บทความวิจัย (Research Article)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ไรโบโซมอลไอทีเอสในบัวประดับสกุล *Nymphaea* ของประเทศไทย

Analysis of nrITS Sequence in Thai waterlilies, *Nymphaea* spp.

ณัฐชา แสงศรี[A], จตุพร กุลอึ้ง[A] และวิภา หงษ์ตระกูล[A]*

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

Nuttacha Sangsri, Chatuporn Kuleung and Vipa Hongtrakul*

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University Bangkhen Campus, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

Received: November 26, 2018; Accepted: December 12, 2018

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ไรโบโซมอลไอทีเอส (nrITS) เพื่อการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในบัวประดับสกุล *Nymphaea* ของประเทศไทยรวม 14 สายพันธุ์ ด้วยโปรแกรม BioEdit พบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (internal transcribed spacer) ยาวประมาณ 900 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยบางส่วนของยีน *18S*, ITS1, ยีน *5.8S*, ITS2 และบางส่วนของยีน *26S* โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS1 และ ITS2 มีความหลากหลายมากกว่าส่วนของยีน *18S*, *5.8S* และ *26S* ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS1 ยาวกว่า ITS2 แต่ ITS1 มีค่า GC content น้อยกว่า ITS2 พบว่าบัวประดับทั้ง 14 สายพันธุ์ มีความยาวของ *5.8S* เท่ากัน คือ 156 คู่เบส เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ไรโบโซมอลไอทีเอสของบัวประดับสกุล *Nymphaea* ทั้ง 14 สายพันธุ์ ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยวิธี maximum likelihood ทดสอบความเชื่อมั่นด้วยค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างบัวที่ศึกษาเป็น 5 กลุ่ม ของสกุลย่อยต่างๆ คือ บัวประดับสกุลย่อย *Anecphya* บัวประดับสกุลย่อย *Brachyceras* บัวประดับลูกผสมข้ามสกุลย่อย (intersubgeneric hybrid) ระหว่างสกุลย่อย *Nymphaea* กับ *Brachyceras* บัวประดับสกุลย่อย *Lotos* และบัวประดับสกุลย่อย *Nymphaea* สอดคล้องกับการจัดจำแนกบัวประดับตามหลักพฤกษศาสตร์

คำสำคัญ : บัวประดับ; นิวเคลียร์ไรโบโซมอลไอทีเอส; แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Abstract

Nucleotide sequences of nrITS were analyzed in order to evaluate genetic variation in 14 Thai waterlilies, *Nymphaea* spp. using BioEdit program. The ITS (internal transcribed spacer) region of

[A]*Center for Advanced Studies in Tropical Natural Resources, NRU-KU, Kasetsart University, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900; *Corresponding author: fscivph@ku.ac.th*

approximately 900 bp contains sequences of partial *18S* gene, ITS1, *5.8S* gene, ITS2 and partial *26S* gene. Nucleotide sequence variations at ITS1 and ITS2 were observed more than those at *18S, 5.8S* and *26S* genes. Comparison to that of ITS2, nucleotide length of ITS1 was longer, but GC contents were less. The *5.8S* gene sequence was 156 bp in all 14 waterlily samples. Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of 14 waterlilies was constructed based on nrITS sequences using MEGA6 program with 1,000 replications (bootstrap). The tree could classify 14 waterlilies into 5 groups of different subgenus, i.e. subgenus *Anecphya*, subgenus *Brachyceras*, Intersubgeneric hybrids (ISG) of subgenus *Nymphaea and* subgenus *Brachyceras*, subgenus *Lotos* and subgenus *Nymphaea*. The classification was consistent with botanical classification in waterlily.

Keywords: waterlily; nrITS; phylogenetic tree

1. คำนำ

บัวเป็นพืชไม้น้ำที่มีความสวยงามจนได้รับสมญานามว่า “ราชินีแห่งไม้น้ำ” พืชที่เรียกว่าบัวในประเทศไทยแบ่งเป็น 2 วงศ์ ได้แก่ Nelumboceae (ปทุมชาติ-บัวก้านแข็ง) และ Nymphaeaceae (อุบลชาติ-บัวก้านอ่อน) ปัจจุบันพบบัวปทุมชาติมีอยู่เพียงสกุลเดียว คือ สกุล *Nelumbo* ได้แก่ บัวหลวง สำหรับบัวอุบลชาตินั้นแบ่งเป็น 6 สกุล ได้แก่ สกุล *Victoria* (บัวกระด้ง) สกุล *Euryale* (บัวถาด) สกุล *Nuphar* (บัวญี่ปุ่น) สกุล *Barclaya* (ไส้ปลาไหล) สกุล *Ondinea* และสกุล *Nymphaea* (Schnieder and Williamson, 1993) บัวในแต่ละสกุลเหล่านี้มีลักษณะที่โดดเด่นแตกต่างกันชัดเจน บัวสกุล *Nymphaea* เป็นบัวที่สวยงาม นิยมนำมาปลูกเป็นบัวประดับ และมีจำนวนสปีชีส์มากที่สุดในวงศ์ Nymphaeaceae (Borsch *et al.*, 2007) มีการจัดประเภทบัวสกุล *Nymphaea* ครั้งแรกโดย Conrad (1905) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม 5 สกุลย่อย (subgenus) คือ กลุ่มที่มีผนังรังไข่เชื่อมติดกัน (syncarpiae) ประกอบด้วย 3 สกุลย่อย ได้แก่ สกุลย่อย *Hydrocallis* (บัวอเมริกันบานกลางคืน) สกุลย่อย *Lotos* (บัวกินสายบานกลางคืน) และสกุลย่อย *Nymphaea* (บัวฝรั่ง) และกลุ่มที่ผนังรังไข่ไม่เชื่อมติดกัน (apocarpiae) ประกอบด้วย 2 สกุลย่อย ได้แก่ สกุลย่อย *Brachyceras* (บัวผัน-บัวเผื่อน บัวนางกวัก บัวจงกลนี) และสกุลย่อย *Anecphya* (บัวยักษ์ออสเตรเลีย)

ประเทศไทยมีการนำบัวฝรั่งเข้ามาเพื่อปลูกเป็นไม้ประดับที่สวยงาม อีกทั้งนำมาปรับปรุงสายพันธุ์ เพื่อให้ได้ลูกผสมใหม่ ๆ มากขึ้น เพื่อประโยชน์ทางการค้า ซึ่งนักผสมพันธุ์บัวไทยก็ประสบความสำเร็จเป็นอย่างมาก หนึ่งในตัวอย่างที่เด่นชัด คือ *Nymphaea* ‘Siam Blue Hardy’ ลูกผสมข้ามสกุลย่อยที่สร้างชื่อเสียงให้กับประเทศไทย เป็นบัวฝรั่งดอกสีม่วงน้ำเงิน ซึ่งเป็นสีที่ไม่เคยปรากฏในบัวฝรั่งมาก่อนเป็นต้นแรกของโลก และยังมี บัวแทนขวัญ (*N.* ‘Tan-Khwan’) ที่ชนะเลิศการประกวดบัวฝรั่งพันธุ์ใหม่ของสมาคมบัวและสวนไม้น้ำสากล (International Waterlily and Water Gardening Society, IWGS) ในปี พ.ศ. 2549 บัวมังคลอุบล (*N.* ‘Mangala Ubol’) บัวฝรั่งที่ผสมในประเทศไทย เคยได้รับรางวัลชนะเลิศจาก IWGS ปี พ.ศ. 2547 เป็นบัวฝรั่งซึ่งมีการซื้อขายมากที่สุดในประเทศไทยและในตลาดต่างประเทศ สามารถส่งเป็นสินค้าออกไปทั่วโลก *N.* ‘Siam purple 1’ ซึ่งมีพ่อและแม่เดียวกับ *N.* ‘Siam Blue Hardy’ ได้รับรางวัลชนะเลิศจาก IWGS ปี พ.ศ. 2554 (2011 IWGS Best New Waterlily) ปี พ.ศ. 2556 *N.*

'Mayaranee' ได้รางวัล '2013 IWGS 1st place Anecphya waterlily' โดยมี *N.* 'Yaowalak' ได้รางวัล '2013 IWGS 2nd place Anecphya waterlily และ *N.* 'Tawan-ok' ได้รางวัล 2013 IWGS 2nd place tropical waterlily ลักษณะเด่นของ *N.* 'Mayaranee' คือ ขณะดอกบานสีของกลีบดอกตั้งแต่วันแรกถึงวันสุดท้ายของการบาน จะเปลี่ยนแปลงจากสีน้ำเงินไปถึงสีชมพูแดง (IWGS, 2018) นอกจากนี้ยังมีบัวที่ได้รับรางวัลจากการประกวดระดับนานาชาติมาอย่างต่อเนื่อง ทำชื่อเสียงให้กับประเทศไทย สร้างความภูมิใจให้กับผู้รักบัว และสร้างความก้าวหน้าในการปรับปรุงพันธุ์บัวเป็นอย่างยิ่ง นอกจากพันธุ์บัวที่ถูกนำเข้ามาปลูกและผสมพันธุ์ในประเทศแล้ว ประเทศไทยยังมีบัวจงกลนีที่เป็นบัวท้องถิ่น พบเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้น ดอกของบัวจงกลนีมีกลีบดอกที่ซ้อนกันมากเป็นลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ต่างจากบัวอื่น ๆ บัวสายพันธุ์นี้ไม่มีเกสรเพศผู้และเพศเมียเลย ทำให้ไม่สามารถผสมข้ามพันธุ์เพื่อถ่ายทอดลักษณะหรือสร้างลักษณะใหม่ได้ เช่นเดียวกับบัวฉลองขวัญ หรือ King of Siam ปรับปรุงพันธุ์โดยนักปรับปรุงพันธุ์บัวชาวไทย ก็ไม่มีเกสรเพศผู้ มีกลีบดอกซ้อนมาก กลีบดอกสีม่วงสวยงามและมีกลิ่นหอม ในอดีตการศึกษาความเป็นบัวพันธุ์ใหม่ของลูกผสมมักจะดูจากลักษณะร่วมระหว่างแม่และพ่อพันธุ์เป็นหลัก แต่มาในระยะหลังเริ่มมีรายงานลูกผสมระหว่างต่างสกุลย่อย (intersubgeneric hybrid) มากขึ้น (Doran *et al*., 2004) และลูกผสมใหม่ ๆ มีลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ที่ใกล้เคียงกัน การระบุสายพันธุ์โดยใช้ phenotype เพียงอย่างเดียวอาจมีความผิดพลาด ลูกผสมที่ได้ควรมีการยืนยันทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ได้แก่ เครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (cpDNA) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ไรโบโซมอลไอทีเอส (nrITS) เป็นต้น (Les *et al*., 2004) เนื่องจากเป็นข้อมูลที่น่าเชื่อถือและตรวจสอบได้ ดังนั้นการขอขึ้นทะเบียนพันธุ์ใหม่รวมทั้งการอ้างสิทธิในพันธุ์ใหม่ จึงควรศึกษาในระดับโมเลกุลด้วย

นิวเคลียร์ไรโบโซมอลไอทีเอส (nrITS) คือส่วนหนึ่งของ nucleolar organizer region (NOR) เป็นบริเวณซ้ำ ๆ ของ rDNA ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ระหว่าง ribosomal RNAs (rRNA) gene เป็นส่วนที่ไม่มีหน้าที่ แต่เป็นส่วนที่สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ (Hao *et al*., 2010) มักนิยมนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในพืช บริเวณของ ITS ประกอบไปด้วย ITS1, 5.8S และ ITS2 (Wheeler and Honeycutt, 1988) ความยาวของ ITS มีความหลากหลายในพืชดอก ซึ่งพบว่ามีความยาวระหว่าง 500-750 นิวคลีโอไทด์ (Baldwin *et. al*., 1995) งานวิจัยนี้ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ไรโบโซมอลไอทีเอสในบัวประดับสกุลย่อยต่าง ๆ บัวลูกผสมข้ามสกุลย่อยที่เคยได้รับรางวัลระดับนานาชาติ และบัวที่พบเฉพาะในประเทศไทย เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและการระบุความจำเพาะของสายพันธุ์บัวสำคัญของประเทศไทย

2. อุปกรณ์และวิธีการ

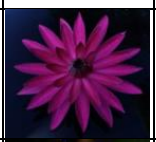
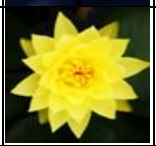
2.1 การรวบรวมตัวอย่างบัวประดับที่ใช้ศึกษา

รวบรวมตัวอย่างบัวประดับ (ตารางที่ 1) ที่เคยได้รับรางวัลระดับนานาชาติจากนักปรับปรุงพันธุ์หรือเจ้าของพันธุ์ และบัวประดับที่พบเฉพาะในประเทศไทย 14 สายพันธุ์ สอบถามประวัติของสายพันธุ์และรวบรวมข้อมูลลักษณะเด่นที่น่าสนใจประจำพันธุ์ ก่อนนำมาสกัดดีเอ็นเอ

2.2 การสกัดดีเอ็นเอและการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

สกัดดีเอ็นเอจากกลีบดอกและใบด้วยวิธีที่ประยุกต์จาก Doyle และ Doyle (1987) จากนั้น

ตารางที่ 1 บัวประดับ 14 สายพันธุ์ ที่ใช้ศึกษา

Name*	Photo	Parentage**	Awards*** / Interesting characters	Hybridizer/ Owner
N. 'Mayaranee' (A)		*N. gigantea* (blue) x *N.* 'A-trans'	2013 IWGS 1st place Anecphya waterlily / petals of flowers change color during blooming from blue to light blue, purple and pink.	N. Nopchai Chansilpa
N. 'Siam Purple 1' (N x B)		*N.*'Supranee Pink' x *N.* 'Nangkwag Fah' (ISG)	2011 IWGS best overall new waterlily and 1st place best new intersubgeneric (ISG) waterlily	Pairat Songpanich
N. 'Siam Purple 2' (N x B)		*N.*'Supranee Pink' x *N.* 'Nangkwag Fah' (ISG)	2014 IWGS 1st place best new intersubgeneric (ISG) waterlily / 2nd best new waterlily / 1st place intersubgeneric waterlily people choice awards	Pairat Songpanich
N. 'Suwanna' (B)		*N. capensis* x *N.* 'Khao Thamanoon 1'	2007 IWGS best new waterlily and 1st place best new tropical waterlily / petal and pad variegations	Kanchana Kokhakanin
N. 'Mangala Ubol' (N)		*N. maxicana* x *N.* 'Perry's Fire Opal'	2004 IWGS 1st place hardy waterlily / large, peach flowers that bloom continuously throughout the summer.	N. Nopchai Chansilpa
N. 'Siam Beauty' (N)		Open pollination of *N.* 'Miss Siam' (*N.* 'Mayla' x *N.* 'Perry's Fire Opal')	2014 IWGS 2nd place best new hardy waterlily	Pairat Songpanich
N. 'Rojjana Ubol' (L)		Open pollination of *N.* 'Maroon Beauty'	2011 IWGS 1st place night-blooming waterlily	Pairat Songpanich
N. 'Joey Tomocik' (N)		unknown	The strongest and most vivid colour of all the yellow lilies available / very free flowering.	Primlarp (Wasuwat) Chukiatman
N. 'Wanvisa' (N)		Rescued from an unspoiled pond of *N.* 'Joey Tomocik'	2010 IWGS best new waterlily and 1st place best new hardy waterlily/ variegated flower with tones of orange, pink and yellow plus a heavily marbled leaves.	N. Nopchai Chansilpa
N. 'Plyfah' (B)		unknown	2015 IWC 2nd place tropical new waterlily	Chaiyaphon Thamasuwan

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Name*	Photo	Parentage**	Awards*** / Interesting characters	Hybridizer/ Owner
N. 'Chalong-Kwan' / King of Siam (B)		*N.* 'Larp Prasert' x *N. colorata*	It is the most double-flowered waterlily created until today with sterile and fragrant flowers.	Chaiyaphon Thamasuwan
N. 'Jongkolnee'/ *N. siamensis* (B)		Native to Thailand, more than 700 years ago during the Sukhothai period.	Ancient waterlily from Sukothai period /double white petals with purple or pink accents and sometimes speckled pads.	Primlarp (Wasuwat) Chukiatman
N. 'Siam Nymph' (N)		(*N.* 'Mayla' x *N.* 'Madame Wilfron Gonnère') x Unknown	2011 1st place hardy waterlily people's choice awards	Pairat Songpanich

ที่มา : Songpanich (2009), International Waterlily Collection (2018) และ IWGS (2018) / *A = subgenus *Anecphya*; B = subgenus *Brachyceras*; L = subgenus *Lotos*; N = subgenus *Nymphaea*; **ISG = intersubgeneric hybrid; ***IWGS = International Waterlily and Water Gardening Society; IWC = International Waterlily Collection

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ F: 5′-TCGCTC CTACCGATTGAATG-3′ (Songpanich and Hong trakul, 2010) และ R: 5′-TCCTCCGCTTATTGAT ATGC-3′ (White *et al.*, 1990) โดยใช้ส่วนประกอบ คือ 100 ng/µl template DNA 1 µL, 10x buffer 1.25 µL, 10 mM dNTPs 1.25 µL, 50 mM $MgCl_2$ 0.5 µL, 5 pmol ไพรเมอร์ F และ R อย่างละ 0.5 µL และ 5 U/µL *Taq* polymerase 0.1 µL สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย initiation denaturation (94 องศาเซลเซียส) 3 นาที ตามด้วย 35 รอบของ denaturation (94 องศาเซลเซียส) 30 วินาที annealing (60 องศาเซลเซียส) 45 วินาที extension (72 องศาเซลเซียส) 1 นาที และ final extension (72 องศาเซลเซียส) 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน 1 % agarose gel

2.3 การคัดเลือกตัวอย่างเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตพีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan) จากนั้นจึงโคลนโดยใช้พลาสมิด pGEM®-T Vector คัดเลือกโคโลนีด้วยวิธี blue-white selection เลือกโคโลนีสีขาวมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 20 โคโลนีต่อสายพันธุ์บัว แล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I และ *Rsa*I เพื่อคัดเลือกโคลนที่ต่างกัน นำไปตรวจสอบโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสใน 1 % agarose gel เลือกโคโลนีแบคทีเรียที่มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอขนาดแตกต่างกัน สายพันธุ์ละ 5 โคโลนี ในกรณีที่รูปแบบหลังการตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะไม่มีความแตกต่างกัน หรือมีความแตกต่างกันแต่มีไม่ถึง 5 โคโลนี สุ่มเลือกมาให้ครบ 5 โคโลนี ในแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นสกัดพลาสมิด แล้วส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์

2.4 การวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของนิวเคลียร์ไรโบโซมอลไอทีเอสมาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall,1999) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์บัวต่าง ๆ โดยสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic

tree) ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยวิธี maximum likelihood (Tamura *et. al*., 2013) bootstrap 1,000 ซ้ำ และสรุปผล

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

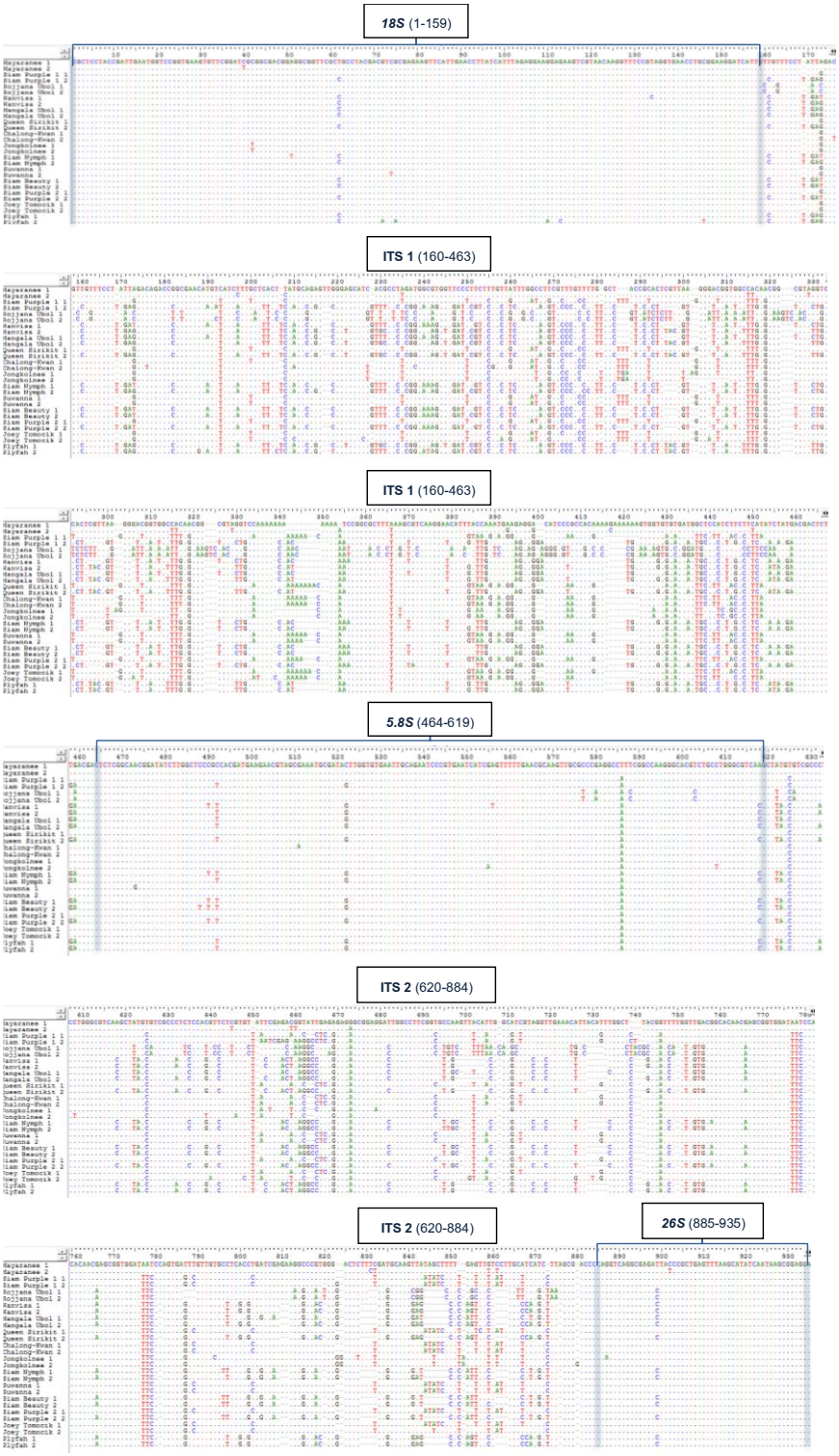
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ในบัวประดับสกุล *Nymphaea* 14 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับบริเวณยีน *18S* และ *26S* ได้ผลผลิตพีซีอาร์ครอบคลุมบางส่วนของยีน *18S*, ITS1, ยีน *5.8S*, ITS2 และบางส่วนของยีน *26S* (*18S*-ITS1-*5.8S*-ITS2-*26S*) โดยพบว่าไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบัวประดับทุกสายพันธุ์ เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าได้แถบดีเอ็นเอคมชัด ในทุกตัวอย่างมีขนาดเท่ากัน คือ ประมาณ 900 คู่เบส

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *18S*-ITS1-*5.8S*-ITS2-*26S* ที่ได้จาก 5 โคลน ของแต่ละสายพันธุ์บัวประดับ ทั้ง 14 สายพันธุ์ โดยโปรแกรม BioEdit พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างแต่ละสายพันธุ์มี 2 รูปแบบ รวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *18S*-ITS1-*5.8S*-ITS2-*26S* ที่แตกต่างทั้งหมด 28 รูปแบบ มีความยาว 935 นิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 1) ประกอบไปด้วยส่วนของ *18S* (ตำแหน่งที่ 1-159) - ITS1 (ตำแหน่งที่ 160-463) - *5.8S* (ตำแหน่งที่ 464-619) -ITS2 (ตำแหน่งที่ 620-884) - *26S* (ตำแหน่งที่ 885-935) ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พบมากกว่าส่วนของยีน *18S*, *5.8S* และ *26S* โดยช่องว่างที่เป็น insertion และ deletion (indel) พบในส่วนของ ITS1 และ ITS2 ไม่พบในส่วนของยีน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dkhar และคณะ (2012) ที่ได้ศึกษาในบัวประดับในประเทศอินเดีย 6 สายพันธุ์ และ Löhne และคณะ (2008) ที่ศึกษาในบัวยักษ์ออสเตรเลีย

บัวประดับที่นำมาศึกษาส่วนใหญ่เป็นลูกผสม ทั้งในสกุลย่อยเดียวกัน (intrasubgeneric hybrid) และต่างสกุลย่อย (intersubgeneric hybrid) (ตารางที่ 1) ลูกผสมอาจเป็น polyploids เช่น *N.* 'Mayaranee' ซึ่งเป็นลูกของ *N. gigantea* ซึ่งมีรายงานว่ามีโครโมโซม 2n = 16x = 224 (Walter, 2000) จึงมีโอกาสทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *18S*-ITS1-*5.8S*-ITS2-*26S* แตกต่างกันมาก อย่างไรก็ตาม พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์บัวประดับเพียง 2 รูปแบบ ข้อมูลการศึกษาโครโมโซมบัวสกุลย่อยต่าง ๆ ยังมีไม่มาก และยังไม่พบการศึกษาจำนวนโครโมโซมในบัวประดับต่าง ๆ ของประเทศไทย

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ เฉพาะบริเวณ ITS ในทุกตัวอย่าง พบว่ามีความยาว 569 นิวคลีโอไทด์ (รวม indel ทั้งหมด) เป็น ITS1 304 นิวคลีโอไทด์ และ ITS2 265 นิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 1) แต่เมื่อแยกทั้งสองรูปแบบของ *18S*-ITS1-*5.8S*-ITS2-*26S* ของแต่ละสายพันธุ์ พบว่าความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปอร์เซ็นต์ของ GC content ในบัวประดับ 14 สายพันธุ์ มีความหลากหลาย (ตารางที่ 2) โดย ITS มีความยาวตั้งแต่ 659 ถึง 698 นิวคลีโอไทด์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Baldwin และคณะ (1995) ซึ่งพบว่าพืชดอกมีความยาวบริเวณ ITS ที่หลากหลาย โดยมีความยาวอยู่ระหว่าง 500-750 นิวคลีโอไทด์ ความยาวของ ITS1 พบตั้งแต่ 269 ถึง 286 นิวคลีโอไทด์ และความยาวของ ITS2 พบตั้งแต่ 226 ถึง 260 นิวคลีโอไทด์ ส่วนค่า GC content (%) พบว่าใน ITS2 มีค่ามากกว่า ITS1 ค่า GC content ที่มากกว่าทำให้การจับคู่ของดีเอ็นเอแม่แบบจับกันเหนียวแน่นมากกว่า และต้องใช้อุณหภูมิที่สูงกว่าเพื่อสลายพันธะ (Yakovchuk *et. al*., 2006) โดยค่า GC content ของบัวประดับทั้ง 14 สายพันธุ์ บริเวณ ITS1 มีค่า 45.8-51.3 % ส่วนบริเวณ ITS2 มีค่า 47.6-60.2 % (ตารางที่ 2)

ส่วนของยีน *5.8S* ของบัวประดับทั้ง 14 สายพันธุ์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาวเท่ากัน คือ 156



รูปที่ 1 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *18S*-ITS1-*5.8S*-ITS2-*26S* ของบัวประดับทั้ง 14 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 2 รูปแบบ แสดงตำแหน่งของ *18S*, ITS1, *5.8S*, ITS2 และ *26S*

ตารางที่ 2 ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ไม่รวม indel) และ GC content (%) ของ ITS1, *5.8S* และ ITS2 ในบัวประดับของประเทศไทย 14 สายพันธุ์

No.	Species	Total Length (bp)	ITS1		*5.8s*		ITS2	
			Length (bp)	% GC	Length (bp)	% GC	Length (bp)	% GC
1	Mayaranee_1	691	281	46.3	156	55.1	254	50.0
2	Mayaranee_2	692	282	46.8	156	55.1	254	47.6
3	Siam Purple 1_1	696	284	46.1	156	55.1	256	50.8
4	Siam Purple 1_2	689	277	50.9	156	54.5	256	50.8
5	Rojjana Ubol_1	683	284	49.6	156	55.1	243	56.4
6	Rojjana Ubol_2	683	284	50.4	156	55.1	243	56.0
7	Wanvisa_1	659	277	49.1	156	54.5	226	60.2
8	Wanvisa_2	661	279	51.3	156	55.1	226	60.2
9	Mangala Ubol_1	665	277	50.9	156	55.1	232	57.8
10	Mangala Ubol_2	661	279	51.3	156	55.1	226	60.2
11	Queen Sirikit_1	698	286	45.8	156	55.1	256	51.2
12	Queen Sirikit_2	661	279	51.3	156	55.1	226	60.2
13	Chalong-Kwan_1	696	284	46.1	156	54.5	256	50.8
14	Chalong-Kwan_2	696	284	46.5	156	55.1	256	50.8
15	Jongkolnee_1	694	279	47.7	156	55.1	259	50.2
16	Jongkolnee_2	685	269	47.2	156	53.8	260	49.6
17	Siam Nymph_1	665	277	49.1	156	54.5	232	56.9
18	Siam Nymph_2	665	277	51.3	156	55.1	232	57.3
19	Suwanna_1	696	284	46.1	156	55.8	256	50.8
20	Suwanna_2	695	283	46.3	156	55.1	256	50.8
21	Siam Beauty_1	665	277	49.1	156	54.5	232	56.9
22	Siam Beauty_2	665	277	49.5	156	53.8	232	56.9
23	Siam Purple 2_1	695	283	46.3	156	55.1	256	50.8
24	Siam Purple 2_2	665	277	48.7	156	54.5	232	56.9
25	Plyfah _1	697	285	46	156	55.1	256	50.8
26	Plyfah _2	696	284	46.1	156	55.1	256	51.6
27	Joey Tomocik _1	661	279	51.3	156	55.1	226	60.2
28	Joey Tomocik _2	661	279	50.2	156	55.1	226	60.2

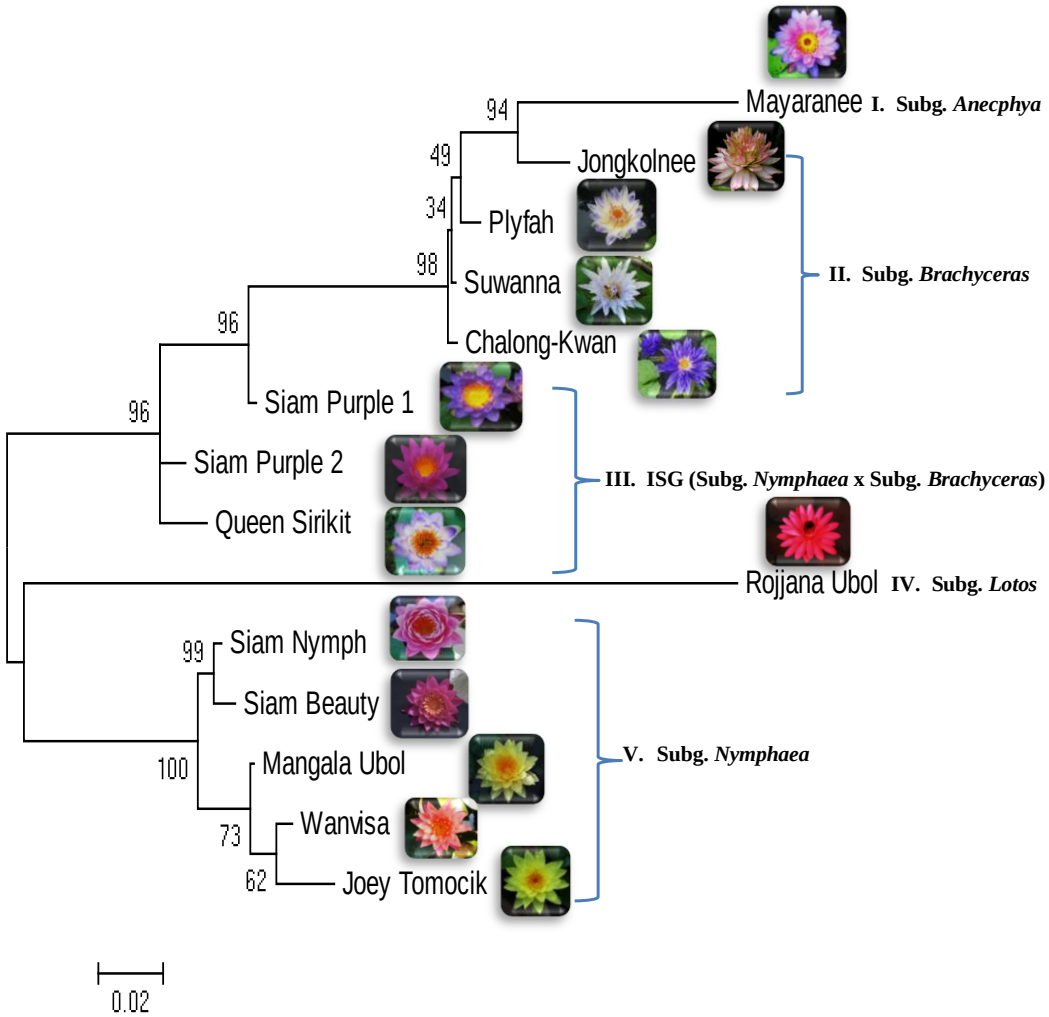
นิวคลีโอไทด์ สอดคล้องกับ Löhne และคณะ (2008) ที่ศึกษาบริเวณ ITS ในบัวยักษ์ออสเตรเลีย และพบบริเวณ *5.8S* ยาว 156 นิวคลีโอไทด์ เท่ากันในทุกตัวอย่าง ยีน *5.8S* น่าจะมีรูปแบบที่คงตัวในพืชแต่ละชนิด เช่น *Saccharum officinarum* L. มียีน *5.8S* ยาว 164 นิวคลีโอไทด์ (Yang *et.al*., 2016) ลิลลี่พื้นเมืองเกาหลีมียีน *5.8S* ยาว 164 นิวคลีโอไทด์ (Sultana *et. al*., 2011) และ Mulberry Genus *Morus* มียีน *5.8S* ยาว 163 นิวคลีโอไทด์ (Zeng *et. al*., 2015) โดย GC content บริเวณ *5.8S* ของบัวประดับทั้ง 14 สายพันธุ์ มีค่า 53.8-55.8 %

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในบัวประดับ 14 สายพันธุ์ โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *18S*-ITS1-*5.8S*-ITS2-*26S* โดยสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA6 (Tamura *et. al*., 2013) โดยใช้วิธี maximum likelihood (รูปที่ 2) พบว่าสามารถแบ่งบัวประดับ 14 สายพันธุ์ เป็น 5 กลุ่ม ตามสกุลย่อยที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลุ่ม I ประกอบด้วย *N.* 'Mayaranee' อยู่สกุลย่อย *Anecphya* กลุ่ม II ประกอบด้วย *N.* 'Plyfah', *N.* 'Suwanna', *N.* 'Chalong-Kwan' และ *N.* 'Jongkolnee' อยู่ในสกุลย่อย *Brachyceras* โดย *N.* 'Jongkolnee' ซึ่งเป็นบัวพื้นเมืองของประเทศไทยมีมาตั้งแต่สมัยสุโขทัย มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับสกุลย่อย *Anecphya* มากที่สุด บัวประดับทั้งกลุ่ม I และ II จัดอยู่ในกลุ่มที่มีผนังรังไข่ไม่เชื่อมติดกัน (apocarpiae) กลุ่ม III เป็นกลุ่มบัวประดับลูกผสมข้ามสกุลย่อย (intersubgeneric hybrid, ISG) ระหว่างสกุลย่อย *Nymphaea* และสกุลย่อย *Brachyceras* ประกอบด้วย *N*. 'Siam Purple 1', *N*. 'Siam Purple 2' และ *N*. 'Queen Sirikit' กลุ่ม IV ประกอบด้วย *N.* 'Rojjana Ubol' อยู่สกุลย่อย *Lotos* และกลุ่ม V ประกอบด้วย *N.* 'Joey Tomocik', *N.* 'Wanvisa', *N.* 'Mangala Ubol', *N.* 'Siam Nymph' และ *N.* 'Siam Beauty' อยู่ในสกุลย่อย *Nymphaea* บัวประดับทั้งกลุ่ม IV และกลุ่ม V จัดอยู่ในกลุ่มที่มีผนังรังไข่เชื่อมติดกัน (syncarpiae) การจำแนกกลุ่มบัวประดับทั้ง 14 สายพันธุ์ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *18S*-ITS1-*5.8S*-ITS2-*26S* ให้ผลที่สอดคล้องกับการจัดจำแนกบัวประดับตามหลักพฤกษศาสตร์ของ Conrad (1905) อย่างไรก็ตาม การวิจัยนี้ไม่มีตัวอย่างบัวสกุลย่อย *Hydrocallis* แต่มีบัวประดับลูกผสมข้ามสกุลย่อย และพบว่าบัวลูกผสมข้ามสกุลย่อยจัดอยู่ระหว่างบัวสกุลย่อย *Brachyceras* และ *Nymphaea* ซึ่งเป็นพ่อและแม่อย่างชัดเจน

การวิเคราะห์ค่าความต่างทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *18S*-ITS1-*5.8S*-ITS2-*26S* ระหว่างบัวประดับทั้ง 14 สายพันธุ์ พบว่ามีค่าความต่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุดตั้งแต่ 0.005 ระหว่างบัว *N.* 'Suwanna' และ *N.* 'Chalong-Kwan บัวประดับทั้ง 2 สายพันธุ์ อยู่ในสกุลย่อย *Brachyceras* และพบว่าบัว *N.* 'Siam Purple1' ซึ่งเป็นลูกผสมข้ามสกุลย่อยระหว่างสกุลย่อย *Nymphaea* และสกุลย่อย *Brachyceras* กับบัว *N.* 'Rojjana Ubol' อยู่ในสกุลย่อย *Lotos* มีค่าความต่างทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ 0.255

เมื่อพิจารณาเป็นกลุ่มเฉพาะสกุลย่อยที่มีอยู่ 4 สกุลย่อย ในบัวประดับ 14 สายพันธุ์ ที่ศึกษา พบว่าบัวสกุลย่อย *Anecphya* มีความต่างทางพันธุกรรมจากสกุลย่อย *Brachyceras* ที่ค่าเฉลี่ย 0.087 ขณะที่บัวสกุลย่อย *Anecphya* มีความต่างทางพันธุกรรมจากสกุลย่อย *Lotos* เฉลี่ย 0.251 และมีความต่างทางพันธุกรรมจากสกุลย่อย *Nymphaea* เฉลี่ย 0.229 บัวสกุลย่อย *Brachyceras* มีความต่างทางพันธุกรรมจากสกุลย่อย *Lotos* เฉลี่ย 0.248 และมีความต่างทางพันธุกรรมจากสกุลย่อย *Nymphaea* เฉลี่ย 0.229 ในขณะที่บัวสกุลย่อย *Lotos* มีความต่างทางพันธุกรรมจากสกุลย่อย *Nymphaea* เฉลี่ย 0.242

จะเห็นได้ว่าบัวในสกุลย่อย *Anecphya* มีความต่างทางพันธุกรรมจากสกุลย่อย *Brachyceras* น้อยที่สุด การผสมพันธุ์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ระหว่าง 2 สกุลย่อย นี้มีแนวโน้มประสบความสำเร็จมากที่สุด



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจัดกลุ่มโดยวิธี maximum likelihood (bootstrap 1,000 ซ้ำ) แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของบัวประดับ 14 สายพันธุ์ โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *18S*-ITS1-*5.8S*-ITS2-*26S* (ISG = intersubgeneric hybrid, Subg. = subgenus)

4. สรุป

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ nrITS ในบัวประดับของประเทศไทย 14 สายพันธุ์ มีความยาวประมาณ 900 นิวคลีโอไทด์ ประกอบไปด้วยส่วนของ *18S*-ITS1-*5.8S*-ITS2-*26S* เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบัวประดับทั้ง 14 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 2 รูปแบบ ได้ความยาวของ ITS1 ตั้งแต่ 269 ถึง 286 นิวคลีโอไทด์ และความยาวของ ITS2 ตั้งแต่ 226 ถึง 260 นิวคลีโอไทด์ ค่า GC content ของบัวประดับทั้ง 14 สายพันธุ์ บริเวณ

ITS1 มีค่า 45.8-51.3 % ส่วนบริเวณ ITS2 มีค่า 47.6-60.2 % ส่วนของ ITS1 และ ITS2 มีความหลากหลายสูง มีทั้ง insertion และ deletion ระหว่างสายพันธุ์ ส่วนของยีน *5.8S* ของบัวประดับทั้ง 14 สายพันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาวเท่ากัน คือ 156 นิวคลีโอไทด์ การวิเคราะห์ผลจากการแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ *18S*-ITS1-*5.8S*-ITS2-*26S* ด้วยวิธี maximum likelihood พบว่าสามารถแบ่งบัวประดับทั้ง 14 สายพันธุ์ เป็น 5 กลุ่ม แตกต่างตามสกุลย่อย ได้แก่ กลุ่ม I คือ สกุลย่อย *Anecphya* กลุ่ม II คือ สกุลย่อย *Brachyceras* กลุ่ม III คือ ลูกผสมข้ามสกุลย่อย *Nymphaea* และ *Brachyceras* กลุ่ม IV คือ สกุลย่อย *Lotos* และกลุ่ม V คือ สกุลย่อย *Nymphaea* โดยกลุ่มบัวประดับสกุลย่อย *Anecphya* และสกุลย่อย *Brachyceras* มีความต่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด ข้อมูลทางพันธุกรรมเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ต่อการระบุความจำเพาะของสายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์บัวประดับในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณไพรัตน์ ทรงพาพานิช ดร. ณ นพชัย ชาญศิลป์ (สถาบันบัวราชมงคลตะวันออก) คุณปริมลาภ ชูเกียรติมั่น (ปางอุบลสวนบัว) คุณชัยพล ธรรมสุวรรณ (บ้านฉลองขวัญ) และคุณกาญจนา เกาะคาดนินทร์ (สวนบัวฟ้า) สำหรับบัวประดับที่ได้นำมาใช้ในการศึกษา

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสถาบัน วิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KURDI) และได้รับการสนับสนุนบางส่วนจาก The Advanced Studies in Tropical Natural Resources, NRU-KU, Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission.

6. รายการอ้างอิง

Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S. and Donoghue M.J., 1995, The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny, Ann. Missouri Bot. Gard. 82: 247-277.

Borsch, T., Hilu, K.W., Wiersema, J.H., Löhne, C., Barthlott W. and Wilde, V., 2007, Phylogeny of *Nymphaea* (Nymphaeaceae): Evidence from substitutions and microstructural changes in the chloroplast *trnT-trnF* region, Int. J. Plant Sci. 168: 639-671.

Buckler E.S., Ippolito, A. and Holtsford, T.P., 1997, The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications, Genetics 145: 821-832.

Conrad, H.S., 1905, The waterlilies: A Monograph of the Genus Nymphaea, The Carnegie Institution of Washington, Washington.

Dkhar, J., Kumaria, S., Rama Rao, S. and Tandon, P., 2012, Sequence characteristics and phylogenetic implications of the nrDNA internal transcribed spacers (ITS) in the genus *Nymphaea* with focus on some Indian representatives, Plant. Syst. Evol. 298: 93-108.

Doran, A.S., Les, D.H. and Moody, M.L., 2004, *Nymphaea* 'William Phillips' a new Intersubgeneric hybrid, HortScience 39: 446-447.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, Phytochem. Bull. 19: 11-15.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 95/98/NT, pp. c1979-c2000, In Nucleic Acids Symposium Series, Vol. 41. No. 41, Information Retrieval Ltd., London.

Hao, D.C., Chen, S.L., Xiao, P.G. and Peng, Y., 2010, Authentication of medicinal plant by DNA-based marker and genomics, Chin. Herb. Med. 2: 250-261.

International Waterlily Collection, 2018, IWC News & Information Multiple Information Categories, Available Source: https://www.internationalwaterlilycollection.com/?page_id=4661, November 17, 2018.

IWGS, 2018, IWGS Events & Competitions, Available Source: http://iwgs.org/events, August 10, 2018.

Les, D.H., Doran, A.S., Moody, M.L. and Phillips, W.E., 2004, A genetically confirmed intersubgeneric hybrid in *Nymphaea* L. (Nymphaeaceae Salisb.), HortScience 39: 219-222.

Löhne, 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), Aust. Syst. Bot. 21: 229-250.

Schneider, E.L. and Williamson, P.S., 1993, Nymphaeaceae, pp. 486-493, In Kubitzki, K., Rohwer, J.G. and Bittrich, V. (Eds.), The Families and Genera of Vascular Plants Vol. 2, Springer, Berlin.

Sultana, S., Lim, Y.P., Bang, J.W. and Choi, H.W., 2011, Internal transcribed spacer (ITS) and genetic variations in *Lilium* native to Korea, Hort. Environ. Biotechnol. 52: 502-510.

Songpanich, P. and Hongtrakul, V., 2010, Intersubgeneric cross in *Nymphaea* spp. L. to develop a blue hardy waterlily, Sci. Hort. 124: 475-481.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S., 2013, MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, Mol. Biol. Evol. 30: 2725-2729.

Walter Pagels, 2000, Chromosome Counts Of Waterlilies And Other *Nymphaeaceae*, Available Source: http://www.victoria-adventure.org/waterlilies/walter_chromosome_counts.html, November 17, 2018.

Wheeler, W.C. and Honeycutt, R.L., 1988, Paired sequence difference in ribosomal RNAs: Evolutionary and phylogenetic implications, Mol. Biol. Evol. 5: 90-96.

White, T.J., Burns, T., Lee, S. and Taylor, J., 1990, Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics, pp. 315-322, In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (Eds.), PCR protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, New York.

Yakovchuk, P., Protozanova, E. and Frank-Kamenetskii, M.D., 2006, Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix, Nucl. Acids Res. 34: 564-574.

Yang, C., Yang, L., Li, Y., Zhang, G., Zhang, C. and Wang, W., 2016, Sequence characteristics and phylogenetic implications of the nrDNA internal transcribed spacers (ITS) in Protospecies and Landraces of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), Sugar Tech. 18: 8-15.

Zeng, Q., Chen, H., Zhang, C., Han, M., Li, T., Qi, X., Xiang, Z. and He, N., 2015, Definition of eight mulberry species in the genus *Morus* by internal transcribed spacer-based phylogeny, PLoS ONE 10(8): e0135411.