บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสกัด RNA

บัวชั้นที่นำมาสกัด RNA โดยใช้ Trizol™ Reagent (Invitrogen, USA) มี 2 กลุ่ม ที่มีลักษณะต่างกันคือ ในกลุ่มที่ 1 ใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก (ภาพที่ 3ก) ส่วนกลุ่มที่ 2 ใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก (ภาพที่ 3ข) และระยะของบัวชั้นที่นำมาสกัด RNA แบ่งเป็น 4 ระยะคือ ระยะใบอ่อน ระยะช่อดอกตูม ระยะช่อดอกบาน และระยะดอกจริงดอกแรกบาน โดยในช่อดอกจะแยกส่วนที่ใช้สกัดเป็น 2 ส่วนคือ ใบประดับส่วนล่าง (lower bract) และใบประดับส่วนบน (upper bract) (ภาพที่ 3ค) RNA ที่สกัดได้มีลักษณะเป็นก้อนสีขาวขุ่น ละลายน้ำได้ง่าย เมื่อตรวจสอบคุณภาพบน agarose gel (1.2%) ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต พบว่าลักษณะแถบของ RNA เกิดขึ้นมีความคมชัดทั้ง 2 แถบ ซึ่งเป็น rRNA ขนาด 28s และ 18s (ภาพที่ 4) อย่างไรก็ตามแถบ RNA ที่ได้ในแต่ละตัวอย่างมีความสว่างไม่เท่ากัน แสดงถึงความเข้มข้นที่ต่างกัน ในการสกัด RNA ใช้ตัวอย่างพืชประมาณ 0.2 กรัม ตะกอน RNA ละลายในน้ำปริมาณ 20 µl เมื่อตรวจสอบปริมาณด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm พบว่ามีความเข้มข้น 100-400 ng/µl

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

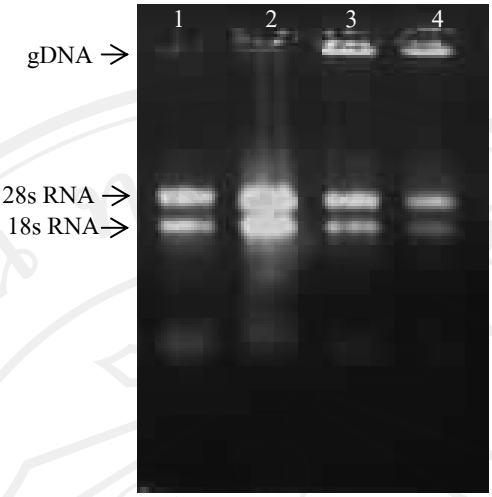
ภาพที่ 3 ระยะการเจริญเติบโตของบัวชั้นที่ใช้สกัด RNA

(ก) กลุ่มบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก

(ข) กลุ่มบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก

(ค) ส่วนของช่อดอกที่ใช้ในการสกัด RNA

(1: ระยะใบอ่อน; 2: ระยะช่อดอกตูม; 3: ระยะช่อดอกบาน; 4: ระยะดอกจริงดอกแรกบาน)

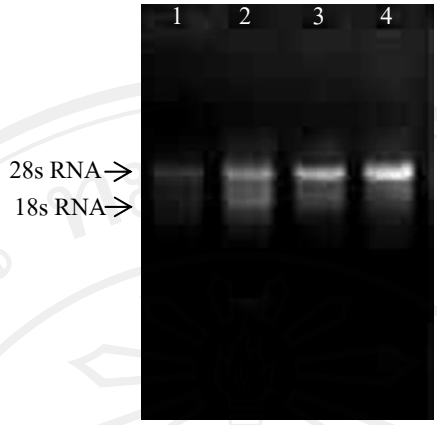


ภาพที่ 4 แถบ RNA ที่สกัดจากระยะต่างๆ ของบัวชั้นบน 1.2% agarose gel
(M: marker 50 bp; 1: ระยะใบอ่อน; 2: ระยะช่อดอกตูม; 3: ระยะช่อดอกบาน;
4: ระยะดอกจริงดอกแรกบาน)

4.2 การทำ DNase digestion

ผลการสกัด RNA ในเบื้องต้นพบว่ามีการปนเปื้อนของ genomic DNA คือ พบแถบที่มีขนาดใหญ่ ปรากฏอยู่เหนือแถบของ RNA (ภาพที่ 4) จึงต้องกำจัดการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นเพื่อไม่ให้กระทบต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR การกำจัด genomic DNA ทำได้โดยใช้เอนไซม์ *DNaseI* เมื่อนำ RNA มาตรวจสอบคุณภาพอีกครั้งหนึ่งบน agarose gel (1.2%) ภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต พบว่า RNA ไม่มีการปนเปื้อน เนื่องจากไม่พบแถบของ genomic DNA ปรากฏบน agarose gel (ภาพที่ 5)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

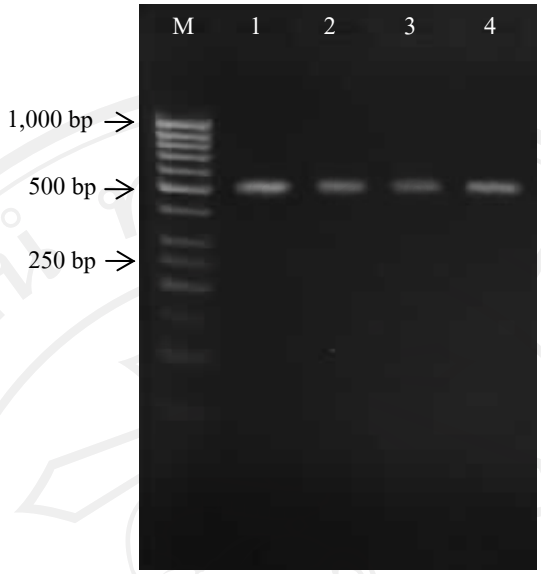


ภาพที่ 5 แถบ RNA ที่กำจัด genomic DNA ปนเปื้อนด้วยเอนไซม์ *DNaseI* บน 1.2% agarose gel (1: ระยะใบอ่อน; 2: ระยะช่อดอกตูม; 3: ระยะช่อดอกบาน; 4: ระยะดอกจริงดอกแรกบาน)

4.3 การสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (cDNA synthesis)

เนื่องจาก mRNA เป็นผลของการถอดรหัส (transcription) ยีนที่แสดงออกต่างกันในแต่ละระยะการเจริญเติบโต และแต่ละส่วนของพืช อย่างไรก็ตาม RNA มีข้อจำกัดด้านความเสถียร จึงเปลี่ยนให้เป็นดีเอ็นเอโดยกระบวนการ reverse transcription ใช้ชุดน้ำยา SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) ในการตรวจสอบผล reverse transcription อาศัยการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยปฏิกิริยา PCR ไพรเมอร์ที่ใช้คือ ndhB up และ ndhB down นำผลผลิต PCR ไปแยกขนาดบน agarose gel (1.2%) พบว่า แถบของ cDNA มีขนาดประมาณ 500 bp (ภาพที่ 6) เพียงแถบเดียวตรงตามขนาดที่คาดหวัง ชี้ให้เห็นถึงคุณภาพที่ดีของ RNA และการกำจัดการปนเปื้อนของ gDNA ที่มีประสิทธิภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



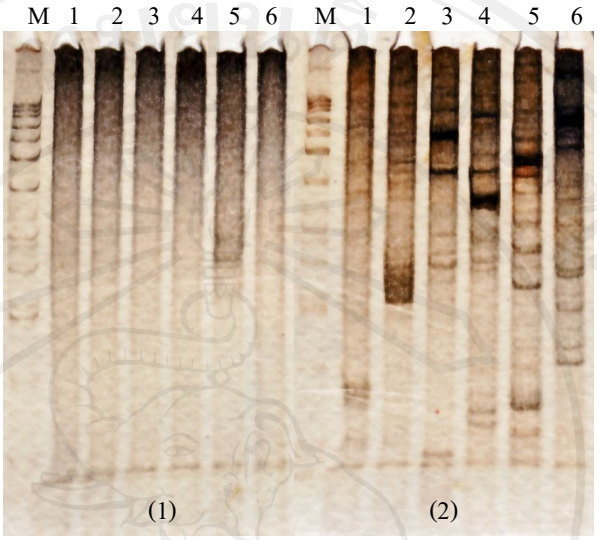
ภาพที่ 6 ผลการตรวจสอบคุณภาพของ cDNA บน agarose gel (1.2%) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ndhB (M: marker 50 bp; 1: ระยะใบอ่อน; 2: ระยะช่อดอกตูม; 3: ระยะช่อดอกบาน; 4: ระยะดอกจริงดอกแรกบาน)

4.4 การคัดกรองคู่ไพรเมอร์

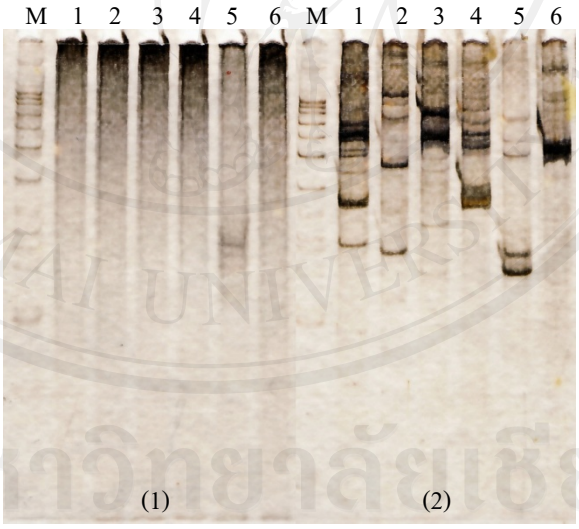
การคัดกรองคู่ไพรเมอร์เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในบัวชั้น พิจารณาจากความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้เทคนิค PCR ให้ได้ผลผลิตที่มีจำนวนแถบหลากหลาย แถบที่ได้มีความคมชัด รวมทั้งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ครอบคลุมในทุกตัวอย่าง และจากการใช้ forward primer ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 58 ไพรเมอร์ ร่วมกับ reverse primer ทั้งหมด 4 ชนิด คือ oligoVA oligoVT oligoVG และ oligoVC เมื่อตรวจสอบผลของ PCR ที่ได้ใน polyacrylamide gel (6%) พบว่ามีจำนวน 52 ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ คือไพรเมอร์ OPD01 OPD02 OPD04 OPD05 OPD06 OPD09-OPD19 OPF01-OPF09 OPF11-OPF20 OPAB12-OPAB19 และ AP-A01-AP-A10 ส่วนไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ ผลการตรวจสอบพบว่าแถบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นรอยยาวต่อเนื่อง ไม่ปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่ชัดเจน จึงนำผลผลิตของ PCR ที่ได้ในครั้งแรกมาเจือจางด้วยน้ำในอัตราส่วน 1:20 เพื่อใช้เป็น template ในการทำปฏิกิริยา PCR รอบที่ 2 ผลที่ได้พบว่าแถบของดีเอ็นเอปรากฏชัดเจนขึ้น (ภาพที่ 7) เมื่อใช้ forward primer 6 ไพรเมอร์คือ OPD03 OPD07

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

OPD08 OPD20 OPF10 และ OPAB11 ร่วมกับ reverse primer คือ oligoVA และ oligoVG สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตและทุกส่วนของบัวชั้นทั้ง 2 กลุ่ม



(ก)



(ข)

ภาพที่ 7 ตัวอย่างผลการเพิ่มปริมาณ cDNA ของบัวชั้นด้วยปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ OPD03 OPD07 OPD08 OPD20 OPF10 และ OPAB11 ร่วมกับ oligoVA (ก) และ oligoVG (ข) บน polyacrylamide gel (6%)

(1) ผลของการทำ PCR ในรอบที่ 1 (2) ผลของการทำ PCR ในรอบที่ 2

(M: marker 50 bp; 1: OPD03; 2: OPD07; 3: OPD08; 4: OPD20; 5: OPF10; 6: OPAB11)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในบัวชั้นโดยเทคนิค DDRT-PCR

การใช้เทคนิค DDRT-PCR เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ต่างกันระหว่างบัวชั้นทั้ง 2 กลุ่มที่มีสัดส่วนสีของใบประดับต่างกัน คือ บัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก และกลุ่มที่มีสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก เมื่อใช้ forward primer 6 ไพรเมอร์คือ OPD03 OPD07 OPD08 OPD20 OPF10 และ OPAB11 ร่วมกับ oligoVG ไม่พบแถบที่มีการแสดงออกร่วมกันภายในกลุ่มและแตกต่างระหว่างกลุ่มชัดเจนในทุกระยะการเจริญเติบโต

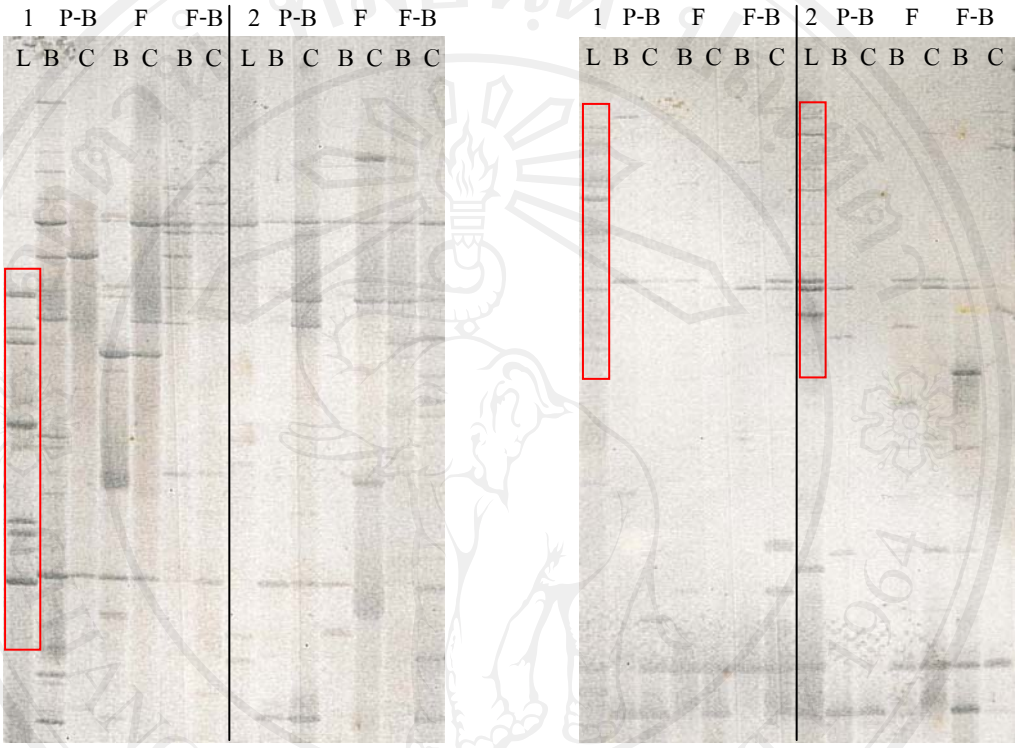
อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ไพรเมอร์ OPD03 พบว่าในระยะใบอ่อน ของบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก มีแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมากกว่าในระยะใบอ่อนของบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก (ภาพที่ 8ก) สำหรับไพรเมอร์ OPD07 สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ในระยะใบอ่อนของบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก ได้ดีกว่าในระยะใบอ่อนของบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก (ภาพที่ 8ข)

ไพรเมอร์ OPD08 พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอย่างเฉพาะเจาะจงในระยะใบอ่อนของบัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก ส่วนในกลุ่มบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน 2 ขนาดในส่วนของ lower bract ที่ทุกระยะการเจริญเติบโต และจากการสังเกตยังพบแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันในส่วนของ lower bract ของบัวชั้นทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก พบแถบดีเอ็นเอในระยะช่อดอกบาน และระยะดอกจริงดอกแรกบาน แตกต่างจากบัวชั้นในกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก พบแถบดีเอ็นเอเฉพาะในระยะดอกจริงดอกแรกบานเท่านั้น (ภาพที่ 9ก) เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPD20 มีแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในระยะใบอ่อนของบัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก มากกว่าแถบดีเอ็นเอของบัวชั้นอีกกลุ่มหนึ่งที่ระยะเดียวกัน (ภาพที่ 9ข)

ไพรเมอร์ OPF10 แถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่มีขนาดเท่ากันในทุกระยะการเจริญเติบโตและทุกส่วนของบัวชั้นทั้ง 2 กลุ่ม (ภาพที่ 10ก) ไพรเมอร์ OPAB11 พบแถบดีเอ็นเอในระยะใบอ่อนมีความหลากหลายในบัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก เมื่อเทียบกับระยะใบอ่อนของบัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก และความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอภายในกลุ่มบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันในส่วนของ lower bract และ upper bract ที่ระยะช่อดอกตูม และระยะช่อดอกบาน แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 ส่วนนี้ ที่ระยะดอกจริงดอกแรกบาน สำหรับในกลุ่มบัวชั้นที่มีใบประดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

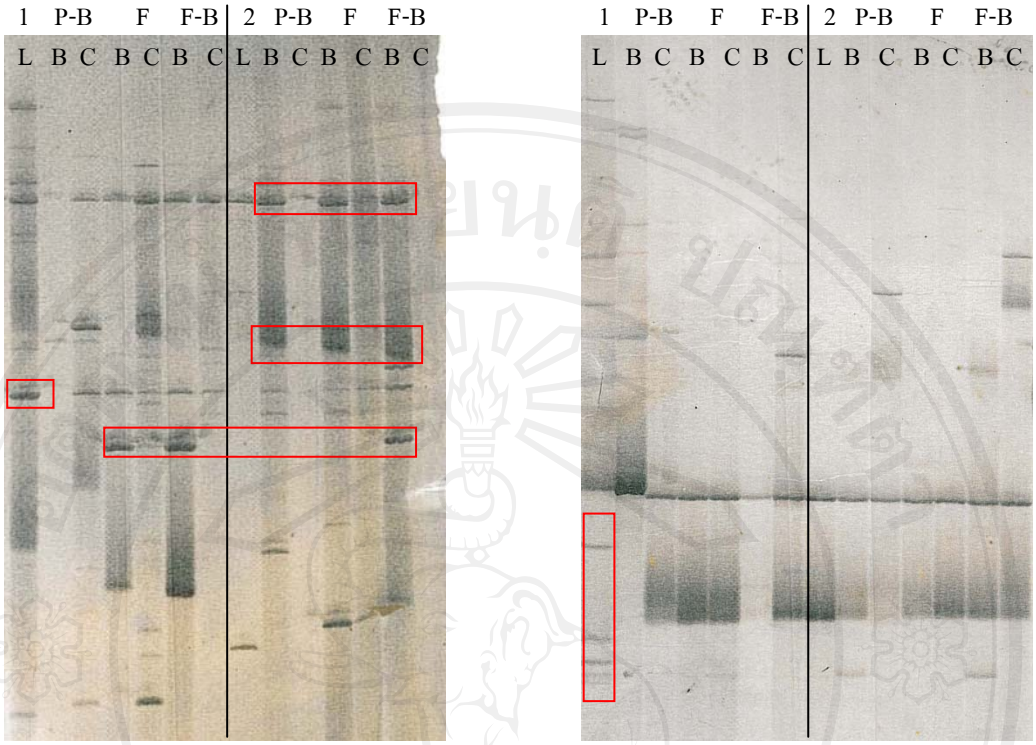
สีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันใน lower bract มีลักษณะเข้มกว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นใน upper bract ที่ระยะช่อดอกบาน และระยะดอกจริงดอกแรกบาน และไม่พบแถบดีเอ็นเอในส่วนของ lower bract ที่ระยะช่อดอกตูม (ภาพที่ 10ข)



ภาพที่ 8 DDRT-PCR โดยใช้ OPD03 (ก) และ OPD07 (ข) ร่วมกับ oligoVG

1: บัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก; 2: บัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก; P-B: บัวชั้นระยะช่อดอกตูม; F: บัวชั้นระยะช่อดอกบาน; F-B: บัวชั้นระยะดอกจริงดอกแรกบาน; L: ใบอ่อน; B: lower bract; C: upper bract

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

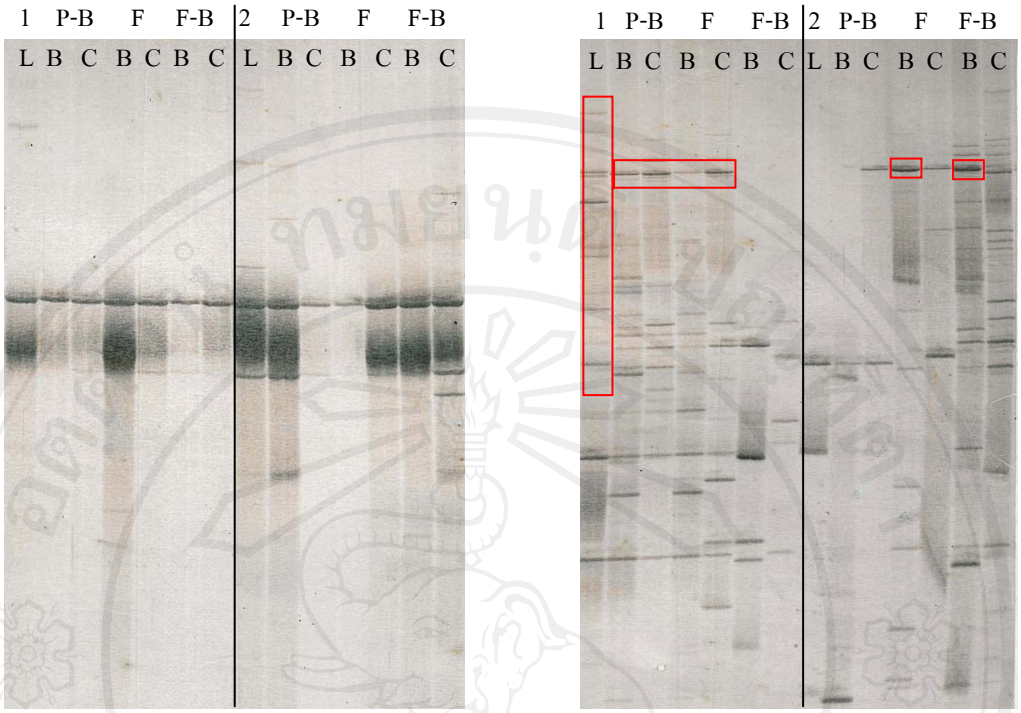


(ก) (ข)

ภาพที่ 9 DDRT-PCR โดยใช้ OPD08 (ก) และ OPD20 (ข) ร่วมกับ oligoVG

1: บัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก; 2: บัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก; P-B: บัวชั้นระยะช่อดอกตูม; F: บัวชั้นระยะช่อดอกบาน; F-B: บัวชั้นระยะดอกจริงดอกแรกบาน; L: ใบอ่อน; B: lower bract; C: upper bract

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



(ก) (ข)

ภาพที่ 10 DDRT-PCR โดยใช้ OPF10 (ก) และ OPAB11 (ข) ร่วมกับ oligoVG

1: บัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก; 2: บัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก; P-B: บัวชั้นระยะช่อดอกตูม; F: บัวชั้นระยะช่อดอกบาน; F-B: บัวชั้นระยะดอกจริงดอกแรกบาน; L: ใบอ่อน; B: lower bract; C: upper bract

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

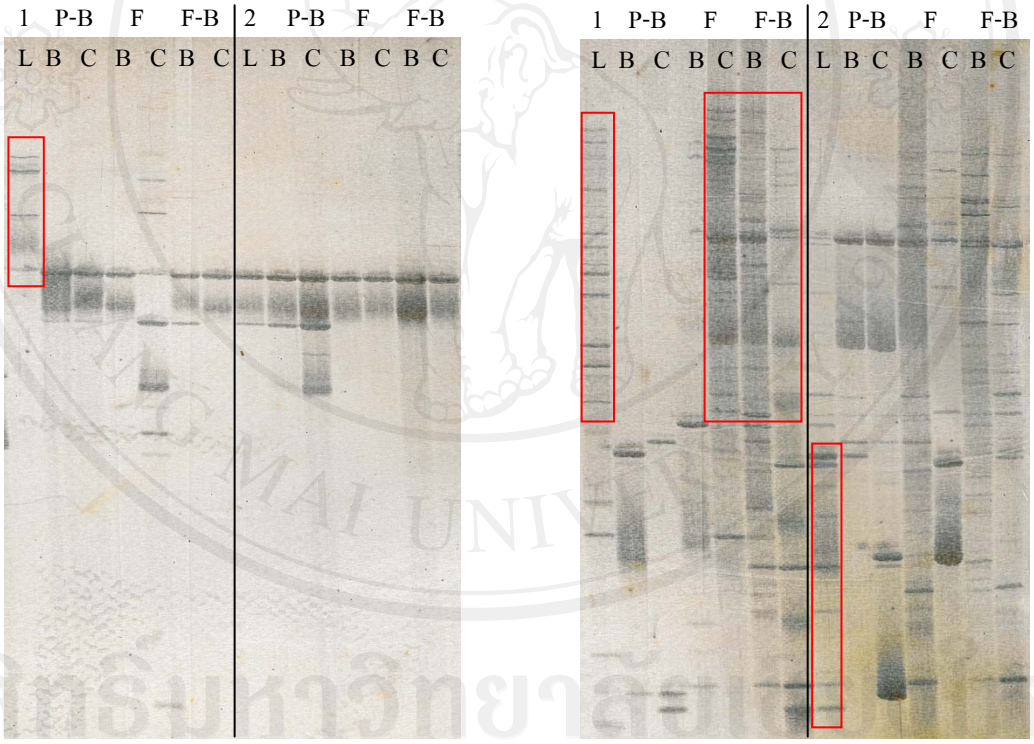
เมื่อใช้ forward primer 6 ไพรเมอร์ ดังกล่าวมาแล้วร่วมกับ oligoVA พบว่า ไพรเมอร์ OPF10 และ OPAB11 ให้แถบของดีเอ็นเอที่มีลักษณะหลากหลายในระยะใบอ่อนของบัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก เมื่อเปรียบเทียบกับระยะใบอ่อนของบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก (ภาพที่ 11ก) ไพรเมอร์ OPAB11 พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่หลายขนาดในระยะใบอ่อนของบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก แต่แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะพบในบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอกในระยะเดียวกัน ในส่วนของ lower bract และ upper bract ที่ระยะช่อดอกบาน และระยะดอกจริงดอกแรกบานของบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาดที่หลากหลายมากกว่าที่เกิดขึ้นในระยะช่อดอกตูม (ภาพที่ 11ข)

ส่วนอีก 4 ไพรเมอร์คือ OPD03 OPD07 OPD08 และ OPD20 ให้ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic DNA) เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPD03 พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีจำนวนมากในส่วนของ lower bract ที่ระยะช่อดอกตูมในบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก เมื่อเปรียบเทียบกับบัวชั้นอีกกลุ่มที่ระยะเดียวกัน และพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 794 bp ซึ่งแสดงออกในบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก ในส่วนของ lower bract และ upper bract ในทุกระยะการเจริญเติบโตยกเว้นในระยะใบอ่อน (ภาพที่ 12ก) ไพรเมอร์ OPD07 พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นที่ระยะใบอ่อนในบัวชั้นทั้ง 2 กลุ่ม มีความแตกต่างกันคือ แถบดีเอ็นเอที่พบในบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก มีขนาดใหญ่กว่าแถบดีเอ็นเอที่พบในบัวชั้นอีกกลุ่มหนึ่ง ในทางตรงกันข้ามกลับพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กในบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก แต่แถบนี้ไม่ปรากฏในบัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก และพบแถบดีเอ็นเอขนาด 883 bp ที่เกิดขึ้นในส่วนของ upper bract ในระยะช่อดอกบานและระยะดอกจริงดอกแรกบาน ในกลุ่มบัวชั้นที่มีสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอกเท่านั้น (ภาพที่ 12ข)

ไพรเมอร์ OPD08 ในกลุ่มบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก พบแถบของดีเอ็นเอในส่วนของ upper bract ที่มีขนาดหลากหลายที่ระยะช่อดอกตูมเพียงระยะเดียว ซึ่งไม่พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในระยะช่อดอกบาน และระยะดอกจริงดอกแรกบาน อีกทั้งยังพบแถบที่แตกต่างกัน 2 ขนาดคือ 835 bp และ 591 bp เฉพาะในบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก โดยแถบขนาด 835 bp แสดงออกเฉพาะใน upper bract ส่วนแถบขนาด 591 bp แสดงออกใน lower bract และ upper bract ทุกระยะการเจริญเติบโต แต่ไม่แสดงออกในระยะใบอ่อน (ภาพที่ 13ก) ส่วนไพรเมอร์ OPD20 ให้แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ในระยะใบอ่อนของบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกันนี้ในบัวชั้นที่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก และยังพบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดในแต่ละส่วน และแต่ละระยะการเจริญเติบโตภายในกลุ่มบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก มีความแตกต่างกันคือ พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจำนวนมากในส่วนของ lower bract ที่ระยะช่อดอกบาน ซึ่งในระยะช่อดอกตูม และระยะดอกจริงดอกแรกบาน แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีจำนวนน้อยกว่า และในส่วนของ upper bract ที่ระยะช่อดอกบาน แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีจำนวนมากกว่าแถบดีเอ็นเอในระยะช่อดอกตูม และระยะดอกจริงดอกแรกบาน เมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นระหว่างส่วนของ upper bract ใน 2 ระยะคือ ระยะช่อดอกบาน และระยะดอกจริงดอกแรกบาน ในบัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก พบแถบขนาด 939 bp แสดงออกเฉพาะใน 2 ระยะนี้เท่านั้น (ภาพที่ 13ข)

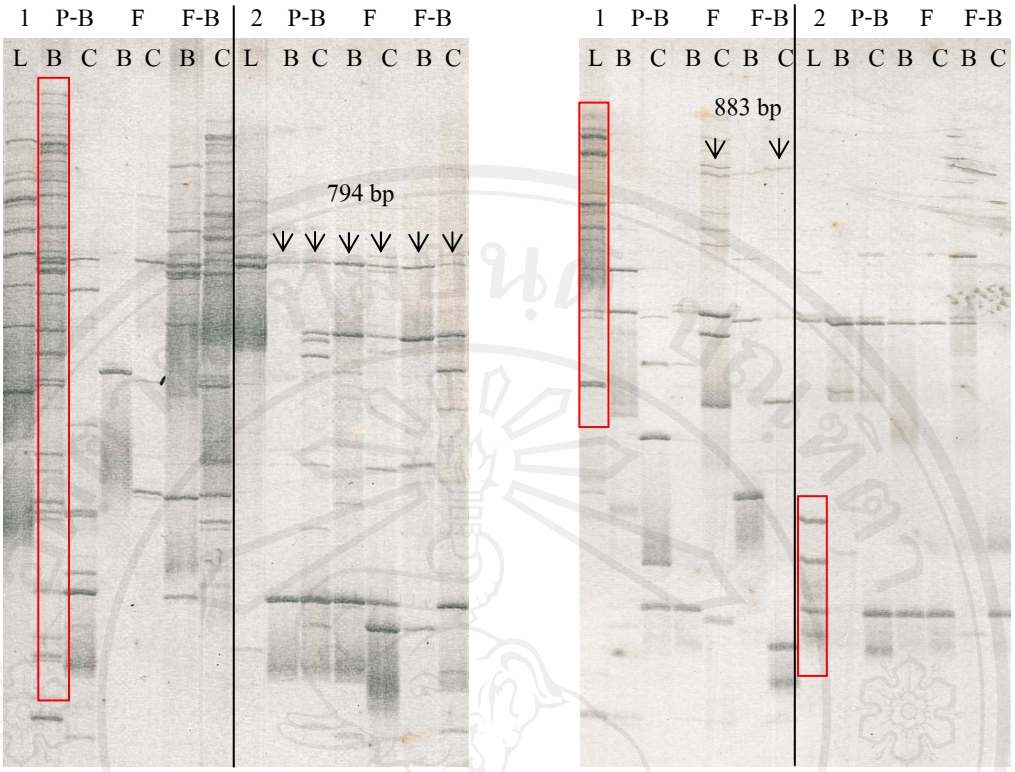


(ก) (ข)

ภาพที่ 11 DDRT-PCR โดยใช้ OPF10 (ก) และ OPAB11 (ข) ร่วมกับ oligoVA

1: บัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก; 2: บัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก; P-B: บัวชั้นระยะช่อดอกตูม; F: บัวชั้นระยะช่อดอกบาน; F-B: บัวชั้นระยะดอกจริงดอกแรกบาน; L: ใบอ่อน; B: lower bract; C: upper bract

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

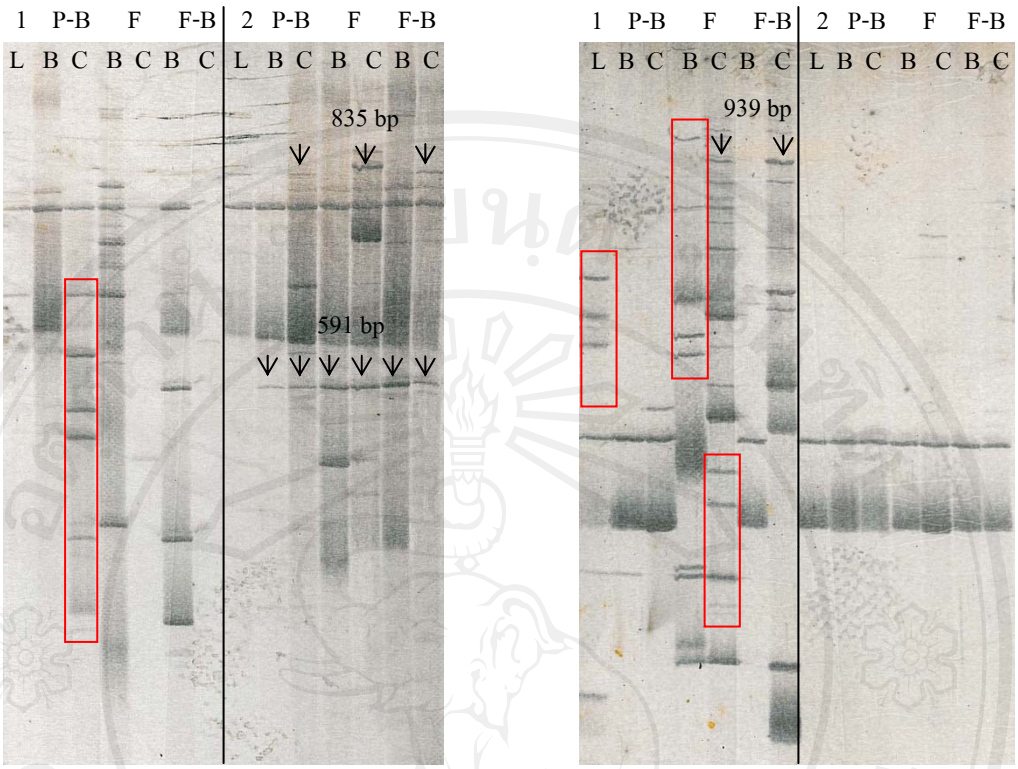


(ก) (ข)

ภาพที่ 12 DDRT-PCR โดยใช้ OPD03 (ก) และ OPD07 (ข) ร่วมกับ oligoVA

1: บัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก; 2: บัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก; P-B: บัวชั้นระยะช่อดอกตูม; F: บัวชั้นระยะช่อดอกบาน; F-B: บัวชั้นระยะดอกจริงดอกแรกบาน; L: ใบอ่อน; B: lower bract; C: upper bract

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



(ก) (ข)

ภาพที่ 13 DDRT-PCR โดยใช้ OPD08 (ก) และ OPD20 (ข) ร่วมกับ oligoVA

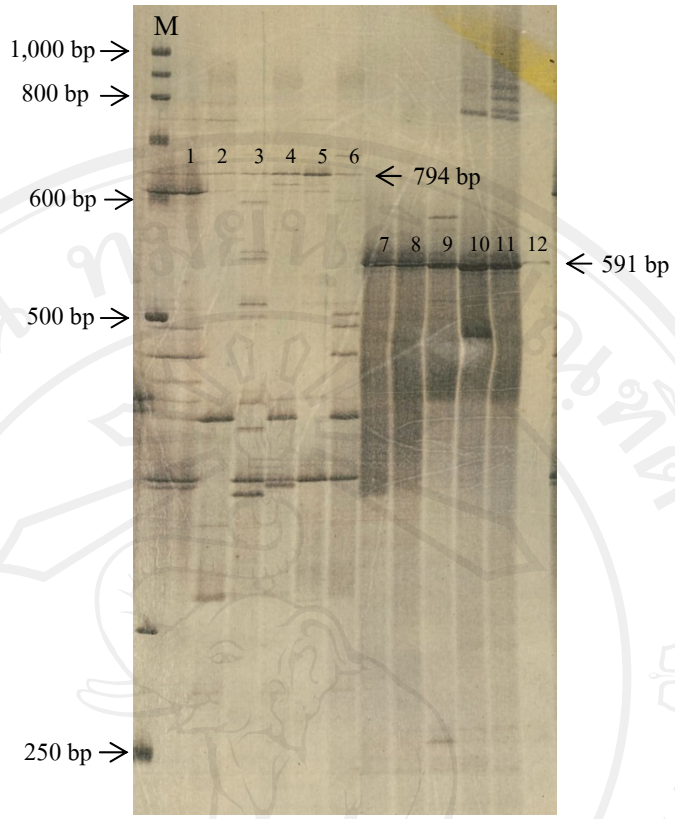
1: บัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูมากกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก; 2: บัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก; P-B: บัวชั้นระยะช่อดอกตูม; F: บัวชั้นระยะช่อดอกบาน; F-B: บัวชั้นระยะดอกจริงดอกแรกบาน; L: ใบอ่อน; B: lower bract; C: upper bract

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.6 การเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR (reamplification of PCR fragment)

จากการทำ DDRT-PCR คัดเลือกแถบที่น่าสนใจที่มีลักษณะแตกต่างระหว่างบัวชั้นทั้ง 2 กลุ่ม เพื่อการวิเคราะห์ลำดับเบสดังนี้ แถบดีเอ็นเอจากการใช้ไพรเมอร์ OPD03 ขนาด 794 bp ในกลุ่มของบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก จากตัวอย่าง lower bract และ upper bract ทั้ง 3 ระยะรวม 6 แถบ และการใช้ไพรเมอร์ OPD08 ขนาด 591 bp ในกลุ่มบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก จำนวน 6 แถบ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละแถบไปเพิ่มปริมาณผลผลิตด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้เงื่อนไขปฏิกิริยาเช่นเดียวกับเทคนิค DDRT-PCR เมื่อตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ได้ใน polyacrylamide gel (6%) พบว่าในการใช้ไพรเมอร์ OPD03 ยังคงพบแถบที่มีขนาด 794 bp แต่ปรากฏแถบอื่นๆ เพิ่มเติมขนาดประมาณ 750-250 bp ส่วนการใช้ OPD08 ยังคงพบแถบที่มีขนาด 591 bp เช่นเดียวกัน แถบที่เกิดขึ้นมีลักษณะเข้มกว่าก่อนการเพิ่มปริมาณผลผลิตด้วยปฏิกิริยา PCR (ภาพที่ 14) ใช้ผลผลิต PCR ที่ได้ทั้ง 12 หลอด เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส (บริษัท1st Base ประเทศมาเลเซีย)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 14 ผลการเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR

(M: marker 50 bp; 1-6 OPD03/VA; 7-12: OPD08/VA; 1, 7: ส่วนของ lower bract ที่ระยะช่อดอกตูม; 2, 8: ส่วนของ upper bract ที่ระยะช่อดอกตูม; 3, 9: ส่วนของ lower bract ที่ระยะช่อดอกบาน; 4, 10: ส่วนของ upper bract ที่ระยะช่อดอกบาน; 5, 11: ส่วนของ lower bract ที่ระยะดอกจริงดอกแรกบาน; 6, 12: ส่วนของ upper bract ที่ระยะดอกจริงดอกแรกบาน)

4.7 การวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอ

ผลการวิเคราะห์แถบขนาด 794 bp จำนวน 6 แถบ พบว่าลำดับเบสที่ได้จากการวิเคราะห์มีขนาดอยู่ระหว่าง 156-720 bp ส่วนผลการวิเคราะห์แถบที่มีขนาด 591 bp จำนวน 6 แถบ พบว่าลำดับเบสที่ได้มีขนาด 374-519 bp เมื่อนำลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์โดย forward primer และ reverse primer มาทำ alignment เพื่อยืนยันความถูกต้องของลำดับเบสที่ได้ด้วยโปรแกรม DNAMAN พบว่าลำดับเบสที่ได้มีลักษณะที่เหมือนกันต่ำมาก ผลการ alignment ของแถบขนาด 408 bp ที่ได้จากเส้น forward primer และแถบขนาด 423 bp ที่ได้จากเส้น reverse primer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีความเหมือนกันมากที่สุด (identity) ที่ค่าความเหมือนเท่ากับ 44% โดยเป็นแถบที่ได้มาจากส่วน upper bract ของบัวชั้นที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก เมื่อนำผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบที่ได้จากกลุ่มไพรเมอร์ OPD03 และกลุ่มไพรเมอร์ OPD08 มาวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับเบสภายในกลุ่ม ด้วยโปรแกรม clustalw.aln โดยแยกวิเคราะห์ออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนของ lower bract และ upper bract พบว่ามีลำดับเบสบางส่วนเหมือนกัน (ภาคผนวก) จากนั้นจึงนำผลลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่มีค่าความเหมือนกันมากที่สุด โดยใช้ลำดับเบสที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย forward primer ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสบนฐานข้อมูลใน NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Homo sapiens* chromosome 3 (ตารางที่ 2) มากที่สุด

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับพันธุกรรมของแถบ cDNA แถบที่ 10 ขนาด 408 bp ของบัวชั้นกลุ่มที่มีใบประดับสีชมพูน้อยกว่า 1 ใน 3 ของช่อดอก ในส่วนของ upper bract ที่ระยะช่อดอกบาน

Accession	Length (bp)	ยีนที่มีความคล้ายคลึง	% identity	E-value
AC132808.2	195741	*Homo sapiens* chromosome 3 clone RP11-794P9, complete sequence	93%	3e-90
AC093418.2	206320	*Homo sapiens* chromosome 3 clone RP11-1035L22, complete sequence	92%	2e-88

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved