การจัดจำแนกพืชวงศ์บัวสายโดยใช้คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ
Systematics in Family Nymphaeaceae Based on Chloroplast DNA

ณัฐกานต์ โกเสนตอ, สุณิสา ณัฐพรณิชกุล และ มลิวรรณ นาคขุนทด*
Nutthakarn Gosanto, Sunisa Nutthapornnitchakul and Maliwan Nakkuntod*
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

พืชในวงศ์บัวสาย (Nymphaeaceae) มีการกระจายพันธุ์อยู่เกือบทั่วโลกทั้งในเขตร้อนและเขตอบอุ่น เป็นพืชที่ได้รับความนิยมในการปลูกเป็นไม้ประดับ พืชในวงศ์บัวสาย หลายชนิดมีลักษณะของสีกลีบดอก รูปร่างดอก หรือใบที่คล้ายคลึงกัน ทำให้ประสบปัญหาในการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ดังนั้นเพื่อให้สามารถจัดจำแนกได้ถูกต้องตามชนิดพันธุ์จึงต้องอาศัยข้อมูลทางชีวโมเลกุล เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Maximum parsimony โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้ข้อมูลของลำดับดีเอ็นเอบริเวณยีน *trn*K ร่วมกับยีน *muterase*K (*mat*K) และบริเวณระหว่างยีน *trn*L-F ในคลอโรพลาสต์ พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 1180-1209 คู่เบส และ 991-1095 คู่เบส ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าสามารถจำแนกพืชในวงศ์บัวสายออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มบัวญี่ปุ่น (*Nuphar*) จะแยกออกมาเป็นกลุ่มแรก และกลุ่มไส้ปลาไหล (*Barclaya*) จะแยกออกมาเป็นกลุ่มที่สอง ขณะที่กลุ่มใหญ่จะประกอบไปด้วยบัวสาย บัวกระด้ง ยูริอาเร่ และออนดิเนีย (*Nymphaea*, *Victoria*, *Euryale* and *Ondinea*)

คำสำคัญ : พืชวงศ์บัวสาย / ยีน *trn*K / ยีน *mat*K / บริเวณระหว่างยีน *trn*L-F

Abstract

Nymphaeaceae is an aquatic herbs family distributed worldwide from tropical to temperate regions. Most of them are useful for decoration. Some species are similar in petal colors, flower shapes or leaves, and thus morphologically indistinquishable. In order to clarify this taxonomic complexity and study the phylogenetic relationship of Nymphaeaceae, two chloroplast markers, *trn*K gene including *mat*K gene and *trn*L-F intergenic spacer, were analysed, using Maximum parsimony method. The results showed that the length of *trn*K including *muterase*K (*mat*K) gene is 1180-1209 basepairs and *trn*L-F is 991-1095 basepairs respectively. According phylogenetic tree, all members of Nymphaeaceae are classified into 3 groups. *Nuphar* clade is the basal lineage of Nymphaeaceae. *Barclaya* clade is the second one, whereas *Nymphaea*, *Victoria*, *Euryale* and *Ondinea* are placed in the same clade.

Keywords : Nymphaeaceae / *trn*K gene / *mat*K gene / *trn*L-F intergenic spacer

***Corresponding author.** E-mail: lotharmali@yahoo.com

1. บทนำ

พืชวงศ์บัวสายเป็นพืชล้มลุกที่ขึ้นในน้ำ พบได้ทั้งในเขตร้อนและเขตหนาว มีอายุหลายปี ประกอบไปด้วย 6 สกุล คือ สกุล *Nymphaea* หรือสกุลบัวสาย ซึ่งมีสมาชิกมากที่สุดในวงศ์นี้ สกุล *Barclaya* หรือไส้ปลาไหล สกุล *Nuphar* หรือบัวญี่ปุ่น สกุล *Ondinea* สกุล *Euryale* หรือบัวถาด และสกุล *Victoria* หรือบัวกระด้ง (คุณหญิงสุชาดา ศรีเพ็ญ, วีรญา บุญเตี้ย และวิสาขา เพียรสุภาพ, 2550; Slocum, 2005) การจัดจำแนกพืชในวงศ์บัวสายโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในปัจจุบันยังเป็นมีสับสนและไม่ชัดเจนอยู่บ้างในบางสกุล เพราะลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้น อาจมีการเปลี่ยนแปลงได้เนื่องมาจากสภาพแวดล้อม ทำให้สิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกันมีการพัฒนาลักษณะบางประการขึ้นมาคล้ายหรือเหมือนกัน และอาจจะมีการลดรูปลักษณะบางประการที่ไม่จำเป็นออกไป เพื่อเป็นการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมนั้นๆ ดังนั้นการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา จึงน่าจะเกิดความผิดพลาดได้ง่ายด้วยลักษณะดังกล่าวที่เกิดขึ้น การที่จะสามารถจัดจำแนกพืชแต่ละกลุ่มออกจากกันได้อย่างชัดเจนและถูกต้องมากขึ้นจึงจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลจากแหล่งอื่นด้วย ซึ่งข้อมูลดีเอ็นเอก็เป็นอีกข้อมูลหนึ่งที่นิยมนำมาใช้ในการจัดจำแนกกันมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นข้อมูลที่ละเอียดเพียงพอและสามารถสืบหาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ด้วย

คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA; cpDNA) ได้ถูกใช้เป็นแหล่งของเครื่องหมายทางดีเอ็นเอที่มีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาวิวัฒนาการและพันธุศาสตร์ประชากร เนื่องจาก คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอเป็นดีเอ็นเอวงกลม ที่มีความคงที่สูงในเรื่องขนาดและโครงสร้าง ลำดับดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ถือเป็นแหล่งแรกของข้อมูลสำหรับการศึกษาทางด้านการจัดจำแนกพืชโดยใช้สารชีวโมเลกุล เนื่องจากมีขนาดและการจัดเรียงตัวของยีนแตกต่างกันมาก การเรียงตัวของยีนในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอได้นำไปสู่การออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้กันทั่วไป (universal chloroplast primers) ซึ่งเป็นการอำนวยความสะดวกให้กับการศึกษาทางด้านวิวัฒนาการของพืชและพันธุศาสตร์ประชากร (Petit *et al*.,1996; Kuo *et al*., 2011) นักชีววิทยาทางด้าน molecular evolution ให้ความสนใจที่จะศึกษายีน *matK* (muterase K) กันมาก เนื่องจากมีอัตราการวิวัฒนาการของลำดับเบสที่สูงกว่ายีนอื่นๆ และมีอัตราการแทนที่เบสสูง จึงทำให้มีการใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกและหาวิวัฒนาการของพืชและตอบคำถามเกี่ยวกับสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับต่างๆ ทางอนุกรมวิธาน (Tamura *et al*., 2004) บางงานวิจัยกล่าวว่า *mat*K เป็น pseudogene ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในยีนนี้จำนวนมาก ทั้งการแทนที่เบส การแทรกเข้ามาหรือขาดหายไป (Hilu and Liang, 1997) นอกจากนี้ในพืชสกุลบัวสาย (*Nymphaea*) ยังมีการใช้บริเวณระหว่างยีน *trn*T-L-F มาใช้ช่วยในการจัดจำแนกระดับสกุลย่อยอีกด้วย เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีความผันแปรสูง โดยเฉพาะเกิดการแทรกเข้ามาหรือขาดหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจำนวนมาก (Les *et al*., 1999; Padgett *et al*., 1999; Podoplelova and Ryzhakov, 2005; Lohne *et al*., 2007) จะเห็นได้ว่าลำดับดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ทั้งสองบริเวณนี้มีประสิทธิภาพอย่างมากในการใช้จัดจำแนกพืช

ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจัดจำแนกและศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในวงศ์บัวสาย โดยการใช้ลำดับดีเอ็นเอบริเวณยีน *trn*K ร่วมกับยีน *mat*K และบริเวณระหว่างยีน *trn*L-F ในคลอโรพลาสต์ เพื่อให้การจัดอนุกรมวิธานของพืชวงศ์นี้ชัดเจนและถูกต้องยิ่งขึ้น

2. วิธีการ

เก็บตัวอย่างพืชในวงศ์บัวสายทั้ง 6 สกุลทั้งที่พบในแหล่งธรรมชาติและที่เก็บรวบรวมสายพันธุ์จากที่ต่างๆ ทั้งที่เป็นตัวอย่างสดและพรรณไม้แห้ง เพื่อใช้เป็น Voucher specimens หรือ living specimens โดยใช้บัวสกุลใกล้เคียงคือ *Brasenia* และ *Cabomba* เป็น outgroups จากนั้นสกัดดีเอ็นเอจากทั้งหมดภายในเซลล์ (genomic DNA) ทั้งดีเอ็นเอในนิวเคลียส คลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรียจากใบบัวที่เก็บมาด้วยวิธีดัดแปลงของ Doyle and Doyle (1987) โดยใช้ 2X CTAB buffer-β-mercaptoethanol และ RNase A แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 ^{0}C จากนั้นเติม chloroform-isoamyl alcohol (24:1) และนำไปปั่นเหวี่ยงแล้วเติม Isopropanol เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงและล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย Ethanol 70% สุดท้ายละลายตะกอนดีเอ็นเอใน TE buffer แล้วนำไปตรวจสอบขนาดและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟริซิสที่ความเข้มข้นเจล 0.8% จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *trn*K ร่วมกับยีน *mat*K โดยใช้ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นเองเพื่อให้จำเพาะต่อตัวอย่างบัวสายที่ศึกษา และใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะสำหรับบริเวณระหว่างยีน *trn*L-F สำหรับพืชทั่วไป (Taberlet *et al*., 1991) โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง GeneAmp* PCR System 9700 (Applied Biosystems) จากนั้นทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ให้บริสุทธิ์ด้วย HiYieldTM Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBC Bioscience) ก่อนนำไปหาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) ที่บริษัท macrogen ประเทศเกาหลีใต้ต่อไป

เมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และถูกต้องแล้ว นำมาทำการจัดเรียงด้วยมือโดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6.002 (Nicholas and Nicholas, 1997) และตรวจสอบความถูกต้องอีกครั้งด้วย ClustalX (Thompson *et al*., 1997) แล้วตรวจหาความหลากหลายของรูปแบบนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้น จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม MEGA5.2 (Tumura *et al*., 2011) หา Phylogenetic tree ที่เหมาะสมที่สุดด้วยการวิเคราะห์ Maximum parsimony โดยใช้ heuristic search แล้ววิเคราะห์ความน่าเชื่อถือในแต่ละกิ่งโดยวิธี Bootstrap แบบ Full heuristic จำนวน 1,000 ซ้ำ

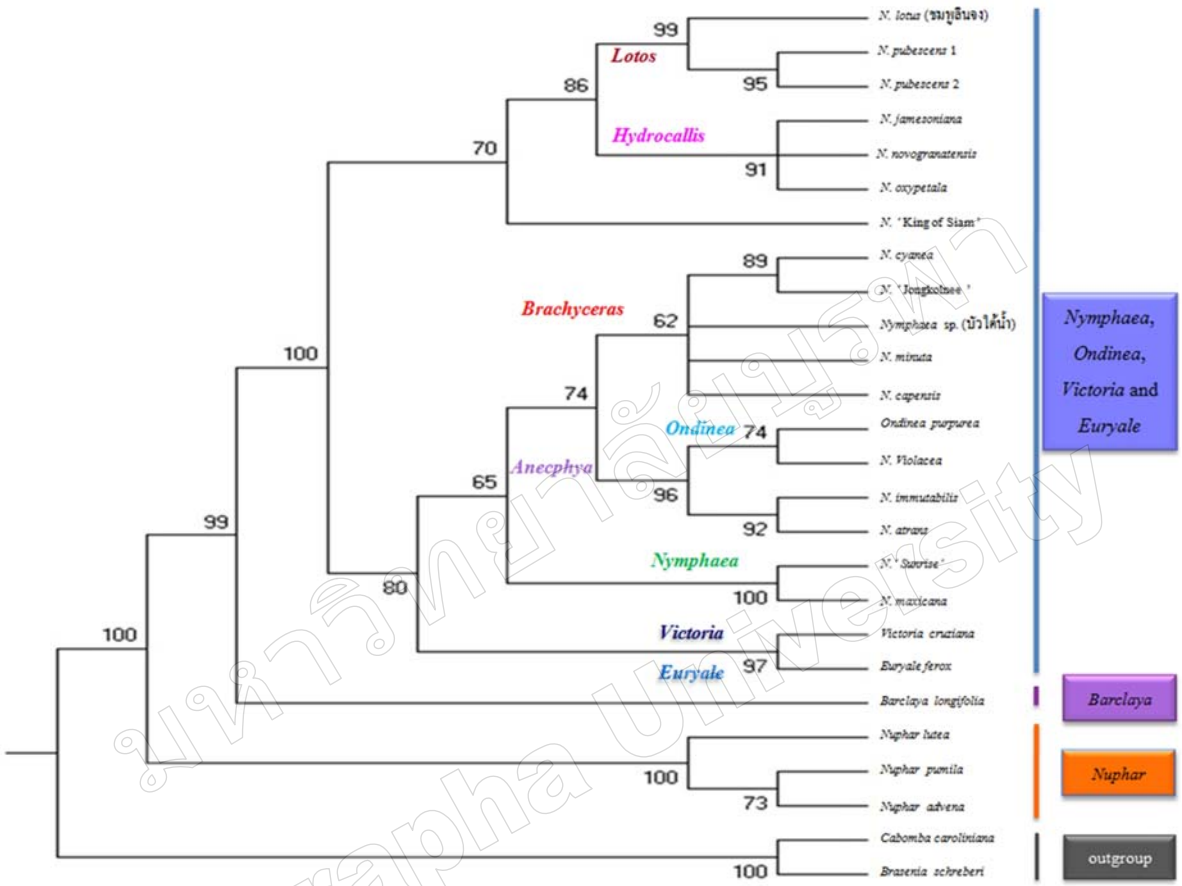
3. ผลและอภิปราย

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณระหว่างยีน *trn*L-F พบว่าชิ้นส่วนมีเพิ่มปริมาณได้มีขนาดประมาณ 1000 คู่เบส และเมื่อนำไปหาลำดับดีเอ็นเอแล้ว พบว่าบริเวณระหว่างยีน *trn*L-F มีขนาดผันแปรตั้งแต่ 990-1090 คู่เบส โดยขนาดที่แตกต่างกันนี้เกิดจากการเพิ่มเข้ามาหรือขาดหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็นส่วนใหญ่ และเป็นลักษณะของเบสซ้ำๆ ตั้งแต่ 2-13 คู่เบส ขณะที่บริเวณยีน *trn*K ร่วมกับยีน *mat*K ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นั้นมีขนาดประมาณ 1200 คู่เบส โดยมีความผันแปรของขนาดตั้งแต่ 1180-1210 คู่เบส โดยขนาดที่แตกต่างกันเกิดจากการเพิ่มเข้ามาหรือขาดหายไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเบสซ้ำตั้งแต่ 1-6 คู่เบส และในบริเวณยีน *mat*K นั้นพบการเปลี่ยนแปลงของเบสในตำแหน่งที่ 2 และ 3 ของโคดอน (codon) ในหลายตำแหน่ง แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในหลายงานวิจัยกล่าวว่ายีน *mat*K นั้นเป็น pseudogene ซึ่งเอนไซม์ muteraseK ที่สร้างขึ้นมายังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจน แต่ยีนนี้มีความแปรผันได้เร็ว เหมาะจะนำมาใช้ศึกษาทางวิวัฒนาการ (Hilu *et al*., 2003)

เมื่อนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ พบว่าบริเวณระหว่างยีน *trn*L-F มี phylogenetic informative site 14.33% และ singleton 10.92% ขณะที่บริเวณยีน *trn*K-*mat*K มี phylogenetic informative site 10.81% และ singleton 7.09% ดังจะเห็นว่าบริเวณระหว่างยีน *trn*L-F ถึงจะมีขนาดสั้นกว่าแต่ให้ข้อมูลที่ใช้ในการจัดจำแนกมากกว่าบริเวณยีน *trn*K-*mat*K เนื่องมาจากบริเวณระหว่างยีนมักจะมีความผันแปรได้มากกว่าบริเวณที่เป็นยีน และ phylogenetic tree ที่ได้มี 5 อัน แต่มีเพียง topology เดียว โดยมีค่า CI = 0.8952 RI = 0.9029 และ tree length = 353 จากสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นพบว่าพืชวงศ์บัวสายเป็น monophyletic group (ภาพที่ 1) ที่มีบัวญี่ปุ่นสกุล *Nuphar* เป็น basal lineage จากค่า bootstrap support ที่สูงมาก โดยที่ *Nu. pumila* และ *Nu. advena* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่า *Nu. lutea* และสกุลไส้ปลาไหล (*Barclaya*) เป็นพืชกลุ่มที่สองที่แยกออกมาในสายวิวัฒนาการของพืชวงศ์บัวสายด้วยค่า bootstrap support ที่สูงมากเช่นกัน ซึ่งพืชในสกุลนี้พบเพียงชนิดเดียวในประเทศไทย เนื่องจากเป็นพืชนำเข้ามาปลูกประดับในตู้ปลาเท่านั้น ไม่พบในธรรมชาติ และกลุ่มใหญ่ที่สุดที่ประกอบด้วยบัวสาย (*Nymphaea*) บัววิคตอเรีย (*Victoria*) บัวถาด (*Euryale*) และบัวออนดิเนีย (*Ondinea*)

เมื่อพิจารณาเฉพาะพืชในสกุลบัวสาย (Genus *Nymphaea*) ที่ประกอบด้วย 5 สกุลย่อย (subgenera) พบว่าพืชสกุลนี้เป็น paraphyletic group ที่มีบัวสกุลอื่นแทรกเข้ามาอยู่ในสายวิวัฒนาการด้วย ทำให้สามารถแบ่งพืชสกุลบัวสายออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ *Lotos-Hydrocallis* clade และ *Brachyceras-Anecphya-Nymphaea* clade โดยในสายวิวัฒนาการแรกคือ *Lotos-Hydrocallis* clade ที่มีค่า bootstrap support ปานกลางนั้นพบว่า *Nymphaea* King of Siam ที่เป็นลูกผสมเป็น basal lineage ของกลุ่มนี้ อาจจะเนื่องมาจากลูกผสมนี้เกิดจากการผสมระหว่างบัวสายพันธุ์ไทยกับบัวสายพันธุ์ต่างประเทศ ทำให้ไม่ถูกจัดอยู่ในสกุลย่อยใดเลย รวมถึงไม่สามารถระบุแม่พันธุ์หรือพ่อพันธุ์ได้ และบัวลูกผสมนี้ก็ยังเป็นหมันอีกด้วย ขณะที่บัวสายสกุลย่อย *Lotos* และ *Hydrocallis* นั้นมีบรรพบุรุษร่วมกัน โดยมีลักษณะร่วมกันคือดอกจะบานในเวลากลางคืนเหมือนกัน แต่บัวสองสกุลย่อยนี้มีเขตการกระจายพันธุ์ต่างกัน กล่าวคือบัวสายสกุลย่อย *Lotos* จะพบในเขตเอเชีย แอฟริกา บางส่วนของออสเตรเลียและยุโรป ขณะที่บัวสายสกุลย่อย *Hydrocallis* พบเฉพาะทวีปอเมริกาเท่านั้น อีกสายวิวัฒนาการหนึ่งคือ *Brachyceras-Anecphya-Nymphaea* clade ที่มีค่า bootstrap support ที่สูงพบว่าจะมีบัวสกุลอื่นแทรกอยู่ด้วย โดยที่บัวสกุล *Victoria* และ *Euryale* จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากด้วยค่า bootstrap support ที่สูงมาก อาจจะเนื่องมาจากลักษณะที่มีหนามที่ก้านใบและก้านดอกเหมือนกัน รูปร่างใบคล้ายกัน แต่ต่างกันที่ขอบใบของบัววิคเตอเรียจะตั้งขึ้น ขณะที่ขอบใบของบัวถาดจะไม่ตั้งขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นกลุ่มที่แยกออกมาเป็นกลุ่มแรก และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับบัวสายสกุลย่อย *Nymphaea* ที่เป็นบัวในเขตหนาวและมีลักษณะของไซเลมเหมือนกัน (Ito, 1987) ด้วยค่า bootstrap support ที่ต่ำ ขณะที่บัวสายในสกุลย่อย *Brachyceras* และ *Anecphya* จะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันด้วยค่า bootstrap support ปานกลาง เนื่องจากมีลักษณะของผนังรังไข่แยกจากกัน (Conard, 1905) และพบว่าบัวสกุลออนดิเนีย (*Ondinea*) มีบรรพบุรุษร่วมกันกับบัวสายสกุลย่อย *Anecphya* ด้วยค่า bootstrap support ปานกลาง ซึ่งบัวสกุลออนดิเนีย (*Ondinea*) และบัวสายสกุลย่อย *Anecphya* นั้นมีเขตการกระจายพันธุ์ที่พบเฉพาะในออสเตรเลียตะวันตกเท่านั้น แต่ที่ลักษณะของดอกที่แตกต่างกันมากอาจจะเนื่องจากการดำรงชีวิตในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน และบัวสกุลออนดิเนียนี้ก็มีเพียงชนิดเดียวคือ *Ondinea purpurea* ดังนั้นบัวสกุลนี้จึงควรจะถูกย้ายสกุลและเปลี่ยนเป็น *Nymphaea ondinea* (Lohne *et al*., 2008; Borsch *et al*., 2011)

จากการจัดจำแนกพืชวงศ์บัวสาย (Nymphaeaceae) โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์พบว่าสามารถให้ความชัดเจนมากขึ้น เนื่องจาก phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นมีค่า bootstrap support ที่ค่อนข้างสูง จึงเชื่อได้ว่าสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการมีความน่าเชื่อถือ แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้สามารถระบุสายสัมพันธ์ที่ชัดเจนยิ่งขึ้นอีกอาจวิเคราะห์ด้วยวิธีอื่นเพิ่มเติม เช่น Maximum Likelihood หรือ Bayesian Analysis หรือควรใช้เครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers) อื่นให้มากขึ้น รวมถึงข้อมูลของดีเอ็นเอในนิวเคลียส (nuclear DNA) ด้วย



ภาพที่ 1 Maximum Parsimonious Tree จากการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอบริเวณคลอโรพลาสต์ของพืชวงศ์บัวสาย ตัวเลขที่ปรากฏบนกิ่งคือค่า Bootstrap support

4. บทสรุป

จากการศึกษาเพื่อการจัดจำแนกและประเมินสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของพืชในวงศ์บัวสาย โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอบริเวณส่วนของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ สามารถสรุปได้ว่าพืชในวงศ์นี้ควรถูกแบ่งออกเป็น 3 วงศ์ย่อย คือ วงศ์ย่อย Nupharoideae ที่มีสมาชิกเพียง 1 สกุลคือ สกุล *Nuphar* หรือบัวญี่ปุ่น วงศ์ย่อย Barclayoideae ที่มีสมาชิกเพียงสกุลเดียวเช่นกัน คือ สกุล *Barclaya* และวงศ์ย่อย Nymphaeoideae ที่ประกอบด้วยสกุล *Victoria*, *Euryale* และ *Nymphaea*

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 และความอนุเคราะห์สถานที่ รวมถึงอุปกรณ์ในการทำวิจัยจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พร้อมกันนี้ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ คุณหญิงสุชาดา ศรีเพ็ญ คุณวีรญา บุญเตี้ย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณ นพชัย ชาญศิลป์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างและให้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6. เอกสารอ้างอิง

คุณหญิงสุชาดา ศรีเพ็ญ, วีรญา บุญเตี้ย และวิสาขา เพียรสุภาพ. (2550). การจำแนกพันธุ์บัว. *The Proceeding of IWGS Annual Symposium*, 181-189.

Borsch, T., Lohne, C., Mbaye, M.S. and Wiersema J.H. (2011). Towards a complete species tree of *Nymphaea*: shedding further light on subgenus *Brachyceras* and its relationships to the Australian water-lilies. *Telopea*, 13(1-2), 193-217.

Conard, H.S. (1905). The Waterlilies: A Monograph of the Genus *Nymphaea*. Washington: Carnegie Institution.

Doyle, J. and Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.

Hilu, K.W., Borsch, T., Muller, K., Soltis D.E., Soltis, P.S. *et al.* (2003). Angiosperm Phylogeny Based on *mat*K Sequence Information. *American Journal of Botany*, 90(12), 1758-1776.

Hilu K.W. and Liang H. (1997). The *matK* gene: Sequence variation and application in plant systematics. American Journal of Botany, 84(6), 830-839.

Ito, M. (1987). Phylogenetic Systematics of the Nymphaeales. *The botanical magazine*, Tokyo, 100, 17-35

Kuo, L.Y., Li, F.W., Chiou, W.L. and Wang, C.N. (2011). First insights into fern matK phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 59, 556-566

Les, D.H., Schneider, E.L., Padgett, D.J., Soltis, P.S., Soltis, D.E. and Zanis, M. (1999). Phylogeny, classification and floral evolution of waterlilies (Nymphaeaceae: Nymphaeales): a synthesis of non-molecular, *rbc*L, *matK*, and 18s rDNA data. *Systematic Botany*, 24, 28-46.

Lohne, C., Borsch, T. and Wiersema, J.H. (2007). Phylogenetic analysis of Nymphaeales using fast-evolving and noncoding chloroplast markers. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 154, 141-163.

Lohne, 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). *Australian Systematic Botany*, 21, 229-250.

Nicholas, K.B. and Nicholas, H.J.B. (1997). GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignment. Retrieved August 20, 2013, from www.psc.edu/biomed/genedoc.

Padgett, D.J., Les, D.H. and Crow, G.E. (1999). Phylogenetic relationships in *Nuphar* (Nymphaeaceae): Evidence from morphology, chloroplast DNA, and nuclear ribosomal DNA. Bridgewater State College, Bridgewater, USA.

Petit, R.J., Demesure, B., and Dumolin-Lapègue, S. (1996). CpDNA and plant mtDNA primers. In Molecular tools for screening biodiversity: Plants and Animals. A Karp, PG Isaac, D Ingram eds, Chapman & Hall.

Podoplelova, Y. and Ryzhakov, G. (2005). Phylogenetic analysis of the order Nymphaeales based on the nucleotide sequences of the chloroplast ITS2-4 region. *Plant Science*,169, 606-611.

Slocum, D. P. (2005). Waterlilies and lotuses: species, cultivars, and new hybrids. Timber press. 260 pages.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of Chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolution Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Nucleic Acids Research*, 24, 4876-4882.