วิธีดำเนินการศึกษา

1. ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

พืชสกุลบัวสาย (*Nymphaea* L.) ที่เก็บจากแหล่งกระจายพันธุ์ต่างๆ และที่รวบรวมสายพันธุ์ไว้ในสวนหลวง ร.9 กรุงเทพมหานคร และแหล่งรวบรวมพันธุ์บัว มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก รวมถึงข้อมูลบางส่วนจาก Genbank ทั้งสิ้น 45 ตัวอย่าง

ตาราง 2 ตัวอย่างที่นำมาศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 45 ตัวอย่าง

ลำดับที่	ตัวอย่างพืช	GenBank no.	แหล่งที่มา
1	*Nymphaea alba* L.	-	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก
2	*N. amazonum* Mart. and Zucc.	AM422026	-
3	*N. atrans* S. W. L. Jacobs	-	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก
4	*N. carpensis* var. *zanzibariensis* (Caspary) Conard	-	สวนหลวง ร. 9
5	*N. colorata* Peter	-	สวนหลวง ร. 9
6	*N. cyanea*	-	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก
7	*N. elleniae* S. W. L. Jacobs	-	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก
8	*N. gigantea* Hook. (ดอกสีขาว)	-	สวนหลวง ร. 9
9	*N. gigantea* Hook. (ดอกสีม่วง)	-	สวนหลวง ร. 9
10	*N. immutabilis* S. W. L. Jacobs	-	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก
11	*N. jamesoniana* Planch.	AM422032	-
12	*N. lotus* (L.) Willd. (ชมพูลินจง)	-	สวนหลวง ร. 9

ตาราง 2 (ต่อ)

ลำดับที่	ตัวอย่างพืช	GenBank no.	แหล่งที่มา
13	*N. macrosperma* Merr. and L. M. Perry	-	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก
14	*N. mexicana* Zucc. 1	-	สวนหลวง ร. 9
15	*N. mexicana* Zucc. 2	-	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก
16	*N. micrantha* Guill. and Perr.	-	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก
17	*N. minuta* Landon	-	สวนหลวง ร. 9
18	*N. nouchali* Willd. 1	-	ระยอง
19	*N. nouchali* Willd. 2	-	พะเยา
20	*N. odorata* Aiton subsp. odorata	AY145333	-
21	*N. oxypetala* Planch.	AM422035	-
22	*N. petersiana* Klotzsch	AM422053	-
23	*N. pubescens* Willd. 1	-	พิษณุโลก
24	*N. pubescens* Willd. 2	-	พิษณุโลก
25	*N. rubra* Roxburgh	-	สวนหลวง ร. 9
26	*N. rudgeana* G. Mey.	-	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก
27	*N. tetragona* Georgi	AM422074	-
28	*N. violacea* Lehm.	-	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก
29	*Nymphaea* sp.1 (ขาวชมพูเล็กใบซ้อน)	-	สวนหลวง ร. 9

ตาราง 2 (ต่อ)

ลำดับที่	ตัวอย่างพืช	GenBank no.	แหล่งที่มา
30	*Nymphaea* sp.2 (ขาวชมพูเล็กใบอ้า)	-	สวนหลวง ร. 9
31	*Nymphaea* sp.3 (ขาวสวนหลวง)	-	สวนหลวง ร. 9
32	*Nymphaea* sp.4 (ซันไลท์)	-	สวนหลวง ร. 9
33	*Nymphaea* sp.5 (ขาวอยุธยา)	-	สวนหลวง ร. 9
34	*Nymphaea* sp.6 (บัวใต้น้ำ)	-	สวนหลวง ร. 9
35	*Nymphaea* sp.7 (จงกลนี)	-	สวนหลวง ร. 9
36	*Nymphaea* sp.8 (ฉลองขวัญ)	-	สวนหลวง ร. 9
37	*Nymphaea* sp.9	-	สระแก้ว
38	*Nymphaea* sp.10(ม่วงกษัตริย์)	-	สวนหลวง ร. 9
39	*Brasenia schreberi* J.F.Gmel.	AY145329	-
40	*Cabomba caroliniana* A.Gray.	AY145328	-
41	*Euryale ferox* Salisb.	AM422020	-
42	*Nuphar lutea* (L.) Sm.	-	สวนหลวง ร. 9
43	*Victoria amazonica* (Poeppig) Sowerby	-	สวนหลวง ร. 9
44	*Barclaya longifolia* Wall.	AM422019	-
45	*Ondinea purpurea* Hartog	AM422023	-

2. สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1. เครื่องหมุนเหวี่ยงแรงหนีศูนย์กลาง (centrifuge)
2. ตู้เก็บรักษาตัวอย่าง (Deep freezer -20 องศาเซลเซียส)
3. เครื่องบ่มเพาะ (Incubator)
4. เครื่องแยกสารด้วยเจลชนิด Agarose (Agarose gel electrophoresis set)
5. เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation)
6. เตาอบไมโครเวฟ (Microwave oven)
7. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
8. หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)
9. ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้
10. eppendorf ขนาด 0.2 และ 1.5 มิลลิลิตร
11. Disposable tips
12. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
13. โกร่งบดตัวอย่าง
14. อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ถุงมือ ปากคีบ กระดาษชั่งสาร ช้อนตักสาร ถาดพลาสติก กระดาษติดป้าย ปากกาเคมี แผ่นอลูมิเนียมฟอลย์ มีดผ่าตัด แท่งแก้วคน บีกเกอร์ กระบอกตวง

2.2 สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

1. Cethyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB)
2. NaCl
3. 2-mercaptoethanol
4. Tris-HCl
5. EDTA
6. Chloroform
7. phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1)
8. Isopropanol
9. RNase A
10. 70 % ethanol
11. Absolute ethanol
12. Sodium acetate

2.3 สารเคมีสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR analysis

1. Master Mix (Fermentas)
2. ไพรเมอร์ (10 พิโคโมล/ไมโครลิตร)
3. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

2.4 สารเคมีสำหรับการทำวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส

1. Agarose
2. DNA ladder marker
3. Ethidium bromide
4. 6X DNA Loading Dye (Fermentas)

3. การเก็บรวมรวมข้อมูล

3.1 การเตรียมวัสดุพืช

ตัวอย่างส่วนใหญ่มาจากการเก็บรวบรวมพันธุ์บัว ณ สวนหลวง ร.9 กรุงเทพมหานคร โดยนำใบมาล้างให้สะอาดแล้วเช็ดให้แห้งก่อนที่จะนำใส่ถุงซิบที่บรรจุสารดูดความชื้น (silica gel) แล้วจึงนำถุงที่ใส่ตัวอย่างใส่ไว้ในตู้ดูดความชื้น เปลี่ยนสารดูดความชื้น (silica gel) เป็นประจำทุกวัน จนกว่าตัวอย่างจะแห้งสนิท จะสามารถเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 เดือนวิธีนี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Aaron *et al.* (1990) และมีการเก็บ voucher specimens ไว้ที่ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีดัดแปลงจาก Agrawal *et al.* (1992)

1) นำใบพืชแห้งประมาณ 0.2 กรัม มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวแล้วถ่ายใส่หลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร

2) เติม 1X CTAB buffer (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH.8.0, 100 mM Tris pH 8.0) 6 มิลลิลิตร กับ mercaptoethanol 20 ไมโครลิตร

3) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ผสมโดยกลับหลอดไปมาทุกๆ 10 นาที

4) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

5) เติม chloroform ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างเบา

6) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

7) ดูดสารละลายใสใสในหลอด centrifuge ขนาด 15 มิลลิลิตร หลอดใหม่

8) เติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 2/3 ของปริมาตรสารที่ดูดมา

9) ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

10) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทิ้ง Isopropanol เก็บตะกอนไว้

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

12) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

13) ทิ้ง wash buffer แล้วทำให้ตะกอนแห้งโดยการทิ้งให้แห้งในอากาศ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

14) ใส่ Rnase buffer (10 mM Tris pH 8.0, 15 mM NaCl) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

15) ใส่ RNase A ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

16) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

17) ใส่ phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดไปมา 4-5 ครั้งเบาๆ

18) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

19) ดูดสารละลายใสด้านบนใสในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

20) เติม chloroform ปริมาตร 450 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดไปมา 4-5 ครั้ง

21) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

22) ดูดสารละลายใส (อยู่ด้านบน) ใส่ใน หลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

23) ใส่ 3 M sodium acetate ปริมาตร 1/10 ของสารที่มีในหลอด แล้วจึงใส่ absolute ethanol ปริมาตรเป็น 2 เท่าของสารที่มีในหลอดตอนแรก

24) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

25) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

26) ใส่ 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

27) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

28) ทำให้ตะกอนแห้งโดยการทิ้งให้แห้งในอากาศ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

29) ละลายตะกอนใน TE buffer (0.01 M Tris pH 8.0, 0.001 M EDTA pH.8.0) 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

3.2.2 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยการวัดการเรืองแสงร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์

นำดีเอ็นเอที่เตรียมไว้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปส่องแสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง โดยความเข้มแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว จะสามารถบอกปริมาณของดีเอ็นเอตัวอย่างโดยประมาณได้ โดยปริมาณที่ตรวจสอบได้ระดับนาโนกรัม ดังนั้นกรณีที่ปริมาณดีเอ็นเอมีน้อยไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้จะใช้วิธีนี้ นอกจากนี้การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีทำอิเล็กโทรโฟรีซีสยังสามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอได้ด้วยว่ามีการปนเปื้อนจากอาร์เอ็นเอ ซึ่งจะเห็นเป็นปื้นเคลื่อนที่เร็วกว่าดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังทราบขนาดและการแตกหักของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย วิธีปฏิบัติทำโดยหยอดดีเอ็นเอที่เตรียมได้ปริมาตรแน่นอนลงในแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ทำอิเล็กโทรโฟรีซีสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดและปริมาณ เมื่อสิ้นสุดการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแล้วจึงย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อนำไปส่องผ่านด้วยแสงอัลตราไวโอเลต และเปรียบเทียบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545)

การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ มีวิธีการดังนี้

1) เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย

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

3) หลอมอะกาโรสโดยใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวให้อะกาโรสละลายจนหมด

4) ตั้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้หนาประมาณ 5 มิลลิเมตร ปล่อยให้แข็งที่อุณหภูมิห้อง

5) เมื่ออะกาโรสเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึงหวีออกแล้วนำลงในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซีส

6) ใส่บัฟเฟอร์ให้ท่วม โดยให้สูงกว่าผิว 2-3 มิลลิเมตร

7) ดูดสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงไปในช่องในแผ่นอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้

8) ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีสแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าโดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์

9) ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไประยะทางพอประมาณ ดูจากสีที่ผสมอยู่ใน loading buffer แล้วจึงปิดเครื่อง

10) นำอะกาโรสเจลมาย้อมในเอธิเดียมโบร์ไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที

11) แล้วนำอะกาโรสเจลมาใส่กล่องพลาสติก ล้างเอธิเดียมโบร์ไมด์ที่ไม่ได้เกาะกับดีเอ็นเอออก

12) นำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation)

3.2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของคลอโรพลาสต์ (chloroplast DNA) ด้วย 3 คู่ไพรเมอร์ ดังนี้ คู่ไพรเมอร์สำหรับบริเวณระหว่างยีน *trnT-L* (Forward Primer: 5’ - CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT - 3’ Reverse Primer: 5’ - TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC - 3’) คู่ไพรเมอร์สำหรับส่วนอินทรอนของยีน *trnL* (Forward Primer: 5’ - CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG - 3’ Reverse Primer: 5’ - GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC - 3’) คู่ไพรเมอร์สำหรับบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* (Forward Primer: 5’ - GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC - 3’ Reverse Primer: 5’ - ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG - 3’) (Taberlet *et al*., 1991) แล้วทำปฏิกิริยาในสภาวะดังนี้ ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (denaturation)ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที แล้วให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ทำซ้ำทั้งหมด 30 รอบ สิ้นสุดปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบขนาดที่เกิดขึ้นโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสความเข้มข้นของอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ในกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์

3.2.4 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์และการหาลำดับดีเอ็นเอ

เมื่อได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการในแต่ละคู่ไพรเมอร์แล้ว นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) จากนั้นนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Automate Sequencer (Biodesign co. th.) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ข้างต้นเป็นไพรเมอร์ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

3.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกบางประการ

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกบางประการ เช่น การปรากฏของรยางค์บริเวณปลายของเกสรตัวผู้ ลักษณะขอบใบที่พบทั้งขอบใบเรียบ หยักเป็นฟันเลื่อย ลักษณะของโคนใบที่มีปลายแหลมหรือปลายมน ลักษณะของ sinus ที่กางออกหรือซ้อนทับกัน เป็นต้น แล้วทำการบันทึกลักษณะต่างๆ ทำการจัดกลุ่มตามลักษณะที่มีความใกล้เคียงกัน แล้วประเมินผลเปรียบเทียบกับ phylogenetic tree ที่ได้

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และถูกต้องแล้ว นำมาจัดเรียง (alignment) โดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6.002 (Nicholas and Nicholas, 1997) และตรวจหาความถี่นิวคลีโอไทด์การเกิด transition (ts) และ transversions (tv) โดยใช้โปรแกรม Mega 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม PAUP* version 4.0b10 (Swofford, 1998) จำนวน 1,000 ซ้ำ พร้อมทั้งวิเคราะห์แยกในแต่ละคู่ไพรเมอร์และวิเคราะห์รวมในทุกไพรเมอร์ประเมินลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกประกอบด้วย