

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพลับพลึงธาร พันธุ์ไม้ใกล้สูญพันธุ์ในประเทศไทย และพืชในวงศ์ Amaryllidaceae โดยอาศัยเครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับยีน

Genetic variation of the endangered species, water-onion (*Crinum thaianum*) in Thailand and plants in family Amaryllidaceae based on gene specific markers

เมธิญา ช้างเจริญ¹ สุจิตรา จางตระกูล² วิภา หงษ์ตระกูล^{1*}

Maytiya Changcharoen¹, Suchittra Changtrakul², Vipa Hongtrakul^{1*}

¹ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

²สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

²Forest and Plant Conservation Research Office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Ministry of Natural Resources and Environment, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author: fscivph@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพลับพลึงธาร (water-onion, *Crinum thaianum*) พันธุ์ไม้ใกล้สูญพันธุ์ของประเทศไทย 77 ตัวอย่าง และพันธุ์พืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกับพลับพลึงธาร (Family Amaryllidaceae) 5 ชนิด ได้แก่ พลับพลึงขาว (*C. asiaticum*) พลับพลึงตีนเป็ด (*Hymenocallis littoralis*) พลับพลึงแดง (*C. amabile*) *C. nathans* และ พลับพลึงหนู (*Hymenocallis* sp.) โดยใช้ PCR-RFLP markers ที่จำเพาะกับยีน 7 ชนิด ได้แก่ *NADH dehydrogenase* subunit F (*ndhF*), *acetyl-CoA carboxylase* beta subunit (*accD*), *NADH-plastiquinone oxidoreductase* subunit 7 (*ndhH*), *NADH-plastoquinone oxidoreductase* subunit 1 (*ndhA*), *photosystem I P700 apoprotein A2* (*psaB*), 18S rDNA และ 26S rDNA พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และ 4 กลุ่มย่อย กลุ่มใหญ่ที่ 1 เป็นพลับพลึงที่อยู่ในสกุล *Crinum* ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มพลับพลึงธารทั้งหมด และกลุ่มพลับพลึงขาวกับพลับพลึงแดง กลุ่มใหญ่ที่ 2 เป็นพลับพลึงในสกุล *Hymenocallis* และ *C. nathans* ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือพลับพลึงตีนเป็ด กับ *C. nathans* อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และพลับพลึงหนู PCR-RFLP markers ที่พัฒนานี้ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างในตัวอย่าง

พลับพลึงธารทั้งหมดที่ศึกษาได้ น่าจะมีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นที่ให้ความหลากหลายสูง และตรวจสอบได้หลายตำแหน่งในการศึกษาพันธุกรรมพลับพลึงธารต่อไป นอกจากนี้ได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนทั้ง 7 ชนิดของพลับพลึงธาร เพื่อยืนยันความจำเพาะของยีนนั้นๆ และเป็นข้อมูลระบุความจำเพาะของชนิดและสายพันธุ์พลับพลึงธารของประเทศไทย รวมทั้งเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 5 ยีน (*accD*, *ndhH*, *ndhA*, *psaB*, 26S rDNA) กับพืชชนิดต่างๆ ที่มีข้อมูลในฐานข้อมูลพบว่าพลับพลึงธารมีความเหมือนทางพันธุกรรมกับพลับพลึงขาวที่มีข้อมูลในฐานข้อมูลมากที่สุด ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลับพลึงธารเป็นข้อมูลแรก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปสู่การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อศึกษาพันธุกรรมของพลับพลึงธาร และเพื่อเป็นแนวทางการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์พลับพลึงธารอย่างยั่งยืนต่อไป

ABSTRACT

Genetic variation among 77 samples of the endangered species, water-onion (*Crinum thaianum*) in Thailand and five plants in family Amaryllidaceae, including *C. asiaticum*, *Hymenocallis littoralis*, *C.*

amabile, *C. nathans* and *Hymenocallis* sp., was studied using PCR-RFLP markers specific to seven genes, *NADH dehydrogenase* subunit F (*ndhF*), *Acetyl-CoA carboxylase* beta subunit (*accD*), *NADH-plastiquinone oxidoreductase* subunit 7 (*ndhH*), *NADH-plastoquinone oxidoreductase* subunit 1 (*ndhA*), *Photosystem I P700 apoprotein A2* (*psaB*), 18S rDNA and 26S rDNA. All samples could be separated into two main groups and 4 subgroups. Group I consisted of two subgroups, one was all water-onion samples and the other was *C. asiaticum* and *C. amabile*. Group II also consisted of two subgroups, one was *Hymenocallis* sp. and the other was *H. littoralis* and *C. nathans*. The developed PCR-RFLP markers could not distinguish all studied water-onion samples. Other DNA markers with high polymorphism and multi-locus detection should be used to study genetic variation among water-onion samples. Partial sequences of seven genes of water-onion were analyzed in order to confirm the gene specificity and for the specific identification of Thailand water-onion. Five partial gene sequences (*accD*, *ndhH*, *ndhA*, *psaB*, 26S rDNA) of water-onion were compared to other plant sequences available in database. The result indicated that water-onion was most closely related to *C. asiaticum*. This first report on water-onion gene sequences will be useful for the development of suitable DNA markers to evaluate water-onion genetic information and for conservation and sustainable use of water-onion in the future.

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางพันธุกรรม; พลับพลึงธาร; เครื่องหมายโมเลกุลจำเพาะกับยีน

Keywords: genetic variation; water-onion (*Crinum thaianum*); gene specific marker

บทนำ

“พลับพลึงธาร” หนึ่งในพรรณไม้น้ำที่ตกอยู่ในสภาพใกล้สูญพันธุ์ (endangered plant) เพราะมีการ

ลักลอบขุดไปขายในต่างประเทศปีละหลายตัน เพื่อนำไปใช้ทำครีมบำรุงผิวพรรณ (Hiscock, 2003) โดยพลับพลึงธารยังเจริญเติบโตและแพร่กระจายพันธุ์อยู่นอกเขตอนุรักษ์ จึงไม่สามารถนำกฎหมายของอุทยานแห่งชาติ หรือเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่ามาคุ้มครองได้ ประกอบกับการทำลายป่าต้นน้ำทำให้สภาพพื้นที่เปลี่ยนไป เกิดตะกอนดินทับถมมากขึ้น ปิดทับต้นและหัวพลับพลึงธารจนงอกไม่ได้ ตะกอนที่แขวนลอยในน้ำยังเกาะอยู่ตามใบทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโต เป็นผลให้พลับพลึงธารมีจำนวนลดลงไปมาก พลับพลึงธารยังเป็นตัวชี้วัดความอุดมสมบูรณ์ของผืนป่าเป็นพรรณไม้น้ำที่ชาวภาคและชาวระนองภาคภูมิใจและให้สมญานามว่า “ราชินีแห่งสายน้ำคลองนาคา” มีจำนวนโครโมโซม $2n = 22$ (วรรณดา และ รัฐภักดิ์, 2551) มีชื่อสามัญว่า onion plant หรือ water-onion ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Crinum thaianum* J. Schulze (ชื่อ *thaianum* เป็นการระบุพบในประเทศไทยเท่านั้น) อยู่ใน Family Amaryllidaceae, Order Asparagales, Class Liliopsida, Division Magnoliophyta (Hiscock, 2003) พบว่าทั่วโลกมีพืชสกุล *Crinum* อยู่ 85 สกุล 860 ชนิด (วรรณดา และ รัฐภักดิ์, 2551) Schulze (1972) รายงานว่าพลับพลึงธารเป็น 1 ใน 4 ชนิดของสกุล *Crinum* ที่เป็นพืชน้ำ โดยอีก 3 ชนิดได้แก่ *C. aquaticum* Burch. ex Spreng. (*Crinum campanulatum* Herb.) และ *C. nathans* Baker พบในแอฟริกาเขตร้อน และ *C. purpurascens* Herb. พบในบราซิลและเทือกเขาแอนดีสตะวันออก ลักษณะโดยทั่วไปของพลับพลึงธารจัดเป็นไม้ล้มลุก มีหัวใต้ดิน ใบออกเป็นวงรอบแทงขึ้นเหนือน้ำ รูปแถบยาว มีเส้นใบตามยาวจำนวนมาก ขอบใบหยักซี่ฟันเล็กน้อย ช่อดอกเป็นรูปร่ม ก้านช่อดอกหนา ดอกสีขาว 6 แฉก รูปแถบถึงรูปหอก ก้านเกสรเพศผู้ 6 ก้าน เกสรเพศเมียสั้นกว่าก้านเกสรเพศผู้ ผลมีสีแดง มีหลายเมล็ด (วรรณดา และ รัฐภักดิ์, 2551) โดยจากการสำรวจในแหล่งน้ำธรรมชาติในจังหวัดพังงาและจังหวัดระนอง พบว่าลักษณะกาบหุ้มช่อดอกสามารถจำแนกได้เป็น 2 ชนิด คือ กาบหุ้มช่อดอกสีแดง และกาบหุ้มช่อดอกสีเขียว ซึ่งมีเขตการกระจายพันธุ์และขึ้นในสภาพแวดล้อมที่จำกัด เป็นพืชถิ่นเดียวของประเทศไทย พบเฉพาะทางภาคใต้ตอนบน บริเวณ จังหวัดพังงา และ จังหวัดระนอง เท่านั้น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพลับพลึงธารในประเทศไทยยังไม่มี

รายงานการศึกษามาก่อน งานวิจัยนี้จึงได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อยีนโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนั้นๆ จากพืชชนิดอื่นที่มีรายงานในฐานข้อมูล และนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาตรวจสอบในเจลอะกาโรส (PCR-RFLP marker) วิเคราะห์ความจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมจากข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างปลับปลิงธารพันธุ์ไม่น้ำใกล้สูญพันธุ์นี้ เพื่อเป็นข้อมูลการอนุรักษ์ปลับปลิงธารให้คงอยู่ในประเทศอย่างยั่งยืนต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างปลับปลิงธาร (*C. thaianum*) จำนวน 77 ตัวอย่าง (Table 1) ซึ่งรวบรวมจากแหล่งจำหน่ายพันธุ์ (บริษัทไวก์เครน และตลาดจตุจักร) และจากแหล่งธรรมชาติ จังหวัดระนองและจังหวัดพังงา (คลองเตรียม, คลองตามุด, คลองคุระ และคลองบางปู้) และพืชในวงศ์เดียวกับปลับปลิงธารอีก 5 ชนิดๆ ละ 1 ตัวอย่าง จากร้านขายพันธุ์ไม้สวนจตุจักร ได้แก่ ปลับปลิงขาว (*C. asiaticum* L.), ปลับปลิงตีนเป็ด (*H. littoralis* Salish.), ปลับปลิงแดง (*C. amabile* Don.), *C. nathans* และ ปลับปลิงหนู (*Hymenocallis* sp.) (Figure 1) สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของตัวอย่างทั้งหมดโดยใช้วิธีของ Doyle and Doyle (1987)

การพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะกับยีน

ออกแบบไพรเมอร์โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอ-

ไทด์ในส่วน coding sequences ของยีนในพืช จากฐานข้อมูล GenBank ที่มีความจำเพาะกับยีน 7 ยีน ได้แก่ *NADH dehydrogenase subunit F (ndhF)*, *acetyl-CoA carboxylase beta subunit (accD)*, *NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 7 (ndhH)*, *NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 1 (ndhA)*, *photosystem I P700 apoprotein A2 (psaB)*, 18S rDNA และ 26S rDNA (Table 2)

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยเทคนิค PCR-RFLP

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนทั้ง 7 ชนิด โดยในปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ (100 ng/μl) 2.0 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ (5 pmol/μl) ชนิดละ 2.0 ไมโครลิตร 2mM dNTP 1.0 ไมโครลิตร 10X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร 50 mM MgCl₂ 1.0 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 U/μl) 0.2 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรรวม 25.0 ไมโครลิตร และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังนี้ รอบที่ 1 ที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที รอบที่ 2–35 ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ที่อุณหภูมิตาม Table 2 1 นาที และที่ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และรอบสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (RFLP marker) จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ ได้แก่ *MseI*, *StyI*, *AluI*, *HaeIII*, *RsaI*, *BclI*, *EcoRI* และ *HpaII* ก่อนตรวจสอบในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้ว วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง

Table 1 Samples *C. thaianum* used in this study.

Sample number	Sample location	Total number of samples
1-5, 49-53	Klong Triam, Phang-nga province	10
6-14, 33-44, 72-73	White Crane Aquatic Plants Co. Ltd.	23
15-32, 56-68	Chatuchak market, Bangkok	31
45-48, 69, 74-75	Klong Taphut, Phang-nga province	6
54-55	Klong Khura, Phang-nga province	2
70-71	Klong Bangpru, Ranong province	2
76-77	Department of Fisheries, Bangkok	2
Total		77



Figure 1 Samples in family Amaryllidaceae used in this study.

Table 2 Gene specific primers used in this study.

Gene	Primer sequence (5'-3')	Length (bp)	Annealing temp. (°C)
1. <i>ndhF</i>	F: GGACTTCTGCTTATTCCG R: GGCTAATCCTCTTACACCC	~1,900	55
2. <i>accD</i>	F: GGACATAGTGGTGAAGTG R: GGAAAGAAACCGTGGAGCTG	~1,400	55
3. <i>ndhH</i>	F: ATGGGTCCTCACCACCCA R: TCATGATATCAGCCAATTTT	~1,100	61
4. <i>ndhA</i>	F: CGACAGAAATAGAAGTACAAGCT R: AAAGAAATTTCCACCCAAG	~2,100	59
5. <i>psaB</i>	F: GCTCAGGATCCCCTACTCGTCGT R: CCTGATGTAGAGGCAATC	~2,100	62
6. 18S rDNA	F: CGACTTTTGAAGGGATGCA R: GGCAAATGCTTTCGCAGTTG	~800	65
7. 26S rDNA	F: TCAGGTGGGACACCCGCTGAGT R: AGAGGGACCGTTCCGCATCCGAC	~500	61

การวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกแถบดีเอ็นเอของพลับพลึงธารและพลับพลึงชนิดต่างๆ โดยให้สัญลักษณ์เป็น “1” กับกาเกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” กับกาไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ numerical taxonomy and multivariate analysis system (NTSYS) pc version 2.20 K คำนวณความสัมพันธ์ระหว่างพลับพลึงธารกับพืชในวงศ์เดียวกันอีก 5 ชนิด และสร้างแผนภูมิพันธุกรรมเพื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (clustal analysis) ด้วยวิธี

unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA)

การหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน (partial sequence) ของยีนของพลับพลึงธาร จากผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยการใช้ไพรเมอร์จำเพาะกับยีนทั้ง 7 ชนิด โดยนำผลผลิตพีซีอาร์มาเชื่อมกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA) และถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ *Escherichia coli* คัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสม และ

ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (1st BASE, Malaysia) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้จากพลับพลึงธารเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นที่มีข้อมูลยีนทั้ง 5 ยีน ในฐานข้อมูล Genbank จากพืช 14 ชนิด (Table 3) โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 5.0.6 (www.mbio.ncsu.edu) และ MEGA version 6.0.5 (Tamura *et al.*, 2013) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของพลับพลึงธารกับพืชชนิดต่างๆ ด้วยการสร้าง phylogenetic tree เพื่อจัดกลุ่มโดย maximum likelihood (ML) และประเมินความเชื่อมั่นโดยการทำ bootstrap 1,000 ครั้ง

ผลการทดลองและวิจารณ์

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR-RFLP

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของพลับพลึงธารจำนวน 77 ตัวอย่างและพืชในวงศ์เดียวกับพลับพลึงธาร 5 ชนิด จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้หลังตัดผลผลิตพีซีอาร์จำเพาะกับยีน 7 ยีนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 8 เอนไซม์ ไม่พบความแตกต่างในตัวอย่างพลับพลึงธารทั้งหมดที่ศึกษา แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ศึกษาในพลับพลึงธารเป็นบริเวณอนุรักษ์สูง ควรพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอบริเวณที่ไม่ใช่ยีน หรือใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่นที่ให้ความหลากหลายสูงและวิเคราะห์ได้หลายๆ ตำแหน่งในจีโนม เช่น simple

sequence repeat (SSR) marker และ amplified fragment length polymorphism (AFLP) marker เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพลับพลึงธารต่อไป อย่างไรก็ตามพบว่าการตัดผลผลิตพีซีอาร์จำเพาะกับยีนด้วยเอนไซม์บางชนิด ให้ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างพลับพลึงธารกับพืชในวงศ์เดียวกัน 5 ชนิดที่นำมาศึกษา (Figure 2)

ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *ndhF* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *MseI* สามารถแยกพลับพลึงธารและพืชในวงศ์เดียวกัน ออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพลับพลึงธาร กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย พลับพลึงขาว พลับพลึงตีนเป็ด พลับพลึงแดง *C. nathans* และพลับพลึงหนู ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *accD* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ 5 ชนิด (*MseI*, *AluI*, *EcoRI*, *RsaI* และ *HpaII*) พบว่าไม่มีเอนไซม์ชนิดใด สามารถแยกพลับพลึงธารและพืชในวงศ์เดียวกันออกจากกันได้ ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *ndhH* เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* สามารถแยกพลับพลึงธารและพืชในวงศ์เดียวกันออกจากกันได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพลับพลึงธาร พลับพลึงตีนเป็ด *C. nathans* และพลับพลึงหนู กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยพลับพลึงขาว และพลับพลึงแดง ผลผลิตพีซีอาร์ของยีน 26S rDNA เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *StyI* สามารถแยกพลับพลึงธารและพืชในวงศ์เดียวกันออกจากกันได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพลับพลึงธาร พลับพลึงขาว

Table 3 Plant gene accession numbers used in this study.

organism	gene	<i>accD</i>	<i>ndhH</i>	<i>ndhA</i>	<i>psaB</i>	26S rDNA
1. <i>Crinum asiaticum</i> L.		JQ277076	JQ276880	JQ276444	JQ276150	JQ213893
2. <i>Scadoxus cinnabarinus</i> (Decne) Friis & Nordal		JQ277078	JQ276882	JQ276446	JQ276152	JQ283889
3. <i>Amaryllis belladonna</i> L.		JQ277075	JQ276879	JQ276443	JQ276149	JQ283852
4. <i>Lomandra longifolia</i> Labill.		JQ277096	HQ181207	HQ180915	HQ181672	JQ283856
5. <i>Triteleia hyacinthine</i> (Lindl.) Greene.		JQ277110	JQ276914	JQ276478	JQ276184	JQ283854
6. <i>Xeronema callistemon</i> W.R.B. Oliv.		JQ277112	JQ276913	JQ276480	JQ276186	JQ283862
7. <i>Dichelostemma ida-maia</i> (Wood) Greene.		JQ277109	JQ276916	JQ276477	JQ276183	JQ283868
8. <i>Sansevieria trifasciata</i> Prain.		JQ277103	JQ276907	JQ276471	JQ276177	JQ283880
9. <i>Brodiaea californica</i> Lindl.		JQ277106	JQ276910	JQ276474	JQ276180	JQ283865
10. <i>Dichelostemma congestum</i> (Sm.) Kunth.		JQ277108	JQ276912	JQ276476	JQ276182	JQ283867
11. <i>Asparagus officinalis</i> L.		JQ277080	HQ181186	JQ276448	JQ276154	JQ283882
12. <i>Dasyllirion wheeleri</i> S. Watson ex Rothrock.		JQ277098	JQ276902	JQ276466	JQ276172	JQ283857
13. <i>Xanthorrhoea preissii</i> Endl.		JQ277111	JQ276915	JQ276479	JQ276185	JQ283890
14. <i>Ophiopogon japonicas</i> (L.f.) Ker Gawl.		JQ277101	JQ276905	JQ276469	JQ276175	JQ283876

พลับพลึงตีนเป็ด พลับพลึงแดง และพลับพลึงหนู กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *C. nathans* ส่วนผลผลิตพีซีอาร์ของยีนอีก 3 ชนิดยีนคือ *ndhA* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *MseI*, *psaB* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *StyI* และ 18S rDNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *RsaI* สามารถแยกกลุ่มของพลับพลึงธารและพืชในวงศ์เดียวกันได้รูปแบบที่เหมือนกันเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพลับพลึงธาร พลับพลึงขาว และพลับพลึงแดง กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย พลับพลึงตีนเป็ด *C. nathans* และพลับพลึงหนู (Figure 2)

เมื่อวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด และสร้าง dendrogram เพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวอย่างสามารถแบ่งตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ และ 4 กลุ่มย่อย กลุ่มใหญ่ที่ 1 เป็นพลับพลึงที่อยู่ในสกุล *Crinum* ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มพลับพลึงธารและกลุ่มพลับพลึงขาวกับพลับพลึงแดง กลุ่มใหญ่ที่ 2 เป็นพลับพลึงในสกุล *Hymenocallis* และ *C. nathans* ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือกลุ่มของพลับพลึงตีนเป็ดกับ *C. nathans* และพลับพลึงหนู (Figure 3) โดยหากเพิ่มชนิดและจำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ศึกษาพันธุกรรมของตัวอย่างพืชที่ศึกษาทั้งหมดอาจแยกพลับพลึงตีนเป็ดและ *C. nathans* พลับพลึงขาวและพลับพลึงแดง หรือแม้แต่ในกลุ่มของพลับพลึงธารที่ยังไม่สามารถแยกได้จากการใช้ specific markers จำเพาะกับ

ยีนทั้ง 7 ชนิดที่ศึกษาได้ อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาที่ได้พบว่าพลับพลึงธารมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพลับพลึงขาวและพลับพลึงแดง และ *C. nathans* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับพลับพลึงตีนเป็ดและพลับพลึงหนู

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในพลับพลึงธาร

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนในพลับพลึงธารทั้ง 7 ยีน เพื่อยืนยันความจำเพาะของยีนนั้นๆ และเป็นข้อมูลระบุความจำเพาะของสายพันธุ์พลับพลึงธารของประเทศไทย โดยผ่านการโคลนผลผลิตพีซีอาร์ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ndhF* ขนาด 1,762 bp, ยีน *accD* ขนาด 1,094 bp, ยีน *ndhH* ขนาด 1,006 bp, ยีน *ndhA* ขนาด 937 bp, ยีน *psaB* ขนาด 2,060 bp, ยีน 18S rDNA ขนาด 769 bp และยีน 26S rDNA ขนาด 453 bp (supplementary data)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 5 ชนิดยีนของพลับพลึงธาร (*accD*, *ndhH*, *ndhA*, *psaB*, 26S rDNA) มาเปรียบเทียบกับยีนในพืชชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank และสร้าง phylogenetic tree โดยใช้ model of nucleotide substitution เป็น JC+I model และกำหนด rate variation among site ชนิด uniform rate พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างทั้งหมดได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มใหญ่ที่ 1 แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยที่ 1

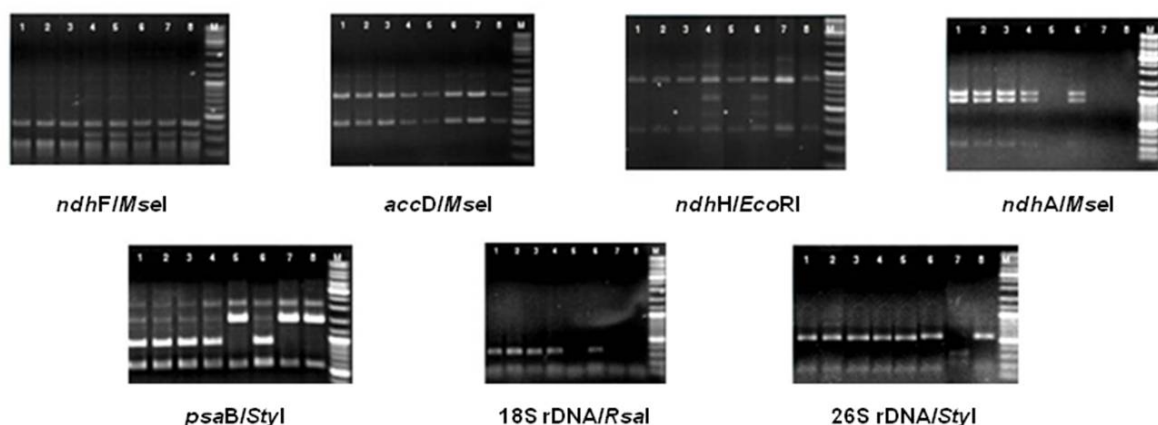


Figure 2 DNA patterns of 7 partial gene specific sequences of plants in family Amaryllidaceae after cutting with different restriction enzymes (1-3 = *Crinum thaianum*, 4 = *C. asiaticum*, 5 = *Hymenocallis littoralis*, 6 = *C. amabile*, 7 = *C. nathans* and 8 = *Hymenocallis* sp.).

ประกอบด้วยพืช 4 ชนิด ได้แก่ *C. thaianum*, *C. asiaticum*, *Scadoxus cinnabarinus*, *Amaryllis belladonna* โดย *C. thaianum* และ *C. asiaticum* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด (genetic distance = 0.003) สอดคล้องกับผลการศึกษาโดยใช้ gene specific PCR-RFLP markers ดังกล่าวแล้ว กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วยพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Xeronema callistemon*, *Xanthorrhoea preissii* และกลุ่ม

ย่อยที่ 3 ประกอบด้วยพืช 4 ชนิด ได้แก่ *Triteleia hyacinthina*, *Brodiaea californica*, *Dichelostemma ida-maia*, *D. congestum* ส่วนกลุ่มใหญ่ที่ 2 ประกอบด้วยพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Lomandra longifolia*, *Asparagus officinalis*, *Sansevieria trifasciata*, *Dasylium wheeleri* และ *Ophiopogon japonicas* โดยพืช 3 ชนิดหลัง มีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุดในกลุ่ม (Figure 4)

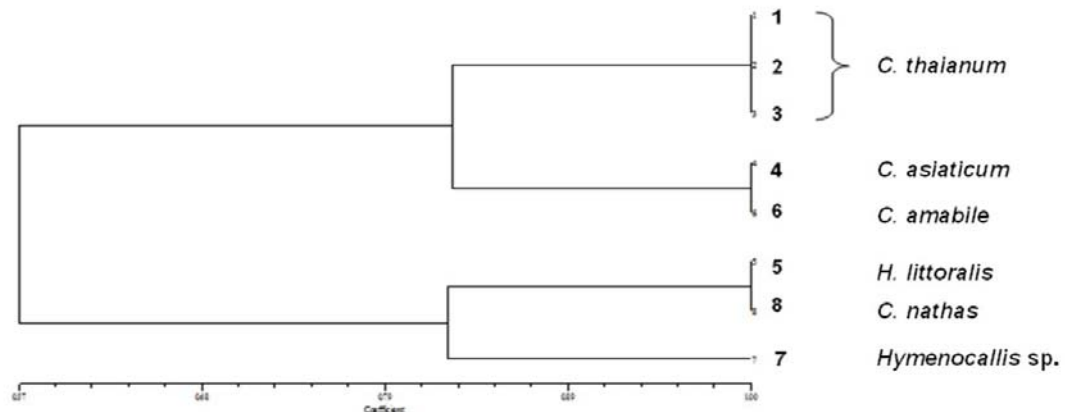


Figure 3 UPGMA dendrogram of *C. thaianum* and plants in family Amaryllidaceae based on seven gene specific markers using PCR-RFLP technique.

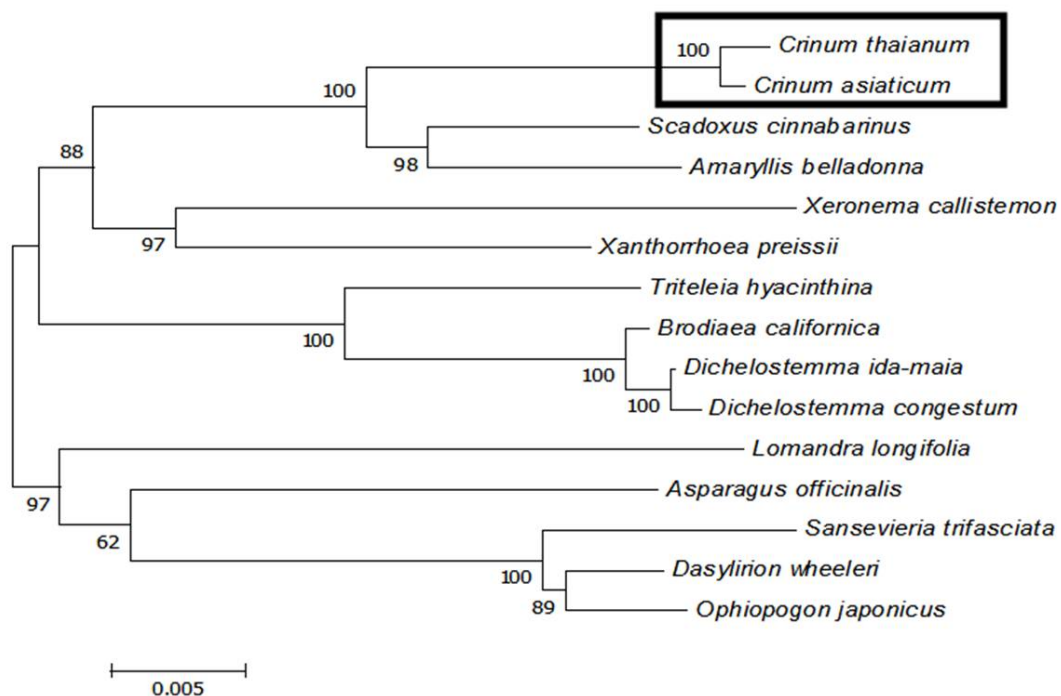


Figure 4 Phylogenetic tree of 15 plant samples resulting from Maximum likelihood analysis of concatenated 5 partial genes (*accD*, *ndhH*, *ndhA*, *psaB*, 26S rDNA). Node support was estimated with 1,000 bootstrap replicates.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ทุนวิจัยมหาวิทยาลัย สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม (สัญญาเลขที่ MRG545S070) และทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปี 2554-2555 [ว-ท(ด)33.54]

เอกสารอ้างอิง

วรรณดา พิพัฒน์เจริญชัย รัฐภัทร์ ประดิษฐ์สรรพ (2551) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหอมน้ำ. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง.

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13–15.

Hiscock P (2003) Encyclopedia of Aquarium Plants. United States and Canada: Interpret Publishing.

Schulze J (1972) *Crinum thaianum* J Schulze, a new aquatic species from Southeast Asia. In: Traub HP, Moldenke HN (eds.) Plant Life. The American Plant Life Society.

Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical taxonomy. Freeman. San Francisco, USA.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30: 2725–2729.