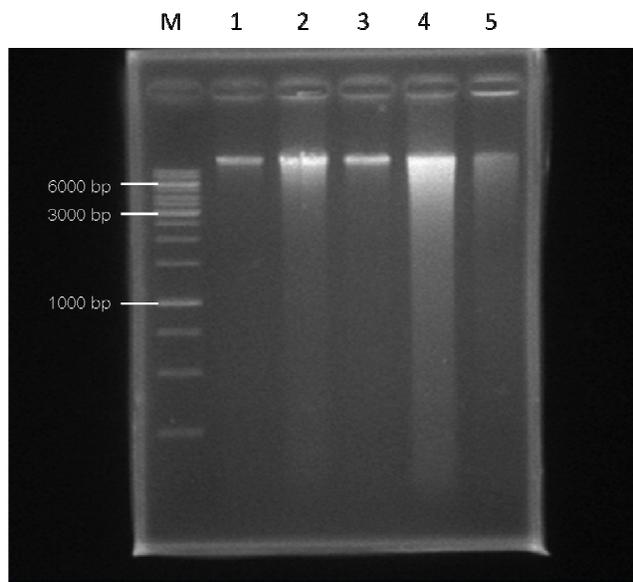


## ผลการศึกษา

### 1. การสกัดและตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

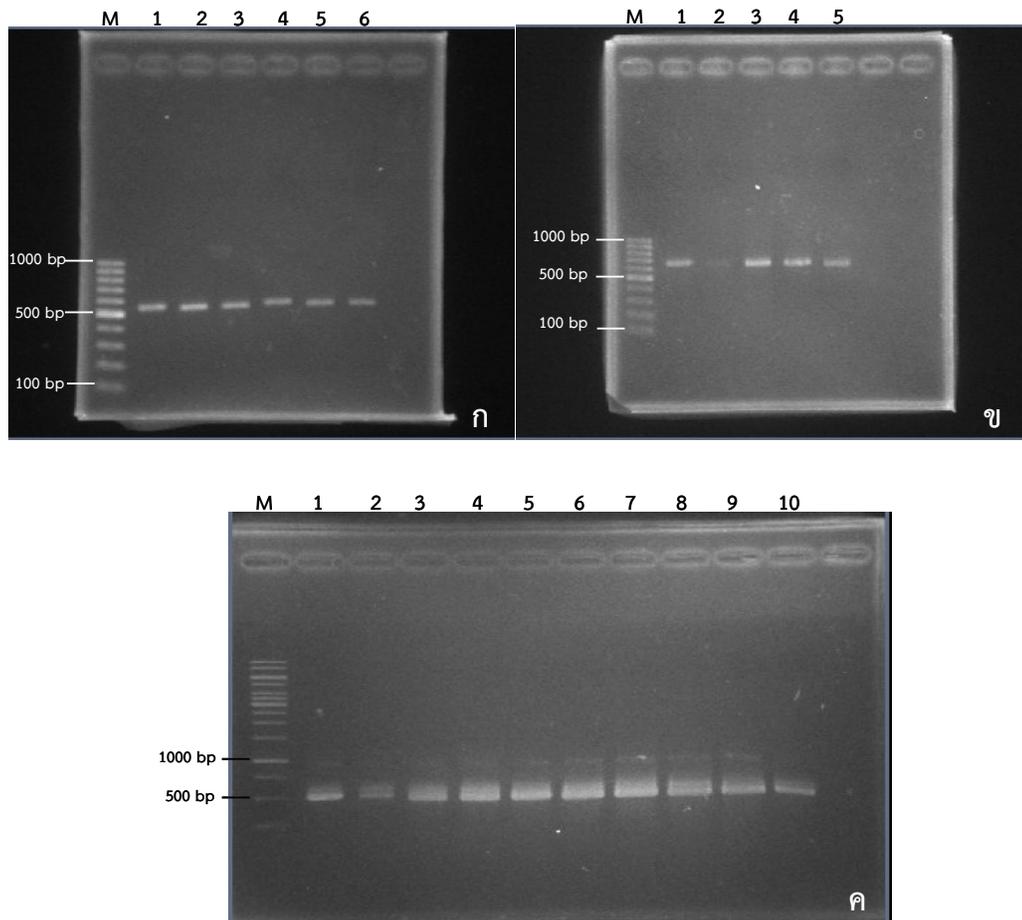
การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืชสกุลบัวสายทั้งหมด 45 ตัวอย่างด้วยวิธีดัดแปลงจาก Agrawal *et al.* (1992) และนำมาตรวจสอบคุณภาพและขนาดด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ สารละลายดีเอ็นเอที่ได้มีลักษณะใสไม่มีสี แต่มีเพียงบางตัวอย่างที่มีสีเหลืองอ่อน อาจเนื่องมาจากใบที่นำมาสกัดเป็นใบที่เก็บไว้ใน silica gel ซึ่งยังแห้งไม่สนิท ทำให้เกิดสารประกอบฟีนอลปริมาณมาก เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส และเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (1 Kb : Fermentas) พบว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ใสไม่มีสีนั้น ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดมากกว่า 10 กิโลเบส และพบการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอน้อยมากหรือไม่พบเลย (ภาพ 4, ตัวอย่าง 1 และ 3) ขณะที่สารละลายดีเอ็นเอที่มีสีเหลืองอ่อน ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเท่ากัน แต่พบการแตกหักของชิ้นส่วนมาก สังเกตจากรอยสเมียร์ที่เกิดขึ้นบนแผ่นเจล (ภาพ 4, ตัวอย่าง 2, 4 และ 5)



ภาพ 4 การตรวจสอบผลการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ M = DNA Ladder 1 Kb Fermentus, Lane 1 = *N. capensis* 1, Lane 2 = *Nymphaea* ‘ชาวอยุธยา’, Lane 3 = *N. capensis* 2, Lane 4 = *Nymphaea* ‘ชาวอยุธยา’ 2 และ Lane 5 = *N. colorata*

## 2. การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

เมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ตามข้อ 1 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์หรือปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ 3 คู่ไพรเมอร์ของบริเวณระหว่างยีน *trnT-L* อินทรอนของยีน *trnL* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ปริมาณมาก และชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีเพียงแถบเดียวในแต่ละคู่ไพรเมอร์ ขนาดประมาณ 550 , 680 และ 500 คู่เบสตามลำดับ (ภาพ 5)



ภาพ 5 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ของ 3 บริเวณในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ คือ บริเวณระหว่างยีน *trnT-L* (ก) อินทรอนของยีน *trnL* (ข) และ บริเวณระหว่างยีน *trnL-F* (ค)

### 3. การวิเคราะห์หา phylogenetic tree และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียง (alignment) แล้วนำไปวิเคราะห์หา phylogenetic tree ด้วยการวิเคราะห์ Parsimony โดยโปรแกรม PAUP\* 4.0 จำนวน 1,000 ซ้ำ ซึ่งมีการคิดวิเคราะห์ที่ทั้งแยกแต่ละคู่ไพรเมอร์และรวมทุกไพรเมอร์ โดยมี outgroups ทั้งหมด 5 ตัวอย่างจากแต่ละสกุลในวงศ์เดียวกันและอีก 2 ตัวอย่างจากวงศ์ในอันดับเดียวกัน ผลปรากฏดังตาราง 3 โดยบริเวณอินทรอนของ *trnL* มีจำนวนของ phylogenetically informative site (12.65%) มากกว่าอีก 2 บริเวณ แต่บริเวณของส่วนระหว่างยีน *trnT-L* มีอัตราส่วนของ transition ต่อ transversion (1.2) สูงกว่าบริเวณอื่น

ตาราง 3 ผลการวิเคราะห์ maximum parsimony ของบริเวณระหว่างยีน *trnT-L-F* บริเวณอินทรอนของยีน *trnL* และการวิเคราะห์ข้อมูลร่วมกัน

	<i>trnT-L</i> spacer	<i>trnL</i> intron	<i>trnL-F</i> spacer	Combined data
ts/tv ratio	1.2	0.5	0.5	-
No. of character	536	688	483	1703
No. of constant sites	406 (75.75%)	508 (73.84%)	354 (73.29%)	1283 (75.34)
No. of variable site	130 (24.25%)	180 (26.16%)	129 (26.71%)	420 (24.66)
No. of phylogenetically informative site	52 (9.7%)	87 (12.65%)	52 (10.77%)	193 (11.33)
Tree length (steps)	154	339	159	566
Consistency index (CI)	0.903	0.584	0.906	0.816
Retention index (RI)	0.934	0.569	0.942	0.877

#### 3.1 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์บริเวณระหว่างยีน *trnT-L*

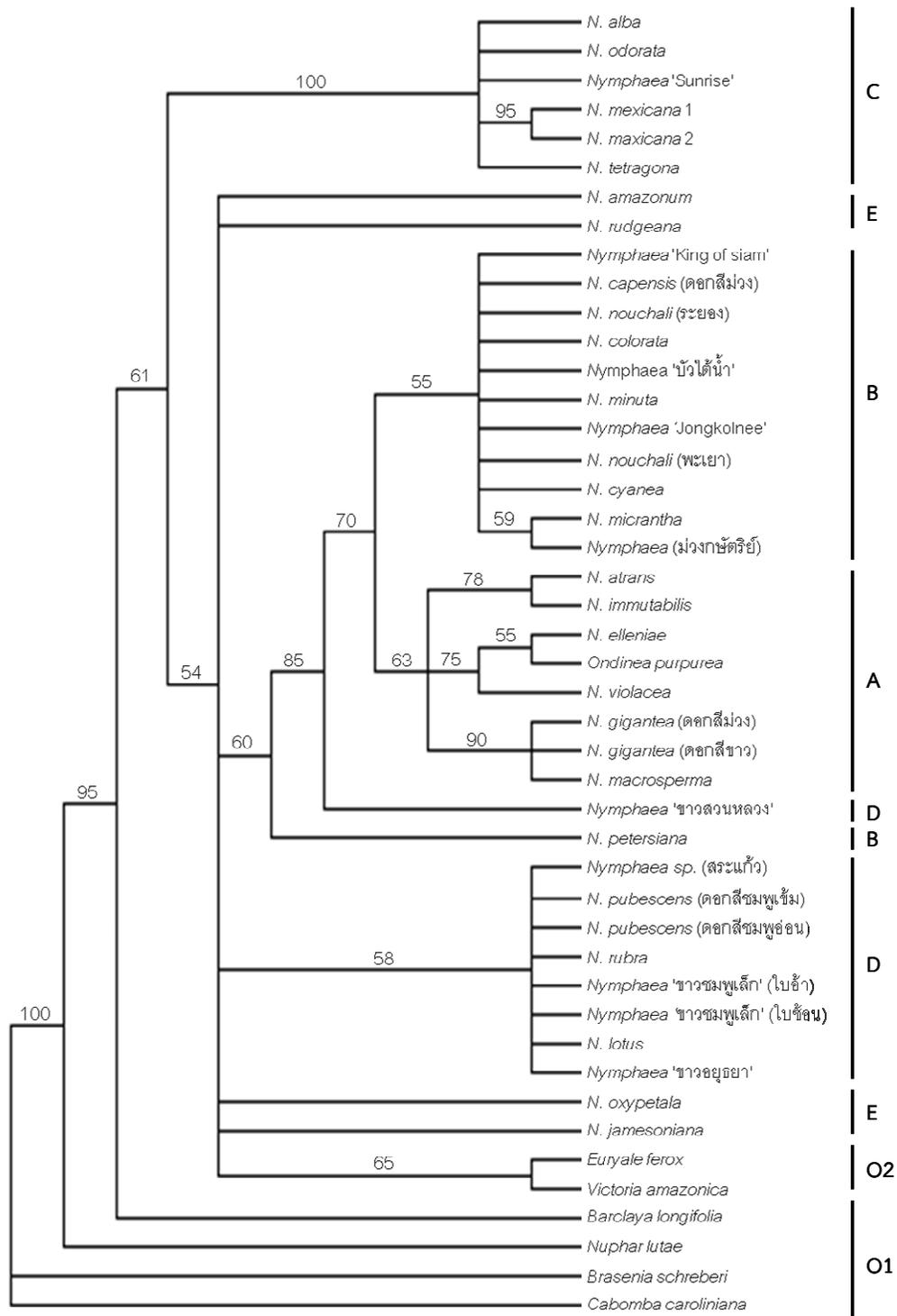
การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnT-L* พบว่ามีความยาวในช่วง 437 คู่เบส (*Euryale ferox*) - 464 คู่เบส (*Barclaya longifolia*) โดยภายในสกุล *Nymphaea* มีความยาวอยู่ในช่วง 443 - 459 คู่เบส ซึ่งเมื่อนำข้อมูลทั้ง 45 ตัวอย่างมาจัดเรียงพบว่ามีความสัมพันธ์ที่เป็นการแทรกของลำดับนิวคลีโอไทด์ (insertion) ทั้งหมด 14 บริเวณ โดยมีขนาดตั้งแต่ 1-17 คู่เบส บาง

บริเวณเป็นการแทรกด้วยเบสซ้ำๆ และมี 8 บริเวณที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (informative characters) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรในแต่ละตัวอย่าง (variable character) 130 คู่เบส (24.25%) โดยแบ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบเฉพาะตัวอย่าง (singleton) จำนวน 78 คู่เบส (14.55%) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจำนวน 52 คู่เบส (9.7%) (ตาราง 3) ค่า GC content ประมาณ 36% อัตราส่วน transition/transversion เท่ากับ 1.2

Phylogenetic tree ที่เกิดขึ้นมีเพียง topology เดียว มีค่า tree length = 152 Consistency index (CI) = 0.903 และค่า Retention index (RI) = 0.934 เมื่อวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า *Brasenia schreberi* และ *Cabomba caroliniana* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Cabombaceae เป็น outgroup ของวงศ์ Nymphaeaceae ขณะที่แต่ละสกุลภายในวงศ์ Nymphaeaceae นี้มีการกระจายอยู่ในเกือบทุกกลุ่มของสายสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น โดยที่ 2 สกุลคือ *Euryale* และ *Victoria* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน สกุล *Ondinea* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุลย่อย *Anecphyta* ของสกุลบัวสาย และสกุล *Barclaya* กับ *Nuphar* เป็น basal lineage ของทั้งหมด (ภาพ 5)

ความสัมพันธ์ของพืชสกุลบัวสายทั้งหมด 38 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม (ภาพ 5, A B C D และ E) โดยที่กลุ่ม C จะแยกออกมาเป็นกลุ่มแรกของพืชสกุลนี้ด้วยค่า bootstrap support ที่สูง (100%) กลุ่มนี้ประกอบด้วย 6 ตัวอย่างที่เป็นสมาชิกของสกุลย่อย *Nymphaea* ได้แก่ *N. alba*, *N. odorata*, *N. maxicana* 2 ตัวอย่าง, *N. tetragona* และ *Nymphaea* ‘Sunrise’ (ลูกผสมระหว่าง *N. maxicana* x *N. odorata*)

จากนั้นภายในกลุ่มใหญ่สามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มย่อยด้วยค่า bootstrap support ที่ต่ำ (54%) ซึ่งประกอบด้วยกลุ่ม O2 ของพืชในสกุล *Euryale* และ *Victoria* ด้วยค่า bootstrap support ที่ต่ำ (65%) กลุ่ม E ที่มีความสัมพันธ์แบบ polytomy กับตัวอย่างอื่นๆ สมาชิกในกลุ่มนี้อยู่ในสกุลย่อย *Hydrocallis* ได้แก่ *N. amazonum*, *N. rudgeana*, *N. oxypetala* และ *N. jamesoniana* กลุ่ม D คือสมาชิกในสกุลย่อย *Lotos* ที่มีค่า bootstrap support ต่ำ (58%) ประกอบด้วย 3 ชนิดใหญ่ๆ คือ *N. lotus*, *N. pubescens* และ *N. rubra* นอกนั้นเป็นตัวอย่างที่ยังไม่ยืนยันชนิดที่แน่นอนอีก 4 ตัวอย่าง และกลุ่มสุดท้ายที่เป็นกลุ่มใหญ่ที่สุดจะประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อยด้วยค่า bootstrap support ปานกลาง (70%) โดยมี 2 ตัวอย่างที่แยกออกมาก่อนคือ *N. petersiana* และ *Nymphaea* ‘ชาวสวนหลวง’ 2 กลุ่มย่อยดังกล่าวคือกลุ่ม B ในสกุลย่อย *Brachyceras* ที่มีสมาชิก 11 ตัวอย่าง ด้วยค่า bootstrap support ที่ต่ำ (55%) และกลุ่ม A ในสกุลย่อย *Anecphyta* ที่มีสมาชิก 7 ตัวอย่าง ด้วยค่า bootstrap support ที่ต่ำ (63%) เช่นกัน ซึ่งในกลุ่ม A นี้มีพืชสกุล *Ondinea* รวมอยู่ด้วย



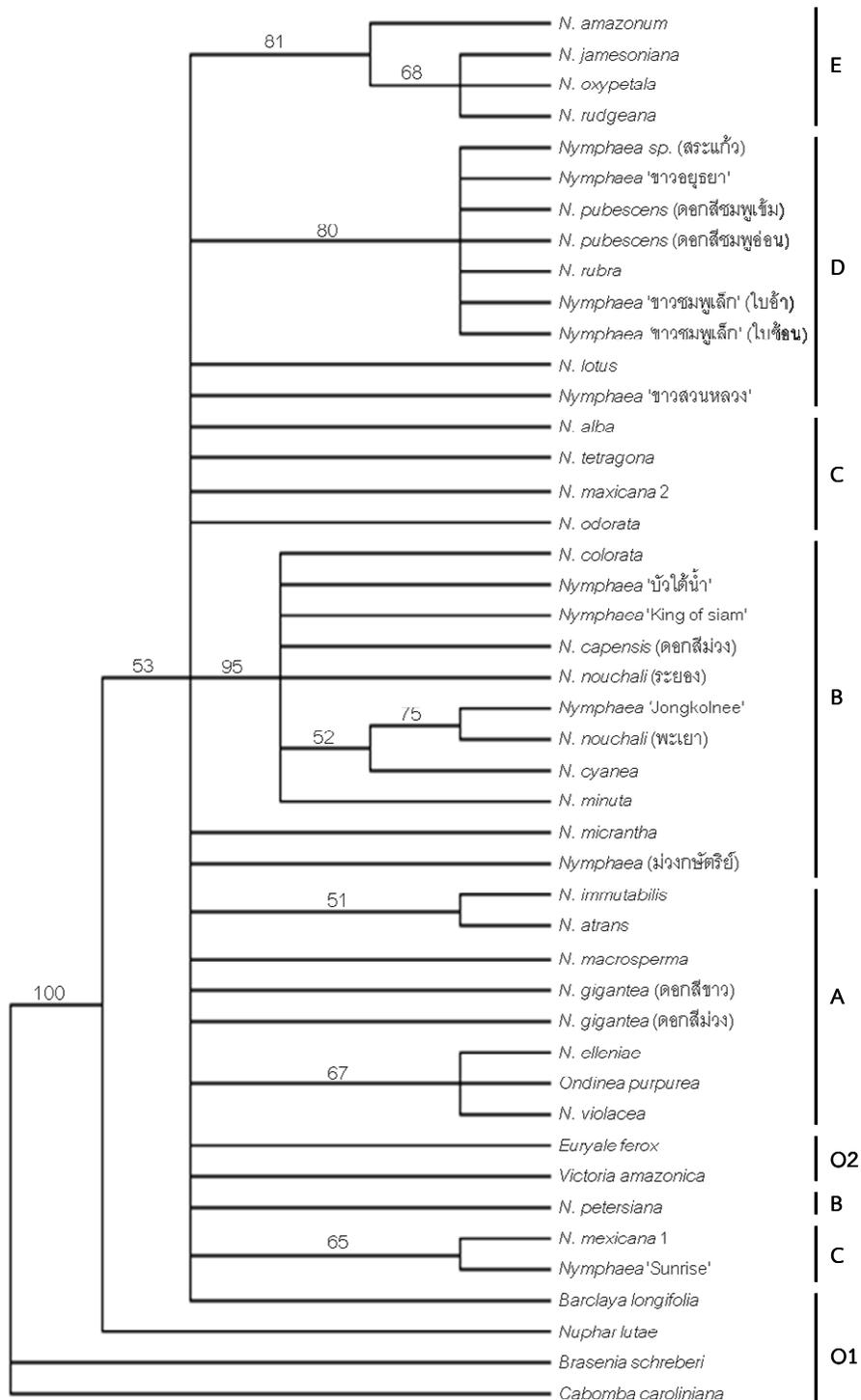
ภาพ 5 Most Parsimonious tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnT-L* ตัวเลขบนกิ่งแสดงค่า bootstrap support (ถ้าน้อยกว่า 50% จะไม่แสดงไว้)

### 3.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์บริเวณอินทรอนของยีน *trnL*

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอินทรอนของยีน *trnL* พบว่ามีความยาวในช่วง 487 คู่เบส (*Cabomba caroliniana*) ถึง 572 คู่เบส (*Nuphar lutea*) ภายในสกุล *Nymphaea* นั้นมีความยาวอยู่ในช่วง 497 คู่เบส (*N. tetragona*) ถึง 542 คู่เบส (*N. amazonum*) ซึ่งเมื่อนำข้อมูลทั้ง 45 ตัวอย่างมาจัดเรียงพบการแทรกของลำดับนิวคลีโอไทด์ (insertion) ทั้งหมด 6 บริเวณมีขนาดตั้งแต่ 2-13 คู่เบส บางบริเวณเป็นการแทรกด้วยเบสซ้ำๆ กัน โดยมี 3 บริเวณที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (informative characters) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรในแต่ละตัวอย่าง (variable character) 180 คู่เบส (26.16%) แบ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบเฉพาะตัวอย่าง (singleton) จำนวน 93 คู่เบส (13.52%) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจำนวน 87 คู่เบส (12.65%) (ตาราง 3) นอกจากนี้ยังพบบริเวณที่มีการซ้ำกันของ A และ T เป็นจำนวนมากในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 305-480 ทำให้ค่า GC content ต่ำ ประมาณ 36% อัตราส่วน transition/transversion เท่ากับ 0.5

Phylogenetic tree ที่เกิดขึ้นมีเพียง topology เดียว มีค่า tree length = 339 Consistency index (CI) = 0.584 และค่า Retention index (RI) = 0.569 เมื่อวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า *Brasenia schreberi* และ *Cabomba caroliniana* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Cabombaceae เป็น outgroup ของวงศ์ Nymphaeaceae เช่นเดียวกับการวิเคราะห์บริเวณระหว่างยีน *trnT-L* ขณะที่แต่ละสกุลภายในวงศ์ Nymphaeaceae นี้มีการกระจายอยู่ในเกือบทุกกลุ่มของสายสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น โดยที่สกุล *Nuphar* เป็นตัวอย่างแรกที่แยกออกมาจากสกุลอื่นๆ (basal lineage) ขณะที่อีก 5 สกุลในวงศ์ Nymphaeaceae คือสกุล *Barclaya* สกุล *Euryale* สกุล *Victoria* สกุล *Ondinea* และสกุล *Nymphaea* กระจายกันอยู่ในกลุ่มใหญ่ (ภาพ 6)

ความสัมพันธ์ของพืชสกุลบัวสายทั้งหมด 38 ตัวอย่าง พบว่ามีความสัมพันธ์แบบ polytomy เกือบทั้งหมด สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มๆ ที่ชัดเจนได้เพียง 3 กลุ่ม (ภาพ 6, B D และ E) คือกลุ่ม B สกุลย่อย *Brachyceras* ซึ่งมีสมาชิกเหลือเพียง 9 ตัวอย่าง ด้วยค่า bootstrap support ที่สูง (95%) ขณะที่อีก 2 ตัวอย่าง (*N. micrantha* และ *Nymphaea* ‘ม่วงกษัตริย์’) เป็น polytomy กับกลุ่มนี้ กลุ่ม D สกุลย่อย *Lotos* มีสมาชิกเพียง 7 ตัวอย่างจาก 2 ชนิดคือ *N. pubescens* และ *N. rubra* ขณะที่ *N. lotus* และ *Nymphaea* ‘ขาวสวนหลวง’ เป็น polytomy กับกลุ่มย่อยนี้เช่นกัน และกลุ่ม E สกุลย่อย *Hydrocallis* ที่มีสมาชิก 4 ชนิดคือ *N. amazonum*, *N. jamesoniana*, *N. oxypetala* และ *N. rudgeana* ด้วยค่า bootstrap support ที่สูง (81%)



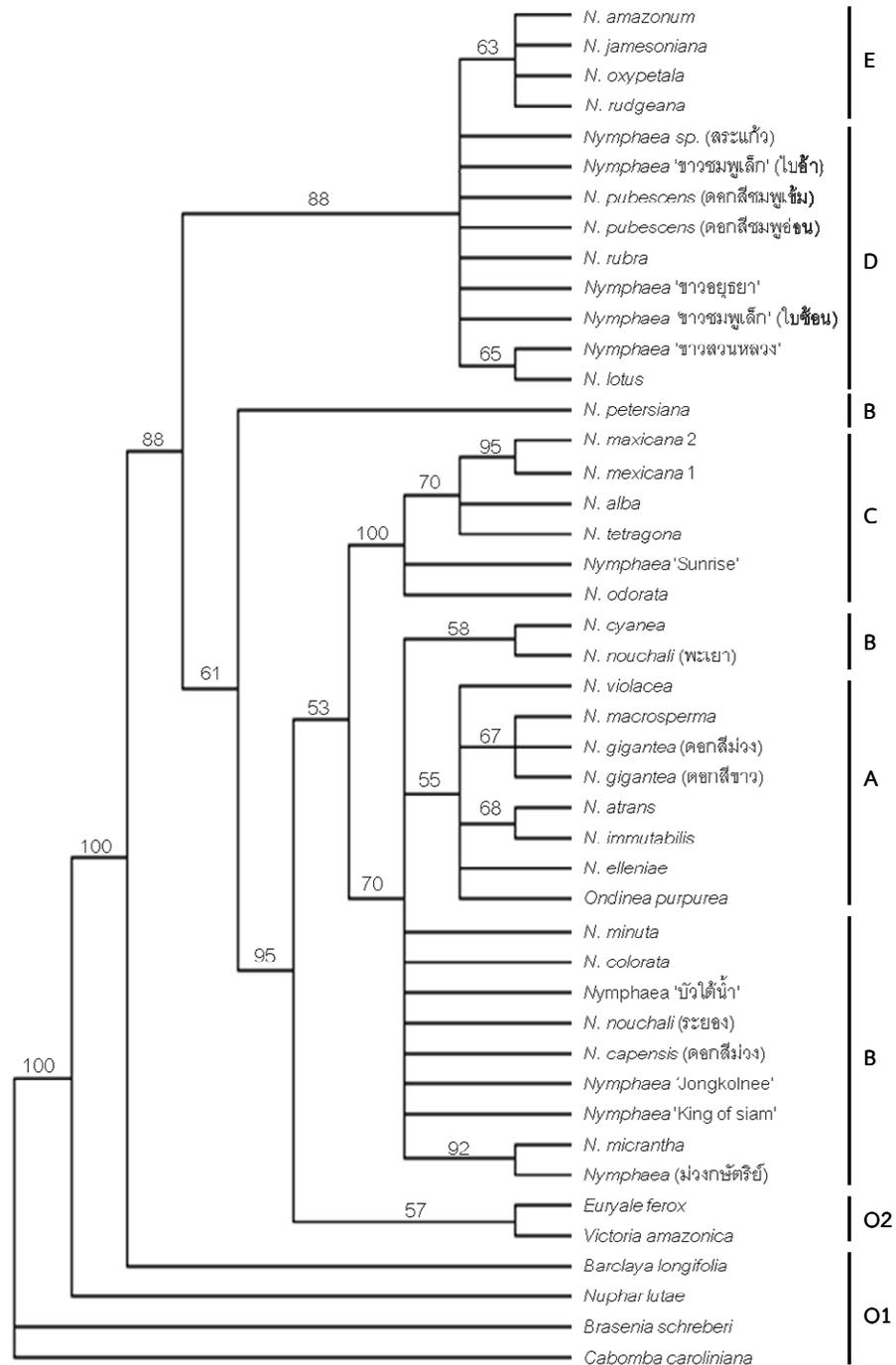
ภาพ 6 Most Parsimonious tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอินทรอนของยีน *trnL* ตัวเลขบนกิ่งแสดงค่า bootstrap support (ถ้าน้อยกว่า 50% จะไม่แสดงไว้)

### 3.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์บริเวณระหว่างยีน *trnL-F*

การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnL-F* พบว่ามีความยาวในช่วง 435 คู่เบส (*Brasenia schreberi*) - 498 คู่เบส (*Nymphaea* ‘ชาวสวนหลวง’) โดยภายในสกุล *Nymphaea* นั้นมีความยาวอยู่ในช่วง 455 - 498 คู่เบส พบว่ามีบริเวณที่มีการแทรกของลำดับนิวคลีโอไทด์ (insertion) ทั้งหมด 15 บริเวณ ขนาดตั้งแต่ 1-24 คู่เบส บางบริเวณเป็นการแทรกของเบสซ้ำๆ กัน มี 7 บริเวณที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (informative characters) ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความผันแปรในแต่ละตัวอย่าง (variable character) 129 คู่เบส (26.71%) โดยแบ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่พบเฉพาะบางตัวอย่าง (singleton) จำนวน 77 คู่เบส (15.94%) และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจำนวน 52 คู่เบส (10.77%) (ตาราง 3) ค่า GC content ประมาณ 34% อัตราส่วน transition/transversion เท่ากับ 0.5

Phylogenetic tree ที่เกิดขึ้นมีเพียง topology เดียว มีค่า tree length = 159 Consistency index (CI) = 0.906 และค่า Retention index (RI) = 0.942 เมื่อวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า *Brasenia schreberi* และ *Cabomba caroliniana* ซึ่งอยู่ในวงศ์ Cabombaceae เป็น outgroup ของวงศ์ Nymphaeaceae เช่นเดียวกับการวิเคราะห์บริเวณระหว่างยีน *trnT-L* และอินทรอนของ *trnL* ขณะที่แต่ละสกุลภายในวงศ์ Nymphaeaceae นี้มีการกระจายอยู่ในเกือบทุกกลุ่มของสายสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น โดยที่สกุล *Nuphar* เป็นตัวอย่างแรกที่แยกออกมาจากสกุลอื่น (basal lineage) สกุลที่แยกต่อมาคือสกุล *Barclaya* ขณะที่สกุล *Euryale* และสกุล *Victoria* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากและเข้ามาอยู่กับสกุล *Nymphaea* สกุล *Ondinea* ก็เข้ามาอยู่กับสกุลย่อย *Anecphyta* ในสกุล *Nymphaea* เช่นกัน (ภาพ 7)

ความสัมพันธ์ของพืชสกุลบัวสายทั้งหมด 38 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ด้วยค่า bootstrap support ที่สูง (88%) (ภาพ 7) ในกลุ่มใหญ่กลุ่มแรกประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อยที่มีค่า bootstrap support ที่สูง (88%) โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยกลุ่ม E ในสกุลย่อย *Hydrocallis* ด้วย bootstrap support ที่ต่ำ (63%) มีสมาชิก 4 ชนิด คือ *N. amazonum*, *N. jamesoniana*, *N. oxypetala* และ *N. rudgeana* ซึ่งทั้ง 4 ชนิดยังไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ได้ชัดเจน และกลุ่ม D ในสกุลย่อย *Lotos* ที่มีสมาชิก 3 ชนิดหลักๆ คือ *N. pubescens*, *N. rubra* และ *N. lotus* โดยที่ทั้งสามชนิดนี้ยังไม่สามารถระบุความสัมพันธ์ได้ชัดเจน แต่ก็พบว่า *N. lotus* และ *Nymphaea* ‘ชาวสวนหลวง’ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่าตัวอย่างอื่นๆ



ภาพ 7 Most Parsimonious tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnL-F* ตัวเลขบนกิ่งแสดงค่า bootstrap support (ถ้าน้อยกว่า 50% จะไม่แสดงไว้)

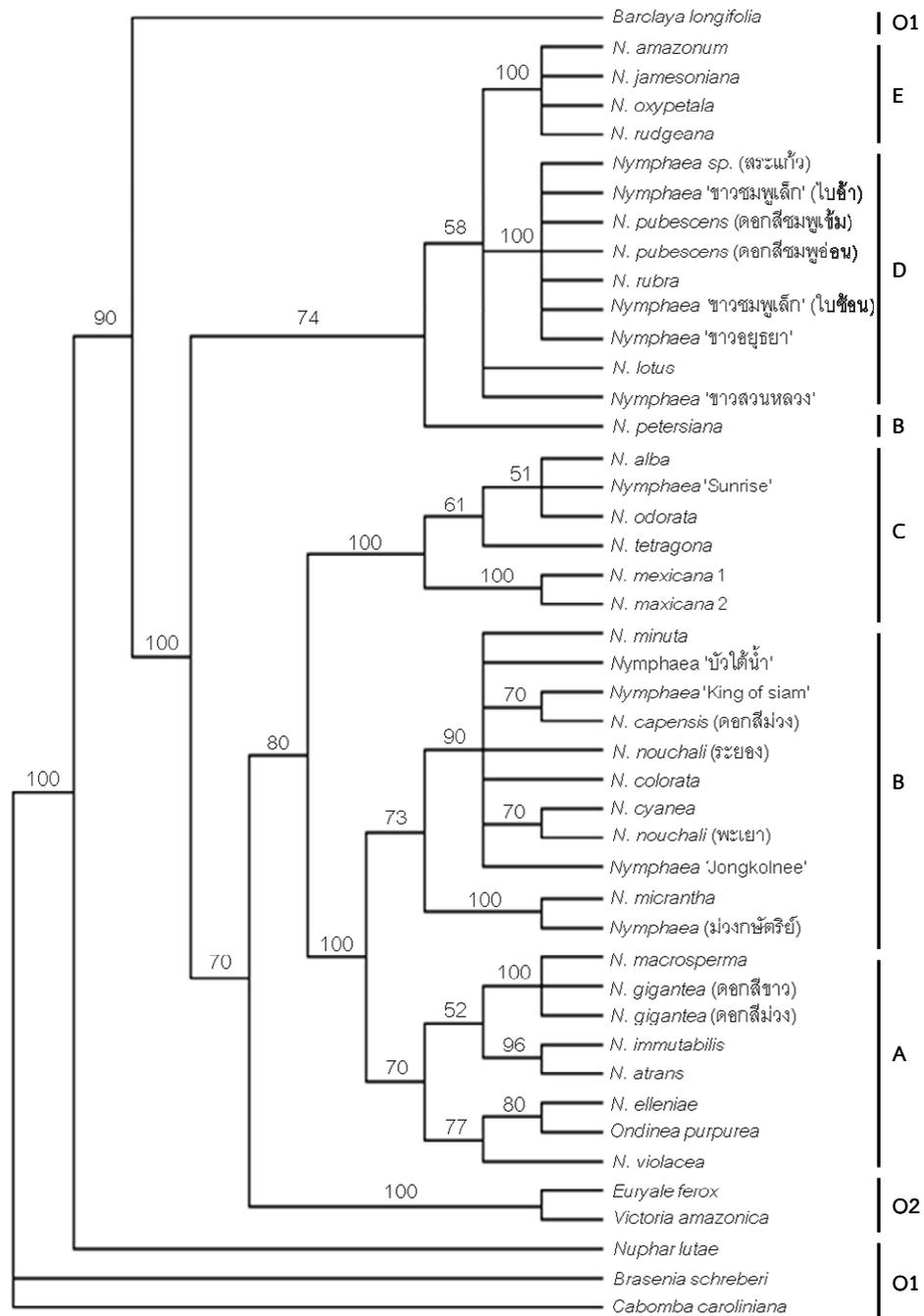
กลุ่มใหญ่กลุ่มที่ 2 พบว่า *N. petersiana* เป็นชนิดแรกที่แยกออกมาจากกลุ่มทั้งหมดด้วยค่า bootstrap support ที่ต่ำ (61%) โดยที่กลุ่มที่เหลือมีค่า bootstrap support ที่สูง (95%) ภายในกลุ่มที่เหลือนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม O2 ที่ประกอบด้วยสมาชิก 2 สกุลคือ *Euryale* และ *Victoria* ด้วยค่า bootstrap support ที่ต่ำ (57%) ขณะที่อีกกลุ่มหนึ่งเป็นกลุ่มใหญ่ที่ประกอบด้วย 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม C ในสกุลย่อย *Nymphaea* ด้วยค่า bootstrap support ที่สูง (100%) มีสมาชิก 6 ตัวอย่าง คือ *N. maxicana* 2 ตัวอย่าง, *N. alba*, *N. tetragona*, *N. odorata* และ *Nymphaea* 'Sunrise' (*N. maxicana* x *N. odorata*) ขณะที่อีกกลุ่มหนึ่งประกอบด้วยอีก 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่ม A ในสกุลย่อย *Anecphyha* ด้วยค่า bootstrap support ที่ต่ำ (55%) มีสมาชิก 8 ตัวอย่าง คือ *N. violacea*, *N. macrosperm*, *N. gigantea* 2 ตัวอย่าง, *N. atrans*, *N. immutabilis*, *N. elleniae* และ *Ondinea purpurea* และอีกกลุ่มย่อยคือ กลุ่ม B ในสกุลย่อย *Brachyceras* ที่มีสมาชิก 11 ตัวอย่างแต่ยังไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ได้

### 3.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เมื่อนำข้อมูลทั้งสามบริเวณมารวมกัน

ผลการวิเคราะห์ค่า parsimony โดยใช้ข้อมูลร่วมกันปรากฏว่าได้เพียง 1 most parsimonious tree เท่านั้นซึ่งมีค่า CI และ RI เท่ากับ 0.816 และ 0.877 ตามลำดับ โดยแผนภาพที่ได้นั้นเห็นได้ชัดเจนว่า *Brasenia schreberi* และ *Cabomba caroliana* เป็น outgroup ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพืชในวงศ์ Nymphaeaceae และความสัมพันธ์ของแต่ละสกุลในวงศ์นี้พบว่าสกุล *Nuphar* และ *Barclaya* เป็นสายวิวัฒนาการแรกที่แยกออกมา (basal lineage) ขณะที่สกุล *Euryale*, *Victoria*, *Ondinea* และ *Nymphaea* จะอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยเริ่มแรกจะสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย กลุ่ม E (สกุลย่อย *Hydrocallis*) 4 ตัวอย่าง กลุ่ม D (สกุลย่อย *Lotos*) 9 ตัวอย่าง และ *N. petersiana* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย กลุ่ม C (สกุลย่อย *Nymphaea*) 6 ตัวอย่าง กลุ่ม B (สกุลย่อย *Brachyceras*) 9 ตัวอย่าง กลุ่ม A (สกุลย่อย *Anecphyha* และสกุลย่อย *Ondinea*) 8 ตัวอย่าง และกลุ่ม O2 (สกุล *Euryale* และ *Victoria*) (ภาพ 8)

## 4. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาบางประการของพืชสกุลบัวสายบางตัวอย่าง

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชสกุลบัวสายในสกุลย่อย *Lotos* สกุลย่อย *Brachyceras* สกุลย่อย *Anecphyha* และสกุลย่อย *Nymphaea* ซึ่งแต่ละสกุลย่อยก็มีลักษณะที่แตกต่างอย่างเห็นได้ชัดเจน เช่น ลักษณะการเจริญเติบโตของเหง้า ลักษณะของใบ ช่วงเวลาในการบานของดอก และลักษณะการบานของดอก นอกจากนี้ส่วนประกอบภายในดอกพบว่ามีหลายลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น รยางค์บริเวณปลายเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย ลักษณะของกลีบเลี้ยง ลักษณะของผนังรังไข่ เป็นต้น



ภาพ 8 Most Parsimonious tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณระหว่างยีน *trnT-L* บริเวณอินทรอนของยีน *trnL* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* ตัวเลขบนกิ่งแสดงค่า bootstrap support (ถ้าน้อยกว่า 50% จะไม่แสดงไว้)

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาของพืชสกุลบัวสาย 10 ตัวอย่าง 4 สกุลย่อย คือ สกุลย่อย *Lotos* 5 ตัวอย่าง ได้แก่ *N. lotus* (ลินจง), *Nymphaea* ‘ชาวสวนหลวง’, *N. rubra*, *Nymphaea* ‘ชาวชมพูเล็กใบซ้อน’, *Nymphaea* ‘ชาวอยุธยา’ สกุลย่อย *Brachyceras* 2 ตัวอย่าง ได้แก่ *N. capensis* และ *Nymphaea* ‘ม่วงกษัตริย์’ สกุลย่อย *Nymphaea* 2 ตัวอย่าง ได้แก่ *Nymphaea* ‘Sunrise’ และ *N. maxicana* และสกุลย่อย *Anecphyra* 1 ตัวอย่าง ได้แก่ *N. gigantea* (ดอกสีขาว) ผลการศึกษาแยกเป็นลักษณะต่างๆ ดังนี้ (ตาราง 4, ภาพ 9-18)

#### 4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบของลำต้น

ลักษณะของลำต้นของพืชสกุลบัวสายทั้ง 10 ตัวอย่าง สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบคือแบบเป็นหัวกลม ได้แก่ *N. gigantea* ซึ่งถ้าหัวกลมนั้นแช่น้ำนานๆ จะสามารถงอกต้นใหม่ออกมาได้ และแบบเป็นเหง้า ซึ่งเหง้าก็มี 2 แบบ คือ เหง้าเจริญตามแนวตั้ง เช่น *N. lotus*, *N. rubra* และ *N. capensis* เป็นต้นและเหง้าที่เจริญตามแนวนอนหรือแนวราบ ได้แก่ *N. maxicana* และ *Nymphaea* ‘Sunrise’

#### 4.2 ลักษณะสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบของใบ

ใบของบัวสายแต่ละตัวอย่างมีความหลากหลายสูงมาก ส่วนที่พบที่มีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดคือลักษณะของขอบใบ โดยที่บัวสายในสกุลย่อย *Lotos* ทั้ง 5 ตัวอย่างมีลักษณะขอบใบแบบจักฟันเลื่อย ขณะที่บัวสายในสกุลย่อย *Brachyceras* สกุลย่อย *Nymphaea* และ สกุลย่อย *Anecphyra* มีลักษณะขอบใบเรียบ แต่ลักษณะที่เรียบนี้ก็มีความแตกต่างกันเล็กน้อย คือ *N. capensis*, *Nymphaea* ‘ม่วงกษัตริย์’ และ *N. gigantea* (ดอกสีขาว) ขอบใบเรียบแต่เป็นคลื่น นอกจากลักษณะของขอบใบแล้ว ลักษณะของเส้นใบและสีของใต้ใบที่เจริญเต็มที่ก็แตกต่างกันในบางตัวอย่าง เช่น ส่วนของเส้นใบหลักของ *N. lotus*, *N. rubra* และ *N. capensis* จะมีเส้นใบนูนเห็นได้ชัดเจน ซึ่งต่างจาก *N. maxicana* และ *N. gigantea* (ดอกสีขาว) ที่มีส่วนของเส้นใบหลักเรียบไปกับส่วนของแผ่นใบ และสีของใต้ใบที่เจริญเต็มที่ของ *N. lotus* และ *N. capensis* จะมีสีเขียวอ่อน ขณะที่ *N. rubra*, *N. gigantea* และ *N. maxicana* จะมีสีแดงอ่อน - เข้ม

#### 4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบของดอก

จากการศึกษาลักษณะกลีบเลี้ยง พบว่า ด้านนอกของกลีบเลี้ยงของ *N. lotus* และ *N. rubra* จะมีสีเขียวและพาดด้วยเส้นสีขาวลากจากบนลงล่างนูนขึ้นมาเห็นชัดเจน ซึ่งแตกต่างกับ *N. capensis*, และ *N. gigantea* (ดอกสีขาว) ที่กลีบเลี้ยงมีสีเขียวสดเป็นมันวาวทั้งกลีบ ขณะที่ *N. maxicana* มีกลีบเลี้ยงสีเหลืองที่มีลายเขียวเป็นเส้นตรงกลางจากบนลงล่าง

จากการศึกษาลักษณะและการมีรยางค์ที่ปลายเกสรเพศผู้ พบว่า ลักษณะเกสรเพศผู้มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดในคนละสกุลย่อย โดยที่ *N. lotus*, *N. rubra* และ *N. maxicana* จะมีลักษณะเกสรเพศผู้เป็นแผ่นแบน ขณะที่เกสรเพศผู้ของ *N. capensis* และ *N. gigantea* จะมีลักษณะเป็นแท่งกลม แต่เมื่อพิจารณาถึงการมีรยางค์ที่ปลายเกสรเพศผู้แล้วพบว่า มีเพียงสกุลย่อยเดียวคือ *Brachyceras* ทั้ง 2 ตัวอย่างที่มีรยางค์ที่ปลายเกสรเพศผู้ ขณะที่ตัวอย่างอื่นในสกุลย่อยอื่นไม่พบลักษณะดังกล่าว

จากการศึกษาการมีรยางค์ที่ยอดเกสรเพศเมียและลักษณะรังไข่ พบว่าพืชสกุลบัวสายทั้ง 3 สกุลย่อย คือ สกุลย่อย *Lotos*, สกุลย่อย *Brachyceras* และ สกุลย่อย *Nymphaea* ไม่พบรยางค์ที่ยอดเกสรเพศเมีย มีเพียง *N. gigantea* (ดอกสีขาว) สกุลย่อย *Anecphyra* เท่านั้นที่พบส่วนของรยางค์ที่ยอดเกสรเพศเมีย จากลักษณะของรังไข่สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีรังไข่เชื่อมติดกัน ได้แก่ สกุลย่อย *Lotos* และ สกุลย่อย *Nymphaea* ในทุกตัวอย่าง และอีกกลุ่มหนึ่งคือกลุ่มที่มีรังไข่แยกกัน ได้แก่ สกุลย่อย *Brachyceras* และ สกุลย่อย *Anecphyra* ในทุกตัวอย่างเช่นกัน

จากการศึกษาช่วงเวลาในการบานของดอกและลักษณะรูปทรงของดอกเมื่อดอกบาน พบว่า เมื่อพิจารณาที่ช่วงเวลาการบานของดอกสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือบัวสายที่บานเวลากลางคืนและจะหุบเมื่อสายของอีกวันหนึ่ง ได้แก่บัวสายในสกุลย่อย *Lotos* ทั้ง 5 ตัวอย่าง ขณะที่อีก 3 สกุลย่อย คือ สกุลย่อย *Brachyceras*, สกุลย่อย *Nymphaea* และ สกุลย่อย *Anecphyra* จะเป็นกลุ่มบัวสายที่บานในเวลากลางวัน ตั้งแต่เช้าและจะหุบเวลาบ่ายถึงเย็นในวันเดียวกัน นอกจากนี้ลักษณะรูปทรงของดอกเมื่อดอกบานก็แตกต่างกันบ้างเพียงเล็กน้อย แต่ก็สามารถสังเกตเห็นได้ โดยแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือเมื่อดอกบานแล้วเป็นรูปถ้วย พบใน 4 ตัวอย่างคือ *N. rubra*, *Nymphaea* ‘ขาวชมพูเล็กใบซ้อน’ *Nymphaea* ‘ขาวอูฐยา’ และ *N. gigantea* (ดอกสีขาว) และอีกกลุ่มคือเมื่อดอกบานแล้วจะบานตั้งแต่ครึ่งวงกลม (*N. capensis* และ *Nymphaea* ‘ม่วงกษัตริย์’) จนถึงค่อนข้างกลม (*N. lotus*, *Nymphaea* ‘ขาวสวนหลวง’, *Nymphaea* ‘Sunrise’ และ *N. maxicana*)

ตาราง 4 แสดงสัณฐานวิทยาภายนอกบางประการของพืชสกุลบัวสาย

ชนิด	ลักษณะลำต้น	ช่วงเวลาในการบานของดอก	ลักษณะรังไข่	รยางค์ที่ปลายเกสรเพศผู้	รยางค์ที่ยอดเกสรเพศเมีย	ลักษณะของขอบใบ	ลักษณะรูปทรงของดอกเมื่อบาน
<i>N. lotus</i> (ลินจง)	เหง้าเจริญตามแนวตั้ง	กลางคืน-ตอนสาย	เชื่อมติดกัน	ไม่มี	มี	จักฟันเลื่อย	บานค่อนข้างกลม
<i>Nymphaea</i> ‘ขาวสวนหลวง’	เหง้าเจริญตามแนวตั้ง	กลางคืน-ตอนสาย	เชื่อมติดกัน	ไม่มี	มี	จักฟันเลื่อย	บานค่อนข้างกลม
<i>N. rubra</i>	เหง้าเจริญตามแนวตั้ง	กลางคืน-ตอนสาย	เชื่อมติดกัน	ไม่มี	มี	จักฟันเลื่อย	บานรูปถ้วย
<i>Nymphaea</i> ‘ขาวชมพูเล็กใบซ้อน’	เหง้าเจริญตามแนวตั้ง	กลางคืน-ตอนสาย	เชื่อมติดกัน	ไม่มี	มี	จักฟันเลื่อย	บานรูปถ้วย
<i>Nymphaea</i> ‘ขาวอุษยา’	เหง้าเจริญตามแนวตั้ง	กลางคืน-ตอนสาย	เชื่อมติดกัน	ไม่มี	มี	จักฟันเลื่อย	บานรูปถ้วย
<i>N. capensis</i>	เหง้าเจริญตามแนวตั้ง	ตอนเช้า-บ่าย	แยกกัน	มี	มี	เรียบเป็นคลื่น	บานรูปครึ่งวงกลม
<i>Nymphaea</i> ‘ม่วงกษัตริย์’	เหง้าเจริญตามแนวตั้ง	ตอนเช้า-บ่าย	แยกกัน	มี	มี	เรียบเป็นคลื่น	บานรูปครึ่งวงกลม
<i>Nymphaea</i> ‘Sunrise’	เหง้าเจริญตามแนวนอน	ตอนเช้า-บ่าย	เชื่อมติดกัน	ไม่มี	มี	เรียบ	บานค่อนข้างกลม
<i>N. maxicana</i>	เหง้าเจริญตามแนวนอน	ตอนเช้า-บ่าย	เชื่อมติดกัน	ไม่มี	มี	เรียบ	บานค่อนข้างกลม
<i>N. gigantea</i> (ดอกสีขา)	หัวขนาดใหญ่	ตอนเช้า-บ่าย	แยกกัน	ไม่มี	ไม่มี	เรียบเป็นคลื่น	บานรูปถ้วย



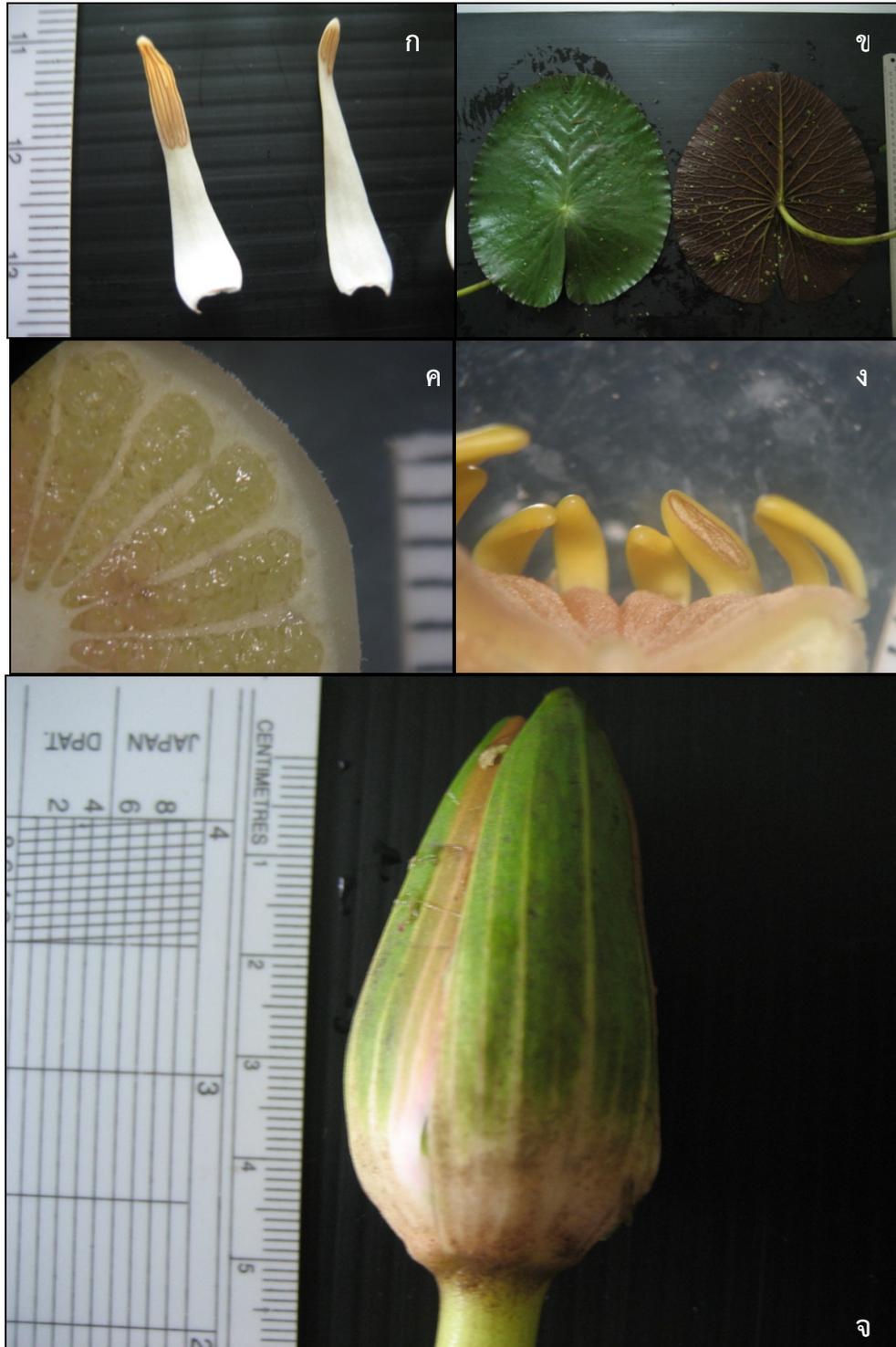
ภาพ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *N. lotus* (ลินจง) ก. ลำต้น ข. ใต้น้ำ ค. รังไข่ ง. รยางค์ที่ยอด  
 เกสรเพศเมีย จ. เกสรเพศผู้และรูปทรงของดอกเมื่อบาน



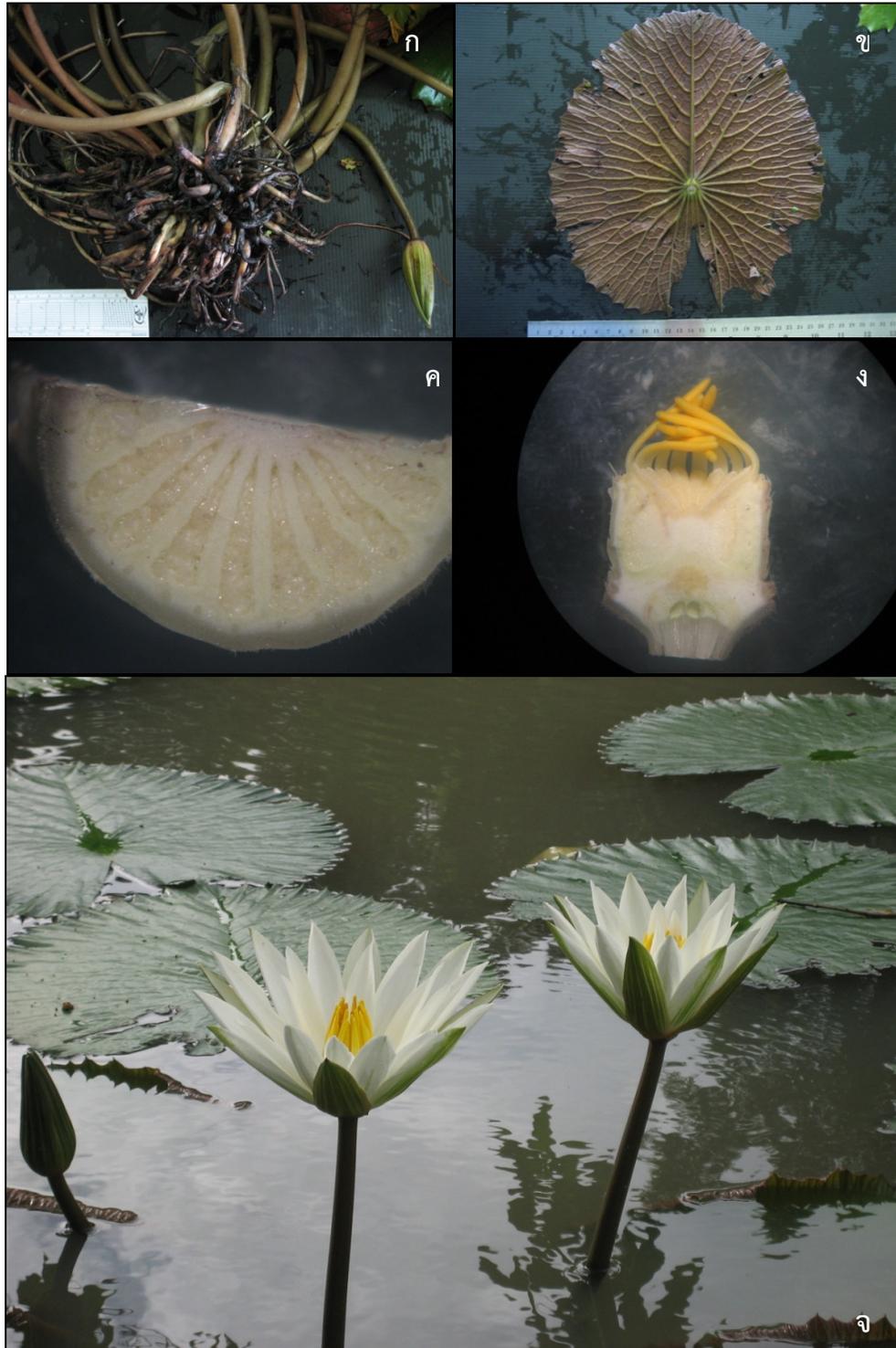
ภาพ 10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Nymphaea* 'ขาวสวนหลวง' ก. ลำต้น ข. ใต้น้ำ ค. รังไข่  
ง. รยางค์ที่ยอดเกสรเพศเมีย จ. เกสรเพศผู้และรูปทรงของดอกเมื่อบาน



ภาพ 11 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *N. rubra* ก. ลำต้น ข. ใต้น้ำ ค. รังไข่ ง. รยางค์ที่ยอดเกสรเพศเมีย จ. รูปทรงของดอกเมื่อบาน



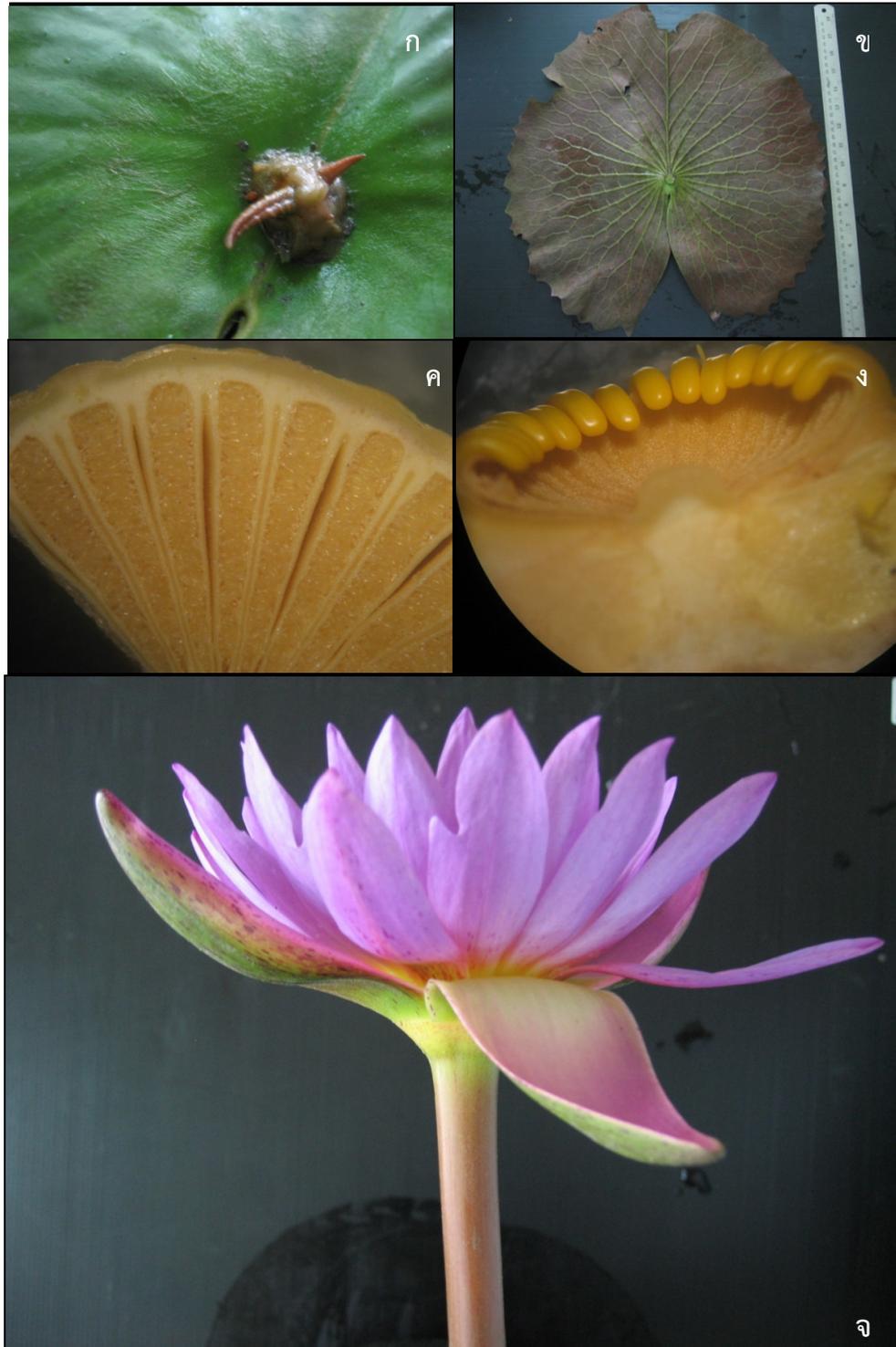
ภาพ 12 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Nymphaea* 'ขาวชมพูเล็กใบซ้อน' ก. เกสรเพศผู้ ข. ใบ ค. รังไข่ ง. รยางค์ที่ยอดเกสรเพศเมีย จ. เส้นสีขาวบนกลีบเลี้ยง



ภาพ 13 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Nymphaea* 'ชาวอยุธยา' ก. ลำต้น ข. ใต้น้ำ  
 ค. รังไข่ ง. รยางค์ที่ยอดเกสรเพศเมีย จ. รูปทรงของดอกเมื่อดอกบาน



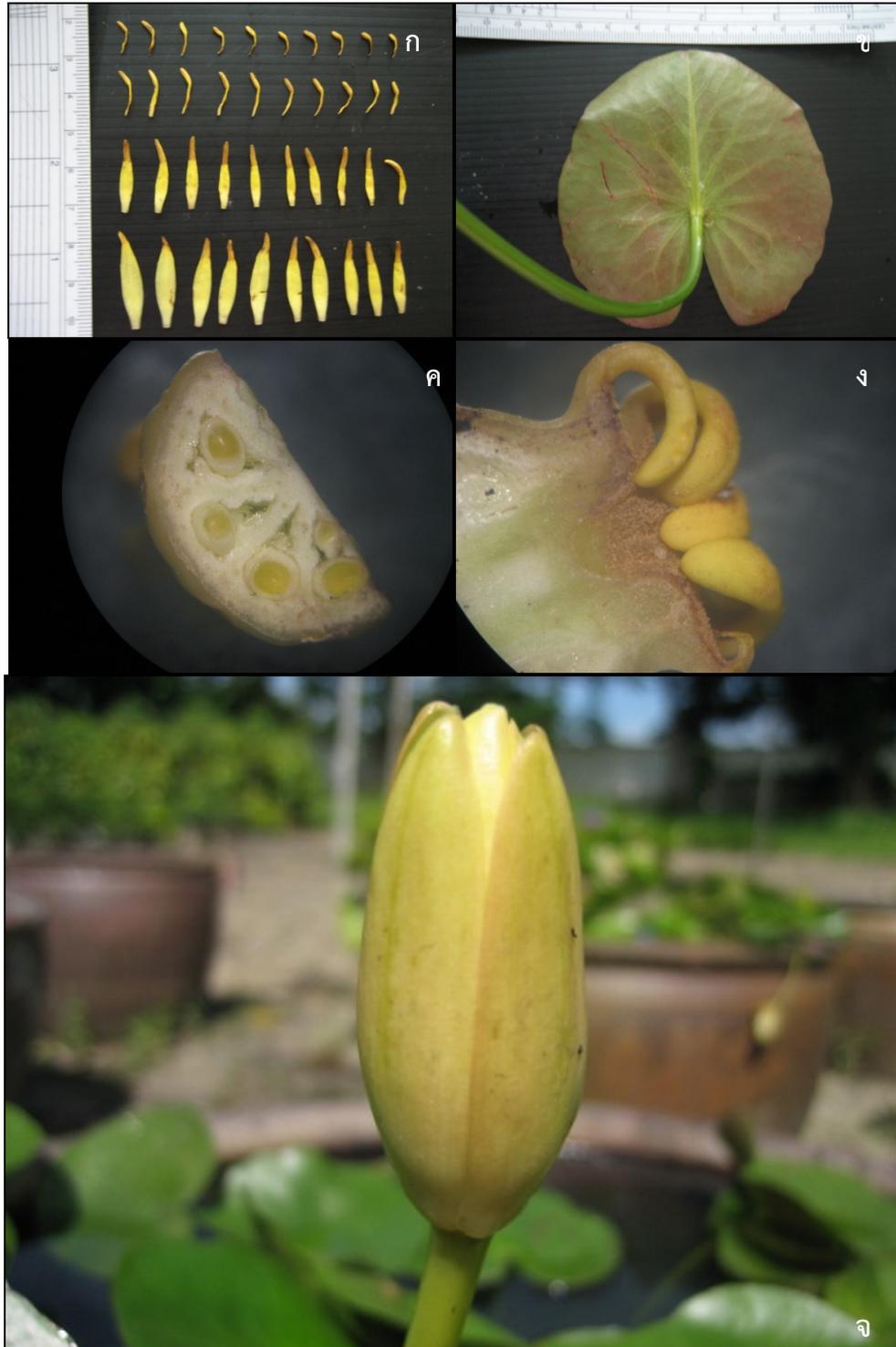
ภาพ 14 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *N. capensis* ก. ลำต้น ข. ใตใบ ค. รังไข่ ง. รยางค์ที่ยอดเกสรเพศเมีย จ. รูปทรงของดอกเมื่อดอกบาน



ภาพ 15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Nymphaea* 'ม่วงกษัตริย์' ก. การเจริญของต้นใหม่บนใบ  
 ข. ใต้ใบ ค. รังไข่ ง. รยางค์ที่ยอดเกสรเพศเมีย จ. รูปทรงของดอกเมื่อดอกบาน



ภาพ 15 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Nymphaea* 'Sunrise' ก. ลำต้น ข. ใบ ค. รังไข่  
ง. รยางค์ที่ยอดเกสรเพศเมีย จ. รูปทรงของดอกเมื่อดอกบาน



ภาพ 17 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *N. maxicana* ก. เกสรเพศผู้ ข. ใตใบ ค. รังไข่  
ง. รยางค์ที่ยอดเกสรเพศเมีย จ. กลีบเลี้ยงสีเหลืองมีลายเขียวตรงกลาง



ภาพ 18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *N. gigantea* (ดอกสีขาว) ก. ลำต้น ข. รังไข่ ค. ใตใบ  
ง. การไม่มีรอยค้ำที่ยอดเกสรเพศเมีย จ. รูปทรงของดอกเมื่อดอกบาน