

อภินันทนาการ



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ เรื่อง การจัดจำแนกพีชวงศ์บัวสายโดยใช้คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ

Systematics in Family Nymphaeaceae Based on
Chloroplast DNA

โดย

ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเรศวร
วันลงทะเบียน..... 12 มี.ย. 2558
เลขทะเบียน.. 16194339
เลขเรียกหนังสือ... ๑ ๐๖ ๔๘๕ .๑๙๒
ผู้เชี่ยวชาญ มีนาคม 2557

มีนาคม 2557

สัญญาเลขที่ R2556C083

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ เรื่อง การจัดจำแนกพีชวงศ์บัวสายโดยใช้คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ

Systematics in Family Nymphaeaceae Based on
Chloroplast DNA



สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

โครงการ เรื่อง การจัดจำแนกพีชวงศ์บัวสายโดยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอในคลอโรฟลาสต์

ผู้วิจัย

ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด

บทคัดย่อ

พีชวงศ์บัวสาย (*Nymphaeaceae*) มีการกระจายพันธุ์อยู่เกือบทั่วโลกทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น เป็นพืชที่ได้รับความนิยมในการปลูกเป็นไม้ประดับ หลายชนิดมีลักษณะของสีกลีบดอก รูปร่างดอก หรือใบที่คล้ายคลึงกัน ดังนั้นเพื่อให้สามารถจัดจำแนกได้ถูกต้องตามชนิดพันธุ์จึงต้องอาศัยข้อมูลทางชีวโมโนเลกุลเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้ข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอบริเวณยืน *trnK-matK* และบริเวณระหว่างยืน *trnL-F* พบว่าขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 1180-1209 คู่เบส และ 991-1095 คู่เบส ตามลำดับ โดยเกิดการเพิ่มเข้ามาหรือขาดหายไป และเกิดการแทนที่เบส ทำให้สามารถจัดจำแนกพีชวงศ์บัวสายออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มบัวญี่ปุ่นจะแยกออกจากเป็นกลุ่มแรก และกลุ่มไส้ปลาไหล จะแยกออกจากเป็นกลุ่มที่สอง ขณะที่กลุ่มใหญ่จะประกอบไปด้วยบัวสาย บัวกระดัง ยูริอาเร่ และอนดีเนีย

คำสำคัญ พีชวงศ์บัวสาย ยืน *trnK-matK* บริเวณระหว่างยืน *trnL-F*

Title Systematics of Nymphaeaceae using Chloroplast DNA Sequences

Author Dr.Maliwan Nakkuntod

Abstract

Nymphaeaceae is aquatic herbs distributed worldwide from tropical to temperate regions. Most of them are useful for decoration. Their characteristics in some species are similar in petal colors, flower shapes or leaves. In this study, all taxa of Nymphaeaceae were classified by *trnK-matK* and *trnL-F* intergenic spacer DNA sequences in order to evaluate phylogenetic relationship. The results presented that the length of *trnK-matK* is 1180-1209 basepairs and one of *trnL-F* is 991-1095 basepairs, showed deletion, insertion and base substitutions. According phylogenetic tree, all members of Nymphaeaceae are classified into 3 group. *Nuphar* clade is the basal lineage of Nymphaeaceae and *Barclaya* clade is the second one, whereas the rest clade consists *Nymphaea*, *Victoria*, *Euryale* and *Ondinea*.

Key words: Nymphaeaceae, *trnK-matK* gene, *trnL-F* intergenic spacer

Executive Summary

พืชในวงศ์บัวสาย (*Nymphaeaceae*) ประกอบด้วย 6 สกุลคือ สกุล *Barclaya* (ไส้ปลาไหล) ซึ่งนิยมนำมาใช้ประดับในตู้ปลา สกุล *Nuphar* (บัวญี่ปุ่น) ซึ่งเป็นพืชนำเข้า สกุล *Nymphaea* (บัวสาย) ซึ่งก็คือบัวสายที่เรานำก้านดอกมารับประทาน ทำแกงสายบัว และในปัจจุบันก็มีลูกผสมมากมาย สกุล *Euryale* สกุล *Victoria* (บัวยักษ์) ซึ่งจัดเป็นบัวขนาดใหญ่ที่สุดและมีหนามหั้งบริเวณลำต้น ใน และดอก และสกุล *Ondinea* ซึ่งมีสมาชิกเพียงชนิดเดียวคือ *O. purpurea* และพบเฉพาะในทวีปอสเตรเลียเท่านั้น จะเห็นได้ว่า พืชวงศ์บัวสายนี้มีความแตกต่างกันทั้งใบและดอกอย่างชัดเจน ดังนั้นการจัดจำแนกโดยอาศัยสัณฐานวิทยานั้นสามารถกระทำได้ง่าย แต่การศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิัฒนาการนั้นค่อนข้างยากและมีข้อมูลน้อย เนื่องจากพืชสกุลนี้มีการกระจายพันธุ์ทั่วโลกในบางสกุลหรือจำเพาะถิ่น ทำให้การจัดจำแนกโดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมกระทำได้จำกัด เนื่องจากขาดแคลนตัวอย่าง ซึ่งงานวิจัยหลายข้อที่มีผู้เคยศึกษานั้นใช้ตัวอย่างเพียงหนึ่งชนิด ต่อหนึ่งสกุลเท่านั้น ทำให้การศึกษาเหล่านั้นอาจจะยังไม่สมบูรณ์ ซึ่งจากการสำรวจและรวบรวมตัวอย่างในประเทศไทยพบว่าสามารถหาตัวอย่างได้หลายชนิดในแต่ละสกุล แต่กระหั้นพืชที่นำเข้ามา เนื่องจากในปัจจุบัน มีการนำเข้ามาปลูกมากขึ้น ทั้งในตู้ปลาและกระเบื้อง เป็นต้น ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงเน้นศึกษาการจัดจำแนก และประเมินสายสัมพันธ์ทางวิัฒนาการของพืชวงศ์บัวสายเพิ่มเติมจากที่มีผู้เคยทำการศึกษา เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจน ครบถ้วนมากยิ่งขึ้น โดยอาศัยข้อมูลจากดีเอ็นเอในส่วนของคลอโรพลาสต์

โดยในการวิเคราะห์ครั้งนี้ใช้ข้อมูลจากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ 3 บริเวณคือ บริเวณอินทรอนของยีน *trnL* บริเวณระหว่างยีน *trnL-F* และบริเวณยีน *trnK-matK* โดยบริเวณ *trnL-F* ดังกล่าวเป็นบริเวณที่มีผู้นิยมศึกษา กันมากในวงศ์บัวสาย เนื่องจากบริเวณระหว่างยีนจะให้ parsimony informative site มากกว่าบริเวณอื่น และมีขนาดไม่ยาวมาก ทำให้เพิ่มปริมาณได้ง่าย รวมถึงไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณสามารถใช้ universal primer ได้ ขณะที่บริเวณ *trnK-matK* นั้นเป็นบริเวณภายในยีน *trnK* ที่แทรกด้วยยีน *matK* ซึ่งเป็นบริเวณที่นิยมศึกษาในวงศ์บัวสายเช่นกัน เนื่องจากยีน *matK* ที่ตั้งอยู่ภายใต้ยีน *trnK* มีรหัสสร้างเออนไซม์ maturase มีลำดับดีเอ็นเอค่อนข้างมาก (ประมาณ 1500 คู่เบส) จึงมีอัตราการแทนที่ของดีเอ็นเอสูง จึงมีประโยชน์ต่อการจัดจำแนก (informative site) เป็นอย่างมาก โดยบริเวณระหว่าง 5' *trnK* กับ *matK* จะยาวกว่าบริเวณระหว่าง *matK* กับ 3' *trnK* แต่ทั้งสองบริเวณเกิดการแทนที่ การแทรก และ/หรือการหายไปของดีเอ็นเอ ขณะที่ยีน *matK* จะเกิดการแทนที่ การแทรก และการหายไปของดีเอ็นเอเข่นกัน ซึ่งปกติไม่น่าจะเกิดกับส่วนที่เป็นยีน ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่ายีน *matK* นี้เป็น pseudogene ซึ่งแทรกอยู่ภายใต้ยีน *trnK* ที่จะถอดรหัสให้ tRNA สำหรับกรดอะมิโนชนิดไลซีน ซึ่งมีผู้ทำการศึกษายีน *matK* กล่าวว่า yīn นี้จะไม่ทำหน้าที่ถอดและแปลงรหัสให้เป็นโปรดีนชนิดใดเลย แต่จะนิยมใช้ในการศึกษาการจัดจำแนกพืชได้ดี

ดังนั้นในการจัดจำแนกพืชในวงศ์บัวสาย (*Nymphaeaceae*) โดยอาศัยข้อมูลทางชีวโมเลกุลเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิัฒนาการด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum parsimony ด้วยข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอบริเวณยีน *trnK-matK* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* ในคลอโรพลาสต์นั้น พบว่าขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เมื่อขนาด 1180-1209 คู่เบส และ 991-1095 คู่เบส ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าสามารถจัดจำแนกพืชในวงศ์บัวสายออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มบัวญี่ปุ่นจะแยกออกจากเป็นกลุ่มแรก และกลุ่มไส้ปลาไหลจะแยกออกจากเป็นกลุ่มที่สอง ขณะที่กลุ่มใหญ่จะประกอบไปด้วยบัวสาย บัวกระดัง ยูริอาเร่ และอนดิเนีย

สารบัญ

	หน้า
บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
นิยามศัพท์เฉพาะ.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
สถานที่ทำการวิจัย.....	3
ระยะเวลาในการทำวิจัย.....	3
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
วงศ์บัวสาย.....	4
คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ.....	8
การเปลี่ยนแปลงวิวัฒนาการระดับไมโครกลุ่ม.....	9
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	11
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	15
การเก็บตัวอย่างพืชในวงศ์บัวสาย.....	15
เครื่องมือที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย.....	10
วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	19
ผลการวิจัย.....	25
การสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ	
ด้วยวิธีอเล็กโตรโฟริชิส.....	25
การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์.....	25
การทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์.....	27
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ.....	29
สรุปและอภิปรายผล.....	37
เอกสารอ้างอิง.....	46
Output ที่ได้จากการ.....	49
ภาคผนวก.....	50

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ตัวอย่างพืชในวงศ์บัวสายและวงศ์ไกลีเดียง.....	15
2 ลักษณะลำดับนิวคลีอิทีด์ของไฟรเมอร์แต่ละตำแหน่ง.....	21
3 อุณหภูมิและเวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	22
4 ความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้ในปฏิกริยาพีซีอาร์.....	22



สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 ลักษณะดีเอ็นเอองกลมของคลอโรพลาสต์จีโนมของ <i>Nymphaea alba</i>	10
2 คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน <i>trnL-F</i>	10
3 แผนที่ดีเอ็นเอบริเวณยีน <i>trnK - matK</i> และบริเวณที่พรเมอร์เข้าจับ.....	10
4 ลักษณะแบบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี CTAB Method โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (fermentas).....	26
5 ลักษณะของแบบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบริเวณระหว่างยีน <i>trnL-F</i> ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Fermentas).....	26
6 ลักษณะแบบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีน <i>trnK-matK</i>	27
7 ลักษณะของแบบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณบริเวณ <i>trnL-F</i> ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Sibenzyme)...	28
8 ลักษณะแบบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณบริเวณ <i>trnK-matK</i> ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (fermentas)...	28
9 ลำดับดีเอ็นเอที่มีความคงที่ (A) ลำดับดีเอ็นเอที่บอกสายสัมพันธ์ ทางวิวัฒนาการ (B) และลำดับดีเอ็นเอที่พับเฉพาะเพียง ตัวอย่างเดียว (C).....	30
10 Consensus tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอในบริเวณ ระหว่างยีน <i>trnL-F</i> ด้วยวิธี Maximum Pasimony.....	31
11 Phylogenetics tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน <i>trnK-matK</i> โดยวิธี Maximum parsimony.....	34
12 Phylogenetics tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอบริเวณ ระหว่างยีน <i>trnL-F</i> และ บริเวณบางส่วนของยีน <i>trnK-matK</i> โดยวิธี Maximum parsimony.....	36

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

พีชวงศ์บัวเป็นพืชน้ำลัมลูกอายุหลายปีที่พบได้ทั่วโลก มีการกระจายพันธุ์ที่กว้างขวางทำให้มีลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ สัณฐานวิทยา และนิเวศวิทยาต่างกันไปตามในแต่ละพื้นที่ตั้งแต่เขตร้อนเขตอบอุ่นและเขตหนาว ซึ่งเกิดจากการปรับตัวเพื่อให้สามารถเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมนั้นๆได้

บัวจัดเป็นไม่น้ำประ��ที่มีอยู่หนือน้ำชนิดหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับมนุษย์มาช้านาน โดยเฉพาะด้านวัฒนธรรม การดำรงชีวิต และศิลปะแขนงต่างๆ ของชาติไทย มีการนำรูปดอกบัวมาสร้าง漉漉ลาย ที่อ่อนช้อย หรือแม้แต่ในชีวิตประจำวันก็มีการนำเหง้า ใบลดอกก้านดอกบัวมาประกอบอาหารซึ่งอุดมไปด้วยคุณค่าและสรรพคุณทางสมุนไพร นอกจากนี้ดอกของบัวสายก็นิยมนำมาปลูกประดับไว้ภายในบ้านเพื่อความสวยงาม หรือตามความเชื่อว่าเป็นสิริมงคล (อิศรา แพงสี, 2551) ตามชื่อของบัวสายแต่ละชนิดอีกด้วย

บัวมีความสัมพันธ์กับชีวิตของคนไทยมาอย่างช้านาน ทั้งทางด้านวัฒนธรรมและการดำรงชีวิตโดยเฉพาะในยุคปัจจุบันบัวเป็นที่ต้องการของผู้ประกอบธุรกิจไม่น้ำ เนื่องจากประเทศไทยมีลักษณะภูมิอากาศที่เอื้ออำนวยต่อการปลูกเลี้ยงทำให้มีการปลูกบัวเพิ่มมากขึ้น และมาตรฐานการผลิตบัวของไทยก็อยู่ในอันดับต้นๆของโลก อีกทั้งนักวิชาการของไทยยังให้ความสนใจในการผสมพันธุ์บัวที่ทำให้ได้ลูกที่มีลักษณะสวยงามมากกว่าพ่อแม่ การจัดจำแนกกลุ่มของบัวจึงมีความสำคัญ แต่การจัดจำแนกกลุ่มของบัวโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่สามารถให้คำตอบที่แน่นอนได้ เพราะลักษณะบางประการสามารถปรับเปลี่ยนได้ตามสภาพแวดล้อม อาจมีการพัฒนาเพิ่มขึ้นหรือปรับลดลงจากลักษณะเดิมเพื่อให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่อยู่ และจากความก้าวหน้าทางด้านชีววิทยา ไม่เลกฤทธิ์ให้การหาจินในสิ่งมีชีวิตได้รับการยอมรับมากยิ่งขึ้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ลักษณะทางสัณฐานร่วมกับเทคนิคด้านชีววิทยาไม่เลกฤทธิ์เพื่อให้การจัดจำแนกทางด้านอนุกรมวิธานมีความชัดเจนมากขึ้น

การจำแนกพืชในวงศ์บัวแต่เดิมจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาซึ่งไม่สามารถใช้จำแนกได้อย่างชัดเจนจึงทำให้เกิดแนวคิดในการนำข้อมูลด้านอื่นๆ เช่น ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ เรณูวิทยา นิเวศวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของพืชรวมไปถึงข้อมูลด้านชีวโมเลกุล เช่น ดีเอ็นเอ (DNA) อาร์เอ็นเอ (RNA) โปรตีน (protein) ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน โดยสามารถศึกษาได้ทั้งดีเอ็นเอในส่วนของไมโทคอนเดรีย นิวเคลียส และคลอโรพลาสต์ (Bakker et al., 1999) โดยดีเอ็นเอที่อยู่ในส่วนประกอบเหล่านี้จะสามารถส่งผลถึงลักษณะที่แสดงออกของพืชได้และจากรายงาน

การศึกษาลำดับดีเอ็นเอในบริเวณ non-coding regions ของ cpDNA และ 18S rRNA สามารถจำแนกพืชได้และนำมาศึกษาการกระจายของประชากรและวิถีวนานาการของพืชได้ดี

นอกจากนี้การนำเอาประโยชน์ข้อมูลทางด้านชีววิทยาโมเลกุลและเทคโนโลยีดีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้ในการอธิบายลักษณะจีโนมของสิ่งมีชีวิต สามารถนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านการจัดจำแนกได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะพืชเองก็ได้มีการนำลำดับดีเอ็นเอทั้งบริเวณนิวเคลียส และคลอโรพลาสต์มาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในการจัดจำแนกพืช โดยเฉพาะตีเอ็นเอที่มีอยู่ในคลอโรพลาสต์ (cpDNA or plastid DNA) ที่มีความผันแปรของลำดับดีเอ็นเอระหว่างสิ่งมีชีวิตในระดับวงศ์หรือสกุล และภายในชนิดหรือสายพันธุ์เดียวกัน เริ่มได้รับการศึกษามากขึ้น เพื่อที่จะใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิถีวนานาการและการจัดจำแนก ในพืชการเลือกใช้ลำดับดีเอ็นเอทั้งในบริเวณดีเอ็นเอในนิวเคลียส (nuclear DNA) และในคลอโรพลาสต์ (chloroplast DNA) ได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในด้านการเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic markers) โดยเฉพาะคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงจะทำการศึกษาการจำแนกและจัดกลุ่มภัยในวงศ์บัวสาย โดยจะใช้การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* และบริเวณยีน *trnK-matK* ลักษณะทางสัณฐานวิทยา รวมทั้งการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิถีวนานาการของบัวในวงศ์นี้โดยเปรียบเทียบกับบัวในวงศ์เดียวกันและวงศ์ใกล้เคียง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิถีวนานาการของพืชในวงศ์บัวสาย (*Nymphaeaceae*) โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์บริเวณระหว่างยีน *trnL-F* และบริเวณยีน *trnK-matK*
- เพื่อศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับดีเอ็นเอบริเวณบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* และบริเวณยีน *trnK-matK*

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสกุลและภัยในสกุลเดียวกัน รวมไปถึงระหว่างชนิดและภัยในชนิดเดียวกันของพืชในวงศ์บัวสาย (*Nymphaeaceae*) โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* และบริเวณ *trnK-matK*

นิยามศัพท์เฉพาะ

การจัดจำแนก	Systematics
วงศ์บัวสาย	Waterlily, <i>Nymphaeaceae</i>
คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ	Chloroplast DNA

สมมุติฐานของการวิจัย

บริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ 2 บริเวณ คือ *trnL-F* และ *trnK-matK* เป็นข้อมูลที่เหมาะสม
และเพียงพอในการใช้จัดจำแนกพืชในวงศ์บัวสาย

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยพันธุศาสตร์และชีวโมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร

ระยะเวลาในการทำการวิจัย

เดือน พฤษภาคม พ.ศ 2556 ถึง เดือน เมษายน พ.ศ 2556

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วงศ์บัวสาย (Nymphaeaceae)

บัวสายเป็นพืชไม้ที่พบอยู่ทั่วโลก ทั้งในเขตร้อนและเขตหนาว ในอดีตมีการใช้ดอกบัวสายบูชาเทพเจ้าโดยมีหลักฐานการบุดบุดดอกบัวสายแห้งฝังอยู่ในสุสานของกษัตริย์รามเสสและตุตันคาเมร์ แห่งอียิปต์ที่มีอายุนานกว่า 3,000 ปี โดยในขณะนั้นต่างเข้าใจว่าเป็นบัวหลวงจึงเรียกว่า The sacred lotus of the Nile หรือ “บัวศักดิ์สิทธิ์แห่งลุ่มน้ำไนล์” ต่อมาคำว่าบัวสาย (*Nymphaea lotus*) ดอกสีขาวที่บานตอนกลางคืนและเป็นชนิดเดียวกับที่นำสายบัวมา กินนอกจากนี้ยังพบภาพเขียนบนผนังที่มีรูปสระบัวและรูปจำลองดอกบัวสายในชาภารอีกด้วย (อุ่ร จิรมงคลการ, 2548)

คำว่า “บัว” ที่พบและนิยมปลูกอยู่ในประเทศไทยมีอยู่ 2 วงศ์คือวงศ์ Nelumbonaceae หรือวงศ์บัวหลวงและวงศ์ Nymphaeaceae หรือวงศ์บัวสาย ซึ่งวงศ์บัวสายสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 สกุลคือ สกุลบัวสาย (*Nymphaea*) สกุลบัวญี่ปุ่น (*Nuphar*) สกุลบัวกระดัง (*Victoria*) สกุลยูริอาเร (*Euryale*) สกุลไส้ปลาไหล (*Barclaya*) และ สกุลอนดินี (*Ondinea*) (Slocum, 2005)

1. สกุลบัวสาย (*Nymphaea*)

บัวสายที่พบอยู่ทั่วโลกขณะนี้มีอยู่ประมาณ 45 - 50 ชนิด ถ้าแบ่งตามลักษณะภูมิอากาศ อาจแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ บัวสายในเขตร้อน (tropical waterlily) และบัวสายในเขตหนาว (Hardy waterlily)

1.1 บัวสายในเขตร้อนสามารถแบ่งออกได้อีกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ บัวสายเขตร้อนบานกลางวัน และบัวสายเขตร้อนบานกลางคืน

1.1.1 บัวสายบานกลางคืน พบใน 2 สกุลย่อยคือ

สกุลย่อย *Hydrocallis* ซึ่งพ布ในทวีปอเมริกากลางและอเมริกาใต้ เป็นบัวกลุ่มใหญ่ที่มีสมาชิก 14 ชนิดแต่ไม่มีความสำคัญในด้านการเกษตร เพราะดอกไม่สวยงามและมักจะบานเพียง 3-4 ชั่วโมงในเวลากลางคืน

สกุลย่อย *Lotos* เป็นกลุ่มที่นิยมปลูกเลี้ยงเป็นไม้ประดับเพราะมีดอกสวยและบานนาน ตั้งแต่ ค่ำจนถึงเวลาเช้าของวันรุ่งขึ้น พบอยู่ 5 ชนิดโดยที่ *N. lotus* มักพบอยู่ในทวีปแอฟริกาแต่อาจพำได้ในทวีปยุโรปที่มีอุณหภูมิสูง เช่น บ่อน้ำร้อนในประเทศไทย เช่น การ์ ส่วนชนิดอื่นๆ มักพบในทวีปเอเชียและตอนเหนือของอสเตรเลีย

1.1.2 บัวสายบานกลางวัน เป็นบัวสายที่พบได้ทั้งในเขตต้อน เขตอบอุ่น และเขตหนาว แบ่งออกเป็น 2 สกุลย่อยคือ

สกุลย่อย *Aneophyta* หรือบัวยักษ์อสเตรเลีย เดิมมีเพียงชนิดเดียวคือ *N. gigantea* ซึ่งพบในทวีปออสเตรเลียและนิวเกินี แต่ปัจจุบันมีบัวชนิดใหม่ๆ ในกลุ่มน้ำตกพบมากขึ้นเรื่อยๆ ทุกปี

สกุลย่อย *Brachyceras* ซึ่งจัดว่าเป็นบัวสายกลุ่มที่ใหญ่และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจมาก มีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วไปในเขตศูนย์สูตรทั้งทวีปแอฟริกา และอเมริกา

1.2 บัวเขตหนาวหรือบัวฝรั่ง จัดอยู่ในสกุลย่อย *Nymphaea* มีทั้งหมด 6 ชนิดใน 3 section คือ

1.2.1 Section *Chamaenymphaea* จะพบได้ในเขตหนาวทั่วโลกทั้งยุโรป เนื้อ เอเชียเนื้อและอเมริกาเหนือ

1.2.2 Section *Eucastalia* ประกอบด้วยบัวฝรั่ง 4 ชนิด พบรอบในเขตตอบอุ่น ของยุโรป อเมริกาเหนือ และบางส่วนของแอฟริกา

1.2.3 Section *Xanthantha* จะพบอยู่เฉพาะตอนล่างของอเมริกาเหนือ และประเทศเม็กซิโก เป็นบัวฝรั่งของเขตต้อนมีอยู่ชนิดเดียวคือ *N. mexicana*

นอกจากนี้บัวสายยังสามารถถูกแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะของผนังรังไข่ (Conard, 1905) คือ

Group I Apocarpiae

บัวสายในกลุ่มนี้จะมีผนังรังไข่แยกออกจากกันและเชื่อมติดกับแกนของดอกและด้านบนของฐานรองดอก (perigynous) ชนิดที่อยู่ในเขตต้อนที่มีการบานของดอกในตอนกลางวันจะมีความหลากรายของสีดอกตั้งแต่สีฟ้าไปจนถึงสีชมพูหรือสีขาว ดอกชูขึ้นเหนือน้ำ 7-30 เซนติเมตร และมีก้านดอกแข็ง ลักษณะการเรียงตัวของเส้นใบของกลีบเลี้ยงไม่เด่นชัด จะประกอบด้วย 2 สกุลย่อย คือ

1. สกุลย่อย *Aneophyta* หรือบัวสายยักษ์อสเตรเลีย

บัวสายในสกุลย่อยนี้จะไม่มีก้านชูเกรสรเพศเมีย (carpellary styles) หรือไม่มีรายงานของเกรสรเพศเมียนั่นเอง มีเกรสรเพศผู้จำนวนมาก แต่มีก้านชูอับเรณูแคบและสั้น อับเรณูโค้ง โดยไม่มีรายงานที่ปลายเกรสรเพศผู้ เกรสรเพศผู้จะอยู่กันอย่างหนาแน่นมากที่บริเวณจุดรวมของฐานรองดอกรอบๆ เกรสรเพศเมีย เม็ดคิมขนาดใหญ่

2. สกุลย่อย *Brachyceras* หรือบัวผัน บัวเผื่อน

บัวสายในสกุลนี้จะมีก้านชูเกรสรเพศเมียสั้น แข็ง และมีเนื้อ (fleshy) เกรสรเพศผู้มีจำนวนมาก กลีบดอกเรียงตัวอยู่บนฐานรองดอก อับเรณูอาจยาวมากกว่าหรือน้อยกว่ารยางค์ได้มีการเชื่อมต่อกับก้านชูอับเรณู ที่แบนและขยายตัวขึ้น เมล็ดมีขนาดเล็ก กระจายอยู่ทั่วโลกในเขตต้อน Group II Syncarpiae

บัวสายในกลุ่มนี้จะมีผนังรังไชเชื่อมกันอย่างสมบูรณ์ ติดกับแกนของดอกและฐานรองดอก เมื่อตอนในกลุ่มแรก เกรสรเพศผู้ไม่มีรยางค์ ดอกมีสีขาว สีกุหลาบ สีม่วง สีเหลือง แต่ไม่พบสีฟ้า ดอกบานตอนกลางคืนหรือกลางวัน ประกอบด้วย 3 สกุลย่อย คือ

1. สกุลย่อย *Castalia*

บัวสายในสกุลย่อยนี้ดอกบานในเวลากลางวัน และปกติออกจะลอยอยู่เสมอ น้ำ กลีบเลี้ยงไม่เห็นเส้นใบเด่นชัด เกรสรเพศผู้แทรกอยู่ในชุดของกลีบดอกและมีการจัดลำดับในขนาดและรูปร่าง เกรสรเพศผู้ที่ด้านในสุดจะมีก้านชูอับละของเรณูแคบ ก้านชูเกรสรเพศเมียเป็นเส้นตรง ในทั้งหมดเป็นแบบ sinuate หรือ crenulate ลำต้นใต้ดินจะไม่ได้รับการป้องกันจากความแห้งแล้ง แต่จะสามารถอกได้ในสภาพอากาศหนาวเย็น เมล็ดเรียบ มี 7 ชนิด พบทุกชนิดในเขตอาณาเขตอุ่นตอนเหนือ ยกเว้นบริเวณที่ลาดชันในอเมริกาเหนือ

2. สกุลย่อย *Lotos*

บัวสายในสกุลย่อยนี้ดอกบานตอนกลางคืน ชูก้านดอกที่อับอวนขึ้นเหนือน้ำ 10-30 เซนติเมตร มีกลีบเลี้ยง 7-13 กลีบชัดเจน และมีเส้นใบเด่นชัด เกรสรเพศผู้แทรกอยู่เหนือกลีบดอก ละของเรณูเรียบ ก้านเกรสรเพศเมียเป็นเส้นตรง มีขันที่ก้านใบ ก้านชุดดอก และใต้ใบ ลำต้นใต้ดินเป็นหลอด รูปไข่ตั้งตรง มีคุณภาพ เมล็ดค่อนข้างเล็ก มีขันสันๆ เป็นเส้นตามยาว มีพันธุ์พื้นเมือง 4 ชนิด ในเขตต้อนของโลกเก่า จากซีนีแคนเบีย จนถึงหมู่เกาะฟิลิปปินส์ และพบทากตอนเหนือของยังการ์ และทางใต้ไปจนถึงมาดาガสการ์

3. สกุลย่อย *Hydrocallis*

บัวสายในสกุลย่อยนี้ดอกบานตอนกลางคืนและลอยน้ำ กลีบเลี้ยงไม่เห็นเส้นใบเด่นชัด กลีบดอกรวมกันเป็นกระจุก 4 กลีบ แบบ whorls สลับกับกลีบเลี้ยงและขั้นของกลีบดอกอื่นๆ เกรสรเพศผู้แทรกอยู่ในชุดของกลีบดอก โดยกลีบดอกด้านนอกสุดจะมี 4 หรือ 8 กลีบ (อาจมากหรือน้อยกว่า) ซึ่งมีเกรสรเพศผู้ที่เปลี่ยนไปเป็นกลีบดอก (petaloid) อยู่ในวงเหมือนกลีบดอก อับเรณูแตกออกพร้อมกัน ก้านเกรสรเพศเมียมีรูปร่างเรียว เมล็ดมีขนาดเล็ก มีขันยาวเป็นจำนวนมาก ขอบใบทั้งหมดเป็นแบบซีฟัน (dentate sinuate) หรือแบบฟันทู (obtuse teeth) ลำต้นใต้ดินเป็นหลอดตรง

และจะแห้งในช่วงฤดูพัก มี 10 ชนิดที่เป็นที่รู้จักของชาวพื้นเมืองในเขตต้อนของซีกโลกตะวันตก (นวลดเนตร จุลบุตร, 2554)

2. สกุลบัวสีปูน (*Nuphar Sibth. and Sm.*)

บัวสีปูนเป็นพืชน้ำอายุหลายปี มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศไทย ทวีปยุโรป และทวีปอเมริกาเหนือ มีลำต้นใต้ดินเป็นเหง้าใหญ่ มีรากยาวหลายเมตร เจริญลึกลอยในโคลน สามารถเจริญได้ในน้ำลึกถึง 3 เมตร ในรูปกลมถึงในรูปหอกขนาดใหญ่ มีทั้งใบใต้น้ำและใบเหนือน้ำ ก้านใบแบบบางครั้งพบว่าแผ่ออกมาคล้ายครีบ ก้านใบและก้านช่อดอกเรียบ หรือมีขันละเอียด ดอกมีขนาดเล็กๆ กลีบ เสี้ยวถึงเสี้ยวหัว จำนวนดอกประกอบด้วย กลีบเลี้ยงจำนวน 5-14 กลีบ สีเขียวถึงสีเหลือง บางครั้งแแกมสีแดง กลีบดอกขนาดเล็กสีเหลือง ลดรูปจนดูคล้ายเกรสรเพศผู้ หรือคล้ายเป็นเกล็ดหนาๆ มีจำนวนมาก ส่วนเกรสรเพศผู้มีจำนวนมากสีเหลืองหรือเหลืองปนแดง เมื่อได้รับการผสมแล้ว ผลจะเจริญหนึ่งน้ำ พบรากมีประมาณ 20 ชนิด (วสันต์ เอื้อมลัษ्टร, 2555)

3. บัววิคตอเรีย (*Victoria Lindley*)

บัวสกุลวิคตอเรีย มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ คุนยูโรปไปพบทะนำไปปลูกที่ประเทศไทยอังกฤษเมื่อประมาณปี พ.ศ.2385 ในสมัยที่พระนางเจ้าวิคตอเรียแห่งประเทศไทยอังกฤษ ทรงราชย์อยู่ จึงนำขึ้นของพระองค์มาเป็นชื่อสกุลของบัวชนิดนี้ เป็นการเทิดพระเกียรติของพระราชินีอังกฤษ (เสริมลาก วสุวัต, 2547) เมืองไทยเริ่มทำการนำมาปลูกกว่า 100 ปีมาแล้ว มีดอกจำนวนมาก มีสีเหลืองอมขาว และทยอยออก ดอกตูมป้อมมาก ดอกบานແ爛เป็นรูปค่อนวงกลม เส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ถึง 30 เซนติเมตร กลีบดอกมากถึง 60 กลีบจัดเป็นบัวที่มีขนาดใหญ่ที่สุดประมาณ 6 ฟุต ลอยบนผิวน้ำมีนามแผลม บานเวลากลางคืนและมีกลิ่นหอม เมื่อเริ่มบานกลีบดอกจะมีสีขาวและจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูต่อไป (มลิวรรณ นาคชุมทด, 2554)

4. สกุลยูริอาเร (*Euryale Salisb.*)

บัวสกุลยูริอาเรมีลักษณะคล้ายบัววิคตอเรีย กลีบดอกสีม่วงสดใส ด้านล่างของใบเป็นสีม่วงในขณะที่พื้นผิวด้านบนเป็นสีเขียว ใบเล็ก มีหนามแผลม ขอบใบไม่ตั้ง ผิวใบด้านบนมีหนาม ฐานแรกลึกรูปหัวใจ กลีบดอกภายนอกสีม่วง ภายในสีขาวลักษณะคล้ายรูปใบหลอก เม็ดมีสีดำมี 8 เม็ด หรือมากกว่าลักษณะกลมขนาด 6-10 มิลลิเมตร มีถิ่นกำเนิดในแถบทวีปแอฟริกาตะวันออก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และประเทศไทย สามารถขึ้นได้ดีในน้ำลึกถึง 4 เมตร ลักษณะลำต้นเป็นหัว อุ้ยในดินใต้น้ำ ใบเป็นแผ่นกลมลอยที่ผิวน้ำ ขนาด 20-30 เซนติเมตร ผิวใบย่น ขอบใบเรียบแบบ มีหนามแผลม ตามเส้นใบทั้งด้านบนและด้านล่างประปา ก้านใบเล็กเรียวยาว มีหนามเล็กแผลม ก้านใบเป็นติดกับแผ่นใบด้านหลังใบ (peltate leaf) ดอกเดี่ยวสมบูรณ์เพศขนาด 5-8 เซนติเมตร ก้านดอกสั้นดอกเจริญที่ผิว

น้ำ ส่วนของดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 4 กลีบผิวด้านนอกมีหนามแหลม กลีบดอกประมาณ 20 กลีบ สีขาว โคนกลีบสีขาว เกสรเพศผู้มีมาก ดอกบานกลางวัน พับเพียงชníดเดียว แต่มีหลายสายพันธุ์ (วสันต์ เอื้อมลัชัตร, 2555)

5. สกุลไส้ปลาไหล (*Barclaya* Wall.)

สกุลไส้ปลาไหลพื้นเมืองในประเทศไทย ทวีปอเมริกาเหนือและในทวีปยุโรป มีลำต้นอยู่ในดินใต้น้ำแบบเหง้า หรืออาจเป็นหัวสันๆ ใบเดี่ยวแตกเป็นกอประมาณ 6-7 ใบเจริญอยู่ในน้ำ บางชนิดมีใบรูปทรงกระบอกยาว รูปไข่ หรือรูปกลมขอบใบเรียบ เป็นคลื่นหรือเรียบแบน ก้านใบกลมเรียวยาว ดอกเดี่ยวสมบูรณ์เพศ ขนาดประมาณ 4-6 เซนติเมตร ก้านดอกส่งดอกให้เจริญเหนือผิวน้ำ ดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 5 กลีบ กลีบดอก 8-15 กลีบ เรียงชั้นกัน 2-3 ชั้นโคนกลีบติดกัน เกสรเพศผู้มี 2 แบบคือแบบปกติและเป็นหมัน ประมาณ 100 อันขนาดเล็ก รังไข่ติดกับโคนของกลีบดอกผลเดี่ยวแบบผลสด เปลือกหนานนุ่ม ภายในมีเมล็ดขนาดเล็กจำนวนมาก (วสันต์ เอื้อมลัชัตร, 2555)

6. สกุลօนดินี (*Ondinea* Hartog)

สกุลօนดินีมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปอสเตรเลียตะวันตก แคว Kimberly District ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ของชาวอะบอริจิน (aborigines) ซึ่งเป็นชนพื้นเมืองของอสเตรเลีย โดยได้นำหัวของพืชพากนี้มารับประทานเป็นอาหาร ในฤดูหนาวเมื่อน้ำในลำธารแห้ง ใบจะเที่ยวเน่าตายเหลือแต่เพียงหัวที่อยู่ใต้ดิน จนถึงฤดูร้อนเริ่มมีน้ำ หัวจะเริ่มงอกแตกรากและใบใหม่ ลักษณะโดยทั่วไปหัวขนาดประมาณ 1.5-2.5 เซนติเมตร ใบขนาดใหญ่ มีทั้งใบลอยน้ำและใบใต้น้ำ ลักษณะเป็นรูปไข่แคบหรือรูปครรภ์ ก้านใบเรียว มีขนละเอียดหรือไม่มี ดอกเดี่ยว บานเหนือน้ำ ในเวลากลางวัน ประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 4 กลีบ กลีบดอก 1-5 กลีบ สีขาวแดง บางชนิดไม่มีกลีบดอก เกสรเพศผู้ 27-34 อัน ดอกมีกลิ่นหอม สกุลนี้มีเพียงชนิดเดียวคือ *Ondinea purpurea* (คุณหญิงสุชาดา ศรีเพ็ญ วีรญา บุญเตี้ยและวิสาขा เพียรสุภาพ, 2550)

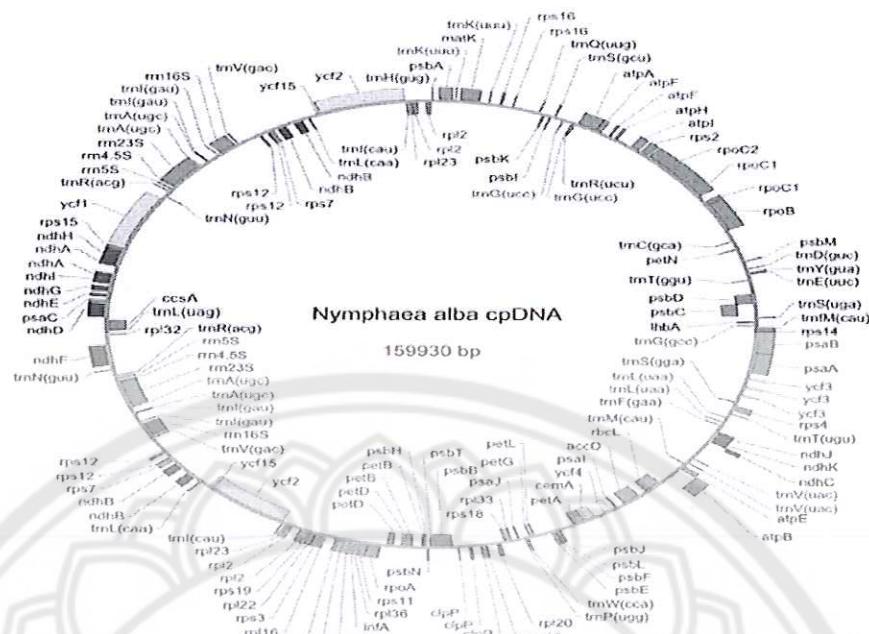
คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ

คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA : cpDNA) ได้ถูกใช้เป็นเครื่องหมายทางดีเอ็นเอที่มีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิวัฒนาการและพันธุศาสตร์ประชากรเนื่องจากคลอโรพลาสต์ ดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอของกลุ่มที่มีความคงที่สูงในเรื่องขนาดและโครงสร้างลำดับดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ ถือเป็นแหล่งแรกของข้อมูลสำหรับการศึกษาทางด้านการจัดจำแนกพืชโดยใช้สารชีวโมเลกุล (gap 1) และสาเหตุที่ทำให้คลอโรพลาสต์ถูกเลือกมาใช้ในการศึกษาทางด้านวิวัฒนาการและพันธุศาสตร์ประชากรของพืชมากกว่าโนโตกอนเดรียลดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA : mtDNA) เพราะ

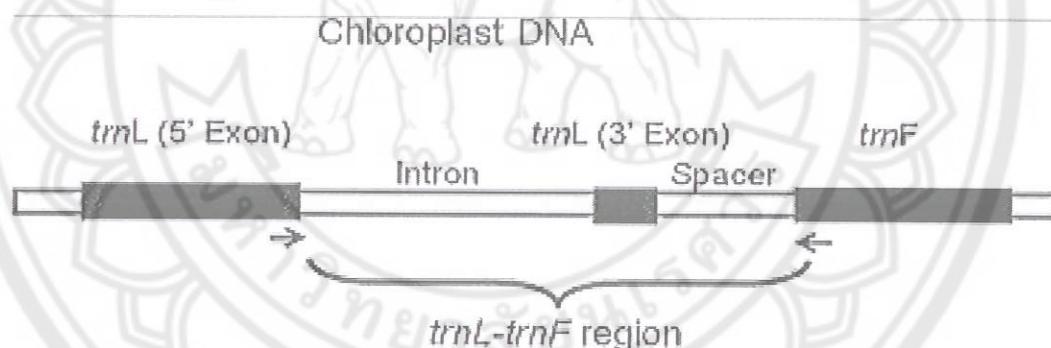
ไม่โทคอนเดรียลตีเอ็นเอของพีชมีขนาดและการจัดเรียงตัวของยีนแตกต่างกันมากและไม่โทคอนเดรียลตีเอ็นเอจะมีอัตราการแทนที่เบสต่ำกว่าคลอโรพลาสต์ตีเอ็นเอมาก การจัดเรียงตัวของยีนในคลอโรพลาสต์ตีเอ็นเอที่อนุรักษ์นี้นำไปสู่การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้กันทั่วไป (universal chloroplast primers) ซึ่งเป็นการอำนวยความสะดวกให้กับการศึกษาทางด้านวิถีของการของพีชและพันธุศาสตร์ประชากร (Petit *et al.*, 1996; Kuo *et al.*, 2011) และในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาลำดับดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* ซึ่งมีความสามารถในการถอดรหัสอาร์เอ็นเอที่ทำหน้าที่ขนส่งกรดอะมิโนลิวซีน (Leucine) และฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) โดยบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* จะอยู่ตรงกลางระหว่างยีน *trnL* และยีน *trnF* (ภาพ 2) และบริเวณยีน *trnK-matK* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ทำการสังเคราะห์ขึ้น (ภาพ 3) ซึ่งบริเวณ open reading frame ของยีนนี้จะเกี่ยวข้องกับ group II intron โดยเป็นลำดับที่จะถอดรหัสให้ tRNA ที่จะนำกรดอะมิโนชนิดไลซีน (Lysine) และยีนนี้ยังแสดงให้เห็นอัตราการวิถีของการของลำดับเบสที่สูงกว่ายีนอื่นๆ ในคลอโรพลาสต์ ยีน *matK* มีตำแหน่งอยู่ในส่วนอินทรอน (intron) ของยีน *trnK* ในคลอโรพลาสต์ ยีน *matK* นี้จะแปลงรหัสให้อ่อนaise'm maturaseK

การเปลี่ยนแปลงวิถีของการระดับโมเลกุล (Molecular Evolution)

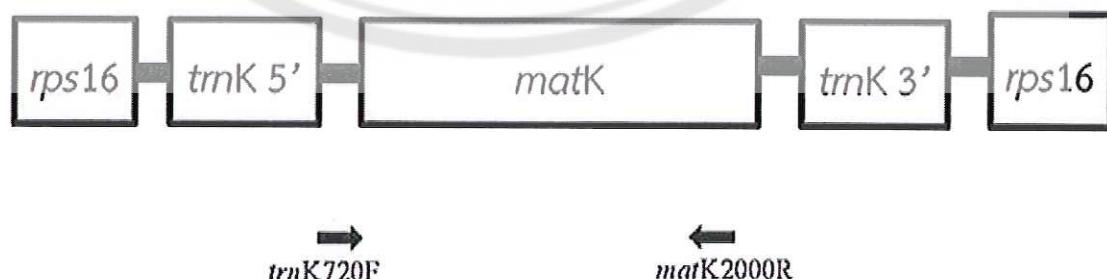
ความรู้ทางวิทยาการด้านชีวิทยาโมเลกุลโดยอาศัยเทคนิคทางด้านโมเลกุลต่างๆ ได้แก่ ไอโอดีเอชเมอร์หรืออัลโลไซเมอร์ เทคนิค RFLPs, RAPD-PCR การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่างๆ (DNA sequencing) ของนิวเคลียดีเอ็นเอ (nuclear DNA), ไม่โทคอนเดรียลตีเอ็นเอ (mtDNA) และคลอโรพลาสต์ตีเอ็นเอ (cpDNA) ซึ่งเทคนิคเหล่านี้มีส่วนส่งเสริมสนับสนุนในการศึกษาชีวิทยาเชิงประชากรและชีวิทยาเชิงวิถีของการ ข้อมูลพื้นฐานทางชีวิทยาเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ด้านการแพทย์ ด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมตลอดจนใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนการอนุรักษ์ทรัพยากรทางพันธุกรรม (ธานินทร์ ภู่พัฒน์, 2538) นอกจากนี้ในปัจจุบันชีวสารสนเทศได้เข้ามา มีส่วนอย่างมากในการบ่งชี้และอนุมานความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากปริมาณข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านนี้มีอยู่เป็นจำนวนมาก อีกทั้งความสามารถในการประมวลผลของคอมพิวเตอร์ที่สูงขึ้น รวมไปถึงขั้นตอน วิธีการและเทคนิคในการหาความสัมพันธ์จากลำดับดีเอ็นเอได้รับการปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพและมีความถูกต้องอยู่ตลอดเวลา การบ่งชี้และการอนุมานความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตมักจะนิยมกระทำโดยการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอเสมอ (รุ่งรัตน์ วงศ์พ่ำน, 2554)



ภาพ 1 ลักษณะดีเอ็นเอองค์กรของคลอโรพลาสต์ในมหงส์ *Nymphaea alba* ที่มา <http://mbe.oxfordjournals.org/content/21/7/1445/F1.expansion>



ภาพ 2 กล้องกลาสต์ดีเจ็นแอนบริเวนระหว่างยืน *trnL* -E



ภาพ 3 แผนที่ดีเอ็นเอบริเวณยืน *trnK - matK* และบริเวณที่เพรเมอร์เข้าจับ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Ito (1987) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในอันดับ Nymphaeales โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาคศาสตร์และเรณูวิทยา พบว่า สกุลบัวหลวง (*Nelumbo*) มีความแตกต่างจากสกุลอื่นอย่างชัดเจน และสกุล *Ceratophyllum* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุล *cabomba* ขณะที่พืชในวงศ์บัวสาย (*Nymphaeaceae sensu stricto*) ที่ประกอบไปด้วยสกุลบัวญี่ปุ่น และสกุลอื่นๆ เป็น monophyletic group ผลจากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าอันดับ Nymphaeales ประกอบด้วย 3 วงศ์คือ *Nelumbonaceae* หรือวงศ์บัวหลวง *Nymphaeaceae* หรือวงศ์บัวสาย และ *Ceratophyllaceae* หรือวงศ์บัวหาร่าย โดยสกุล *Brasenia* และ *Cabomba* อาจถูกจัดอยู่ในวงศ์ *Nymphaeaceae* หรืออาจถูกจัดอย่างอิสระในวงศ์ *Cabombaceae* หรืออาจถูกรวมอยู่ในวงศ์ *Ceratophyllaceae* ก็ได้

Les et al. (1991) ทำการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชชั้น 11 ชนิด โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอบริเวณยืน *rbcL* พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มพืชชั้นนำออกได้เป็น 3 อันดับคือ อันดับ Nymphaeales อันดับ Nelumbonales และอันดับ Ceratophyllales โดยอันดับ Nelumbonales และอันดับ Ceratophyllales ถูกแยกออกจากอันดับ Nymphaeales อย่างชัดเจน และภายในอันดับ Nymphaeales ยังสามารถแบ่งได้ออกเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มสกุล *Brasenia* – *Cabomba* และกลุ่มสกุล *Nuphar*, *Barclaya*, *Nymphaea*, *Victoria* และ *Euryale*

Khoshokhan, et al. (2010) ทำการศึกษาลำดับของดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยืน *trnL-F* ซึ่งนิยมนำมาใช้เพื่อจัดจำแนกพืชหลายชนิดในระดับสกุล เช่น พืชสกุล *Pelargonium* (Bakker, et al., 1999) สกุลกระทกรก (*Passiflora*) (Krosnick and Freudenstein, 2005) สกุลบัวสาย (Borsch, et al., 2007) และสกุล *Pseudoroegneria* (Hai-Qing, et al., 2010) การใช้ข้อมูลของดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยืน *trnL-F* ในคลอโรพลาสต์ร่วมกับบริเวณ ITS ในนิวเคลียสซึ่งให้ผลที่ดีในระดับโมเลกุลเข่นกัน ยกตัวอย่างเช่น ในพืชสกุล *Rochelia*

Collinson (1980) ทำการศึกษาลักษณะทางด้านของสัณฐานวิทยาร่วมกับการศึกษาการพัฒนาภายในเมล็ดของพืชในอันดับ Nymphaeales โดยใช้ตัวอย่างพืชในวงศ์บัวหาร่าย (*Cabombaceae*) เปรียบเทียบกับวงศ์บัวสาย พบว่าในวงศ์บัวหาร่ายซึ่งก็คือ *Brasenia schreberi* และ *Cabomba caroliniana* มีลักษณะเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นนอก (outer integument) เป็นแบบ hood-shape ซึ่งพัฒนามาจาก semiannular integument ส่วนในวงศ์บัวสายเกือบทั้งหมดยกเว้นในสกุล *Nuphar* จะมีลักษณะเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นนอกเป็นแบบ cup-shape ซึ่งพัฒนามาจาก annular integument จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาและการพัฒนา

ภายในเมล็ด สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกระหว่างพืชในวงศ์บัวหาร่ายและวงศ์บัวสายได้ และยังสามารถบอกถึงแนวทางของการวิจัยนาการ รวมถึงความสัมพันธ์ของพืชทั้ง 2 วงศ์ได้ เนื่องจากลักษณะลักษณะเปลือกหุ้มเมล็ดซึ่งนอกของวงศ์บัวหาร่ายที่เป็นแบบ hood-shape นั้นมีลักษณะที่เหมือนกับพืชในวงศ์บัวสายในสมัยโบราณ

Les et al. (2004) ทำการทดลองดัดดับตีอีนเอในการศึกษาลูกผสม เช่น การศึกษาพืชสกุลบัวสาย ที่เกิดจากรุ่นลูก F1 ของการผสมระหว่าง *N. gigantea* 'Andre Leu' (แม่พันธุ์) กับ *N. colrata* ที่มีดอกสีขาว (พ่อพันธุ์) และยืนยันการเป็นลูกผสมโดยการศึกษาลำดับตีอีนเอในนิวเคลียส พบร้า ลักษณะของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์จะปรากฏร่วมกันในลูกผสม หลังจากนั้นทำการการศึกษาลำดับตีอีนเอในคลอโรพลาสต์ทำให้ทราบอีกว่า *N. gigantea* เป็นแม่พันธุ์ของลูกผสมจริง

Woods et al. (2005) ได้มีการศึกษาตัวอย่างประชากรของ *Nymphaea odorata* ในตอนเหนือของอเมริกา พบร้าว่า *N. odorata* subsp. 'odorata' และ *N. odorata* subsp. 'tuberose' ทั้งสองชนิดมีลำดับตีอีนเอที่คล้ายคลึงกันมาก ขณะที่ทั้งสองชนิดมีลักษณะรูปทรงของแผ่นใบ และก้านใบที่แตกต่างกัน

Padgett et al. (1999) ทำการศึกษาการจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของบัวญี่ปุ่นขึ้นใหม่ เนื่องจากข้อมูลที่มีอยู่ยังไม่เป็นที่ชัดเจนมากนักในการจัดจำแนกบัวญี่ปุ่น โดยการหาความสัมพันธ์ทางวิจัยนาการที่อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ประกอบกับการหาลำดับตีอีนเอ (DNA sequences) บริเวณยีน *matK* ในคลอโรพลาสต์ และบริเวณ ITS ของ ribosomal DNA ในนิวเคลียส ซึ่งจากการวิเคราะห์ลักษณะสัณฐานวิทยาจำนวน 17 ลักษณะพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มบัวญี่ปุ่นออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ บัวญี่ปุ่นโลกเก่า (old world *Nuphar*) และบัวญี่ปุ่นโลกใหม่ (New world *Nuphar*) โดยบัวญี่ปุ่นในกลุ่มโลกเก่าคือบัวญี่ปุ่นทางฝั่งเอเชีย ได้แก่ *N. microphylla*, *N. pumila*, *N. sinensis*, *N. oguraensis*, *N. japonica* และ *N. lutea* ส่วนบัวญี่ปุ่นโลกใหม่ คือบัวญี่ปุ่นทางฝั่งอเมริกาเหนือ ได้แก่ *N. advena*, *N. ozarkana*, *N. ulvacea*, *N. orbiculata*, *N. sagittifolia*, *N. variegata* และ *N. polysepala*

Padgett (1999) มีการจัดกลุ่มของบัวญี่ปุ่นออกเป็น 2 กลุ่มโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา ลำดับนิวเคลียสไฮดร์บริเวณยีน *matK* (cpDNA) และบริเวณ ITS (nrDNA) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่ม *Nuphar* ที่มีกลีบเลี้ยง 5 กลีบ อับเรณูจำนวนไม่เกินครึ่งหนึ่งของความยาวก้านชูอับเรณู ก้านเกรสรูปเดียว และผลเป็นรูปคนโถ ได้แก่บัวญี่ปุ่นทางฝั่งยุโรเปียกับชนิดทางอเมริกาเหนือคือ *N. microphylla* เพียงชนิดเดียวและ กลุ่ม *Astylus* ที่มีกลีบเลี้ยง 6-12 กลีบ อับเรณูยาว 1-2 เท่า

ของความยาวก้านชูอับเรณู ลักษณะผลกลม ไม่มีก้านเกรสรเพศเมีย เป็นบัวญี่ปุ่นชนิดที่มีการกระจายตัวอยู่ทางอเมริกาเหนือ

Les et al. (1999) ได้ทำการศึกษาการจัดจำแนกพืชในวงศ์บัวสายโดยใช้ลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาจำนวน 68 ลักษณะร่วมกับการศึกษาบริเวณยีน *rbcL*, *matK* และ 18S rDNA พบว่า ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกพืชในวงศ์บัวสายได้ยกเว้นข้อมูลบริเวณ 18S rDNA โดยสามารถแบ่งพืชในวงศ์บัวสายออกได้เป็น 3 วงศ์ย่อยคือวงศ์ย่อย *Nupharoideae* ประกอบด้วยสกุล *Nuphar* วงศ์ย่อย *Barclayoideae* ประกอบด้วยสกุล *Barclaya* และวงศ์ย่อย *Nymphaeoideae* ประกอบด้วยสกุล *Nymphaea*, *Ondinea*, *Victoria* และ *Euryale* ขณะที่วงศ์บัวหาร่ายสามารถแบ่งได้เป็น 2 วงศ์ย่อยคือ วงศ์ย่อย *Cabomboideae* และวงศ์ย่อย *Hydropeltoideae*

Les (2002) กล่าวว่าอันดับ *Nymphaeales* ถูกแบ่งทางอนุกรมวิธานได้เป็น 2 วงศ์คือ *Cabombaceae* (วงศ์บัวหาร่าย) และ *Nymphaeaceae* (วงศ์บัวสาย) โดยที่วงศ์บัวหาร่ายประกอบด้วย 2 สกุลคือ *Brasenia* และ *Cabomba* ซึ่งมีทั้งหมด 6 ชนิด ส่วนวงศ์บัวสายประกอบด้วย 6 สกุลคือ *Nymphaea*, *Nuphar*, *Victoria*, *Euryale*, *Barclaya* และ *Ondinea* ซึ่งมีประมาณ 75 ชนิด โดยการวิจัยเก่าๆ ได้รวมวงศ์บัวหลวง (*Nelumbonaceae*) ไว้ในอันดับนี้ด้วย แต่การศึกษาในปัจจุบันที่ใช้ดีเอ็นเอได้แสดงให้เห็นแล้วว่าวงศ์บัวหลวงไม่ได้อยู่ในกลุ่มนี้

Slocum (2005) กล่าวว่าบัวสกุลวิคตอเรียมีลักษณะหลายประการที่สามารถแยกความแตกต่างออกจากบัวสกุลอื่นได้คือ ทุกส่วนของบัววิคตอเรียมีหนามแหลมทั้งด้านล่างของแผ่นใบ ลำต้น และบริเวณด้านนอกของตา ยกเว้นใน *Victoria cruziana* ที่ไม่มีหนามบนกลีบเลี้ยง และดอกของบัววิคตอเรียเปลี่ยนสีในหนึ่งวัน ซึ่งเป็นลักษณะเด่นในการ辨ของดอก โดยวันแรกที่นานดอกจะมีสีขาวไปจนถึงช่วงใกล้ค่ำและยังคงบานไปจนถึงช่วงสายของวันที่สองดอกจะเป็นสีชมพูหรือค่อนข้างแดง บัววิคตอเรียมีขนาดใหญ่ต้องการพื้นที่ในการเจริญอย่างน้อย 15 ฟุต (4.5 เมตร) บัววิคตอเรียจะเจริญได้ที่อุณหภูมิของน้ำ 75 องศา Fahrén ไฮต์ (24 องศาเซลเซียส) หรือมากกว่า โดยที่ *V. amazonica* จะมีความอ่อนไหวต่ออุณหภูมิของน้ำมากกว่า *V. cruziana*

Muhammad et al. (2010) ได้ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบัวริอาร์เพ็บว่า บัวริอาร์เป็นไม้ล้มลุกปีเดียว (annual herb) มีหนามจำนวนมาก มีเหง้าสั้นและหนา ใบมีขนาด 25 - 120 เซนติเมตร ซึ่งมีลักษณะแบบเป็นแผ่น เมื่อโตเต็มที่จะเป็นแผ่นกลม โดยพื้นผิวด้านบนใบจะมีเสี้ยวเข้มลักษณะย่น เส้นใบเป็นแบบตาข่าย มียางและขนอ่อน ส่วนพื้นผิวด้านล่างเป็นสีม่วง ซึ่งทั้งสองด้านของใบจะมีหนามยาว 3 - 6 มิลลิเมตร รวมถึงที่ก้านใบตัวย กลีบเลี้ยง 4 กลีบ ยาว 3 เซนติเมตร ผิวเกลี้ยงและเต็มไปด้วยหนาม กลีบดอกยาว 2 เซนติเมตร ด้านในเป็นสีม่วง ส่วนด้านนอก

เป็นสีเขียว ยอดเกสรเพศเมียคล้ายรูปจาน (stigma discoid) รังไข่ฝังอยู่ในฐานรองดอกที่หนาเรียกว่า ทอรัส (torus) และตำแหน่งรังไข่อยู่ใต้ฐานรองดอก ส่วนผลเป็นรูปทรงกรวยและมีกลีบเลี้ยงติดจนเป็น ผล (persistent calyx)



วิธีดำเนินงานวิจัย

การเก็บตัวอย่างพืชในวงศ์บัวสาย

เก็บใบอ่อนของบัวในวงศ์บัวสาย (*Nymphaeaceae*) ทั้งหมดจำนวน 57 ตัวอย่างมาใช้ในการวิเคราะห์ผล รวมไปถึงใช้ *Cabomba caroliniana* และ *Brasenia schreberi* เป็น Outgroups (ตาราง 1)

ตาราง 1 ตัวอย่างพืชในวงศ์บัวสายและวงศ์ใกล้เคียง

No.	Specimens	Petal color	Blooming time	Source	ชื่อภาษาไทย/ชื่อท้องถิ่น
1	<i>Victoria cruziana</i> d'Orbigny1	white – pink	Night	Bangkok	บัวกระดัง
2	<i>V. cruziana</i> d'Orbigny2	white – pink	Night	Bangkok	บัวกระดัง
3	<i>V. amazonica</i> (Poeppig) Sowerby	white – pink	Night	Bangkok	บัวกระดัง
4	<i>Euryale ferox</i> Salisb.	blue	Day	Bangkok	บัวดาด
5	<i>Euryale</i> sp.1	NA	Day	Bangkok	บัวดาด
6	<i>Euryale</i> sp.2	NA	Day	Bangkok	บัวดาด
7	<i>Nuphar japonica</i> de Candolle1	yellow - red	Day	Bangkok	บัวญี่ปุ่น
8	<i>Nu. japonica</i> de Candolle2	yellow - red	Day	Bangkok	บัวญี่ปุ่น
9	<i>Nu. pumila</i> (Timm) Beal	yellow	Day	Bangkok	บัวญี่ปุ่น
10	<i>Nuphar</i> . sp.	yellow	Day	Bangkok	บัวญี่ปุ่น
11	<i>Nu. advena</i> (Aiton) W.T. Aiton	yellow	Day	Bangkok	บัวญี่ปุ่น
12	<i>Barclaya longifolia</i> Wallich1	red - violet	NA	Bangkok	ไส้ปลาไหล
13	<i>B. longifolia</i> Wallich2	NA	NA	Bangkok	ไส้ปลาไหล
14	<i>Nymphaea pubescens</i>	white - pink	Night	Bangkok	ขาวชมพูเล็กใบอ้า
15	Willdenow1	pink	Night	Sa – Kaeo	ชมพูสรวงแก้ว
16	<i>N. pubescens</i> Willdenow2	white-pink	Night	Phitsanulok	บัวกินสาย
17	<i>N. pubescens</i> Willdenow3	red	Night	Bangkok	บัวแดง
18	<i>N. rubra</i> Roxb.	pink	Night	Bangkok	ชมพูลินจง
19	<i>N. lotus</i> 'Linjong'	white	Night	Bangkok	ขาวสวนหลวง
20	<i>N. lotus</i> Linnaeus	NA	NA	AM422053	NA

No.	Specimens	Petal color	Blooming time	Source	ชื่อภาษาไทย/ ชื่อท้องถิ่น
21	<i>N. petersiana</i> Klotzsch.	deep yellow	Day	Bangkok	บัวผึ้ง
22	<i>N. maxicana</i> Zuccarini1	yellow	Day	AM422063	บัวผึ้ง
23	<i>N. maxicana</i> Zuccarini2	white	Day	Chonbury	บัวผึ้ง
24	<i>N. alba</i> L.	white	Day	Chonbury	NA
25	<i>N. tetragona</i> Georgi.	NA	NA	Chonbury	NA
26	<i>N. immutabilis</i> S.W.L. Jacobs	white	Day	Chonbury	บัวอสเตรเลีย
27	<i>N. atrans</i> S.W.L. Jacobs	white – pink	Day	Chonbury	บัวอสเตรเลีย
28	<i>N. violacea</i> Lehm.	NA	Day	Chonbury	บัวอสเตรเลีย
29	<i>N. capensis</i> Thunberg 1	dark violet	Day	Bangkok	สุรัสโนบล
30	<i>N. capensis</i> Thunberg 2	blue	Day	Bangkok	สุรัสโนบล
31	<i>N. nouchali</i> Burman f. 1	pale blue	Day	Lampang	บัวเพื่อน
32	<i>N. nouchali</i> Burman f. 2	white – pale blue	Day	Rayong	บัวผัน
33	<i>N. nouchali</i> Burman f. 3	white – pale blue	Day	Phitsanulok	บัวผัน
34	<i>N. cyanea</i> Roxb.1	violet	Day	-	บัวขาน
35	<i>N. cyanea</i> Roxb.2	dark violet	Day	Phayao	บัวขาน
36	<i>N. minuta</i>	white	Day	Chonbury	บัวจิว
37	<i>N. colorata</i> Peter	violet	Day	Bangkok	NA
38	<i>N. micrantha</i> Guill. And Perr.	NA	NA	Chonbury	NA
39	<i>N. stellata</i> Willd.1	violet	Day	Rayong	บัวเพื่อน
40	<i>N. stellata</i> Willd.2	white	Day	Phayao	บัวเพื่อน
41	<i>N. 'King of Siam'</i>	violet	All	Bangkok	ฉลองขวัญ
42	<i>N. 'Jongkolnee'</i>	light pink	Day	Bangkok	จงกลนี
43	<i>N. 'Sunrise'</i>	yellow	Day	Bangkok	บัวผึ้ง
44	<i>N. 'Royal Purple'</i>	violet	All	Chonbury	ม่วงกั้ตติย์
45	<i>Nymphaea</i> sp.1	NA	NA	Bangkok	บัวใต้น้ำ
46	<i>Nymphaea</i> sp.2	NA	NA	Chonbury	บัวลูกผสม
47	<i>N. 'Violet Nang kwak'</i>	violet	NA	Phitsanulok	บัวนางกวักม่วง
48	<i>N. 'White Nang Kwak'</i>	white	NA	Phitsanulok	บัวนางกวักขาว
49	<i>N. 'violacea X atrans'</i>	NA	NA	Chonbury	บัวลูกผสม

No.	Specimens	Petal color	Blooming time	Source	ชื่อภาษาไทย /ชื่อท้องถิ่น
50	<i>N. amazonum</i> Mart. And Zucc.	NA	NA	AM422026	NA
51	<i>N. jamesoniana</i> Planch	NA	Night	DQ 185544.1	NA
52	<i>N. novogratensis</i> Wiersema	NA	Night	DQ 185545.1	NA
53	<i>N. oxypetala</i> Planch	NA	Night	DQ185546. 1	NA
54	<i>N. rudgrena</i> G.Mey.	NA	NA	Chonbury	NA
55	<i>Ondinea purpurea</i> Hartog	blue -violet	Day	DQ 185538.1	NA
56	<i>Brasenia schreberi</i> J.F. Gmel	NA	Night	Bangkok	water shield
57	<i>Cabomba caroliniana</i> A. Gray	NA	Night	Bangkok	บัวสาหร่าย

*NA= ไม่มีข้อมูล

เครื่องมือที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการดำเนินงานวิจัย

- ตู้เก็บรักษาตัวอย่าง (deep freezer -20 องศาเซลเซียส)
- โกร่งบดตัวอย่าง
- หลอด microcentrifuge ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร
- ไมโครพิเพต (micropipette) ขนาดต่างๆ
- Disposable tip
- เครื่องซั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
- เครื่องหมุนเหวี่ยงแรงหนีศูนย์กลาง (centrifuge)
- เครื่อง Vortex mixer
- Water-bath
- เครื่องปั่นตกตะกอน
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
- เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven)
 - เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR eppendorf Mastercycler Personal)
 - เครื่องอิเล็กโทรโฟเรซ (electrophoresis)
 - เครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต

- อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ถุงมือ ปากคิบ ข้อนตักสาร กระดาษซั่งสาร ปากกาเคมี ถุงพลาสติก อลูมิเนียมฟอลย์ แท่งแก้วคนสาร มีดผ่าตัด ระบบอุกตัว บีกเกอร์

2. สารเคมีที่ใช้สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

- 1X CTAB buffer (1% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris)
- β -mercaptoethanol
- Chloroform
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- Chloroform : Isoamylalcohol (24:1)
 - 10 mg/ml RNase A (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 15 mM NaCl)
 - 3M Sodium acetate PH 5.5
- 70% Ethanol
- Absolute ethanol
 - TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)
 - 50X TAE buffer (0.4 M Tris-HCl PH 8.0, Glacial acetic acid, 0.5 M EDTA pH 8.0)
- Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA)

3. สารเคมีที่ใช้สำหรับปฏิกริยาพีซีอาร์

- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- Master Mix (Promega)
- GoTaq® Green Master Mix (Promega)
- ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์

4. สารเคมีที่ใช้สำหรับการทำอิเล็ก tro-ฟริชีส

- 50X TAE buffer (0.4 M Tris-HCl PH 8.0, Glacial acetic acid, 0.5 M EDTA pH 8.0)
 - Agarose powder
 - Ethidium bromide

- Marker 1kb DNA Ladder (RBC) และ 1kb DNA Ladder (Sibenzyme)
- 6X DNA Loading Dye (Fermentas)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การสกัดดีเอ็นเอจากใบบัว

ทำการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างของพืชในวงศ์บัวสายจากใบอ่อนและตัวอย่างแห้งโดยใช้วิธี CTAB method 2 วิธีคือ

1.1. การสกัดดีเอ็นเอโดยตัดเปล่งมาจาก Agrawal (Agrawal, et al., 1992) มีวิธีการดังนี้

1. ทำการซึ่งตัวอย่างใบของพืชในวงศ์บัวสาย 50 มิลลิกรัม แล้วนำบดให้ละเอียดในไมโครเจนเลว แล้วใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มี 1X CTAB buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และ β -mercaptoethanol 10 ไมโครลิตร

2. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที โดยผสมกลับหลอดไปมาทุกๆ 10 นาที

3. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

4. เติม chloroform ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เพื่อตอกตะกอนโปรตีน กลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง

5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนที่ใสด้านบนใส่ microcentrifuge หลอดใหม่

6. นำสารละลายที่ได้มาเติม RNase A ปริมาตร 5 ไมโครลิตรและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

7. จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง แล้วนำกลับไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที

8. ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ทำซ้ำตามข้อ 7 อีก 1 รอบ

9. นำสารละลายที่ได้มาเติม sodium acetate ปริมาตร 1/10 ของสารละลายที่มีอยู่ แล้วเติม absolute ethanol 2 เท่า ของสารละลายที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากัน

10. บ่มที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 60 นาที

11. นำไปปั่นให้วิ่งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทสาระลามัยส่วนใสทึ้ง เก็บตะกอนไว้

12. ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้ตะกอนหลุดแล้วนำไปปั่นให้วิ่งที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวทึ้ง ทำซ้ำอีก 1 รอบ

13. ทิ้งตะกอนให้แห้งในอากาศ แล้วเติม TE buffer ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร

14. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งานต่อไป

1.2. การสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (Doyle and Doyle, 1987) มีวิธีการดังนี้

1. ทำการซึ่งตัวอย่างใน 50 มิลลิกรัม มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวแล้วใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มี 2X CTAB buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร

2. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ผสมกลับหลอดไปมาทุกๆ 10 นาที

3. เติม chloroform : isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดเบาๆ

4. จากนั้นนำไปปั่นให้วิ่งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. ดูดสารละลามัยส่วนที่ใสเด้านบนใส่หลอดใหม่ทำซ้ำขั้นตอน 3-4 ซ้ำอีก 2 รอบ

6. ทำการเติม isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เพื่อตักตะกอนดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. นำไปปั่นให้วิ่งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

8. เทสาระลามัยส่วนที่เป็น isopropanol ทิ้งแล้วเติม 80% Ethanol ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปปั่นให้วิ่งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (ทำซ้ำอีก 2 รอบ)

9. เท 80% Ethanol ทิ้ง ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. ละลายตัวกอนดีเอ็นเอใน TE buffer 50 ไมโครลิตร และเติม RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

11. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งานต่อไป
2. การตรวจสอบปริมาณและการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีของการ์สเจลอะลีกโพรไฟลิชิส

 1. เตรียมตัวสำหรับเทเจลและหวีให้เรียบร้อย
 2. ซึ่งผงของการ์ส 0.8 กรัม ในขวดรูปชามพู่แล้วเติม 1X TAE buffer 100 มิลลิลิตร
 3. ละลายของการ์สโดยใช้ microwave เขย่าเป็นครั้งคราวให้ agarose ละลาย วางที่ไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้
 4. เมื่อของการ์สแข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึงหวีออก จะได้หลุมสำหรับใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอ แล้วนำไปวางในเครื่องสำหรับทำอะลีกโพรไฟลิชิส
 5. เท 1X TAE buffer ลงไป ให้สูงกว่าผิวของการ์สเล็กน้อย
 6. ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ loading dye แล้วหยดลงในหลุม (well)
 7. เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟ (power supply) ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที หรือจนกว่าสี bromophenol blue จะเคลื่อนห่างจากจุดเริ่มต้นพอสมควร
 8. นำของการ์สมาย้อมโดยใช้สารละลาย ethidium bromide นาน 5-10 นาที ตรวจดูແບดีเอ็นเอด้วยเครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator)

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวที่มีผู้ศึกษาจากบัวสายชนิดอื่นๆ จากนั้นนำมาตรวจสอบขนาดของແບดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ด้วยวิธีของการ์สเจลอะลีกโพรไฟลิชิสที่มีความเข้มข้นของของการ์สเจล 1% ในกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์

ตาราง 2 ลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์ของไฟรเมอร์แต่ละตำแหน่ง

ไฟรเมอร์	ตำแหน่ง	ลักษณะลำดับดีเอ็นเอ
<i>trnL-F intergenic spacer (c-f)</i>	Forward primer	5'- GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC -3'
<i>trnK 720F</i>	Reverse primer	5,- ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG -3'
<i>matK 2000R</i>	Forward primer	5'- ATA ACC CAA GAA ATC CTC CC -3'
	Reverse primer	5'- GAT TTC TGC ATA TCC ACC CG -3'

ตาราง 3 อุณหภูมิและเวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Initial denaturation	94	1	1
2. Denaturation	94	1.30	
Annealing	55	2	
Extension	72	3	
3. Final extension	72	10	1

ตาราง 4 ความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ความเข้มข้นของสาร	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
5X Go Taq buffer	10	1X
25 mM mgcl ₂	3	1.5 mM
10 mM dNTPs	1	0.2 mM
10 mM Forward primer	1	0.2 mM
10 mM Reverse primer	1	0.2 mM
5 U/μl Go Taq DNA Polymerase	0.2	1 U/μl
DNA template	1	50 -100 ng
Distill water	32.8	
	50	

4. การทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์และหาลำดับดีเอ็นเอ

เมื่อได้ขนาดແแนบดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว นำมาทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ Wizard® SV Gel and PCR Clean-up system (USA) จากนั้นนำไปหาลำดับดีเอ็นเอต่อไปโดยใช้ forward primer และ reverse primers ข้างต้น โดยมีขั้นตอนตามวิธีมาตรฐานของบริษัท Promega ดังนี้

- นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์มาแยกขนาดด้วยวิธีอเล็กโตรโพรีซิสโดยใช้ 1XTAE buffer ที่เตรียมใหม่

2. นำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอด เพื่อตรวจสอบแบบดีเอ็นเอที่ต้องการ แล้วทำการตัดแบบดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ซึ่งน้ำหนักหลอดเปล่าไว้แล้ว
3. จากนั้นนำหลอด microcentrifuge ที่มีชิ้นเจลไปซึ่งน้ำหนักอีกรั้งเพื่อหาน้ำหนักของเจล
4. เติม Membrane Binding Solution 10 ไมโครลิตร/10 มิลลิกรัม ของเจลที่ตัดได้
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะถาวร化
6. นำ SV minicolumn ใส่ใน collection tube แล้วเติมสารละลายเจลที่ได้ลงไปในเครื่อง SV minicolumn
7. ปั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับ membrane
8. จากนั้นนำไปปั่นให้เร็วที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทของเหลวใน collection tube ทิ้ง
9. เติม Membrane Wash Solution ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอแล้วนำไปปั่นให้เร็วที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทของเหลวใน collection tube ทิ้ง
10. เติม Membrane Wash Solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ซ้ำ เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอให้สะอาด แล้วนำไปปั่นให้เร็วที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทของเหลวที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง
11. นำไปปั่นให้เร็วอีก 1 นาที เพื่อให้สารละลายที่ใช้ในการล้างตะกอนหมดไปจากตะกอนดีเอ็นเอที่เมมเบรน จากนั้นย้าย SV minicolumn ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่
12. จากนั้นเติม Nuclease Free Water ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร ใส่ตรงกลาง column บนแผ่นเมมเบรนพอดี เพื่อละลายดีเอ็นเอ
13. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นให้เร็วที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
14. นำไปตรวจสอบขนาดและความเข้มข้นด้วยวิธีของการสแกนโฟร์ไซต์

ข้อสังเกต ถ้าขึ้นส่วนดีอี็นเอมีเพียงหนึ่งແບບให้เริ่มทำข้อ 4 ได้เลยโดยเดิม Membrane Binding Solution ปริมาตร 1 เท่าของสารที่มีอยู่ แล้วขั้นตอนของข้อ 5 ไปยังข้อ 6 และข้อต่อๆ ไปตามขั้นตอนข้างต้น

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อได้ลำดับดีอี็นเอที่สมบูรณ์และถูกต้องทุกตัวอย่างแล้ว นำมำจัดเรียงทุกตัวอย่างในแต่ละบริเวณ (alignment) โดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6.002 (Nicholas and Nicholas, 1997) และ ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) และวิเคราะห์ร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยาเพื่อเปรียบเทียบ phylogenetic tree ที่มีความตีมากที่สุด



ก บก
บดส
.๕๒
ม.๒๔๘
๒๖๖๑

๖๗๗๔๓๓๙

๑๒ มิ.ย ๒๕๕๘



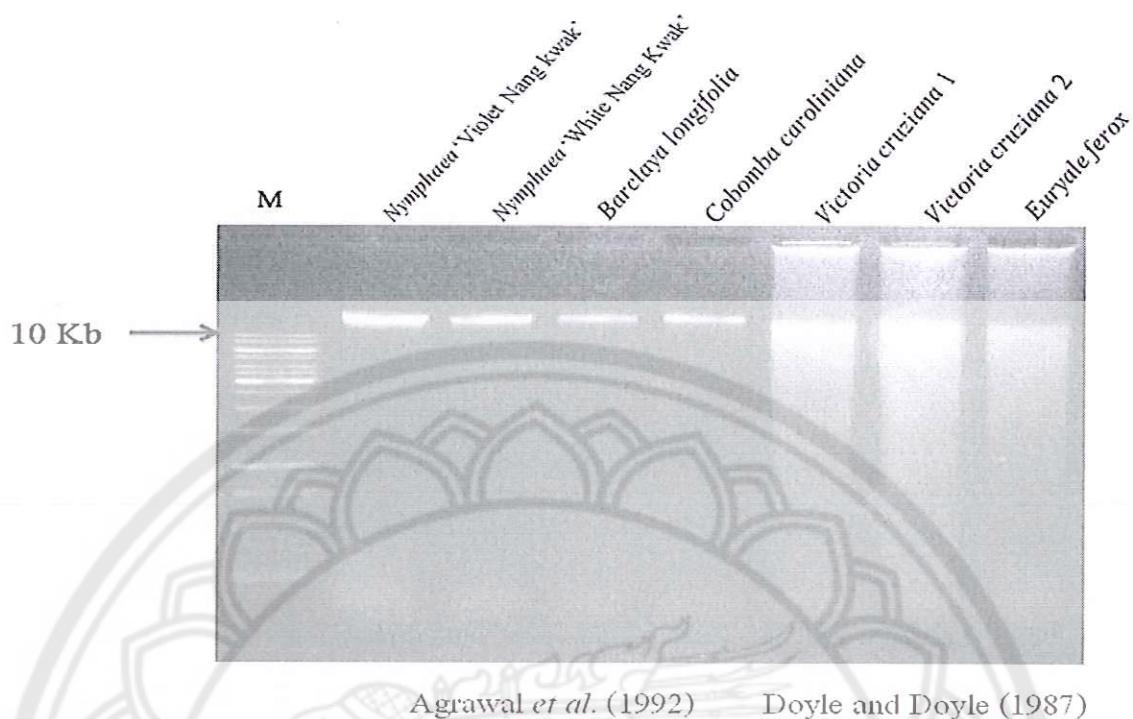
ผลการวิจัย

การสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโพริชีส

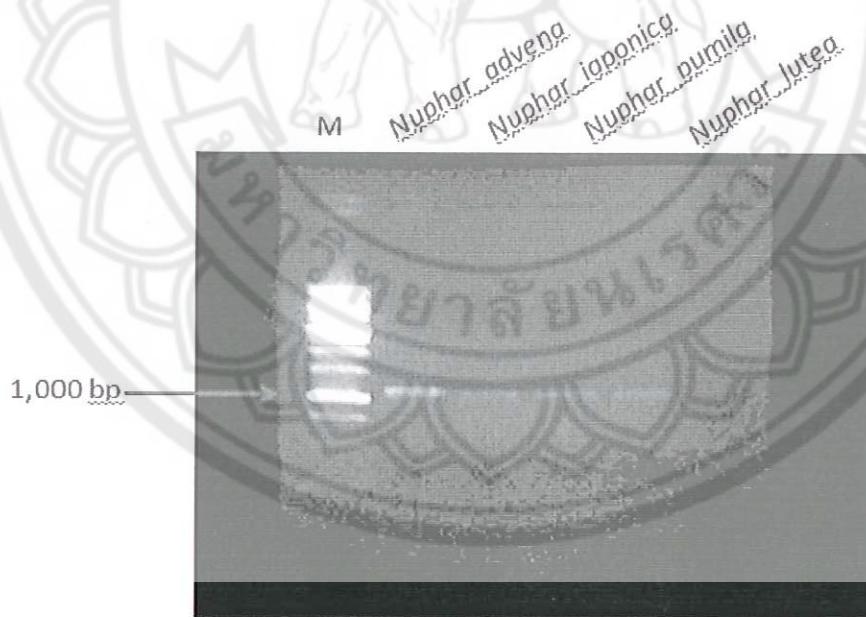
นำตัวอย่างสตูดใบอ่อนของพืชในวงศ์บัวสาย และตัวอย่างใบอ่อนแห้งที่เก็บรักษาไว้ในซิลิกาเจล มาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วย 2 วิธีคือ การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB Method ที่ดัดแปลงมาจาก Agrawal *et al.*, (1992) ใช้ในการสกัดตัวอย่างสตูด และการสกัดดีเอ็นเอจากใบพืชด้วยวิธีดัดแปลงของ Doyle and Doyle (1987) ใช้ในการสกัดตัวอย่างแห้ง พบว่าสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีดัดแปลงของ Agrawal *et al.*, (1992) มีลักษณะใส ไม่มีสี ส่วนสาร ละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีดัดแปลงของ Doyle and Doyle (1987) มีลักษณะเป็นสีเหลืองใส เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโพริชีสบนօกาโรสเจล 0.8% พบว่าแบบของดีเอ็นเอที่สกัดได้มีขนาดใหญ่มากกว่า 10 กิโลเบส หรือ 10,000 คู่เบส ดังนั้นจะเห็นได้ว่าแบบของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีดัดแปลงของ Agrawal *et al.*, (1992) ปรากฏเป็นแบบชัดเจน ในขณะที่แบบของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีดัดแปลงของ Doyle and Doyle (1987) จะปรากฏเป็นรอย smear ซึ่งคาดว่าจะเกิดจากการแตกหักของดีเอ็นเอในปริมาณมาก (ภาพ 4)

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

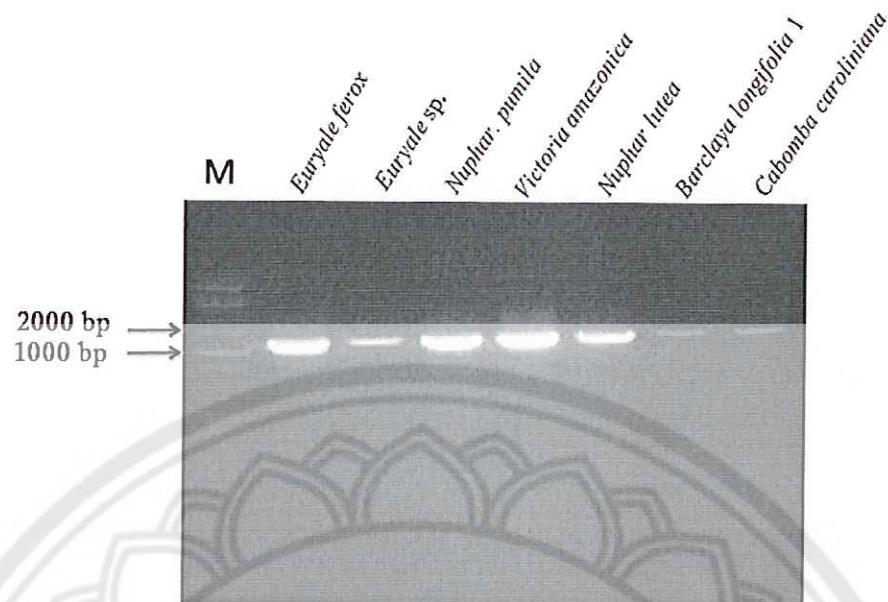
จากการนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ และใช้อุณหภูมิในชั้น annealing ๕๕ องศาเซลเซียส พบว่าบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* มีขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 1,000 - 1,100 คู่เบส (ภาพ ๕) ส่วนบริเวณบางส่วนของยีน *trnK-matK* มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1300 คู่เบส (ภาพ ๖) ในทุกตัวอย่าง แล้วตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโพริชีสบนօกาโรสเจล ๑% พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการได้ในปริมาณมาก แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ใช้กับบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* และบริเวณบางส่วนของยีน *trnK-matK* มีความจำเพาะเจาะจง เนื่องจากไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดจากการจับของไพรเมอร์แบบไม่จำเพาะเจาะจง (non - specific product) เกิดขึ้นเลย และสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยานั้นก็เหมาะสมดีแล้ว รวมถึงส่วนผสมในปฏิกิริยาที่เหมาะสมเช่นกัน เนื่องจากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไม่เกิดทั้ง non-specific band และ primer dimer



ภาพ 4 ลักษณะแอบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธี CTAB Method โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (fermentas)



ภาพ 5 ลักษณะของแอบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Fermentas)

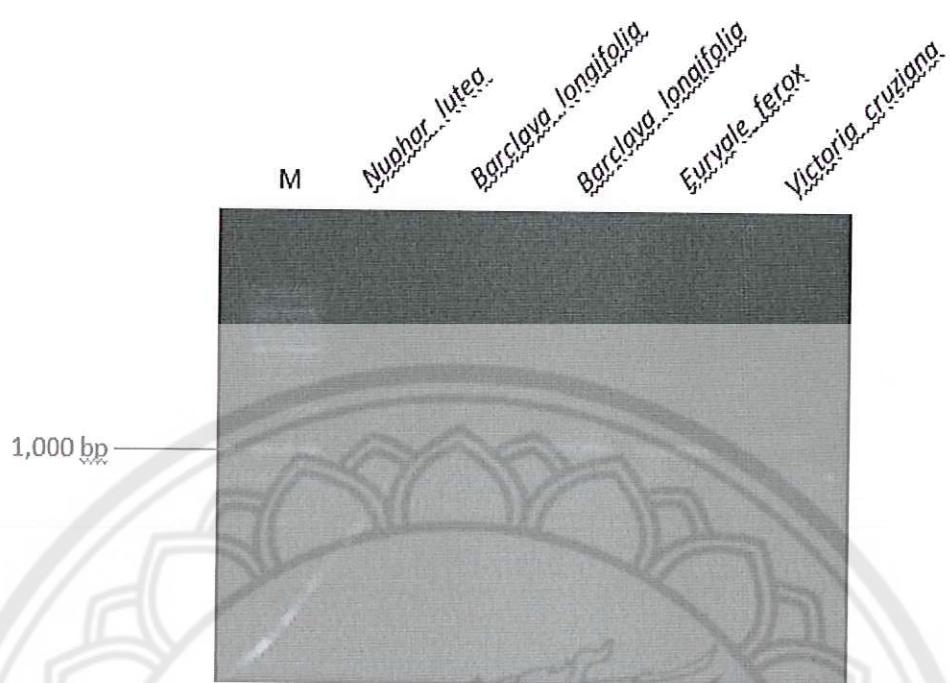


ภาพ 6 ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบางส่วนของยีน *trnK-matK*

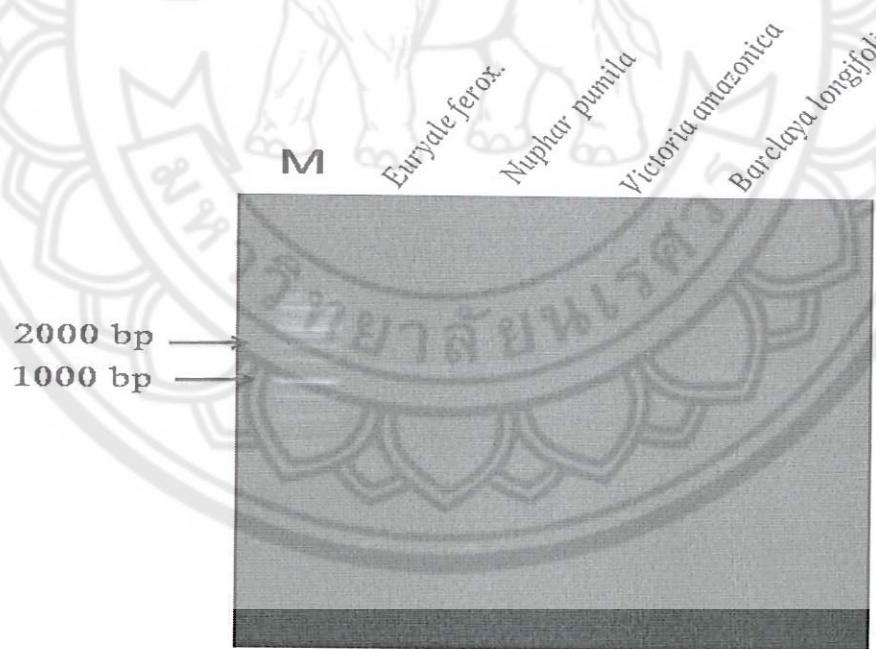
ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (fermentas)

โดยแต่ละแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความสว่างไม่เท่ากันนั้นก็เนื่องมาจากปริมาณของดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มด้วยเทคนิคพีซีอาร์นี้มีปริมาณไม่เท่านั้น เกิดจากความจำเพาะของไพรเมอร์ที่เข้าทำการเพิ่มปริมาณ เพราะไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ออกแบบมาจากลำดับดีเอ็นเอของบัวสายที่มีผู้อื่นเคยศึกษาไว้แล้ว ดังนั้นในบางตัวอย่างที่มีความสัมพันธ์ทางวิถีมากกับบัวสาย ก็อาจมีความสว่างของแถบดีเอ็นเอน้อยซึ่งก็คือเพิ่มปริมาณขึ้นส่วนดีเอ็นเอได้น้อยนั่นเอง จึงต้องทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในครั้งต่อๆ ไปเพื่อให้ได้ปริมาณขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพียงพอต่อการใช้งานต่อไป การทำให้ขึ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์

จากการนำขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Wizard® SV Gel and PCR Clean-up system (USA) เพื่อทำให้ขึ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์มากขึ้น เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป หลังจากทำให้ขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้บริสุทธิ์แล้วนำไปตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนօกาโรสเจล 1% พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละตัวอย่างจะมีความสว่างไม่เท่ากันเนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์นั้นแตกต่างกัน (ภาพ 7-8) จะสังเกตได้ว่าเมื่อปริมาณของดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์มีน้อย ขึ้นส่วนตัวอย่างของดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์จะมีปริมาณของดีเอ็นเอน้อยด้วย เช่นเดียวกัน บางครั้งต้องนำขึ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากหลายๆ หลอดมารวมกันจึงจะสามารถได้ปริมาณดีเอ็นเอหลงทำให้บริสุทธิ์แล้วมากพอนำไปใช้งานต่อไป



ภาพ 7 ลักษณะของแอบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณบริเวณ *trnL-F* ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดย M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Sibenzyme)



ภาพ 8 ลักษณะแอบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณบริเวณ *trnK-matK* ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (fermentas)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

เมื่อนำชุดข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการหาลำดับดีเอ็นเอโดยบริษัท Macrogen Inc. ประเทศไทยได้ มาจัดเรียง (alignment) ด้วยมือโดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6.002 (Nicholas and Nicholas, 1997) และตรวจสอบการจัดเรียงด้วยโปรแกรม ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ทางวิวัฒนาการด้วยการวิเคราะห์ Maximum Parsimony โดยใช้โปรแกรม MEGA5.2 (Tamura *et al.*, 2011)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากดีเอ็นเอบีโวน *trnL-F*

ความยาวของลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากการบีโวนระหว่างยืน *trnL-F* ของตัวอย่างมีขนาดตั้งแต่ 991 (*Barsenia schreberi*) - 1095 (*Victoria cruziana X amazonica*) คู่เบส และเมื่อทำการจัดเรียงลำดับดีเอ็นเอทั้งหมด 43 ตัวอย่าง โดยรวมตัวอย่างบัววงศ์อื่นเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ ซึ่งจากตัวอย่างทั้งหมดดังกล่าวเมื่อนำมาจัดเรียงแล้วจะมีความยาว 1291 คู่เบส โดยผลจากการวิเคราะห์ด้วย Maximum parsimony พบว่า Phylogenetic tree ที่ได้มี 2 topology มีค่า tree length เท่ากับ 179 โดย topology ทั้งสองแบบมีความแตกต่างกันอยู่ 2 บริเวณ คือ สกุลย่อย *Nymphaea* ใน topology แบบที่ 1 *N. tetragona* แยกออกจากสมาชิกอื่นๆ ส่วนใน topology แบบที่ 2 *N. tetragona* จะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *N. alba*, *N. odorata* และ *Nymphaea ‘Sunrise’* และ *Nymphaea ‘King of Siam’* กับ *N. peterziana* ใน topology แบบที่ 1 จะอยู่ระหว่างสกุลย่อย *Lotos* และสกุลย่อย *Hydrocalis* ส่วนใน topology แบบที่ 2 จะอยู่ในสกุลย่อย *Lotos* โดยแยกออกมาเป็นกลุ่มแรก จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลเป็น Consensus tree เพื่อร่วมข้อมูลจากทั้ง 2 topology และจากการจัดเรียงลำดับดีเอ็นเอพบตำแหน่งของลำดับดีเอ็นเอที่มีความคงที่ (conserved sites) เท่ากับ 964 คู่เบส (74.67%) (ภาพ 9A) มีลำดับดีเอ็นเอที่มีความผันแปรทั้งสิ้น 327 คู่เบส (25.33%) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นลำดับดีเอ็นเอที่ใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการหรือ Phylogenetically informative site เท่ากับ 185 คู่เบส (14.33%) (ภาพ 9B) และลำดับดีเอ็นเอที่พบเฉพาะเพียงตัวอย่างเดียว (singleton) เท่ากับ 141 คู่เบส (10.92%) (ภาพ 9C)

โดยพบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็นการแทนที่ในส่วนขาดหายไป และการเพิ่มเข้ามาของเบส ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้พีซีบีวีที่มีผู้ค้นพบว่าพีซีบีวีมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพีซีบีวี (Collinson, 1980) และเมื่อทำการพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจะเห็นได้ว่าสามารถจำแนกพีซีบีวีออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มของบัวญีปุ่น กลุ่มไส้ปลาไหล และกลุ่มของบัวสาย ญูริอาเร่ บัวกระดัง และอนดินีเนียอยู่ร่วมกัน (ภาพ 10)

A B C

ภาพ 9 ลำดับดีเอ็นเอที่มีความคงที่ (A) ลำดับดีเอ็นเอที่บอกสายสัมพันธ์ทางวิถีนาการ (B) และ ลำดับดีเอ็นเอที่พบเฉพาะเพียงตัวอย่างเดียว (C)

จะเห็นได้ว่าสกุลบัวญี่ปุ่นเป็นกลุ่มแรกที่แยกออกจากในสายวิวัฒนาการของบัวทั้งหมด ในวงศ์บัวสายด้วยค่า bootstrap support ที่สูง (99%) โดยมีสมาชิกประกอบไปด้วย *Nuphar advena*, *Nu. japonica*, *Nu. pumila* และ *Nu. lutea* กลุ่มที่ 2 คือ สกุลไส้ปลาไหลประกอบไปด้วย *Barclaya longifolia* ที่ถูกสนับสนุนด้วยค่า bootstrap support ที่สูง (99%) และกลุ่มสุดท้ายประกอบไปด้วย 4 สกุล ที่ถูกสนับสนุนด้วยค่า bootstrap support ที่สูง (99%) เช่นเดียวกับกลุ่มของบัวญี่ปุ่นและไส้ปลาไหล คือ สกุลบัวจଡ ได้แก่ *Euryale ferox* สกุลที่ 2 คือ สกุลอนันติเนีย ได้แก่ *Ondinea puperea* สกุลที่ 3 คือ สกุลบัวกระดัง ได้แก่ *Victoria cruziana* *V. cruziana* × *V. amazonica* และ และสกุลบัวสาย (*Nymphaea*) ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 สกุลย่อย ได้แก่ สกุลย่อย *Lotos*, *Hydrocalis*, *Nymphaeae*, *Anecphya* และสกุลย่อย *Brachycera*

สกุลย่อย *Lotos* ประกอบไปด้วย *N. pubescens* (กลีบดอกสีชมพูเข้ม), *N. pubescens* (กลีบดอกสีชมพูอ่อน), *N. pubescens* (กลีบดอกสีชมพูอ่อน), *N. lotus* ‘Linjong’ และ *N. rubra*

สกุลย้อย *Hydrocalis* ประกอบไปด้วย *N. amazonum*, *N. jamesoniana*, *N. novogranatensis*, *N. oxypetala* และ *N. rudgena*,

สกุลย์อย *Anecphya* ประกอบไปด้วย *N. atrans*, *N. elleniae*, *N. immutabilis*,

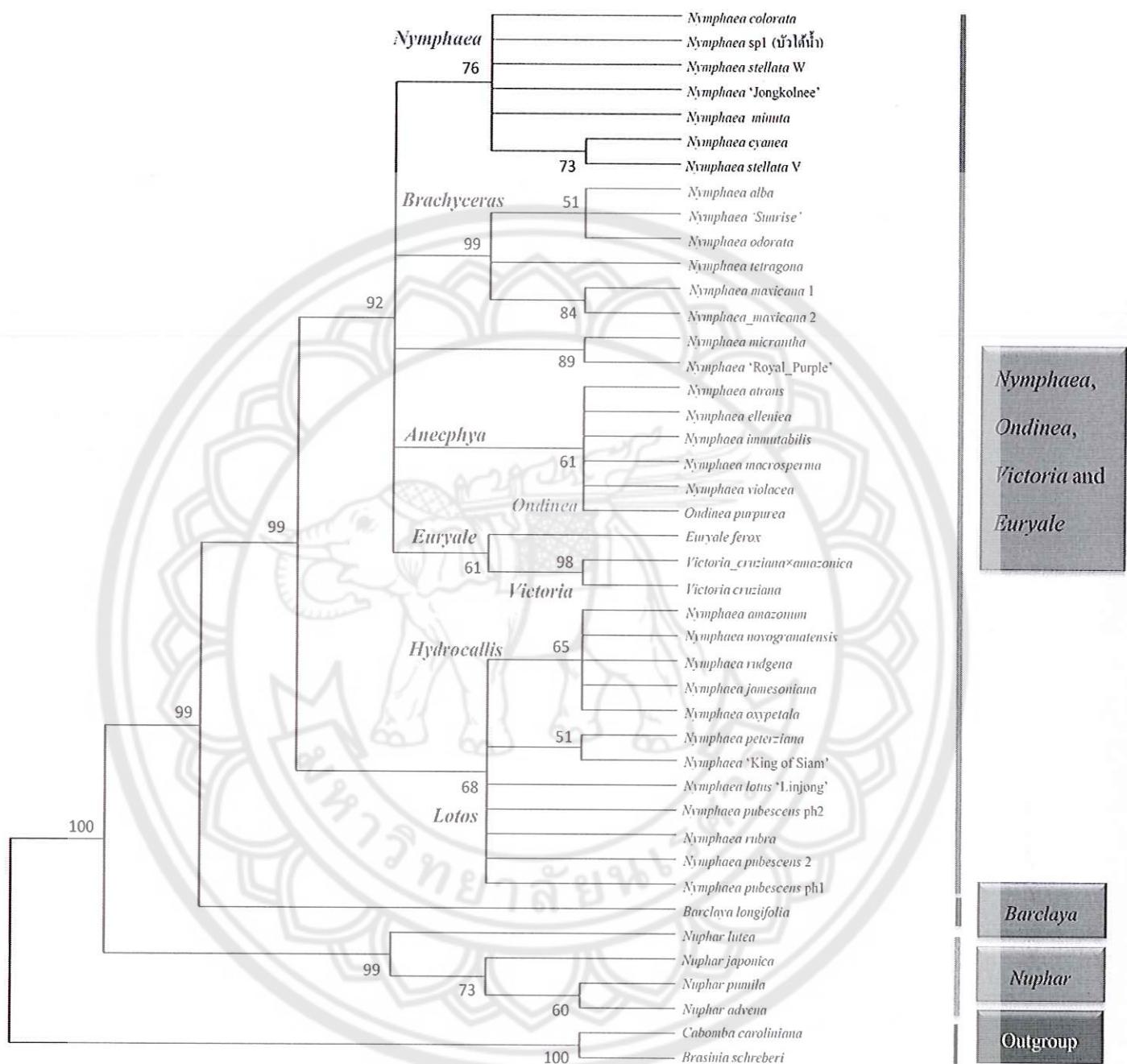
N. micrantha และ *N. violacea*

สกุลยี่อย *Nymphaeae* ประกอบไปด้วย *N. alba*, *N. odorata*, *N. tetragona*,

N. maxicana (ดอกเล็ก), *N. maxicana* (ดอกใหญ่) และ *Nymphaea 'Sunrise'*

และสกุลย้อย *Brachyceras* ประกอบไปด้วย *Nymphaea 'Jongkolnee'*,

Nymphaea 'Royal_Purple', *Nymphaea* sp1 (บัวใต้น้ำ), *N. cyanea*, *N. minuta*, *N. stellata* (กลีบดอกสีขาว), *N. stellata* (กลีบดอกสีม่วง), *N. peterziana* และ *N. capensis*



ภาพ 10 Consensus tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอในบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* ด้วยวิธี Maximum Pasimony

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากดีเอ็นเอบริเวณ *trnK-matK*

ความยาวของลำดับดีเอ็นเอที่ได้บริเวณบางส่วนของยีน *trnK-matK* มีขนาดตั้งแต่ 1179 (*Brasenia schreberi*) – 1209 (*Nuphar advena*) เมื่อทำการจัดเรียงลำดับดีเอ็นเอทั้งหมด 43 ตัวอย่าง พบว่ามีความยาว 1240 คู่เบส โดยจะมีตำแหน่งของลำดับดีเอ็นเอที่มีความคงที่ (conserved sites) เท่ากับ 1018 คู่เบส (82.10%) ขณะที่มีลำดับดีเอ็นเอที่มีความผันแปรทั้งสิ้น 222 คู่เบส (17.90%) ซึ่งเป็นลำดับดีเอ็นเอที่ใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการหรือ Phylogenetically informative sites เท่ากับ 134 คู่เบส (10.81%) ในขณะที่มีลำดับดีเอ็นเอที่พบเฉพาะตัวอย่าง (singleton) เท่ากับ 88 คู่เบส (7.09%) โดยบริเวณบางส่วนของยีน *trnK-matK* นี้พบการเพิ่มเข้ามาหรือขาดหายไปของลำดับดีเอ็นเอจำนวน 16 บริเวณ ขนาดตั้งแต่ 1-15 คู่เบส ซึ่งสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการแสดงให้เห็นว่าพืชในวงศ์บัวสามารถแบ่งได้ออกเป็น 3 กลุ่มคือ สกุลบัวญี่ปุ่นแยกออกจากเป็นกลุ่มแรก สกุลไส้ปลาไหลแยกออกจากเป็นกลุ่มที่สอง และกลุ่มสุดท้ายประกอบด้วยสกุลบัวสาย สกุลอนดินเนีย สกุลวิตอเรียและสกุลยูริอาเร่ โดยที่สกุลอนดินเนีย สกุลวิตอเรียและสกุลยูริอาเร่นั้นแทรกอยู่ภายในกลุ่มของสกุลบัวสาย

จากการสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าพืชในวงศ์บัวสายทุกสกุลแยกออกจาก outgroups คือ *Barclaya longifolia* และ *Brasenia schreberi* อย่างชัดเจน โดยความสัมพันธ์ภายในวงศ์บัวสายสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ (clades) คือ กลุ่มที่หนึ่ง กลุ่มของสกุลบัวญี่ปุ่น ที่แยกออกจากเป็นกลุ่มแรกด้วยค่า bootstrap support 100% นอกจากนี้สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายในสกุลบัวญี่ปุ่นยังสามารถแบ่งออกได้ออกเป็น 2 กลุ่มด้วยค่า bootstrap support 99% คือ บัวญี่ปุ่นโลกใหม่ (*Nuphar advena*) และบัวญี่ปุ่นโลกเก่า (*Nuphar japonica* 1, *Nu japonica* 2, *Nu lutea*, *Nu pumila*) ในขณะที่กลุ่มที่สองที่แยกออกจาก คือกลุ่มสกุลไส้ปลาไหล ด้วยค่า bootstrap support 81% ซึ่งได้แก่ *Barclaya longifolia* 1 และ *Barclaya longifolia* 2

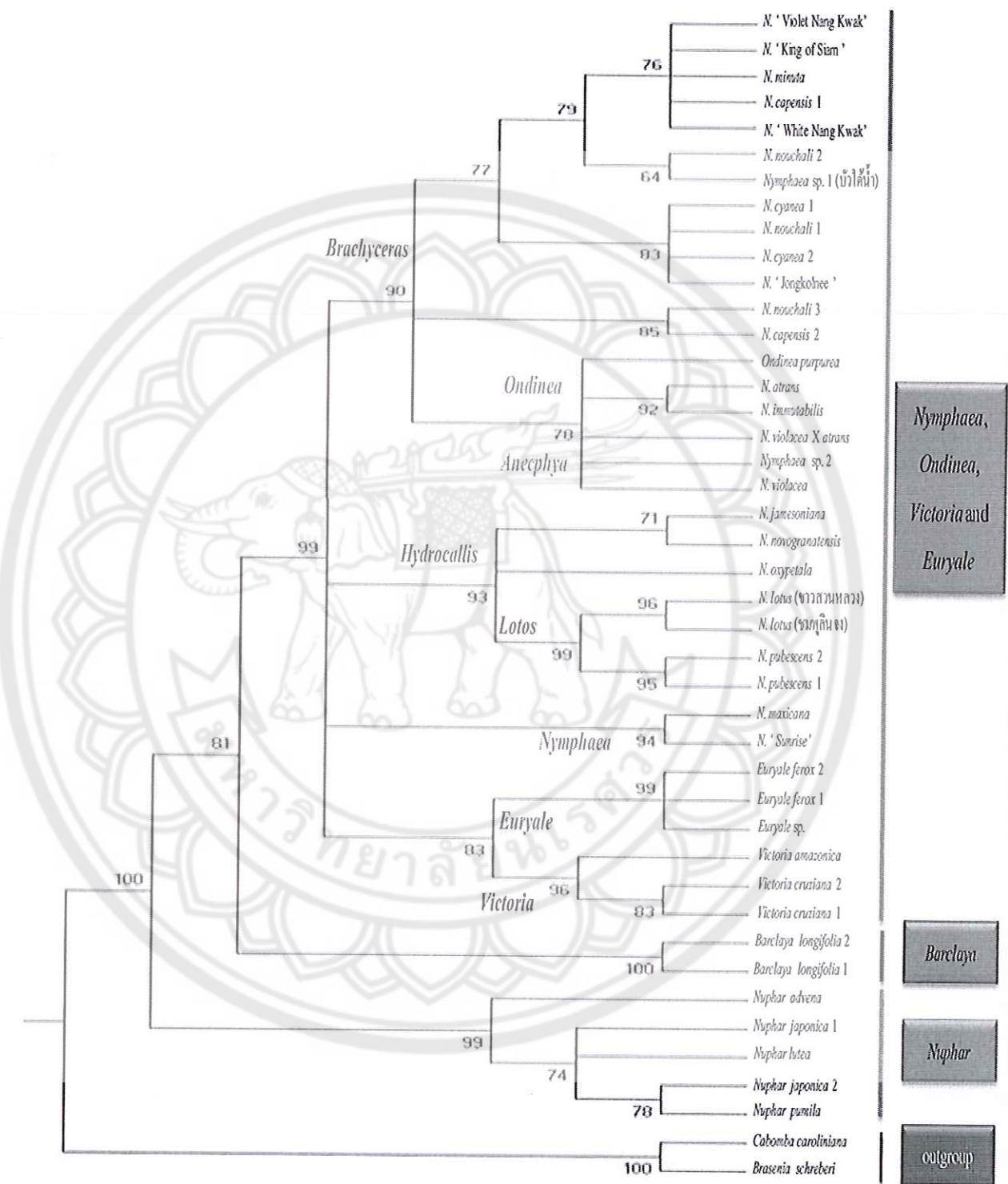
กลุ่มสุดท้ายที่แยกออกจากประกอบไปด้วยสกุลบัวสาย สกุลอนดินเนีย สกุลวิตอเรียและสกุลยูริอาเร่ด้วยค่า bootstrap support 99% โดยความสัมพันธ์ภายในสกุลบัวสายยังสามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มสกุลย้อย *Nymphaea* ซึ่งดอกจะบานในเวลากลางวัน ได้แก่ *N. maxicana* และ *N. 'Sunrise'* กลุ่มสกุลย้อย *Hydrocallis-Lotos* ซึ่งดอกจะบานในเวลากลางคืน โดยที่สกุลย้อย *Hydrocallis* ได้แก่ *N. jamesoniana*, *N. novogranatensis* และ *N. oxypetala* ส่วนสกุลย้อย *Lotos* ได้แก่ *N. lotus* (ขาวสวนหลวง), *N. lotus* (ชมพูลิ้นจัง), *N. pubescens* 1 และ *N. pubescens* 2 โดยทั้งสามสกุลย้อยนี้มีลักษณะของผนังรังไข่ที่เชื่อมติดกัน (Syncarpiae) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มสกุลย้อย *Brachyceras-Anecphya* ซึ่งดอกจะบานในเวลากลางวัน โดยสกุลย้อย

Brachyceras ได้แก่ *N. nouchali* 1, *N. nouchali* 2, *N. nouchali* 3, *N. minuta*, *N. capensis* 1, *N. capensis* 2, *N. cyanea* 1, *N. cyanea* 2, *N. ‘Violet Nang Kwak’*, *N. ‘White Nang Kwak’*, *Nymphaea* sp. 1 (บัวใต้น้ำ), *N. ‘Jongkolnee’* และ *N. ‘King of Siam’* ส่วนสกุลย่อย *Anecphya* ได้แก่ *N. atrans*, *N. immutabilis*, *Nymphaea* sp. 2, *N. violacea*, *N. violacea* X *atrans* โดยที่หงส่องสกุลย่อยนี้มีลักษณะของผนังรังไข่แบบแยกจากกัน (apocarpiae)

สกุลวิคตอเรีย และยูริอาเรจะอยู่ในกลุ่มเดียวกันและมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากด้วยค่า bootstrap support 83% ซึ่งได้แก่ *Euryale ferox* 1, *Euryale ferox* 2, *Euryale* sp., *Victoria amazonica*, *Victoria cruziana* 1 และ *Victoria cruziana* 2 แสดงให้เห็นว่ามีวัฒนาการร่วมกันมา ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาริเวณใต้แผ่นใน ก้านใบ ก้านดอกและกลีบเลี้ยงที่ มีหนามเหมือนกันและหงส่องสกุลนี้จะแพรกอยู่ในสายสัมพันธ์ของสกุลบัวสายด้วย โดยมีความสัมพันธ์ ใกล้ชิดกับสกุลย่อย *Nymphaea- Hydrocallis-Lotos* ซึ่งไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างชัดเจน (polytomy) อาจเนื่องมาจากลักษณะรูปร่างของใบที่คล้ายกัน นอกจากนี้สกุลอนดินเนียก็ยังแพรกอยู่ ในสายสัมพันธ์ของสกุลบัวสายด้วยโดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุลย่อย *Anecphya* ด้วยค่า bootstrap support 78% ซึ่งอาจเนื่องมาจากหงสกุลอนดินเนียและสกุลย่อย *Anecphya* นั้นมีการ การกระจายพันธุ์เฉพาะในแทนทวีปօอสเตรเลียเท่านั้นเหมือนกันนั่นเอง (ภาพ 11)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากการรวมบริเวณ *trnL-F* และ *trnK-matK*

จากการวิเคราะห์รวมข้อมูลระหว่างบริเวณยืน *trnK-matK* และบริเวณระหว่างยืน *trnL-F* พบว่าความยาวของลำดับดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 2170 (*Brasenia schreberi*) – 2297 (*Nuphar advena*) เมื่อทำการจัดเรียงลำดับดีเอ็นเอทั้งหมด 26 ตัวอย่าง พบว่ามีความยาว 2509 คู่เบส โดยจะมีตำแหน่งของลำดับดีเอ็นเอที่มีความคงที่ (conserved sites) เท่ากับ 1838 คู่เบส (73.26%) ขณะที่มีลำดับดีเอ็นเอที่มีความผันแปรทั้งสิ้น 671 คู่เบส (26.74%) ซึ่งเป็นลำดับดีเอ็นเอที่ ใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการหรือ Phylogenetically informative sites เท่ากับ 474 คู่เบส (18.89%) และลำดับดีเอ็นเอที่พับเฉพาะตัวอย่าง (singleton) เท่ากับ 197 คู่เบส (7.85%) ซึ่งจากการพิจารณาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจะเห็นว่าพืชในวงศ์บัวสายสามารถแบ่งได้ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ สกุลบัวภูปุ่นแยกออกมาเป็นกลุ่มแรก สกุลไส้ปลาไหลแยกออกมาเป็นกลุ่มที่สอง และกลุ่ม สุดท้ายประกอบด้วยสกุลบัวสาย สกุลอนดินเนีย สกุลวิคตอเรียและสกุลยูริอาเร โดยที่สกุลอนดินเนีย สกุลวิคตอเรียและสกุลยูริอาเรนั้นแพรกอยู่ภายในกลุ่มของสกุลบัวสาย

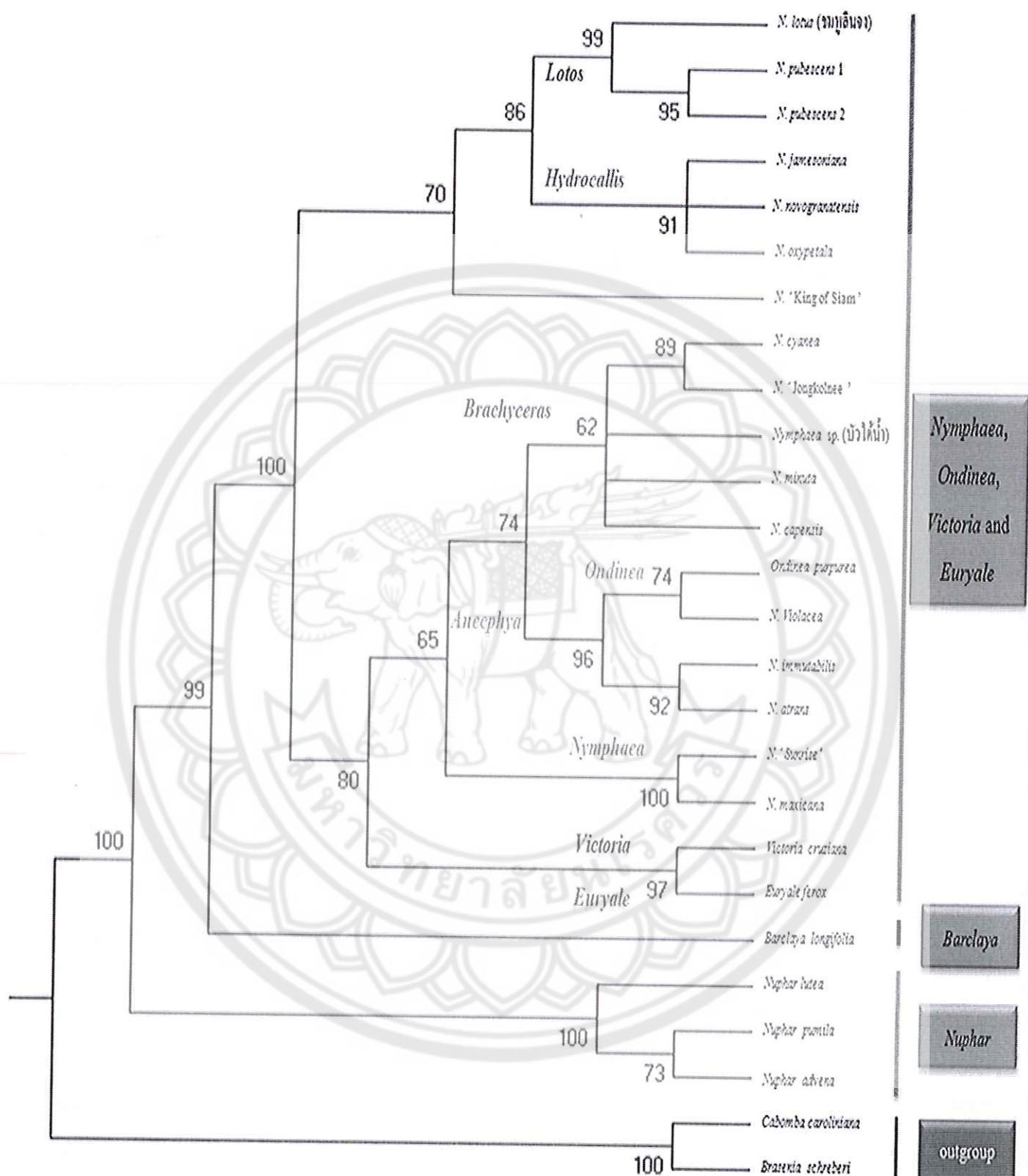


ภาพ 11 Phylogenetics tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *trnK-matK* โดยวิธี Maximum parsimony

จากความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าพืชในวงศ์บัวสายทุกสกุลแยกออกจาก outgroups คือ *Cabomba caroliniana* และ *Brasenia schreberi* อย่างชัดเจน โดยความสัมพันธ์ของพืชในวงศ์บัวสายสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ (clades) คือ กลุ่มของสกุลบัวญี่ปุ่น ที่แยกออกมาเป็นกลุ่มแรกด้วยค่า bootstrap support 100% ซึ่งประกอบไปด้วย *Nuphar advena*, *Nu. japonica*, *Nu. pumila* และ *Nu. lutea* ในขณะที่กลุ่มที่สองที่แยกออกมานี้ คือกลุ่มสกุลไส้ปลา ได้แก่ *Barclaya longifolia* ซึ่งถูกสนับสนุนด้วยค่า bootstrap support 99%

กลุ่มสุดท้ายที่แยกออกมาร่วมด้วยค่า bootstrap support 100% ประกอบไปด้วย สกุล อนดินีเนีย ได้แก่ *Ondinea puperea* สกุลวิคตอเรีย ได้แก่ *Victoria cruziana* สกุลยูริอาเร่ ได้แก่ *Euryale ferox* และสกุลบัวสาย ซึ่งความสัมพันธ์ภายในสกุลบัวสายยังสามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มสกุลย้อย *Nymphaea* ซึ่งดอกจะбанในเวลากลางวัน ได้แก่ *N. maxicana* และ *N. 'Sunrise'* กลุ่มสกุลย้อย *Hydrocallis-Lotos* ซึ่งดอกจะбанในเวลากลางคืน โดยที่สกุลย้อย *Hydrocallis* ได้แก่ *N. jamesoniana*, *N. novogranatensis* และ *N. oxypetala* ส่วนสกุลย้อย *Lotos* ได้แก่ *N. lotus* (ชุมพูลินจง), *N. pubescens* 1 และ *N. pubescens* 2 โดยทั้งสามสกุลย้อยนี้มีลักษณะของผนังรังไข่ ที่เชื่อมติดกัน (Syncarpiae) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มสกุลย้อย *Brachyceras-Anecphya* ซึ่งดอกจะбан ในเวลากลางวัน โดยสกุลย้อย *Brachyceras* ได้แก่ *N. cyanea*, *N. 'Jongkolnee'*, *Nymphaea* sp. (บัวใต้น้ำ), *N. minuta*, *N. capensis* ส่วนสกุลย้อย *Anecphya* ได้แก่ *N. atrans*, *N. immutabilis* และ *N. violacea* โดยที่ทั้งสองสกุลย้อยนี้มีลักษณะของผนังรังไข่แบบแยกจากกัน (apocarpiae)

นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์รวมของข้อมูลระหว่างบริเวณยืน *trnK-matK* และบริเวณ ระหว่างยืน *trnL-F* ยังพบว่า *N. 'King of Siam'* มีผลในสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการไม่ชัดเจนอาจ เนื่องจากเป็นลูกผสมระหว่าง *N. 'Larpprasert'* กับ *N. colorata* โดยผลการวิเคราะห์เฉพาะบริเวณ ยืน *trnK-matK* พบว่า *N. 'King of Siam'* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสกุลย้อย *Brachyceras* แต่การวิเคราะห์ บริเวณระหว่างยืน *trnL-F* ให้ผลที่ไม่ชัดเจนระหว่าง สกุลย้อย *Brachyceras* และสกุลย้อย *Lotos* (ภาพ 12)



ภาพ 12 Phylogenetics tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* และ บริเวณบางส่วนของยีน *trnK-matK* โดยวิธี Maximum parsimony

สรุปและอภิปรายผล

สรุปผลการวิจัย

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืชในวงศ์บัวสายและบัววงศ์อื่นโดยใช้วิธี CTAB Method ที่ดัดแปลงมาจาก Agrawal *et al.*, (1992) ผลที่ออกมายังได้ดีเอ็นเอในปริมาณมากและมีคุณภาพดีกว่าวิธีดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987) ซึ่งทำให้เกิดการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอมากกว่าวิธีที่ดัดแปลงจาก Agrawal ดังนั้นวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจาก Agrawal *et al.*, (1992) จึงมีความเหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืชในวงศ์บัวสายมากกว่า ซึ่งรอย smear จากการแตกหักของดีเอ็นเอที่เกิดจากการสกัดด้วยวิธีดัดแปลงของ Doyle and Doyle (1987) อาจมีสาเหตุมาจากการตัวอย่างของใบพืชในวงศ์บัวสายมีขนาดใหญ่และอ่อนน้ำ เมื่อต้องเก็บรักษาด้วยซิลิกาเจล ภาย ในถุงซิปซึ่งมีการวางตัวอย่างซ้อน ทับกันจำนวนมาก ภายในถุงจึงยังมีความชื้นอยู่ ทำให้บางส่วนของใบที่มีบาด แผลและซ้อนทับกันมีการสร้างสารประกอบฟีนอลขึ้น ทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอเปลี่ยนไป ส่งผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ หรือการกลับหลอดเพื่อผสมสารละลายต่างๆ ในชั้นตอนการสกัดแรงเกินไป ทำให้สายโปรตีนของดีเอ็นเอถูกทำลาย

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trnL-F* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์สามารถช่วยเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้เป็นจำนวนมาก โดยมีขนาดประมาณ 1,000 - 1,100 คู่เบส แต่เมื่อทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Wizard® SV Gel and PCR Clean-up system (USA) แล้วส่งไปหาลำดับดีเอ็นเอที่ประเทศเกาหลีใต้ พบร่วงลำดับดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 991 คู่เบส (*Barsenia schreberi*) - 1095 คู่เบส (*Victoria cruziana* X *V. amazonica*) ซึ่งในทุกตัวอย่างมีขนาดที่ใกล้เคียงกัน ขณะที่การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ *trnK-matK* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้เป็นจำนวนมาก เช่นกัน โดยมีขนาดประมาณ 1300 คู่เบส ซึ่งเมื่อนำไปหาลำดับเบสแล้วมีขนาดตั้งแต่ 1179 – 1209 คู่เบส และพบว่าในบางตัวอย่างที่บริเวณบางส่วนยืน *trnK-matK* เกิดการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับเบสด้วย

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิทยาการ

จากการวิเคราะห์และการจัดจำแนกพืชในวงศ์บัวสายโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ บริเวณระหว่างยืน *trnL-F* สามารถจำแนกพืชวงศ์บัวสายออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มของสกุล *Nuphar* จะแยกออกมาเป็นกลุ่มแรก กลุ่มที่ 2 คือ สกุล *Barclaya* และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ กลุ่มของสกุล

Ondinea, Victoria, Euryale และ *Nymphaea* ส่วนชนิดที่เป็นลูกผสมจะถูกจัดอยู่ในสกุลย่อย *Brachyceras* และสกุลย่อย *Lotos* ซึ่งอยู่ในสกุล *Nymphaea* ทั้งนี้อาจเนื่องจากลูกผสมที่มีเป็นสมาชิกของของสกุลย่อยทั้ง 2 สกุล ทำให้การวิเคราะห์ผลเพียงบริเวณเดียวอาจจะให้ผลที่ไม่ชัดเจน ดังนั้นการวิเคราะห์ผลร่วมกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งอื่นๆ เพิ่มขึ้น ร่วมกับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา หรือการศึกษาด้านอื่นๆ อาจทำให้การจัดจำแนกพีชวงศ์บัวสายมีความชัดเจนมากขึ้น และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิัฒนาการโดยใช้ลำดับดีเอ็นเอบางส่วนบริเวณยืน *trnK-matK* พบว่างศ์บัวสายมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับวงศ์บัวหาร่าย (*Cabomba caroliniana* และ *Brasenia schreberi*) ซึ่งวงศ์บัวสายเป็น Monophyletic group แต่ภายในสกุลบัวสายนั้นมีการแพร่กระจายของสกุลบัวกระตง บัวดาด และอนดินี เท่าที่สกุลบัวสายเป็น Paraphyletic group และจากสายสัมพันธ์ทางวิัฒนาการพบว่าบัวญี่ปุ่นจะแยกอกมาเป็นกลุ่มแรก ดังนั้นสกุลบัวญี่ปุ่นจึงเป็น Basal lineage ของวงศ์บัวสายนั่นเอง

อภิปรายผลการวิจัย

การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืชในวงศ์บัวสายโดยใช้วิธี CTAB Method ที่ดัดแปลงมาจาก Agrawal *et al.*, (1992) และ Doyle and Doyle (1987) จะได้ดีเอ็นเอที่มีลักษณะใส ไม่มีสี และเมื่อตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบร่องดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณมากและมีคุณภาพดี ปราศจากดีเอ็นเอเพียงแผ่นเดียวขนาดมากกว่า 10 กิโลเบสแต่ในบางตัวอย่างก็รอย smear เกิดขึ้น อาจเนื่องมาจากการขันตอนของการกำจัดโปรตีนออกจากสายดีเอ็นเอด้วย chloroform หลายรอบก่อนนำไป รวมไปถึงการกลับหลอดที่แรงเกินไปอาจทำให้โปรตีนโดนดึงออกมากจากสายดีเอ็นเอแรงจนสายดีเอ็นเอขาดได้ นอกจากนี้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987) นั้นจะใช้ทำการสกัดตัวอย่างใบที่เป็นตัวอย่างแห้งซึ่งปราศจากดีเอ็นเอเป็นรอย smear ที่เกิดจากการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นเองเนื่องจากตัวอย่างแห้งถูกเก็บรักษาไว้เป็นเวลานานทำให้เกิดสารประกอบฟีโนอลซึ่งมีผลทำให้ดีเอ็นเอแตกหักได้และวิธีนี้ก็ใช้ความเข้มข้นของ extraction buffer ที่สูงกว่าวิธีที่ดัดแปลงจาก Agrawal *et al.*, (1992) ทำให้สามารถใช้ในการสกัดตัวอย่างที่เกิดสารประกอบฟีโนอลในปริมาณมากแล้วได้ และวิธีการนี้จะทำการสกัดโปรตีนออกจากสายดีเอ็นเอเพียงครั้งเดียว ทั้งนี้ก็เพื่อลดโอกาสของการกลับหลอดที่รุนแรงจนทำให้สายดีเอ็นเอขาดนั่นเอง ส่วนวิธีที่ดัดแปลงจาก Agrawal *et al.*, (1992) นั้นใช้ในการสกัดตัวอย่างใบสด ซึ่งใช้ extraction buffer ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าวิธีการที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle

(1987) เพราะตัวอย่างใบที่เพิ่งทำการเก็บ ยังสร้างสารประกอบฟีนอลได้ในปริมาณที่น้อย จึงไม่จำเป็นต้องใช้ extraction buffer ความเข้มข้นที่สูง และวิธีการนี้ยังทำการสกัดโปรตีนออกจากดีเอ็นเอถึงสองครั้งเพื่อให้ดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ การทำให้บริสุทธิ์ และการทำลำดับดีเอ็นเอ

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จำเป็นต้องใช้สารละลายดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงเพื่อลดการรบกวนอัตราการเกิดปฏิกิริยา เพราะจะนั่นในสารละลายดีเอ็นเอบางตัวอย่างจำเป็นต้องทำการเจือจางมากเพื่อลดความสกปรกของดีเอ็นเอกจากการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอลซึ่งการการเจือจางในแต่ละตัวอย่างจะไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับการปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลที่มากน้อยต่างกัน

จากการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีเล็กโตรโพเรซีส์ในօกาโรสเจล 1% พบร่วมชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ *trnL-F* มีขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส โดยไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทั้ง forward และ reverse มีคุณสมบัติเป็น universal primer คือเป็นไพรเมอร์ที่สามารถใช้ได้ในพีซีอาร์ทุกชนิด จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เครื่อง Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA) จากนั้นส่งไปหาลำดับดีเอ็นเอที่ประเทศไทยแล้ว พบว่าลำดับดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 991 (*Barsenia schreberi*) - 1095 (*Victoria cruziana* X *V. amazonica*) คู่เบส ซึ่งในทุกตัวอย่างมีขนาดที่ใกล้เคียงกัน โดยการขาดหายไปของเบสอาจเป็นผลทำให้ขนาดของลำดับดีเอ็นเอต่างจากขนาดที่ตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโพเรซีส และจากการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโพเรซีสพบว่ามีขนาดประมาณ 1300 คู่เบส โดยไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทั้ง forward และ reverse ถูกออกแบบจากลำดับดีเอ็นเอของบัวชนิดต่างๆใน Genebank จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ซึ่งหากແນບดีเอ็นเอที่ปราศจากพิษและเดียวสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้เลย แต่ถ้าหากແນບดีเอ็นประภูมิหลายແນບ จะต้องทำการตัดเจอก่อน การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Wizard® SV Gel and PCR Clean-up system (USA) แล้วส่งไปหาลำดับดีเอ็นเอต่อไป

การทำลำดับดีเอ็นเอจะใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ซึ่งสามารถหาลำดับดีเอ็นเอทางด้าน 5' และ 3' ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ยาวด้านละประมาณ 700 คู่เบส เมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอแล้วนำผลมาจัดเรียงให้เป็นลำดับดีเอ็นเอเดียวกันในแต่ละตัวอย่างพบว่าบริเวณบางส่วนของยีน *trnK-matK* เกิดการแทนที่และการขาดหายไปของลำดับดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการบริเวณระหว่างยืน *trnL-F* ในคลอโรพลาสต์จากตัวอย่างใบอ่อนของพืชน้ำ สามารถบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ได้อย่างชัดเจน เพราะบริเวณระหว่างยืน *trnL-F* จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในส่วนที่ไม่มีการแสดงออก การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของบัวจากบริเวณระหว่างยืน *trnL-F* สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของพืชในวงศ์บัวสายได้ ซึ่งจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum Parsimony จากบริเวณระหว่างยืน *trnL-F* พบว่าพืชวงศ์บัวสายในวงศ์บัวสายจำนวนทั้งหมด 43 ตัวอย่าง มีความสัมพันธ์กันแบบ Monophyletic group คือ แบ่งได้เป็นกลุ่มเดียวไม่มีกลุ่มอื่นๆ แทรกเข้ามา (Les, et al., Borsch, et al., 2007) และจากการศึกษาร่วมกับพืชวงศ์บัวอื่นๆ ทำให้พบว่าพืชวงศ์บัวสายมีความที่ใกล้ชิดกันกับวงศ์บัวหาร่าย (*Brasenia schreberi* และ *Cabomba caroliniana*) ซึ่งใช้เป็น out group ในงานวิจัยครั้งนี้ นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งพืชในวงศ์บัวสายได้เป็น 3 กลุ่มหรือ 3 วงศ์ย่อย คือ *Nupharoideae*, *Barclayoideae* และ *Nymphaeoideae* ซึ่งสามารถแยกความสัมพันธ์ออกมากด้วยค่า bootstrap support 99%

โดยวงศ์ย่อย *Nupharoideae* ประกอบด้วย *Nuphar advena*, *Nu. japonica*, *Nu. pumila* และ *Nu. lutea* ซึ่งวงศ์ย่อย *Nupharoideae* จะแยกออกมานอกสายวิวัฒนาการของบัว ทั้งหมดในวงศ์บัวสายและมีความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกันกับ *Cabomba caroliniana* และ *Brasinia schreberi* ในวงศ์บัวหาร่ายซึ่งอยู่ภายใต้กลุ่มบัวสาย อาจเนื่องจาก *Nu. japonica* มีลักษณะของเปลือกหุ้มเมล็ดขั้นนอกเป็นแบบ hood-shape เมื่อเทียบกับ *C. caroliniana* และ *B. schreberi* คือมีฝักเล็กทรงรีและมีส่วนที่คอดเล็ก ด้านล่างฝักจะมีลักษณะเหมือนแผ่นajan มีรอยหยักซึ่งเป็นลักษณะที่เหมือนกับพืชในวงศ์บัวสายในสมัยโบราณ (Collinson, 1980)

วงศ์ย่อย *Barclayoideae* ประกอบไปด้วย *Barclaya longifolia* ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้มีตัวอย่างเพียงชนิดเดียว เนื่องจากได้สัมภาระไม่ถูกดำเนินโดยในทวีปอเมริกาเหนือและทวีปยุโรป ชนิดที่พบในประเทศไทยจึงเป็นชนิดที่มีการนำเข้ามาจากต่างประเทศ อีกทั้งลักษณะทางสัณฐานของใบได้เปลี่ยนไปตามรูปทรง กระบอกหรือรูปไข่ ขอบใบเป็นคลื่น ซึ่งต่างจากสกุลอื่นๆ ในวงศ์บัวสาย ทำให้ได้สัมภาระไม่ถูกจัดแยกออกมานะเพียงชนิดเดียว

และวงศ์ย่อย *Nymphaeoideae* ประกอบไปด้วย 4 สกุล คือ สกุล *Victoria* ได้แก่ *V. cruziana* และ *V. cruziana × V. amazonica* สกุล *Euryale* ได้แก่ *E. ferox* สกุล *Ondinea* ได้แก่ *O. puparea* และสกุล *Nymphaea* ซึ่งแบ่งเป็นสกุลย่อย 5 สกุลย่อย ได้แก่ สกุลย่อย *Lotos*, *Hydrocalis*, *Nymphaea*, *Anecphya* และสกุลย่อย *Brachycera*

จากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจะเห็นได้ว่าสกุล *Euryale* และสกุล *Victoria* ซึ่งตัวอย่างคือ *E. ferox*, *V. cruziana* และ *V. cruziana × V. amazonica* ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่าง *V. cruziana* และ *V. amazonica* จะมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมาก มีค่า bootstrap support ปานกลาง (61%) เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานคล้ายคลึงกัน คือ มีหนามแหลมบริเวณก้านใบ ใต้แผ่นใบ ก้านดอกรและกลีบเลี้ยงที่เหมือนกัน และพบว่าทั้ง 2 สกุลแทรกປะปนอยู่ในกลุ่มสกุลบัวสาย โดยเป็น basal lineage ของกลุ่มบัวสายที่บานในตอนเช้า (สกุลย่อย *Anecphya*, สกุลย่อย *Brachycera* และสกุลย่อย *Nymphaeae*) โดยกลุ่มนี้ลักษณะร่วมกันคือ มี protoxylem แบบ lacuna และมีก้านใบเดตดอยู่กลางแผ่นใบ (Ito, 1987)

ขณะที่สกุล *Ondinea* ที่มีเพียงชนิดเดียว คือ *O. puparea* จะมีความใกล้ชิดกับสกุลย่อย *Anecphya* ถึงแม้ว่าจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลายอย่างที่แตกต่างกันก็ตาม อาจเนื่องมาจากบัวทั้งสองชนิดนี้มีแหล่งกำเนิดจากภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และออสเตรเลีย เช่นเดียวกัน ทำให้สกุล *Ondinea* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของสกุล *Nymphaea* (Lohne, et al., 2008) อีกทั้งสกุล *Ondinea* มีเพียงแค่ชนิดเดียว โดยอาจเกิดจากการยกลายพันธุ์ทำให้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป แต่ก็ยังมีลักษณะที่คล้ายกับบัวสายอสเตรเลีย คือ มีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ มีตำแหน่งของกลีบเลี้ยงและกลีบดอกอยู่ใต้ฐานรองดอก อยู่ติดรอบผนังรังไข่และผนังก้น (Ito, 1987)

สกุล *Nymphaea* แบ่งเป็นสกุลย่อย 5 สกุลย่อย ได้แก่

สกุลย่อย *Lotos* มี 5 ตัวอย่าง 3 ชนิด ประกอบไปด้วย *N. pubescens* 1 (กลีบดอกสีชมพูเข้ม จังหวัดพิษณุโลก), *N. pubescens* 2 (กลีบดอกสีชมพูอ่อน จังหวัดพิษณุโลก), *N. pubescens* (กลีบดอกสีชมพูอ่อน จังหวัดนครศรีธรรมราช), *N. rubra* และ *N. lotus* ‘Linjong’ ซึ่งเป็นลูกผสม มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ร่วมกันคือ มีขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย กลีบเลี้ยงมีเส้นพาดตามยาวจากบนลงล่างที่มองเห็นได้ชัดเจน ดอกบานในเวลากลางคืน (Conard, 1905)

สกุลย่อย *Hydrocalis* มี 5 ตัวอย่าง 5 ชนิด ประกอบไปด้วย *N. amazonum*, *N. jamesoniana*, *N. novogranatensis*, *N. oxypetala* และ *N. rudgrena* มีการกระจายตัวอยู่ในเขตทวีปอเมริกาเหนือและทวีปอเมริกาใต้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ร่วมกันคือ มีลักษณะของก้านซู๊ก เกสรเพศเมียแบบทรงกระบอกเรียวยาว (slender) มีผนังรังไข่เป็นแบบเชื่อมติดกัน และมีดอกบานในเวลากลางคืน

สกุลย่อย *Anecphya* มี 5 ตัวอย่าง 5 ชนิด ประกอบไปด้วย *N. atrans*, *N. elleniae*, *N. immutabilis*, *N. micrantha* และ *N. violacea* เป็นสกุลย่อยที่มีการกระจายตัวอยู่ในเขตทวีปอオスเตรเลียทั้งหมด มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ร่วมกันคือ เกสรเพศผู้และเพศเมียไม่มีรยางค์ ผนังรังไข่แยกออกจากกัน และมีดอกบานในเวลากลางวัน

สกุลย่อย *Brachyceras* มี 9 ตัวอย่าง 8 ชนิด ประกอบไปด้วย *Nymphaea 'Jongkolnee'* และ *Nymphaea 'Royal_Purple'* ซึ่งเป็นลูกผสม, *N. stellata* (กลีบดอกสีขาว), *N. stellata* (กลีบดอกสีม่วง), *Nymphaea* sp1 (บัวใต้น้ำ), *N. cyanea*, *N. minuta*, *N. peterziana* และ *N. capensis* เป็นสกุลที่มีสมาชิกมากที่สุด มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ร่วมกันคือ ขอบใบหยักเป็นคลื่น เกสรเพศผู้เป็นแท่งกลม มีรยางค์ทั้งในเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย ผนังรังไข่เป็นแบบแยก และมีดอกบานในเวลากลางวัน จากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนา- การจะเห็นว่า *N. stellata* (กลีบดอกสีม่วง) และ *N. cyanea* มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันซึ่งถูกสนับสนุนด้วยค่า bootstrap support ที่ค่อนข้างสูง (73%) อาจเนื่องจากตัวอย่างทั้ง 2 มีกลีบดอกที่มีสีม่วงเหมือนกัน

จะเห็นว่า *Nymphaea 'Royal_Purple'* สมาชิกในสกุลย่อย *Brachyceras* มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันกับ *N. micrantha* สมาชิกในสกุลย่อย *Anecphya* และยังแยกออกจากตัวอย่างอื่นๆ ด้วยค่า bootstrap support ที่ค่อนข้างสูง (89%) อาจเกิดจากทั้ง 2 ตัวอย่างมีลักษณะการสร้างต้นอ่อนบนใบเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์แบบไม่ออาศัยเพศ ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่พบในพืชสกุลบัวสายชนิดอื่น จึงอาจสามารถใช้เป็นข้อพิสูจน์ได้ว่า *Nymphaea 'Royal_Purple'* เป็นลูกผสมที่เกิดจาก *N. micrantha* เป็นแม่พันธุ์ และ *N. capensis* เป็นพ่อพันธุ์ (Chomchalow and Chansilpa, 2009)

นอกจากนี้ยังมี *Nymphaea 'King of Siam'* และ *N. peterziana* ที่ถูกจัดอยู่ระหว่างกลุ่มของสกุลย่อย *Lotos* และสกุลย่อย *Hydrocalis* ขณะที่ตัวอย่างดังกล่าวเป็นสมาชิกในสกุลย่อย *Brachyceras* จึงถือว่าไม่สามารถจัดลำดับความสัมพันธ์กับตัวอย่างชนิดอื่นๆ ได้ อาจเนื่องมาจาก *Nymphaea 'King of Siam'* เป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่าง *N. colorata* ที่อยู่ในสกุลย่อย *Brachyceras* และ *Nymphaea 'Larpprasert'* ซึ่งเป็นลูกผสมเช่นเดียวกัน ทำให้การจำแนกเป็นไปได้ยาก หรือบริเวณที่ศึกษาไม่มีลำดับสามารถใช้ในการจัดจำแนกได้ และ *Nymphaea 'King of Siam'* ก็มีลักษณะดอกที่คล้ายกับ *N. peterziana* มาก จึงทำให้ *N. peterziana* ถูกดึงลงมาอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

และสกุลย่อย *Nymphaeae* มี 6 ตัวอย่าง 5 ชนิด ประกอบไปด้วย *N. maxicana* (ดอกเล็ก), *N. maxicana* (ดอกใหญ่) *N. alba*, *N. odorata*, *N. tetragona*, และ *Nymphaea ‘Sunrise’* ซึ่งเป็นลูกผสม มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ร่วมกันคือ เกสรเพศผู้ไม่มีรยางค์ ขอบใบเรียบ ผนังรังไข่เป็นแบบเชื่อมติดกัน และมีดอกบานในเวลากลางวัน โดย *N. maxicana* (ดอกเล็ก) และ *N. maxicana* (ดอกใหญ่) จะมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกัน ซึ่งถูกสนับสนุนด้วยค่า bootstrap support ที่สูง (84%) เนื่องจากทั้ง 2 เป็นบัวชนิดเดียวกันแต่มีลักษณะทางสัณฐานที่ต่างกันคือ มีดอกขนาดใหญ่และดอกขนาดเล็ก

เมื่อพิจารณาจากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการพบว่าสกุลย่อย *Lotos* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุลย่อย *Hydrocalis* โดยถูกสนับสนุนด้วยค่า bootstrap support ปานกลาง (68%) เนื่องจากมีดอกบานในเวลากลางคืนเหมือนกัน ส่วนอีกกลุ่มนึงหรืออีก 3 สกุลย่อย คือ สกุลย่อย *Anecphya* สกุลย่อย *Nymphaeae* และสกุลย่อย *Brachyceras* จะบานในเวลากลางวัน โดยในกลุ่มนี้สกุลย่อย *Anecphya* และสกุลย่อย *Brachyceras* จะมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันเนื่องจากมีผนังรังไข่ที่แยกจากกันอย่างชัดเจน ส่วนสกุลย่อย *Nymphaeae* จะมีผนังรังไข่เป็นแบบเชื่อม

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการรวมข้อมูลบริเวณยืน *trnK-matK* และบริเวณระหว่างยืน *trnL-F* สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของพืชในวงศ์บัวสายได้ โดยสามารถแบ่งกลุ่มตามการแยกออกมาจากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้เป็น 3 กลุ่ม โดยสกุลบัวญี่ปุ่นจะแยกออกมาเป็นกลุ่มแรกและมีความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกันกับ *Cabomba caroliniana* และ *Brasenia schreberi* ในวงศ์บัวหาร่ายซึ่งอยู่ภายใต้สกุลบัวสาย แสดงถึงว่าสกุลบัวญี่ปุ่นเป็น basal lineage ของพืชในวงศ์บัวสาย อาจเนื่องจาก *Nu. japonica* มีลักษณะของเปลือกหุ้มเมล็ดชั้นนอกเป็นแบบ hood-shape เหมือนกับ *C. caroliniana* และ *B. schreberi* คือมีฝักเล็กทรงรีและมีส่วนที่คอดเล็กด้านล่างฝักจะมีลักษณะเหมือนแผ่นajanมีรอยหยักซึ่งเป็นลักษณะที่เหมือนกับพืชในวงศ์บัวสายในสมัยโบราณ (Collinson, 1980)

ส่วนสกุลที่แยกออกมาเป็นกลุ่มที่สองคือสกุลไส้ปลาไหล ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้มีตัวอย่างเพียงชนิดเดียว คือ *Barclaya longifolia* เนื่องจากไส้ปลาไหลมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาเหนือและทวีปยุโรป ชนิดที่พบในประเทศไทยจึงเป็นชนิดที่มีการนำเข้ามาจากต่างประเทศ รวมทั้งลักษณะทางสัณฐานของไส้ปลาไหลที่มีใบยาวเรียวเป็นรูปทรง กระบอกหรือรูปไข่ ขอบใบเป็นคลื่น ซึ่งเป็นลักษณะที่ต่างจากสกุลอื่นๆ ในวงศ์บัวสาย ทำให้ไส้ปลาไหลถูกจัดแยกออกมาเพียงชนิดเดียว

และกลุ่มสุดท้ายที่แยกออกมาประกอบด้วยสกุลบัวสาย สกุลอนดิเนีย สกุลวิคตอเรียและสกุลยูริอาเร่โดยที่สกุลอนดิเนีย สกุลวิคตอเรียและสกุลยูริอาเร่ แทรกอยู่ในกลุ่มสกุลบัวสาย

โดยการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากบริเวณบางส่วนของยีน *trnK-matK* และ *trnL-F* สามารถแบ่งบัวสายได้เป็น 5 กลุ่ม (clade) ตามสกุลย่อยได้ค่อนข้างชัดเจน ซึ่งพืชสกุลบัวสายสามารถแบ่งได้ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มแรกประกอบด้วยสกุลย่อย *Hydrocallis* และ *Lotos* กลุ่มนี้สองคือสกุลย่อย *Nymphaea* และอีกกลุ่มคือสกุลย่อย *Anecphya* และ *Brachyceras* ซึ่งหากจัดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผนังรังไข่ (Conard, 1905) แล้ว กลุ่มสกุลย่อย *Hydrocallis* และ *Lotos* นี้เป็นกลุ่มที่มีผนังรังไข่แบบเชื่อมติดกันและดกจะบานในเวลากลางคืน ส่วนกลุ่มสกุลย่อย *Anecphya* และ *Brachyceras* เป็นกลุ่มที่มีผนังรังไข่แบบแยกและ ดกจะบานในเวลากลางวัน แต่ในสกุลย่อย *Nymphaea* นั้นมีความแตกต่างจากทั้งสองกลุ่มคือมีผนัง รังไข่แบบเชื่อมติดกันแต่ดกจะบานในเวลากลางวัน ทำให้ในการศึกษาครั้งนี้กลุ่มสกุลย่อย *Nymphaea* ถูกแยกออกจากทั้งสองกลุ่มนี้เอง แต่อย่างไรก็ตามสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้ก็ ไม่สามารถแยกสกุลย่อย *Nymphaea* ออกจากสกุลย่อย *Anecphya* และ *Brachyceras* ได้อย่าง ชัดเจน

นอกจากการแพร่กระจายในสกุลบัวสายของสกุลอนดินีเนีย สกุลวิคตอรีย์และสกุลยูริอาเร่ นั้น พบร่วมกับสกุลอนดินีเนียมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุลย่อย *Anecphya* ด้วยค่า bootstrap support 74% ซึ่งอาจเนื่องมาจากการกระจายตัวอยู่ในทวีปอสเตรเลีย เช่นเดียวกัน อีกทั้ง สกุลอนดินีเนียก็มีสมาชิกเพียงชนิดเดียวซึ่งอาจเกิดการกลยุทธ์ทำให้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เปลี่ยนแปลงไปแต่ก็ยังมีลักษณะคล้ายกับสกุลย่อย *Anecphya* คือมีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ มีตำแหน่งของ กลีบเลี้ยงและกลีบดกอยู่ใต้ฐานรองดอก อยู่ติดรอบผนังรังไข่และผนังก้น (Ito, 1987)

ส่วนการศึกษาในบัวสกุลวิคตอรีย์และยูริอาเร่ที่พบว่าบัวทั้งสองสกุลมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ด้วยค่า bootstrap support 97% อาจเนื่องมาจากการลักษณะทางสัณฐานวิทยาของบัวสกุลวิคตอรีย์ และยูริอาเร่มีความคล้ายคลึงกัน โดยดูกองของทั้งสองสกุลมีสีม่วง ในของบัววิคตอรีย์ และยูริอาเร่ก็มี ลักษณะคล้ายคลึงกันเพียงแต่ขอบในของบัวยูริอาเร่นั้นไม่ตั้งขึ้นเหมือนขอบในของบัววิคตอรีย์ ซึ่งบัว ทั้งสองสกุลนี้มีความเด่นตรงที่มีหนามในบริเวณต่างๆ ที่แตกต่างกันไปดังนั้นความสัมพันธ์ของบัวสกุล วิคตอรีย์และยูริอาเร่ที่ใกล้ชิดกันมากกว่าสกุลอื่นในวงศ์เดียวกันนั้นอาจเนื่องมาจากการมีหนาม บริเวณใต้ใบ ก้านใบ ก้านดอกและกลีบเลี้ยงที่เหมือนกัน และนอกจากนี้ทั้งสองสกุลนี้จะแพร่กระจายใน สายสัมพันธ์ของสกุลบัวสายด้วย โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุลย่อย *Nymphaea- Brachyceras-Anecphya* ซึ่งเป็นกลุ่มของบัวสายที่บานในตอนเช้า

โดยจากการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในวงศ์บัวสายโดยใช้ลำดับดีเอ็นเอ บริเวณยีน *trnK-matK* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* พบว่าสามารถแบ่งพืชในวงศ์บัวสายออกได้เป็น

3 วงศ์ย่อยคือวงศ์ย่อย Nupharoideae ประกอบด้วยสกุลบัวญี่ปุ่น วงศ์ย่อย Barclayoideae ประกอบด้วยสกุลไส้ปลาไหล และวงศ์ย่อย Nymphaeoideae ประกอบด้วยสกุลบัวสาย สกุลอนดินเนีย สกุลวิคตอเรียและสกุลยูริอาเร่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Les et al., 1999

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างในการศึกษาและศึกษาบริเวณยืนอื่นๆ เพื่อให้ข้อมูลที่ได้มีความน่าเชื่อถือมากขึ้น
2. การนำลูกผสมมาทำการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิถีนาการร่วมด้วย อาจก่อให้เกิดความสับสนของข้อมูลได้
3. ควรเก็บตัวอย่างในพื้นที่ที่มีความหลากหลาย เพื่อศึกษาปัจจัยของสิ่งแวดล้อมว่ามีผลหรือไม่

เอกสารอ้างอิง

- คุณหญิงสุชาดา ศรีเพ็ญ, วีรญา บุญเตี้ย และวิสาขा เพียรสุภาพ. (2550). การจำแนกพันธุ์บัว. ใน **The Proceeding of IWGS Annual Symposium** (หน้า 181-189). กรุงเทพฯ: มูลนิธิสวนหลวง ร. 9
- ชานินทร์ ภู่พัฒน์. (2538). วิทยาการดีเอ็นเอในงานนิติเวช. ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- นวลดเนตร จุลบุตร. (2554). ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในสกุลบัวสายโดยใช้ลำดับดีเอ็นเอบริเวณ *trnK-matK*. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.
- มลิวรรณ นาคชุมทด. (2554). รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์โครงการเรื่องการจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของบัวสาย (*Nymphaeae L.*) ในประเทศไทยโดยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.
- รุ่งรัตน์ วงศ์ฟ่าท์. (2554). คู่มือชีวสารสนเทศ. นันทกานต์กราฟฟิกการพิมพ์. 163 หน้า.
- วสันต์ เอื้อมลพัตร. (2555). การจัดจำแนกบัวสาย (*Genus Nymphaea L.*) โดยใช้วิธีเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์. วิทยานิพนธ์เสนอปัจฉติวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเรศวร.
- เสริมลากา วสุวัต. (2547). บัวประดับในประเทศไทย. กรุงเทพฯ. บริษัทเน้นบุ๊คส์. 192 หน้า.
- อิศรา แพงสี. (2551). บัวและพรมน้ำ=waterlily & waterplant.บ้านและสวน, กรุงเทพมหานคร.
- อุไร จิรมงคลการ. (2548). มือใหม่หัดปลูกบัว (Easy waterlily and lotus). ออมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์พับลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ: บ้านและสวน.
- อุไรวรรณ วิจารณกุล. (2545). ดีเอ็นเอเทคโนโลยี. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม.
- Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P. (1992). Isolate of DNA from *Cheorospondias asillaris* leaves. *Biotechnology and Biodiversity Letters*, 2,19-24.
- Bakker, F. T., Culham, A., Daugherty , L. and Gibby , M. (1999). A *trnL-F* phylogeny for species of *Pelargonium* (Geraniaceae) with small chromosome. *Plant Systematic and Evolution*, 216, 309-324.

- Borsch, T., Hilu, K.W., Wiersema, J.H., Lohne, C., Barthlott, W. and Wildes, V. (2007). Phylogenetic of *Nymphaea* (Nymphaeaceae) : evidence from substitutions and microstructural changes in the chloroplast *trnL-trnF* region. *Plant Science*, 168(5), 639-671.
- Collinson, M.E. (1980). Recent and Tertiary seeds of the Nymphaeaceae sensu lato with a revision of *Brasenia ovula* (Brong). Reid and Chandler. *Annals of Botany*, 46, 603-632.
- Conard, S. H. (1905). A monograph of the genus *Nymphaea*. Washington : Carnegie institution.
- Kuo, L.Y. Li, F.W. Chiou, W.L. Wang, C.N . (2011). First insights into fern *matK* Phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 59: 556-566.
- Les, D.H. (2002). Nymphaeales. University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA
- Doyle, J. and Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.
- Les D.H. (2000) Nymphaeales : Encyclopedia of Life Science. University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA
- Les D.H., Garvin, D.K. and Wimpee CF (1991) Molecular evolutionary history of ancient aquatic angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 10119-10123.
- Les, D.H, Moody, M.L. and Doran, A.S. (2004). A Genetically Confirmed Intersubgenetic Hybrid in *Nymphaea* L. (Nymphaeaceae Salisb.). *HortScience*, 39(2), 219-222.
- Les, D.H, Schneider, E.L., Padgett, D.J., Soltis, P.S., Soltis, D.E. and Zanis, M. (1999) Phylogeny, Classification and Floral Evolution of Water Lilies (Nymphaeaceae; Nymphaeales) : A Synthesis of Non-molecular, *rbcL*, *matK*, and 18s rDNA Data. *Systematic Botany*. 24: 28-46
- Ito, M. (1987). *Phylogenetics Systematics of the Nymphaeales*. Kyoto University. Kyoto.

- Khossokhan, M., Kazempour Osaloo, S., Saadatmand, S. and Attar, F. (2010). Molecular phylogeny of *Rochelia* (*Boraginaceae*) based on nrDNA ITS and cpDNA *trnL-F* sequences. *Iranian Journal of Botany*, 16 (1). 22-29
- Muhammad Ajaib, Zaheer – Ud-Din Khan, Nasrullah Khan and Muhammad Wahab. (2010). *Euryale ferox* Salib of the family Nymphaeaceae: An Addition to the Flora of Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 42(5): 2973-2974.
- Nicholas, K.B. and Nicholas, H.B.Jr. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments.
- Padgett, D.J. (1999). Nomenclature novelties in *Nuphar*. Bridgewater state College, Bridgewater, USA
- Padgett, D.J., Les, D.H. and Crow, G.E. (1999). Phylogenetic relationships in *Nuphar* (Nymphaeaceae): Evidence from morphology, chloroplast DNA, and nuclear ribosomal DNA. Bridgewater state College, Bridgewater, USA
- Petit, R.J., Demesure, B., and Dumolin-Lapegue, S. (1996). CpDNA and plant mtDNA primer. In Molecular tools for screening biodiversity: Plants and Animals. A Karp, PG Isaac, D Ingram eds, Chapman & Hall.
- Slocum, D.P. (2005). Waterlilies and lotuses: species, cultivars, and new hybrids. Timber press. 260 pages.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.
- Woods, K., Hilu, K.W., Borsch, T. and Wiersema, J.H. (2005). Pattern of Variation and Systematic of *Nymphaea odorata*: . Sequence Information from ITS and *trnL-F*. *Systematic Botany*, 30(3), 48-493.

Output ที่ได้จากการ

- มีการเผยแพร่ผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการระดับชาติ “วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ ๖” ในระหว่างวันที่ 20-21 มีนาคม 2557 ณ มหาวิทยาลัยบูรพา ในรูปแบบ Poster Presentation และรายงานสืบเนื่องจากการประชุม (Full proceeding)



Reprint

การจัดจำแนกพีชวงศ์บัวสายโดยใช้คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ Systematics in Family Nymphaeaceae Based on Chloroplast DNA

ณัฐกานต์ โภเสน陀, สุนิสา ณัฐพรนิชกุล, และ มลิวนันดา นาคขุนทด*

Nutthakarn Gosanto, Sunisa Nutthapornnitchakul and Maliwan Nakkuntod*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้า

บทคัดย่อ

พีชวงศ์บัวสาย (Nymphaeaceae) มีการกระจายพันธุ์อยู่เกือบทั่วโลกทั้งในเขต้อนและเขตตอบอุ่น เป็นพืชที่ได้รับความนิยมในการปลูกเป็นไฟประดับ พีชวงศ์บัวสาย หลายชนิดมีลักษณะของสีกลีบดอก รูปร่างดอก หรือใบที่คล้ายคลึงกัน ทำให้ประสบปัญหาในการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ดังนั้น เพื่อให้สามารถจัดจำแนกได้ถูกต้องตามชนิดพันธุ์จึงต้องอาศัยข้อมูลทางชีวโมเดลเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ทางวิวัฒนาการด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum parsimony โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้ข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอที่เก็บไว้ในยีน *trnK-matK* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* ในคลอโรพลาสต์ พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 1180-1209 คู่เบส และ 991-1095 คู่เบส ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าสามารถจำแนกพีชวงศ์บัวสายออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มน้ำกลิ่นจะแยกออกจากเป็นกลุ่มแรก และกลุ่นไส้ปลาไหลจะแยกออกจากเป็นกลุ่มที่สอง ขณะที่กลุ่มใหญ่จะประกอบไปด้วยบัวสาย บัวกระดัง ผู้ริอาเร และอนดินเนีย

คำสำคัญ : พีชวงศ์บัวสาย / ยีน *trnK-matK* / บริเวณระหว่างยีน *trnL-F*

Abstract

Nymphaeaceae is an aquatic herbs family distributed worldwide from tropical to temperate regions. Most of them are useful for decoration. Some species are similar in petal colors, flower shapes or leaves, and thus morphologically indistinguishable. In order to clarify this taxonomic complexity and study the phylogenetic relationship of *Nymphaeaceae*, two chloroplast markers, *trnK-matK* and *trnL-F* intergenic spacer, were analysed, using Maximum parsimony method. The results showed that the length of *trnK-matK* is 1180-1209 basepairs and *trnL-F* is 991-1095 basepairs respectively. According phylogenetic tree, all members of *Nymphaeaceae* are classified into 3 groups. *Nuphar*

clade is the basal lineage of Nymphaeaceae. *Barclaya* clade is the second one, whereas *Nymphaea*, *Victoria*, *Euryale* and *Ondinea* are placed in the same clade.

Keywords : Nymphaeaceae / *trnK-matK* gene / *trnL-F* intergenic spacer

*Corresponding author. E-mail : lotharmali@yahoo.com

1. บทนำ

พืชวงศ์บัวสายเป็นพืชล้มลุกที่ขึ้นในน้ำ พบได้ทั่วไปในเขตต้อนและเขตอบโนน มีอายุหลายปี ประกอบไปด้วย 6 กลุ่ม คือ กลุ่ม *Nymphaea* หรือกลุ่มบัวสาย ซึ่งมีสมาชิกมากที่สุดในวงศ์นี้ กลุ่ม *Barclaya* หรือไส้ปลาไหล กลุ่ม *Nuphar* หรือบัวญี่ปุ่น กลุ่ม *Ondinea* กลุ่ม *Euryale* หรือบัวดาด และกลุ่ม *Victoria* (คุณหญิงธุรชาติ เพ็ญ, วีรญา บุญตี้ และวิสาข เพียรศุภานาพ, 2550; Slocum, 2005) gehören จัดจำแนกพืชในวงศ์บัวสายโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในปัจจุบันยังเป็นมีสับสนและไม่ชัดเจนอยู่บ้างในบางส่วน เพราะลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้น อาจมีการเปลี่ยนแปลงได้เนื่องจากสภาพแวดล้อม ทำให้สั่งมีชีวิตที่อยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกันมีการผันแปรลักษณะบางประการขึ้นมากถ้าหากว่ามีการเปลี่ยนแปลงได้เนื่องจากสภาพแวดล้อม ทำให้สั่งมีชีวิตที่อยู่ในส่วนเดียวกันมีการเปลี่ยนแปลงได้ตามนั้น ดังนั้นการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จึงไม่สามารถอธิบายได้ด้วยลักษณะดังกล่าวที่เกิดขึ้น การที่จะสามารถจัดจำแนกพืชแต่ละกลุ่มออกจากกันได้ยาก จัดจำแนกได้ยากและถูกต้องมากขึ้นจึงจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลจากแหล่งอื่นด้วย ซึ่งข้อมูลดีเยี่ยมมากที่สุดนั้นคือข้อมูลน้ำที่นิยมนำมาใช้ในการจัดจำแนกมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นข้อมูลที่ละเอียดเพียงพอและสามารถสืบหาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ด้วย

คลอโรฟลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA; cpDNA) ได้ถูกใช้เป็นแหล่งของเครื่องหมายทางดีเอ็นเอที่มีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิวัฒนาการและพันธุศาสตร์ประชากร เนื่องจาก คลอโรฟลาสต์ดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอของเซลล์ที่มีความคงที่สูงในเรื่องขนาดและโครงสร้าง คำจำกัดความของคลอโรฟลาสต์ดีเอ็นเอนั้นคือเป็นแหล่งของข้อมูลสำหรับการศึกษาทางด้านการจัดจำแนกพืชโดยใช้พาราเซโนเลกต์ เมื่อจากมีขนาดและการจัดเรียงตัวของยีนแตกต่างกันมาก การเรียงตัวของยีนในคลอโรฟลาสต์ดีเอ็นเอได้นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้กันทั่วไป (universal chloroplast primers) ซึ่งเป็นการอำนวยความสะดวกให้กับการศึกษาทางด้านวิวัฒนาการของพืชและพันธุศาสตร์ประชากร (Petit et al., 1996; Kuo et al., 2011) นักวิชาชีวภาพทางด้าน molecular evolution ให้ความสนใจที่จะศึกษาในยีน *matK* กันมาก เนื่องจากมีอัตราการวิวัฒนาการของลำดับเบตที่สูงกว่ายีนอื่นๆ และมีอัตราการแทนที่เบตสูง จึงทำให้มีการใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกและหารวิวัฒนาการของพืชและตอบคำถามเกี่ยวกับสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับต่างๆ ของอนุกรมวิธานด้วย (Tamura et al., 2004) และยังมีบริการอื่นๆ ที่สามารถนำมาใช้ส่วนในการจัดจำแนกได้อีกด้วย เช่น *trnT-L-F* เป็นต้น (Les et al., 1999; Padgett et al., 1999; Podoplelova and Ryzhakov, 2005; Lohne et al., 2007)

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจัดจำแนกและศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในวงศ์บัวสาย โดยการใช้คำจำกัดความของยีน *trnK-matK* และ *trnL-F* ในคลอโรฟลาสต์ เพื่อให้การจัดอนุกรมวิธานของพืชวงศ์นี้ชัดเจนยิ่งขึ้น

2. วิธีการ

เก็บตัวอย่างพืชในวงศ์บัวสายทั้ง 6 กลุ่มทั้งที่พบในแหล่งธรรมชาติและที่เก็บทราบสายพันธุ์จากที่ต่างๆ ทั้งที่เป็นตัวอย่างสดและพรรณไม้แห้ง เพื่อใช้เป็น Voucher specimens หรือ living specimens โดยใช้ *Brasenia* และ *Cabomba* เป็น outgroups จากนั้นแยกตัวอย่างเป็นชุดโดยใช้ชุด genomic DNA ด้วยวิธีดักแด้ปัลอกของ Doyle and Doyle (1987) โดยใช้ 2X CTAB buffer-β-mercaptoethanol และ RNase A แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C จากนั้นเติม chloroform-isoamyl alcohol (24:1) และนำไปปั่นเหยี่ยง แล้วเติม Isopropanol เพื่อตัดตะกอนดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จากนั้นนำไปปั่นเหยี่ยง และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย Ethanol 70% ตัดหัวละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer แล้วนำไปต่อรวมขนาดและ

คุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีของการ PCR เจลอิเล็กโทรฟอร์ไซต์ที่ความเข้มข้นเจล 0.8% จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริโภคนระหว่างยืน *tRNA-L-F* โดยใช้ universal primer (Taberlet *et al.*, 1991) และบริโภคนยืน *tRNA-K-matK* โดยใช้ไฟเเมร์ที่สังเคราะห์ขึ้นเอง ด้วยเครื่อง GeneAmp^{*} PCR System 9700 (Applied Biosystems) จากนั้นทำขั้นตอนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ให้บริสุทธิ์ด้วย HiYieldTM Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBCBioscience) ก่อนนำไปหาลำดับดีเอ็นเอต่อไป

เมื่อได้ลำดับนิวคลีอิດที่สมบูรณ์และถูกต้องแล้ว นำมำทำการจัดเรียงด้วยมือโดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6.002 (Nicholas and Nicholas, 1997) และตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้งด้วย ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) แล้วตรวจหาความหลากหลายของรูปแบบนิวคลีอิດที่เกิดขึ้น จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม MEGA5.2 (Tamura *et al.*, 2011) หา Phylogenetic tree ที่เหมาะสมที่สุดด้วยวิเคราะห์ Maximum parsimony โดยใช้ heuristic search แล้ววิเคราะห์ความน่าเชื่อถือในแต่ละกิ่งโดยวิธี Bootstrap แบบ Full heuristic จำนวน 1,000 ราก

3. ผลและอภิปราย

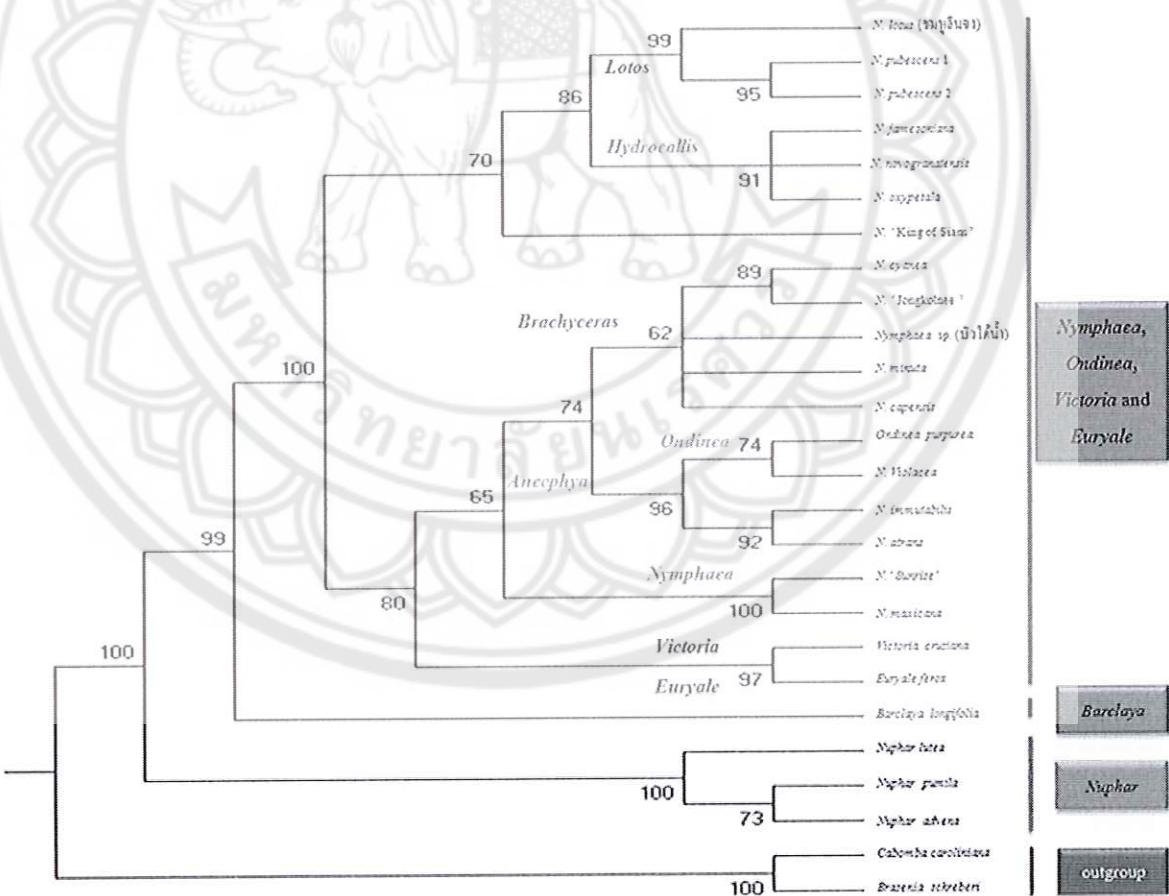
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริโภคนระหว่างยืน *tRNA-L-F* พบร่วมกับชั้นส่วนมีเพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 1000 คู่เบส และเมื่อนำไปหาลำดับดีเอ็นเอแล้ว พบร่วมบริโภคนระหว่างยืน *tRNA-L-F* มีขนาดผันแปรตั้งแต่ 990-1090 คู่เบส โดยขนาดที่แตกต่างกันนี้เกิดจากการเพิ่มเข้ามาหรือขาดหายไปของชั้นส่วนดีเอ็นเอเป็นส่วนใหญ่ และเป็นลักษณะของเบสร้าว ตั้งแต่ 2-13 คู่เบส ขณะที่บริโภณยืน *tRNA-K-matK* ชั้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นั้นมีขนาดประมาณ 1200 คู่เบส โดยมีความผันแปรของขนาดตั้งแต่ 1180-1210 คู่เบส โดยขนาดที่แตกต่างกันเกิดจากการเพิ่มเข้ามาหรือขาดหายไปของชั้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเบสร้าวตั้งแต่ 1-6 คู่เบส และในบริโภณยืน *matK* นั้นพบการเปลี่ยนแปลงของเบสในตำแหน่งที่ 2 และ 3 ของโคดอน (codon) ในหลายตำแหน่ง แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในหลายงานวิจัยกล่าวว่ายืน *matK* นั้นเป็น pseudogene ซึ่งเอนไซม์ muteraseK ที่สร้างขึ้นมาอย่างไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน แต่ยืนนี้มีความแปรผันได้เร็ว แนะนำจะนำมำใช้ศึกษาทางวิวัฒนาการ (Hilu *et al.*, 2003)

เมื่อนำมาหาลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ พบร่วมบริโภณระหว่างยืน *tRNA-L-F* มี phylogenetic informative site 14.33% และ singleton 10.92% ขณะที่บริโภณยืน *tRNA-K-matK* มี phylogenetic informative site 10.81% และ singleton 7.09% ดังจะเห็นว่าบริโภณระหว่างยืน *tRNA-L-F* ถึงจะมีขนาดสั้นกว่าแต่ให้ข้อมูลที่ใช้ในการจัดจำแนกมากกว่าบริโภณยืน *tRNA-K-matK* เนื่องจากบริโภณระหว่างยืนนักจะมีความผันแปรได้มากกว่าบริโภณที่เป็นนี้ และ phylogenetic tree ที่ได้มี 5 ขั้น แต่เมื่อเทียบ topology เดียว โดยมีค่า CI = 0.8952 RI = 0.9029 และ tree length = 353 จากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นพบว่าพืชวงศ์บัวสายเป็น monophyletic group (ภาคที่ 1) ที่มีบัวญี่ปุ่นสกุล *Nuphar* เป็น basal lineage จากค่า bootstrap support ที่สูงมาก โดยที่ *Nu. pumila* และ *Nu. advena* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่า *Nu. lutea* และสกุลได้ปลาไทร (Barclaya) เป็นพืชกลุ่มที่สองที่แยกออกมานาในสายวิวัฒนาการของพืชวงศ์บัวสายด้วยค่า bootstrap support ที่สูงมากเช่นกัน ซึ่งพืชในสกุลนี้พบเพียงชนิดเดียวในประเทศไทย เนื่องจากเป็นพืชนำเข้ามาปลูกประดับในตู้ปลาเท่านั้น ไม่พบในธรรมชาติ และกลุ่มนี้ที่สุดที่ประกอบด้วยบัวสาย (*Nymphaea*) บัววิดตอเรีย (*Victoria*) บัวดา (*Euryale*) และบัวอ่อนนิดนี่ (*Ondinea*)

เมื่อพิจารณาเฉพาะพืชในสกุลบัวสาย (Genus *Nymphaea*) ที่ประกอบด้วย 5 วงศ์ย่อย (subgenera) พบร่วมที่สกุลนี้เป็น paraphyletic group ที่มีบัวสกุลอื่นแทรกเข้ามาอยู่ในสายวิวัฒนาการด้วย ทำให้สามารถแบ่งพืชสกุลบัวสายออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ *Lotos-Hydrocallis* clade และ *Brachyceras-Anecphya-Nymphaea* clade โดยในสายวิวัฒนาการแรกคือ *Lotos-Hydrocallis* clade ที่มีค่า bootstrap support ปานกลางนั้นพบว่า *Nymphaea* King of Siam ที่เป็นลูกผสมเป็น basal lineage ของกลุ่มนี้ อาจจะเนื่องมาจากลูกผสมนี้เกิดจากการผสมระหว่างบัวสายพันธุ์ไทยกับบัวสายพันธุ์ต่างประเทศ ทำให้ไม่ถูกจัดอยู่ในสกุลย่อยใดเลย รวมถึงไม่สามารถระบุแม่พันธุ์หรือพ่อพันธุ์ได้ และบัวสูญเสียที่ยังเป็นหมันอีกด้วย ขณะที่บัวสายสกุลย่อย *Lotos* และ *Hydrocallis* นั้นมีบัวพุบุษร่วมกัน โดยมีลักษณะร่วมกันคือจะบานในเวลากลางคืนเหมือนกัน แต่บัวสกุลนี้มี特性การกระจายพันธุ์ต่างกัน กล่าวคือบัวสายสกุลย่อย *Lotos* จะพบในเขตเดียวกัน 例外คือ *Victoria* บางส่วนของอสเตรเลียและญี่ปุ่น ขณะที่บัวสายสกุลย่อย *Hydrocallis* พบร่วมกับบัวสายสกุลอื่นแทรกอยู่ด้วย โดยที่บัวสกุล *Victoria* และ *Euryale* จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดที่มีค่า bootstrap support ที่สูงพบว่าจะมีบัวสกุลอื่นแทรกอยู่ด้วย โดยที่บัวสกุล *Victoria* และ *Euryale* จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิด

กันมากด้วยค่า bootstrap support ที่สูงมาก อาจจะเนื่องมาจากการถักชณะที่มีหนามที่ก้านใบและก้านดอกเหมือนกัน รูปร่างใบคล้ายกัน แต่ต่างกันที่ข้อใบของบัววิเศษเดอเรียจะตั้งขึ้น ขณะที่ข้อใบของบัวดาดจะไม่ตั้งขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นกลุ่มที่แยกออกมาเป็นกลุ่มแรก และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับบัวสายสกุลย่อย *Nymphaea* ที่เป็นบัวในเขตหนาวและมีลักษณะของไช畠เมื่อก่อนกัน (Ito, 1987) ด้วยค่า bootstrap support ที่ต่ำ ขณะที่บัวสายในสกุลย่อย *Brachyceras* และ *Anecphya* จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันด้วยค่า bootstrap support ปานกลาง เนื่องจากมีลักษณะของแผ่นรังไห้แยกจากกัน (Conard, 1905) และพบว่าบัวสกุลอนดีเนีย (*Ondinea*) มีบรรพบุรุษร่วมกับบัวสายสกุลย่อย *Anecphya* ด้วยค่า bootstrap support ปานกลาง ซึ่งบัวสกุลอนดีเนีย (*Ondinea*) และบัวสายสกุลย่อย *Anecphya* นั้นมีข特การกระจาดพันธุ์ที่พบเฉพาะในอสเตรเลียตะวันตกเท่านั้น แต่ที่สำคัญของดอกที่แตกต่างกันมากอาจจะเนื่องจากการดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน และบัวสกุลอนดีเนียนี้ก็มีเพียงชนิดเดียวคือ *Ondinea purpurea* ดังนั้นบัวสกุลนี้จึงควรจะถูกย้ายสกุลและเปลี่ยนเป็น *Nymphaea ondinea* (Lohne et al., 2008; Borsch et al., 2011)

จากการจัดจำแนกพืชวงศ์บัวสาย (Nymphaeaceae) โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอในคลอโรฟลาตต์เพบัวสามารถให้ความชัดเจนมากขึ้น เนื่องจาก phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นมีค่า bootstrap support ที่ค่อนข้างสูง จึงเชื่อได้ถ้าสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมีความน่าเชื่อถือ แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้สามารถระบุสายสัมพันธ์ที่ชัดเจนยิ่งขึ้นอีกขั้นเครื่องวิเคราะห์ด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม เช่น Maximum Likelihood หรือ Bayesian Analysis หรือการใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers) อื่นให้มากขึ้น รวมถึงข้อมูลของดีเอ็นเอในนิวเคลียส (nuclear DNA) ด้วย



ภาพที่ 1 Maximum Parsimonious Tree จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอบริโภณคลอโรฟลาตต์ของพืชวงศ์บัวสาย
ตัวเลขที่ปรากฏบนกิ่งคือค่า Bootstrap support

4. บทสรุป

จากการศึกษาเพื่อการจัดจำแนกและประเมินถ่ายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในวงศ์บัวสาย โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอ บริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ ตามการถอดแบบได้สำเร็จในวงศ์นี้ ควรถูกแบ่งออกเป็น 3 วงศ์ย่อย คือ วงศ์ย่อย Nupharoideae ที่มีสมาชิกเพียง 1 สกุลคือ สกุล *Nuphar* หรือบัวญี่ปุ่น วงศ์ย่อย Barclayoideae ที่มีสมาชิกเพียงสกุลเดียวเช่นกัน คือ สกุล *Barclaya* และวงศ์ย่อย Nymphaeoideae ที่ประกอบด้วยสกุล *Victoria*, *Euryale* และ *Nymphaea*

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 และความอนุเคราะห์สถานที่ รวมถึงอุปกรณ์ในการทำวิจัยจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พร้อมกันนี้ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ คุณหญิงสุชาดา ศรีเที่ยง คุณวีรญา บุญเตี้ย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณ นาหรัย ชาญศิลป์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้วยอย่างดีให้ข้อมูลทางด้านฐานวิทยา

6. เอกสารอ้างอิง

- คุณหญิงสุชาดา ศรีเที่ยง, วีรญา บุญเตี้ย และวิสาขा เพียรสุภาพ. (2550). การจำแนกพันธุ์บัว. *The Proceeding of IWGS Annual Symposium*, 181-189.
- Borsch, T., Lohne, C., Mbeye, M.S. and Wiersema J.H. (2011). Towards a complete species tree of *Nymphaea*: shedding further light on subgenus *Brachyceras* and its relationships to the Australian water-lilies. *Telopea*, 13(1-2), 193-217.
- Conard, H.S. (1905). The Waterlilies: A Monograph of the Genus *Nymphaea*. Washington: Carnegie Institution.
- Doyle, J. and Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Hilu, K.W., Borsch, T., Muller, K., Soltis D.E., Soltis, P.S. et al. (2003). Angiosperm Phylogeny Based on *matK* Sequence Information. *American Journal of Botany*, 90(12), 1758–1776.
- Ito, M. (1987). Phylogenetic Systematics of the Nymphaeales. *The botanical magazine*, Tokyo, 100, 17-35
- Kuo, L.Y., Li, F.W., Chiou, W.L. and Wang, C.N. (2011). First insights into fern *matK* phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59, 556–566
- Les, D.H., Schneider, E.L., Padgett, D.J., Soltis, P.S., Soltis, D.E. and Zanis, M. (1999). Phylogeny, classification and floral evolution of waterlilies (Nymphaeaceae: Nymphaeales): a synthesis of non-molecular, *rbcL*, *matK*, and 18s rDNA data. *Systematic Botany*, 24, 28–46.
- Lohne, C., Borsch, T. and Wiersema, J.H. (2007). Phylogenetic analysis of Nymphaeales using fast-evolving and noncoding chloroplast markers. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 154, 141–163.
- Lohne, C., Borsch, T., Jacobs, S.W.L., Hellquist, C.B. and Wiersema, J.H. (2008). Nuclear and plastid DNA sequences reveal complex reticulate patterns in Australian water-lilies (*Nymphaea* subgenus *Anecphya*, Nymphaeaceae). *Australian Systematic Botany*, 21, 229-250.
- Nicholas, K.B. and Nicholas, H.J.B. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignment. Retrieved August 20, 2013, from www.psc.edu/biomed/genedoc.
- Padgett, D.J., Les, D.H. and Crow, G.E. (1999). Phylogenetic relationships in *Nuphar* (Nymphaeaceae): Evidence from morphology, chloroplast DNA, and nuclear ribosomal DNA. Bridgewater State College, Bridgewater, USA.

- Petit, R.J., Demesure, B., and Dumolin-Lapègue, S. (1996). CpDNA and plant mtDNA primers. In Molecular tools for screening biodiversity: Plants and Animals. A Karp, PG Isaac, D Ingram eds, Chapman & Hall.
- Podoplelova, Y. and Ryzhakov, G. (2005). Phylogenetic analysis of the order Nymphaeales based on the nucleotide sequences of the chloroplast ITS2-4 region. *Plant Science*, 169, 606–611.
- Slocum, D. P. (2005). Waterlilies and lotuses: species, cultivars, and new hybrids. Timber press. 260 pages.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of Chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolution Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Research*, 24, 4876-4882.

