

## สรุปและอภิปรายผลการศึกษา

### 1. วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอของพืชสกุลบัวสายโดยใช้วิธีดัดแปลงจาก Agrawal *et al.* (1992) แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าดีเอ็นเอที่มีปริมาณมากและคุณภาพดี ถึงแม้ว่าบางตัวอย่างสามารถสกัดได้สารละลายที่มีสีเหลืองอ่อนก็ตาม ซึ่งอาจเกิดจากตัวอย่างที่เก็บใน silica gel ยังแห้งไม่สนิท และใบบัวสายมีความหนาแน่นมาก นอกจากนี้บัวสายเป็นพืชน้ำ การทำให้แห้งสนิทจึงต้องหมั่นเปลี่ยน silica gel บ่อยๆ ดังนั้นเมื่อนำใบมาบดและสกัดดีเอ็นเอจึงมีสารประกอบฟีนอลเกิดขึ้นจำนวนหนึ่ง ซึ่งจะไปมีผลต่อสีของสารละลาย นอกจากนี้พบว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้นั้นมีการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเกิดขึ้นด้วย ซึ่งอาจเกิดจากการมีสารประกอบฟีนอลนี้เกิดขึ้นระหว่างขบวนการสกัด และเมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ สามารถเกิดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการได้ โดยเฉพาะในตัวอย่างที่สารละลายดีเอ็นเอใส ไม่มีสี ถึงแม้ว่าจะใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตรก็ตาม เนื่องจากสารละลายดีเอ็นเอดังกล่าวมีปริมาณดีเอ็นเอมากและมีความบริสุทธิ์มากด้วย ดังนั้นจึงไม่มีผลไปรบกวนต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ ขณะที่ตัวอย่างที่สารละลายดีเอ็นเอเป็นสีเหลืองอ่อน ถ้าใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตรเลย ในบางตัวอย่างจะไม่ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ อาจเนื่องมาจากสารละลายดีเอ็นเอดังกล่าวมีความสกปรกจากการปนเปื้อนด้วยสารประกอบฟีนอลก็ได้ ดังนั้นจึงต้องทำการเจือจางดีเอ็นเอก่อนนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อให้การปนเปื้อนดังกล่าวน้อยลงและไม่ไปมีผลต่อการเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งมีการทำการเจือจางตั้งแต่ 1/50, 1/100 และ 1/200 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Weir (2001) โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนที่ไปมีผลต่อเกิดพีซีอาร์ ดังนั้นจึงต้องนำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาลดความเข้มข้นลงเพื่อให้เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

ดังนั้นจะให้เห็นว่าวิธีการดัดแปลงดังกล่าวที่กล่าวมาข้างต้นเหมาะสมสำหรับใช้สกัดดีเอ็นเอจากใบบัวสายหรือแม้กระทั่งพืชน้ำต่างๆ หรือแม้แต่ใบพืชที่หนาและมีน้ำยางมากก็ตาม เนื่องจากสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณมากและบริสุทธิ์พอที่จะนำมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไป

### 2. การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

คูไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 3 คูไพรเมอร์ เป็น universal primer ซึ่งสามารถนำมาใช้ได้กับพืชทุกชนิด แม้แต่พืชสกุลบัวสายทุกชนิด และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดี และปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้ต่อไปได้ โดยทั้ง 3 คูไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอในทุกตัวอย่าง ได้แก่ คูไพรเมอร์สำหรับบริเวณระหว่างยีน *trnT-L* (*trnT-L* intergenic spacer) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 550 คู่เบส คูไพรเมอร์สำหรับ

บริเวณอินทรอนของยีน *trnL* (*trnL* intron) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 680 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์สำหรับบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* (*trnL-F* intergenic spacer) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 500 คู่เบส จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปทำให้บริสุทธิ์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งได้ผลออกมาถูกต้องโดยการเช็คทั้ง forward และ reverse primer

### 3. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชสกุลบัวสายและสกุลใกล้เคียง

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากทั้ง 3 บริเวณในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ โดยแยกวิเคราะห์ทีละข้อมูลพบว่า ได้ phylogenetic tree ที่สอดคล้องกัน สามารถแบ่งเป็นกลุ่มๆ ได้ โดยบริเวณระหว่างยีน *trnT-L* และ *trnL-F* จะเกิด polytomy น้อยกว่าบริเวณอินทรอนของยีน *trnL* นั่นคือสามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ได้ชัดเจนกว่า การที่บริเวณอินทรอนของยีน *trnL* มีการเกิด polytomy มากที่สุด อาจเป็นเพราะว่าบริเวณดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่ำ เพราะเป็นบริเวณอินทรอนที่มีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าบริเวณระหว่างยีน และอีกเหตุผลหนึ่งคือมีการซ้ำกันของ A และ T เป็นจำนวนมาก (p 8 stem loop) ซึ่งบริเวณดังกล่าวในธรรมชาติแล้วจะมีการเปลี่ยนแปลงที่น้อยมาก

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากบริเวณระหว่างยีน *trnT-L* สามารถแบ่งบัวสายออกเป็นกลุ่ม 5 กลุ่มตาม 5 สกุลย่อยได้ค่อนข้างชัดเจน โดยเฉพาะกลุ่ม A (สกุลย่อย *Anecphyta*) และกลุ่ม C (สกุลย่อย *Nymphaea*) ที่สมาชิกทุกตัวอย่างในแต่ละสกุลย่อยถูกจัดรวมอยู่ด้วยกันเป็นกลุ่มมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันในกลุ่ม และในกลุ่ม A นี้มีพืชสกุลอื่นแทรกอยู่ด้วย นั่นคือ สกุล *Ondinea* ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *N. elleniae* (sister taxa) ขณะที่กลุ่ม B (สกุลย่อย *Brachyceras*) ถ้าไม่นับรวม *N. petersiana* สมาชิกทุกตัวอย่างก็มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเช่นเดียวกับกลุ่ม D (สกุลย่อย *Lotos*) ถ้าไม่นับรวม *Nymphaea* ‘ชาวสวนหลวง’ สมาชิกในสกุลย่อยนี้ก็มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน แต่ในกลุ่ม E (สกุลย่อย *Hydrocallis*) พบว่ามีความสัมพันธ์ที่เป็นแบบ polytomy ในทุกตัวอย่าง ซึ่งไม่สามารถบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ในแต่ละตัวอย่าง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณระหว่างยีน *trnT-L* มีความสามารถในการจัดจำแนกและจัดกลุ่มพืชสกุลบัวสายได้ในบางสกุลย่อยเท่านั้น

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากบริเวณอินทรอนของยีน *trnL* สามารถแบ่งกลุ่มพืชสกุลบัวสายได้เพียงบางกลุ่มเท่านั้น และเห็นความสัมพันธ์ในบางกลุ่มได้ชัดเจนยิ่งขึ้น กล่าวคือกลุ่ม B (สกุลย่อย *Brachyceras*) ซึ่งเมื่อวิเคราะห์แล้วได้ความสัมพันธ์ออกมาคล้ายคลึงกับการวิเคราะห์ *trnT-L* นั่นคือถ้าไม่นับ *N. petersiana* แล้ว สมาชิกภายในสกุลย่อยนี้จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าในอนาคต *N. petersiana* อาจถูกดึงออกจากสกุลย่อยนี้ก็ได้

ขณะที่กลุ่ม D (สกุลย่อย *Lotos*) นั้น *N. lotus* และ *Nymphaea* ‘ขาวสวนหลวง’ แยกออกมาจากกลุ่มของ *N. pubescens* และ *N. rubra* นั้นอาจกล่าวได้ว่ากลุ่มใหญ่ที่เกิดขึ้นของ *N. pubescens* และ *N. rubra* นั้น ทุกตัวอย่างน่าจะเป็นชนิดเดียวกันทั้งหมดนั่นคือเป็น *N. pubescens* เนื่องจากว่าเดิม *N. rubra* ก็ถูกจัดในกลุ่มของ *N. pubescens* แต่ด้วยลักษณะของสีดอกที่มีสีแดงเข้ม ทำให้มีการตั้งชื่อใหม่เป็น *N. rubra* ขึ้นภายหลังแต่ยังไม่เป็นที่ยอมรับ ดังนั้นจากการวิเคราะห์นี้ก็อาจจะช่วยยืนยันได้ว่า *N. rubra* ก็คือ *N. pubescens* นั่นเอง ขณะที่กลุ่ม A (สกุลย่อย *Anecphyta*) มีการรวมสกุล *Ondinea* เข้าไปด้วย ซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *N. elleniae* และ *N. violacea* ดังนั้นในอนาคตสกุลนี้ที่มีสมาชิกเพียง 1 ชนิดอาจจะถูกยุบไปอยู่ในสกุล *Nymphaea* และสกุลย่อย *Anecphyta* ก็ได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Borsch et al. (2011) ที่ได้มีการใช้ชื่อ *Nymphaea ondinea* แทนการใช้ *Ondinea purpurea* เนื่องจากไม่ว่าหลักฐานทางดีเอ็นเอข้อมูลใด สกุล *Ondinea* ก็จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับบัวสายในสกุลย่อย *Anecphyta* ทุกครั้ง แม้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะต่างกันก็ตาม และกลุ่ม E (สกุลย่อย *Hydrocallis*) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากจากข้อมูลการวิเคราะห์นี้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอินทรอนของยีน *trnL* สามารถนำมาใช้จัดจำแนกและจัดกลุ่มพืชสกุลบัวสายได้และทำให้เห็นความสัมพันธ์ในบางสกุลย่อยชัดเจนขึ้น

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* สามารถแบ่งกลุ่มพืชสกุลบัวสายได้ชัดเจนขึ้นและอธิบายความสัมพันธ์ได้ชัดเจนขึ้นกว่าการวิเคราะห์ข้อมูล *trnT-L* และ *trnL* กลุ่ม A (สกุลย่อย *Anecphyta*) ยังอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเดียวกันและมีวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน โดยมีสกุล *Ondinea* รวมอยู่ด้วยเช่นเดิม กลุ่ม B (สกุลย่อย *Brachyceras*) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันอยู่กับเป็นกลุ่ม ยกเว้น *N. petersiana* ที่แยกออกมาจากกลุ่ม กลุ่ม C (สกุลย่อย *Nymphaea*) ก็มีการจัดกลุ่มกันชัดเจนยิ่งขึ้นและมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก กลุ่ม D (สกุลย่อย *Lotos*) ก็มีการรวมกลุ่มกันของ *N. pubescens* และ *N. lotus* ที่เห็นชัดเจนขึ้น และเห็นความสัมพันธ์ของ *N. lotus* และ *Nymphaea* ‘ขาวสวนหลวง’ ซึ่งก็อาจกล่าวได้ว่า *Nymphaea* ‘ขาวสวนหลวง’ ก็เป็นบัวสายสายพันธุ์หนึ่งในกลุ่มของ *N. lotus* นั่นเอง และกลุ่ม E (สกุลย่อย *Hydrocallis*) ก็มีการจัดกลุ่มกันชัดเจนขึ้น แต่ยังไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ภายในกลุ่มนี้ได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* มีศักยภาพในการนำมาใช้จัดจำแนกและจัดกลุ่มพืชสกุลบัวสายได้ชัดเจนกว่าอีก 2 บริเวณที่กล่าวมา

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากบริเวณระหว่างยีน *trnT-L* บริเวณอินทรอนของยีน *trnL* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* ร่วมกันทั้ง 3 ข้อมูล แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ที่ได้มีความชัดเจนกว่าการวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลจากแหล่งเดียว และยังสามารถบอกความสัมพันธ์ระหว่างสกุลได้ด้วย โดยที่พืชวงศ์ *Nymphaeaceae* นี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพืชวงศ์ *Cabombaceae* 2

ชนิดที่นำมาศึกษาคือ *Brasenia schreberi* และ *Cabomba caroliniana* สำหรับพืชภายในวงศ์ Nymphaeaceae ประกอบด้วย 6 สกุลคือ *Nuphar*, *Barclaya*, *Euryale*, *Victoria*, *Ondinea* และ *Nymphaea* พบว่าสกุล *Nuphar* และ *Barclaya* เป็นสายแรกที่แยกออกมา (basal lineage) ขณะที่อีก 4 สกุลอยู่รวมกันเป็นกลุ่มใหญ่ และสกุล *Euryale*, *Victoria* และ *Ondinea* แทรกเข้าไปอยู่ในสายวิวัฒนาการของสกุล *Nymphaea* โดยที่สกุล *Euryale* และ *Victoria* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ลักษณะทางสัณฐานวิทยาก็คล้ายคลึงกัน กล่าวคือมีหนามที่ทั้งใบและดอก ซึ่งลักษณะนี้ไม่พบในพืชสกุลอื่น ขณะที่สกุล *Ondinea* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับบัวสายในสกุลย่อย *Anecphyta* ถึงแม้ลักษณะของดอกจะต่างกันก็ตาม แต่ทั้งสกุล *Ondinea* และบัวสายสกุลย่อย *Anecphyta* มีแหล่งกระจายพันธุ์ในบริเวณเดียวกันคือประเทศออสเตรเลีย ทำให้อาจเป็นไปได้ว่ามีการกลายพันธุ์เกิดขึ้น ทำให้ลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงไป ส่วนภายในสกุล *Nymphaea* นั้นสรุปได้ว่าแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มได้จริงตามการจัดจำแนกและจัดกลุ่มโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะรังไข่ เป็นต้น Conard (1905) แต่ละกลุ่มที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กันโดยที่กลุ่ม D (สกุลย่อย *Lotos*) จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่ม E (สกุลย่อย *Hydrocallis*) อาจเนื่องจากมีช่วงเวลาการบานของดอกเหมือนกันคือดอกบานในเวลากลางคืนแล้วหุบตอนสายของอีกวันหนึ่ง และมี *N. petersiana* เป็น basal lineage ของกลุ่มทั้งสองนี้ ขณะที่กลุ่ม A (สกุลย่อย *Anecphyta*) และกลุ่ม B (สกุลย่อย *Brachyceras*) มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกันมากกว่า เนื่องจากมีลักษณะของรังไข่ที่เป็นแบบแยกกัน (apocarpiae) เหมือนกัน และกลุ่ม C (สกุลย่อย *Nymphaea*) มีความสัมพันธ์กับกลุ่ม A (สกุลย่อย *Anecphyta*) และกลุ่ม B (สกุลย่อย *Brachyceras*) อาจจะเป็นเนื่องจากมีช่วงเวลาการบานของดอกเหมือนกันคือดอกบานในเวลากลางวัน ตั้งแต่เช้าแล้วหุบเมื่อเวลาบ่ายหรือเย็น โดยทั้ง 3 กลุ่มนี้มีกลุ่ม *Euryale-Victoria* เป็น basal lineage ซึ่งผลการศึกษาขัดแย้งกับการศึกษาของ Borsch et al. (2011) โดยผลการศึกษาพบว่ากลุ่ม *Euryale-Victoria* เป็น basal lineage ของพืชในสกุลบัวสายทั้งหมด

จากการศึกษาการจัดจำแนกโดย Conard (1905) ซึ่งอาศัยลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาในการแบ่งระดับสกุลย่อยถึงระดับชนิด ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลที่ใช้ข้อมูลของบริเวณระหว่างยีน *trnT-L* อินทรอนของยีน *trnL* และบริเวณระหว่างยีน *trnL-F* เมื่อพิจารณาเป็นกลุ่มๆ จะได้ดังนี้

กลุ่ม A (สกุลย่อย *Anecphyta*) มีตัวอย่างทั้งหมด 8 ตัวอย่าง 7 ชนิด กระจายพันธุ์ในประเทศออสเตรเลียทั้งสิ้น มีลักษณะสัณฐานวิทยาโดยรวมกันมีเมล็ดขนาดใหญ่ มีช่องว่างระหว่างวงกลีบดอกกับวงเกสรตัวผู้ และลักษณะขอบใบ 2 แบบคือเป็นคลื่น (sinuate) และหยักแหลม (dentate) (Jacobs and Hellquist, 2006) โดยที่สามารถแบ่งเป็นกลุ่มๆ คือกลุ่มที่ 1 *N. gigantea* ดอกสีม่วง

และดอกสีขาวจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *N. macrosperma* กลุ่มที่ 2 *N. immutabilis* เป็น sister taxa กับ *N. atrans* บัวสายออสเตรเลียทั้งสองชนิดนี้ในสภาพธรรมชาติมีความแตกต่างกันน้อยมาก ผลการจัดจำแนกสอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (Lohne *et al.*, 2008) กับคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเออื่น (Borsch *et al.*, 2007) และกลุ่มที่ 3 *N. elleniae* ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Ondinea purpurea* และ *N. violacea* ตามลำดับ ซึ่งเมื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS และคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอแล้วมาวิเคราะห์ร่วมกันแล้ว ได้มีการเสนอย้าย *Ondinea purpurea* ให้เป็น *Nymphaea ondinea* (Borsch *et al.*, 2011; Hedemark *et al.*, 2010)

กลุ่ม B (สกุลย่อย *Brachyceras*) มีทั้งหมด 12 ตัวอย่าง 6 ชนิด เป็นลูกผสม 4 ตัวอย่าง มีการกระจายพันธุ์ในเขตร้อนทั่วไป มีผนังรังไข่แยกออกจากกัน ลักษณะของเกสรเพศผู้เป็นแท่งกลม ขอบใบมีลักษณะเป็นคลื่น ความสัมพันธ์ที่เห็นได้ชัดคือระหว่าง *Nymphaea* ‘ม่วงกษัตริย์’ และ *N. micrantha* ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก อาจเนื่องจากการมีลักษณะร่วมกันคือการสร้างต้นอ่อนบนใบ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Nymphaea* ‘ม่วงกษัตริย์’ นั้นเป็นลูกผสมที่เกิดจากการใช้ *N. micrantha* เป็นต้นแม่พันธุ์ด้วย (Chomchalow and Chansilpa, 2009; Huhn, 1972) และ *Nymphaea* ‘King of Siam’ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *N. capensis* (ดอกสีม่วง) เนื่องจากลักษณะของดอกที่มีขนาดใหญ่เมื่อโตเต็มที่ แต่ก็มีความแตกต่างกันที่ *Nymphaea* ‘King of Siam’ เป็นหมัน ไม่มีเกสรเพศผู้ ซึ่งก็น่าจะเกิดจากการเป็นลูกผสมที่มนุษย์พัฒนาขึ้น ขณะเดียวกัน *N. cyanea* และ *N. nouchali* (พะเยา) ก็มีความใกล้ชิดกันอาจด้วยจากสีของกลีบดอกที่เป็นสีม่วงเหมือนกัน หรือ *N. nouchali* (พะเยา) นี้ก็อาจจะระบุชนิดใหม่เป็น *N. cyanea* ก็ได้ เนื่องจากไม่มีความสัมพันธ์กับ *N. nouchali* (ระยอง) เช่นเดียวกับ *Nymphaea* ‘จกกลณี’ ที่มีความใกล้ชิดกับ *N. nouchali* (พะเยา) และ *N. cyanea* ซึ่งก็ตรงจากข้อสันนิษฐานที่บอกว่า *Nymphaea* ‘จกกลณี’ เป็นลูกผสมตามธรรมชาติที่เกิดจาก *N. cyanea* เป็นต้นแม่พันธุ์ และ *N. lotus* เป็นต้นพ่อพันธุ์ ซึ่งต้นพ่อพันธุ์นั้นต้องมีการศึกษาดีเอ็นเอในนิวเคลียสรวมด้วยจึงจะสามารถบอกได้ ขณะที่ *N. minuta* และ *N. nouchali* (ระยอง) ก็มีความใกล้ชิดกันด้วยสีของกลีบดอกที่มีสีขาวปลายกลีบสีฟ้าเหมือนกัน (Landon *et al.*, 2006) นอกจากนี้อีก 1 ชนิดในสกุลย่อยนี้ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับตัวอย่างอื่นๆ เลย คือ *N. petersiana* ซึ่งถ้าจำแนกตามหลักฐานวิทยา พบว่าจัดอยู่ในสกุลย่อยนี้แต่เมื่อวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจะถูกจัดอยู่ในกลุ่ม D (สกุลย่อย *Lotus*) ขณะที่ตัวอย่างอื่นๆ ยังไม่สามารถระบุความสัมพันธ์ได้

กลุ่ม C (สกุลย่อย *Nymphaea*) ประกอบด้วย 6 ตัวอย่าง 5 ชนิด มีการบานของดอกในเวลากลางวัน ช่วงบ่ายๆ และจะหุบในช่วงเย็น โดย *N. tetragona* (Section *Chamaenymphaea*) จะถูกแยกออกมาจากกลุ่ม ด้วยลักษณะของเหง้าเจริญตามแนวตั้ง (Hitchcock *et al.*, 1964) ซึ่งมีความ

แตกต่างกับ *N. alba*, *N. odorata* และ *Nymphaea* 'Sunrise' (Section *Eucastalia*) ที่มีลักษณะของเหง้าที่เจริญตามแนวนอน และมีการบานของดอกในเวลาเช้า และจะหุบในเวลาเที่ยงวัน โดยใน *Nymphaea* 'Sunrise' นั้นเป็นลูกผสมระหว่าง *N. maxicana* และ *N. odorata* (Slocum, 2005)

กลุ่ม D (สกุลย่อย *Lotos*) มีตัวอย่างทั้งหมด 9 ตัวอย่าง 3 ชนิด แต่ปรากฏเพียง 2 สายวิวัฒนาการ นั่นคือกลุ่มของ *N. pubescens*, *N. rubra* และตัวอย่างอื่นๆ มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่านี่คือกลุ่มของ *N. pubescens* ทั้งหมด ดังนั้นตัวอย่างใดที่ยังไม่สามารถระบุชนิดได้ในกลุ่มนี้ ก็ถือว่าเป็น *N. pubescens* นั่นเอง รวมถึง *N. rubra* ด้วยที่อาจต้องเปลี่ยนชื่อกลับมาเป็น *N. pubescens* เช่นเดิม และอีกกลุ่มหนึ่งคือความสัมพันธ์ของ *N. lotus* กับ *Nymphaea* 'ขาวสวนหลวง' ที่มีลักษณะการบานดอกคล้ายกัน คือเมื่อดอกบานแล้วจะบายเป็นรูปค่อนข้างกลม ดังนั้น *Nymphaea* 'ขาวสวนหลวง' นี้ก็อาจคือสายพันธุ์หนึ่งใน *N. lotus* ก็ได้

กลุ่ม E (สกุลย่อย *Hydrocallis*) มีทั้งหมด 4 ตัวอย่าง 4 ชนิด ซึ่งมีความแตกต่างทั้งลักษณะใบและดอก เมื่อเทียบกับสกุลย่อยอื่น ภายในสกุลย่อยเดียวกันยังไม่สามารถระบุความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้อย่างชัดเจน ถึงแม้จะใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 บริเวณร่วมกัน ดังนั้นควรเพิ่มข้อมูลให้มากขึ้นอีก แต่กลุ่มนี้ก็มียู่จริง

กลุ่ม O2 มีทั้งหมด 2 ตัวอย่างคือ *Euryale ferox* และ *Victoria amazonica* ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกันคือ การมีหนามบริเวณใบ ก้านใบ และกลีบเลี้ยงของดอก กลุ่มนี้แทรกเข้ามาอยู่ในกลุ่มใหญ่ของสกุล *Nymphaea* แสดงว่ามีวิวัฒนาการร่วมกัน ทำให้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ถึงว่าลักษณะสัณฐานวิทยาจะแตกต่างกันบ้างก็ตาม

ดังนั้นเราจะเห็นได้ว่าพืชวงศ์บัวสาย (Nymphaeaceae) เป็น monophyletic group โดยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพืชวงศ์บัวทราย (Cabombaceae) ขณะที่พืชในสกุลบัวสาย (*Nymphaea*) เป็น paraphyletic group เนื่องจากมีสกุล *Euryale*, *Victoria* และ *Ondinea* แทรกอยู่ภายในสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ นอกจากนี้ยังสามารถสรุปความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการภายในสกุลได้ โดยที่สกุลย่อย *Anecphyra* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุลย่อย *Brachyceras* มากกว่าสกุลย่อย *Nymphaea* และสกุลย่อย *Lotos* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุลย่อย *Hydrocallis* นอกจากนี้อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงภายในสกุลย่อยคือ *N. petersiana* อาจถูกเปลี่ยนจากสกุลย่อย *Brachyceras* มาอยู่สกุลย่อย *Lotos* เนื่องจากความสัมพันธ์ที่ใกล้กับ *N. pubescens* และ *N. lotus* ขณะที่สกุล *Ondinea* ที่มีเพียงชนิดเดียว เหมาะที่จะเปลี่ยนมาอยู่ในสกุลย่อย *Anecphyra* โดยใช้ชื่อ *N. ondinea*

#### 4. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาบางประการของพืชสกุลบัวสายบางตัวอย่าง

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาบางประการในตัวอย่างบัวสาย 10 ตัวอย่าง พบว่าบางลักษณะสามารถนำมาใช้ในการจัดจำแนกหรือจัดกลุ่มได้ เช่นลักษณะของลำต้นที่มีทั้งที่เป็นหัวและเป็นเหง้า ซึ่งลักษณะของเหง้าก็แตกต่างกัน บางตัวอย่างเป็นเหง้าที่เจริญตามแนวตรง บางชนิดเป็นเหง้าที่เจริญในแนวนอนหรือแนวราบ ลักษณะขอบใบของพืชสกุลนี้มีแตกต่างกัน โดยแบ่งได้เป็น ขอบใบจักฟันเลื่อยและขอบใบเรียบ โดยที่ใบที่เป็นขอบใบเรียบก็มีทั้งที่เป็นคลื่นและไม่เป็นคลื่น

การปรากฏของรยางค์ที่ปลายเกสรเพศผู้สามารถนำมาใช้จัดจำแนกได้ โดยที่ 2 ตัวอย่างในสกุลย่อย *Brachyceras* จะพบรยางค์ที่ปลายเกสรเพศผู้ ขณะที่ในสกุลย่อยอื่นไม่พบ และการปรากฏของรยางค์ที่ยอดเกสรเพศเมียก็พบว่ามีความแตกต่าง โดยที่บัวสายสกุล *Anecphyra* จะไม่พบรยางค์ที่ยอดเกสรเพศเมีย ขณะที่ในสกุลย่อยอื่นพบรยางค์ที่ยอดเกสรเพศเมีย ลักษณะของรังไข่ก็เช่นกัน มีทั้งที่เป็นแบบเชื่อมติดกันในสกุลย่อย *Lotos* และสกุลย่อย *Nymphaea* และรังไข่ที่แยกกันในสกุลย่อย *Brachyceras* และสกุลย่อย *Anecphyra*

ลักษณะรูปทรงของดอกเมื่อดอกบาน และช่วงเวลาในการบานของดอกก็มีความแตกต่างกัน โดยพบว่าบางตัวอย่างดอกบานเป็นรูปถ้วย เช่น *N. gigantea* และ *N. pubescens* ซึ่งรวม *N. rubra* ด้วย บางตัวอย่างดอกบานเป็นรูปครึ่งวงกลม เช่น 2 ตัวอย่างในสกุลย่อย *Brachyceras* และบางตัวอย่างดอกจะบานเป็นรูปค่อนข้างกลม เช่น *N. lotus* ทั้ง 2 ตัวอย่าง และ 2 ตัวอย่างของสกุลย่อย *Nymphaea*

ดังนั้นจะเห็นว่าลักษณะสัณฐานวิทยาต่างๆ ของบัวสายนี้ สามารถนำมาช่วยใช้ในการจัดจำแนกและจัดกลุ่มบัวสายได้