



หลักฐานทางสัณฐานวิทยาและดีเอ็นเอเปรียบเทียบ

ระหว่างกลอยและกลอยเขา

Comparative Morphology and DNA Evidences Between

Dioscorea hispida Dennst. var. *hispida* and *D. hispida*

Dennst. var. *neoscaphoides* Prain & Burkill

เชิดศักดิ์ ทัพใหญ่^{1*} และมลิวรรณ นาคขุนทด²

¹ภาควิชาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

*Corresponding Author, E-mail: chirdsakt@nu.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบของกลอยและกลอยเขา จากตัวอย่างของพืชที่เก็บจากภาคสนาม และตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชต่างๆ พบว่าโครงสร้างของพืชทั้งโครงสร้างที่ไม่เกี่ยวข้องกับเพศและโครงสร้างสืบพันธุ์ ได้แก่ หัวใต้ดิน ลำต้น ใบ หัวตามซอกใบ ดอก ผล และเมล็ด ตลอดจนลักษณะทางสัณฐานของกลีบรวม ความหนาแน่นของขนและหนาม มีขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ผลการศึกษาดีเอ็นเอของกลอยทั้งสองพันธุ์ พบว่าไม่สามารถแยกกลอยและกลอยเขาออกจากกันได้ เมื่อใช้ลำดับดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcl* แต่เพียงบริเวณเดียว ดังนั้นข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาในการศึกษาครั้งนี้ จึงสนับสนุนและยืนยันสถานภาพของกลอยและกลอยเขาให้มีความแตกต่างกันในระดับพันธุ์ (variety) เท่านั้น แต่ไม่มีความแตกต่างมากพอที่จะแยกกลอยเขาขึ้นให้เป็นชนิด (species) ได้

ABSTRACT

Comparative morphology of *Dioscorea hispida* var. *hispida* and *D. hispida* var. *neoscaphoides* was studied by field and herbarium specimens investigation. The result showed that mostly vegetative and reproductive parts such as tuber, stem, leaf, bulbil, flower, fruit and seed, between two varieties were significant distinction. Moreover, shape of tepal, as well as hair and spine density were also different. On the other hand, the result of DNA study was indicated

that *D. hispida* var. *hispida* and *D. hispida* var. *neoscaphoides* were not distinguished from each other based on only *rbcl* sequences. Therefore, only the information of morphological study were highly supported their variety status but couldn't state var. *neoscaphoides* up to the specific rank.

คำสำคัญ: กลอย กลอยเขา สันฐานวิทยา ดีเอ็นเอ

Keywords: Asiatic Bitter Yams, *Dioscorea hispida*, Morphology, DNA

บทนำ

กลอย (*Dioscorea hispida* Dennst.) เป็นพืชล้มลุกขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ลำต้นเลื้อยพันต้นไม้ อื่นขึ้นไปเพื่อรับแสง อาจยาวได้ถึง 20 เมตร หัวใต้ดิน (tuber) มีอายุหลายปี พบทั่วไปในเขตร้อนของทวีปเอเชีย ตั้งแต่อินเดีย จีนตอนกลางจนถึงไต้หวัน ไทย คาบสมุทรมลายู อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ นิวกินี และตอนเหนือของออสเตรเลีย (Wilkin & Thapyai, 2009) ในประเทศไทยสามารถพบกลอยได้ในบริเวณป่าเบญจพรรณ ป่าไผ่ ป่าดิบชื้นจนถึงป่าดิบเขา หรือบริเวณชายป่าที่มีดินลึกร่วนซุยและระบายน้ำดีทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย ทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ ออกดอกระหว่างเดือนมีนาคมถึงมิถุนายน ติดผลเดือนกรกฎาคมถึงเดือนพฤศจิกายน (Thapyai, 2004)

ในปี ค.ศ. 1927 Prain and Burkill ได้จำแนกพันธุ์ (variety) ของกลอยเขา (*D. hispida* Dennst. var. *neoscaphoides* Prain & Burkill) แยกออกมาจากกลอย (*D. hispida* Dennst. var. *hispida*) เนื่องจากพบความแตกต่างของลักษณะทางสันฐานวิทยาโดยเฉพาะขนาดของลำต้น ใบ ดอก และผล ที่มีขนาดเล็กกว่ากลอยทั่วไป ต่อมาในปี ค.ศ. 2009 Wilkin and Thapyai รายงานไว้ในหนังสือพรรณพฤกษชาติของประเทศไทย (Flora of Thailand) พบพืชสกุลกลอย (Genus *Dioscorea* L.) ในประเทศไทย

จำนวน 42 ชนิด แต่ไม่ได้แยกพันธุ์ของกลอยเขาออกมาต่างหาก เนื่องจากมีข้อมูลทางสันฐานวิทยาและอนุกรมวิธานไม่เพียงพอ ที่จะจำแนกพันธุ์ของกลอยและกลอยเขาออกจากกันได้

เชิดศักดิ์และณัฐพงศ์ (2555) รายงานพบความแตกต่างที่สำคัญระหว่างกลอยและกลอยเขาหลายประการ ทั้งในส่วนของโครงสร้างที่ไม่เกี่ยวกับเพศและโครงสร้างในการสืบพันธุ์ (ตารางที่ 1) รวมถึงการสร้างหัวตามซอกใบ (bulbil) รูปทรงกระบอก ที่พบในกลอยเขาเสมอ ต่างจากกลอยที่มีรายงานพบหัวอากาศได้จากตัวอย่างที่เก็บจากอุทยานแห่งชาติภูพาน (Wilkin et al., 1016 เก็บรักษาไว้ที่หอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช) เพียงตัวอย่างเดียวเท่านั้น ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดขึ้นในกรณีที่ลำต้นของกลอยทอดเลื้อยไปตามพื้นดินที่มีความชื้นค่อนข้างสูง (Thapyai, 2004) เมื่อพิจารณาถึงช่วงเวลาออกดอกก็พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน กล่าวคือ กลอยเริ่มออกดอกตั้งแต่ช่วงกลางฤดูร้อนในเดือนมีนาคมถึงต้นฤดูฝนในเดือนมิถุนายน ต่างจากกลอยเขาที่เริ่มออกดอกในกลางฤดูฝนเดือนสิงหาคมไปจนถึงเดือนตุลาคม ส่วนการติดผลนั้นมีความแตกต่างกันไม่มากนัก เนื่องจากมีช่วงซ้อนทับกันในช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนพฤศจิกายน

การศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลอยเพื่อที่จะนำมาใช้ระบุชนิดนั้นทำได้ยากเนื่องจากมี

ความผันแปรของลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะส่วนของหัวใต้ดิน ลำต้น และใบ (Wilkin et al., 2005) ดังนั้นข้อมูลดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ จึงนิยมนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลอยและมันป่า โดย Wilkin and Caddick (2000) ใช้ดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcL* และ *matK* ร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่ากลอยที่มีใบเป็นใบประกอบจะอยู่ในกลุ่มเดียวกันเป็น monophyletic ถัดมา Wilkin et al. (2005) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของกลอย 67 แท้กษัตริย์ดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcL* และ *matK* พบว่ากลอยโลกเก่าที่มีการเลื้อยพันของลำต้นทางซ้ายและขวามีความสัมพันธ์เป็น monophyletic เช่นกัน แต่ก็ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของความสัมพันธ์ของกลอยในแถบเอเชียที่ยังไม่ชัดเจน จนกระทั่ง Hsu et al. (2013) ศึกษากลอยในแถบเอเชียจำนวน 72 ตัวอย่าง โดยใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์จำนวน 4 บริเวณ ได้แก่ *trnL-F*, *matK*, *rbcL* และ *atpB-rbcL* พบว่าสามารถแยกออกเป็นกลุ่ม (section) ได้ และกลอยในแต่ละกลุ่มก็มีลักษณะสัณฐานที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน

เมื่อพิจารณาจากข้อมูลที่กล่าวมาข้างต้นและตารางที่ 1 การที่จะแยกความแตกต่างของกลอยทั้งสองพันธุ์นี้ออกจากกันได้หรือไม่นั้นคณะผู้วิจัยจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาหาหลักฐานสนับสนุนทางสัณฐานวิทยาให้ละเอียดมากขึ้น ร่วมกับการศึกษาหาหลักฐานทางด้านดีเอ็นเอ ที่จะสามารถนำมาเป็นข้อมูลสำคัญในการศึกษาทบทวนทางอนุกรมวิธาน (taxonomic revision) ของกลอยทั้งสองพันธุ์นี้ เพื่อเป็นการพิสูจน์ยืนยันถึงสถานะภาพการเป็นพันธุ์ที่ใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ หรืออาจมีความแตกต่างกันมากพอจนกระทั่งสามารถยกระดับพันธุ์ (variety rank) ของ

กลอยเขา ขึ้นเป็นระดับชนิด (specific rank) อันจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ การอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ของกลอยและกลอยเขาอย่างยั่งยืนต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างพืช

1.1 ศึกษาเอกสาร งานวิจัย และตัวอย่างพรรณไม้แห้งของกลอยและกลอยเขาที่พบในประเทศไทย ที่เก็บรักษาไว้ ณ พิพิธภัณฑ์พืชต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการสำรวจ เก็บตัวอย่าง และระบุชนิด

1.2 สำรวจและเก็บตัวอย่างของตัวอย่างกลอยและกลอยเขาที่พบในพื้นที่ป่าธรรมชาติระหว่างเดือนตุลาคม 2556 ถึงเดือนกันยายน 2557 ในท้องที่จังหวัดพิษณุโลก อุตรดิตถ์ พะเยา เชียงใหม่ และจังหวัดใกล้เคียงตามลักษณะนิเวศวิทยาที่พบกลอยและกลอยเขาเจริญอยู่ อย่างน้อย 1 ครั้งต่อเดือน (ความถี่จะมากขึ้นเมื่อถึงช่วงการออกดอกของพืช) โดยเก็บตัวอย่างของพืชที่มีทั้งใบ ดอก ผล และเมล็ด พร้อมทั้งหัวใต้ดิน เพื่อนำมาจัดทำตัวอย่างพรรณไม้แห้ง (dry specimen) สำหรับศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและดีเอ็นเอ

1.3 ถ่ายภาพและวาดภาพลายเส้นแสดงลักษณะของหัวใต้ดิน ลำต้น ใบ ดอก ผล และเมล็ดของกลอยทั้ง 2 พันธุ์ พร้อมทั้งจัดบันทึกลักษณะต่างๆ และวัดขนาดของโครงสร้างต่างๆ โดยละเอียด

1.4 นำตัวอย่างใบสดของพืชจากข้อ 3 มาทำให้แห้งโดยใช้สารดูดความชื้น (silica gel) ตัวอย่างละ 3 – 5 ใบ เพื่อเตรียมตัวอย่างไว้สำหรับการศึกษาด้านดีเอ็นเอต่อไป

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและซีพลักษณะบางประการระหว่างกลอยและกลอยเขา

Variety	Tuber size (cm)	Terminal leaflet width (cm)	Tepal length (mm)	Ovary length (mm)	Fruit size (cm)	Flowering time	Fruiting time
<i>hispida</i>	9 – 25 x 6 – 20	8 – 25(-35)	0.3 – 1.2	2.5 – 4.4	4 – 5.2 x 2 – 3	March – June	July – Nov.
<i>neoscaphoides</i>	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 และ ณัฐพงศ์, 2555

2. การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

2.1 ระบุชนิด ทาชื่อวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้องของพืช โดยพิจารณาจากรูปร่าง (key) จากเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พร้อมทั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งที่เก็บรักษาไว้ในพิพิธภัณฑ์พืชต่างๆ

2.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชอย่างละเอียดทั้งรูปร่าง โครงสร้างและวัดขนาดของส่วนต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งดอกและผล เพื่อใช้เป็นหลักฐานเปรียบเทียบทั้งทางด้านการบรรยายและทางสถิติของค่าเฉลี่ยระหว่างกลอยทั้งสองพันธุ์

2.3 นำตัวอย่างใบพืชที่ทำให้แห้งในสารดูดความชื้น มาทำการสกัดดีเอ็นเอจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างกลอย 3 ตัวอย่าง กลอยเขา 6 ตัวอย่าง และมันคันขาว 1 ตัวอย่าง (*D. pentaphylla*) ด้วยวิธีดัดแปลง CTAB Method ของ Agrawal et al. (1992) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcl* 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 โวลต์เมื่อได้ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้

Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (USA) และนำไปหาลำดับดีเอ็นเอด้วย forward และ reverse primers ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ต่อไป

2.4 เมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอแล้วนำมาตรวจสอบด้วยการเทียบกับลำดับดีเอ็นเอที่มีในฐานข้อมูล Genbank (NCBI) ของ NCBI (Basic Local Alignment Search Tool : BLAST) และเมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และถูกต้องทั้ง 10 ตัวอย่างแล้วนำมาจัดเรียงทุกตัวอย่างในแต่ละบริเวณ (alignment) โดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6.002 (Nicholas and Nicholas, 1997) และ ClustalX (Thompson et al., 1997) แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยการวิเคราะห์ Maximum Likelihood ใช้ Tamura-Nei model และวิเคราะห์ค่า Bootstrap ที่ 1,000 ซ้ำด้วยโปรแกรม MEGA 5.2 (Tamura et al., 2011) เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นจาก phylogenetic tree ที่ได้ โดยใช้ข้อมูลลำดับดีเอ็นเอจากพืชชนิดอื่นในสกุลเดียวกันจากฐานข้อมูล Genbank (NCBI) เพื่อใช้เป็น outgroups และข้อมูลลำดับดีเอ็นเอเปรียบเทียบจำนวน 6 ตัวอย่าง คือ *D. pentaphylla* (AF307470.1), *D. antaly* (gbAY66710), *D. arachidna* (AF307468.1),

D. bulbifera (D28327), *D. dumentorum* (gbAF3074 64) และ *D. hispida* (AF307463.1)

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบ

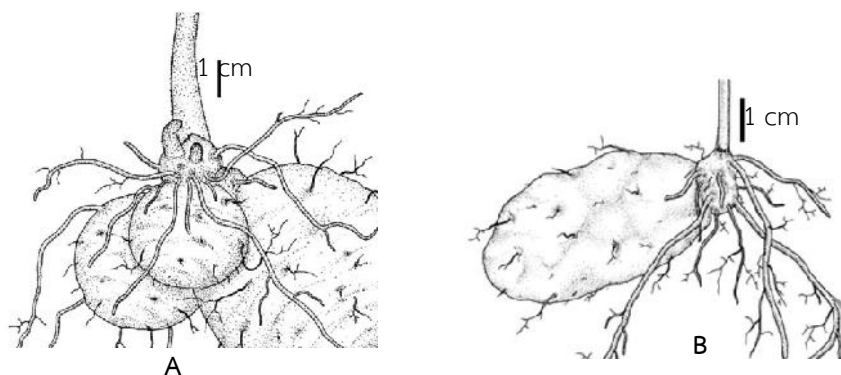
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบระหว่างกลอยและกลอยเขา พบว่ามีลักษณะแตกต่างกันหลายประการ ทั้งส่วนของหัวใต้ดิน ลำต้น ใบ ดอก ช่อดอก ผล และเมล็ด โดยมีรายละเอียดดังนี้

1.1 หัวใต้ดิน (tuber) กลอยมีการเจริญในลักษณะเป็นกลุ่ม (cluster) ประมาณ 3-5 หัวต่อดัน โดยขนาดของหัวผันแปรไปตามอายุและความสมบูรณ์ของพืช รูปร่างของหัวโดยทั่วไปเป็นรูปไข่ ทรงกลมหรือพองออกตอนปลายคล้ายกระบอก (รูปที่ 1A) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 6-20 เซนติเมตร ยาว 9-25 เซนติเมตร ต่างจากหัวใต้ดินของกลอยเขาที่จะเกิดเพียงหัวเดี่ยวๆ รูปทรงกระบอกปลายมน หรือรูปไข่ (รูปที่ 1B) เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2-3 เซนติเมตร ยาว 4-6 เซนติเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าหัวของกลอยจะสะสมอาหารเพิ่มเติมทุกปี (perennially replacement) ทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ ต่างจากหัวของกลอยเขาที่จะเกิดหัวใหม่แทนหัวเก่าในทุกๆ ปี (annually replacement) โดยหัวเก่าจะย่อยสลายไปเมื่อลำต้นของฤดูกาลใหม่แตกหน่อขึ้นมาแล้ว ไม่สามารถมีอายุของหัวข้ามปีได้ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาขนาดของหัวใต้ดินเปรียบเทียบระหว่างกลอยและกลอยเขา พบว่ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางหัวที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2)

1.2 ลำต้น (stem) ขนาดลำต้นของกลอยทั้งสองพันธุ์พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ (ตารางที่ 2) ช่วงเวลาที่ลำต้นของกลอยแตกหน่อขึ้นมาขึ้นนั้น พบตั้งแต่ปลายเดือนกุมภาพันธ์หรือมีนาคมแล้วมีการเจริญของช่อดอกตามมาทันทีที่ก่อนที่ใบจะเจริญเต็มที่ โดยช่อดอกที่เกิดในระยะแรกนี้ทั้งหมดจะเป็นดอกเพศผู้ทั้งสิ้น ส่วนลำต้นที่เกิดดอกเพศเมียจะเริ่มพบได้ประมาณเดือนเมษายนเป็นต้นไปถึงประมาณเดือนกรกฎาคม ตรงกันข้ามกับกลอยเขาที่พบว่าเริ่มมีการแตกหน่อเกิดลำต้นใหม่ออกมา ในช่วงต้นฤดูฝนประมาณเดือนพฤษภาคม โดยมีการเจริญของทั้งลำต้นและใบไปพร้อมๆ กัน เมื่อลำต้นและใบมีการเจริญเติบโตเต็มที่แล้วกลอยเขาจึงจะมีการออกดอกในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนธันวาคม

การที่ระยะเวลาในการออกดอกของกลอยทั้งสองพันธุ์แตกต่างกันเช่นนี้ สืบเนื่องมาจากกลอยมีหัวใต้ดินขนาดใหญ่ มีอาหารสะสมอยู่มาก ทำให้สามารถสร้างดอกได้ในทันทีที่ลำต้นเจริญขึ้นมา ไม่ต้องรอใบชุดใหม่ที่จะเจริญมาภายหลัง นอกจากนี้ในช่วงระยะเวลาดังกล่าว ไม้ต้นในป่าที่กลอยเจริญอยู่ส่วนใหญ่ยังอยู่ในช่วงผลัดใบ สภาพป่าโดยทั่วไปค่อนข้างเปิดโล่ง ทำให้สื่อผสมเกสรต่างๆ สามารถเข้าถึงดอกกลอยที่มีขนาดเล็กได้ง่ายขึ้น ต่างจากกลอยเขาที่มีขนาดของลำต้นขนาดเล็ก จึงต้องรอให้พรรณไม้อื่นๆ เจริญขึ้นมาเสียก่อน เพื่อที่จะได้อาศัยเลี้ยงพันขึ้นไปได้ง่าย อีกประการหนึ่งที่สำคัญก็คือ หัวของกลอยเขามีขนาดค่อนข้างเล็กและเกิดเป็นหัวเดี่ยว จึงไม่มีอาหารสะสมไว้มากพอที่จะออกดอกได้ทันทีหลังจากแตกหน่อขึ้นมาใหม่ ต้องรอให้ใบชุดใหม่ทำการสังเคราะห์ด้วยแสงสร้างอาหารให้เพียงพอก่อน พร้อมกับสร้างหัวใหม่ขึ้นแทนหัวเก่าที่จะสลายไป จากนั้นจึงจะมีการออกดอกต่อไป



รูปที่ 1 หัวใต้ดินของกลอยทั้งสองพันธุ์: A กลอย และ B กลอยเขา

1.3 หัวตามซอกใบ (bulbil) พบเป็นปกติในกลอยเขา (รูปที่ 4A) รูปทรงกระบอก หรือรูปกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลาง 5–10 มิลลิเมตร ยาว 15–25 มิลลิเมตร เปลือกนอกสีน้ำตาลแกมเทา ผิวขรุขระ เพราะว่ามีรากสั้นๆ แทงโผล่ออกมา เปลือกในสีเขียว เนื้อในสีขาว นอกจากนี้ยังพบว่าในหัวตามซอกใบที่อายุมากมักจะพบหน่ออ่อนและใบเกิดขึ้นอยู่ด้วย แม้ว่าหัวนั้นยังคงติดอยู่ภายในซอกใบก็ตาม ส่วนหัวตามซอกใบของกลอยนั้นไม่พบในตัวอย่างที่เก็บมาศึกษา

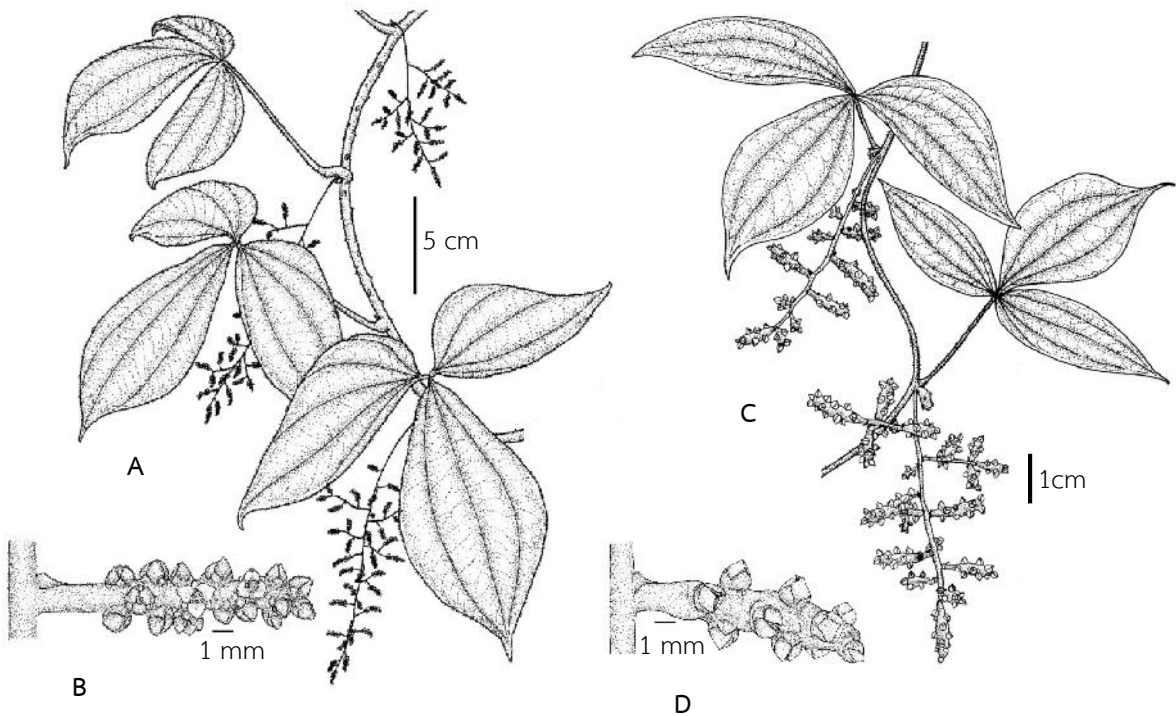
1.4 ใบ (leaf) พบว่าใบของกลอยทั้งสองพันธุ์นั้น มีขนาดที่แตกต่างกันอย่างมาก ใบของกลอยเขาเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว กว้างไม่เกิน 5 เซนติเมตร ต่างจากกลอยที่ใบกว้างได้ถึง 15 เซนติเมตร

เช่นเดียวกับความยาวของก้านใบ (ตารางที่ 2) ที่มีความยาวแตกต่างกันมาก โดยกลอยเขามีก้านใบยาว 3–5 เซนติเมตร ในขณะที่กลอยมีก้านใบยาวตั้งแต่ 6 เซนติเมตรขึ้นไป และมักมีหนามขนาดเล็กเกิดขึ้นตามก้านใบอีกด้วย ต่างจากก้านใบของกลอยเขาที่จะไม่พบหนาม สอดคล้องกับการวิเคราะห์ทางสถิติ ที่พบว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในเรื่องความยาวของก้านใบและความยาวของใบย่อยใบกลาง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเรื่องความยาวของปลายใบ (ตารางที่ 2) ลักษณะของเนื้อใบพบว่าเนื้อใบของกลอยเขาค่อนข้างอวบหนา มีขนนุ่มปกคลุมบางๆ ส่วนเนื้อใบของกลอย ค่อนข้างเหนียวและมีขนแข็งขึ้นปกคลุมหนาแน่น

ตารางที่ 2 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโครงสร้างที่ไม่เกี่ยวกับเพศระหว่างกลอยและกลอยเขา (ที่ $\alpha = 0.05$)

variety	Vegetative Characters											
	TP ¹ (tuber)		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.
<i>hispidia</i>	4.2	1.8	16.1	6.0	6.1	1.9	17.6	5.2	15.4	5.7	13.4	5.2
<i>neoscaphoides</i>	1	0	3.3	1.2	2.3	0.71	6.7	2.4	7.40	1.5	14.8	4.3
t-score	8.2*		6.6*		11.7*		12.2*		8.6*		1.4	

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; ¹n = 20; ²n = 40



รูปที่ 2 ลำต้น ใบ และช่อดอกเพศผู้ (A–B กลอย (*D. hispida* Dennst. var. *hispida*), A ลำต้น ใบ และช่อดอก, B ช่อดอกย่อย; C–D กลอยเขา (*D. hispida* Dennst. var. *neoscaphoides*), C ลำต้น ใบ และช่อดอก, D ช่อดอกย่อย)

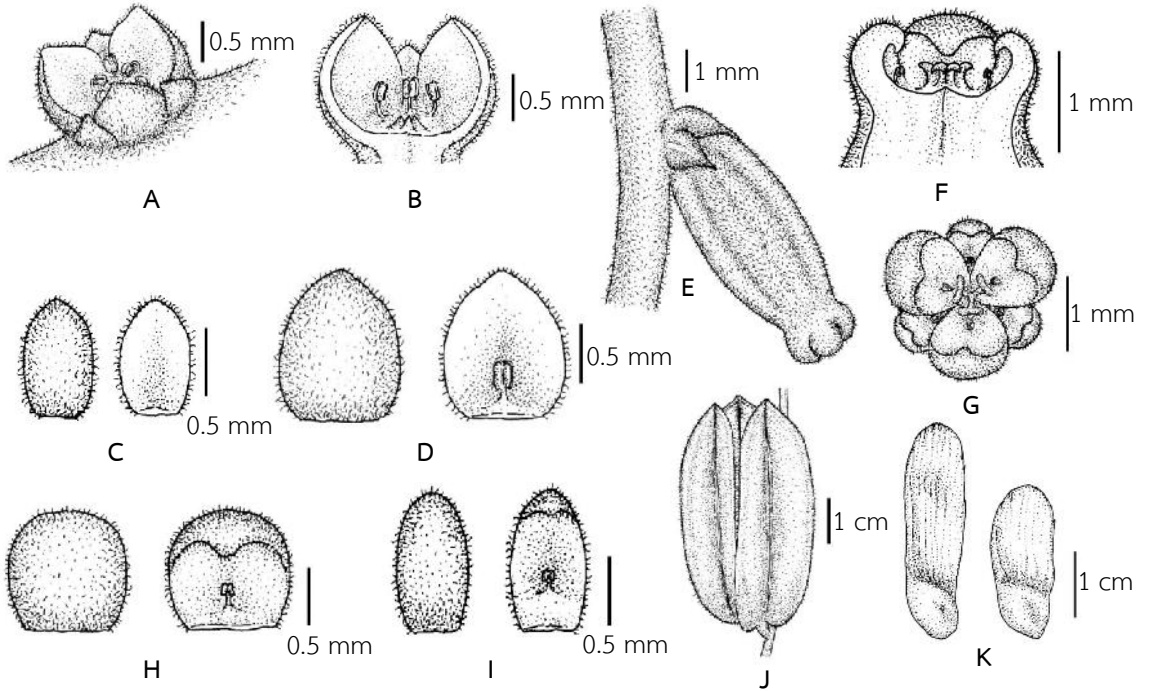
1.5 ดอกและช่อดอกเพศผู้ (male flower and inflorescence) พบเกิดเป็นช่อแยกแขนง (panicle) ขนาดใหญ่ในกลอย (รูปที่ 2A) มีความยาวทั้งหมด 4–17 เซนติเมตร ช่อย่อยแบบช่อเชิงลด (spike) ยาว 2–8 เซนติเมตร ต่างจากช่อดอกของกลอยเขาพบที่ว่า ส่วนมากเกิดเป็นช่อสั้นๆ (รูปที่ 2C) พบบ้างที่มีการแตกแขนง มีความยาวทั้งหมดเพียง 2–7 เซนติเมตร ช่อดอกย่อยยาว 0.5–1 เซนติเมตร ส่วนขนาดของดอกเพศผู้ในกลอยทั้งสองพันธุ์นั้น พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกันมาก แต่รูปร่างของแกนช่อดอกย่อย (axis) มีลักษณะที่ค่อนข้างแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด กล่าวคือ แกนช่อดอกย่อยของกลอยรูปทรงกระบอก มีดอกย่อยเรียงหนาแน่นตลอดความยาว (รูปที่ 2B)

ต่างจากกลอยเขาที่แกนช่อดอกย่อยรูปคล้ายกระบอง และมีดอกย่อยเรียงห่างๆ กัน (รูปที่ 2D) เมื่อพิจารณาขนาดพบว่า ทั้งความยาวของก้านช่อดอกย่อยเส้นผ่านศูนย์กลางดอกบาน ตลอดจนความยาวของกลีบรวมชั้นนอก กลีบรวมชั้นใน ใบประดับ (bract) และใบประดับย่อย (bracteole) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3)

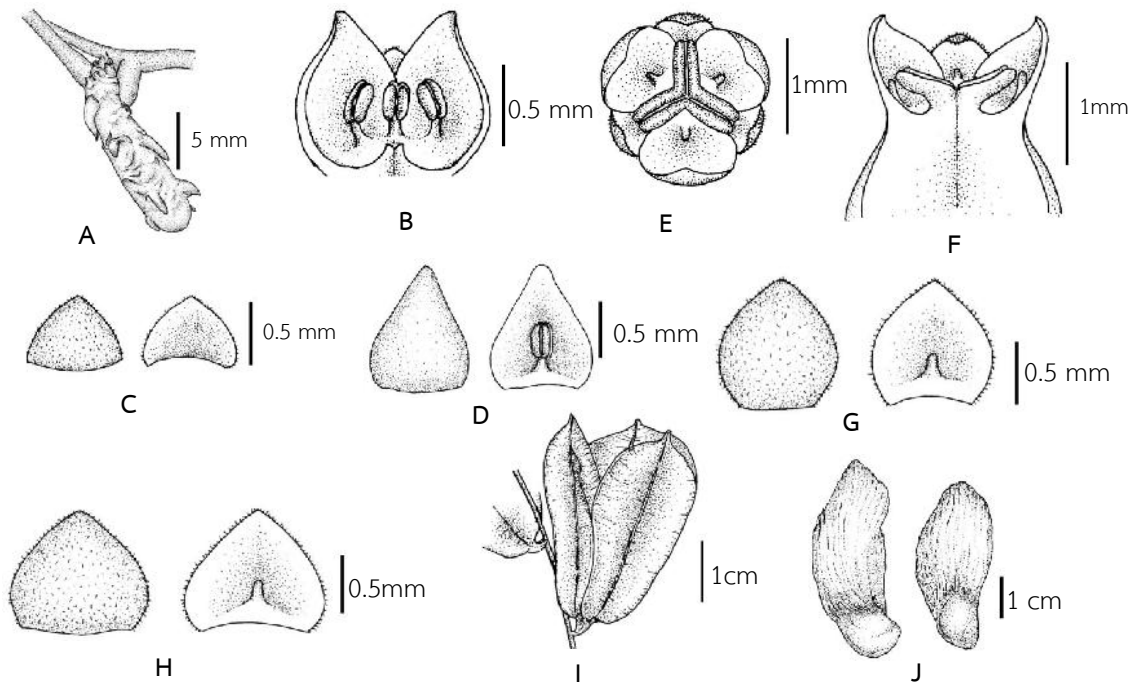
1.6 ดอกและช่อดอกเพศเมีย (female flower and inflorescence) พบเกิดเป็นช่อเชิงลด (spike) ไม่แยกแขนงทั้งสองสายพันธุ์ แต่ดอกย่อยของกลอยจะเกิดรวมกันอยู่เฉพาะตอนปลายช่อเท่านั้น ต่างจากดอกย่อยของกลอยเขาที่ค่อนข้างกระจายอยู่ตลอดความยาวของก้านช่อ ความแตกต่างทางสถิติที่พบ

เกิดขึ้นในขนาดของดอกบานและความยาวของกลีบ
รวมชั้นนอกเท่านั้น ส่วนลักษณะอื่นๆ มีค่าไม่แตกต่าง
กัน (ตารางที่ 4) ส่วนความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา
พบว่ากลีบรวมของกลอยมีลักษณะอวบหนา ปลายกลีบ

โค้งมนและงอรั้งเข้าหาใจกลางดอกอย่างชัดเจน
(รูปที่ 3H, 3I) ต่างจากกลีบรวมของกลอยเขาที่ค่อนข้าง
บาง ปลายกลีบแหลมตรงหรือโค้งงอเพียงเล็กน้อย
(รูปที่ 4G, 4H)



รูปที่ 3 โครงสร้างส่วนสืบพันธุ์ของกลอย (*Dioscorea hispida* Dennst. var. *hispida*) (A ดอกเพศผู้, B ดอกเพศผู้ตัดตามยาว, C กลีบรวมเพศผู้ชั้นนอก, D กลีบรวมเพศผู้ชั้นใน, E ดอกเพศเมีย, F ดอกเพศเมียตัดตามยาว, G ยอดเกสรเพศเมีย, H กลีบรวมเพศเมียชั้นนอก, I กลีบรวมเพศเมียชั้นใน, J ผล, K เมล็ด)



รูปที่ 4 โครงสร้างส่วนสืบพันธุ์ของกลอยเขา (*Dioscorea hispida* var. *neoscaphoides*) (A หัวตามซอกใบ, B ดอกเพศผู้ตัดตามยาว, C กลีบรวมเพศผู้ชั้นนอก, D กลีบรวมเพศผู้ชั้นใน, E ยอดเกสรเพศเมีย, F ดอกเพศเมียตัดตามยาว, G กลีบรวมเพศเมียชั้นนอก, H กลีบรวมเพศเมียชั้นใน, I ผล, J เมล็ด)

ตารางที่ 3 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโครงสร้างสืบพันธุ์เพศผู้ (male reproductive parts) ระหว่างกลอยและกลอยเขา (ที่ $\alpha = 0.05$)

Variety	Male floral characters											
	PMA (mm)		FLD (mm)		OTL (mm)		ITL (mm)		FBL (mm)		BTL (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.
<i>hispida</i>	14.6	3.6	1.7	0.4	0.7	0.10	1.1	0.2	1.03	0.19	0.7	0.12
<i>neoscaphoides</i>	7.2	2.6	1.2	0.1	1.0	0.1	1.2	0.11	1.4	0.2	0.8	0.1
t-score	10.6*		8.9*		10.3*		2.8*		7.2*		4.0*	

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; n = 40

1.7 ผลและเมล็ด (capsule and seed) ผลของกลอยทั้งสองพันธุ์เมื่อแก่จะแตกตามตะเข็บทั้งสามด้านแบบ loculicidal capsule (รูปที่ 3J, 4I) มีจำนวนเมล็ดตั้งแต่ 1–6 เมล็ด ความกว้างของผลมีขนาดใกล้เคียงกันระหว่าง 20–30 มิลลิเมตร แต่ขนาดความยาวผลของกลอยจะมากกว่าอย่างชัดเจนที่ขนาด 40–52 มิลลิเมตร ส่วนกลอยเขามีความยาวของผล

เพียง 25–30 มิลลิเมตรเท่านั้น สอดคล้องกับการวิเคราะห์ทางสถิติ ที่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 4) นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อผลสดของกลอยเขามีลักษณะค่อนข้างบางและโปร่งแสง สามารถมองเห็นเมล็ดที่อยู่ภายในได้ชัดเจน ต่างจากเนื้อผลของกลอยที่หนาแข็งและทึบแสง

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโครงสร้างทางด้านการสืบพันธุ์เพศเมีย (female reproductive parts) ระหว่างกลอยและกลอยเขา ($\alpha = 0.05$)

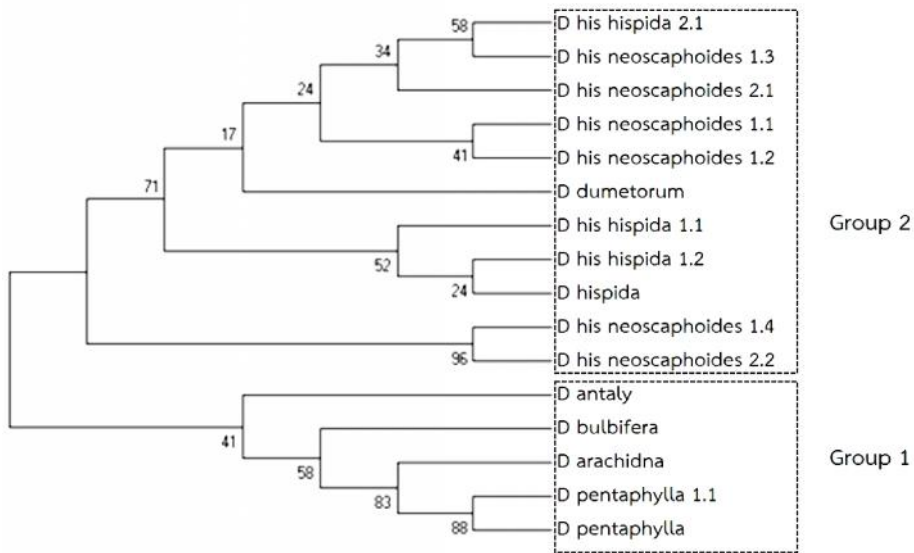
Variety	Female floral & capsule characters													
	FLD (mm)		OTL (mm)		ITL (mm)		FBL (mm)		BTL (mm)		CPL (mm)		CPW (mm)	
	n = 14		n = 18		n = 18		n = 6		n = 5		n = 20		n = 20	
	\bar{X}	S.D.	\bar{X}	S.D.	\bar{X}	S.D.	\bar{X}	S.D.	\bar{X}	S.D.	\bar{X}	S.D.	\bar{X}	S.D.
<i>hispida</i>	2.6	0.3	0.8	0.9	0.9	0.1	2.2	0.4	1.3	0.2	48.2	8.9	26.8	4.5
<i>neoscaphoides</i>	1.5	0.3	1.0	0.2	1.0	0.3	2.4	0.5	1.3	0.2	37.4	3.6	22.3	2.2
t-score	10.7*		2.4*		1.7		0.1		0.1		5.1*		4.0*	

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)

2. การศึกษาหลักฐานทางดีเอ็นเอเปรียบเทียบ

การสกัดดีเอ็นเอบริเวณยีน *rbcl* บางส่วน พบว่ามีความยาวตั้งแต่ 631–644 คู่เบส โดยพบการแทนที่เบสจำนวน 68 ตำแหน่ง (10.56%) อัตราส่วนของ transition ต่อ transversion เท่ากับ 0.744 พบการแทรกเข้ามาหรือขาดหายไป 3 บริเวณ ขนาดตั้งแต่ 5–9 คู่เบส จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยประเมินจากค่า bootstrap support สามารถแบ่งกลอยออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ (รูปที่ 5) โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *Dioscorea* ชนิดอื่นๆ

จำนวน 4 ชนิดที่เป็น outgroup ทั้งหมด ได้แก่ *D. arachidna*, *D. bulbifera*, *D. antaly* และ *D. pentaphylla* ซึ่ง *D. pentaphylla* 1.1 ที่เก็บตัวอย่างมานั้นถือว่าจัดจำแนกได้ถูกต้อง เนื่องจากตัวอย่างอยู่ใกล้ชิดกัน มีค่า bootstrap support สูง แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีลำดับดีเอ็นเอที่แตกต่างกันบ้าง อาจจะเนื่องมาจาก *D. pentaphylla* ในฐานข้อมูล และในการศึกษาครั้งนี้เก็บมาคนละแหล่ง แสดงให้เห็นถึงความผันแปรที่เกิดขึ้นได้ของบริเวณยีน *rbcl* ถึงแม้จะเป็นชนิดเดียวกันก็ตาม



รูปที่ 5 สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ได้จากการวิเคราะห์ Maximum Likelihood ของลำดับดีเอ็นเอ บริเวณยีน *rbcl* ในพืชสกุลกลอย (ตัวเลขหลังชื่อวิทยาศาสตร์หมายถึงหมายเลขตัวอย่าง (specimen number))

ขณะที่กลุ่ม 2 นั้น *D. hispada* และ *D. dumetorum* จะรวมอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แสดงให้เห็นว่า *D. hispada* และ *D. dumetorum* มีบรรพบุรุษร่วมกัน สอดคล้องกับการศึกษาพืชสกุลกลอยโดยใช้ลำดับดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ 2 บริเวณคือ *rbcl* และ *matK* พบว่าพืชทั้งสองชนิดนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก (Wilkin et al., 2005) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า *D. hispada* ไม่ได้เป็น monophyletic และเมื่อพิจารณาภายในชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ พบว่า *D. hispada* var. *hispada* กับ var. *neoscaphoides* ไม่สามารถแยกเป็นกลุ่มได้ชัดเจน แต่สามารถแยกสายวิวัฒนาการได้เป็น 2 กลุ่มที่มีค่า bootstrap support ที่สูงถึง 96 และ 71 ตามลำดับ โดยกลุ่มที่ 1 นั้น *D. hispada* var. *neoscaphoides* ตัวอย่างที่ 1.4 และ 2.2 มีสายสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมากและแยกออกมาเป็นสายวิวัฒนาการแรก (basal lineage) ของกลอยทั้งหมด ขณะที่ภายในกลุ่มใหญ่นั้น *D. hispada* var. *hispada*

ตัวอย่างที่ 1.1 และ 1.2 มีลำดับดีเอ็นเอที่คล้ายกับ *D. hispada* ที่ได้มาจาก Genbak (NCBI) มากที่สุด ขณะที่ *D. hispada* var. *neoscaphoides* ตัวอย่างที่ 1.1, 1.2, 1.3 และ 2.1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *D. hispada* var. *hispada* ตัวอย่างที่ 2.1 ถึงแม้จะมีค่า bootstrap ที่ต่ำ แต่อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่าง *D. hispada* var. *hispada* กับ var. *neoscaphoides* ยังไม่แน่ชัดและแยกกลุ่มไม่ได้ชัดเจน ถึงแม้ว่าจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน เนื่องจากบริเวณยีน *rbcl* นั้น แม้ว่าจะช่วยในการจัดกลุ่มและศึกษาสายวิวัฒนาการของกลอยได้ แต่ยีนดังกล่าวนี้ในพืชอื่นๆ ถือว่ามีประสิทธิภาพในการนำมาใช้แยกและระบุชนิดต่ำ แต่ถ้าใช้ร่วมกับบริเวณอื่น เช่น ยีน *matK* หรือดีเอ็นเอในนิวเคลียส เช่น ITS ก็จะทำให้ผลการแยกและระบุชนิดพืชดีขึ้น (Hilu and Liang, 1997)

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบของโครงสร้างพืชทั้งหมด ร่วมกับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการจากดีเอ็นเอ พบว่ากลอยและกลอยเขามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากเมื่อเทียบกับกลอยหรือมันป่าในกลุ่มใบประกอบ (compound leaves) ด้วยกัน ผลการศึกษาในครั้งนี้จึงยืนยันได้ว่ากลอยและกลอยเขามีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันถึงแม้ว่าจะมี มันป่าชนิดอื่นถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันด้วยก็ตาม ดังนั้นข้อมูลของดีเอ็นเอในการศึกษานี้จึงไม่สามารถแยกสถานะภาพของกลอยเขาจากระดับพันธุ์ขึ้นเป็นระดับชนิดต่างหากได้ มีเพียงข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเท่านั้น ที่สนับสนุนให้การจัดจำแนกกลอยและกลอยเขาออกจากกันในระดับสายพันธุ์ (variety) ตามที่ได้รายงานไว้โดย Prain and Burkill (1927) นั้นถือว่าเหมาะสมถูกต้องแล้ว

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย จากงบประมาณรายได้ประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยนเรศวร ขอขอบพระคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.พ.สธ.-กพ. เพื่อสนธิสัญญา ที่ให้ความอนุเคราะห์ผู้วิจัย เข้าเก็บตัวอย่างพืชประกอบการวิจัย ขอขอบคุณภัณฑกรักษ์ประจำหอพรรณไม้ (BKF) ที่อนุญาตให้ผู้วิจัย เข้าศึกษาตัวอย่างพันธุ์ไม้แห้งและค้นคว้าเอกสารวิชาการที่เกี่ยวข้อง

ภาคผนวก

รายชื่อตัวอย่างที่ศึกษาสัณฐานวิทยา [BKF]

Dioscorea hispida Dennst. var. *hispida*

A. Virapong AV 243; C. Thapyai 13, 617, 638, 653, 659; Geesink & Santisuk 4993, 5475; Maxwell 85-1093, 87-390; Newman et al. 1375; Phengkai 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, 654, 655, 656, 657, 658, 660; Hansen 4509; Larsen & Hansen 4509; Larsen et al. 482, 2218, 2286, 2682; 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. รายชื่อตัวอย่างที่ศึกษาดีเอ็นเอ [BKF]

Dioscorea hispida Dennst. var. *hispida*

D his hispida 1.1 (C. Thapyai 617) Sequence Number KU865501

D his hispida 1.2 (C. Thapyai 653) Sequence Number KU865503

D his hispida 2.1 (C. Thapyai 659) Sequence Number KU865509

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

D his neoscaphoides 1.1 (C. Thapyai 654) Sequence Number KU865504

D his neoscaphoides 1.2 (C. Thapyai 655) Sequence Number KU865505

D his neoscaphoides 1.3 (C. Thapyai 656) Sequence Number KU865506

D his neoscaphoides 1.4 (C. Thapyai 657) Sequence Number KU865507

D his neoscaphoides 2.1 (C. Thapyai 658) Sequence Number KU865508

D his neoscaphoides 2.2 (C. Thapyai 660) Sequence Number KU865510

Dioscorea pentaphylla L.

D pentaphylla 1.1 (C. Thapyai 629) Sequence Number KU865502

เอกสารอ้างอิง

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

Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P. (1992). Isolate of DNA from *Cheorospondias asillariz* 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.

Hsu, K.M., Tsai, J.L., Chen, M.Y., Ku, H.M., and Liu, S.C. (2013). Molecular phylogeny of *Dioscorea* (Dioscoreaceae) in East and Southeast Asia. *Blumea* 58: 21–27.

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. [Online]. Available: www.psc.edu/biomed/genedoc [2013, May 20]

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

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

Thapyai, C. (2004). Taxonomic Revision of Family Dioscoreaceae in Thailand. Ph.D. Dissertation, Kasetsart University. pp. 186–190.

Wilkin, P. and Caddick, L.R. (2000). Palaeotropical compound-leaved yams (*Dioscorea*; Dioscoreaceae): monophyly and relationships. In: Wilson KL, Morrison DA (eds), *Monocots: Systematics and Evolution*: Melbourne: CSIRO, 497–504.

Wilkin, P., Schols, P., Chase, M.W., Chayamarit, K., Furness, C.A., Huysmans, S., Rakotonasolo, F., Smets, E., and Thapyai, C. (2005). A plastid gene phylogeny of the yam genus, *Dioscorea*: roots, fruits and Madagascar. *Systematic Botany* 30: 736–749.

Wilkin, P. and C. Thapyai. (2009). Dioscoreaceae. *Flora of Thailand* 10(1): 1 – 140.

