมายเลข 1-25 คือ (1) บัวสุปราณีพิงค์ (2) บัวนางกวักฟ้า (3) บัวควีนสิริกิตต์ (4) บัวระพี (5) บัวสราญลาภ (6) บัวเหลืองพูนทรัพย์ (7) บัวนิลวารี (8) บัววิบูลย์ลาภ (9) บัวเชิดลาภ (10) บัววรุณลาภ (11) บัวเรณู (12) บัว Tanzanite (13) บัว CL5826-01 (14) บัว CL5826-02 (15) บัว CL5826-03 (16) บัว CL5826-05 (17) บัวแม่พลอย (18) บัวทองสุก (19) บัว F1-1 CL5759 (20) บัว F1-2 CL5759 (21) บัว F1-3 CL5759 (22) บัวกรีนสโมก (23) บัวแอมพา (24) บัว CL5850-2 และ (25) บัว CL5850-3]

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของบัวสายและลูกผสมด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e เลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA พบว่าค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.40-0.91 ดังรูปที่ 2 และผลการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ดังรูปที่ 3 เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความเหมือนที่ตำแหน่ง 0.57 สามารถแบ่งกลุ่มบัวสายออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกมีสมาชิก 8 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ บัวสุปราณีพิงค์ บัวระพี บัวสราญลาภ บัว CL5826-01 บัว CL5826-02 บัว CL5826-03 บัว CL5826-04 และบัวเชิดลาภ กลุ่มสองมีสมาชิก 13 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ บัวนางกวักฟ้า บัวควีนสิริกิตต์ บัวนิลวารี บัววิบูลย์ลาภ บัวเรณู บัว Tangzanite บัวเหลืองพูนทรัพย์ บัววรุณลาภ บัวทองสุก 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 สำหรับบัวสายที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดมากที่สุด คือ บัว F1-3 CL5759 กับบัวแม่พลอย มีค่าดัชนีความเหมือน 0.91 ส่วนบัวสายที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดน้อยที่สุด คือ บัว F1-2 CL5759 กับบัวนางกวักฟ้า มีค่าดัชนีความเหมือน 0.40

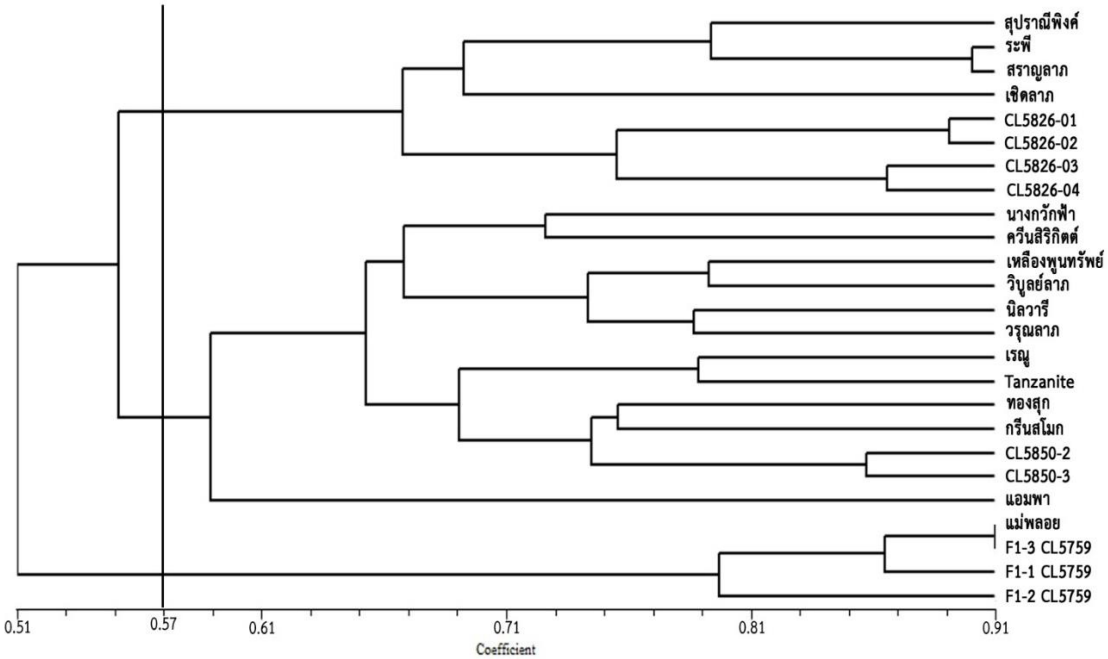
	สุปราณีพิงค์	นางกวักฟ้า	ควีนสิริกิตต์	ระพี	สราญลาภ	เหลืองพูนทรัพย์	นิลวารี	วิบูลย์ลาภ	เชิดลาภ	วรุณลาภ	เรณู	Tanzanite	CL5826-01	CL5826-02	CL5826-03	CL5826-04	แม่พลอย	ทองสุก	F1-1 CL5759	F1-2 CL5759	F1-3 CL5759	กรีนสโมก	แอมพา	CL5850-2	CL5850-3
สุปราณีพิงค์	1.00																								
นางกวักฟ้า	0.47	1.00																							
ควีนสิริกิตต์	0.67	0.72	1.00																						
ระพี	0.79	0.46	0.66	1.00																					
สราญลาภ	0.80	0.41	0.61	0.90	1.00																				
เหลืองพูนทรัพย์	0.45	0.69	0.64	0.50	0.47	1.00																			
นิลวารี	0.46	0.71	0.66	0.49	0.46	0.76	1.00																		
วิบูลย์ลาภ	0.48	0.69	0.63	0.53	0.49	0.79	0.76	1.00																	
เชิดลาภ	0.64	0.62	0.72	0.75	0.70	0.64	0.65	0.67	1.00																
วรุณลาภ	0.44	0.69	0.66	0.51	0.44	0.73	0.79	0.74	0.69	1.00															
เรณู	0.51	0.72	0.67	0.50	0.46	0.68	0.64	0.67	0.63	0.69	1.00														
Tanzanite	0.52	0.71	0.64	0.51	0.48	0.66	0.68	0.72	0.63	0.65	0.79	1.00													
CL5826-01	0.61	0.57	0.63	0.68	0.64	0.53	0.54	0.61	0.72	0.59	0.62	0.68	1.00												
CL5826-02	0.60	0.55	0.64	0.67	0.66	0.54	0.52	0.59	0.72	0.56	0.64	0.69	0.89	1.00											
CL5826-03	0.65	0.44	0.55	0.73	0.71	0.47	0.44	0.48	0.62	0.51	0.53	0.54	0.76	0.76	1.00										
CL5826-04	0.61	0.46	0.54	0.72	0.68	0.53	0.47	0.57	0.66	0.55	0.57	0.57	0.74	0.76	0.87	1.00									
แม่พลอย	0.47	0.47	0.51	0.51	0.51	0.51	0.52	0.52	0.52	0.56	0.52	0.55	0.55	0.53	0.58	0.61	1.00								
ทองสุก	0.48	0.62	0.68	0.52	0.50	0.65	0.66	0.64	0.64	0.65	0.68	0.67	0.65	0.63	0.55	0.56	0.50	1.00							
F1-1 CL5759	0.45	0.44	0.49	0.49	0.50	0.49	0.51	0.51	0.53	0.52	0.44	0.53	0.56	0.55	0.58	0.57	0.87	0.52	1.00						
F1-2 CL5759	0.43	0.40	0.44	0.47	0.50	0.45	0.51	0.47	0.48	0.48	0.42	0.52	0.54	0.51	0.53	0.53	0.77	0.52	0.84	1.00					
F1-3 CL5759	0.45	0.45	0.47	0.49	0.50	0.47	0.49	0.54	0.50	0.52	0.51	0.56	0.52	0.51	0.54	0.57	0.91	0.52	0.86	0.79	1.00				
กรีนสโมก	0.44	0.61	0.54	0.48	0.45	0.63	0.58	0.65	0.58	0.65	0.71	0.69	0.67	0.63	0.54	0.58	0.47	0.76	0.45	0.51	0.47	1.00			
แอมพา	0.44	0.54	0.55	0.50	0.47	0.60	0.56	0.58	0.54	0.58	0.62	0.62	0.54	0.52	0.50	0.53	0.52	0.54	0.48	0.48	0.50	0.64	1.00		
CL5850-2	0.50	0.62	0.66	0.53	0.50	0.62	0.64	0.67	0.63	0.63	0.71	0.68	0.68	0.66	0.58	0.61	0.54	0.74	0.54	0.56	0.52	0.76	0.58	1.00	
CL5850-3	0.47	0.64	0.62	0.52	0.50	0.69	0.67	0.72	0.66	0.67	0.70	0.68	0.64	0.65	0.55	0.60	0.53	0.75	0.56	0.56	0.53	0.73	0.62	0.86	1.00

รูปที่ 2 ค่าดัชนีความเหมือนของบัวสาย 25 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคสก๊อต

3.2 การอภิปรายผล

การศึกษาความสัมพันธ์ของบัวสายด้วยเทคนิคสก๊อตด้วยการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ โดยผลการจัดกลุ่มเมื่อพิจารณาที่ตำแหน่ง 0.57 สามารถแบ่งกลุ่มได้ 3 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วยสมาชิก 8 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ บัวสุปราณีพิงค์ บัวระพี บัวสราญลาภ บัว CL5826-01 บัว CL5826-02 บัว CL5826-03 บัว CL5826-04

และบัวเชิดลาภ จากแผนภูมิความสัมพันธ์มีการแยกเป็นกลุ่มย่อย ในกลุ่มย่อยแรกจะเห็นได้ว่าบัวระพีและบัวสราญลาภมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันเป็นอย่างมาก มีค่าดัชนีความเหมือน 0.90 ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะสัณฐาน เนื่องจากมีลักษณะสัณฐานทุกอย่างเหมือนกัน มีเพียงสีก้านที่ต่างกันเท่านั้น อีกทั้งบัวทั้ง 2 ชนิด นี้เกิดจากแม่เดียวกัน คือ บัวสุปราณีพิงค์ จากแผนภูมิความสัมพันธ์ยังทำให้เห็นว่าบัวระพีและบัวสราญลาภมีความใกล้ชิดกับบัวสุปราณีพิงค์ที่เป็นต้นแม่ สอดคล้องกับลักษณะสัณฐาน ในกลุ่มย่อยที่สองพบว่าเป็นกลุ่มของบัวลูกผสมที่เกิดจากบัวเรณู (แม่) กับบัว Tangzanite (พ่อ) ทั้งหมด ได้แก่ บัว CL5826-01 บัวCL5826-02 บัว CL5826-03 บัว CL5826-04 ซึ่งบัวทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มีลักษณะสัณฐานที่คล้ายคลึงกัน



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ของบัวสาย 25 พันธุ์/สายพันธุ์ ที่ได้จากเทคนิคสก๊อต

กลุ่มที่สองประกอบด้วยสมาชิก 13 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ บัวนางกวักฟ้า บัวควีนสิริกิตต์ บัวนิลวารี บัววิบูลย์ลาภ บัวเรณู บัว Tangzanite บัวเหลืองพูนทรัพย์ บัววรุณลาภ บัวทองสุก บัว CL5805-2 บัว CL5805-3 บัวกรีนสโมก และบัวแอมพา ซึ่งจากแผนภูมิความสัมพันธ์มีการแยกเป็นกลุ่มย่อย เช่น บัว CL5805-2 กับบัว CL5805-3 ซึ่งบัวทั้งสองเป็นลูกผสมที่เกิดจากบัวกรีนสโมก (แม่) และ บัวแอมพา (พ่อ) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือบัววิบูลย์ลาภกับบัววรุณลาภ ซึ่งบัวทั้งสองเป็นลูกผสมที่เกิดจากบัวเหลืองพูนทรัพย์ (แม่) และบัวนิลวารี (พ่อ) ก็ถูกจัดไว้ในกลุ่มเดียวกันเช่นกัน

กลุ่มที่สามประกอบด้วยสมาชิก 4 พันธุ์/สายพันธุ์ ได้แก่ บัวแม่พลอย บัว F1-1 CL5759 บัว F1-2 CL5759 และบัว F1-3 CL5759 โดยบัว F1-1 CL5759 บัว F1-2 CL5759 และบัว F1-3 CL5759 ล้วนแล้วแต่เป็นบัวลูกผสมที่เกิดจากบัวแม่พลอย (แม่) และบัวทองสุก (พ่อ) อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาลักษณะสัณฐานของบัวลูกผสมทั้ง 3 สายพันธุ์จะพบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับแม่มากกว่า

ซึ่งสอดคล้องกับแผนภูมิความสัมพันธ์ อีกทั้งบัว F1-3 CL5759 กับบัวแม่พลอยมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมอย่างมาก มีค่าดัชนีความเหมือน 0.91 และหากพิจารณาลักษณะสัณฐานของบัวทั้งสองจะพบว่ามีลักษณะที่ใกล้เคียงกันอย่างมาก

งานวิจัยนี้เลือกใช้เทคนิคสก๊อตในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและจำแนกพันธุ์บัวสายและลูกผสมเนื่องจากเทคนิคสก๊อตนิยมนำมาใช้ในการศึกษาพันธุกรรมพืชกันอย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะเป็นพืชสกุลมะพลับในมณฑลกวางสี ประเทศจีน (Deng *et al*., 2015) มะเขือเทศ (Armad *et al*., 2014) บอระเพ็ด (Paliwal *et al*., 2013) องุ่น (Guo *et al*., 2012) มะม่วง (Lou *et al*., 2015) อีกทั้งยังสามารถใช้ศึกษาพืชลูกผสม เช่น ทิวลิปลูกผสม (Gao *et al*., 2014) ได้อีกด้วย

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัวสายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์บัวสายเนื่องจากในปัจจุบันนิยมปรับปรุงพันธุ์บัวสายอย่างแพร่หลาย โดยการคัดเลือกและประเมินพันธุ์บัวสายที่มีลักษณะดีมาผสมกัน เพื่อให้ได้ลูกผสมพันธุ์ใหม่มีลักษณะตามที่ต้องการและเพื่อสามารถใช้เป็นข้อมูลในการยืนยันพันธุ์บัวลูกผสมต่อไป

4. สรุป

เทคนิคสก๊อตมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัวสาย โดยไพรเมอร์ 17 ชนิดที่มาจากการคัดเลือกสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 224 แถบ ขนาด 300-2,500 คู่เบส พบแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากรูปจำนวน 220 แถบ คิดเป็น 98.21 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาผลของแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01e และจัดกลุ่มแบบ UPGMA สามารถจัดกลุ่มของบัวสายได้ 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะสัณฐาน มีค่าดัชนีความเหมือน 0.40-0.91 ผลการวิจัยสามารถเป็นแนวทางในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์พันธุ์ต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ น.ต.ปริมลาภ ชูเกียรติมั่น เจ้าของปางอุบล สวนบัว จังหวัดนนทบุรี ผู้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างใบบัวสายและข้อมูลเกี่ยวกับบัวสำหรับทำงานวิจัย และขอขอบคุณ ทุนวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ภายใต้ “ทุนวิจัยทั่วไป”

6. รายการอ้างอิง

ไชยา ลาวัลย์, 2547, การปลูกบัว, สำนักพิมพ์ ฐานเกษตรกรรม, กรุงเทพฯ.

นฤมล ธนานันต์, ฐิติพร โท้มโสภา และธีระชัย ธนานันต์, 2555, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Technol. 1: 169-179.

นฤมล ธนานันต์, จุฑามาศ เจียมเจือจันทร์ และธีระชัย ธนานันต์, 2560, การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการระบุชนิดของกล้วยไม้สกุลก้านก่อด้วยเครื่องหมายสก๊อต, Thai J. Sci. Technol. 6: 152-160.

ภูรินทร์ อัครกุลธร, 2553, มนต์เสน่ห์แห่งบัว, พิพิธภัณฑ์บัวมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, ว.ไทย 31(16): 22-23.

ณัฐกานต์ โกเสนตอ, มลิวรรณ นาคขุนทด, สุณิสา ณัฐพรณิชกุล, 2557, การจัดจำแนกพืชวงศ์บัวสายโดยใช้คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ, ว.วิทยาศาสตร์บูรพา (พิเศษ : การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 6): 1-6.

ปิยดา บุสดี, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์,

2558, การจำแนกพันธุ์มะม่วงในประเทศไทยจากลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbc*L และ *rpo*C1, ว. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 23(6): 983-993.

Ahmad, S., Sepideh, T. and Mahmood, K., 2014, Efficiency of SCoT and ISSR markers in assessment of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) genetic diversity, Int. J. Biosci. 5(2): 14-22.

Deng, L.B., Liang, Q.Z., He, X.H., Lou, C., Chen, H. and Qin, Z.S., 2015, Investigation and analysis of genetic diversity of diospyros germplasms using SCoT molecular markers in Guangxi, PLoS ONE 10(8): e0136510.

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.

Guo, D.L., Zhang J.Y. and Liu C.H., 2012, Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses, Mol. Biol. 39: 5307-5313.

Gao, U.H., Zhu, Y.Q., Tong, Z.k., Xu, Z.Y., Jiang, X.F. and Huang, C.H., 2014, Analysis of genetic diversity and relationships among genus *Lycoris* based on start codon targeted (SCoT) marker, Biochem. System. Ecol. 57: 221-226.

Lou, C., He, X.H., Chen, H., Ou, S.J. and Gao, M.P., 2010, Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using start codon targeted (SCoT) markers, Biochem. System. Ecol. 38: 1176-1184.

Paliwal, R., Singh, R., Singh, A.M., Kumar, S., Kumar, A. and Singh, R.M., 2013, Molecular characterization of Giloe [*Tinospora cordifolia* (Willd. Miers ex Hook. F. and Thoms.] accessions using start codon targeted (SCoT) markers, Int. J. Med. Aromat. Plants, 3: 413-422.

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.