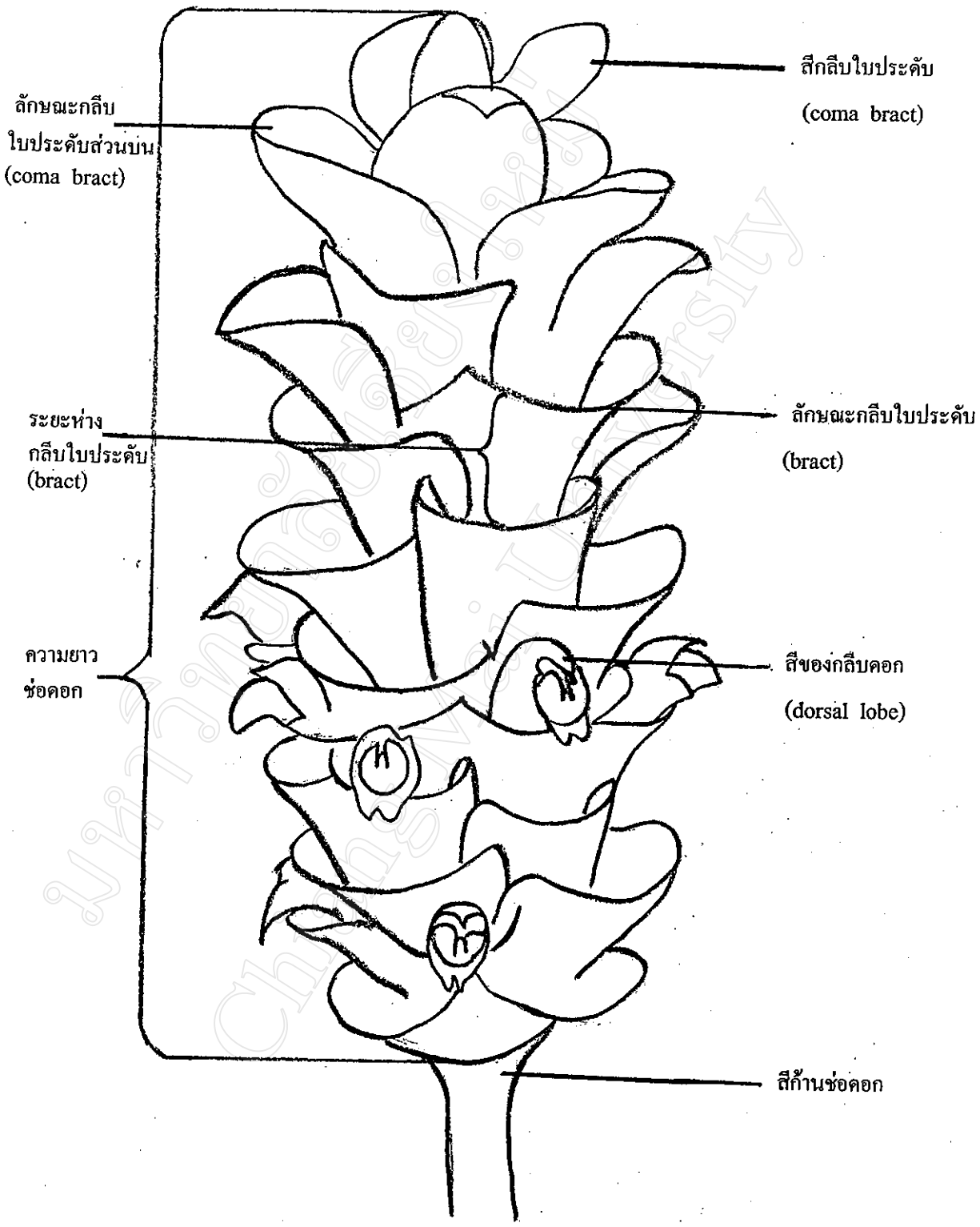
บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การคัดเลือกพืชทดลอง

ในช่วงเดือนมิถุนายนเก็บตัวอย่างใบอ่อนบัวชั้นจาก 7 แปลง โดยให้สัญลักษณ์แทน คือ A – G แปลงละ 15 ต้น รวม 105 ต้น บันทึก และ ทำเครื่องหมายไว้ที่ต้น จากนั้นเมื่อมีการออกดอก และ สีกลีบใบประดับเกิดสีเต็มที่ในเดือนกรกฎาคมจึงถ่ายรูปไว้ และ บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบัวชั้น 7 ลักษณะ คือ สีกลีบใบประดับ ระยะห่างกลีบใบประดับ ลักษณะกลีบใบประดับ ลักษณะกลีบใบประดับส่วนบน สีก้านช่อดอก ความยาวช่อดอก และ สีของกลีบดอก (ภาพ 20) (ตาราง 2)

การคัดเลือกต้นบัวชั้นเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP พิจารณาจาก สีกลีบใบประดับ * (สีเข้ม และ สีอ่อน), สีก้านช่อดอก **(สีขาว และ สีเขียว) และ ลักษณะกลีบใบประดับส่วนบน ***(ปลายกลีบกว้าง และ ปลายกลีบแหลม) รวม 34 ต้น (ตาราง 2)



ภาพ 20 ภาพวาดบัวชั้น (*Curcuma petiolata* Roxb.)
แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยา 7 ลักษณะ

ตาราง 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบัวชั้น (*, **, *** = ต้นที่เลือกใช้ในแต่ละลักษณะ)

ตัวอย่างพืช	กลีบใบประดับ				สีก้านช่อดอก	ความยาวช่อดอก (เซนติเมตร)	สีของกลีบดอก
	สี	ลักษณะส่วนบน	ระยะห่าง	ลักษณะ			
A6	สีอ่อน*	แหลม	ถี่	ป้าน	เขียว	27	ฉาบแดง
A7	สีเข้ม	แหลม***	ถี่	ห่อ	ขาว**	16	ขาวนวล
A8	สีเข้ม	แหลม***	ถี่	ห่อ	ขาว**	20.5	ขาวนวล
A12	สีเข้ม	แหลม	ถี่	ห่อ	ขาว**	16	ขาวนวล
A13	สีเข้ม	แหลม	ห่าง	ห่อ	ขาว**	21	ขาวนวล
A14	สีเข้ม*	แหลม	ถี่	ห่อ	ขาว**	22	ฉาบแดง
A15	สีอ่อน*	กว้าง***	ถี่	ห่อ	เขียว	30	ขาวนวล
B5	สีเข้ม	แหลม	ถี่	ป้าน	ขาว**	26	ฉาบแดง
B8	สีอ่อน	แหลม***	ห่าง	ห่อ	ขาว**	14.5	ขาวนวล
B9	สีเข้ม*	แหลม***	ถี่	ห่อ	เขียว	20.5	ขาวนวล
B14	สีเข้ม	แหลม	ถี่	ห่อ	ขาว**	21.5	ขาวนวล
C2	สีอ่อน	กว้าง***	ถี่	ห่อ	ขาว**	18	ขาวนวล
C5	สีอ่อน	กว้าง***	ถี่	ห่อ	ขาว**	20	ขาวนวล
C8	สีเข้ม*	แหลม***	ถี่	ห่อ	เขียว	26	ขาวนวล
C9	สีอ่อน*	แหลม	ถี่	ห่อ	เขียว	28	ขาวนวล
C11	สีอ่อน*	กว้าง	ถี่	ห่อ	เขียว	24	ขาวนวล
C14	สีเข้ม	กว้าง***	ถี่	ป้าน	เขียว**	22	ขาวนวล
D1	สีอ่อน*	แหลม	ถี่	ห่อ	เขียว	20.5	ฉาบชมพู
D3	สีอ่อน*	กว้าง***	ห่าง	ป้าน	เขียว	25	ขาวนวล
E2	สีอ่อน*	แหลม	ถี่	ห่อ	เขียว	28.5	ขาวนวล
E4	สีเข้ม*	กว้าง***	ถี่	ป้าน	เขียว	26.5	ขาวนวล
E9	สีเข้ม*	แหลม	ถี่	ป้าน	เขียว**	24	ขาวนวล
E12	สีเข้ม	แหลม	ถี่	ป้าน	เขียว**	21	ขาวนวล
F1	สีเข้ม*	แหลม***	ถี่	ป้าน	เขียว**	29	ขาวนวล
F2	สีเข้ม*	แหลม***	ถี่	ป้าน	เขียว**	29	ฉาบแดง
F4	สีอ่อน*	กว้าง***	ห่าง	ห่อ	เขียว	20	ขาวนวล
F6	สีเข้ม*	แหลม***	ถี่	ห่อ	เขียว**	24.5	ฉาบแดง
F7	สีอ่อน*	แหลม***	ห่าง	ห่อ	เขียว	24	ขาวนวล
F14	สีเข้ม*	แหลม***	ถี่	ห่อ	เขียว**	26	ฉาบชมพู
G2	สีเข้ม*	กว้าง***	ถี่	ป้าน	เขียว	25	ขาวนวล
G4	สีเข้ม	กว้าง***	ถี่	ห่อ	เขียว**	18.5	ขาวนวล
G9	สีเข้ม	แหลม	ถี่	ป้าน	เขียว**	22.5	ขาวนวล
G10	สีเข้ม	กว้าง***	ถี่	ป้าน	เขียว**	22.5	ขาวนวล
G13	สีอ่อน*	แหลม	ถี่	ห่อ	เขียว	25	ขาวนวล

เลขหมู่.....
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

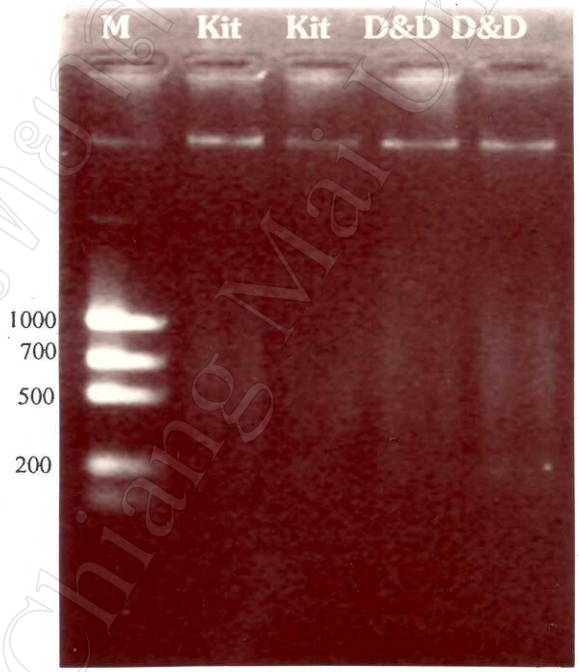
การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ

จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 2 วิธี คือ

1. สกัดด้วย DNeasy Plant Mini Kit (Cat No. 69103) ของบริษัท QIAGEN โดยมีน้ำยาสำเร็จรูปที่ใช้ในการสกัด ดังนี้ AP1 buffer, AP2 buffer, AP3 buffer, AW buffer และ RNase A

2. สกัดด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1990) (อุไรวรรณ, 2540) โดยมีน้ำยาที่เตรียมขึ้นเอง ดังนี้ extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA และ 0.5% SDS), Proteinase K, isopropanol, 70% ethyl alcohol, RNase ONE™ ribonuclease, phenol, chloroform และ TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA)

เมื่อทดสอบโดยวิธีอกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพ 21) พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 วิธีมีความคมชัด คุณภาพดีไม่เกิดปื้น ขนาดโมเลกุลใหญ่ และ ปริมาณดีเอ็นเอใกล้เคียงกัน



ภาพ 21 ดีเอ็นเอบัวชั้นที่ได้จากการสกัดด้วย DNeasy Plant Mini Kit (Kit) และ วิธีดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (D&D)
M = Marker

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

การทดลองที่ 3 การทดสอบสภาพที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

จากการทดสอบสภาพที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ได้แก่ ผลของปริมาณดีเอ็นเอ และระยะเวลาต่อปฏิกิริยา digestion ผลของระยะเวลาในการทำ ligation ต่อปฏิกิริยา PCR และ ผลของการเจือจางดีเอ็นเอต่อปฏิกิริยา PCR เปรียบเทียบผลที่ได้จากแต่ละเงื่อนไขโดยวิธีอกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ภาพ 22) พบว่า เมื่อใช้ดีเอ็นเอ 250 500 และ 750 นาโนกรัม ในปฏิกิริยา digestion องค์ประกอบที่ใช้สามารถตัดดีเอ็นเอได้สมบูรณ์ สังเกตได้จาก การไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่ (uncut) และ ปื้นมีความสม่ำเสมอ

การทำปฏิกิริยา digestion ที่ 2 ชั่วโมง เพียงพอในการตัดดีเอ็นเอ 250 นาโนกรัม ได้อย่างสมบูรณ์ โดยดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะไม่ต่างจากการทำปฏิกิริยาข้ามคืน

ดีเอ็นเอที่ได้หลังการตัดด้วยเอ็นไซม์ต้องนำไปต่อกับ adapter และ เจือจางก่อนการทำ PCR เมื่อเปรียบเทียบการใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการทำ ligation เป็นเวลา 2, 4, 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่า แถบที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์จาก pre-selective amplification มีปริมาณ และขนาดเหมือนกัน

เมื่อใช้ดีเอ็นเอต้นแบบเจือจางที่อัตรา 1:5, 1:10 และ 1:50 พบว่าได้แถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกันเช่นกัน

ภาพ 22 สภาพที่เหมาะสมเพื่อทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกระเจียว
(M = Marker, ช่องที่ 1, 2, 3, 4 = การเจือจางดีเอ็นเอต่อ ปฏิกิริยา PCR ที่อัตรา 1:5, 1:10, 1:50 ตามลำดับ, ช่องที่ 5, 6, 7, 8 = จำนวนชั่วโมงในการต่อดีเอ็นเอ 2, 4, 6, 12 ชั่วโมง ตามลำดับ, ช่องที่ 9 และ 10 = ชั่วโมงในการตัดดีเอ็นเอ 2 ชั่วโมง, ช่องที่ 11 และ 12 = ข้ามคืน, ช่องที่ 13, 14, 15 = ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทำการตัดดีเอ็นเอ 250, 500, 700 นาโนกรัม ตามลำดับ)

การทดลองที่ 4 การทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำ AFLP

การทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำ selective amplification (PCR ขั้นตอนที่ 2) จากไพรเมอร์ทั้งหมด 64 คู่ พบว่ามีไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัวชั้นได้จำนวน 46 คู่ (ตาราง 3) แต่ละคู่ไพรเมอร์สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอได้มากน้อยต่างกัน (ภาพ 23- 26)

ตาราง 3 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของบัวชั้นได้

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

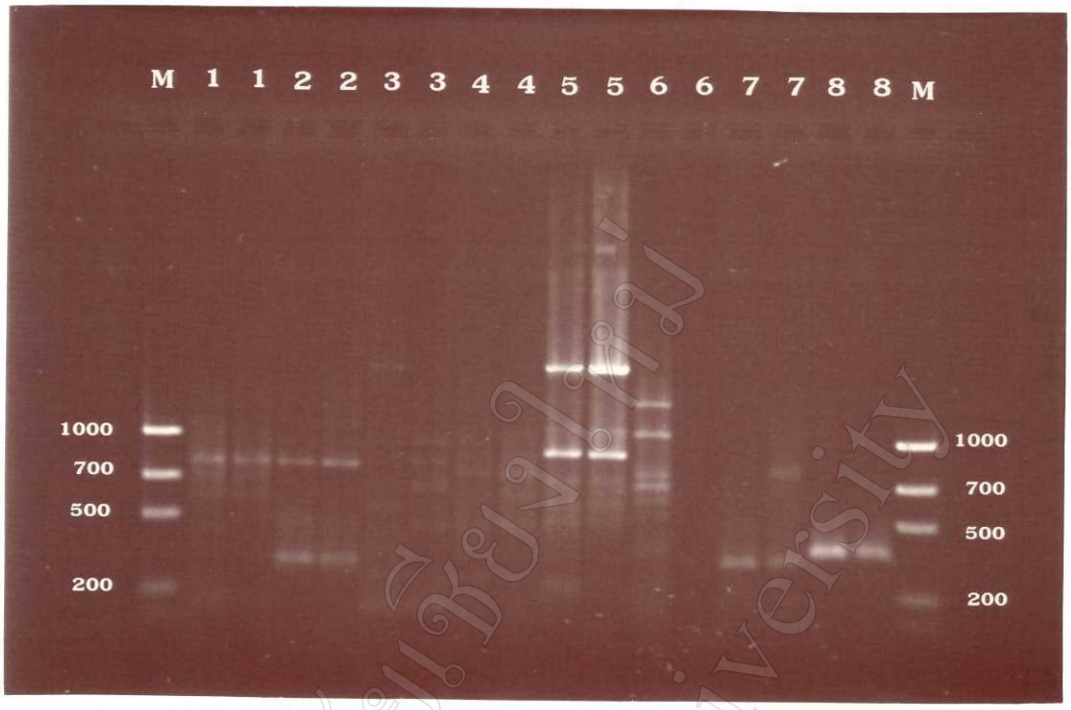
หมายเหตุ X - คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

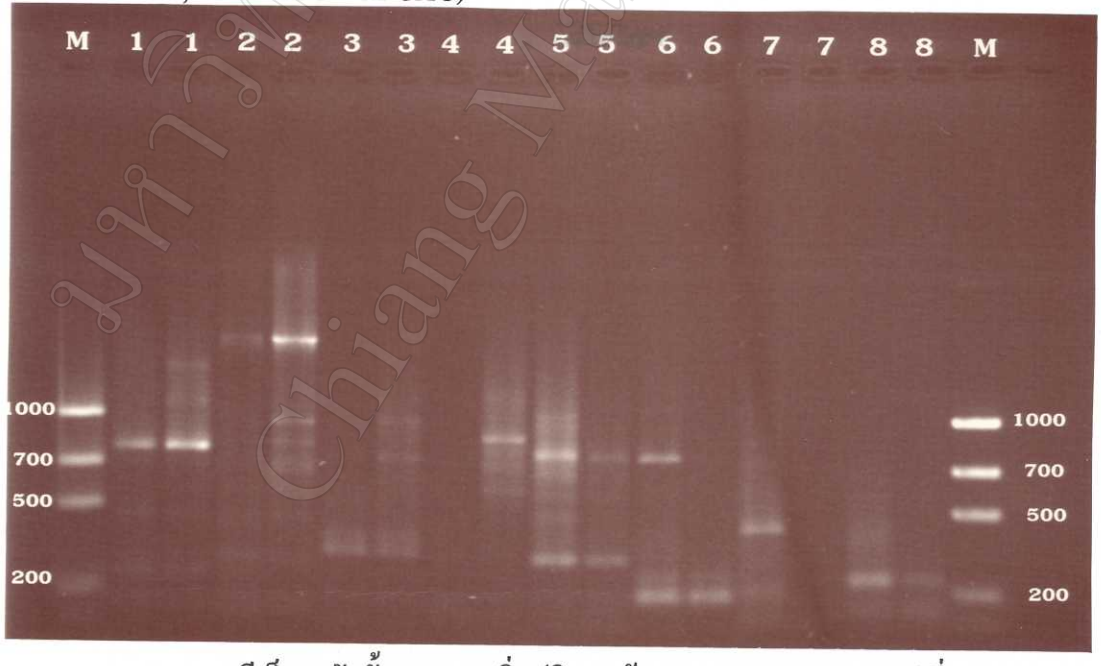
ภาพ 23 แถบดีเอ็นเอบัวชั้นจากการเพิ่มปริมาณด้วย selective primers ชุดที่ 1 (M =Marker; 1 = E-ACG+ M-CAA; 2 = E-ACG + M-CAC; 3 = E-ACG + M-CAG; 4 = E-ACG + M-CAT; 5 = E-ACG + M-CTC; 6 = E-ACG + M-CTG; 7 = E-ACG + M-CTT; 8 = E-AGC + M-CAA)

ภาพ 24 แถบดีเอ็นเอบัวชั้นจากการเพิ่มปริมาณด้วย selective primers ชุดที่ 2 (M = Marker; 1 = E-AGG + M-CAG; 2 = E-AGG + M-CTA; 3 = E-AAC + M-CAC; 4 = E-ACC + M-CTC; 5 = E-AAC + M-CAT; 6 = E-AGG + M-CTG; 7 = E-AAC + M-CAG; 8 = E-AGG + M-CTT)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



ภาพ 25 แถบดีเอ็นเอบัวชั้นจากการเพิ่มปริมาณด้วย selective primers ชุดที่ 3 (M = Marker; 1 = E-ACT + M-CAA; 2 = E-ACT + M-CAC; 3 = E-ACT + M-CAG; 4 = E-ACT + M-CAT; 5 = E-ACT + M-CTA; 6 = E-ACT + M-CTG; 7 = E-AGG + M-CAA; 8 = E-AGG + M-CAG)



ภาพ 26 แถบดีเอ็นเอบัวชั้นจากการเพิ่มปริมาณด้วย selective primers ชุดที่ 4 (M = Marker; 1 = E-AGC + M-CAC; 2 = E-AGC + M-CAG; 3 = E-AGC + M-CTC; 4 = E-AGC + M-CTT; 5 = E-AGG + M-CAA; 6 = E-AGG + M-CTG; 7 = E-AGG + M-CAT; 8 = E-AGG + M-CTC)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

โดยมีไพรเมอร์ที่สร้างแถบดีเอ็นเอมาก และ ชัดเจน (ประเมิณด้วยสายตา) 13 คู่ และ สร้างแถบดีเอ็นเอได้น้อย 16 คู่ (ตาราง 4)

ตาราง 4 กลุ่มไพรเมอร์ทั้ง 4 ชุดที่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอบัวชั้น

แถบดีเอ็นเอจาก PCR	ไพรเมอร์
จำนวนมาก	E-ACG + M-CAA, E-ACG + M-CAC, E-ACG + M-CAT, E-ACG + M-CTG, E- ACG + M- CTT, E-AGC + M-CAA, E-AAC + M-CAC, E-ACC + M-CTC, E-AAC + M-CAT, E-ACT + M-CTA, E-ACT + M-CTG, E-AGC + M-CAG, E-AGC + M-CTT
จำนวนน้อย	E-ACG + M-CAG, E-ACG + M-CTC, E-AGG + M-CAG, E-AGG + M-CTA, E- AGG + M- CTG, E-AAC + M-CAG, E-AGG + M-CTT, E-ACT + M-CAA, E-ACT + M-CAC, E-ACT + M-CAG, E-ACT + M-CAT, E-AGG + M-CAA, E-AGC + M-CAC, E-AGC + M-CTC, E-AGG + M-CAT, E-AGG + M-CTC

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

การทดลองที่ 5 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัวชั้น

จากบัวชั้นจำนวน 105 ต้น ได้คัดเลือกต้นที่นำมาศึกษาโดยจัดชุดตัวอย่างตามลักษณะสีของกลีบใบประดับ สีก้านช่อดอก และ ลักษณะสีของกลีบใบประดับส่วนบน

บัวชั้นที่เลือกจากลักษณะสีกลีบใบประดับ (ตาราง 2) แบ่งเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 ประกอบด้วย กลุ่มกลีบประดับสีเข้ม 5 ต้น ได้แก่ ต้น F1, F2, F6, F14 และ G2 กลุ่มกลีบประดับสีอ่อน 5 ต้น ได้แก่ ต้น D3, E2, F4, F7 และ G13 ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ E-ACC และ M-CTC (ภาพ 27) พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของบัวชั้น ได้ 318 แถบ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น monomorphic ทั้งหมด 230 แถบ และ ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น polymorphic ทั้งหมด 88 แถบ โดยมีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 400-2600 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยพิจารณาจากการปรากฏ และ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง (ภาคผนวก ตาราง 5) สามารถจำแนกบัวชั้นออกเป็น 7 กลุ่ม (ภาพ 30) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น G13 และ G2
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น F6
กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น F4 และ F7
กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น F2
กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น D3 และ F1
กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น F4
กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น F14

ชุดที่ 2 ประกอบด้วย กลุ่มกลีบประดับสีเข้ม 5 ต้น ได้แก่ ต้น A14, B9, C8, E4 และ E9 กลุ่มกลีบประดับสีอ่อน 5 ต้น ได้แก่ ต้น A6, A15, C9, C11 และ D1 ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ E-AAC และ M-CAC (ภาพ 27) พบว่า สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของบัวชั้นได้ทั้งหมด 280 แถบ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น monomorphic ทั้งหมด 140 แถบ และ ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น polymorphic ทั้งหมด 140 แถบ โดยมีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 500-6200 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยพิจารณาจากการปรากฏ และ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง (ภาคผนวก ตาราง 6) สามารถจำแนกบัวชั้นออกเป็น 7 กลุ่ม (ภาพ 31) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A14, E4 และ C11
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น C8
กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น B9
กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A15 และ C9

กลุ่มที่ 5 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A6
กลุ่มที่ 6 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น E9
กลุ่มที่ 7 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น D1

บัวชั้นที่เลือกจากลักษณะสีก้านช่อดอก (ตาราง 2) แบ่งเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 คือ กลุ่มสีขาว ได้แก่ ต้น A13, A14, B5, C2 และ C5 กลุ่มสีเขียวได้แก่ ต้น F1, F14, G4, G9 และ G10 ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ E-AAC และ M-CAT สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของบัวชั้น ได้ 20 แถบ และให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น monomorphic ทั้งหมด โดยมีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 650-1100 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยพิจารณาจากการปรากฏ และ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง (ภาคผนวก ตาราง 7) ไม่สามารถจำแนกบัวชั้นออกเป็นกลุ่ม (ภาพ 32)

เมื่อนำบัวชั้นกลุ่มเดียวกันมาทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ E-ACG และ M-CAT พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของบัวชั้น ได้ 44 แถบ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น monomorphic ทั้งหมด 20 แถบ และ ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น polymorphic ทั้งหมด 24 แถบ โดยมีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 1000-1500 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยพิจารณาจากการปรากฏ และ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง (ภาคผนวก ตาราง 8) สามารถจำแนกบัวชั้น ออกเป็น 3 กลุ่ม (ภาพ 33) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A14, C2, F1, C5, G10 และ F14
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น G9, B5 และ G4
กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A13

ชุดที่ 2 ประกอบด้วยกลุ่มสีขาว ได้แก่ ต้น A7, A8, A12, B8 และ B14 กลุ่มสีเขียว ได้แก่ ต้น C14, E9, E12, F2, และ F6 ทำปฏิกิริยากับ ไพรเมอร์คู่ E-AGC และ M-CAG (ภาพ 28) พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของบัวชั้นได้ 165 แถบ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น monomorphic ทั้งหมด 80 แถบ และ ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น polymorphic ทั้งหมด 85 แถบ โดยมีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 500-2200 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยพิจารณาจากการปรากฏ และ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง (ภาคผนวก ตาราง 9) สามารถจำแนกบัวชั้นออกเป็น 4 กลุ่ม (ภาพ 34) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น B14, F6 และ A7
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น C14 และ F2
กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A8, E9 และ B8

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น E12 และ A12

บัวชั้นที่เลือกจากลักษณะกลีบใบประดับส่วนบน (ตาราง 2) แบ่งเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 ประกอบด้วย กลุ่มกลีบปลายแหลม ได้แก่ ต้น A8, B9, C8, F7 และ F14 กลุ่มกลีบปลายกว้าง ได้แก่ ต้น D3, E4, F4, G4 และ G10 ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ E-ACG และ M-CAT พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของบัวชั้น ได้ 114 แถบ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น monomorphic ทั้งหมด 90 แถบ และ ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น polymorphic ทั้งหมด 24 แถบ โดยมีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 500-1500 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยพิจารณาจากการปรากฏและ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง (ภาคผนวก ตาราง 10) สามารถจำแนกบัวชั้นออกเป็น 3 กลุ่ม (ภาพ 35) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น B9, F7, D3, F14, G10 และ E4

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น G4, C8 และ F4

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A8

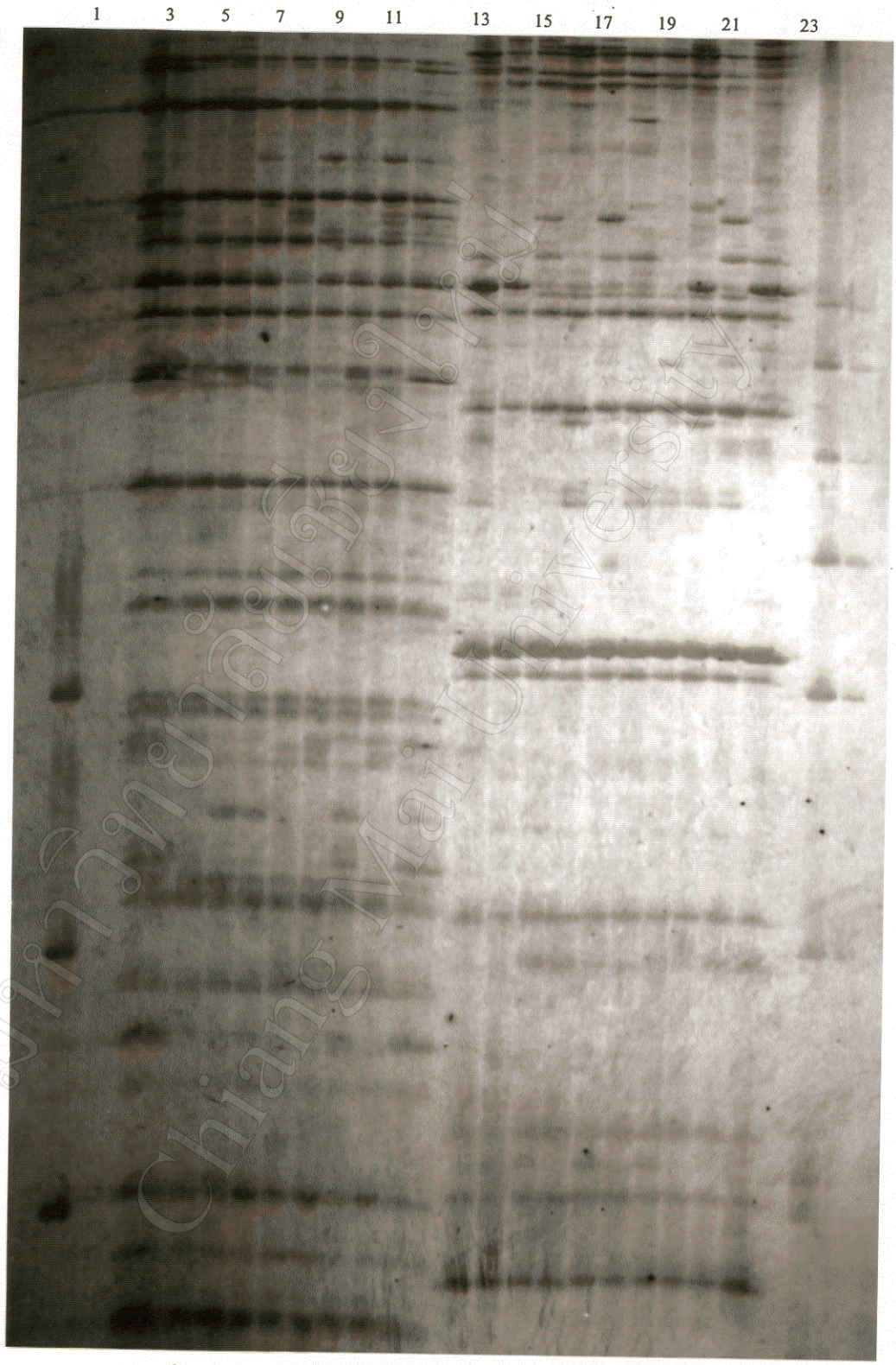
ชุดที่ 2 ประกอบด้วย กลุ่มกลีบปลายแหลม ได้แก่ ต้น A7, B8, F1, F2 และ F6 กลุ่มกลีบปลายกว้าง ได้แก่ ต้น A15, C2, C5, C14 และ G2 ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ E-AGC และ M-CAG (ภาพ 29) พบว่าสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของบัวชั้นได้ 185 แถบ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น monomorphic ทั้งหมด 100 แถบ และ ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็น polymorphic ทั้งหมด 85 แถบ โดยมีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 500-2200 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยพิจารณาจากการปรากฏ และ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง (ภาคผนวก ตาราง 11) สามารถจำแนกบัวชั้นออกเป็น 4 กลุ่ม (ภาพ 36) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น F6, G2 และ A7

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น A15 และ C14

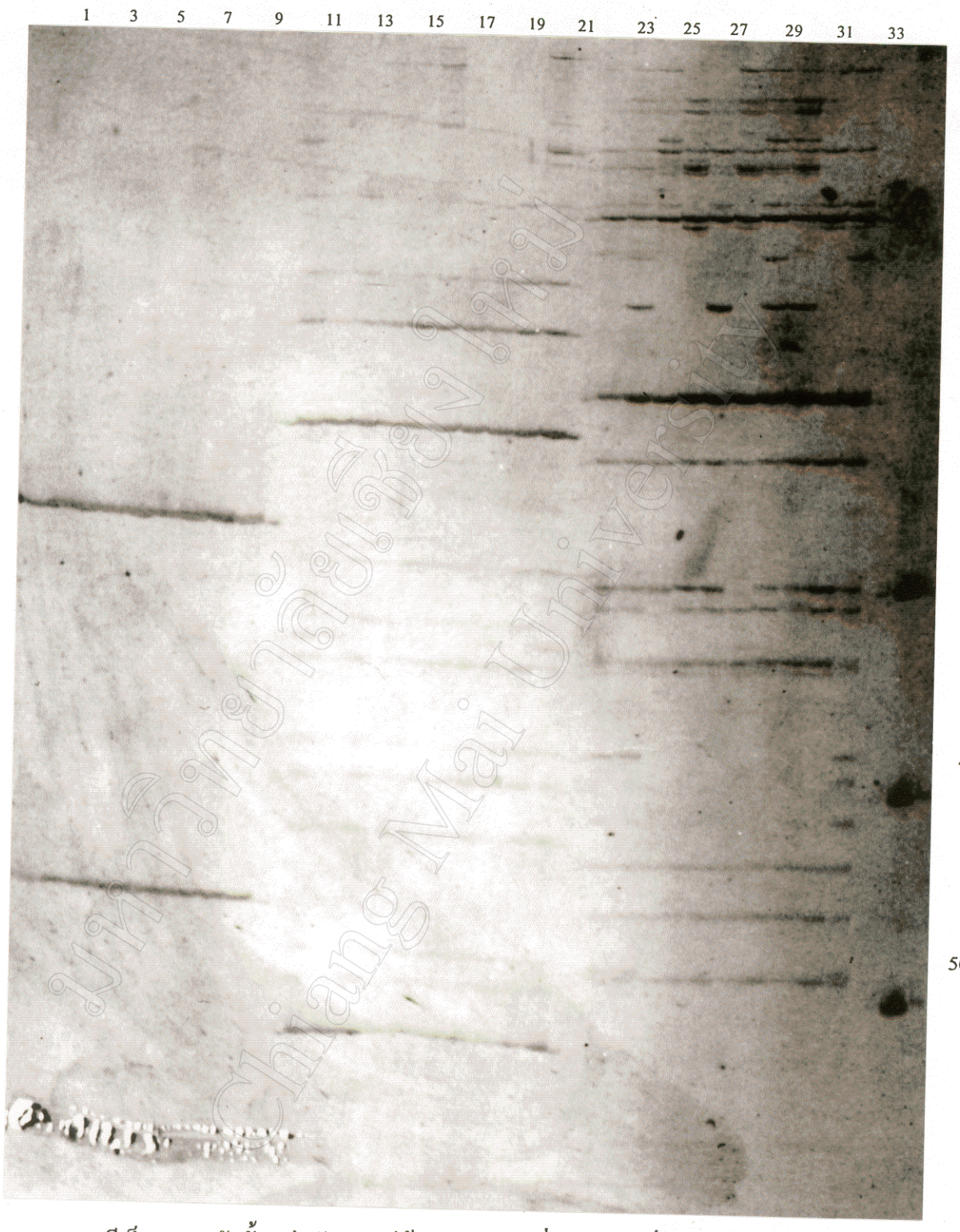
กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น B8, C2 และ F2

กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วย บัวชั้น ต้น C5 และ F1



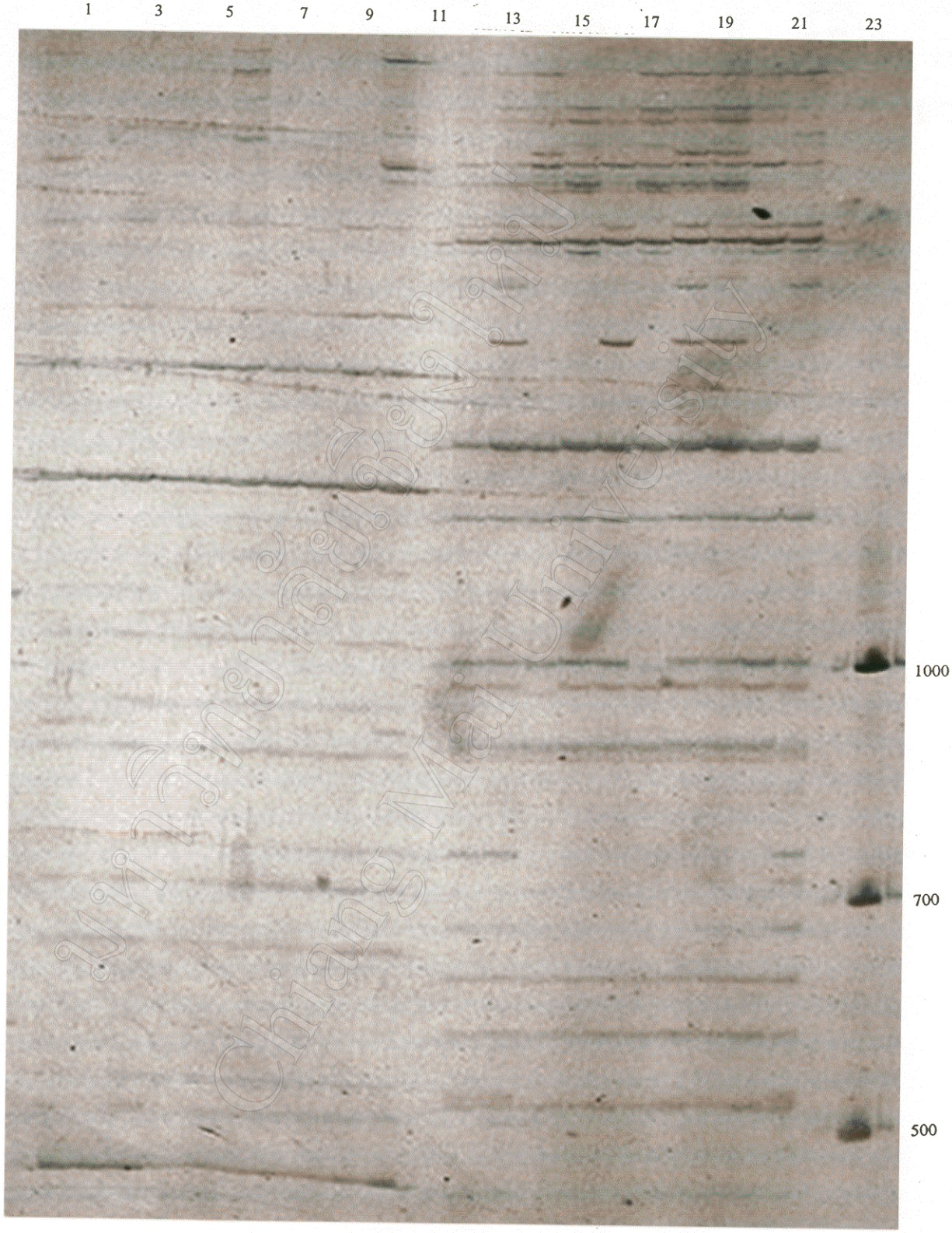
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพ 27 แถบดีเอ็นเอของบัวชั้นกลุ่มลักษณะสีกลีบใบประดับชุดที่ 1 และ ชุดที่2 ไพรเมอร์ E-ACC + M-CTC (ช่องที่ 1-12 =M, D3, F1, E2, F2, F6, F14, F4, F7, G13 และ G2 ตามลำดับ) และ ไพรเมอร์ E-AAC + M-CAC (ช่องที่ 13-24 = A6, A14, A15, B9, C8, E4, C9, C11, D1, E9 และ M ตามลำดับ)



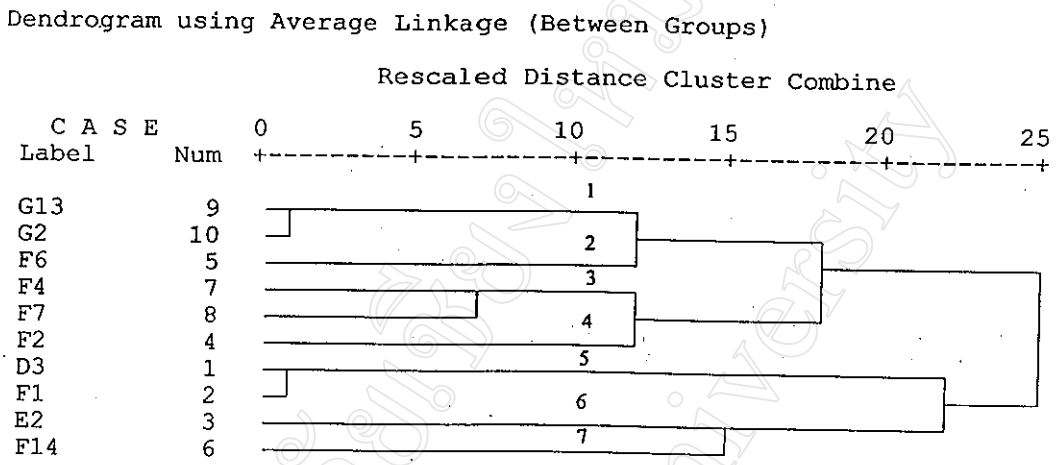
ภาพ 28 แถบดีเอ็นเอของบัวชั้นกลุ่มลักษณะสีก้านช่อดอกชุดที่ 1 และ ชุดที่ 2 ไพรเมอร์ E-AAC + M-CAT (ช่องที่ 1-10 =A13, F1, A14, F14, G4, G9, B5, C2, C5 และ G10 ตามลำดับ) ไพรเมอร์ E-ACG + M-CAT (ช่องที่ 12-21 = A13, F1, A14, F14, G4, G9, B5, C2, C5 และ G10 ตามลำดับ) และไพรเมอร์ E-AGC+ M-CAG (ช่องที่ 23-34 = A7, C14, A8, E9, E12, F2, A12,B8, B14,F6 และ M ตามลำดับ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

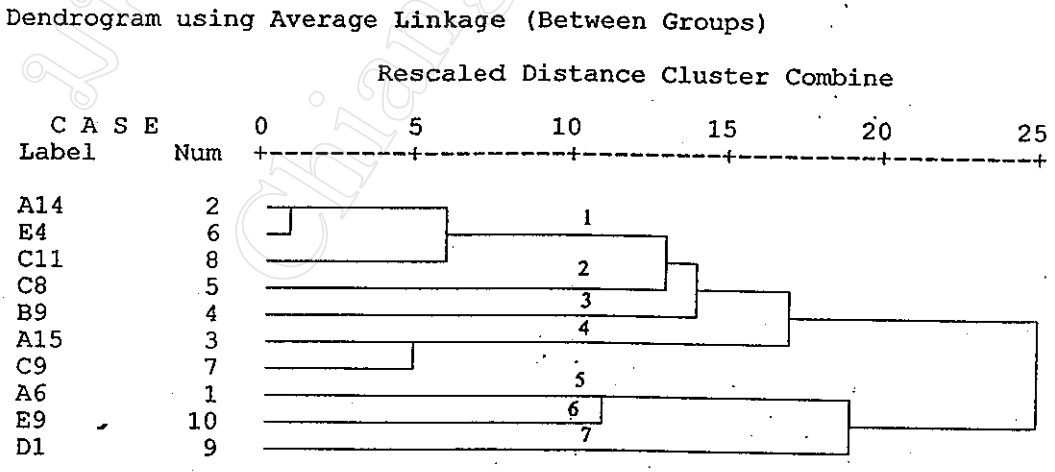


ภาพ 29 แถบดีเอ็นเอของบัวชั้นลักษณะสีกลีบใบประดับส่วนบนชุดที่ 1 และชุดที่ 2 ไพรเมอร์ E-ACG + M-CAT (ช่องที่ 1-10 = A8, D3, B9, E4, F4, G4, C8, F7, F14 และ G10 ตามลำดับ) และ ไพรเมอร์ E-AGC+ M-CAG (ช่องที่ 12-23 = A7, A15, B8, C2, C5, C14, F1, F2, F6, G2 และ M ตามลำดับ)

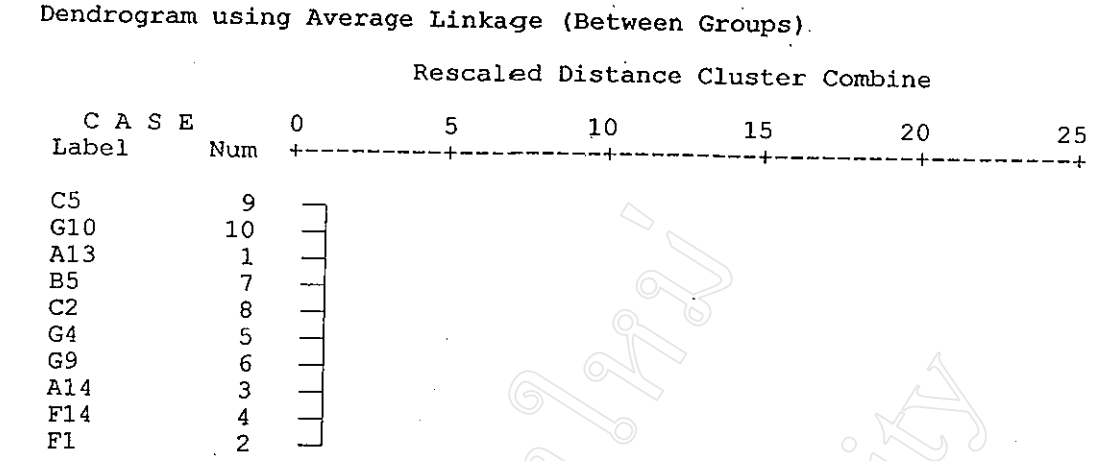
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



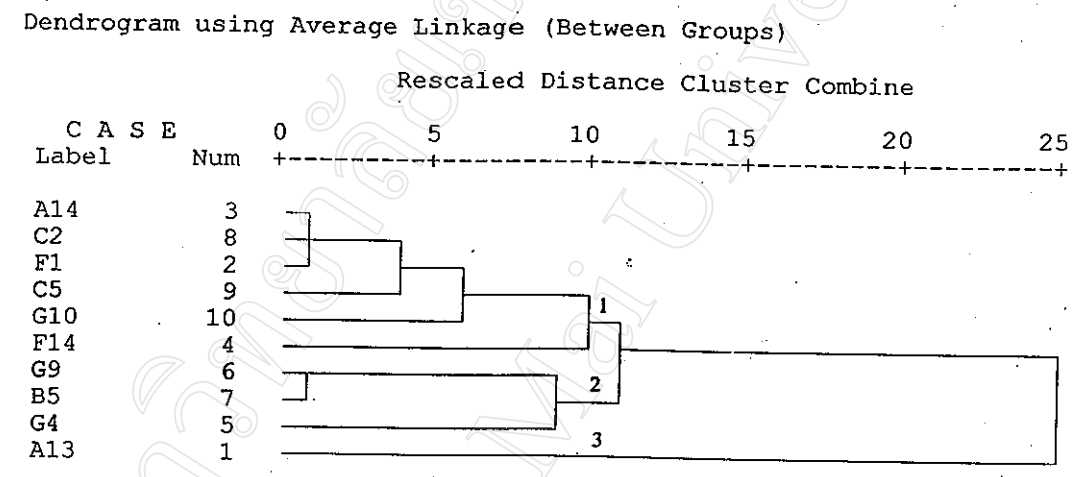
ภาพ 30 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างบัวชั้นกลุ่มลักษณะสีกลีบใบประดับสีเข้ม และ สีอ่อนด้วยไพรเมอร์ E-ACC และ M-CTC



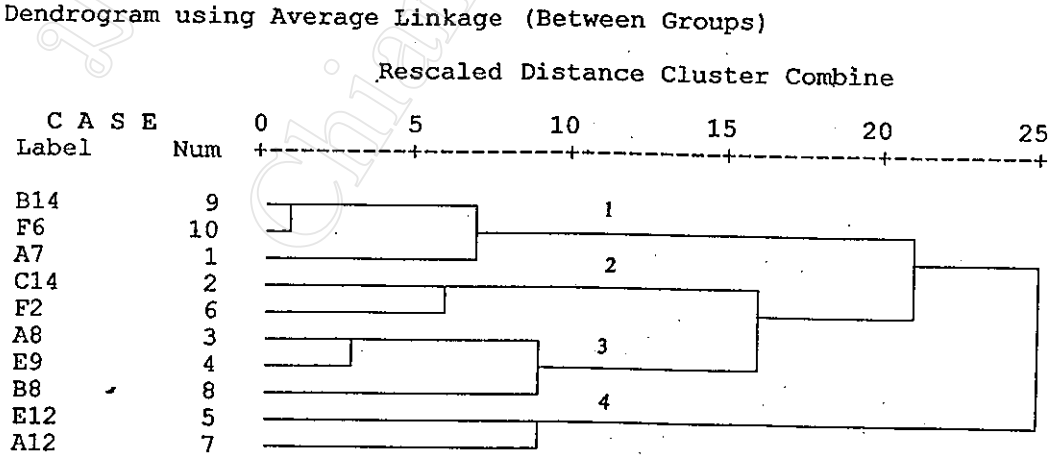
ภาพ 31 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างบัวชั้นกลุ่มลักษณะสีกลีบใบประดับสีเข้ม และ สีอ่อนด้วยไพรเมอร์ E-AAC และ M-CAC



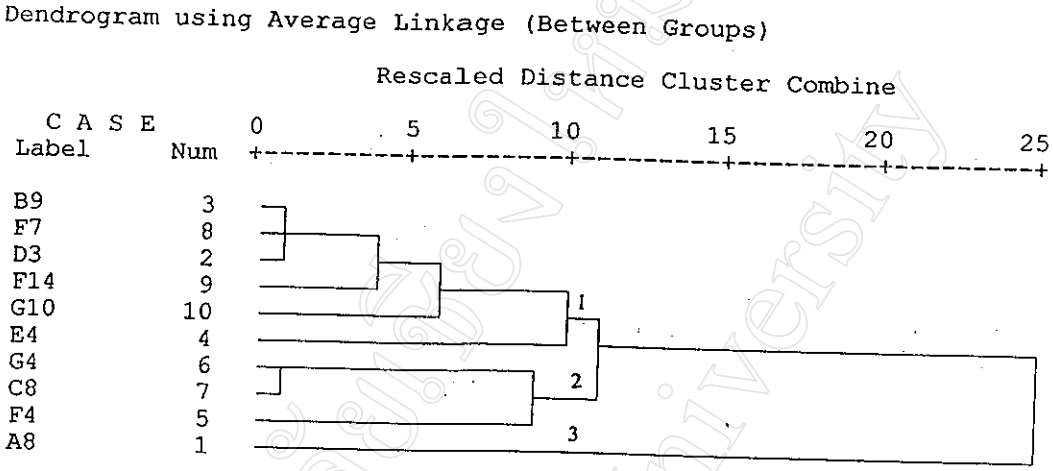
ภาพ 32 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างบัวชั้นกลุ่มลักษณะสีก้านช่อดอก สีขาว และ สีเขียวด้วยไพรเมอร์ E-AAC และ M-CAT



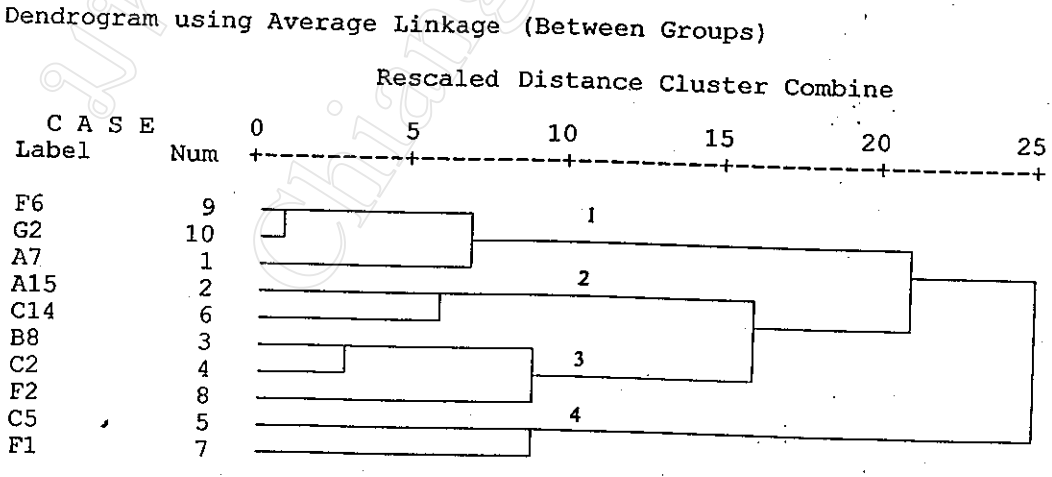
ภาพ 33 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างบัวชั้นกลุ่มลักษณะสีก้านช่อดอก สีขาว และ สีเขียวด้วยไพรเมอร์ E-ACG และ M-CAT



ภาพ 34 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างบัวชั้นกลุ่มลักษณะสีก้านช่อดอก สีขาว และ สีเขียวด้วยไพรเมอร์ E-AGC และ M-CAG



ภาพ 35 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างบัวชั้นกลุ่มลักษณะกลีบใบประดับส่วนบนกลีบปลายแหลม และ กลีบปลายกว้าง ด้วยไพรเมอร์ E-ACG และ M-CAT



ภาพ 36 Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างบัวชั้นกลุ่มลักษณะกลีบใบประดับส่วนบนกลีบปลายแหลม และ กลีบปลายกว้าง ด้วยไพรเมอร์ E-AGC และ M-CAG