บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษา

เก็บตัวอย่างพืชสกุลบัวสาย (*Nymphaea*) จากแหล่งกระจายพันธุ์ในธรรมชาติ และที่รวบรวมไว้ในสวนหลวง ร. 9 กรุงเทพมหานคร รวมถึงจากสถานีวิจัยบัวและถ่ายทอดเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออกรวมถึงข้อมูลใน Genbank เพื่อให้ข้อมูลครบถ้วนสมบูรณ์ใน 5 สกุลย่อย และสกุลใกล้เคียงที่ใช้เป็น outgroups รวมตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ทั้งสิ้น 54 ตัวอย่าง (ตาราง 1)

ตาราง 1 ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับที่	ตัวอย่างพืช	แหล่งที่มา / GenBank no.
1	*Nymphaea alba* L.	RMUTTO*
2	*N. amazonum* Mart. and Zucc.	AM422026**
3	*N. atrans* S. W. L. Jacobs	RMUTTO
4	*N. carpensis* var. *zanzibariensis* (Caspary) Conard (กลีบดอกสีม่วง)	สวนหลวง ร. 9
5	*N. carpensis* var. *zanzibariensis* (Caspary) Conard (กลีบดอกสีชมพู)	สวนหลวง ร. 9
6	*N. carpentaria* S.W.L. Jacobs and Hellq.	RMUTTO
7	*N. colorata* Peter	สวนหลวง ร. 9
8	*N. cyanea* Roxb.	RMUTTO
9	*N. elleniae* S. W. L. Jacobs	AM422056
10	*N. gigantea* Hook. (ดอกสีขาว)	สวนหลวง ร. 9
11	*N. gigantea* Hook. (ดอกสีม่วง)	สวนหลวง ร. 9
12	*N. immutabilis* S. W. L. Jácobs	RMUTTO
13	*N. jamesoniana* Planch.	AM422032

ตาราง 1 (ต่อ)

ลำดับที่	ตัวอย่างพืช	แหล่งที่มา / GenBank no.
14	*N. lotus* (L.) Willd. (ชมพูลินจง)	สวนหลวง ร. 9
15	*N. macrosperma* Merr. and L. M. Perry	AM422063
16	*N. mexicana* Zucc. (ดอกขนาดเล็ก)	สวนหลวง ร. 9
17	*N. mexicana* Zucc. (ดอกขนาดใหญ่)	RMUTTO
18	*N. micrantha* Guill. and Perr.	RMUTTO
19	*N. minuta* Landon	สวนหลวง ร. 9
20	*N. neorosea* Landon	RMUTTO
21	*N. nouchali* Burman f. (กลีบดอกสีขาวขอบฟ้า)	ระยอง
22	*N. nouchali* Burman f. (กลีบดอกสีม่วง)	พะเยา
23	*N. odorata* Aiton subsp. *odorata* 1	AY145333
24	*N. odorata* Aiton subsp. *odorata* 2	สหรัฐอเมริกา
25	*N. odorata* Aiton subsp. *tuberosa*	สหรัฐอเมริกา
26	*N. oxypetala* Planch.	AM422035
27	*N. petersiana* Klotzsch	AM422053
28	*N. pubescens* Willd. (กลีบดอกสีชมพูเข้ม)	พิษณุโลก
29	*N. pubescens* Willd. (กลีบดอกสีชมพูอ่อน)	พิษณุโลก
30	*N. pubescens* Willd. (กลีบดอกสีชมพูอ่อน)	พิษณุโลก
31	*N. pubescens* Willd. (กลีบดอกสีชมพูอ่อน)	นครสวรรค์
32	*N. rubra* Roxb.	สวนหลวง ร. 9
33	*N. rudgeana* G. Mey.	RMUTTO
34	*N. tetragona* Georgi	RMUTTO
35	*N. violacea* Lehm.	RMUTTO
36	*Nymphaea* 'Chalongkwan'	สวนหลวง ร. 9
37	*Nymphaea* 'Jongkolnee'	สวนหลวง ร. 9
38	*Nymphaea* 'Royal purple'	สวนหลวง ร. 9
39	*Nymphaea* 'Sunrise'	สวนหลวง ร. 9

ตาราง 1 (ต่อ)

ลำดับที่	ตัวอย่างพืช	แหล่งที่มา / GenBank no.
40	*Nymphaea* 'Violet Nang kwang'	พิษณุโลก
41	*Nymphaea* 'White Nang kwang'	พิษณุโลก
42	*Nymphaea* sp.	สระแก้ว
43	*Nymphaea* sp. ขาวชมพูเล็ก (ฐานใบปิด)	สวนหลวง ร. 9
44	*Nymphaea* sp. ขาวชมพูเล็ก (ฐานใบเปิด)	สวนหลวง ร. 9
45	*Nymphaea* sp. (ขาวสวนหลวง)	สวนหลวง ร. 9
46	*Nymphaea* sp. (ขาวอยุธยา)	สวนหลวง ร. 9
47	*Nymphaea* sp. (บัวใต้น้ำ)	สวนหลวง ร. 9
48	*Barclaya longifolia* Wall.	AM422019
49	*Brasenia schreberi* J.F.Gmel.	AY145329
50	*Cabomba caroliniana* A.Gray.	AY145328
51	*Euryale ferox* Salisb.	AM422020
52	*Nuphar lutea* (L.) Sm.	สวนหลวง ร. 9
53	*Ondinea purpurea* Hartog	AM422023
54	*Victoria amazonica* (Poeppig) Sowerby	สวนหลวง ร. 9

*RMUTTO = มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก

**ลำดับนิวคลีโอไทด์ใน Genbank มาจากการศึกษาของ Borsch, et al, (2007)

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องหมุนเหวี่ยงแรงหนีศูนย์กลาง (centrifuge)
2. ตู้เก็บรักษาตัวอย่าง (deep freezer ลบ 20 องศาเซลเซียส)
3. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
4. ชุดอิเล็กโทรโฟรีซีส (electrophoresis set)
5. เครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation)
6. เตาอบไมโครเวฟ (microwave oven)
7. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
8. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

7.4 ข้อมูลข่าวสารและการบริการ เพื่อให้เกิดความรู้เกี่ยวกับเรื่องต่างๆ แก่นักท่องเที่ยว เพื่อชักจูงให้นักท่องเที่ยวเข้ามาเที่ยวในประเทศมากยิ่งขึ้น เช่น หนังสือแนะนำเกี่ยวกับแหล่งท่องเที่ยว แผ่นพับ แผนที่และเอกสารแนะนำต่างๆ การโฆษณาประชาสัมพันธ์เพื่อชักจูงใจให้นักท่องเที่ยวเข้ามาเที่ยว การส่งเสริมและให้ความรู้ใหม่ๆ อบรมการนำเที่ยวหรือมัคคุเทศก์ รายละเอียดเกี่ยวกับ นักท่องเที่ยวแต่ละแห่ง จัดทำแผนที่เส้นทางและแผนที่ท่องเที่ยวของสถานที่ท่องเที่ยวแต่ละแห่ง นอกจากนี้สิ่งสำคัญที่สุดของธุรกิจการท่องเที่ยวอีกประการหนึ่งคือการบริการ ประกอบด้วย ที่พักสำหรับนักท่องเที่ยวที่สะอาด ปลอดภัย ราคาเหมาะสม อาหารและเครื่องดื่ม ห้องน้ำที่สะอาด สะดวกสบายและเหมาะสมกับสถานที่ ของที่ระลึกและสินค้าพื้นเมือง

7.5 ความปลอดภัยและการอำนวยความสะดวก ด้านการเข้าเมืองต้องมีการคำนึงถึงมากที่สุด อาจจะกระทำได้หลายอย่าง ได้แก่ การแนะนำเจ้าของท้องถิ่นให้ช่วยเหลือนักท่องเที่ยวเมื่อได้รับความเดือดร้อน การแนะนำนักท่องเที่ยวเกี่ยวกับเรื่องการป้องกัน และระมัดระวังตน เพื่อมิให้ได้รับอันตรายในด้านต่างๆ การกำหนดมาตรการต่างๆ เพื่อความปลอดภัยของนักท่องเที่ยว การขอความร่วมมือจากหน่วยงานต่างๆ ในการอำนวยความสะดวกปลอดภัยแก่นักท่องเที่ยว การจัดหน่วยงานพิเศษเพื่อช่วยเหลือและให้บริการด้านต่างๆ แก่นักท่องเที่ยวการระเบียบพิธีการ เข้าเมือง เช่น การทำวีซ่า และศุลกากร การขนส่งกระเป๋าของผู้โดยสารการบริการขนส่งระหว่าง ท่าอากาศยานหรือสถานีขนส่งกับที่พัก และการอำนวยความสะดวกด้านต่างๆ แก่ผู้โดยสารที่สถานีขนส่งและท่าอากาศยาน

7.6 องค์ประกอบด้านโครงสร้างพื้นฐาน ต้องมีเพียงพอตามความจำเป็นที่จะสนับสนุนความสะดวกและให้บริการแก่นักท่องเที่ยว อีกทั้งต้องเอื้อประโยชน์ต่อสาธารณชน จึงทำให้ธุรกิจการท่องเที่ยวสามารถดำเนินไปได้ด้วยดีและก่อให้เกิดความสะดวกรวดเร็ว ทำให้แหล่งท่องเที่ยวมีการพัฒนาศักยภาพเพิ่มขึ้น ได้แก่ การไฟฟ้า มีเพียงพอและใช้การได้ดี ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ผู้ประกอบกิจการและให้บริการรวมทั้งความปลอดภัยด้วย การประปาสะอาดถูกหลักอนามัยและมีปริมาณเพียงพอแก่การบริการ การสื่อสาร โทรเลข โทรสาร สะดวก รวดเร็วและปริมาณของหน่วยบริการเพียงพอ ความสามารถในการกำจัดขยะและสิ่งปฏิกูล ตลอดจนสถานพยาบาลและโรงพยาบาลต่างๆ ทันสมัย สะดวก รวดเร็ว ปลอดภัย

7.7 การสนับสนุนอื่นๆ เป็นการเพิ่มความสะดวกสบายให้แก่นักท่องเที่ยว เช่นการเงินการธนาคาร ระเบียบต่างๆ ของสถานที่หรือแหล่งค้นคว้า ความร่วมมือระหว่างประเทศตลอดจนความสุภาพอ่อนโยนและมีไมตรีต่อกัน

สารเคมีสำหรับการทำวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส

1. Agarose powder
2. GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas)
3. Ethidium bromide (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
4. 6X DNA Loading Dye (Fermentas)

วิธีดำเนินการทดลอง

1. เตรียมตัวอย่างพืช

นำใบอ่อนของบัวสายแต่ละชนิดมาล้างให้สะอาดแล้วเช็ดให้แห้งแยกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำมาสกัดดีเอ็นเอ ตัวอย่างที่เหลือนำมาใส่ถุงซิบที่บรรจุสารดูดความชื้น (silica gel) แล้วเก็บตัวอย่างไว้ในตู้ดูดความชื้นต่อไป เปลี่ยนสารดูดความชื้น (silica gel) เป็นประจำทุกวัน จนกว่าตัวอย่างจะแห้งสนิท จึงจะสามารถเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ เพื่อรอการนำมาใช้ต่อไป วิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Aaron, et al. (1990) ส่วนที่ 2 ตัวอย่างบัวสายบางชนิดได้เก็บ voucher specimens ไว้ที่ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก บางตัวอย่างมีปลูกที่สวนหลวง ร. 9 สถานีวิจัยบัวและถ่ายทอดเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก และในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ

2. การสกัดดีเอ็นเอ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีดัดแปลงจาก Agrawal, et al. (1992) เหมาะกับตัวอย่างที่มีปริมาณมาก และใบหนา

1) นำใบพืชแห้งประมาณ 0.2 กรัม มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวแล้วถ่ายใส่หลอดขนาด 15 มิลลิลิตร ที่เติม 1X CTAB buffer (1% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH.8.0, 100 mM Tris pH 8.0) 6 มิลลิลิตร กับ 2-mercaptoethanol 20 ไมโครลิตร

2) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ผสมโดยกลับหลอดไปมาทุกๆ 10 นาที

3) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

4) เติม chloroform ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีน ผสมให้เข้ากันเบาๆ

5) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

6) ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร หลอดใหม่

7) เติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 2/3 ของปริมาตรสารที่มีเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ สังเกตสายดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น

8) ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิลบ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

9) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทิ้ง Isopropanol แล้วเก็บตะกอนไว้

10) ล้างตะกอนด้วย wash buffer (10 mM sodium acetate, 70% ethanal) 5 มิลลิลิตร

11) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

12) ทิ้ง wash buffer แล้วทำให้ตะกอนแห้งโดยการทิ้งให้แห้งในอากาศ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

13) เติม Rnase buffer (10 mM Tris pH 8.0, 15 mM NaCl) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วดูดสารละลายที่ได้ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

14) เติม RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เพื่อย่อยอาร์เอ็นเอ

15) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

16) เติม phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีนที่เหลืออยู่ แล้วกลับหลอดไปมา 4-5 ครั้งเบาๆ

17) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

18) ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

19) เติม chloroform ปริมาตร 450 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีนซ้ำอีกครั้ง แล้วกลับหลอดไปมา 4-5 ครั้งเบาๆ

20) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

21) ดูดสารละลายใสด้านบนใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

22) เติม 3 M sodium 'acetate ปริมาตร 1/10 ของสารที่มี และเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารที่มีเช่นกัน

23) บ่มไว้ที่อุณหภูมิลบ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

24) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

25) ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

26) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

27) ทิ้งตะกอนให้แห้งในอากาศ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

28) ละลายตะกอนด้วย TE buffer (0.01 M Tris pH 8.0, 0.001 M EDTA pH.8.0) 200 ไมโครลิตร

29) เก็บไว้ที่อุณหภูมิลบ 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งานต่อไป

2.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1987) เหมาะกับตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย

1) นำใบพืชแห้งประมาณ 0.05 กรัม มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวแล้วถ่ายใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เติม 1X CTAB buffer 600 ไมโครลิตร กับ mercaptoethanol 10 ไมโครลิตร

2) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ผสมโดยกลับหลอดไปมาทุกๆ 10 นาที

3) เติม chloroform ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีน ผสมให้เข้ากันเบาๆ

4) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

5) ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

6) ใส่ RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เพื่อย่อยอาร์เอ็นเอ

7) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

8) เติม chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีนซ้ำ ผสมให้เข้ากันเบาๆ

9) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

10) ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

11) ทำซ้ำข้อ 9-11 อีกหนึ่งรอบ

12) เติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 1/10 ของสารที่มี และเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารที่มีเช่นกัน

13) บ่มไว้ที่อุณหภูมิลบ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

14) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

15) ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

16) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

17) ทิ้งตะกอนให้แห้งในอากาศ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

18) ละลายตะกอนด้วย TE buffer (0.01 M Tris pH 8.0, 0.001 M EDTA pH.8.0) 200 ไมโครลิตร

19) เก็บไว้ที่อุณหภูมิลบ 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งานต่อไป

3. การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส

โดยแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมากซึ่งมีประจุเป็นลบที่ pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก โดยดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่เร็วกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ช่อง minor groove ของดีเอ็นเอ (Colella, et al., 1996; Bailly, et al., 2005) ด้วยวิธีการดังนี้

1) เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย

2) ชั่งผงอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 กรัม เติม 1X TAE buffer (Tris-Acetate-EDTA) 100 มิลลิลิตร

3) หลอมอะกาโรสโดยใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวให้อะกาโรสละลายจนหมด

4) ตั้งให้เย็นลงและอุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้หนาประมาณ 5 มิลลิเมตร ปล่อยให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง

5) เมื่ออะกาโรสเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึงหวีออกแล้วนำลงในเครื่องสำหรับ อิเล็กโทรโฟรีซีส

6) ใส่ 1X TAE buffer ให้ท่วม โดยให้สูงกว่าผิวอะกาโรสเจล

7) ดูดสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye (0.25% bromophenol blue, 40% (W/V) sucrose) 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงไปในช่องในแผ่นอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้

8) ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีสแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์

9) ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไประยะทางประมาณ ¾ ของอะกาโรสเจลโดยดูจากสีที่ผสมอยู่ใน loading dye แล้วจึงปิดเครื่อง

10) นำอะกาโรสเจลมาย้อมในเอธิเดียมโบร์ไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที

11) นำอะกาโรสเจลมาใส่กล่องพลาสติก ล้างเอธิเดียมโบร์ไมด์ส่วนเกินออก

12) นำอะกาโรสเจลที่ย้อมด้วยเอธิเดียมโบร์ไมด์ไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (gel documentation)

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

1) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (Taberlet et al., 1991) โดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ (ตาราง 2) ร่วมกับ GoTaq® Green Master Mix (Promega) (ตาราง 3)

ตาราง 2 ลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แต่ละตำแหน่ง

ไพรเมอร์	ตำแหน่ง	ลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์
trnT-L intergenic	Forward Primer	5' - CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT - 3'
spacer	Reverse Primer	5' - TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC - 3'
trnL intron	Forward Primer	5' - CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG - 3'
	Reverse Primer	5' - GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC - 3'
trnL-F intergenic	Forward Primer	5' - GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC - 3'
spacer	Reverse Primer	5' - ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG - 3'

2) สภาวะที่เหมาะในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นในแต่ละบริเวณ (ตาราง 4)

3) จากนั้นนำมาตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ในกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์

4.2 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อได้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในแต่ละคู่ไพรเมอร์แล้ว นำมาทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการใช้ QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) แล้วนำไปหา

ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Automated Sequencer บริษัท BioDesign โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ทำพีซีอาร์ข้างต้นเป็นไพรเมอร์ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตาราง 3 ความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

สารที่ใช้	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
GoTaq® Green Master Mix, 2X	25	1เท่า
DNA Template (50 ng/µl)	1	1 ng/µl
Forward Pimer (10 pmole/µl)	1	0.2 pmole/µl
Reverse Primer (10 pmole/µl)	1	0.2 pmole/µl
Nuclease-Free Water	22	
Total	50	

ตาราง 4 สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแต่ละบริเวณ

ช่วง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Initial denaturation	94	1	1
2. Denaturation	94	1.30	
Annealing	50	2	30
Extension	72	3	
3. Final extension	72	10	1

การวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และถูกต้องทั้งหมดทุกตัวอย่างแล้ว นำมาจัดเรียงทุกตัวอย่างในแต่ละบริเวณ (multiple alignment) โดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6.002 (Nicholas and Nicholas, 1997) และ Clustal X (Jeanmougin, et al., 1998) จากนั้นตรวจหาความถี่นิวคลีโอไทด์ การเกิด transition (ts) และ transversions (tv) โดยใช้โปรแกรม Mega 4 (Tamura, et al., 2007) แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม PAUP* version 4.0b10 (Swofford, 1998) และใช้ *Brasenia schreberi* และ *Cabomba caroliniana* เป็น outgroup ทำการวิเคราะห์ phylogenetic tree ที่เหมาะสมที่สุดด้วยการวิเคราะห์ maximum

parsimony โดยใช้ heuristic search ร่วมกับ tree bisection reconnection (TBR) branch swapping จากนั้นบันทึก topology ทั้งหมดที่เกิดขึ้นแล้วหา phylogenetic tree ที่เหมาะสมที่สุดเพียงอันเดียว แล้ววิเคราะห์ความน่าเชื่อถือในแต่ละกิ่งโดยวิธี bootstrap แบบ full heuristic จำนวน 1,000 ซ้ำโดยวิเคราะห์แยกในแต่ละคู่ไพรเมอร์และวิเคราะห์รวมในทุกไพรเมอร์ในตัวอย่างที่ซ้ำกัน รวมถึงการประเมินร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกเพื่อบ่งบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์บางประการของบัวสาย

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะอื่นๆ ดังต่อไปนี้

1. ลำต้น
   1.1 ลักษณะแบบเป็นเหง้าหรือหัว
   1.2 ลักษณะการเจริญของเหง้า
2. ใบ
   2.1 ลักษณะขอบใบ
   2.2 ลักษณะเส้นใบ (venation)
   2.3 ลักษณะฐานใบ (sinus)
3. ดอก
   3.1 ลักษณะผิวด้านนอกของกลีบเลี้ยง
   3.2 ลักษณะก้านชูเกสรเพศผู้ (filament)
   3.3 ลักษณะรยางค์บริเวณปลายของเกสรเพศผู้และเพศเมีย
   3.4 ลักษณะผนังรังไข่
4. ลักษณะอื่นๆ
   4.1 ลักษณะการบานของดอก
   4.2 ช่วงเวลาการบานของดอก

จากนั้นนำมาประเมินเปรียบเทียบกับสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ที่สร้างได้จากข้อมูลทางดีเอ็นเอโดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอทั้ง 3 บริเวณข้างต้น