

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นรวงผึ้ง (*Schoutenia glomerata* King subsp. *peregrina* (Craib) Roem.) ที่พบในเขตจังหวัดเชียงใหม่ด้วยเทคนิค HAT-RAPD[†]

ปริญญานุช ปินนิล^{1,*}, นิรัชชา สุริยา¹, ทิพย์สุดา ตั้งตระกูล¹, เยาวนิตย์ ธาราฉาย² และ รัฐพร จันทรเดช¹

¹สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

²สาขากฎหมาย คณะสถาปัตยกรรมและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ 50290

*อีเมล: auanmolec@gmail.com

บทคัดย่อ

ต้นรวงผึ้งจัดเป็นพืชพื้นถิ่นเดียว (endemic plant) ของประเทศไทยพบมากในป่าทางภาคเหนือที่ความสูงจากระดับน้ำทะเล 1,000 - 1,100 เมตร ดอกของต้นรวงผึ้งมีลักษณะเด่น คือมีกลีบดอกสีเหลืองสดเรียงตัวกันคล้ายรูปดาวห้าแฉกส่งกลิ่นหอมได้ตลอดทั้งวัน ดังนั้นจึงทำให้รวงผึ้งกลายเป็นพืชที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมไม้หอม อีกทั้งยังมีความสำคัญเป็นต้นไม้ประจำพระบาทสมเด็จพระปรเมนทรรามาธิบดีศรีสินทรมหาวชิราลงกรณ พระวชิรเกล้าเจ้าอยู่หัว รัชกาลที่ 10

ปัจจุบันต้นรวงผึ้งจัดเป็นพืชหายาก มีสถานะภาพใกล้จะสูญพันธุ์ในธรรมชาติอย่างยิ่ง เนื่องจากป่าไม้ได้ถูกทำลายไปจึงหลงเหลือต้นตามธรรมชาติที่พบตามแหล่งป่าเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ข้อมูลเชิงวิชาการของต้นรวงผึ้งโดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการรวบรวมสายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นรวงผึ้งยังมีค่อนข้างน้อย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นรวงผึ้งที่พบในเขตพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทยด้วยเทคนิค HAT-RAPD ซึ่งผลจากการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 30 ไพรเมอร์ พบว่ามีทั้งหมด 11 ไพรเมอร์ที่ให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสามารถนำไปใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์รวงผึ้งได้ ซึ่งจากการวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจากตัวอย่างทั้งหมด สามารถจำแนกตัวอย่างของต้นรวงผึ้งได้ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 emu03, emu04, emu05 และ A กลุ่มที่ 2 ได้แก่ emu01, emu02, emu06 และ B

คำสำคัญ: ต้นรวงผึ้ง, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ดีเอ็นเอ, แอสตอร์เฟที

บทนำ

ต้นรวงผึ้งหรือต้นสายน้ำผึ้งมีชื่อสามัญว่า Yellow star และมีชื่อวิทยาศาสตร์ *Schoutenia glomerata* King subsp. *peregrina* (Craib) Roem. เป็นพืชพื้นเมืองของที่ราบลุ่มภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ปัจจุบันต้นรวงผึ้งจัดเป็นพืชที่หายากมาก มีสถานะภาพใกล้จะสูญพันธุ์ในธรรมชาติเนื่องจากป่าไม้ได้ถูกทำลายไปจนเกือบหมด ต้นรวงผึ้งตามธรรมชาติที่ยังหลงเหลือส่วนใหญ่จะเป็นไม้ปลูกอยู่ตามวัดหรือบ้านเรือนในภาคกลาง และภาคเหนือ โดยจะพบมากในป่าทางภาคเหนือที่ความสูงจากระดับน้ำทะเล 1,000 - 1,100 เมตร มีลักษณะเด่นคือ มีกลีบดอกสีเหลืองสดเรียงตัวกันคล้ายรูปดาวห้าแฉกจะบานในช่วงเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม ส่งกลิ่นหอมได้ตลอดทั้งวัน ดังนั้นจึงทำให้รวงผึ้งกลายเป็นพืชที่น่าสนใจเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมไม้หอม อีกทั้งยังมีความสำคัญเป็นต้นไม้ประจำพระบาทสมเด็จพระปรเมนทรรามาธิบดีศรีสินทรมหาวชิราลงกรณ พระวชิรเกล้าเจ้าอยู่หัว รัชกาลที่ 10

เนื่องจากต้นรวงผึ้งเป็นต้นไม้ที่มีความสำคัญเป็นต้นไม้ประจำรัชกาลที่ 10 ทำให้ต้นรวงผึ้งเป็นที่ต้องการของตลาดในการนำมาปลูกเป็นไม้มงคล อีกทั้งยังมีลักษณะเด่นคือมีกลิ่นหอมทนนาน อย่างไรก็ตามข้อมูลในด้านเชิงวิชาการของต้นรวงผึ้งยังมีการศึกษาด้านการรวบรวมสายพันธุ์และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้นรวงผึ้งยังมีค่อนข้างน้อยทำให้เป็นที่น่าสนใจในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อใช้ในการเป็นข้อมูลในการนำไปพัฒนาหรือปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้ต้นรวงผึ้งมีลักษณะที่ดีขึ้น

เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล เช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), และ Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) ได้ถูกนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและสร้างเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมของพืชหลากหลายชนิดเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์ (Hollingsworth et al., 2011) ซึ่งงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิค HAT-RAPD (High annealing temperature-random amplified polymorphic DNA) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาจากเทคนิค RAPD (random amplified polymorphic DNA) ให้มีความแม่นยำสามารถทำซ้ำและให้ผลเหมือนเดิม (Chundet et al.,

[†]การประชุมวิชาการและการนำเสนอผลงาน ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ครั้งที่ 10 (ระหว่างวันที่ 20 - 22 กันยายน 2565 ณ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์)

2007) มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของต้นรวงผึ้งในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่เพื่อรวบรวมและระบุสายพันธุ์ของรวงผึ้งเบื้องต้น ซึ่งจะนำไปสู่การสรุปรายชื่อข้อมูล (database) แบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จำเพาะเจาะจงต่อต้นรวงผึ้งในประเทศไทยด้วยเทคนิคทางอนุชีววิทยาต่อไป

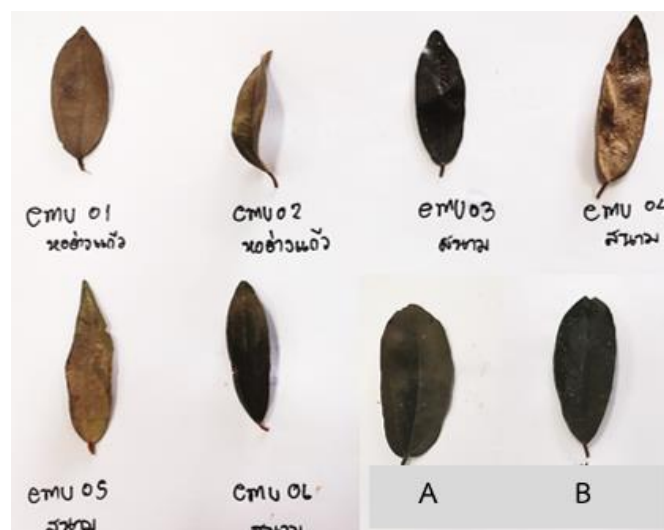
วิธีการดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของตัวอย่าง

ที่	ตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง
1	emu 01	ห่ออ้งแก้ว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2	emu02	ห่ออ้งแก้ว มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3	emu03	สนาม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4	emu04	สนาม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
5	emu05	สนาม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
6	emu06	สนาม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
7	A	มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่
8	B	อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง

นำใบอ่อนของต้นรวงผึ้งทั้ง 8 ตัวอย่าง (รูปที่ 1) มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ รัฐพร จันทรเดช และคณะ (2564) ซึ่งดัดแปลงวิธีการของ Doyle and Doyle (1987) โดยนำชิ้นส่วนใบสดของต้นรวงผึ้ง 0.1 กรัม เติม extraction buffer (NaCl ความเข้มข้น 1.4 โมลาร์, EDTA ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, Tris-HCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ pH 8.0, CTAB ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และ β -mercaptoethanol ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 700 ไมโครลิตรแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการกลั่นเหลวด้วย 15 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่ 1.5 มิลลิลิตร microtube ใหม่ แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่ 1.5 มิลลิลิตร microtube ใหม่ เติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ดูดมาจากหลอดเดิม ตกตะกอนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งจากนั้นเติมเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 900 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วละลายตกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 และ EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ pH 7.0) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติม RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ RNase A



ภาพที่ 1 ตัวอย่างใบของต้นรวงผึ้งที่นำมาศึกษา

การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอและคุณภาพดีเอ็นเอ

ตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอต้นรังผึ้งที่สกัดได้ ด้วยเครื่อง NanoDrop Lite (Thermo Scientific, USA) บันทึกผลปริมาณดีเอ็นเอที่ค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยบันทึกสัดส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

การจำแนกสายพันธุ์ของรังผึ้งด้วยเทคนิค HAT-RAPD

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบรวงผึ้งจำนวน 8 ตัวอย่าง มาสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยปฏิกิริยา PCR ด้วย DreamTaq™ Hot Start Green DNA Polymerase (100 นาโนกรัม Primer, 5 - 10 นาโนกรัม DNA template และ 0.5 ยูนิต Taq Polymerase) ด้วยเครื่อง Thermo cycler โดยใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาฟิซอร์ 3 ขั้นตอนย่อยที่ประกอบด้วย denaturation stage ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing stage ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที extension stage ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ final extension step ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ ทั้งหมด 35 รอบ โดยใช้ Random Primer ทั้งหมด 30 ตัว ได้แก่ (OPAN-01, OPAN-02, OPAN-03, OPAN-04, OPAN-05, OPAN-06, OPAN-07, OPAN-08, OPAN-09, OPAN-10, OPAN-11, OPAN-12, OPAN-13, OPAN-14, OPAN-15, OPT-01, OPT-08, OPT-14, OPT-20, OPAS-03, OPAS-11, OPE-04, OPC-01, OPC-04, OPC-17, OPK-07, OPK-09, OPK-16, OPK-18 และ OPT-08) จากนั้นตรวจสอบผลผลิตฟิซอร์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรส เจลความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์

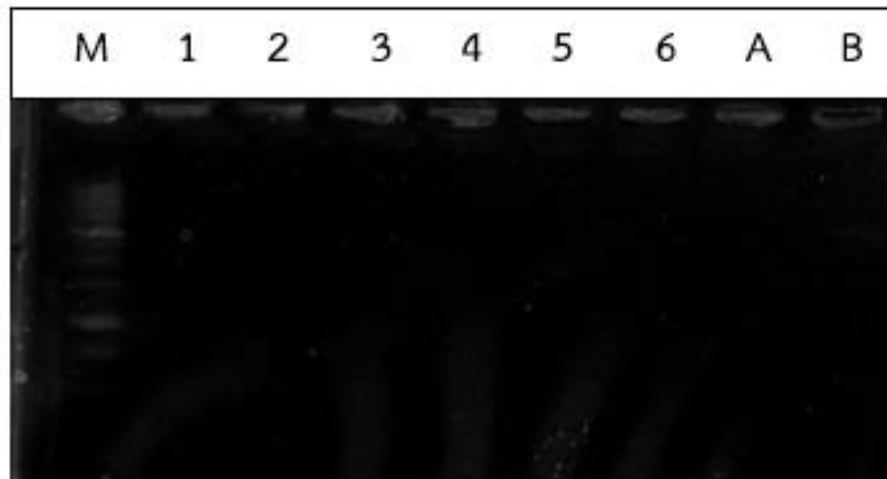
การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอ

บันทึกผลด้วยการให้คะแนนแถบที่เกิดแถบดีเอ็นเอของแต่ละสายพันธุ์ โดยเปรียบเทียบจากความเหมือนและแตกต่างของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยสายพันธุ์ที่เกิดแถบดีเอ็นเอจะให้ค่าตัวแปรเป็น 1 ส่วนบริเวณที่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอให้ค่าตัวแปรเป็น 0 นำข้อมูลการวิเคราะห์มาหาค่าดัชนีความเหมือนด้วยวิธี Jaccard coefficient และแสดงในรูปแบบภูมิทัศน์ไม้ด้วยวิธี IBM SPSS Statistics 26 วิเคราะห์ผลข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (Mackill et al., 1996)

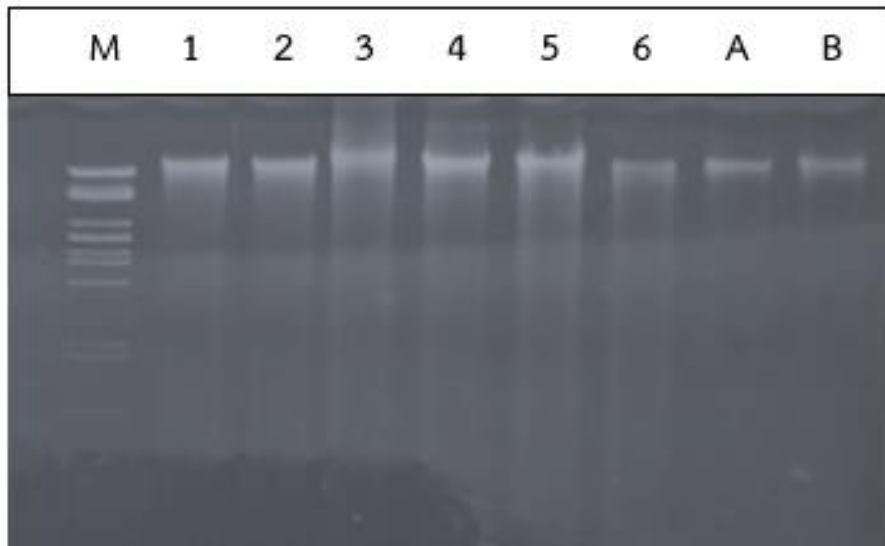
ผลและอภิปรายผล

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากใบของต้นรวงผึ้ง

จากการวิธีการสกัดดีเอ็นเอของ Doyle and Doyle (1987) ได้ใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ CTAB, 2 เปอร์เซ็นต์ Tris-HCL pH 8.0, 1.4 โมลาร์ EDTA และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ β -mercaptoethanol มาเป็นส่วนประกอบใน extraction buffer และเมื่อผสม extraction buffer ร่วมกับตัวอย่างแล้วจะนำไปปั่นต่อที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ทั้งนี้ แต่วิธีนี้ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างรวงผึ้งได้ รัฐพร จันทรเดช และคณะ (2564) จึงได้ดัดแปลงวิธีการสกัดของ Doyle and Doyle (1987) ใหม่ โดยการเพิ่มความเข้มข้นและปรับเปลี่ยนสารประกอบให้มีความเหมาะสมกับลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างมากยิ่งขึ้น ทำให้ extraction buffer ดัดแปลงมีส่วนประกอบดังนี้ 1.4 โมลาร์ NaCl, 20 มิลลิโมลาร์ EDTA pH 8.0, 100 มิลลิโมลาร์ Tris-HCL pH 8.0, 4 เปอร์เซ็นต์ CTAB และ 2 เปอร์เซ็นต์ β -mercaptoethanol นอกจากนี้ ระยะเวลาการบ่มอาจจะทำให้เซลล์แตกไม่เพียงพอ เนื่องจากในใบสดของรวงผึ้งมีสารกลุ่มโพลีฟีนอล และ สารทุติยภูมิจำนวนมาก ทำให้ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอของรวงผึ้งได้ ดังนั้น รัฐพร จันทรเดช และคณะ (2564) จึงเพิ่มเวลาการบ่มจากเดิม 60 นาที เป็น 120 นาที เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ extraction buffer ให้ทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งสามารถสกัดดีเอ็นเอของรวงผึ้งได้ในที่สุด และเมื่อทำการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดโดยใช้วิธีดัดแปลงของ รัฐพร จันทรเดช และคณะ (2564) (ตารางที่ 1) พบว่าปริมาณดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มข้นสูงสุด 2323.2 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และเมื่อนำมาตรวจสอบคุณภาพที่ค่าดูดกลืนแสง OD260/280 พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับค่ามาตรฐาน ซึ่งถือว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพและปริมาณที่เพียงพอต่อการนำไปตรวจสอบสายพันธุ์ด้วยเทคนิค HAT-RAPD



ภาพที่ 2 ดีเอ็นเอจากรวงผึ้ง (1 : emu01, 2 : emu02, 3 : emu03, 4 : emu04, 5 : emu05, 6 : emu06 , A และ B) ที่ใช้วิธีการสกัดของ Doyle and Doyle (1987)



ภาพที่ 3 ดีเอ็นเอจากรวงผึ้ง (1 : emu01, 2 : emu02, 3 : emu03, 4 : emu04, 5 : emu05, 6 : emu06, A และ B) ที่ได้ทำการดัดแปลงวิธีการสกัดจาก Doyle and Doyle (1987)

ตารางที่ 1 ผลวิเคราะห์ความเข้มข้นและคุณภาพของรงควัตถุ

วิธีการสกัด	ระยะเวลาในการบ่ม (65 องศาเซลเซียส) / นาที	ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของ DNA (นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร)	OD260/280
1	60	emu01	ND	-
	60	emu02	ND	-
	60	emu03	ND	-
	60	emu04	ND	-
	60	emu05	ND	-
	60	emu06	ND	-
	60	A	ND	-
	60	B	ND	-
2	120	emu01	704.1	1.7
	120	emu02	500.5	1.62
	120	emu03	719.9	1.8
	120	emu04	707.7	1.86
	120	emu05	774	1.61
	120	emu06	1587.3	1.77
	120	A	2323.2	1.7
	120	B	1586.9	1.87

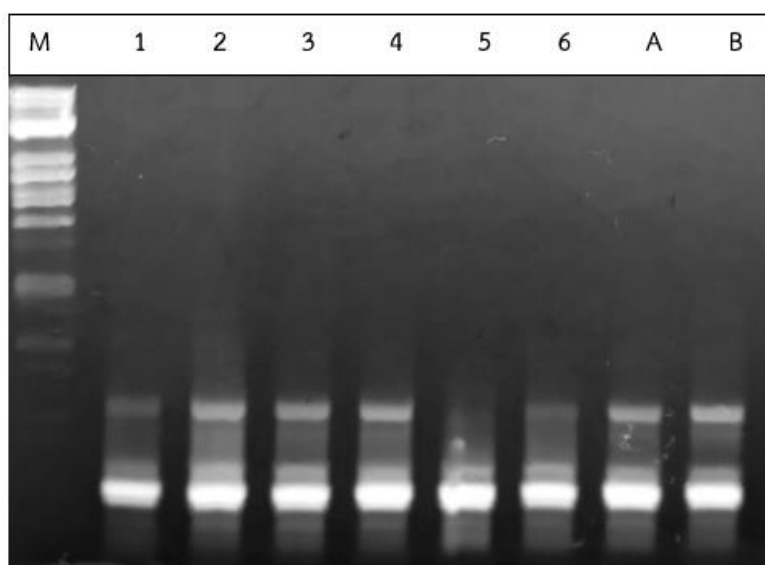
ผลการจำแนกสายพันธุ์ของรงควัตถุด้วยเทคนิค HAT-RAPD

จากผลการจำแนกสายพันธุ์ของรงควัตถุ 8 ตัวอย่างด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยใช้ Random Primers ทั้งหมด 30 ไพรมเมอร์ (ตารางที่ 2) พบว่ามี 11 ไพรมเมอร์ที่ให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดเจน (ภาพที่ 4 - 8)

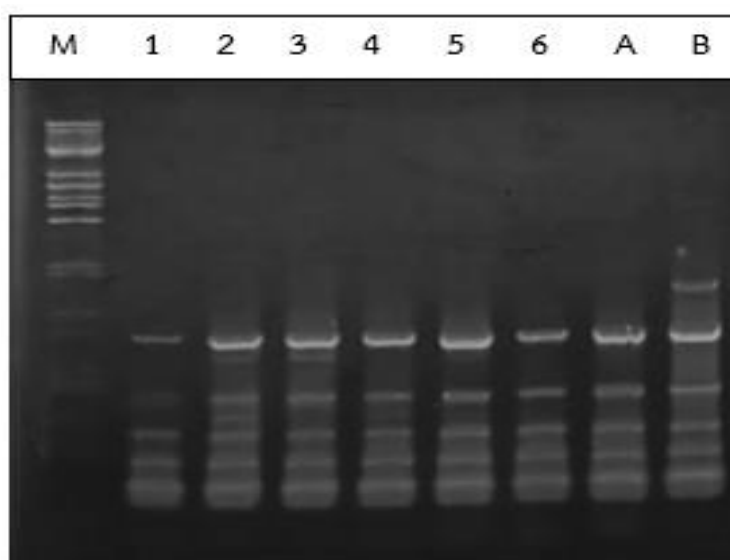
ตารางที่ 2 Random primers ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา HAT-RAPD

ลำดับ	PRIMER	ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
1	OPAN-01	×
2	OPAN-02	×
3	OPAN-03	×
4	OPAN-04	×
5	OPAN-05	×
6	OPAN-06	×
7	OPAN-07	×
8	OPAN-08	✓
9	OPAN-09	×
10	OPAN-10	×
11	OPAN-11	×
12	OPAN-12	×
13	OPAN-13	×
14	OPAN-14	×
15	OPAN-15	×
16	OPT-01	✓
17	OPT-08	✓
18	OPT-14	✓
19	OPT-20	✓
20	OPAS-03	✓
21	OPAS-11	×

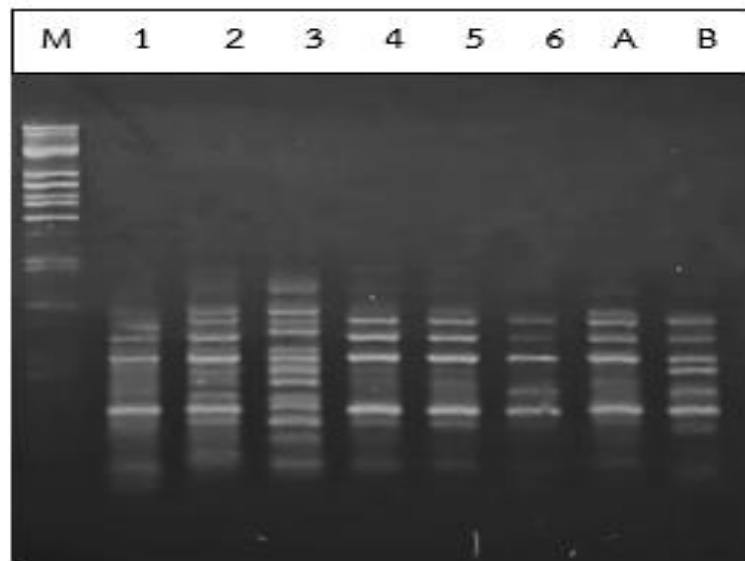
ลำดับ	PRIMER	ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ
22	OPE-04	✓
23	OPC-01	×
24	OPC-04	✓
25	OPC-17	✓
26	OPK-07	✓
27	OPK-09	×
28	OPK-16	✓
29	OPK-18	×
30	OPT-08	×



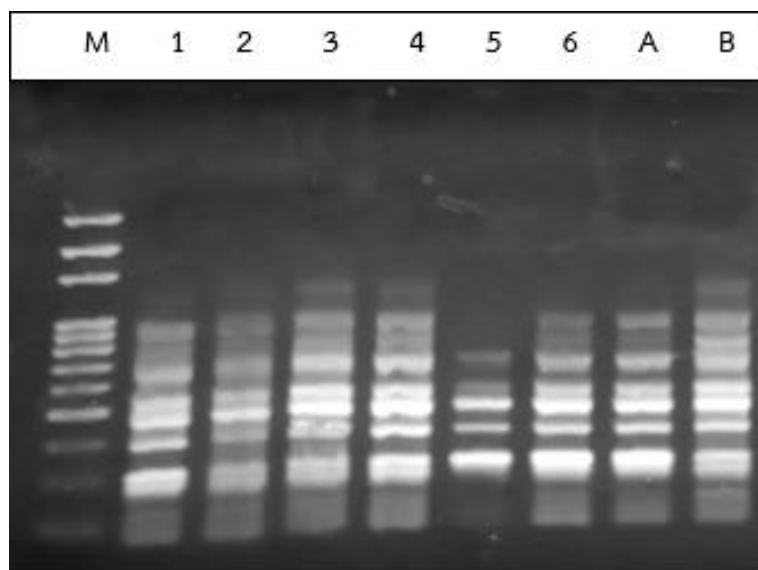
ภาพที่ 4 ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรวงผึ้ง (1 : emu01, 2 : emu02, 3 : emu03, 4 : emu04, 5 : emu05, 6 : emu06, A และ B) จากการใช้ไพรเมอร์ OPT-01



ภาพที่ 5 ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรวงผึ้ง (1 : emu01, 2 : emu02, 3 : emu03, 4 : emu04, 5 : emu05, 6 : emu06, A และ B) จากการใช้ไพรเมอร์ OPT-08

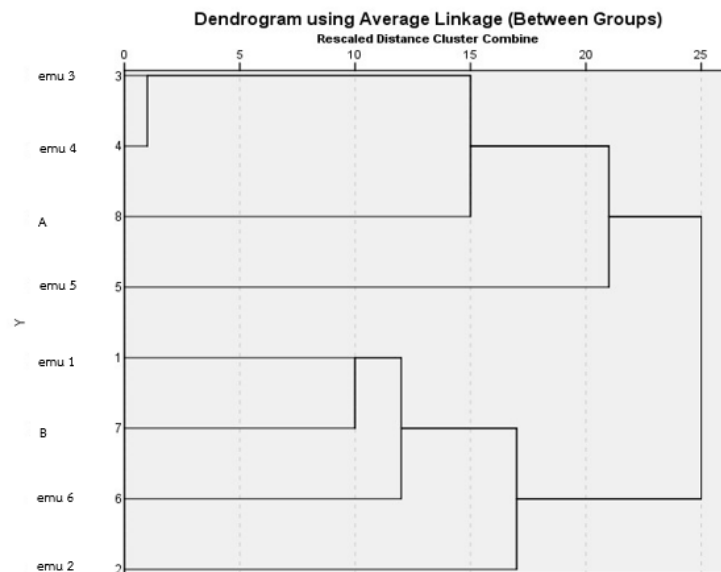


ภาพที่ 6 ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรวงผึ้ง (1 : emu01, 2 : emu02, 3 : emu03, 4 : emu04, 5 : emu05, 6 : emu06, A และ B) จากการใช้ไพรเมอร์ OPT-014



ภาพที่ 7 ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของรวงผึ้ง (1 : emu01, 2 : emu02, 3 : emu03, 4 : emu04, 5 : emu05, 6 : emu06, A และ B) จากการใช้ไพรเมอร์ OPT-20

นำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics 26 (ภาพที่ 9) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตัวอย่างของรวงผึ้งทั้ง 8 ตัวอย่างได้ทั้งหมด 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยรวงผึ้งตัวอย่างที่ 3, 4, 5 และ A ซึ่งรวงผึ้งตัวอย่างที่ 3 และ 4 แสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ 5 และ 9 โดยในกลุ่มที่ 2 จะมีรวงผึ้งตัวอย่างที่ 1, 2, 6 และ B ซึ่งรวงผึ้งตัวอย่างที่ 1 กับ B มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมมากกว่าตัวอย่างที่ 2 และ 6 ดังนั้นจากการทดลองทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่าเทคนิค HAT-RAPD สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์รวงผึ้งได้



ภาพที่ 9 Dendrogram ของต้นรวงผึ้งด้วยเทคนิค HAT-RAPD (1 : emu01, 2 : emu02, 3 : emu03, 4 : emu04, 5 : emu05, 6 : emu06, A และ B)

สรุปผลการทดลอง

จากการวิจัยสรุปได้ว่า คณะผู้วิจัยสามารถพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอของต้นรวงผึ้งได้ทั้งปริมาณและคุณภาพที่ดีเพียงพอต่อการนำไปจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค HAT-RAPD ซึ่งจากการวิเคราะห์ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นจากตัวอย่างทั้งหมด 8 ตัวอย่าง และวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติสามารถจำแนกตัวอย่างของต้นรวงผึ้งได้ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 emu03, emu04, emu05 และ A กลุ่มที่ 2 ได้แก่ emu01, emu02, emu06 และ B อย่างไรก็ตามข้อมูลจากงานวิจัยนี้เป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นเนื่องจากจำเป็นต้องทราบถึงประวัติและที่มาของตัวอย่างต้นรวงผึ้งที่นำมาวิเคราะห์ให้ชัดเจน และจำเป็นต้องทำการรวบรวมตัวอย่างของต้นรวงผึ้งในพื้นที่อื่น ๆ ของประเทศไทย เพื่อที่จะสามารถทำให้การจำแนกสายพันธุ์ของต้นรวงผึ้งในประเทศไทยได้ถูกต้องยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ประจำปีงบประมาณ 2564 ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และศูนย์วิทยาศาสตร์และเครื่องมือกลางที่อนุเคราะห์เครื่องมือครุภัณฑ์ และสถานที่ในการดำเนินการวิจัย

บรรณานุกรม

- สำนักงานทรัพย์สินส่วนพระมหากษัตริย์. (2562). ต้นรวงผึ้ง ดอกไม้ประจำรัชกาลที่ 10. <http://www.crownproperty.or.th/post/ต้นรวงผึ้ง-ต้นไม้ประจำรัชกาลที่-10>
- รัฐพร จันทรเดช, ปารวี กาญจนประโชติ, ทิพย์สุดา ตั้งตระกูล, และ เยาวนิตย์ ธาราฉาย. (2564). การปรับปรุงวิธีการสกัดจีโนมดีเอ็นเอจากใบของต้นรวงผึ้ง. ใน การประชุมวิชาการระดับชาติ ประจำปี 2564 นวัตกรรมเกษตร อาหาร และสุขภาพ. เชียงใหม่: สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- Chundet, R., Cutler, R. W., Tasanon, M., & Anuntalabhojai, S. (2007). Hybrid detection in lychee (*Litchee chinensis* Sonn.) cultivars using HAT-RAPD markers. *ScienceAsia*, 33, 307-311.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11-15.
- Karagyozyov, L., Kalcheva, I. D., & Chapman, V. M. (1993). Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Research*, 21(16), 3911-3912.
- Katengam, S., Crane, J. M., & Knapp, S. J. (2002). The development of a genetic map for meadowfoam comprised of amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(1), 92-96.

- Kochert, G. (1994). *RFLP technology* (pp. 8-38). In Phillips, R. L. and Vasil, I. K. (Eds.). DNA-based markers in plants. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Mackill, D. J., Zhang, Z., Redona, E. D., & Colowit, P. M. (1996). Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome*, 39(5), 969-977.
- McCouch, S. R., & Tanksley, S. D. (1991). *Development and use of restriction fragment length polymorphism in rice breeding and genetics* (pp.109-133). In Khush, G. S., & Toenniessen, G. H. (Eds). Rice Biotechnology. Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PloS One*, 6(5), e19254.