อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

หลักฐานทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลเปรียบเทียบระหว่างกลอยและกลอยเขา

Comparative morphology and molecular genetic evidences between *Dioscorea hispida* Dennst. var. *hispida* and D. *hispida* Dennst. var. *neoscaphoides* Prain & Burkill

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 25 มี.ค. 2559
เลขทะเบียน 1371026
เลขเรียกหนังสือ 9 QH
ช756ร
2558

คณะผู้วิจัย

เชิดศักดิ์ ทัพใหญ่ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มลิวรรณ นาคขุนทด คณะวิทยาศาสตร์

สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย
โดย งบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2557

กิตติกรรมประกาศ
(Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยนเรศวร ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย จากงบประมาณรายได้ประจำปีงบประมาณ 2557 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลระหว่างกลอยและกลอยเขา ทำให้ได้ข้อสรุปยืนยันทางสถานภาพของชนิดพันธุ์ของพืชดังกล่าว ขอขอบพระคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อพ.สธ. – กฟผ. เขื่อนสิริกิติ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ผู้วิจัยเข้าเก็บตัวอย่างพืช (กลอยเขา) ประกอบการศึกษา พร้อมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของเขื่อนสิริกิติ์ที่อำนวยความสะดวกในการเข้าสำรวจและเก็บตัวอย่างพืช ขอขอบคุณภัณฑรักษ์ประจำหอพรรณไม้ (BKF) กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช ภัณฑรักษ์ประจำพิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพ (BK) กรมวิชาการเกษตร และภัณฑ์รักษ์ประจำหอพรรณไม้ (QSBG) สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ จังหวัดเชียงใหม่ ที่อนุญาตให้ผู้วิจัยเข้าศึกษาตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งและค้นคว้าเอกสารวิชาการที่เกี่ยวข้อง ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการชีววิทยาทางพืช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในภาคปฏิบัติการ เพื่อทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลของกลอยและกลอยเขาจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย
สิงหาคม 2558

บทคัดย่อ

การศึกษาสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบของกลอยและกลอยเขา จากตัวอย่างของพืชที่เก็บรวบรวมเพื่อการศึกษา และตัวอย่างพรรณไม้แห้งที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชต่างๆ พบว่าโครงสร้างส่วนใหญ่ของพืชทั้งสองสายพันธุ์ มีความแตกต่างกันในเรื่องของขนาดอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งโครงสร้างในการเจริญเติบโตและส่วนสืบพันธุ์ ได้แก่ หัวใต้ดิน ลำต้น ใบ ดอก ผล และเมล็ด นอกจากนี้ยังพบว่ารูปร่างและสิ่งปกคลุม เช่น รูปร่างของใบและส่วนประกอบของดอก ตลอดจนความหนาแน่นของขนและหนามที่เกิดขึ้น ยังมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ตรงกันข้ามกับผลการศึกษาเปรียบเทียบดีเอ็นเอของกลอยทั้งสองสายพันธุ์ กลับพบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด ไม่สามารถแยกออกจากกันได้อย่างเด็ดขาด ชี้ให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องกันทางพันธุกรรมที่สืบเชื้อสายมาจากชนิดพันธุ์เดียวกัน ดังนั้นข้อมูลทั้งทางด้านสัณฐานวิทยาและดีเอ็นเอที่ได้ในครั้งนี้ จึงยืนยันสถานภาพว่า การจำแนกกลอยและกลอยเขาออกเป็นสองสายพันธุ์ (variety) ที่มีความแตกต่างกันนั้นถูกต้องแล้ว แต่ไม่มีความแตกต่างมากพอที่จะแยกกลอยเขาขึ้นไปเป็นชนิด (species) ต่างหากได้

คำสำคัญ: กลอย กลอยเขา สัณฐานวิทยา ชีวโมเลกุล ดีเอ็นเอ

Abstract

Comparative morphology between var. *hispida* and var. *neoscaphoides* of Asiatic Bitter Yam (*Dioscorea hispida* Dennst.) was study by investigated through both voucher and herbarium specimens. The result showed that mostly characters between two varieties are distinct as highly significant. Mainly vegetative and reproductive structures such as tuber, stem, leaf, flower, fruit and seed were different both sizes and shapes. However, the result of DNA study was controversially indicated that var. *hispida* and var. *neoscaphoides* were closely related as a sister group and did not separated from the other. In conclusion of morphological and DNA study were highly supported their variety status and could not separate var. *neoscaphoides* up to the specific rank.

Keywords: Asiatic Bitter Yam, *Dioscorea hispida* Dennst., var. *hispida*, var. *neoscaphoides*, Morphology, Molecular genetic, DNA

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อ	ii
สารบัญ	iii
สารบัญตาราง	iv
สารบัญภาพ	v
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	13
บทที่ 4 ผลการศึกษา	19
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา	32
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	37

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการระหว่างกลอยและกลอยเขา	7
2	ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	14
3	ลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แต่ละตำแหน่ง	16
4	ความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์	18
5	อุณหภูมิและเวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์	18
6	สัณฐานวิทยาเปรียบเทียบระหว่างกลอยและกลอยเขา	20
7	ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโครงสร้างทางด้านการเจริญเติบโตระหว่างกลอยและกลอยเขา	23
8	ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโครงสร้างทางด้านการสืบพันธุ์เพศผู้ระหว่างกลอยและกลอยเขา	24
9	ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโครงสร้างทางด้านการสืบพันธุ์เพศเมียระหว่างกลอยและกลอยเขา	25

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	พืชวงศ์กลอยในสกุลต่างๆ	4
2	ปฏิกิริยาพีซีอาร์	9
3	หัวใต้ดินของกลอยและกลอยเขา	19
4	ลำต้น สิ่งปกคลุม และหัวอากาศของ	21
5	ลำต้น ใบ และช่อดอกเพศผู้	22
6	ช่อดอกและส่วนประกอบของดอกเพศผู้กลอย	23
7	ช่อดอกและส่วนประกอบของดอกเพศผู้กลอยเขา	24

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	ช่อดอกและส่วนประกอบของดอกเพศเมียกลอย	25
9	ช่อดอกและส่วนประกอบของดอกเพศเมียกลอยเขา	26
10	ช่อผล ผลแก่ และเมล็ดของกลอย	27
11	ช่อผล ผลแก่ และเมล็ดของกลอยเขา	27
12	ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบริเวณยีน *rbcl*	28
13	สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่จากการวิเคราะห์ Maximum Likehood ของลำดับดีเอ็นเอ บริเวณยีน *rcbl* ในพืชสกุลกลอย	29
14	แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของ *D. hispida* var. *hispida* และ *D. hispida* var. *neoscaphoides*	30
15	แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของ *D. hispida* var. *hispida* 2.1	30
16	แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของ *D. hispida* var. *neoscaphoides* 1.4	31
17	แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของ *D. hispida* var. *neoscaphoides* 2.2	31
ภาพผนวกที่		
1	กลอย (*Dioscorea hispida* Dennst. var. *hispida*)	39
2	กลอยเขา (*Dioscorea hispida* Dennst. var. *neoscaphoides* Prain & Burkill)	40

บทที่ 1
บทนำ

กลอย (*Dioscorea hispida* Dennst.) เป็นพืชล้มลุกขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ มีลำต้นเลื้อยพันต้นไม้อื่นขึ้นไปเพื่อรับแสง อาจมีความสูงได้ถึง 20 เมตร หัวใต้ดิน (tuber) มีอายุยืนหลายปี พบเจริญทั่วไปในเขตร้อนของทวีปเอเชีย ตั้งแต่อินเดีย จีนตอนกลางจนถึงไต้หวัน ไทย คาบสมุทรมาลายู อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ นิวกินีและตอนเหนือของออสเตรเลีย (Wilkin & Thapyai, 2009) ในประเทศไทยสามารถพบกลอยได้ในบริเวณป่าเบญจพรรณผสมป่าไผ่ ป่าดิบชื้นจนถึงป่าดิบเขา หรือบริเวณชายป่าที่มีดินลึก ร่วนซุย และระบายน้ำดี ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ตั้งแต่ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกจนถึงภาคใต้ ออกดอกระหว่างเดือนมีนาคมถึงมิถุนายน ติดผลระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนพฤศจิกายน (Thapyai, 2004)

ในปี ค.ศ. 1927 Prain and Burkill ได้จำแนกสายพันธุ์ (variety) ของกลอยเขา (*D. hispida* Dennst. var. *neoscaphoides* Prain & Burkill) แยกออกมาจากสายพันธุ์ของกลอย (*D. hispida* Dennst. var. *hispida*) เนื่องจากพบว่ากลอยเขามีความแตกต่างหลายประการจากกลอยทั่วไป โดยมีขนาดเล็กกว่าทั้งในส่วนของลำต้น ใบ ดอกและผล แต่ไม่ได้รายงานหรือศึกษารายละเอียดเพิ่มเติมไว้ เพียงแต่รายงานสถานภาพของกลอยเขาว่าพบเฉพาะในประเทศไทย (endemic species) ต่อมาในปี ค.ศ. 2009 Wilkin and Thapyai รายงานไว้ในคู่มือพรรณพฤกษชาติของประเทศไทย (Flora of Thailand) พบพืชสกุลกลอย (Genus *Dioscorea*) ในประเทศไทยจำนวน 42 ชนิด แต่ก็ไม่ได้แยกสายพันธุ์ของกลอยเขาออกมาไว้ต่างหาก เนื่องจากสายพันธุ์ของกลอยเขามีรายงานการกระจายพันธุ์เพียงบางท้องที่เท่านั้น ต่างจากกลอยทั่วไปที่มีการแพร่กระจายพันธุ์กว้างขวางทั่วประเทศ ทำให้ตัวอย่างของกลอยเขาที่เก็บรวบรวมได้มีน้อยมาก รวมไปถึงตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้ง (herbarium specimens) ที่เก็บไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช (herbarium) ทั้งในและต่างประเทศก็มีอยู่เพียงไม่กี่ตัวอย่าง ทำให้มีข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธานไม่เพียงพอ ที่จะจำแนกสายพันธุ์ของกลอยและกลอยเขาออกจากกันได้อย่างชัดเจน

ในปี พ.ศ. 2555 เชิดศักดิ์ ทัพใหญ่ และ ณัฐพงศ์ แก้วทุ่ง รายงานพบการกระจายพันธุ์ทางธรรมชาติของกลอยเขา ที่มีประชากรจำนวนมากพอสมควร จากพื้นที่เขื่อนสิริกิติ์ จังหวัดอุตรดิตถ์ โดยพบว่าความแตกต่างที่สำคัญระหว่างกลอยและกลอยเขาได้แก่ กลอยจะมีขนาดของหัวใต้ดินขนาดใหญ่ประมาณ 9 – 25 x 6 – 20 เซนติเมตร เกิดเป็นกลุ่ม (cluster) 3 – 5 หัว มีขนาดของลำต้น ใบ และผลที่มีขนาดใหญ่กว่าอย่างชัดเจน (ตารางที่ 1) ส่วนกลอยเขาจะมีหัวขนาดเล็ก ประมาณ 2 – 3 x 4 – 6 เซนติเมตร จำนวนเพียง 1 หัวต่อต้นเท่านั้น มีขนาดของลำต้น ใบ และผลที่มีขนาดเล็กกว่า นอกจากนี้ยังมักพบหัวอากาศ (bulbil) รูปทรงกระบอก กว้าง 5 – 10 มิลลิเมตร ยาว 15 – 25 มิลลิเมตร อยู่ตามซอกใบของกลอยเขาได้เสมอ ต่างจากกลอยที่มีรายงานพบหัวอากาศได้จากตัวอย่างที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติภูพาน (Wilkin *et al.*, 1016 เก็บรักษาไว้ที่หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช) เพียงตัวอย่างเดียวเท่านั้น ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดขึ้นในกรณีที่ลำต้นของกลอยทอดเลื้อยไปตามพื้นดินที่มีความชื้นค่อนข้างสูง (Thapyai, 2004) เมื่อพิจารณาถึงช่วงเวลาการออกดอกก็พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน กล่าวคือ กลอยจะเริ่มออกดอกตั้งแต่ช่วงกลางฤดูร้อนในเดือนมีนาคมไปจนถึงต้นฤดูฝนในเดือนมิถุนายน ต่างจากกลอยเขาที่จะเริ่มออกดอกในกลางฤดูฝนเดือนสิงหาคมไปจนถึงเดือนตุลาคม ส่วนการติดผลนั้นมีความแตกต่างกันไม่มากนัก เนื่องจากมีช่วงซ้อนทับกันในช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนพฤศจิกายน

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของกลอยและกลอยเขา พบว่าความแตกต่างที่สำคัญระหว่างกลอยทั้งสองสายพันธุ์นี้ได้แก่ กลอยจะมีขนาดของหัวใต้ดินขนาดใหญ่ ประมาณ 9 – 25 x 6 – 20 เซนติเมตร เกิดเป็นกลุ่ม (cluster) 3 – 5 หัว มีขนาดของลำต้น ใบ และผลที่มีขนาดใหญ่กว่าอย่างชัดเจน ส่วนกลอยเขาจะมีหัวขนาดเล็ก ประมาณ 2 – 3 x 4 – 6 เซนติเมตร จำนวนเพียง 1 หัวต่อต้นเท่านั้น มีขนาดของลำต้น ใบ และผลที่มีขนาดเล็กกว่า (เชิดศักดิ์ ทัพใหญ่ และณัฐพงศ์ แก้วทุ่ง (2555) นอกจากนี้ยังมักพบหัวอากาศ (bulbil) รูปทรงกระบอก กว้าง 5 – 10 มิลลิเมตร ยาว 15 – 25 มิลลิเมตร อยู่ตามซอกใบของกลอยเขาได้เสมอ ต่างจากกลอยที่มีรายงานพบหัวอากาศได้จากตัวอย่างที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติภูพานเก็บรักษาไว้ที่หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช) เพียงตัวอย่างเดียวเท่านั้น ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดขึ้นในกรณีที่ลำต้นของกลอยทอดเลื้อยไปตามพื้นดินที่มีความชื้นค่อนข้างสูง (Thapyai, 2004) เมื่อพิจารณาถึงช่วงเวลาการออกดอกก็พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน กล่าวคือ กลอยจะเริ่มออกดอกตั้งแต่ช่วงกลางฤดูร้อนในเดือนมีนาคมไปจนถึงต้นฤดูฝนในเดือนมิถุนายน ต่างจากกลอยเขาที่จะเริ่มออกดอกในกลางฤดูฝนเดือนสิงหาคมไปจนถึงเดือนตุลาคม ส่วนการติดผลนั้นมีความแตกต่างกันไม่มากนัก เนื่องจากมีช่วงซ้อนทับกันในช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนพฤศจิกายน

เมื่อพิจารณาจากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่ามีลักษณะหลายประการ เช่น ขนาดของหัว ความกว้างของใบ ความยาวของผล และช่วงเวลาการออกดอกของกลอยและกลอยเขา มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามลักษณะบางอย่างได้แก่ ความยาวของกลีบรวม (tepal) และรังไข่ (ovary) มีค่าอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน ตลอดจนช่วงเวลาการติดผลก็ยังคงมีระยะเวลาที่ซ้อนทับกัน ดังนั้นการที่จะแยกความแตกต่างของกลอยทั้งสองสายพันธุ์นี้ออกจากกันได้หรือไม่ ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาหาหลักฐานสนับสนุนทางสัณฐานวิทยาให้ละเอียดมากขึ้น ร่วมกับการศึกษาหาหลักฐานทางด้านชีวโมเลกุล โดยเฉพาะหลักฐานทางดีเอ็นเอ และสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ที่จะสามารถนำมาเป็นข้อมูลสำคัญในการศึกษาทบทวนทางอนุกรมวิธาน (taxonomic revision) ของกลอยทั้งสองสายพันธุ์นี้ เพื่อเป็นการพิสูจน์ยืนยันถึงสถานะภาพการเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ หรืออาจมีความแตกต่างกันมากพอ จนกระทั่งสามารถยกระดับสายพันธุ์ (variety rank) ของกลอยเขา ขึ้นเป็นระดับชนิดพันธุ์ (specific rank) ต่างหาก อันจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ การอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ของกลอยและกลอยเขาอย่างยั่งยืนต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อหาหลักฐานทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล ในการศึกษาทบทวนสถานะภาพทางอนุกรมวิธานของกลอยและกลอยเขา
2. เพื่อศึกษาความเกี่ยวข้องกันในทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล ของกลอยและกลอยเขาว่ามีความใกล้ชิดหรือแตกต่างกันเพียงใด
3. **เพื่อเป็นหลักฐานยืนยันถึงสภานะภาพของกลอยและกลอยเขาในทางอนุกรมวิธานว่า สมควรอยู่ในระดับสายพันธุ์หรือควรยกระดับขึ้นเป็นชนิดพันธุ์ต่างหาก**

ขอบเขตการวิจัย

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พฤกษศาสตร์ และอนุกรมวิธาน จากตัวอย่างพืชที่เก็บเพิ่มเติมโดยผู้วิจัย (voucher specimens) และศึกษาจากตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้ง (herbarium specimens) ที่ถูกเก็บรักษาไว้ที่ หอพรรณไม้ (BKF) กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช พิพิธภัณฑ์พืชกรุงเทพฯ (BK) กรมวิชาการเกษตร และหอพรรณไม้ (QSBG) สวนพฤกษศาสตร์สมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์

2. การสกัดแยกดีเอ็นเอใช้ใบสดของกลอยและกลอยเขา จากพื้นที่ป่าธรรมชาติในเขตภาคเหนือของไทย และใช้ลำดับดีเอ็นเอของพืชในสกุล *Dioscorea* จาก Gene Bank จำนวน 6 ตัวอย่าง เป็น outgroups โดยงานวิจัยนี้ใช้ยีนบริเวณ *rbc*L ใน cpDNA มาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่บ่งชี้ความจำเพาะของกลอยและกลอยเขา โดยการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree) และเปรียบเทียบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของกลอยทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ เพื่อเป็นการพิสูจน์ยืนยันถึงสถานะภาพการเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชวงศ์กลอย

พืชวงศ์กลอยจัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จัดอยู่ในวงศ์ Dioscoreaceae ประกอบด้วย 4 สกุล (ภาพที่ 1) คือ *Dioscorea* L., *Trichopus* Gaertn., *Tacca* J.R. & G. Forst. และ *Stenomeris* Planch. โดยพืชในสกุล *Dioscorea* มีความหลากหลายของชนิดพันธุ์มากที่สุด มีเขตการกระจายพันธุ์พบได้ตั้งแต่ป่าดิบชื้นไปจนถึงป่าเต็งรัง พบได้บริเวณเขตร้อนของทวีปอาฟริกา อเมริกา และทวีปเอเชีย ทั่วโลกพบประมาณ 350 – 400 ชนิด สกุล *Trichopus* และสกุล *Stenomeris* พบได้บริเวณเขตร้อนของมาเลเซีย บอเนียว ฟิลิปินส์ และเอเชียใต้ พบพันธุ์ไม้สกุลละ 2 ชนิด ส่วนสกุล *Tacca* มีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วไปบริเวณเขตร้อนของเอเชียและอาฟริกาในสกุล *Tacca* ประกอบด้วยพันธุ์ไม้ 10 ชนิด (Caddick *et al.*, 2002) ในประเทศไทยพบพืชวงศ์กลอย 3 สกุล คือ สกุล *Dioscorea* พบจำนวน 42 ชนิด สกุล *Trichopus* พบจำนวน 1 ชนิด (Wilkin and Thapyai, 2009) และสกุล *Tacca* พบจำนวน 5 ชนิด (Phengklai, 1993)

ภาพที่ 1 พืชวงศ์กลอยในสกุลต่างๆ

ก – ข. พืชในสกุล *Dioscorea* L.
ค – ง. พืชในสกุล *Trichopus* Gaerth.
จ – ฉ. พืชในสกุล *Tacca* J.R. & G. Forst.
ช – ซ. พืชในสกุล *Stenomeris* Planch.

(ที่มา: ค – ซ: http://dioscoreaceae.myspecies.info/)

1.1 ส่วนใต้ดิน และหัวอากาศ (Underground parts and bulbils)

พืชวงศ์กลอยทุกชนิดมีส่วนใต้ดินเป็นหัวสะสมอาหารหรือเหง้า มีการสะสมอาหารจำพวกแป้ง น้ำตาลและน้ำ เพื่อเก็บสะสมไว้ใช้ในฤดูต่อไป เนื่องจากพืชวงศ์กลอยมีการพักตัวในช่วงฤดูแล้ง คือส่วนลำต้นเหนือดินและใบจะเหี่ยวแห้งไป เมื่อถึงฤดูฝนจะงอกหน่อใหม่โดยใช้อาหารภายในหัวที่สะสมไว้ในฤดูก่อน

นอกจากนี้ส่วนของหัวใต้ดินของพืชวงศ์กลอยบางชนิดยังสะสมสารพิษในกลุ่มอัลคาลอยด์ ซึ่งถ้าได้รับในปริมาณที่มากจะเป็นอันตรายถึงชีวิตได้ (Wilkin and Thapyai, 2009) ดังนั้นก่อนรับประทานควรศึกษาวิธีการกำจัดพิษและวิธีการปรุงอย่างถูกวิธีเพื่อความปลอดภัยในการบริโภค และนอกจากหัวใต้ดินแล้วยังพบหัวอากาศซึ่งเป็นลำต้นพิเศษ ที่เปลี่ยนมาทำหน้าที่สะสมอาหาร เหมือนกับหัวใต้ดินเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

1.2 ลำต้นและสิ่งปกคลุม (Stems and Indumentums)

พืชวงศ์กลอยเป็นพืชล้มลุก ไม่มีเนื้อไม้ถึงแม้ว่าบางชนิดจะมีลำต้นที่ค่อนข้างแข็งหรือมีลักษณะคล้ายเนื้อไม้บ้างก็ตามก็จะพบได้แค่ในส่วนของโคนต้นเท่านั้น ในสกุล *Dioscorea* และ*Stenomeris* มีลักษณะของลำต้นเป็นเถาเลื้อย โดยที่ใช้ลำต้นเลื้อยพันกับต้นไม้อื่นเพื่อได้รับแสง ส่วนสกุล *Trichopus* และสกุล *Tacca* นั้นลำต้นมีลักษณะที่เป็นข้อสั้น ไม่มีการเลื้อยพันกับพันธุ์ไม้ชนิดอื่น เจริญอยู่ใกล้ระดับผิวดินลำต้นมีกาบใบห่อหุ้มซ้อนกันหนาแน่น พืชในสกุล *Dioscorea* ในส่วนของลำต้นที่มีการเลื้อยพันกับต้นไม้ชนิดอื่นนั้น (Wilkin and Thapyai, 2009) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ทิศทาง คือ เลื้อยพันในทิศทางตามเข็มนาฬิกาหรือเวียนซ้าย และเลื้อยพันในทางทวนเข็มนาฬิกาหรือเวียนขวา ซึ่งเป็นลักษณะที่ถูกกำหนดโดยพันธุกรรม มีลักษณะการเลื้อยพันคล้ายกับบันไดเวียน ลำต้นของพืชในสกุล *Dioscorea* บางชนิดมีหนามหรือขนปกคลุมอยู่ทั่วทั้งลำต้น ในบางครั้งพบขนปกคลุมในระยะของต้นอ่อนเท่านั้น และในบางชนิดลำต้นจะมีลักษณะเป็นครีบแผ่ออกทางด้านข้างของลำต้นได้อีกด้วย

1.3 ใบ (Leaves)

ใบของพืชวงศ์กลอยพบได้หลายแบบ พบได้ทั้งใบเดี่ยว และใบประกอบแบบนิ้วมือมีใบย่อยตั้งแต่ 3 – 5 ใบย่อย รูปร่างของใบส่วนใหญ่เป็นรูปไข่ รูปรีหรือรูปหอก ฐานใบเว้าลึกคล้ายรูปหัวใจ รูปลิ่ม หรือมีลักษณะกลมมน ส่วนของปลายใบเป็นติ่งแหลมแข็ง แผ่นใบพบได้ทั้งแบบมีขนหรือเกลี้ยง เนื้อใบพบได้ทั้งที่มีลักษณะหนาแข็งและบาง ลักษณะของก้านใบยาวเรียวและมักมีร่องตื้นตามยาว บริเวณโคนและปลายของก้านใบโป่งบวมออกคล้ายกระเปาะ ก้านใบส่วนที่ติดกับลำต้นมักแผ่ออกเป็นครีบหรือบางชนิดพบหนามขึ้นอยู่บริเวณโคนของก้านใบในส่วนที่ติดกับลำต้นอีกด้วย ในส่วนของใบนั้นเกิดความผันแปรได้ง่ายตามสภาพที่อยู่อาศัย (Wilkin and Thapyai, 2009)

1.4 ดอกและช่อดอก (Flowers and inflorescences)

พืชในสกุล *Dioscorea* ทุกชนิดเป็นพืชที่สร้างดอกแยกเพศต่างต้น (dioecious plants) คือ สร้างดอกเพศผู้บนต้นเพศตัวผู้ และสร้างดอกเพศเมียบนต้นเพศเมีย แต่ลักษณะภายนอกของต้นเพศผู้และต้นเพศเมียนั้นมีลักษณะเหมือนกันทุกประการต่างกันที่ดอกเพียงอย่างเดียว จึงทำให้การผสมเกสรเป็นการผสมข้ามเท่านั้น ดอกย่อยแต่ละดอกประกอบด้วยกลีบประดับ 2 กลีบ กลีบเลี้ยง 3 กลีบ กลีบดอก 3 กลีบ แต่มีสีและลักษณะที่เหมือนกันมากจึงทำให้นิยมเรียกว่ากลีบรวม (tepal) ดอกเพศผู้มีลักษณะเป็นตุ่มกลมขนาดเล็กประมาณ 1 – 3 มิลลิเมตร เมื่อดอกบานมีช่องเปิดขนาดเล็ก ดอกเพศผู้ประกอบด้วยเกสรเพศผู้ 6 อัน แต่พบว่าบางชนิดเป็นหมัน 3 อัน จึงทำให้เหลือเกสรเพศผู้ที่สามารถสืบพันธุ์ได้เพียง 3 อันเท่านั้น ช่อดอกเพศผู้มักพบเป็นช่อห้อยลง แบบช่อกระจะ (raceme) ช่อเชิงลด (spike) หรือช่อแยกแขนง (panicle) เกิดตามซอกใบ จำนวน 1 – 3 ช่อ ในแต่ละช่อดอกยาวประมาณ 3 – 5 เซนติเมตร ไปจนถึงมากกว่า 1 เมตร ดอกเพศเมียขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ บางชนิดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ถึง 1 เซนติเมตร รังไข่ใต้ฐานรองดอก (inferior ovary) มีรูปทรงเป็นทรงกระบอกรี มีสันหรือครีบแผ่ออก 3 พู ผิวรังไข่ด้านนอกเกลี้ยงเป็น

มัน บางชนิดมีขนปกคลุมหนาแน่น ภายในดอกเพศเมียพบเกสรเพศผู้ที่เป็นหมันจำนวน 3 – 6 อันอยู่ด้วย ก้านชูเกสรเพศเมียค่อนข้างสั้น ส่วนปลายยอดแยกแกเป็น 3 แฉก รังไข่แต่ละอันประกอบด้วย 3 carpel มี ovule 6 อัน ติดอยู่ที่แกนกลางแบบ axile placentation ช่อดอกเพศเมียมักพบเป็นช่อห้อยลง เป็นแบบช่อกระจะและช่อเชิงลดเท่านั้น (Wilkin and Thapyai, 2009) พบช่อแขนงน้อยมาก ส่วนความยาวของช่อดอกเพศเมียอยู่ที่ระหว่าง 10 – 30 เซนติเมตร แต่มีบางชนิดที่มีความยาวเกิน 50 เซนติเมตร

1.5 ผลและเมล็ด (Fruits and seeds)

ผลของพืชสกุล *Dioscorea* ทุกชนิดเมื่อผลแห้งจะแตกตามตะเข็บ (loculicidal capsule) มีลักษณะกลมหรือรูปทรงกระบอก มีครีบตามยาว 3 ครีบ เมื่อผลแก่จะแตกตามครีบตะเข็บทั้ง 3 ครีบ ทำให้เมล็ดแพร่กระจายออกไป เม็ดมีได้มากที่สุด 6 เมล็ดต่อ 1 ผล จำนวนเมล็ดที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับการผสมเกสรที่เกิดขึ้นตามจำนวนของ ovule ที่มีอยู่ 6 อัน เมล็ดส่วนใหญ่มีลักษณะกลมแบนคล้ายเลนส์มีปีกล้อมรอบเป็นวงกลม บางชนิดเม็ดมีปีกเรียวยาว ซึ่งปีกที่เกิดขึ้นมีไว้ช่วยแพร่กระจายพันธุ์

2. สัณฐานวิทยาของกลอยและกลอยเขา

กลอย (*Dioscorea hispida* Dennst. var. *hispida*) เป็นพืชล้มลุกขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ มีลำต้นเลื้อยพันต้นไม้อื่นขึ้นไปเพื่อรับแสง อาจมีความยาวได้ถึง 20 เมตร หัวใต้ดิน (tuber) มีอายุยืนหลายปี (perennial) พบเจริญทั่วไปในเขตร้อนของทวีปเอเชีย ตั้งแต่อินเดีย จีนตอนกลางจนถึงไต้หวัน ไทย คาบสมุทรมาลายู อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ นิวกินีและตอนเหนือของออสเตรเลีย (Wilkin & Thapyai, 2009) ในประเทศไทยสามารถพบกลอยได้ในบริเวณป่าเบญจพรรณผสมป่าไผ่ ป่าดิบชื้นจนถึงป่าดิบเขา หรือบริเวณชายป่าที่มีดินลึกร่วนซุยและระบายน้ำดี ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ตั้งแต่ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกจนถึงภาคใต้ ออกดอกระหว่างเดือนมีนาคมถึงมิถุนายน ติดผลระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนพฤศจิกายน (Thapyai, 2004)

กลอยเขา (*D. hispida* Dennst. var. *neoscaphoides* Prain & Burkill) เป็นพืชล้มลุกขนาดเล็ก ลำต้นเลื้อยพันต้นไม้อื่นสูงประมาณ 2 – 3 เมตร แต่ส่วนใหญ่มักพบเลื้อยพันไม้พุ่มขนาดเล็กใกล้ผิวดิน หัวใต้ดินมีอายุปีเดียว (annual) สถานภาพเป็นพืชเฉพาะถิ่น (endemic) ของไทย เนื่องจากยังไม่มีรายงานพบในประเทศอื่นนอกจากประเทศไทย (Prian & Burkill, 1927) ในประเทศไทยมีรายงานพบได้ในบริเวณป่าเบญจพรรณผสมป่าไผ่ที่มีดินค่อนข้างลึกและร่วนซุย เฉพาะในภาคเหนือได้แก่ พิษณุโลกและอุตรดิตถ์ (เชิดศักดิ์ ทัพใหญ่ และณัฐพงศ์ แก้วทุ่ง, 2555) และภาคตะวันตกได้แก่กาญจนบุรี (เต็ม สมิตินันท์, 2544) เท่านั้น ออกดอกระหว่างเดือนสิงหาคมถึงเดือนตุลาคม ติดผลระหว่างเดือนกันยายนถึงเดือนพฤศจิกายน (เชิดศักดิ์ ทัพใหญ่ และณัฐพงศ์ แก้วทุ่ง, 2555)

กลอย มีหัวสะสมอาหารจำพวกแป้ง ที่สามารถนำมารับประทานได้ นิยมนำมาประกอบอาหารได้หลายอย่าง ได้แก่ กลอยทอด กลอยนึ่ง ข้าวเหนียวกลอย เป็นส่วนผสมในถั่วทอดและกล้วยทอด ด้วยรสชาติที่เป็นเอกลักษณ์และมีความอร่อย ทำให้เป็นที่นิยมบริโภคกันพอสมควร จากการสังเกตของผู้วิจัยพบว่ามีการนำกลอยมาเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายกันอย่างแพร่หลายในท้องที่จังหวัดพิษณุโลก สุโขทัย อุตรดิตถ์และแพร่ หรือแม้กระทั่งในเขตกรุงเทพมหานคร ก็พบว่ามีการนำผลิตภัณฑ์ของกลอยมาจำหน่ายอยู่บ้างตามตลาดนัด การสอบถามข้อมูลจากผู้ขายที่จำหน่ายผลิตภัณฑ์จากกลอยในเส้นทาง เด่นชัย – ลำปาง ที่มีร้านค้าอยู่มากกว่า 20 ร้าน พบว่ามีรายได้โดยเฉลี่ยวันละกว่า 500 – 1,000 บาท โดยผู้ขายบอก

ว่าจะมีคนนำหัวกลอยมาจำหน่ายให้ จากนั้นจะต้องนำหัวกลอยไปทำการล้างพิษด้วยน้ำให้หมดเสียก่อน จึงจะนำมาปรุงเป็นอาหารได้ (ข้อมูลจากการสอบถามโดยตรงจากผู้ขาย)

กลอยเขา (*D. hispida* Dennst. var. *neoscaphoides* Prain & Burkill) ถูกรายงานแยกออกมาจากพันธุ์ของกลอยในปี ค.ศ. 1927 โดย Prain and Burkill จากขนาดของพืชที่มีขนาดเล็กกว่าทั้งในส่วนของลำต้น ใบ ดอกและผล ต่อมาการศึกษาของ Wilkin and Thapyai (2009) รายงานพบพืชสกุลกลอย (Genus *Dioscorea*) ในประเทศไทยจำนวน 42 ชนิด แต่ไม่ได้แยกสายพันธุ์ของกลอยเขาออกมา เนื่องจากพบการกระจายพันธุ์ของกลอยเขาอยู่เฉพาะบางพื้นที่เท่านั้น ต่างจากกลอยทั่วไปที่พบกระจายพันธุ์อย่างกว้างขวางทั้งในและต่างประเทศ มากไปกว่านี้ยังพบว่าตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้ง (herbarium specimens) ของกลอยเขาที่เก็บรวบรวมไว้ในพิพิธภัณฑ์พืช (herbarium) ทั้งในและต่างประเทศก็มีอยู่เพียงไม่กี่ตัวอย่าง ทำให้มีข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและอนุกรมวิธานไม่เพียงพอ ที่จะจำแนกสายพันธุ์ของกลอยและกลอยเขาออกจากกันได้อย่างชัดเจน จนกระทั่งปี พ.ศ. 2555เชิดศักดิ์ ทัพใหญ่ และณัฐพงศ์ แก้วทุ่ง ได้รายงานพบการกระจายพันทางธรรมชาติของสายพันธุ์กลอยเขา ที่มีจำนวนประชากรมากพอสมควรจากพื้นที่ป่าธรรมชาติภายในเขื่อนสิริกิติ์ จังหวัดอุตรดิตถ์ และเมื่อทำการศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์พบว่ามีความแตกต่างกันระหว่างกลอยและกลอยเขาอยู่พอสมควร (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการระหว่างกลอยและกลอยเขา

Variety	Tuber size (cm)	Terminal leaflet wide (cm)	Tepal length (mm)	Ovary length (mm)	Fruit size (cm)	Flowering period	Fruiting period
hispida	9 – 25 x 6 – 20	8 – 25(–35)	0.3 – 1.2	2.5 – 4.4	4 – 5.2 x 2 – 3	March – May	July – Nov.
neoscaphoides	2 – 3 x 4 – 6	2 – 5	0.7 – 1.2	3 – 6	2 – 2.5 x 2.5 – 3	Aug. – Oct.	Sept. – Nov.

ที่มา: เชิดศักดิ์ ทัพใหญ่ และ ณัฐพงศ์ แก้วทุ่ง (2555), Thapyai (2004)

3. การศึกษาและสกัดดีเอ็นเอ

งานวิจัยนี้ใช้ยีนบริเวณ *rbc*L ใน cpDNA มาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่บ่งชี้ความจำเพาะของกลอยและกลอยเขา โดยการสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree) และเปรียบเทียบความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของกลอยทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ เพื่อเป็นการพิสูจน์ยืนยันถึงสถานะภาพการเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ

3.1 ยีน *rbc*L ในคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ

ยีน *rbc*L (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) ในพืชมีหลากหลายขนาด เช่น 1,428, 1,431 หรือ 1,434 คู่เบส เป็นยีนที่ไม่มีอินทรอน (intron) สอดแทรกอยู่ภายใน เมื่อลอกรหัส (transcription) และแปลรหัส (translation) จะได้หน่วยย่อยขนาดใหญ่ (large subunit) ของเอนไซม์ Rubisco หรือ ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการตรึงคาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide fixation) ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง

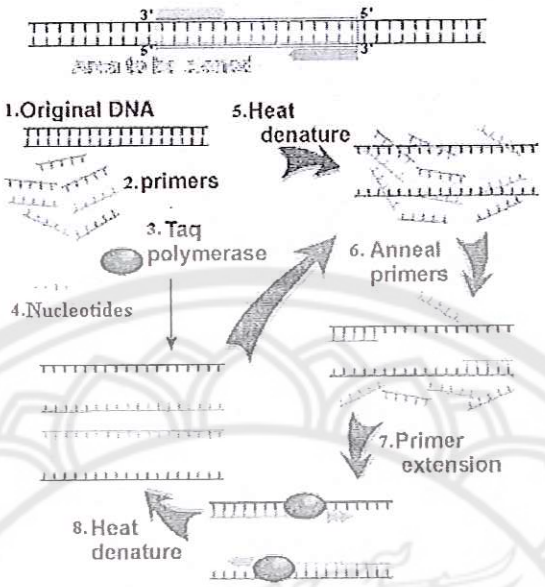
(photosyntesis) มีรายงานว่าการใช้ยีน *mat*K ร่วมกับ *rbc*L เป็นรหัสแท่งดีเอ็นเอจะทำให้การจัดกลุ่มและการพิสูจน์เอกลักษณ์ที่ชัดเจนขึ้น ข้อดีของการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbc*L ในการศึกษาสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogeny) หรือจำแนกชนิดของพืชเนื่องจาก ยีน *rbc*L นี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แน่นอน (unambiguous) ไม่มี intron แทรกอยู่ภายในยีน และเกิดการเพิ่มหรือการขาดหายไปของเบส (indels) ต่ำ

3.2 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR) เทคนิคนี้ได้มีการคิดค้นโดย Kary Mullis ปี ค.ศ. 1986 เป็นการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอให้มีมากขึ้นในเวลาอันสั้นอาศัยสมบัติของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสชนิดที่มีความสามารถในการต่อสายของดีเอ็นเอให้ยาวขึ้นโดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบสายสั้นๆที่เรียกว่า ดีเอ็นเอไพร์เมอร์(DNA primer)และสมบัติพิเศษของเอนไซม์ที่ทนความร้อนได้กว่า 90 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถปรับอุณหภูมิของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสให้สูงต่ำตามความต้องการ โดยที่ไม่ทำให้เอนไซม์นี้เสียความสามารถในการทำงานไป

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นกระบวนการที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยๆ ประกอบด้วยสามขั้นตอนหลัก (ภาพ 7) คือ DNA denaturation เป็นการเพิ่มอุณหภูมิให้เพียงพอที่จะทำให้สายดีเอ็นเอตั้งต้นนั้นเกิดสูญเสียสภาพธรรมชาติ โดยทำให้มีการแยกสายพอลินิวคลีโอไทด์สองสายที่พันกันเป็นเกลียวนั้นแยกออกจากกัน Annealing ดีเอ็นเอไพร์มเมอร์ หมายถึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวสั้นๆประมาณ 18-22 เบสมีลำดับเบสจาก 5’ –phosphate ไปยัง 3’ –OH คู่สม (complimentary base) กับสายดีเอ็นเอแม่แบบ การทำพีซีอาร์ชุดหนึ่งจะใช้ดีเอ็นเอไพร์มเมอร์ 2 ชุด แต่ละชุดมีลำดับเบสจากปลาย 5’ สู่ปลาย 3’ ดีเอ็นเอไพร์มเมอร์ชุดที่ลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบสดีเอ็นเอแม่แบบจากปลาย 5’ ปลาย 3’เรียกว่า sense-primer หรือ forward primer ส่วนดีเอ็นเอไพร์มเมอร์อีกชุดหนึ่งมีลำดับเบสคู่สมกับบริเวณปลาย 3’ ของดีเอ็นเอแม่แบบแต่มีทิศทางสวนกลับ ชุดนี้เรียกว่า antisense primer หรือ reverse primer เมื่อสายดีเอ็นเอแม่แบบแยกเป็นสายเดี่ยวแล้ว และมีการปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมเพื่อให้ดีเอ็นเอไพร์มเมอร์ทั้งสองชุดเข้าคู่กับสายดีเอ็นเอแม่แบบทั้งสองสาย โดยทั่วไป annealing temperature ประมาณ 52-58 องศาเซลเซียส ขึ้นกับค่า melting temperature ของสายดีเอ็นเอไพร์มเมอร์ Extension หลังจากดีเอ็นเอไพร์มเมอร์เข้าคู่กับสายดีเอ็นเอแม่แบบแล้ว ที่ปลาย 3’ ของดีเอ็นเอไพร์มเมอร์มีหมู่ไฮดรอกซิลอิสระ ทำให้ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสสามารถดำเนินการต่อสายดีเอ็นเอไพร์มเมอร์ โดยเลือกใช้นิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) ชนิดที่มีเบสคู่สมกับสายดีเอ็นเอแม่แบบ เข้าเชื่อมกับดีเอ็นเอไพร์มเมอร์ที่ปลาย 3’ ด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ ทำให้ได้พอลินิวคลีโอไทด์สายใหม่ยาวขึ้นและมีเบสคู่สมกับสายดีเอ็นเอเดิมได้ เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสที่ใช้มักเป็น *Taq* DNA polymerase ซึ่งได้มาจากแบคทีเรียที่ทนความร้อนชื่อ *Thermus aquaticus* ครั้งแรกๆได้มาจากน้ำพุร้อนที่อุทยาน yellow stone ประเทศสหรัฐอเมริกา เอนไซม์ชนิดนี้ทำงานได้ดีที่ประมาณ 60 องศาเซลเซียสและทนความร้อนได้กว่า 90 องศาเซลเซียส กระบวนการ PCR จะเป็นการดำเนินของวัฏจักร denaturation-annealing-extension อย่างเป็นวงจร แต่ละวัฏจักรจะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเท่าตัว (ภาพที่ 2) ซึ่งเมื่อครบประมาณ 30 วัฏจักรจะได้ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 2^{30} หรือประมาณ 10^{9} โมเลกุล โดยทั่วไปนิยมใช้ที่ 20-35 วัฏจักร แต่การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีการ PCR ยังมีข้อจำกัดที่ความถูกต้องแม่นยำ หากปฏิกิริยาPCR เกินกว่า 30 วัฏจักรแล้วสายดีเอ็นเอที่ได้จะมีลำดับเบสผิดพลาดมากขึ้น พบว่ามีเบสที่ผิดพลาดประมาณ 1 mismatchทุกๆ 2,000-3,000 คู่

เบส แต่ในปัจจุบันมีการพัฒนาของเอนไซม์พอลิเมอเรสที่มีความสามารถในการตรวจความผิดพลาดโดยมี 3'to5'-exonuclease activity ที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น ProofStart DNA polymerase



ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ที่มา: http://universe-review.ca)

3.3 สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาพีซีอาร์

เนื่องจากการทำพีซีอาร์เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลองจึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ สารเคมีที่ต้องใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ มีดังนี้

1. Deoxynucleotide (dNTP)เป็นนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ประกอบด้วย dATP dGTP dCTP และ dTTP ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 50-200 µM

2. DNA polymerase เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกิริยาเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับ primer ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 0.5-1.0 Unit/50 µl rxn

3. Primer เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้นๆ 20-30 เบส มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาคือ 0.2-1.0 µM

4. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่างๆ ซึ่งจะต้องมี Mg^{2+} และ KCl ซึ่ง Mg^{2+} ทำหน้าที่เป็น cofactor ช่วยในการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Mg^{2+} อยู่ในช่วง 0.5-2.5 mM ส่วน KClทำหน้าที่ในการเกิด primer annealing ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 50mM

5. DNA Template คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ความเข้มข้นของ genomic template ควรอยู่ในช่วง 1-10 µg/ml

3.4 การเกิดรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2545) ได้อธิบายไว้ว่า การทำให้เกิดรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอมี 3 วิธีดังนี้

1. Hybridization-based methods เป็นวิธีใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดสายจีโนมิกดีเอ็นเอ ได้เป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ตามความจำเพาะในการตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์ชนิดนั้นๆ แยกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิค อีเล็กโทรโฟริซีส (electrophoresis) และตรวจสอบด้วยการจับ (hybridization) กับดีเอ็นเอตรวจจับ (DNA probe) ที่เป็นดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA) ซึ่งติดฉลากด้วยกัมมันรังสีหรือสารเคมี จะได้รูปแบบของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหลายตำแหน่ง (multilocus band pattern) ที่มีความหลากหลาย วิธีนี้เรียกว่า RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

2. Sequencing-based methods เป็นวิธีการจำแนกชนิดของพืชโดยวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ในรูปแบบต่างๆ เช่น การเพิ่ม (insertion) การแทนที่ (substitution) หรือการทดสอบในส่วนของยีนที่มีการใช้ในการศึกษา เช่น internal transcribed spacer (ITS) และยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ต่างๆ เช่น ยีน *trn*K, ยีน*mat*K และ ยีน *rbc*L เป็นต้น ตัวอย่างของวิธีนี้เช่น RAPD (Random amplify polymorphism DNA)

3. PCR-based method เป็นวิธีที่ใช้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) หรือไพร์เมอร์ที่สามารถเข้าจับและดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์สร้างดีเอ็นเอ

3.5 วิธีการจัดจำแนกพันธุ์ปลูกพืชในระดับโมเลกุล

การแยกความแตกต่างของสายพันธ์หรือพันธุ์ปลูกของพืชโดยอาศัยลักษณะทางกายภาพหรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชนั้น อาจมีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ในปัจจุบันได้มีการใช้เทคนิคต่าง ๆ ในการหาความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยความแตกต่างในระดับยีนหรือดีเอ็นเอได้แก่ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Weber and Helentjaris, 1989) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Wiesmann *et al*., 1998) STS (Sequence-Tagged Site) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism DNA) DNA Fingerprinting analysis หรือการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เทคนิคเหล่านี้ทำให้เกิดความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอซึ่งใช้ในการบ่งชี้และจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกนำมาใช้เป็นตัวแทนหรือเครื่องหมายของลักษณะใดลักษณะหนึ่งที่เรียกว่า molecular marker ซึ่งหมายถึงการใช้ ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการตรวจและใช้ประโยชน์จากการเกิดความแตกต่างหรือpolymorphism ของลำดับดีเอ็นเอที่แสดงให้เห็นถึงการพัฒนาทางชีวโมเลกุล

เครื่องหมายดีเอ็นเอ คือ ชิ้นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่ลำดับเบสสามารถจับกันหรือเข้าคู่กับช่วงใดช่วงหนึ่งบนสายดีเอ็นเอ หรือโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตเป้าหมาย ทำให้สามารถกำหนดหรือระบุตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซมที่ศึกษา นอกจากนี้ยังนำมาใช้เป็นเครื่องหมายติดตามหน่วยพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิตได้ ความแตกต่างที่พบจากการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอตรวจสอบสารพันธุกรรมจากสิ่งมีชีวิตที่ต่างชนิดหรือต่างพันธุ์กัน เกิดขึ้นจากการเรียงตัวของลำดับเบสหรือนิวคลีโอไทด์ในสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดที่มีความแตกต่างกัน เมื่อนำมาทำปฏิกิริยาระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่าง ๆ ตำแหน่งการวางตัวและปริมาณของแถบดีเอ็นเอ (DNA band) ที่ปรากฏบนตัวกลางในการตรวจสอบภายหลังจากการทำปฏิกิริยาจึงแตกต่างกัน ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่นำมาทำการศึกษาได้

นฤมล ธนานันต์ (2557) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตา (Bulbophyllum) หมู่สิงโตสยาม ซึ่งได้ทำการวิเคราะห์จีโนมของกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยาม

12 ชนิด โดยตวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K, *rbc*L, *rpo*B, *rpo*C1 และชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน *trn*H กับ *psb*A พบว่าไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณใดที่สามารถแยกกล้วยไม้สกุลสิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามทั้ง 12 ชนิด ออกจากกันได้ทั้งหมด การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *mat*K และ *rbc*L ร่วมกันสามารถแยกกล้วยไม้สิงโตสกุลกลอกตาหมู่สิงโตสยามออกจากกันได้ ยกเว้นสิงโตก้ามปูใหญ่และสิงโตก้ามปูแดงซึ่งสามารถแยกด้วยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rpo*C1 หรือชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ *trn*H-*psb*A

วิชัย บุญแสง และคณะ (2547) ได้อธิบายไว้ว่า การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) คือ การตรวจรูปแบบของ แถบชิ้น DNA ที่ถูกแยกออกจากกันบนตัวกลางตามโครงสร้างของ DNAของพืช ซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะต้นหรือเฉพาะคน ยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twin) หรือพืชโคลนเดียวกันหรือสายพันธุ์บริสุทธิ์ หรือลูกผสมเดียวกัน ซึ่งลายพิมพ์DNAดังกล่าวในพืชแต่ละต้นจะสามารถตรวจสอบซ้ำและให้ผลที่เหมือนกันตลอด ดังนั้นข้อดีของการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอคือสามารถตรวจสอบหาลายพิมพ์DNA ที่เป็นเอกลักษณ์ของพืชแต่ละต้นได้สามารถทำซ้ำๆ กันและได้ผลเหมือนเดิมทุกครั้ง และลายพิมพ์ดีเอ็นเอจะไม่เปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อมและระยะการเจริญเติบโตของพืชอีกด้วย

เบญจพร ศรีสุวรมาศ และคณะ (2555.) ได้ทำการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์มะขามต้านเชื้อราด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฉายรังสีแกมมา ได้ทำการสกัด DNA จากใบอ่อนทุกทรีทเมนต์ ศึกษาลายพิมพ์ DNA ด้วยยีน *rbc*L ในคลอโรพลาสต์ ผลการทดลองพบว่ายีนต้านเชื้อราไม่อยู่บนยีน *rbc*L และอาจไม่มียีนต้านเชื้อราในมะขาม แต่ยีน*rbc*L สามารถใช้จำแนกความแตกต่างของทุกทรีทเมนต์ได้ดี

3.6 เทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟเอลพี

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) หมายถึงความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เนื่องจากการตรวจสอบในระดับโปรตีนทำได้ไม่กว้างขวางเท่าที่ควร จึงมีการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งมีข้อได้เปรียบคือ สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดก็ได้ไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสิ่งแวดล้อม ทั้งยังสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งในส่วนของยีนและไม่ใช่ส่วนของยีน ส่วนของดีเอ็นเอในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอยู่ในนิวเคลียสและออร์แกนเนลล์บางชนิด ได้แก่ คลอโรพลาสต์ และไมโทคอนเดรีย (ในที่นี้ได้ศึกษาในส่วนของคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอคลอดรพลาสต์เป็นออร์แกนเนลล์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง พบในพืชทั่วไป มีดีเอ็นเอที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ (double stranded circular DNA) ขนาดประมาณ 120-220 กิโลเบส จำนวนคลอดรพลาสต์ในแต่ละเซลล์มีได้มากถึง 40 อัน และแต่ละอันมีดีเอ็นเอประมาณ 20-40 โมเลกุล รวมจำนวณดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ (choloroplast DNA, cpDNA) ในแต่ละเซลล์อาจมีมากถึงประมาณ 800-1600 โมเลกุล จากการศึกษาลำดับเบสในจีโนมของคลอโรพลาสของพืชหลายชนิดพบว่าจีโนมของคลอโรพลาสของพืชส่วนใหญ่ มีส่วนของดีเอ็นเอที่ทีลำดับเบสเหมือนกันซ้ำสองชุด เรียงตัวอยู่ห่างกันในทิศทางตรงกันข้าม (inverted repeat) แยกส่วนที่มีลำดับเบสจำเพาะเพียงชุดเดียว (unique sequence) เป็นสองส่วน เป็นส่วนที่มีขนาดใหญ่ (large single copy) และส่วนที่มีขนาดเล็ก (small single copy) จีโนมของคลอโรพลาสต์โดยทั่วไปมีจำนวนยีนประมาณ 100 ยีน) โมเลกุลของดีเอ็นเอนี้มีความสามารถที่จะจำลองโมเลกุลได้ถูกต้องแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและยังคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์นั่นเอง นอกจากจะมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแต่ละตัวแล้ว อาจมีการเปลี่ยนแปลงของชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่ หรือเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ หรือ โครโมโซม

หายไป (deletion) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มขึ้นมา (insertion) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของส่วนดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement) หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซม หรือ จากต่างโครโมโซม (transposition) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน แต่เป็นวิธีที่ทำได้ยากมาก วิธีที่ง่ายกว่าคือ นำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้นมาย่อยด้วนเอ็นไซม์ตัดจำเพาะบางชนิดเปรียบเทียบชิ้นส่วนที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์นั้น

เอ็นไซม์ตัดจำเพาะเป็นเอ็นไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรียและจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของเบสแบบจำเพาะเรียกว่าตำแหน่งจดจำ (recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยเบส 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้นเมื่อใช้เอ็นไซม์ชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมายโมเลกุลหนึ่ง จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายจากแหล่งต่างกันและมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไป หรือ มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่งดังที่กล่าวมาแล้ว เมื่อนำมาตัดโดยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จะได้ขนาดและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเดิมเรียกว่าเกิดพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) (สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล, 2552) เอนไซม์แบ่งออกเป็น 3 แบบ ตามลักษณะการทำงาน องค์ประกอบของหน่วยย่อยของเอนไซม์ องค์ประกอบร่วม (cofactor) ที่ใช้ และวิธีการตัดดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในงานทางดีเอ็นเอส่วนมากเป็นเอนไซม์ใน type II ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้มากในการตัดต่อยีน เนื่องจากโมเลกุลไม่ซับซ้อนประกอบด้วยโพลีเปปไทด์เพียงชนิดเดียว การตัดดีเอ็นเอจะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะในบริเวณจดจำหรือที่จุดใกล้บริเวณจดจำ ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอน และในปฏิกิริยาต้องการเฉพาะแมกนีเซียมไอออนเท่านั้น มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงอย่างเดียว การเติมหมู่เมธิลให้กับเบสอาศัยเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง

นิจรดา ย๊ะหมื่น และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพาราจากลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน caffeateO-methyl-transferase ด้วยเทคนิคพีซีอาร์แล้วอ่านลำดับเบสจากพลาสมิดสายผสมผ่านวิธีการโคลนโดยใช้พลาสมิด พบว่าสามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยางพาราจำนวน 10 สายพันธุ์ จากส่วนของยีน COMT โดยเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ขนาด 1,569-1,573 คู่เบส และตัดด้วยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิดคือ *Ban*I, *Bbs*I, *Btg*ZI และ *Msp*I ปรากฏรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างทั้งหมด 8 รูปแบบ ที่สามารถระบุความเป็นเอกลักษณ์ของยางพาราได้จานวน 7 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ BPM 24, RRIT 226, RRIT 408, RRIM 600,สงขลา 36, ฉะเชิงเทรา 50 และบางปิด แต่ยังไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างยางพาราสายพันธุ์ PB235, PB 255 และ PB 260 ออกจากกันได้

จิตรอนงค์ คารศ และ ชูตา บุญภักดี (2013) ได้ทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาสกุล *Camellia* จากลำดับดีเอ็นเอบางส่วนของยีน Chalcone synthase โดยนำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอของชาบริเวณยีน *ChS* มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจาเพาะ *Aci*I, *Bbv*I, *Hpa*II และ *Rsa*I พิจารณารูปแบบที่เกิดจากเอนไซม์ทั้งสี่ชนิดจะพบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 27 รูปแบบ จำแนกชาได้ 18 ชนิด และ 4 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน รวมถึงสามารถจำแนกชาจีน ชาอัสสัม และชาน้ำมันได้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

1. อุปกรณ์การศึกษา

1.1 อุปกรณ์ในการสำรวจละเก็บตัวอย่างพืช ได้แก่ กรรไกรตัดกิ่ง ไม้สอย เครื่องวัดระดับความสูงของพื้นที่ (altimeter) ฉลากติดหมายเลขตัวอย่าง (label tag) และกล้องถ่ายภาพ

1.2 อุปกรณ์สำหรับการทำตัวอย่างพรรณไม้แห้ง ได้แก่ แผงอัดพรรณไม้ ขนาดกว้าง 12 นิ้ว ยาว 18 นิ้ว กระดาษลูกฟูกขนาดกว้าง 11 นิ้ว ยาว 17 นิ้ว กระดาษหนังสือพิมพ์ ขวดดองตัวอย่าง และแอลกอฮอล์ 70%

1.3 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ สำหรับศึกษารายละเอียดของตัวอย่างที่มีขนาดเล็ก ได้แก่โครงสร้างของดอก กลีบเลี้ยง กลีบดอกและเกสร

1.4 สารดูดความชื้น (silica gel) เครื่องอิเล็คโทรโฟลิซีส เครื่องพีซีอาร์ และอุปกรณ์ในการสกัดและวิเคราะห์หาดีเอ็นเอของพืช

1.5 อุปกรณ์สำนักงานและเครื่องเขียน

1.6 เอกสารทางวิชาการที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ คู่มือพรรณไม้ (Manual) ตำราพรรณพฤกษชาติ (Flora) เอกสารเฉพาะเรื่อง (Monograph) และตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง (Herbarium specimens)

2. วิธีการศึกษา

2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1. ศึกษาเอกสาร งานวิจัย และตัวอย่างพรรณไม้แห้งของกลอยและกลอยเขาที่พบในประเทศไทย ที่เก็บรักษาไว้ ณ พิพิธภัณฑ์พืชต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในสำรวจ เก็บตัวอย่าง และจำแนกชนิดในขั้นตอนต่อไป

2. สำรวจและเก็บตัวอย่างของตัวอย่างกลอยและกลอยเขาที่พบในพื้นที่ป่าธรรมชาติในท้องที่จังหวัดพิษณุโลก อุตรดิตถ์ และใกล้เคียงตามลักษณะนิเวศวิทยาที่พบกลอยและกลอยเขาเจริญอยู่ อย่างน้อย 1 ครั้งต่อเดือน (ความถี่จะมากขึ้นเมื่อถึงช่วงการออกดอกของพืช) โดยเก็บตัวอย่างของพืชที่มีทั้งใบ ดอก ผล และเมล็ด พร้อมทั้งส่วนของหัวใต้ดิน เพื่อนำมาประกอบในการระบุชนิด ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุลต่อไป

3. ถ่ายภาพ ลักษณะของใบ ดอก ผล และเมล็ด ตลอดจนหัวใต้ดินของพืช พร้อมทั้งจดบันทึกลักษณะต่างๆ ที่อาจสูญเสียไปในขณะเก็บรักษา เช่น สีของใบ ดอก และผล เป็นต้น

4. นำตัวอย่างพืชที่มีใบ ดอกและผล มาจัดทำพรรณไม้แห้ง (dried specimens) โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 – 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง หรือจนกว่าตัวอย่างจะแห้งสนิท (สำหรับส่วนของดอกหรือผลที่อาจเสียรูปร่างได้ง่าย จะนำไปดองไว้ในเอทานอล 70%) เมื่อตัวอย่างพรรณไม้แห้งสนิทแล้ว จะนำไปเย็บติดกับกระดาษแข็ง พร้อมทำป้ายบันทึกประจำตัว (label) เพื่อลงทะเบียนและเก็บเข้าพิพิธภัณฑ์พืชต่อไป

5. ระบุชนิด หาชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของพืช โดยพิจารณาจากรูปวิธาน (key) จากเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พร้อมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชต่างๆ

6. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชอย่างละเอียดทั้งรูปร่าง โครงสร้างและขนาดของส่วนต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งดอกและผล เพื่อใช้เป็นหลักฐานเปรียบเทียบทั้งทางด้านการบรรยาย (descriptive characters) และทางสถิติ (statistic characters)

2.2 การศึกษาทางด้านชีวโมเลกุล

1) <u>การเก็บตัวอย่างกลอย</u>

1.1 เก็บตัวอย่างใบกลอยและกลอยเขา รวม 9 ตัวอย่าง โดยเก็บใบอ่อนใส่ถุงซิบล็อคที่บรรจุ silica gel รวมถึง เก็บตัวอย่างส่วนอื่นๆ มาเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วย และทำเป็น voucher species เพื่อการอ้างอิงต่อไป และใช้ลำดับดีเอ็นเอจากพืชในสกุล *Dioscorea* จาก GeneBank จำนวน 6 ตัวอย่าง เพื่อเป็น outgroups (ตารางที่ 2)

1.2 นำตัวอย่างใบสดของพืช มาทำให้แห้งโดยใช้สารดูดความชื้น (silica gel) ตัวอย่างละ 3 – 5 ใบ มาทำการสกัดดีเอ็นเอ จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างกลอย 3 ตัวอย่าง กลอยเขา 6 ตัวอย่าง และมันคันขาว (*D. pentaphylla* L.) 1 ตัวอย่าง ด้วยวิธีดัดแปลงจากวิธี CTAB Method ของ Agrawal *et al.* (1992) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbc*L บางส่วนด้วย universal primer โดยใช้ rbcL1F (5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC-3') เป็น forward primer และใช้ rbcL724R (5'-CAT GTA CCT GCA GTA GC-3') เป็น reverse primer (Fay *et al.*, 1997) แล้วตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ความเข้มข้นเจล 1% กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เมื่อได้ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (USA) และนำไปหาลำดับดีเอ็นเอโดยใช้ทั้ง forward และ reverse primers ของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

1.3. เมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอแล้วนำมาตรวจสอบด้วยการเทียบกับลำดับดีเอ็นเอที่มีในฐานข้อมูล Genebank ของ NCBI (Basic Local Alignment Search Tool: BLAST) และเมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และถูกต้องทั้ง 10 ตัวอย่างแล้ว นำมาจัดเรียงทุกตัวอย่างในแต่ละบริเวณ (alignment) โดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6.002 (Nicholas and Nicholas, 1997) และ ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยการวิเคราะห์ Maximum Likelihood ใช้ Tamura-Nei model และวิเคราะห์ค่า Bootstrap ที่ 1,000 ซ้ำ ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นจาก phylogenetic tree ที่ได้ โดยใช้ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอจากพืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกันจากฐานข้อมูล Genebank (NCBI) เพื่อใช้เป็น outgroups และข้อมูลลำดับดีเอ็นเอเปรียบเทียบจำนวน 6 ตัวอย่างคือ *D. pentaphylla* (AF307470.1), *D. arachidna* (AF307468.1), *D. bulbifera* (D28327), *D. antaly* (gbAY66710), *D. dumentorum* (gbAF30 7464) และ *D. hispida* (AF307463.1)

2) <u>การสกัดสารดีเอ็นเอจากใบ</u>

การสกัดดีเอ็นเอจากใบกลอยด้วยวิธี Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) Method ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Agrawal *et al.* (1992) โดยมีวิธีการดังนี้

<u>ตารางที่ 2</u> ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

Voucher specimens	Locality / GeneBank no.
D. hispida var. *hispida* 1.1	อุตรดิตถ์
D. hispida var. *hispida* 1.2	อุตรดิตถ์
D. hispida var. *hispida* 2.1	อุตรดิตถ์
D. hispida var. *neocaphoides* 1.1	อุตรดิตถ์
D. hispida var. *neocaphoides* 1.2	อุตรดิตถ์
D. hispida var. *neocaphoides* 1.3	อุตรดิตถ์
D. hispida var. *neocaphoides* 1.4	อุตรดิตถ์
D. hispida var. *neocaphoides* 2.1	อุตรดิตถ์
D. hispida var. *neocaphoides* 2.2	อุตรดิตถ์
D. antaly	gbAY667100
D. archidna	AF307468.1
D. bulbifera	D.28327
D. dumetorum	gbAF307464
D. hispida	AF307463.1
D. pentaphylla	AF307470.1

1. ทำการชั่งตัวอย่างใบ 50 มิลลิกรัม แล้วนำมาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว แล้วใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มี 1X CTAB buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และ β-mercaptoethanol 10 ไมโครลิตร

2. บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที ผสมโดยกลับหลอดไปมาทุกๆ 10 นาที

3. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

4. เติม chloroform ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนโปรตีน ผสมโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ 2 – 3 ครั้ง

5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสด้านบนใส่ microcentrifuge หลอดใหม่

6. นำสารละลายที่ได้มาเติม RNase A ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ

7. จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอดไปมา 2 – 3 ครั้ง แล้วนำกลับไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที

8. ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ทำซ้ำตามข้อ 7 อีก 1 รอบ

9. จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาเติม sodium acetate ปริมาตร 1/10 ของสารละลายที่มีอยู่ แล้วเติม absolute ethanol 2 เท่า ของสารละลายที่มีอยู่ เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วผสมให้เข้ากัน

10. บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

11. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนไว้

12. ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้ตะกอนหลุด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 รอบ

13. ทิ้งตะกอนให้แห้งในอากาศ แล้วเติม TE buffer ปริมาตร 30 – 50 ไมโครลิตร

14. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งานต่อไป

3) การตรวจสอบปริมาณ และการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส

1. เตรียมถาดสำหรับเทเจลและหวีให้เรียบร้อย

2. ชั่งผงอะกาโรส 0.8 กรัม ในขวดรูปชมพู่แล้วเติม 1X TAE buffer 100 มิลลิลิตร

3. ละลายอะกาโรสโดยใช้ microwave เขย่าเป็นครั้งคราวให้อะกาโรสละลาย วางทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้

4. เมื่ออะกาโรสแข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึงหวีออก จะได้หลุมสำหรับใส่ตัวอย่างดีเอ็นเอ แล้วนำไปวางในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟลิซิส

5. เท 1X TAE buffer ลงไป ให้สูงกว่าผิวอะกาโรสเล็กน้อย

6. ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับ loading dye แล้วหยอดลงในหลุม (well)

7. เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟ (power supply) ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าสี bromophenol blue จะเคลื่อนห่างจากจุดเริ่มต้นพอสมควร

8. นำอะกาโรสมาย้อมโดยแช่ในสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 5 – 10 นาที แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่องฉายแสงอัลตราไวโอเลต (UV transilluminator)

4) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbc*L ด้วยไพรเมอร์ที่มีลำดับดีเอ็นเอตามตาราง 2 โดยส่วนประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ตามตาราง 3 และสภาวะตามตาราง 4 จากนั้นนำมาตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟลิซิสที่มีความเข้มข้นของอะกาโรสเจล 1% ในกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ต่อไป

ตารางที่ 3 ลักษณะลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แต่ละตำแหน่ง

ไพร์เมอร์	ตำแหน่ง	ลักษณะดีเอ็นเอ
rbcL1F	Forward primer	5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAA ACT AAA GC-3'
rbcL724R	Reverse primer	5'-CAT GTA CCT GCA GTA GC-3'

5) การทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์

เมื่อได้ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว นำมาทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยใช้ RBC Bioscience จากนั้นนำไปหาลำดับดีเอ็นเอหรือศึกษาตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป โดยมีขั้นตอนตามวิธีมาตรฐานดังนี้

1. นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีสโดยใช้ 1X TAE buffer ที่เตรียมใหม่

2. นำเจลไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเต เพื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ แล้วทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าไว้แล้ว

3. จากนั้นนำหลอด microcentrifuge ที่มีชิ้นเจลไปชั่งน้ำหนักอีกครั้งเพื่อหาน้ำหนักของเจล ถ้าตัวอย่างใดที่ปรากฏแถบเดียว สามารถทำให้บริสุทธิ์จากสารละลายได้เลย โดยเริ่มที่ขั้นตอนที่ 4

4. เติม DF buffer 10 ไมโครลิตร/10 มิลลิกรัมของเจลที่ตัดได้ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด หรือ 5 เท่าของสารละลายที่มี

5. นำ DF column ใส่ใน collection tube แล้วเติมสารละลายเจลที่ได้ลงไปใน DF column ดังกล่าว จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอจับกับ membrane

6. จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารใน collection tube ทิ้ง

7. เติม Wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทสารใน collection tube ทิ้ง

8. เติม Wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ซ้ำ เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอให้สะอาด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทสารที่อยู่ใน collection tube ทิ้ง

9. นำไปปั่นเหวี่ยงอีก 1 นาที เพื่อให้สารละลายที่ใช้ในการล้างตะกอนหมดไปจากตะกอนดีเอ็นเอที่เมมเบรน จากนั้นย้าย DF column ใส่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

10. จากนั้นเติม Elution buffer ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร ใส่ตรงกลาง DF column บนแผ่นเมมเบรนพอดี เพื่อละลายดีเอ็นเอ

11. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดและความเข้มข้นด้วยวิธีอะกาโรสอิเล็กโตรโฟริซีส

6) การหาลำดับดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ข้อมูล

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้และทำให้บริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับดีเอ็นเอโดยใช้ forward และ reverse primers เมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และถูกต้องทุกตัวอย่างแล้ว นำมาจัดเรียงทุกตัวอย่างในแต่ละบริเวณ (alignment) โดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6.002 (Nicholas and Nicholas, 1997) และ ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011) และวิเคราะห์ร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยาเพื่อเปรียบเทียบ phylogenetic tree ที่มีความเหมาะสมมากที่สุด

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ความเข้มข้นของสาร	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
5X Go Taq buffer	10	1X
25 mM mgcl2	3	1.5 mM
10 mMdNTPs	1	0.2 mM
10 mM Forward primer	1	0.2 mM
10 mM Reverse primer	1	0.2 mM
5 U/µl Go Taq DNA Polymerase	0.2	1 U/µl
DNA template	1	50 – 100 ng
Distill water	32.8	
Total	50	

ตารางที่ 5 อุณหภูมิและเวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Pre-denaturation	94	3	1
Denaturation	94	0.45	35
Annealing	56 – 58	0.30	
Extension	72	1.5	
Final extension	72	5	1

7) การหาแผนที่เอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้และทำให้บริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับดีเอ็นเอโดยใช้ forward และ reverse primers และเมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และถูกต้องทุกตัวอย่างแล้วนำมาจัดเรียงทุกตัวอย่างในแต่ละบริเวณ (alignment) โดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6.002 (Nicholas and Nicholas, 1997) และ ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) และนำลำดับดีเอ็นเอดังกล่าวมาตรวจสอบบริเวณตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรม NEB cutterV.20 (TamasVincze and Roberts, 2003) และสร้างแผนที่ที่แสดงจุดตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะในแต่ละตัวอย่าง

3. สถานที่ทำการศึกษาวิจัย

ห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยชีววิทยาทางพืช ห้องปฏิบัติการหน่วยวิจัยพันธุศาสตร์และโมเลกุล **ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ฯ มหาวิทยาลัยนเรศวร**

บทที่ 4
ผลการศึกษา

การศึกษาสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบและหลักฐานทางชีวโมเลกุลระหว่างกลอยและกลอยเขา ได้ผลการศึกษา ดังมีรายละเอียดดังนี้

1. การศึกษาสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบ

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบระหว่างกลอยและกลอยเขา พบว่ามีลักษณะแตกต่างกันหลายประการ (ตารางที่ 1) ทั้งส่วนของหัวใต้ดิน ลำต้น ใบ ดอกและช่อดอกตลอดจนผลและเมล็ด โดยมีรายละเอียดดังนี้

1.1. **หัวใต้ดิน** (tuber) กลอยมีการเจริญในลักษณะเป็นกลุ่ม (cluster) ประมาณ 3 – 5 หัวต่อต้น โดยขนาดของหัวผันแปรไปตามอายุและความสมบูรณ์ของพืช รูปร่างของหัวโดยทั่วไปมีรูปไข่ กลม หรือพองออกตอนปลายคล้ายกระบอง (ภาพที่ 3) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 6 – 20 เซนติเมตร ยาว 9 – 25 เซนติเมตร ต่างจากหัวใต้ดินของกลอยเขาที่จะเกิดเพียงหัวเดี่ยวๆ รูปทรงกระบอก ปลายมน หรือรูปไข่ (ภาพที่ 3) เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2 – 3 เซนติเมตร ยาว 4 – 6 เซนติเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าหัวของกลอยจะการสะสมอาหารเพิ่มเติมทุกปี (perennially replacement) ทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ ต่างจากหัวของกลอยเขาที่จะเกิดหัวใหม่แทนหัวเก่าในทุกๆปี (annually replacement) โดยหัวเก่าจะย่อยสลายไปเมื่อลำต้นของฤดูกาลใหม่แตกหน่อขึ้นมาแล้ว ไม่สามารถมีอายุของหัวข้ามปีได้ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาขนาดของหัวใต้ดินเปรียบเทียบระหว่างกลอยและกลอยเขา พบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 6)

ภาพที่ 3 หัวใต้ดินของกลอย (ก) และกลอยเขา (ข)

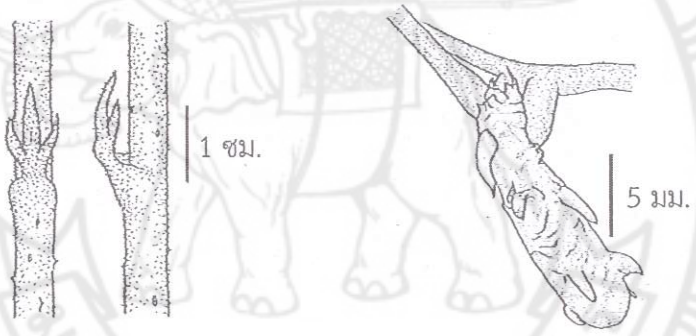
1.2. **ลำต้น** (stem) ภายหลังจากที่พักตัวในฤดูกาลที่ไม่เหมาะสม ลำต้นของกลอยจะมีการเจริญและแตกหน่อออกมาจากหัวใต้ดินอีกครั้งหนึ่ง (ภาพที่ 4) โดยมีขนาดของลำต้นที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 7) ช่วงเวลาที่ลำต้นของกลอยแตกหน่อขึ้นมานั้น พบตั้งแต่ปลายเดือนกุมภาพันธ์หรือมีนาคม แล้วมีการเจริญของช่อดอกตามมาทันทีก่อนที่ใบจะเจริญเต็มที่ โดยช่อดอกที่เกิดใน

ตารางที่ 6 สัณฐานวิทยาเปรียบเทียบระหว่างกลอย (*Dioscorea hispida* Dennst. var. *hispida*) และกลอยเขา (*D. hispida* Dennst. var. *neoscaphoides* Prain Burkill)

Characteristics	var. *hispida*	var. *neoscaphoides*
1. Tubers		
1.1 number	cluster (3 – 5 per plant) perennial	solitary (only 1 per plant)
1.2 replacement	9 – 25 cm across	annual
1.3 mature size	6 – 20 cm long	2 – 3 cm across
		4 – 6 cm long
2. Stems		
2.1 diameter	5 – 10 mm	2.5 – 3 mm
2.2 spine	all parts especially toward stem base	almost unarm but often on immature stem
3. Leaves		
3.1 terminal leaflet	4 – 15 cm X 8 – 25 cm	2 – 5 X 5 – 13 cm
3.2 blade texture	tuff	Slightly translucent
3.3 petiole length	6.5 – 25 cm	3 – 5 cm
4. Bulbils	absent (occasionally present when stem touched the soil)	abundant (clavate shaped, 5 – 10 mm x 15 – 25 mm)
5. Male Inflorescences		
5.1 total length	4 – 17 cm	2 – 7 cm
4.2 partial inflorescences		
1) Length	20 – 80 mm	5 – 10 mm
2) axis shaped	terete	clavate
5.3 flower diameter	0.3 – 2 mm	1 mm
5.4 outer tepal length	0.6 – 1.2 mm	0.7 – 1.2 mm
5.5 floral shaped at opened	Ovoid	Conical
6. Female inflorescences		
6.1 total length	8 – 10 cm	5 – 23 mm
6.2 flower diameter	2 – 2.5 mm	1 – 2 mm
6.3 outer tepal length	0.7 – 1 mm	0.4 – 0.8 mm
6.4 ovary wide	2 – 3 mm	1.5 – 3 mm
6.5 ovary length	2.5 – 4.5 mm	3 – 6 mm
6.6 flower position	Cluster at the tip of axis	Alternated along the axis
7. Capsules		
7.1 wide	20 – 30 mm	20 – 25 mm
7.2 length	40 – 52 mm	25 – 30 mm
8. Seeds		
9.1 seed length	6 – 13 mm	5 – 7 mm
9.2 seed wing length	8 – 12 mm	
10. Flowering period	March – May	August – November

ระยะแรกนี้ ทั้งหมดจะเป็นดอกเพศผู้ทั้งสิ้น ส่วนลำต้นที่เกิดดอกเพศเมียจะเริ่มพบได้ประมาณเดือนเมษายนเป็นต้นไปจนถึงประมาณเดือนกรกฎาคม ตรงกันข้ามกับกลอยเขาที่พบว่าเริ่มมีการแตกหน่อเกิดลำต้นใหม่ออกมา ในช่วงต้นฤดูฝนประมาณเดือนพฤษภาคม โดยมีการเจริญของทั้งลำต้นและใบไปพร้อมๆกัน เมื่อลำต้นและใบมีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้วกลอยเขาจึงจะมีการออกดอกในช่วงเดือนสิงหาคมไปจนถึงเดือนธันวาคม

การที่ระยะเวลาในการออกดอกของกลอยทั้งสองสายพันธุ์แตกต่างกันนี้ สืบเนื่องมาจาก กลอยมีหัวใต้ดินขนาดใหญ่ มีอาหารสะสมอยู่จำนวนมาก ทำให้สามารถสร้างดอกได้ในทันทีที่ลำต้นเจริญออกมา ไม่ต้องรอใบชุดใหม่ที่จะเจริญมาภายหลัง นอกจากนี้ในช่วงระยะเวลาดังกล่าว พันธุ์ไม้ยืนต้นในป่าที่กลอยเจริญอยู่ส่วนใหญ่ยังอยู่ในช่วงผลัดใบ สภาพป่าโดยทั่วไปค่อนข้างเปิดโล่ง ทำให้สื่อผสมเกสรต่างๆ สามารถเข้าถึงดอกกลอยที่มีขนาดเล็กได้ง่ายขึ้น ต่างจากกลอยเขาที่มีขนาดของลำต้นขนาดเล็ก จึงต้องรอให้พันธุ์ๆไม้อื่นๆเจริญขึ้นมาเสียก่อน เพื่อที่จะได้อาศัยเลื้อยพันขึ้นไปได้ง่าย อีกประการหนึ่งที่สำคัญก็คือ หัวของกลอยเขามีขนาดค่อนข้างเล็กและเกิดเป็นหัวเดี่ยว จึงไม่มีอาหารสะสมไว้มากพอที่จะออกดอกได้ทันทีหลังจากแตกหน่อขึ้นมาใหม่ ต้องรอให้ใบชุดใหม่ทำการสังเคราะห์แสงสร้างอาหารให้เพียงพอก่อน พร้อมๆกับการสร้างหัวใหม่ขึ้นแทนหัวเก่าที่จะสลายไป จากนั้นจึงจะมีการออกดอกต่อไป



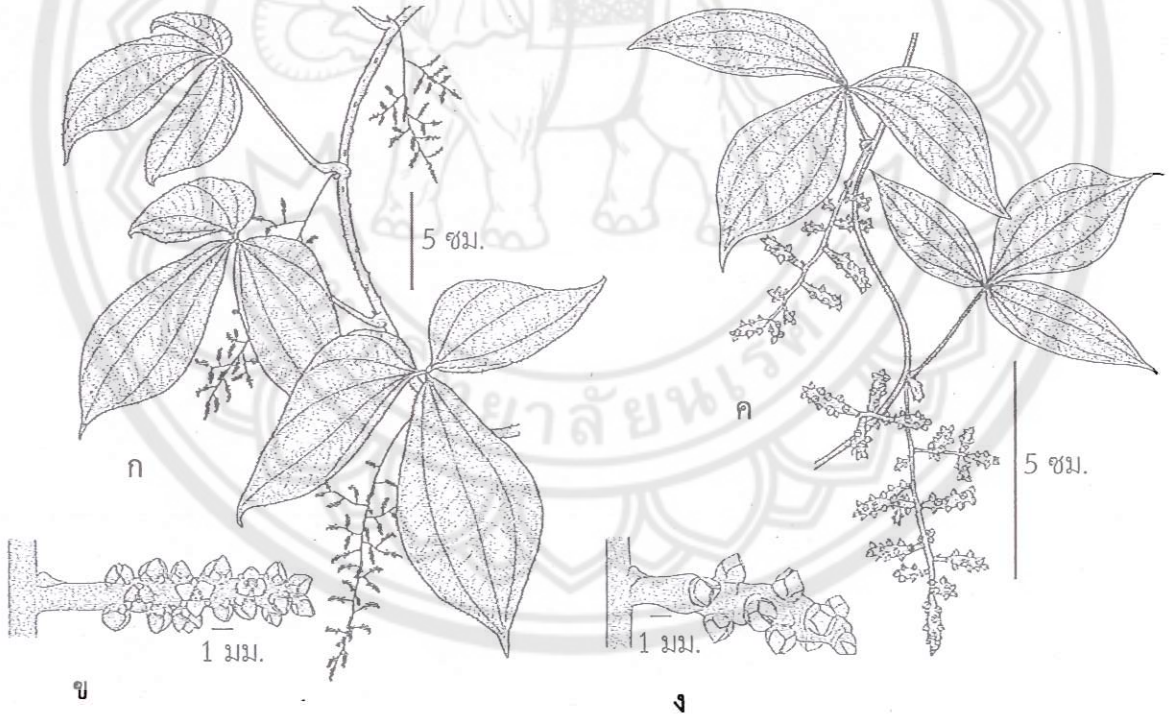
ภาพที่ 4 ลำต้น สิ่งปกคลุม และหัวอากาศ; ก. กลอย, ข. หัวอากาศของกลอยเขา

1.3 **ใบ** (leaf) พบว่าใบของกลอยทั้งสองสายพันธุ์นั้น มีขนาดที่แตกต่างกันอย่างมาก ใบของกลอยเขาเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว จะมีขนาดความกว้างไม่เกิน 5 เซนติเมตร ต่างจากกลอยที่มีขนาดใบกว้างได้ถึง 15 เซนติเมตร เช่นเดียวกับความยาวของก้านใบ (ตารางที่ 6) ที่มีความยาวแตกต่างกันมาก โดยกลอยเขามีก้านใบยาวเพียง 3 – 5 เซนติเมตร ในขณะที่กลอยมีความยาวของก้านใบตั้งแต่ 6 เซนติเมตรขึ้นไป และมักมีหนามขนาดเล็กเกิดขึ้นบนก้านใบอีกด้วย ต่างจากก้านใบของกลอยเขาที่จะไม่พบหนามเกิดขึ้นเลย สอดคล้องกับการวิเคราะห์ทางสถิติ ที่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในขนาดความยาวของก้านใบและความยาวของใบย่อยกลาง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในขนาดความยาวของปลายใบ (ตารางที่ 7) ลักษณะของเนื้อใบพบว่าเนื้อใบของกลอยเขาค่อนข้างอวบหนา มีขนนุ่มปกคลุมบางๆ ส่วนเนื้อใบของกลอย ค่อนข้างเหนียวและมีขนแข็งขึ้นปกคลุมหนาแน่น

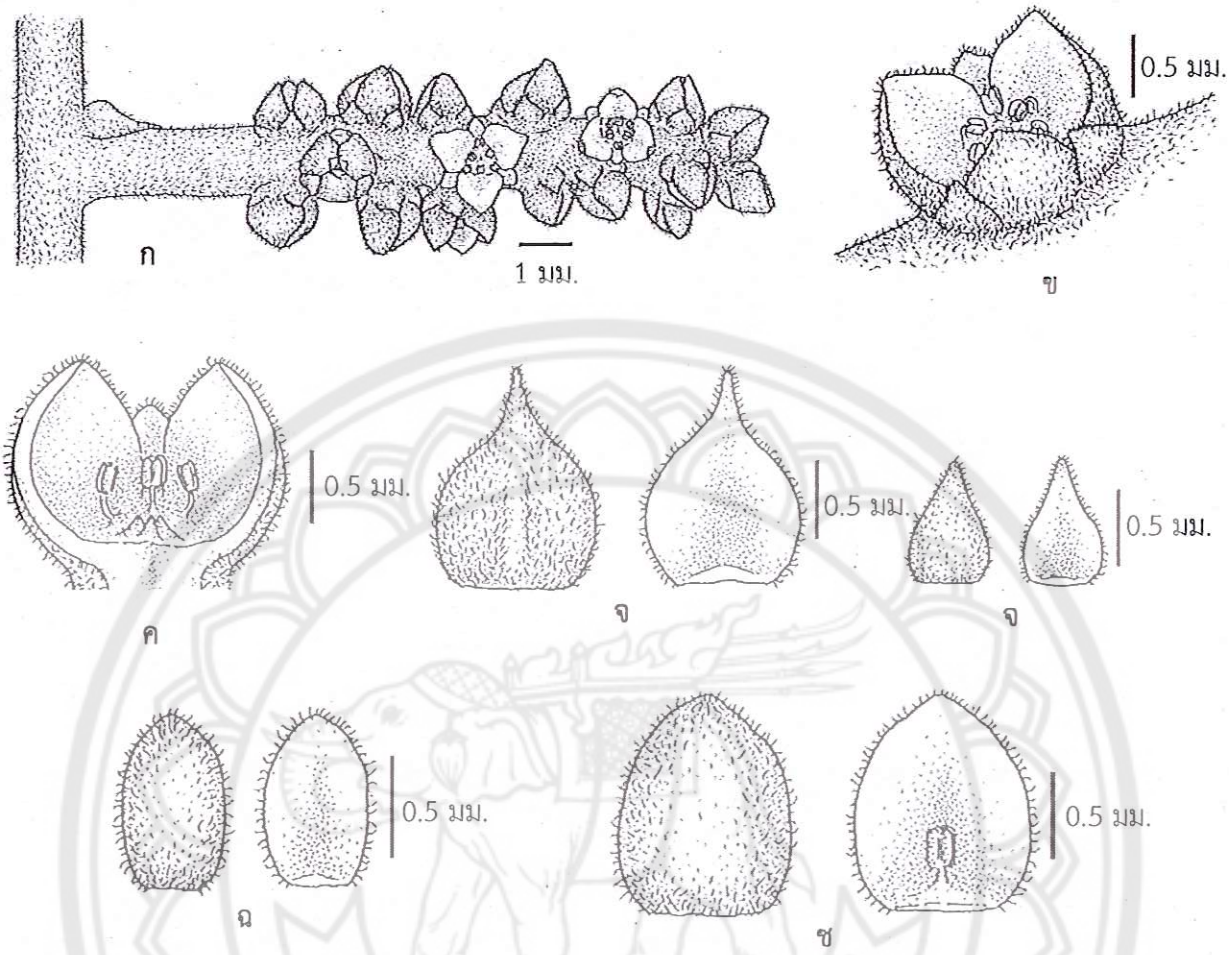
1.4 **หัวอากาศ** (bulbil) พบเป็นปกติบริเวณซอกใบในกลอยเขา (ภาพที่ 4) รูปร่างทรงกระบอกหรือรูปกระบอง เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 – 10 มิลลิเมตร ยาว 15 – 25 มิลลิเมตร เปลือกสีน้ำตาลแกมเทา ผิวนอกขรุขระเพราะว่ามีรากสั้นๆแทงโผล่ออกมา เปลือกในสีเขียว เนื้อในสีขาว นอกจากนี้ยังพบว่าใน

หัวอากาศที่อายุมากมักจะพบหน่ออ่อนและใบเกิดขึ้นอยู่ด้วย แม้ว่าหัวอากาศนั้นยังคงติดอยู่ภายในซอกใบก็ตาม ส่วนหัวอากาศของกลอยนั้นไม่พบเกิดขึ้นเลยในตัวอย่างที่เก็บมาศึกษา แต่จากการตรวจตัวอย่างพรรณไม้แห้ง (herbarium specimen) ที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติภูพาน (Wilkin *et al.*, 1016) เก็บรักษาไว้ที่หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช พบว่ามีหัวอากาศเกิดขึ้นเพียงตัวอย่างเดียวเท่านั้น ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดขึ้นในกรณีที่ลำต้นของกลอยทอดเลื้อยไปตามพื้นดินที่มีความชื้นค่อนข้างสูง (Thapyai, 2004)

1.5 ดอกและช่อดอกเพศผู้ (male flower and inflorescence) พบเกิดเป็นช่อแยกแขนง (compound spike) ขนาดใหญ่ในกลอยทั่วไป มีความยาวทั้งหมด 4 – 17 เซนติเมตร ช่อดอกย่อยยาว 20 – 80 มิลลิเมตร ต่างจากช่อดอกของกลอยเขาพบที่ว่า ส่วนมากเกิดเป็นช่อสั้นๆ พบบ้างที่มีการแตกแขนง มีความยาวทั้งหมดเพียง 2 – 7 เซนติเมตร ช่อดอกย่อยยาว 5 – 10 มิลลิเมตร ส่วนขนาดของดอกเพศผู้ในกลอยทั้งสองสายพันธุ์นั้น พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกันมาก แต่รูปร่างของแกนช่อดอกย่อย (axis) มีลักษณะที่ค่อนข้างแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด กล่าวคือ แกนช่อดอกย่อยของกลอยจะมีรูปทรงกระบอก มีดอกย่อยเรียงตัวหนาแน่นตลอดความยาว (ภาพที่ 5ข) ต่างจากกลอยเขาที่แกนช่อดอกย่อยมีรูปร่างคล้ายกระบองและมีดอกย่อยเรียงตัวอยู่ห่างๆกัน (ภาพที่ 5ง) กลีบรวมดอกกลอยรูปขอบขนานแกมรูปไข่ (ภาพที่ 6) กลีบรวมกลอยเขารูปไข่ถึงไข่กว้าง (ภาพที่ 7) เมื่อพิจารณาขนาดพบว่า ทั้งขนาดความยาวของก้านช่อดอกย่อย



ภาพที่ 5 ลำต้น ใบ และช่อดอกเพศผู้
ก – ข. กลอย (var. *hispida*)
ค – ง กลอยเขา (var *neoscaphoides*)



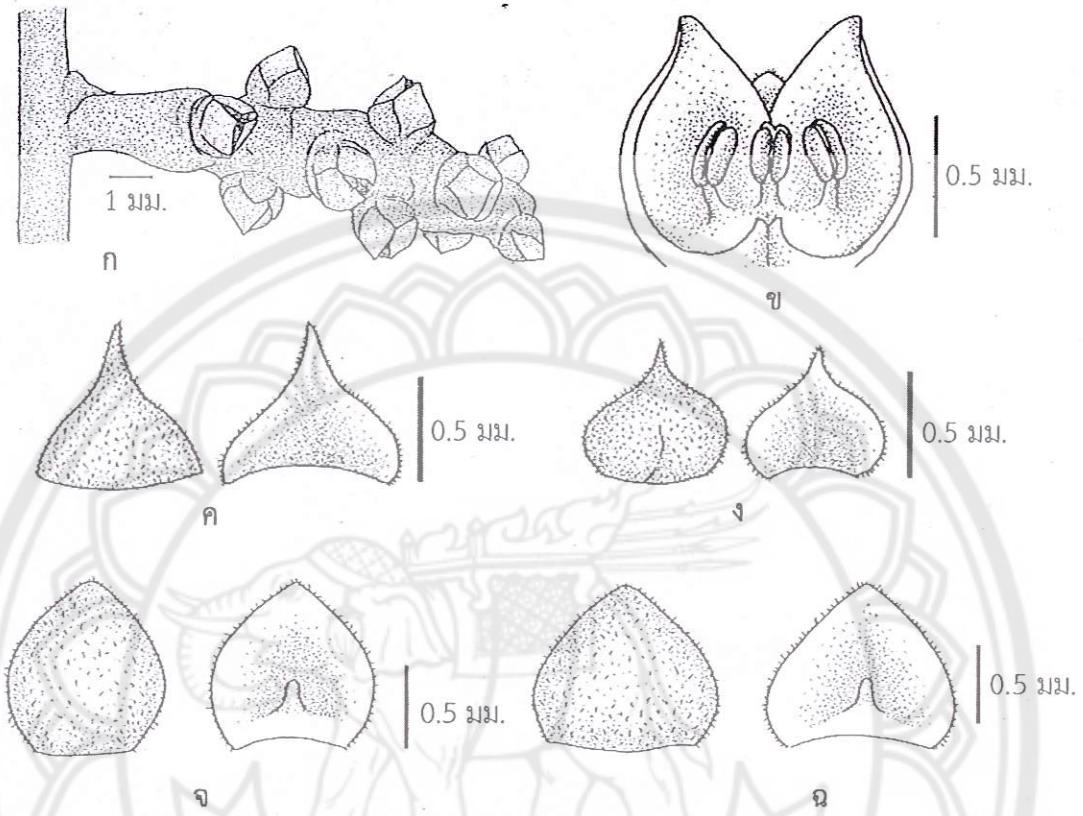
ภาพที่ 6 ช่อดอกและส่วนประกอบของดอกเพศผู้กลอย (*Dioscorea hispida* Dennst. var. *hispida*)
ก. ช่อดอกย่อย (partial inflorescence) ข. ดอกย่อยด้านข้าง ค. ดอกย่อยตัดตามยาว
ง. กลีบประดับ จ. กลีบประดับรอง ฉ. กลีบรวมชั้นนอก ช. กลีบรวมชั้นใน

ตารางที่ 7 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโครงสร้างทางด้านการเจริญเติบโต (vegetative parts) ระหว่างกลอยและกลอยเขา (ที่ $\alpha = 0.05$)

variety	Vegetative Characters											
	TP[1] (tubers)		TD[1] (mm)		SD[2] (mm)		PL[2] (cm)		TLL[1] (cm)		LTL[1] (mm)	
	$\bar{X}$	S.D.	$\bar{X}$	S.D.	$\bar{X}$	S.D.	$\bar{X}$	S.D.	$\bar{X}$	S.D.	$\bar{X}$	S.D.
hispida	4.2	1.75	16.10	6.05	6.13	1.93	17.65	5.21	15.38	5.67	13.38	5.21
neoscaphoides	1	0	3.31	1.21	2.32	0.71	6.69	2.42	7.40	1.51	14.85	4.29
t-score	8.25*		6.55*		11.73*		12.24*		8.60*		1.38	

หมายเหตุ: TP = number of tuber per plant; TD = tuber diameter; SD = stem diameter; PL = petiole length; TLL = terminal leaflet length; LTL = length of terminal leaflet tip; [1] n = 20; [2] n = 40

เส้นผ่านศูนย์กลางดอกบาน ตลอดจนขนาดความยาวของกลีบรวมชั้นนอก กลีบรวมชั้นใน กลีบประดับและกลีบประดับย่อย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งหมด (ตารางที่ 8)



ภาพที่ 7 ช่อดอกและส่วนประกอบของดอกเพศผู้กลอยเขา (*Dioscorea hispida* Dennst. var. *neoscaphoides* Prain & Burkill): ก. ช่อดอกย่อย (partial inflorescence) ข. ดอกย่อยด้านข้าง ค. ดอกย่อยตัดตามยาว ง. กลีบประดับ จ. กลีบประดับรอง ฉ. กลีบรวมชั้นนอก ช. กลีบรวมชั้นใน

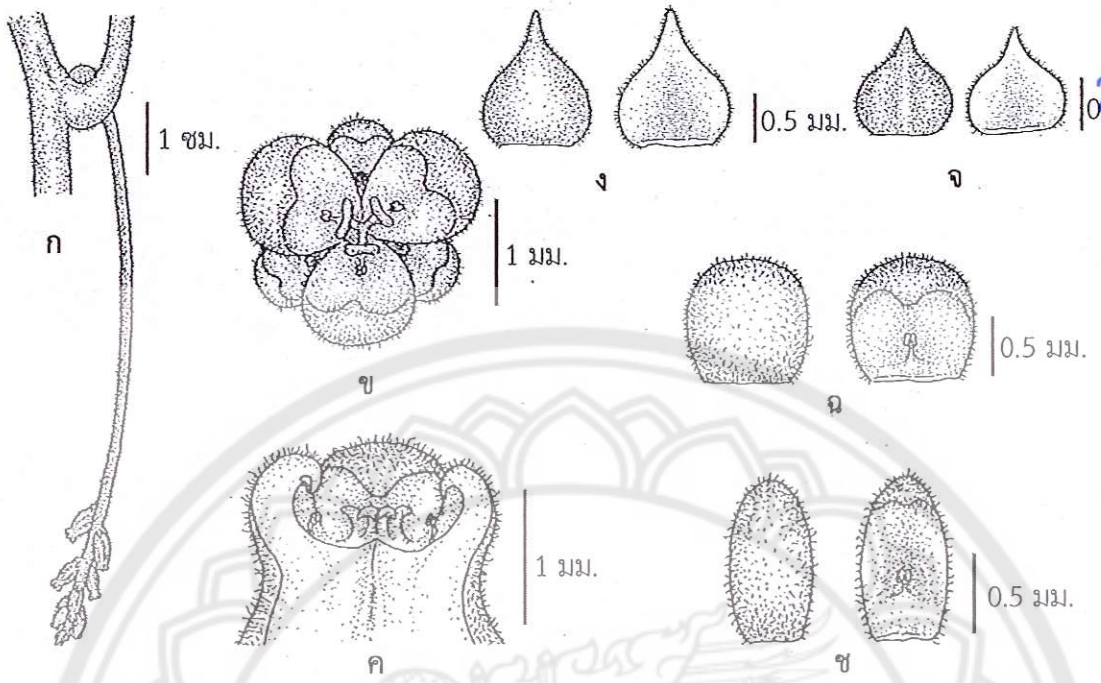
ตารางที่ 8 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโครงสร้างทางด้านการสืบพันธุ์เพศผู้ (male reproductive parts) ระหว่างกลอยและกลอยเขา

variety	Male floral characters											
	PMA (mm)		FLD (mm)		OTL (mm)		ITL (mm)		FBL (mm)		BTL (mm)	
	$\overline{X}$	S.D.	$\overline{X}$	S.D.	$\overline{X}$	S.D.	$\overline{X}$	S.D.	$\overline{X}$	S.D.	$\overline{X}$	S.D.
hispida	14.64	3.58	1.73	0.36	0.72	0.10	1.13	0.20	1.03	0.19	0.72	0.12
neoscaphoides	7.22	2.57	1.21	0.07	0.96	0.10	1.23	0.11	1.38	0.25	0.82	0.08
t-score	10.65*		8.92*		10.32*		2.82*		7.20*		3.95*	

หมายเหตุ: PMA = partial male inflorescence axis length; FLD = floral diameter; OTL = outer tepal length; ITL = inner tepal length; FBL = floral bract length; BTL = bracteole length

ที่ 6910269

สำนักหอสมุด
25 มี.ค. 2559



ภาพที่ 8 ช่อดอกและส่วนประกอบของดอกเพศเมียกลอย (var. *hispida*)
ก. ช่อดอก ข. ดอกเพศเมีย เปิดกลีบรวมออกเพื่อแสดงยอดเกสรเพศเมียและเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน ค. ดอกเพศเมียตัดตามยาว (ไม่รวมส่วนรังไข่) ง. กลีบประดับ จ. กลีบประดับรอง ฉ – ช. กลีบรวมชั้นนอกและชั้นในตามลำดับ แสดงเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน

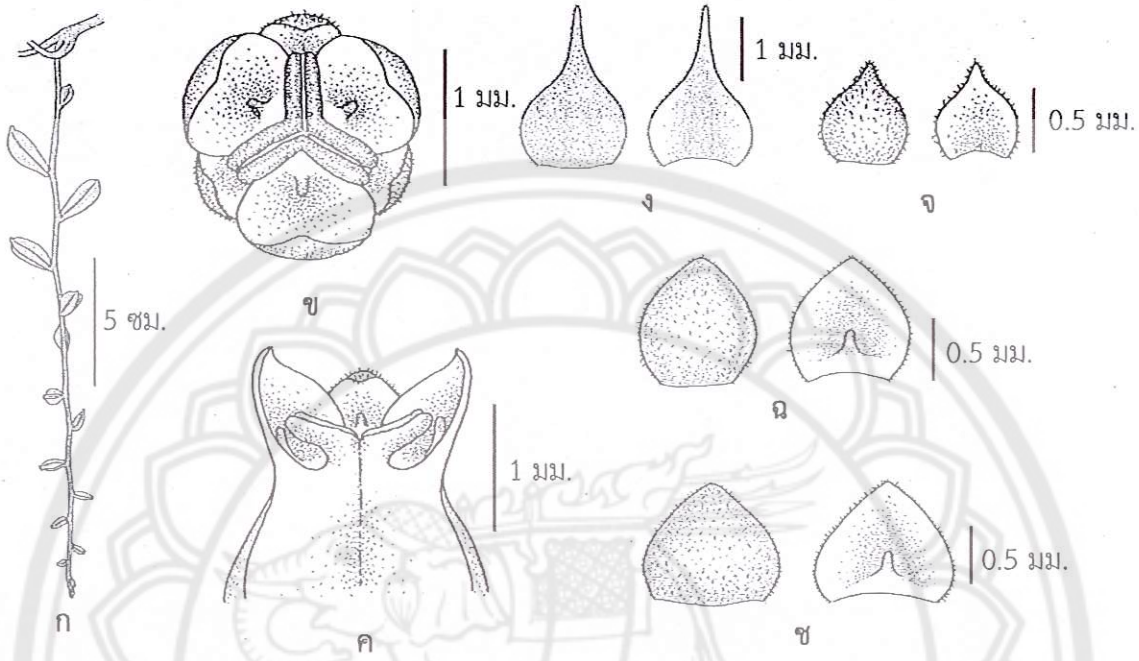
ตารางที่ 9 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโครงสร้างทางด้านการสืบพันธุ์เพศเมีย (female reproductive parts) ระหว่างกลอยและกลอยเขา

variety	Female floral & capsule characters													
	FLD (mm) n =14		OTL (mm) n = 18		ITL (mm) n = 18		FBL (mm) n = 6		BTL (mm) n = 5		CPL (mm) n = 20		CPW (mm) n = 20	
	$\overline{X}$	S.D.	$\overline{X}$	S.D.	$\overline{X}$	S.D.	$\overline{X}$	S.D.	$\overline{X}$	S.D.	$\overline{X}$	S.D.	$\overline{X}$	S.D.
hispida	2.65	0.26	0.85	0.08	0.90	0.12	2.15	0.41	1.26	0.18	48.2	8.88	26.8	4.52
neoscaphoides	1.56	0.27	0.98	0.21	1.01	0.26	2.39	0.50	1.27	0.25	37.4	3.59	22.3	2.22
t-score	10.74*		2.41*		1.67		0.06		0.06		5.09*		3.97*	

หมายเหตุ: FLD = floral diameter; OTL = outer tepal length; ITL = inner tepal length; FBL = floral bract length; BTL = bracteole length; CPL = capsule length; CPW = capsule wide (mm)

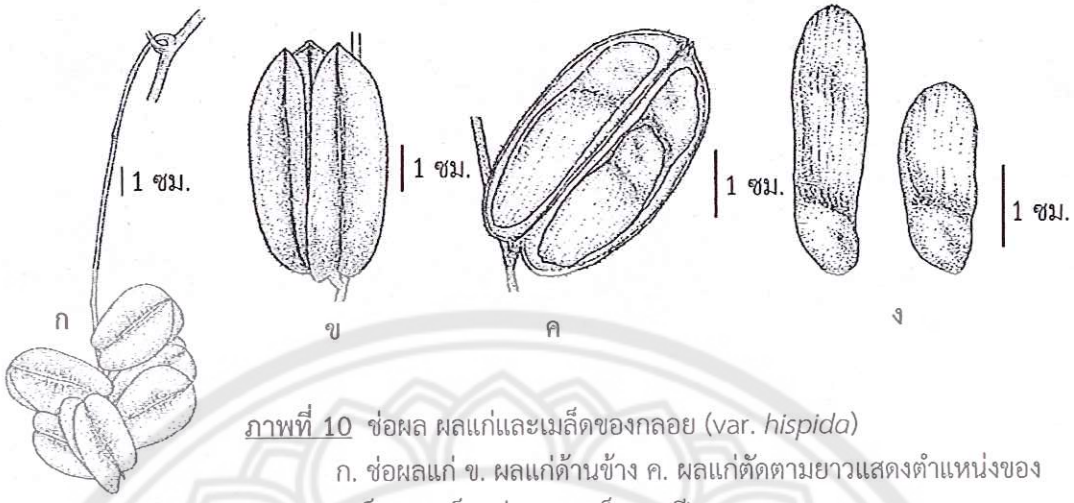
1.6 ดอกและช่อดอกเพศเมีย (female flower and inflorescence) พบเกิดเป็นช่อเชิงลด (spike) ไม่แยกแขนงทั้งสองสายพันธุ์ แต่ดอกย่อยของกลอยจะเกิดรวมกันอยู่เฉพาะตอนปลายช่อเท่านั้น (ภาพที่ 8ก) ต่างจากดอกย่อยของกลอยเขาที่ค่อนข้างกระจายอยู่ตลอดความยาวของก้านช่อ (ภาพที่ 9ก) ความแตกต่างทางสถิติที่พบ เกิดขึ้นในขนาดของดอกบานและความยาวของกลีบรวมชั้นนอกเท่านั้น ส่วน

ลักษณะอื่นๆ มีค่าไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 9) ส่วนความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาพบว่ากลีบรวมของกลอยมีลักษณะอวบหนา ปลายกลีบโค้งมนและงองุ้มเข้าหาใจกลางดอกอย่างชัดเจน (ภาพที่ 8ข, 8ค) ต่างจากกลีบรวมของกลอยเขาที่ค่อนข้างบาง ปลายกลีบแหลมและโค้งงุ้มเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 9ข, 9ค)

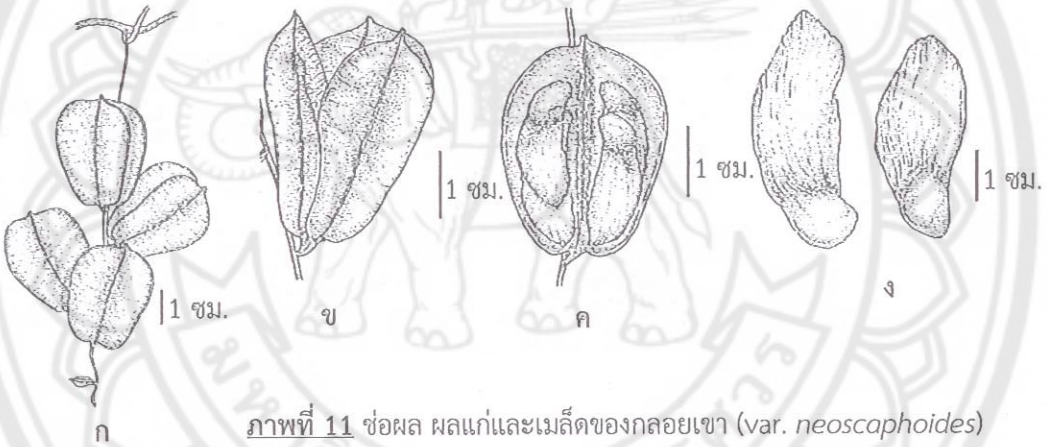


<u>ภาพที่ 9</u> ช่อดอกและส่วนประกอบของดอกเพศเมียกลอยเขา (var. *neoscaphoides*)
ก. ช่อดอก ข. ดอกเพศเมีย เปิดกลีบรวมเพื่อแสดงยอดเกสรเพศเมียและเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน ค. ดอกเพศเมียตัดตามยาว (ไม่รวมส่วนรังไข่) ง. กลีบประดับ จ. กลีบประดับรอง ฉ – ช. กลีบรวมชั้นนอกและชั้นในตามลำดับ แสดงเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน

1.7 ผลและเมล็ด (capsule and seed) ผลของกลอยทั้งสองสายพันธุ์จะแตกออกเมื่อแก่ตามตะเข็บทั้งสามด้านแบบ loculicidal capsule (ภาพที่ 10ข, 11ข) มีจำนวนเมล็ดตั้งแต่ 1 – 6 เมล็ด ความกว้างของผลมีขนาดใกล้เคียงกันระหว่าง 20 – 30 มิลลิเมตร แต่ขนาดความยาวผลของกลอยจะมากกว่าอย่างชัดเจนที่ขนาด 40 – 52 มิลลิเมตร ส่วนกลอยเขามีความยาวของผลเพียง 25 – 30 มิลลิเมตรเท่านั้น สอดคล้องกับการวิเคราะห์ทางสถิติ ที่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งขนาดและความยาวของผล (ตารางที่ 9) นอกจากนี้เนื้อผลสดของกลอยเขายังค่อนข้างบางและโปร่งแสงสามารถมองเห็นเมล็ดที่อยู่ภายในได้ชัดเจน ต่างจากเนื้อผลของกลอยที่หนาแข็งและทึบแสง



ภาพที่ 10 ช่อผล ผลแก่และเมล็ดของกลอย (var. *hispida*)
ก. ช่อผลแก่ ข. ผลแก่ด้านข้าง ค. ผลแก่ตัดตามยาวแสดงตำแหน่งของเมล็ด ง. เมล็ดแก่ แสดงเมล็ดและปีก



ภาพที่ 11 ช่อผล ผลแก่และเมล็ดของกลอยเขา (var. *neoscaphoides*)
ก. ช่อผลแก่ ข. ผลแก่ด้านข้าง ค. ผลแก่ตัดตามยาวแสดงตำแหน่งของเมล็ด ง. เมล็ดแก่ แสดงเมล็ดและปีก

2. การศึกษาหลักฐานทางดีเอ็นเอเปรียบเทียบ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส

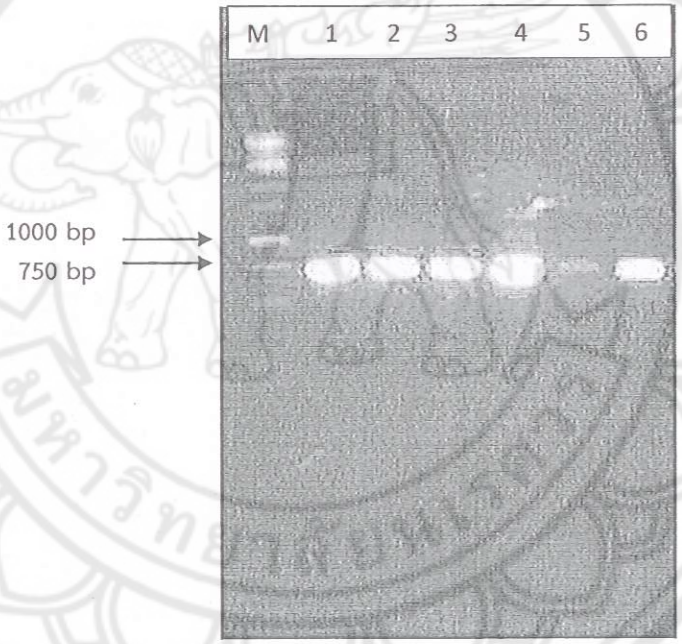
จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบกลอยพบว่าสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นสารละลายที่มีลักษณะใส ไม่มีสี และเมื่อนำสารละลายดีเอ็นเอดังกล่าว มาตรวจสอบโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดมากกว่า 10 กิโลเบส และบางตัวอย่างเป็นรอย smear ซึ่งเกิดจากการแตกหักของดีเอ็นเอที่เกิดจากการกลับหลอดที่รุนแรงเกินไปในขั้นตอนของการสกัดทำให้โปรตีนโดนดึงออกมาจากสายดีเอ็นเอแรงดีเอ็นเอจึงเกิดความเสียหายได้

2.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาทำการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์บริเวณยีน *rbc*L โดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ และใช้อุณหภูมิในขั้น annealing 56 – 58 องศาเซลเซียสขึ้นกับตัวอย่าง พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการได้ในปริมาณมากและชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณมีขนาด 700 คู่เบส ตรงตามตำแหน่งไพรเมอร์ที่เข้าจับ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเกิด non-specific band ขึ้นในบางตัวอย่างซึ่งอาจจะเกิดจากในการเพิ่มปริมาณยังไม่เหมาะสม อาจต้องลดแมกนีเซียมคอลไรด์หรือเพิ่มอุณหภูมิในช่วง annealing ให้เหมาะสมยิ่งขึ้น

2.3 การทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริสุทธิ์

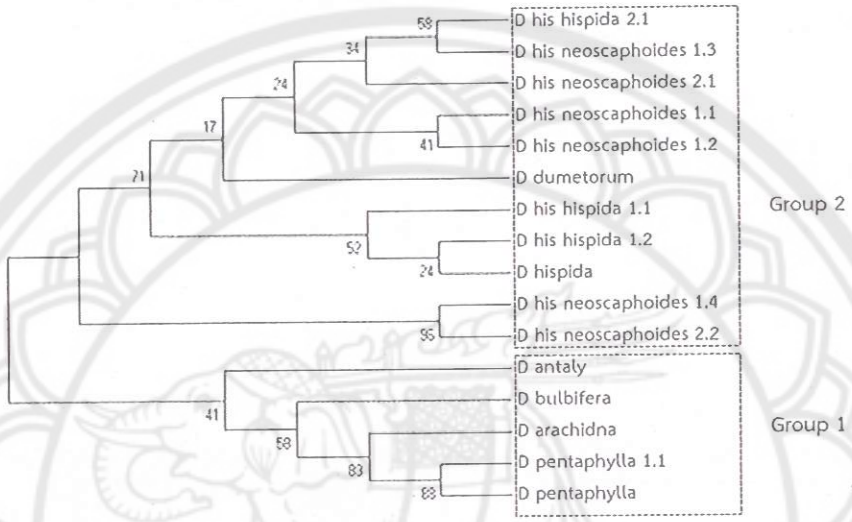
นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RBC Bioscience เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป หลังจากทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Fermentas) และดีเอ็นเอที่ได้บริสุทธิ์ขึ้น โดยเฉพาะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดมาจากเจลปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบเท่านั้น (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 ลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบริเวณยีน *rbc*L; โดย M คือ 1Kb ladder marker (Fermentas) 1 – 2 คือ var. *hispida* 1.1 และ 2.1 ตามลำดับ 3 – 6 คือ var. *neocephoides* 1.1, 1.2, 1.3 และ 1.4 ตามลำดับ

2.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

เมื่อนำลำดับดีเอ็นเอที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (BLAST) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *D. hispida* (AF307463.1) ทั้ง 9 ตัวอย่าง ในที่ *D. pentaphylla* ก็คล้ายคลึงกับในข้อมูลของ Genebank เช่นกัน และชุดข้อมูลที่ได้มาจัดเรียง (alignment) ด้วยมือทั้งหมด 9 ตัวอย่าง ที่พบว่ามีความยาว 644 คู่เบส โดยพบลำดับดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 101 ตำแหน่ง (indels) (15.68 %) และมีลำดับดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 543 ตำแหน่ง (84.32%) จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยประเมินจากค่า bootstrap support สามารถแบ่งกลอยออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (ภาพที่ 13)



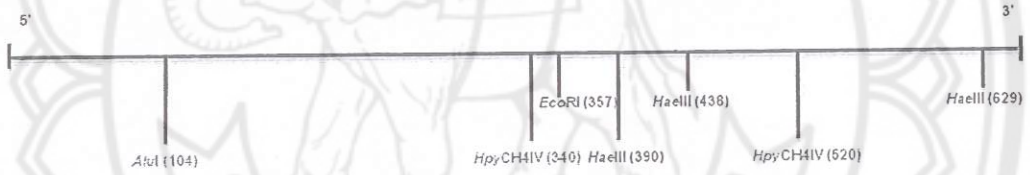
ภาพที่ 13 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้จากการวิเคราะห์ Maximum Likelihood ของลำดับดีเอ็นเอบริเวณยีน*rbc*L ในพืชสกุลกลอย (ตัวเลขหลังชื่อวิทยาศาสตร์หมายถึงหมายเลขตัวอย่าง (specimen number))

โดยกลุ่ม 1 ประกอบด้วย *Dioscorea* ชนิดอื่นๆ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *D. arachidna*, *D. bulbifera*, *D. antaly* และ *D. pentaphylla* ซึ่ง *D. pentaphylla* 1.1 ที่เก็บตัวอย่างมานั้นถือได้ว่าจัดจำแนกได้ถูกต้องเนื่องจากตัวอย่างอยู่ใกล้ชิดกัน มีค่า Bootstrap support สูง แต่อย่างไรก็ตามยังมีลำดับดีเอ็นเอที่แตกต่างกันบ้าง เนื่องมาจาก *D. pentaphylla* ในฐานข้อมูลและในการศึกษาครั้งนี้เก็บมาจากคนละแหล่ง แสดงให้เห็นถึงความผันแปรที่เกิดขึ้นได้ของยีนบริเวณ *rbc*L ถึงแม้ว่าจะเป็นชนิดเดียวกันก็ตาม ขณะที่กลุ่ม 2 *D. hispida* และ *D. dumetorum* จะรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แสดงให้เห็นว่า *D. hispida* และ *D. dumetorum* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดที่สุด ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าพืชทั้งสองชนิดนี้มีบรรพบุรุษร่วมกัน และเมื่อมีการวิเคราะห์โดยใช้ตัวอย่างของ *D. hispida* จำนวนมากขึ้น *D. dumetorum* ก็ไม่แยกออกมาเป็นกลุ่มเดียว ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า *D. hispida* ไม่ได้เป็น monophyletic และเมื่อพิจารณาภายในชนิดเดียวกันแต่ต่างพันธุ์ พบว่า *D. hispida* var. *hispida* กับ *D. hispida* var. *neoscaphoides* ไม่สามารถแยกเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจน แต่สามารถแยก *D. hispida* var. *neoscaphoides* ตัวอย่างที่ 1.4 และ 2.2 ออกมาเป็นสายวิวัฒนาการแรก (basal lineage) ของกลอยทั้งหมด ด้วยค่า bootstrap support ที่สูงถึง 96 ขณะที่ภายในกลุ่มใหญ่นั้น *D. hispida* var. *hispida* ตัวอย่างที่ 1.1 และ 1.2 มี

ลำดับดีเอ็นเอที่คล้ายกับ *D. hispida* ที่ได้มาจาก GeneBank มากที่สุด ขณะที่ กลุ่มสุดท้าย *D. hispida* var. *neocephoides* ตัวอย่างที่ 1.1, 1.2, 1.3 และ 2.1 กลับมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *D. hispida* var. *hispida* ตัวอย่างที่ 2.1 มากกว่า ถึงจะมีค่า bootstrap ที่ต่ำ จากข้อมูลดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่าง *D. hispida* var. *hispida* กับ *D. hispida* var. *neoscaphoides* ยังไม่แน่ชัดและสามารถแยกกลุ่มได้ ถึงแม้ว่าจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน

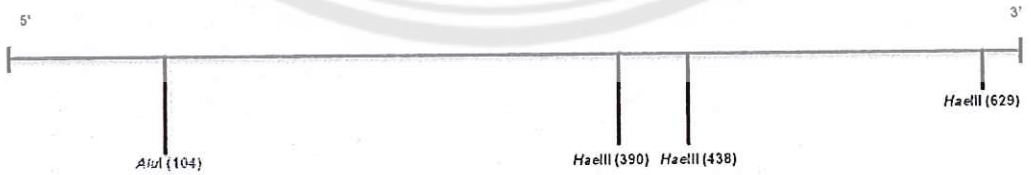
2.5 การสร้างแผนที่ที่แสดงจุดตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

เมื่อนำชุดข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการหาลำดับดีเอ็นเอโดยบริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลีใต้มาจัดเรียง (alignment) ด้วยมือโดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6.002 (Nicholas and Nicholas, 1997) และตรวจสอบการจัดเรียงด้วยโปรแกรม ClustralX (Thompson *et al.*, 1997) จากนั้นนำไปตรวจสอบบริเวณตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วย NEB cutter V.20 (TamasVincze and Roberts, 2003) โดยสนใจเฉพาะเอนไซม์ตัดจำเพาะ Type II พบว่ามีรูปแบบแตกต่างกัน 4 รูปแบบ โดยรูปแบบ 1 มีเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดได้ 1 ตำแหน่ง จำนวน 8 เอ็นไซม์ ได้แก่ *Eco*RV (GAT$^{\blacktriangledown}$ATC) *Alu*I (AG$^{\blacktriangledown}$CT) *Pst*I (CTGCA$^{\blacktriangledown}$G) *Cvi*QI (G$^{\blacktriangledown}$TAC) *Rsa*I (GT$^{\blacktriangledown}$AC) *Taq*I (T$^{\blacktriangledown}$CGA) *Eco*RI (G$^{\blacktriangledown}$AATTC) *Mse*I (T$^{\blacktriangledown}$TAA) เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดได้ 2 ตำแหน่ง จำนวน 8 เอ็นไซม์ ได้แก่ *Hpy*CH4V (TG$^{\blacktriangledown}$CA) *Fat*I ($^{\blacktriangledown}$CATG) *Cvi*AII (C$^{\blacktriangledown}$ATG) *Nla*III (CATG$^{\blacktriangledown}$) *Dpn*II ($^{\blacktriangledown}$GATC) *Bfu*CI ($^{\blacktriangledown}$GATC) *Sa*U3AI ($^{\blacktriangledown}$GATC) *Dpn*I (GA$^{\blacktriangledown}$TC) เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดได้ 3 ตำแหน่ง จำนวน 1 เอ็นไซม์ได้แก่ *Hae*III (GG$^{\blacktriangledown}$CC) (ภาพที่ 14)



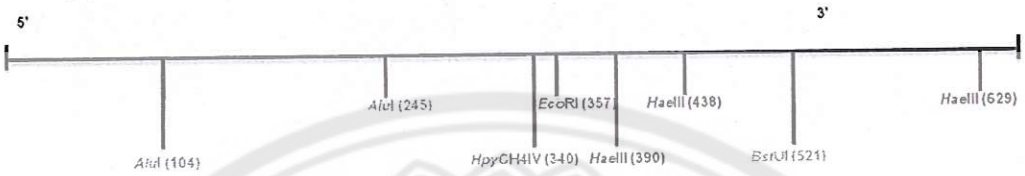
<u>ภาพที่ 14</u> แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของ *D. hispida* var. *hispida* 1.1, 1.2 และ *D. hispida* var. *neocaphoides* 1.1, 1.2, 1.3, และ 2.1

รูปแบบ 2 เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดได้ 1 ตำแหน่ง จำนวน 6 เอ็นไซม์ ได้แก่ *Alu*I (AG$^{\blacktriangledown}$CT) *Pst*I (CTGCA$^{\blacktriangledown}$G) *Cvi*QI (G$^{\blacktriangledown}$TAC 3) *Rsa*I (GT$^{\blacktriangledown}$AC) *Taq*I (T$^{\blacktriangledown}$CGA) *Mse*I(T$^{\blacktriangledown}$TAA) เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดได้ 2 ตำแหน่ง จำนวน 8 เอ็นไซม์ ได้แก่ HpyCH4V (TG$^{\blacktriangledown}$CA) *Fat*I (CATG) *Cvi*AII (C$^{\blacktriangledown}$ATG) *Nla*III (CATG$^{\blacktriangledown}$) *Dpn*II ($^{\blacktriangledown}$GATC) *Bfu*CI ($^{\blacktriangledown}$GATC) *Sa*U3AI ($^{\blacktriangledown}$GATC) *Dpn*I (GA$^{\blacktriangledown}$TC) เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดได้ 3 ตำแหน่ง จำนวน 1 เอ็นไซม์ ได้แก่ *Hae*III (GG$^{\blacktriangledown}$CC) (ภาพที่ 15)



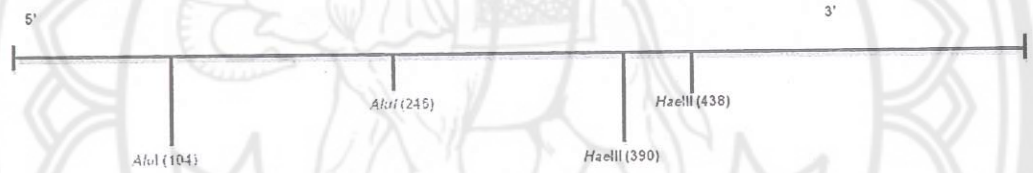
<u>ภาพที่ 15</u> แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของ *D. hispida* var. *hispida* 2.1

รูปแบบ 3 เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดได้ 1 ตำแหน่ง จำนวน 7 เอ็นไซม์ ได้แก่ *Eco*RV (GAT▼ATC) *Pst*I (CTGCA▼) *Cvi*QI (G▼TAC) *Rsa*I (GT▼AC) *Taq*I (T▼CGA) *Mse*I (T▼TAA) *Bst*I (CG▼CG) เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดได้ 2 ตำแหน่ง จำนวน 9 เอ็นไซม์ *Alu*I (AG▼CT) *Hpy*CH4V (TG▼CA) *Fat*I (▼CATG) *Cvi*AII (C▼ATG) *Nla*III (CATG▼) *Dpn*II (▼GATC) *Bfu*CI (▼GATC) *Sa*U3AI (▼GATC) *Dpn*I (GA▼TC) เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดได้ 3 ตำแหน่ง จำนวน 1 เอ็นไซม์ ได้แก่ *Hae*III (GG▼CC) (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของ *D. hispida* var. *neocaphoides* 1.4

รูปแบบ 4 เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดได้ 1 ตำแหน่ง จำนวน 8 เอ็นไซม์ ได้แก่ *Eco*RV (GAT▼ATC) *Pst*I (CTGCA▼G) *Cvi*QI (G▼TAC) *Rsa*I (GT▼AC) *Taq*I (T▼CGA) *Eco*RI (G▼AATTC) *Hae*III (GG▼CC) *Mse*I(T▼TAA) เอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดได้ 2 ตำแหน่ง จำนวน 10 เอ็นไซม์ *Alu*I (AG▼CT) *Hpy*CH4V (TG▼CA 3) *Fat*I (CATG) *Cvi*AII (C▼ATG 3) *Nla*III (CATG▼) *Dpn*II (▼GATC) *Bfu*CI (▼GATC) *Sa*U3AI (▼GATC) *Dpn*I (GA▼TC) *Hae*III (GG▼CC) (ภาพ 17)



ภาพที่ 17 แผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของ *D. hispida* var. *neocaphoides* 2.2

หมายเหตุ ภาพแสดงแผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แสดงเฉพาะตำแหน่งการตัดเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดแล้วทำให้เห็นความแตกต่างอย่างชัดเจน

จากรูปแบบแผนที่การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จะพบว่ารูปแบบที่ 1 เป็นกลุ่มตัวอย่างส่วนใหญ่ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้โดยเป็นตัวอย่างของกลอย 2 ตัวอย่างและกลอยเขา 4 ตัวอย่าง และมี 1 ตัวอย่างของกลอยที่แตกต่าง (รูปแบบ 2) คือไม่พบตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Eco*RI และ *Hpy*CH4IV ขณะที่กลอยเขา 1 ตัวอย่างมีรูปแบบที่แตกต่างไป (รูปแบบ 3) กล่าวคือพบตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Hpy*CH4IV เพียงตำแหน่งเดียว และมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Bst*UI เพิ่มขึ้นมา ร่วมไปถึงมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Alu*I 2 ตำแหน่งด้วย นอกจากนี้กลอยเขาอีก 1 ตัวอย่างก็ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างออกไป (รูปแบบ 4) โดยมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Alu*I2 ตำแหน่ง ขณะที่ตำแหน่งของเอนไซม์ *Hpy*CH4IV และ *Hae*III หายไป

บทที่ 5
สรุปและอภิปราย

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบระหว่างกลอยและกลอยเขาโดยละเอียด ทั้งในส่วนที่ใช้ในการเจริญเติบโต ได้แก่ หัวใต้ดิน ลำต้น และใบ และโครงสร้างในการสืบพันธุ์ ได้แก่ ดอก ผล และเมล็ด พบว่ามีความแตกต่างกันเป็นส่วนมากในเรื่องของขนาด สอดคล้องกับการวิเคราะห์เชิงสถิติ ที่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เนื่องมาจากกลอยมีลักษณะการเจริญแบบพืชล้มลุกอายุหลายปี (perennial herb) สามารถสะสมอาหารไว้ในหัวใต้ดินเพิ่มเติมได้ทุกๆปี จึงทำให้โครงสร้างของลำต้นและใบมีความสมบูรณ์ ขนาดใหญ่มากขึ้นเมื่อมีอายุหลายปี ต่างจากกลอยเขาที่มีการเจริญในลักษณะของพืชล้มลุกปีเดียว (annual herb) ที่สะสมอาหารไว้ในหัวใต้ดินเพียง 1 ปี เมื่อถึงฤดูกาลเจริญเติบโตใหม่อาหารสะสมเหล่านี้ก็จะถูกใช้ในการแตกหน่อและผลิใบขึ้นมาใหม่ไปทั้งหมด ยืนยันได้จากหลักฐานที่จะพบเสมอว่าหัวใต้ดินของกลอยเขาปีก่อนหน้า จะฝ่อหรือมีร่องรอยปรากฏอยู่กับหัวใหม่ที่สร้างขึ้น (ภาพผนวกที่ 2) ไม่พบหัวใต้ดินเกิดเป็นกลุ่มเหมือนกับกลอย (ภาพผนวกที่ 1) จึงทำให้ความสมบูรณ์ของอาหารที่จะสร้างโครงสร้างของลำต้น ใบ หรือผลให้มีขนาดที่ใหญ่ได้มากนัก

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงรูปร่างของโครงสร้างในส่วนสืบพันธุ์ ได้แก่ ช่อดอก กลีบประดับ กลีบรวม ของดอกเพศผู้และเพศเมีย ไปจนถึงผลและเมล็ด พบว่ายังคงมีรูปแบบที่เป็นไปในลักษณะเดียวกัน แม้ว่าจะมีความแตกต่างกันอยู่บ้างก็ตาม สะท้อนให้เห็นว่าลักษณะทางพันธุกรรมของกลอยและกลอยเขาที่ถ่ายทอดออกมาทางส่วนสืบพันธุ์ยังคงมีความสัมพันธ์กันอยู่พอสมควร ไม่ได้แยกหรือตัดขาดออกจากกันอย่างเด็ดขาด แต่ถ้าหากพิจารณาถึงช่วงเวลาในการออกดอกและผสมเกสรระหว่างกลอยและกลอยเขากลับพบว่ามีช่วงเวลาที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน กล่าวคือ กลอย มีการออกดอกและผสมเกสรอยู่ในช่วงเดือนมีนาคม – พฤษภาคม ส่วนกลอยเขาอยู่ในช่วงเดือนสิงหาคม – ตุลาคม ดังนั้นกลอยทั้งสองสายพันธุ์นี้จึงไม่มีโอกาสที่จะผสมพันธุ์กันได้ตามธรรมชาติ แม้ว่าจะเกิดอยู่ในพื้นที่หรือกลุ่มประชากรใกล้เคียงกันก็ตามชัดเจน ชี้ให้เห็นถึงการตัดขาด (isolation) ของการผสมพันธุ์แลกเปลี่ยนยีนระหว่างกลอยทั้งสองพันธุ์นี้ แม้ว่าจะพบเจริญอยู่ในพื้นที่เดียวกัน ก็ไม่มีโอกาสผสมพันธุ์กันได้ตามธรรมชาติ แสดงถึงแนวโน้มในทางวิวัฒนาการที่จะแยกออกจากกันทั้งในระดับพันธุ์หรือชนิดต่อไป

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาลักษณะทางนิเวศวิทยาของประชากรกลอยและกลอยเขา พบว่ากลอยมีความสามารถเจริญอยู่ได้ในทุกพื้นที่ ตั้งแต่พื้นที่ราบใกล้ระดับน้ำทะเลไปจนถึงป่าดิบเขาในภาคเหนือ พื้นที่ถูกบุกรุกทำลายที่มีความแห้งแล้ง ดินเลว ไปจนถึงพื้นที่รกร้างทั่วไป ต่างจากกลอยเขาที่จะพบเจริญอยู่ในสภาพของป่าเบญจพรรณที่มีร่มเงาของพันธุ์ไม้อื่นช่วยบดบังแสง ดินมีความอุดมสมบูรณ์และค่อนข้างมีความชุ่มชื้นสูง ทั้งนี้สามารถอธิบายได้ว่ากลอยนั้นมีใบที่หนาแข็งและมีขนปกคลุมหนาแน่น จึงทำให้สามารถป้องกันความร้อนและการคายระเหยของน้ำได้เป็นอย่างดี ต่างจากใบของกลอยเขาที่ค่อนข้างบางและมีขนประปราย จึงทำให้ไม่สามารถเจริญอยู่ในพื้นที่ที่มีแดดจัดหรือแห้งแล้งได้มากนัก

การสกัดดีเอ็นเอจากใบกลอยโดยใช้วิธี CTAB Method ที่ดัดแปลงมาจาก Agrawal *et al.*, (1992) จะได้ดีเอ็นเอที่มีลักษณะใส ไม่มีสี และเมื่อตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีส ที่ความเข้มข้นเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณมากและมีคุณภาพดี ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวขนาดมากกว่า 10 กิโลเบส แต่ในบางตัวอย่างมีรอย smear เกิดขึ้น อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนของการกำจัด

โปรตีนออกจากสายดีเอ็นเอด้วย chloroform หลายรอบเกินไป รวมไปถึงการกลับหลอดที่แรงเกินไปอาจทำให้โปรตีนโดนดึงออกมาจากสายดีเอ็นเอแรงจนสายดีเอ็นเอขาดได้

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จำเป็นต้องใช้สารละลายดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูง เพื่อลดการรบกวนอัตราการเกิดปฏิกิริยา เพราะฉะนั้นในสารละลายดีเอ็นเอบางตัวอย่างจำเป็นต้องทำการเจือจางมาก เพื่อลดความสกปรกของดีเอ็นเอจากการปนเปื้อนของสารประกอบฟีนอล ซึ่งการการเจือจางในแต่ละตัวอย่างจะไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับการปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลที่มากน้อยต่างกัน และจากการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีสพบว่ามีขนาดประมาณ 700 คู่เบส โดยไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทั้ง forward และ reverse เป็น universal primer ที่สามารถใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในพืชอื่นๆ ได้ด้วย จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งหากแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏมีเพียงแถบเดียวสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้เลย แต่ถ้าหากแถบดีเอ็นปรากฏหลายแถบจะต้องทำการตัดเจลก่อน การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ RBC Bioscience แล้วส่งไปหาลำดับดีเอ็นเอต่อไป การหาลำดับดีเอ็นเอจะใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ซึ่งสามารถหาลำดับดีเอ็นเอทางด้าน 5'และ 3' ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ยาวด้านละประมาณ 700 คู่เบส เมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอแล้วนำผลมาจัดเรียงให้เป็นลำดับดีเอ็นเอเดียวกันในแต่ละตัวอย่าง พบว่าบริเวณบางส่วนของยีน *rbc*L เกิดการแทนที่และการขาดหายไปของลำดับดีเอ็นเอ

การนำลำดับดีเอ็นเอมาตรวจสอบบริเวณตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบริเวณยีน *rbc*L ยังไม่สามารถแยกกลอยและกลอยเขาได้อย่างชัดเจน เนื่องจากรูปแบบการสร้างแผนที่ที่แสดงจุดตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ในรูปแบบที่ 1 เป็นกลอย 2 ตัวอย่างและกลอยเขา 4 ตัวอย่าง ซึ่งถือเป็นตัวอย่างกลุ่มใหญ่ที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้ ส่วน 3 ตัวอย่างที่เหลือมีรูปแบบต่างกันออกไป โดยรูปแบบที่ต่างกันพบว่าเนื่องมาจากการขาดหายหรือแทนที่เข้ามาของลำดับเบส รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในcodon ที่สามซึ่งยังคงให้กรดอะมิโนตัวเดิมจากการสร้างแผนที่ที่แสดงจุดตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่มีรูปแบบต่างกัน 4 รูปแบบอาจจะมีผลเนื่องมาจากความแปรผันทางธรรมชาติ ซึ่งลำดับเบสส่วนใหญ่ยังมีลักษณะเหมือนกันในทุกๆ ตัวอย่างที่ได้ทำการศึกษาในครั้งนี้

การสกัดดีเอ็นเอจากใบของกลอยโดยใช้วิธี CTAB Method ที่ดัดแปลงมาจาก Agrawal *et al.* (1992) จะได้ดีเอ็นเอในปริมาณมากและมีคุณภาพดี มีการแตกหักของดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย ซึ่งถือว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอของพืชกลุ่มนี้ได้ ถึงแม้ใบจะค่อนข้างหนาก็ตาม การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้เป็นจำนวนมาก โดยมีขนาดประมาณ 700 คู่เบสซึ่ง และพบว่าในบางตัวอย่างที่บริเวณบางส่วนยีน *rbc*L เกิดการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของลำดับเบสด้วย แต่การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะพบในตำแหน่งดีเอ็นเอที่ 3 ของ codon ซึ่งไม่มีผลต่อกรดอะมิโนที่นำมาต่อในสายโพลีเพพไทป์จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่ากลอยและกลอยเขามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถแยกเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจน แต่สามารถแต่กลอยออกจากพืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกันได้

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่ากลอยและกลอยเขามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากเมื่อเทียบกับกลอยหรือมันป่าในกลุ่มใบประกอบ (compound leaves) ด้วยกัน นอกจากนี้ยังพบว่า *D. dumetorum* ซึ่งมีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ในทวีปแอฟริกา กลับมีความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกับกลอยและกลอยเขามาก แสดงให้เห็นว่า *D. dumetorum* อาจเป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งของกลอยด้วย แต่ทั้งนี้จะต้องศึกษารายละเอียดให้มากขึ้นต่อไป แต่อย่างไรก็ตามสามารถยืนยันได้ว่ากลอยและกลอยเขา มีความสัมพันธ์

ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันมาก ไม่สามารถแยกกลอยเขาออกเป็นอีกชนิดได้ เนื่องจากกลอยและกลอยเขามีความสัมพันธ์ปรากฏอยู่หลายกลุ่มปะปนกัน เมื่อพิจารณาข้อมูลการศึกษาทางด้านดีเอ็นเอของกลอยทั้งสองพันธุ์นี้พบว่า มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเมื่อเทียบกับมันป่าในกลุ่มใบประกอบ (compound leaves) ชนิดอื่นๆ แต่ไม่สามารถแยกกลอยเขาออกเป็นอีกชนิดต่างหากได้ เนื่องจากกลอยและกลอยเขามีความสัมพันธ์ปรากฏอยู่หลายกลุ่มปะปนกัน อย่างไรก็ตามข้อมูลได้แสดงให้เห็นการแยกกลุ่มระหว่างกลอยทั้งสองพันธุ์อยู่พอสมควร เพราะไม่ได้เกิดเป็นกลุ่มเดียวกันทั้งหมด แต่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมในระดับหนึ่ง สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนใหญ่ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เนื่องจากข้อมูลดีเอ็นเอที่ได้ศึกษา ไม่สามารถแยกกลอยเขาขึ้นเป็นชนิดต่างหาก ดังนั้นสถานภาพของกลอยและกลอยเขาจึงยังคงเป็นความแตกต่างในระดับพันธุ์เท่านั้น สนับสนุนข้อมูลการแยกพันธุ์ของกลอยเขาตามที่ Prain and Burkill (1927) ได้รายงานไว้

สรุปผลจากการศึกษาครั้งนี้ได้ว่า การแยกสายพันธุ์ของกลอยออกเป็น กลอย (var. *hispida*) และกลอยเขา (var. *neoscaphoides*) ตามที่ Prain & Burkill ได้รายงานไว้ในปี ค.ศ. 1927 นั้นถูกต้องแล้ว และไม่สามารถแยกความแตกต่างของทั้งสองสายพันธุ์นี้ออกเป็นชนิดต่างหากได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาวิจัยต่อไป เพราะการใช้เฉพาะบริเวณยีน *rbc*L เพียงบริเวณเดียวมาวิเคราะห์หาความเกี่ยวข้องกันทางวิวัฒนาการ อาจทำให้มีประสิทธิภาพในการจำแนกและระบุชนิดต่ำ จึงควรที่จะมีการศึกษาเพิ่มเติมและใช้ร่วมกับการศึกษายีนบริเวณอื่น เช่น ยีน *mat*K ก็จะทำให้ผลการแยกและระบุชนิดพืชได้ดีขึ้น (Hilu and Liang, 1997)

เอกสารอ้างอิง

จิตรอนงค์ คำรศ และ ชูตา บุญภักดี. 2013. **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของชาสกุล *Camellia* จากลาดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน Chalcone synthase.** Thai Journal Genetics (1): 230 – 234

เชิดศักดิ์ ทัพใหญ่ และ ณัฐพงศ์ แก้วทุ่ง. 2555. **ความหลากหลายทางชนิดพันธุ์ของกลอยในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืช อพ.-สธ. เขื่อนสิริกิติ์ การไฟฟ้าฝ่ายผลิต จังหวัดอุตรดิตถ์.** วารสารวิจัยนเรศวรพะเยา 5(3): 271 – 280

เต็ม สมิตินันทน์. 2544. **ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย.** ฉบับแก้ไขเพิ่มเติม. บริษัทประชาชน จำกัด, กรุงเทพมหานคร.

นฤมล ธนานันต์ เกียรติชัย แซ่ไต่ และ ธีระชัย ธนานันต์. 2557. **การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สิงโตกลอกตาหมู่สิงโตสยามโดยใช้ลำดับนิวคลีอไทด์ของยีนจำเพาะ.** วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ 22 (4): 523 – 530

เบญจพร ศรีสุวรมาศ วุฒิชัย แก้วมงคล และ มหามะซุปยัน แดเบาะ. 2555. **การปรับปรุงพันธุ์มะขามต้านเชื้อราด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการฉายรังสีแกมมา.** รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี 2555. 136 หน้า

วิชัย บุญแสง, อัญชลี ทัศนาขจร, ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์, นุสรา สิทธิดิลกรัตน์ และ สกล พันธุ์ยิ้ม. 2547. **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล.** สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ.** ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P. 1992. **Isolate of DNA from Cheorospondias asillaris leaves.** Biotechnology and Biodiversity Letters 2: 19 – 24

Fay, M.F., Swensen, S.M. and Chase, M.W. (1997). Taxonomic Affinities of Medusagyne oppositifolia (Medusagynaceae). Kew Bull. 52: 111 – 120

Hilu, K.W. and Liang, H. (1997). The matK Gene: Sequence variation and application in plant systematic. American Journal of Botany 84(6): 830 – 839

Nicholas, K.B, and Nicholas, H.J.B. 1997. **GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignment.** Available at www.psc.edu/biomed/genedoc [25 March, 2014]

Phengklai, C. 1993. **Taccaceae.** *In* Smitinand, T., Larsen, K. & Nielsen, I. (eds.) Flora of Thailand 6(1): 1 – 9

Prain, D. and I.H. Burkill. 1927. **The genus Dioscorea in Siam.** Bull. Misc. Inform. Kew 6: 225 – 246

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

Thapyai, C. 2004. **Taxonomic Revision of Family Dioscoreaceae in Thailand.** Ph.D. Dissertation, Kasetsart University

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 tools.** Nucleic Acids Research 24: 4876 – 4882

Weber D. and Helentjaris T. 1989. **Mapping RFLP loci in maize using B-A translocations.** Genetics 121:583 – 590

Wiesman Z, Avidan N, Lavee S, Quebedeaux B. 1998. **Molecular characterization of common olive varieties in Israel and the West Bank using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers.** J. Am. Soc. Hort. Sci. 123: 837-841.

Wilkin, P. and C. Thapyai. 2009. **Dioscoreaceae.** *In* Santisuk, T. and Larsen, K. (eds.) Flora of Thailand 10(1): 1 – 140

ภาคผนวก

1. Herbarium specimens [BKF]

Dioscorea hispida Dennst. var. *hispida*

A. Virapong *AV 243*; C. Thapyai 13, 617; Geesink & Santisuk 4993, 5475; Maxwell 85-1093, 87-390; Newman *et al.* 1375; Phengklai *et al.* 6717, 15738; Pooma *et al.* 4063; Puudjaa 138; Smutnavee 794; Smitinand 1109; Wilkin *et al.* 855, 869, 876, 987, 1008, 1016

Dioscorea hispida Dennst. var. *neoscaphoides* Prain & Burkill

Chayamarit *et al.* 2093; C. Thapyai 538, 619, Hansen 4509; Larsen & Hansen 4509; Larsen *et al.* 482, 2218, 2286, 2682, 277243615; Maxwell 87-896, 88-831, 88-1158, 92-531, 95-1293, 96-1147, 05-422; Pooma *et al.* 4552; Tagawa *et al.* T-9175; T.Shimizu T-8055

2. Voucher specimens

Dioscorea hispida Dennst. var. *hispida*

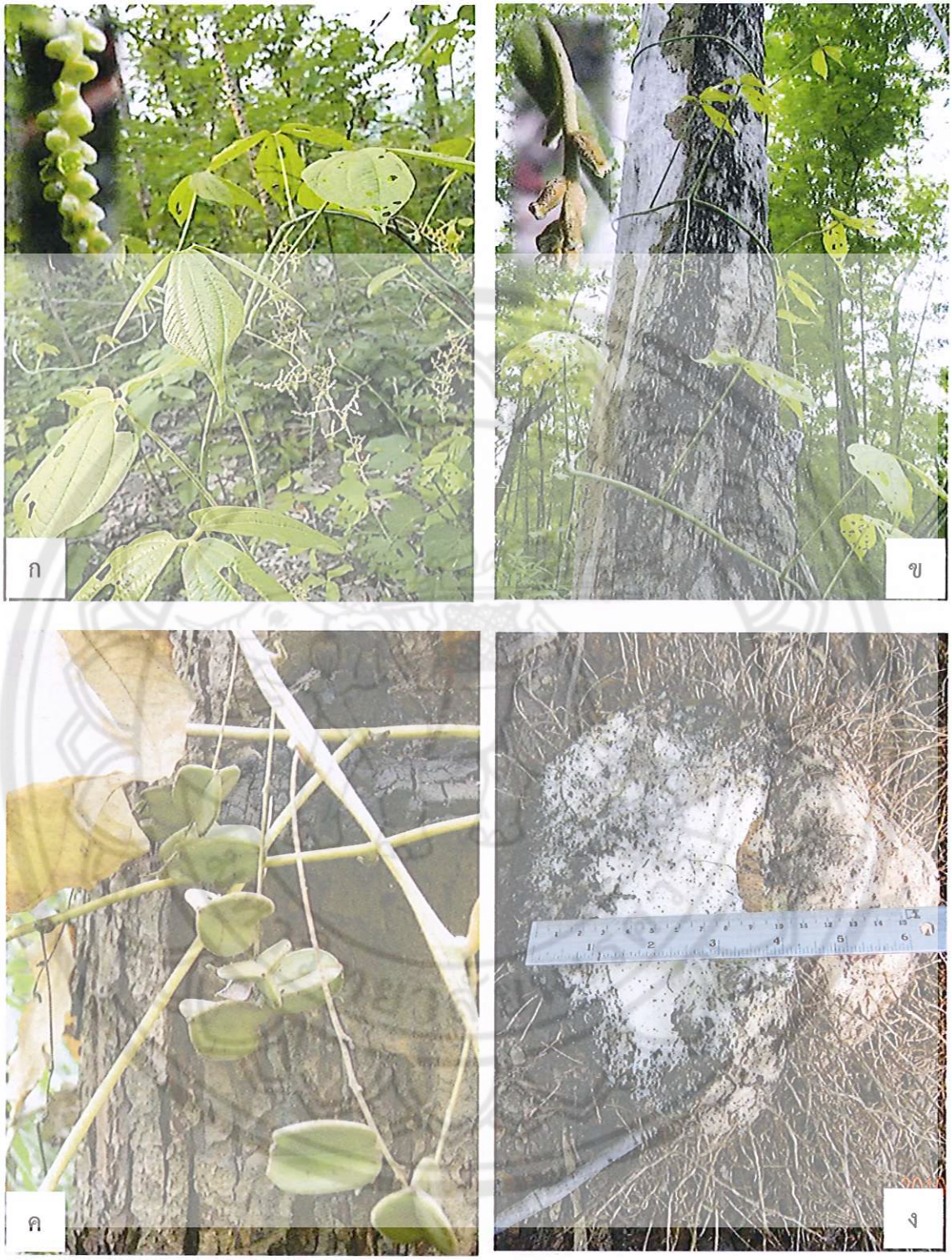
C. Thapyai 628, 638, 640, 642, 653, 659

Dioscorea hispida Dennst. var. *neoscaphoides* Prain & Burkill

C. Thapyai 646, 647, 648, 649, 654, 655, 656, 657, 658, 660

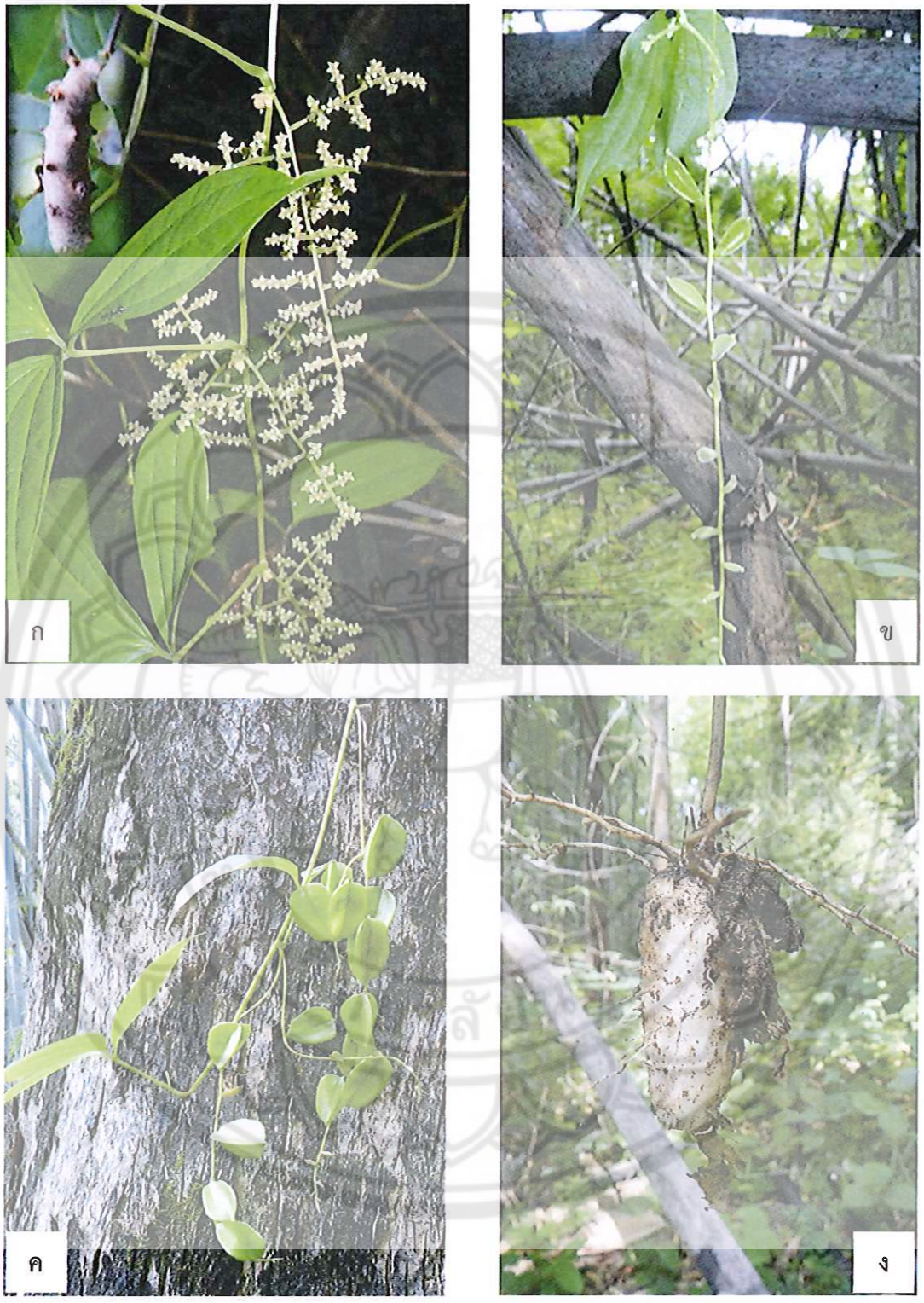
D. pentaphylla L.

C. Thapyai 627



ภาพผนวกที่ 1 กลอย (*Dioscorea hispida* Dennst. var. *hispida*)

ก. ต้นเพศผู้และช่อดอก
ข. ต้นเพศเมียและช่อดอก
ค. ช่อผล
ง. หัวใต้ดิน



ภาพผนวกที่ 2 กลอยเขา (*Dioscorea hispida* Dennst. var. *neoscaphoides* Prain & Burkill)

ก. ต้นเพศผู้ ช่อดอกและหัวอากาศ

ข. ต้นเพศเมียและช่อดอก

ค. ช่อผล

ง. หัวใต้ดิน