

การศึกษาจุดกำเนิดเฟินลูกผสมพันธุ์การค้าทางพืชสวนในกูดผีเสื้อพันธุ์ปลูก Mayi โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอร่วมกับเครื่องหมาย SSCP

A study of hybrid origin in the fern horticultural trade, *Pteris cretica* L. 'Mayi' by using DNA sequencing and SSCP markers

ทัตไน จารุวัฒนพันธ์^{1*}, มัตสึโมะโตะ ซะดามุ² และ วะทะโนะ ยะสุยูกิ³

Tassanai Jaruwattanaphan^{1*}, Matsumoto Sadamu² and Watano Yasuyuki³

บทคัดย่อ: กูดผีเสื้อ (*Pteris cretica* L.) เป็นเฟินที่มีความนิยมเป็นอย่างมากในหลายประเทศ แต่การศึกษาจุดกำเนิดของพันธุ์ลูกผสมทำได้ค่อนข้างยากเนื่องมาจากการผสมพันธุ์และการเกิดลูกผสมชนิดใหม่ที่เกิดขึ้นผ่านกระบวนการเพิ่มชุดจำนวนโครโมโซม เพื่อให้ทราบถึงจุดกำเนิดของกูดผีเสื้อสายพันธุ์ปลูก Mayi ซึ่งเป็นพันธุ์ปลูกที่มีชื่อเสียง โดยนำตัวอย่างที่ได้จากตลาดไม้ประดับในประเทศไทยและญี่ปุ่นจำนวนสองตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ SSCP (single-strand conformation polymorphism) แล้วทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนในนิวเคลียส (*gapCp*) และคลอโรพลาสต์ (*rbcL* และ *trnV-trnM*) กับฐานข้อมูล GenBank ผลจากการวิเคราะห์ SSCP ของยีน *gapCp* พบว่าไม่มีความผันแปรระหว่างตัวอย่างจากทั้งสองประเทศ โดยทั้งสองตัวอย่างมีจีโนไทป์เป็น 21/22/K1/M2/R3 ซึ่งเป็นผลจากการรวมของอัลลีล 21/22/R3 จากเฟินเงินแฉะ (*P. cretica* var. *albolineata*) ซึ่งเป็นเฟินที่มีสามจีโนมและมีรูปแบบการสืบพันธุ์แบบอะกาไมสปอรัส และอัลลีล K1/M2 จากเฟินหางไก่ (*P. multifida*) ซึ่งมีสี่จีโนมและมีรูปแบบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยลูกผสมพันธุ์ปลูกนี้มี cpDNA แบบเดียวกับเฟินหางไก่ (haplotype I) แสดงให้เห็นว่าเฟินหางไก่เป็นผู้ให้จีโนมสายพันธุ์แม่ในกระบวนการเกิด allopolyploidization ของกูดผีเสื้อสายพันธุ์ปลูกนี้ จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมกับ SSCP มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบจุดกำเนิดของเฟินลูกผสมที่เป็นโพลีพลอยด์ได้ดี ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาในการตรวจสอบลูกผสมในเฟินชนิดอื่นๆ ต่อไป

คำสำคัญ: เฟิน, ลูกผสม, โพลีพลอยด์, เครื่องหมายดีเอ็นเอ, เอสเอสซีพี

ABSTRACT: *Pteris cretica* L. is one of the most popular fern in many countries. However, revealing the origin of hybrid cultivars is difficult due to hybridization and the hybrid speciation which happened through polyploidization process. To gain insights into the origin of a famous cultivar, *P. cretica* 'Mayi', two samples obtained from ornamental plant market in Thailand and Japan were examined with a single-strand conformation polymorphism (SSCP). Comparison of DNA from nuclear gene (*gapCp*) and regions of chloroplast DNA (*rbcL* and *trnV-trnM*) to the GenBank database was performed. The results from SSCP analysis of *gapCp* gene showed no variation between samples.

¹ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900

² แผนกพฤกษศาสตร์ พิพิธภัณฑ์วิทยาศาสตร์และธรรมชาติ อะมะคุโบะ จังหวัดทสึคุบะ 305-0005 ประเทศญี่ปุ่น

Department of Botany, National Museum of Nature and Science, Amakubo, Tsukuba 305-0005, Japan

³ ภาควิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยชิบะ ยาโยอิ อินาเงะ จังหวัดชิบะ 263-8522 ประเทศญี่ปุ่น

Department of Biology, Graduate School of Science, Chiba University, Yayoi-cho, Inage, Chiba 263-8522, Japan

* Corresponding author: fagrtnj@ku.ac.th

The assessed genotype of nuclear gene, 21/22/K1/M2/R3, indicated the combination of alleles from the triploid agamosporous species, *P. cretica* var. *albolineata* (21/22/R3) and tetraploid sexual species, *P. multifida* (K1/M2). Based on results of cpDNA, these hybrids are similar to *P. multifida* (haplotype I). This inferred that *P. multifida* was the maternal genome donor in the allopolyploidization process of *P. cretica* 'Mayi'. Moreover, these results indicated that the coupling of SSCP and the DNA sequencing methods have greatly contributed to resolving the hybrid origin in polyploid ferns, which will be useful tools to be applied in other fern species.

Keywords: fern, hybrid, polyploidy, DNA marker, single strand conformation polymorphism (SSCP)

บทนำ

เฟินสกุล *Pteris* L. มีเขตการกระจายพันธุ์ทั่วโลก ซึ่งมีรายงานว่ามีความมากกว่า 250 ชนิด (Chao et al., 2012) โดยชนิดซึ่งได้รับความนิยมมากในการปลูกเลี้ยงเป็นไม้ประดับกระถางคือกูดผีเสื้อ (*P. cretica* L.) ซึ่งมีสายพันธุ์ปลูกหลากหลายและเป็นที่นิยมในหลายประเทศ (Foster, 1995) โดยมีรายงานว่ากูดผีเสื้อมีพันธุ์ปลูกมากถึง 17 พันธุ์ (Graf, 1980) เช่น พันธุ์ปลูก Parkeri พันธุ์ปลูก Rivertoniana พันธุ์ปลูก Wimsettii พันธุ์ปลูก Albolinaeta หรือเฟินเงินแคะ (*P. cretica* var. *albolineata* Hook.) และพันธุ์ปลูก Mayi เป็นต้น โดยพันธุ์ปลูก Mayi และเฟินเงินแคะมีลักษณะที่คล้ายกันคือมีแถบสีขาวบริเวณกลางแผ่นใบ แต่พันธุ์ปลูก Mayi มีลักษณะที่แตกต่างจากเฟินเงินแคะคือมีปีก (wing) ที่เส้นแกนใบมากกว่าหนึ่งปีก มีจำนวนคู่ใบมากกว่า และบริเวณปลายใบย่อยแตกออกเป็นแฉก (crisate) (Graf, 1980) โดยรูปแบบการสืบพันธุ์ (reproductive mode) ของกูดผีเสื้อนั้นพบทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual, SEX) ซึ่งจะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (ไข่และสเปิร์ม) ที่ลดจำนวนโครโมโซมลงครึ่งหนึ่งตามปกติ และอะกาโมสปอร์ส (agamosporous, AGA) ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศผ่านทางสปอร์ โดยเป็นรูปแบบเดียวกับอะโพมิซิส (apomixis) ที่พบในพืชดอก (Raghavan, 1989) โดยการสืบพันธุ์รูปแบบนี้จะมีการสร้างสปอร์ที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับต้นระยะสปอโรไฟท์ และแกมีโทไฟท์จะสร้างต้นสปอโรไฟท์จากเนื้อเยื่อของแกมีโทไฟท์เองโดยไม่ผ่านการปฏิสนธิ ซึ่งแกมีโทไฟท์ของเฟินที่สืบพันธุ์ในรูปแบบนี้จะสามารถสร้างได้เฉพาะแอนเทอริเดียม (antheridium) ซึ่งจะผลิตสเปิร์มที่ไม่ลดจำนวนโครโมโซม (unre-

duced sperm) แม้ว่าบางกรณีจะมีการสร้างอาร์คิโกเนียม (archegonium) แต่ก็จจะฝ่อไปและไม่สามารถผลิตไข่ที่ทำหน้าที่ได้ (Suzuki and Iwatsuki 1990; Huang et al., 2011) โดยรูปแบบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในกูดผีเสื้อนั้นมีรายงานว่าพบเฉพาะที่ประเทศจีน (Kato et al., 1992) ในขณะที่รูปแบบการสืบพันธุ์แบบอะกาโมสปอร์สนั้นสามารถพบได้หลาย cytotype คือ 2x 3x 4x และ 5x ซึ่งมีการกระจายพันธุ์กว้างทั่วโลกยกเว้นในเขตขั้วโลก (Matsumoto, 1976; Chao et al., 2012) จากการศึกษาของความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเฟินในกลุ่มกูดผีเสื้อ (*P. cretica* group) โดย Jaruwattanaphan et al. (2013) พบว่าเฟินเงินแคะ ($2n=3x=87$, AGA) มีจุดกำเนิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างกูดผีเสื้อ ($2n=2x=87$, AGA) ซึ่งเป็นสายพันธุ์พ่อ (paternal race) และบรรพบุรุษซึ่งมีสองจีโนมของ *P. ryukyuensis* Tagawa ($2n=4x=116$, SEX) เป็นสายพันธุ์แม่ (maternal race) ดังนั้นการศึกษารั้วนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบหาสายพันธุ์พ่อและแม่ของกูดผีเสื้อพันธุ์ปลูก Mayi ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีลักษณะใกล้เคียงกับเฟินเงินแคะ โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอและเครื่องหมาย SSCP (single-strand conformation polymorphism) ของยีนในนิวเคลียสและคลอโรพลาสต์

วิธีการศึกษา

ทำการตรวจนับจำนวนสปอร์ในอับสปอร์เพื่อตรวจสอบรูปแบบการสืบพันธุ์ซึ่งมีประสิทธิภาพสำหรับเฟินในสกุล *Pteris* (Chao et al., 2010; Huang et al., 2011) หากพบ 32 สปอร์หรือน้อยกว่าต่อหนึ่งอับสปอร์จะแสดงรูปแบบการสืบพันธุ์แบบอะกาโมสปอร์ส และ

64 สปอร์ต่อหนึ่งอับสปอร์จะแสดงถึงรูปแบบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Suzuki and Iwatsuki, 1990) โดยทำการนับจำนวนสปอร์ตัวอย่างละ 5 อับสปอร์ในส่วนของการศึกษาทางชีวโมเลกุล จีโนมิกซ์ดีเอ็นเอถูกสกัดจากตัวอย่างใบของกุฎผีเสื้อสายพันธุ์ปลูก Mayi จำนวนสองตัวอย่างจากตลาดไม้ประดับในประเทศญี่ปุ่นและประเทศไทย โดยใช้ DNeasy Plant Mini Kit ของบริษัท Qiagen ประเทศญี่ปุ่น และทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในนิวเคลียส (*gapCp*) และคลอโรพลาสต์ (*rbcl* และ *trnV-trnM*) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ดังแสดงใน Table 1 อัตราส่วน และการตั้งค่าของปฏิกิริยา PCR ทำตามวิธีของ Jaruwattanaphan et al. (2013) ในส่วนของยีน *gapCp* ทำการตรวจสอบฟอสโมร์ฟิซึมของผลผลิตพีซีอาร์ด้วยการวิเคราะห์ SSCP (single-strand conformation polymorphism) หรือ PCR-SSCP ตามวิธีของ Watano et al. (2004) โดยนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วมาทำให้เสียสภาพในฟอร์มาไมด์ และ loading dye ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วนำมาแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้เจล MDE (mutation detection enhancement) ของบริษัท Takara Bio ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งประกอบด้วย 2% glycerol ภายใต้อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ใช้กระแสไฟ 300 V เป็นเวลา 11 ชั่วโมง แล้ว

นำเจลไปย้อมด้วย silver nitrate ต่อจากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบนด์ดีเอ็นเอที่ตรวจพบในการวิเคราะห์ PCR-SSCP โดยการตัดแถบดีเอ็นเอจากเจลที่ทำให้แห้งแล้วตามวิธีของ Jaruwattanaphan et al. (2013) แล้วนำมาบ่มใน TE buffer ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมึนแล้วนำสารละลายส่วนบนมาใช้เป็นแม่แบบในการทำ PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์เดิม หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วมากำจัดดีเอ็นเอสายเดี่ยวออกก่อนนำไปหาลำดับเบสด้วย 2% ExoSAP-IT บริษัท USB สหรัฐอเมริกา โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที และ 15 นาที ตามลำดับและนำไปใช้เป็นแม่แบบสำหรับการหาลำดับเบส โดยใช้ BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit บริษัท Applied Biosystems สหรัฐอเมริกา ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วย ABI 3500 genetic analyser บริษัท Applied Biosystems และนำผลของลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับรูปแบบลำดับเบส (sequence type) ของเฟินในกลุ่มกุฎผีเสื้อ (*Pteris cretica* group) จากการศึกษาของ Jaruwattanaphan et al. (2013) ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 1999) การวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ (ยีน *rbcl* และตำแหน่ง *trnV-trnM*) ทำเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ของยีน *gapCp*

Table 1 Primers sequences for PCR amplification and sequencing in this study. a = Jaruwattanaphan et al. (2013), b = Hasabe et al. (1994), and c = Nishizawa and Watano (2000)

DNA Region	Primer	5'-3' Primer sequence	Origin
<i>gapCp</i>	cretica_long9F	CGCTTAGAGAAAGGAGCTTCA	a
	cretica_long10R	CCCTTTCATAGGACCTTCAGC	a
<i>rbcl</i>	rbcl-aF	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	b
	rbcl-cF	TGAAAACGTGAATTCCTCAACCGTTTATGCG	b
	rbcl-cR	GCAGCAGCTAGTTCGGGGCTCCA	b
<i>trnV</i> (UAC)- <i>trnM</i> (CAU)	trnV-M/F	TGTAAACGAGTTGCTCTACC	c
	trnV-M/R	CTAACCACTGAGTTAAGTAG	c

ผลการศึกษา

จำนวนสปอร์ของทั้งสองตัวอย่างมีจำนวน 32 สปอร์ต่อหนึ่งอับสปอร์และสปอร์มีรูปร่างปกติซึ่งแสดงถึงรูปแบบการสืบพันธุ์แบบอะกาโมสปอร์ส (Table 2) การวิเคราะห์ความผันแปรของอัลลีลในยีน *gapCp* ด้วยวิธี PCR-SSCP และการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าตัวอย่างจากประเทศไทย และญี่ปุ่น มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 9 แถบเหมือนกัน หลังจากวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอโดยการหาลำดับเบสพบว่า 8 แถบเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวไม่มีการซ้อนทับของอัลลีลเนื่องจากไม่พบ heterozygous event จาก sequencing chromatogram และมีหนึ่งแถบซึ่งมีการซ้อนทับกันของอัล

ลีล 21 และ 22 (Figure 1-A) และเมื่อนำลำดับเบสที่วิเคราะห์ได้จากแถบดีเอ็นเอไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเฟินในกลุ่มกุฎผีเสื้อ (Jaruwattanaphan et al., 2013) พบว่าจีโนมโทปีของกุฎผีเสื้อพันธุ์ลูก Mayi คือ 21/22/R3/K1/M2 ซึ่งมี 3 อัลลีลที่พบได้ในเฟินเงินแฉะ (21 22 และ R3) และ 2 อัลลีล (K1 และ M2) จากเฟินหางไก่ (*P. multifida* Poir., $2n=4x=116$, SEX) นอกจากนั้นพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในคลอโรพลาสต์ของยีน *rbcL* และตำแหน่ง *trnV-trnM* มีรูปแบบนิวคลีโอไทด์เหมือนกันในทั้งสองตัวอย่าง และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของเฟินในกลุ่มกุฎผีเสื้อในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็น haplotype I ซึ่งเป็น haplotype ที่พบได้ในเฟินหางไก่ (Table 2)

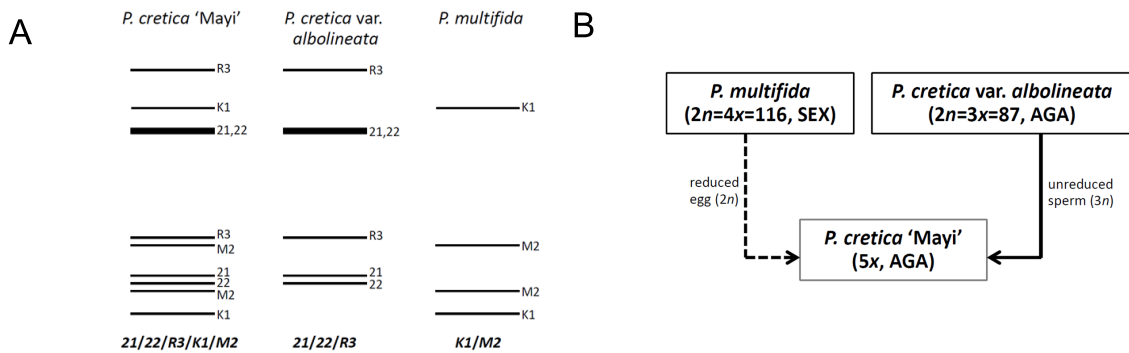


Figure 1 A: schematic explanation for PCR-SSCP band patterns at *gapCp* gene of *Pteris cretica* 'Mayi', *P. cretica* var. *albolineata*, and *P. multifida*. The interpreted genotype (allele combination) is shown under each lane. B: Hypothesis of the origin of *Pteris cretica* 'Mayi'. Arrow represents nuclear DNA contribution and dash arrow represents cpDNA contribution.

Table 2 Interpretation of allelic constitutions of nuclear gene and chloroplast DNA haplotype in *P. cretica* 'Mayi' and putative parental species.

Taxa	Spore*	Locality	cpDNA haplotype	<i>gapCp</i> sequence type				
<i>P. cretica</i> 'Mayi' ^a	32 (N)	Jap.	I	21	22	R3	K1	M2
	32 (N)	Thai.	I	21	22	R3	K1	M2
<i>P. cretica</i> var. <i>albolineata</i> ^b	32 (N)	Jap./Thai.	J	21	22	R3		
<i>P. multifida</i> ^b	64 (N)	Thai./Ma.	I	K1	M2			

*number of spores per sporangium. N = normal shaped spores

** a = this study, b = Jaruwattanaphan et al. (2013)

Jap. = Japan, Thai. = Thailand, Ma. = Malaysi

วิจารณ์

จากหลักฐานของยีนในนิวเคลียสของกูดฟีเลื้อยพันธุ์ปลูก Mayi พบว่ามีจีโนไทป์ของยีน *gapCp* เป็น 21/22/R3/K1/M2 ซึ่งเป็นการรวมของจีโนมจากเฟินเงินแคระ (21/22/R3) และเฟินหางไก่ (K1/M2) ผ่านทางขบวนการ allopolyploidization โดยรูปแบบดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของกูดฟีเลื้อยพันธุ์ปลูกนี้เหมือนกับเฟินหางไก่ (haplotype I) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเฟินหางไก่เป็นสายพันธุ์แม่ (maternal race) และมีเฟินเงินแคระซึ่งมีรูปแบบการสืบพันธุ์แบบอะกาโมสปอร์รัส (Matsumoto, 1976; Jaruwattanaphan et al., 2013) เป็นสายพันธุ์พ่อ (paternal race) (Figure 1-B) สอดคล้องกับ Laird and Sheffield (1986) และ Huang et al. (2011) ซึ่งรายงานว่ากูดฟีเลื้อย และ *P. cretica* var. *roweri* ซึ่งมีรูปแบบการสืบพันธุ์แบบอะกาโมสปอร์รัสจะสร้างเฉพาะสเปิร์มเท่านั้นและไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย เมื่อพิจารณาถึงจำนวนจีโนมของกูดฟีเลื้อยพันธุ์ปลูก Mayi จะพบว่ากูดฟีเลื้อยพันธุ์ปลูกนี้ควรมีห้าจีโนม (pentaploid) เนื่องจากผลรวมของการปฏิสนธิระหว่างสเปิร์มของเฟินเงินแคระซึ่งไม่ลดจำนวนโครโมโซม ($3n$) กับไข่ที่ลดจำนวนโครโมโซมลงครึ่งหนึ่ง ($2n$) ของเฟินหางไก่ (Figure 1-B) นอกจากนี้จำนวนอัลลีลที่พบก็สามารถแสดงถึงจำนวนจีโนมได้ โดยกูดฟีเลื้อยพันธุ์ปลูกนี้มี 5 อัลลีลในยีนตำแหน่งเดียวกัน (single loci) ซึ่งสามารถคาดคะเนได้ว่าควรมีห้าจีโนมหรือมากกว่านั้น เนื่องจากเครื่องหมาย SSCP ไม่สามารถระบุ gene dosage ได้ (Ebihara et al., 2005) ซึ่งสอดคล้องกับ จักรพงษ์ (2549) ซึ่งทำการสร้างลูกผสมระหว่างเฟินเงินแคระ และเฟินหางไก่ปลายแฉก (*P. multifida* 'Crestata', $2n=4x=116$) และพบว่าลูกผสมที่ได้มีห้าจีโนม ($2n=5x=145$) นอกจากนี้หลักฐานทางชีวโมเลกุลแล้วลักษณะทางสัณฐานวิทยา ก็สามารถสนับสนุนถึงการถ่ายทอดจีโนมของเฟินหางไก่ได้ โดยลักษณะปีก (wing) ที่เส้นแขนใบที่พบในกูดฟีเลื้อยพันธุ์ปลูก Mayi ซึ่งมีมากกว่าหนึ่งปีกนั้นอาจจะถ่ายทอดมาจากเฟินหางไก่ สอดคล้องกับ Nakato

and Hyodo (2011) และจักรพงษ์ (2549) ที่พบว่าลักษณะปีกที่เส้นแขนใบมากกว่าสองปีกสามารถพบได้ในลูกผสมที่มีเฟินหางไก่เป็นหนึ่งในสายพันธุ์แม่ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาจีโนไทป์ของเฟินหางไก่ปลายแฉกเพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะแฉกที่ปลายใบของกูดฟีเลื้อยพันธุ์ปลูก Mayi จากการศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่องหมาย SSCP ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการค้นหาสายพันธุ์พ่อและแม่ของลูกผสมได้ดีโดยเฉพาะในเฟินที่มีจำนวนจีโนมหลายชุดเนื่องจากสามารถวิเคราะห์และจำแนกชนิดของอัลลีลได้ง่ายและค่าใช้จ่ายต่ำกว่าการโคลนผลผลิตพีซีอาร์ (PCR Cloning)

สรุป

กูดฟีเลื้อยพันธุ์ปลูก Mayi จำนวนสองตัวอย่างทั้งจากประเทศไทยและประเทศญี่ปุ่น นำจะมีต้นกำเนิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างเฟินเงินแคระซึ่งมีรูปแบบการสืบพันธุ์แบบอะกาโมสปอร์รัส ($2n=3x=87$) และเฟินหางไก่ซึ่งมีรูปแบบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ($2n=4x=116$) และการใช้เครื่องหมาย SSCP ร่วมกับการวิเคราะห์ลำดับเบสสามารถใช้วิเคราะห์จุดกำเนิดของเฟินลูกผสมที่เป็นโพลีพลอยด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำขอบคุณ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนจาก Monbukagakusho scholarship (Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Government of Japan: MEXT)

เอกสารอ้างอิง

จักรพงษ์ รัตตะมณี. 2549. การถ่ายทอดลักษณะใบแฉกและจำนวนโครโมโซมของเฟิร์นบางชนิดในสกุล *Asplenium*, *Pteris* และ *Nephrolepis* วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- Chao, Y.-S., H.-Y. Liu, Y.-C. Chiang, and W.-L. Chiou. 2012. Polyploidy and speciation in *Pteris* (Pteridaceae). *Journal of Botany* 2012:ID 817920.
- Ebihara, A., H. Ishikawa, S. Matsumoto, S.-J. Lin, K. Iwatsuki, M. Takayama, Y. Watano, and M. Ito. 2005. Nuclear DNA, chloroplast DNA, and ploidy analysis clarified biological complexity of the *Vandenboschia radicans* complex (Hymenophyllaceae) in Japan and adjacent areas. *American Journal of Botany* 92: 1535-1547.
- Foster, F.G. 1995. *Ferns to know and grow*. 3rd Edition. Timber Press, Oregon.
- Graf, A.B. 1980. *Exotica series 3: pictorial cyclopedia of exotic plants from tropical and near-tropic regions*. Roehrs Company, New Jersey.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hasebe, M., T. Omori, M. Nakazawa, T. Sano, M. Kato, and K. Iwatsuki. 1994. rbcL gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 91: 5730-5734.
- Huang, Y.-M., S.-Y. Hsu, T.-H. Hsieh, H.-M. Chou, and W.-L. Chiou. 2011. Three *Pteris* species (Pteridaceae: Pteridophyta) reproduce by apogamy. *Botanical Studies*. 52: 79-87.
- Jaruwattanaphan, T., S. Matsumoto, and Y. Watano. 2013. Reconstructing hybrid speciation events in the *Pteris cretica* group (Pteridaceae) in Japan and adjacent regions. *Systematic Botany*. 38: 15-27.
- Kato, M., N. Nakato, X. Cheng, and K. Iwatsuki. 1992. Cytotaxonomic study of ferns of Yunnan, Southwestern China. *The Botanical Magazine Tokyo* 105: 105-124.
- Laird, S. and E. Sheffield. 1986. Antheridia and archegonia of the apogamous fern *Pteris cretica*. *Annals of Botany*. 57: 139-143.
- Matsumoto, S. 1976. Cytogenetic study on related taxa of *Pteris cretica* and *P. multifida*. M. S. thesis. Tokyo University of Agriculture, Tokyo. (In Japanese).
- Nakato, N. and S. Hyodo. 2011. The origin of triploid *Pteris xsefuricola* (Pteridaceae) from Ehime Prefecture, Japan. *The Journal of phytogeography and taxonomy* 58: 115-121. (in Japanese)
- Nishizawa, T. and Y. Watano. 2000. Primer pairs suitable for PCR-SSCP analysis of chloroplast DNA in angiosperms. *Journal of Phytogeography and Taxonomy*. 48: 63-66.
- Raghavan, V. 1989. *Developmental biology of fern gametophytes*. Cambridge University Press, NY.
- Suzuki, T. and K. Iwatsuki. 1990. Genetic variation in apogamous fern *Pteris cretica* L. in Japan. *Heredity* 65: 221-227.
- Watano, Y., A. Kanai, and N. Tani. 2004. Genetic structure of hybrid zones between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae) revealed by molecular hybrid index analysis. *American Journal of Botany*. 91: 65-72.