

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไผ่ชนิดต่าง ๆ

- 1.1 เก็บใบอ่อนของไผ่ จำนวน 26 ชนิดๆ ละ 1 ตัวอย่าง จากสถานีทดลองปลูกพรรณไม้หินลับ
อ. บ่อพลอย จ.กาญจนบุรี ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไผ่ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษา

ชนิดไผ่	ชื่อวิทยาศาสตร์
1. ไผ่บงดำ	<i>Bambusa tulda</i>
2. ไผ่รวกดำ	<i>Thyrsostachys oliveri</i>
3. ไผ่ข้าวหลาม	<i>Cephalostachyum pergracile</i>
4. ไผ่ป่า	<i>Bambusa bambos</i>
5. ไผ่รวก	<i>Thyrsostachys siamensis</i>
6. ไผ่ตงพันธุ์ศรีปราชญ์	<i>Dendrocalamus asper</i>
7. ไผ่สีทอง	<i>Schizostachyum brachycladum</i>
8. ไผ่เหลือง	<i>Bambusa vulgaris</i> Shrader ex. H. Wendland
9. ไผ่หวาน	<i>Bambusa</i> sp.
10. ไผ่บงใหญ่	<i>Dendrocalamus brandisii</i>
11. ไผ่ชางนวล	<i>Dendrocalamus membranaceus</i>
12. ไผ่กำยาน	<i>Bambusa vulgaris</i> (Green variety)
13. ไผ่ตง	<i>Dendrocalamus asper</i>
14. ไผ่ปล้องยาว	ยังไม่ได้รับการกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์
15. ไผ่เลี้ยง	<i>Bambusa multiplex</i>
16. ไผ่เพ็ก	<i>Vietnamosasa pusilla</i>
17. ไผ่หลอด	<i>Neohouzeaua mekongensis</i>
18. ไผ่หก	<i>Dendrocalamus hamiltonii</i>
19. ไผ่มันหมู	ยังไม่ได้รับการกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์
20. ไผ่สีสุก	<i>Bambusa blumeana</i>

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดไผ่	ชื่อวิทยาศาสตร์
21. ไผ่เลี้ยงมัน	ยังไม่ได้รับการกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์
22. ไผ่ไร่	<i>Gigantochloa albociliata</i>
23. ไผ่น้ำเต้า	<i>Bambusa vulgaris</i> Shrader cv. Wamin (Brandis)
24. ไผ่ผาก	<i>Gigantochloa densa</i>
25. ไผ่ล่ำมะลอก	<i>Bambusa longispiculata</i>
26. ไผ่กระแสน	ยังไม่ได้รับการกำหนดชื่อวิทยาศาสตร์

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรไผ่ป่า

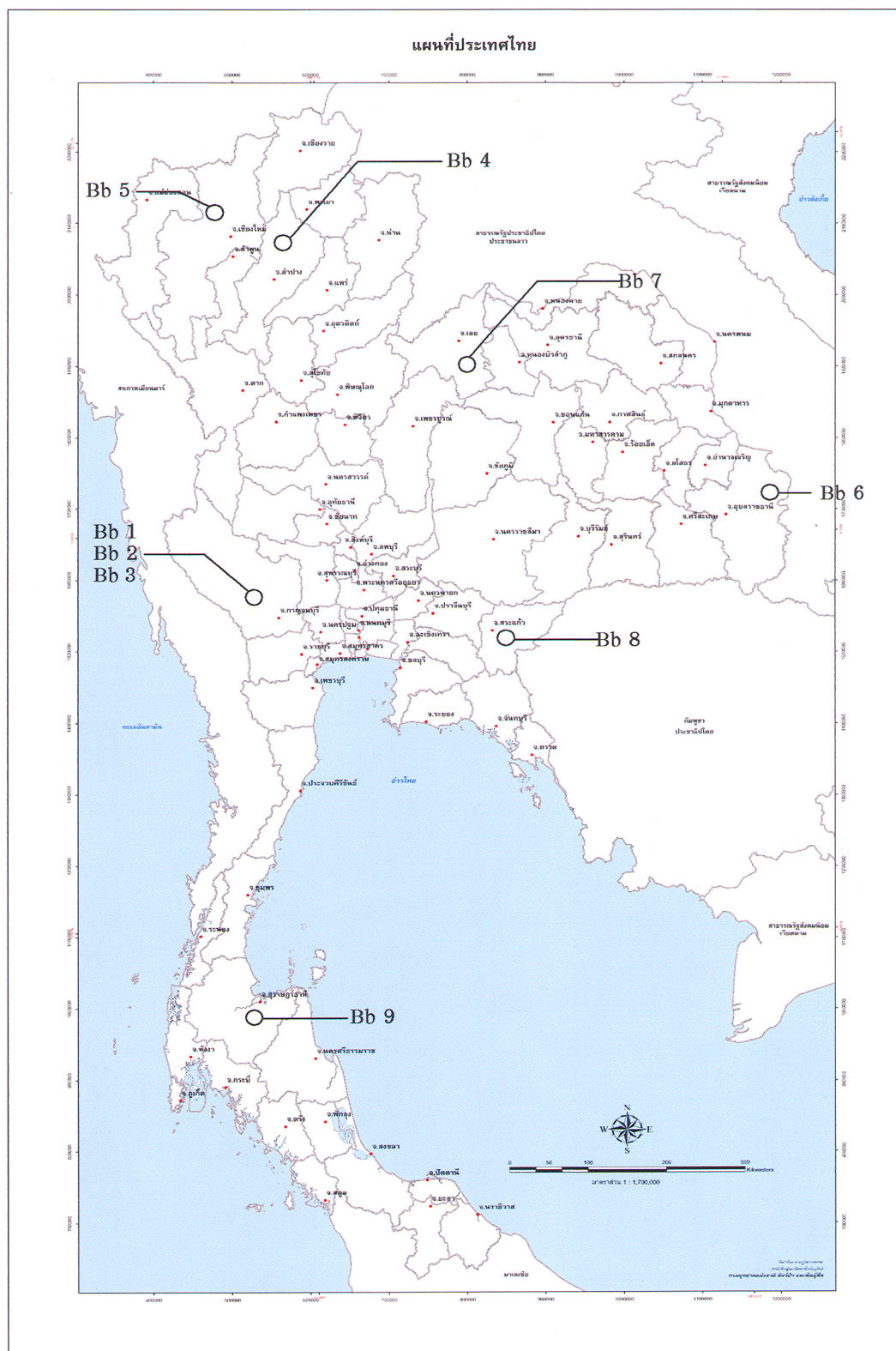
2.1 ใบอ่อนของไผ่ป่า (*Bambusa bambos*) ที่เก็บจากป่าธรรมชาติทั่วทุกภาคของประเทศไทย จำนวน 9 แหล่ง แหล่งละ 30 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2 และภาพที่ 19)

ตารางที่ 2 แสดงแหล่งเก็บตัวอย่างไผ่ป่า (*Bambusa bambos*) จากแหล่งธรรมชาติของประเทศไทย

สัญลักษณ์	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง ต่อแหล่ง	พิกัดทางภูมิศาสตร์	
			^o N	^o E
Bb 1	อ. บ่อพลอย จ. กาญจนบุรี (1)	30	14°15'36.66"	99°42'41.88"
Bb 2	อ. ไทรโยค จ. กาญจนบุรี (2)	30	14°41'56.59"	98°39'50.41"
Bb 3	อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี (3)	30	14°09'46.59"	99°05'20.41"
Bb 4	อ. จาว จ. ลำปาง	30	18°41'56.10"	99°42'25.49"
Bb 5	อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่	30	19°16'09.55"	98°54'57.44"
Bb 6	อ. โขงเจียม จ. อุบลราชธานี	30	15°18'29.90"	105°30'23.51"
Bb 7	อ. ภูกระดึง จ. เลย	30	16°51'57.94"	101°46'07.21"
Bb 8	อ. เมือง จ. สระแก้ว	30	13°59'50.06"	102°16'38.79"
Bb 9	อ. เมือง จ. สุราษฎร์ธานี	30	8°57'41.73"	99°05'51.86"

หมายเหตุ: ^oN คือ ตำแหน่ง Latitude

^oE คือ ตำแหน่ง Longitude



ภาพที่ 19 แผนที่แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างไผ่ป่า (*Bambusa bambos*)

3. การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของไผ่

การเตรียมดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP; Amplified fragment length polymorphism) และไมโครแซเทลไลท์ (microsatellite) ต้องได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี ไม่มีการปนเปื้อนจากสิ่งต่างๆ เพื่อป้องกันการตัดดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์และการวิเคราะห์ผลที่ผิดพลาด โดยการทดลองนี้ได้นำตัวอย่างใบอ่อนของไผ่แต่ละชนิดมาล้างเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดอยู่บริเวณผิวใบตามวิธีของ Zhang *et al.* (1997) แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีที่ประยุกต์มาจากวิธีการสกัดของ Doyle and Doyle (1990) และ Changtragoon *et al.* (1996) โดยคัดเลือกใบพืชที่ไม่อ่อนหรือแก่จนเกินไป ซึ่งมาประมาณ 0.2 กรัม บดในโกรงบดยาที่มีไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วย้ายลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 2X CTAB buffer (2% CTAB, 1% PVP, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 % β -mercapto-ethanol) 600 ไมโครลิตร และเติม 10%CTAB และ 10%PVP อย่างละ 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่เตรียมไว้ นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบแช่ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปเติมสารละลายที่มีส่วนผสมของคลอโรฟอร์มกับไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (อัตราส่วน 24 ต่อ 1 โดยปริมาตร) ลงไปประมาณ 700 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนและกำจัดโปรตีน เช้าเบาๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นที่ระดับความเร็ว 12,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนมาใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ส่วนที่เหลือทิ้งไป ตกตะกอนและกำจัดโปรตีนด้วยคลอโรฟอร์มกับไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ซ้ำอีก 2-3 รอบ แล้วเติมไอโซโพรพานอล 600 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอผสมเบาๆ ให้เข้ากันนำไปแช่ไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-20 นาที นำไปปั่นที่ระดับความเร็วรอบและอุณหภูมิเท่าเดิม เป็นเวลา 5-10 นาที เทไอโซโพรพานอลทิ้ง ระวังอย่าให้ตะกอนที่ก้นหลอดหลุดออกมา แล้วเติม 80% เอทานอลลงไป 800 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอและนำไปปั่นที่ระดับความเร็ว 12,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วเท 80% เอทานอลทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอซ้ำด้วย 80% เอทานอลอีก 2 ครั้ง ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยการเปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 20-30 นาที นำมาละลายใน 1X TE buffer (10 mM Tris -HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 50-100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส

4. การวัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

การวัดคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยเตรียมอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8% ซึ่งใช้อะกาโรส 0.4 กรัม ใน 1X TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA) ปริมาตร 50 มิลลิตร จากนั้นนำไปละลายด้วยเครื่องไมโครเวฟจนกระทั่งผงอะกาโรสหลอมละลายจนหมด รอให้อะกาโรสอุ่นลงแล้วเทลงในถาดเจลที่มีหัวเสียบไว้ แล้วปล่อยให้เย็นจนกระทั่งเจลแข็งตัว เมื่อเจลแข็งตัวแล้วดึงหัวออก ย้ายเจลที่ได้ออกใน horizontal chamber โดยให้ด้านที่มีช่องหัวอยู่ด้านซ้าย แล้วเท 1X TAE buffer ลงจนท่วมแผ่นเจล ผสมสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างกับโหลดดิงบัฟเฟอร์ (6X loading buffer: 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol) ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 แล้วค่อยๆ หยอดตัวอย่างลงในช่องหัวด้วยไมโครปิเปตต์ ปิดฝาเครื่องแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านจากซ้ายไปขวา โดยใช้กระแสไฟฟ้า 80-100 โวลต์ และปิดกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของโหลดดิงบัฟเฟอร์ (loading buffer) เคลื่อนที่ไปได้ระยะทางที่เหมาะสม นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) เป็นเวลา 10-15 นาที จากนั้นล้างแผ่นเจลโดยแช่ในถาดที่มีน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 3-5 นาที นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb แล้วบันทึกภาพ

5. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี

5.1 เตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ

5.1.1 ตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *EcoRI* และ *MseI* เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณในการทำพีซีอาร์ (PCR; Polymerase Chain Reaction) ได้ดี และมีขนาดเหมาะสมในการแยกบน non-denaturing polyacrylamide gel โดยเติมดีเอ็นเอและสารละลายแต่ละชนิดในหลอดขนาด 0.5 มิลลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2.50 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 เท่า (1X reaction buffer: 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.025% Triton X-100) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด คือ *EcoRI* (20 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.125 ไมโครลิตร และ *MseI* (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.25 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยนำไปหมุนเหวี่ยงในเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์ เป็นเวลา 0.5-1 นาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5.1.2 เชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับการเพิ่มปริมาณ โดย adapter ที่ต่อเข้ากับปลายของชิ้นดีเอ็นเอ จะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งจับเกาะของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ ซึ่ง adapter ที่ใช้ คือ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter มีลำดับเบส ดังตารางที่ 3 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter นั้น ทำโดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิดแล้ว ซึ่งมีปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาเติมสารละลาย *EcoRI* adapter (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ *MseI* adapter (25 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 เท่า (1X T4 ligase buffer: ประกอบด้วย 1mM ATP, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT 25 mg/ml BSA) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ T4 DNA ligase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วให้ได้ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยนำไปหมุนเหวี่ยงในเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์เป็นเวลา 0.5-1 นาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องหรือที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์

5.2.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบส 1 ตัวที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ดังตารางที่ 3 (preamplification) เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ และให้มีความจำเพาะในขั้นหนึ่งก่อน โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ adapter แล้ว ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมนลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เติมสารละลายไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ E-A และไพรเมอร์ M-C (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำพีซีอาร์ความเข้มข้น 10 เท่า (10X PCR buffer: 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl) 2.50 ไมโครลิตร dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 2.50 ไมโครลิตร และสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (25 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วให้ได้ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยนำไปหมุนเหวี่ยงในเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์เป็นเวลา 0.5-1 นาที นำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ รุ่น Biometra T-gradient ตั้งอุณหภูมิและเวลาของเครื่องจำนวน 20 รอบ ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที แล้วแบ่งบางส่วนมาเจือจาง 20 เท่าด้วยน้ำกลั่น เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นต่อไปส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส

5.2.2 เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบส 3 ตัว ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ ดังตารางที่ 3 (selective amplification) เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ และให้มีความจำเพาะมากขึ้น โดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด (forward และ reverse primer) ชนิดละ 8 แบบ ตามตารางที่ 3 ซึ่งจะทำให้ได้คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอนนี้เป็นจำนวน 64 คู่ และองค์ประกอบของปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้มีดังนี้ นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางในขั้นตอน preamplification แล้ว ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร เติมสารละลายไพรเมอร์ 2 ชนิด ไพรเมอร์ E+3, และไพรเมอร์ M+3 (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) อย่างละ 1 ไมโครลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำพีซีอาร์ ความเข้มข้น 10 เท่า (10X PCR buffer: 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl) 2.0 ไมโครลิตร dNTP mix (ประกอบด้วย: dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร และสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (25 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยนำไปหมุนเหวี่ยงในเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์เป็นเวลา 0.5–1 นาที นำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอและทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ โดยใช้โปรแกรม touch down PCR ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 1 รอบ ลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และต่อด้วยการตั้งอุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 23 รอบ

5.3.3 แยกชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องแยกขนาดแบบ non-denaturing polyacrylamide ด้วยเครื่อง Gel-scan 3000 ที่ความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ 6 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.6X TBE buffer ที่ผสมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ผ่านกระแสไฟฟ้า 800 โวลต์ นาน 60 นาที เปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 bp

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter และ primer ในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย เอเอฟแอลพี

สัญลักษณ์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Adapter	
<i>Eco</i> RI adapter	5' - CTCGTAGACTGCGTACC 3' 3' - CATCTGACGCATGGTTAA- 5'
<i>Mse</i> I adapter	5' -GACGATGAGTCCTGAG-3' 3' -TACTCAGGACTCAT-5'
Primer+1	
E-A	5' -GACTGCGTACCAATTCA-3'
M-C	5' -GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
Primer+3	
E-AAC	5' -GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
E-AAG	5' -GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
E-ACA	5' -GACTGCGTACCAATTCACA-3'
E-ACT	5' -GACTGCGTACCAATTCACT-3'
E-ACC	5' -GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
E-ACG	5' -GACTGCGTACCAATTCACG-3'
E-AGC	5' -GACTGCGTACCAATTCAGC-3'
E-AGG	5' -GACTGCGTACCAATTCAGG-3'
M-CAA	5' -GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
M-CAC	5' -GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
M-CAG	5' -GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
M-CAT	5' -GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
M-CTA	5' -GATGAGTCCTGAGTAACTA-3'
M-CTC	5' -GATGAGTCCTGAGTAACTC-3'
M-CTG	5' -GATGAGTCCTGAGTAACTG-3'
M-CTT	5' -GATGAGTCCTGAGTAAC TT -3'

5.3 การวิเคราะห์ผลเอเอฟแอลพี

5.3.1 คัดเลือกคูไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากทั้งหมด 64 คู่ โดยเลือกเฉพาะคู่ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ชัดเจนและแสดงความแตกต่างระหว่างไฟแต่ละชนิด

5.3.2 คำนวณหาร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่อยู่ในสภาวะหลากหลายรูปแบบ (percentage of polymorphism) และจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคูไพรเมอร์ได้จาก

$$\text{percentage of polymorphism} = \frac{\text{จำนวนของยีนหรือแถบดีเอ็นเอในสภาวะหลากหลายรูปแบบ} \times 100}{\text{จำนวนของยีนหรือแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ศึกษา}}$$

$$\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคูไพรเมอร์} = \frac{\text{จำนวนของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด}}{\text{จำนวนคูไพรเมอร์ที่ศึกษา}}$$

5.3.3 วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจำเพาะ (specific band) ที่ปรากฏในแต่ละคูไพรเมอร์ของไฟแต่ละชนิดเพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการจำแนกชนิดพันธุ์ไฟ

5.3.4 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยแปลผลข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของไฟแต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบจากความเหมือนและความแตกต่างของรูปแบบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยพันธุ์ที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ให้สัญลักษณ์เป็น “1” ส่วนพันธุ์ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกันนั้น ให้สัญลักษณ์เป็น “0” และคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธี simple matching (Sneath and Sokal, 1973) นำมาเข้าสู่ตาราง matrix โดยใช้ Nei and Li (1979) similarity index เพื่อใช้ในการจัดกลุ่มศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค unweigthed pair group method of arithmetic average (UPGMA) (Sneath and Sokal, 1973) โดยใช้โปรแกรม NTSYS-pc version 2.01e (Rohlf, 1993) และแสดงผลในรูปแบบของ phylogenetic tree

6. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์

6.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์

นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมสารละลายไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ forward และ reverse ดังตารางที่ 4 ความเข้มข้น 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำพีซีอาร์ ความเข้มข้น 10 เท่า (10X PCR buffer: 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl) 1.0 ไมโครลิตร dNTP mix (dATP dCTP dGTP และ dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร และสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (25 มิลลิโมลาร์) ดังตารางที่ 4 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.08 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วให้ได้ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยนำไปหมุนเหวี่ยงในเครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์เป็นเวลา 0.5–1 นาที นำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้น ดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรมดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 50 หรือ 55 หรือ 60 องศาเซลเซียส ตามอุณหภูมิของ annealing ของไพรเมอร์ 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 วินาที จำนวน 35 รอบ

แยกชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ตัวกลางชนิด non-denaturing polyacrylamide gel ภายใต้เครื่อง Gel-scan 3000 ที่ความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ 6 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.6X TBE buffer ที่ผสมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ผ่านกระแสไฟฟ้า 1,000 โวลต์ นาน 45 นาที เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

6.2 การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครแซทเทลไลต์

นำข้อมูลจีโนไทป์ของไผ่ป่า (*Bambusa bambos*) แต่ละต้นในแต่ละประชากรมาคำนวณ ค่าต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

6.2.1 จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อตำแหน่ง (number of allele per locus, N)
(Hedrick, 1985) คำนวณได้จาก

$$N = \frac{\text{จำนวนอัลลีลทั้งหมดทุกตำแหน่ง}}{\text{จำนวนตำแหน่งยีนทั้งหมดที่ศึกษา}}$$

ตารางที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับเบสแกน อุณหภูมิในการจับเกาะ (annealing temperature, T_A) ขนาดผลผลิตของพีซีอาร์ และความเข้มข้นแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ของคูไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ลำดับที่	ตำแหน่ง	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3')	ลำดับเบสแกน	T_A ($^{\circ}C$)	ความเข้มข้นแมกนีเซียม คลอไรด์ (mM)	ขนาดของผลผลิต พีซีอาร์ (คู่เบส)	GenBank Accession number
1	DTLBb 1	F: GTGCGCTGATGTTGTTTGTG R: CGGCCAATATCCATATTTCCATC	$(GTT)_2TGT(GTT)_2$	55	2.5	200	–
2	DTLBb 8	F: AGGTTGACCAATTTGGGGAAAG R: TTTGTGTATGGTTGTAGGAAGTCG	$(CT)_3$	50	2.5	160	–
3	DTLBb 15	F: GCC TAA AA T TTC GGG TGA TCC R: CAG CCG TCA CAG CTC ACA AC	$(CAA)_{19}$	55	2.5	280	–
4	DTLBb 20	F:CTG CCA TGG TGA CAC TAG AAC G R: CCT CAA ACA CAG GAA TTT CAA GC	$(GT)_9A(TA)_3(GA)_{10}$	60	1.5	290	–
5	DTLBb 29	F: TTACAACCAAGAGAGCGCGATAC R: GCAGACACTTTACCGACTTCAGC	$(GA)_5GG(CA)_8$	60	1.5	160	–
6	DTLBb 47	F: GATCAGACTTCAACACAAACGTAC R: TGTGTCAACTGTCAAGTCCTCTTC	$(CT)_{16}AT(CT)_7$	60	1.5	140	–
7	DTLBb 50	R: GATAAATAACTGCATCGTTGGT R: CAGAAGTTACTGTCAGAGAGACG	$(CT)_{16}$	60	1.5	150	–
8	AJ507491	F: TTCGTT GCT CCTGCAAGG R: CTG TGG TTC TAC TAT GCG C	$(CA)_7$	50	2.5	150	AJ507491
9	AJ507492	F: CTAGCAAACGCACAGTG R: CAGTGTGATACACGTCC	$(AC)_5C(AC)_2GC(AC)_4$	50	2.5	206	AJ507492

6.2.2 จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งที่แท้จริง (effective number of allele, n_e) (Kimura and Crow, 1964) โดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

$$n_e = 1/\sum p_i^2$$

เมื่อ p_i = คือความถี่อัลลีลที่ i

6.2.3 ความถี่อัลลีล (allele frequency) ของแต่ละตำแหน่งโดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh *et al.*, 1999) ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

$$X_i = (2H_A + H_B)/2N$$

เมื่อ X_i คือ ความถี่ของอัลลีลที่ i

H_A คือ จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัส

H_B คือ จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส

N คือ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

6.2.4 ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) โดยใช้โปรแกรม TFPGA (Miller, 1997) ดังนี้

6.2.4.1 ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (observed heterozygosity, H_o)

$$H_o = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}}$$

6.2.4.2 ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากค่าคาดหวัง (expected heterozygosity, H_e) (Nei, 1978)

$$h_k = 2n(1 - \sum X_i^2)/2n-1$$

$$H_e = \sum h_k/r$$

เมื่อ	h_k	คือ	ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ตำแหน่ง k
	X_i	คือ	ความถี่ของอัลลีล i ที่ตำแหน่ง k
	n	คือ	จำนวนอัลลีลที่ตำแหน่ง k
	r	คือ	จำนวนตำแหน่งที่ทำการศึกษา
	H_e	คือ	ค่าเฉลี่ยเฮเทอโรไซโกซิตีต่อตำแหน่ง

6.2.5 การทดสอบสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium)

ทดสอบความถี่ของจีโนไทป์แต่ละตำแหน่งของแต่ละประชากรว่ามีความสอดคล้องกับสมดุลฮาร์ดี-ไวน์เบิร์กหรือไม่ โดยการประมาณค่า exact p -value ตามวิธีของ Guo and Thomson (1992) ในโปรแกรม TFPGA version 1.3 (Miller, 1997)

6.2.6 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance)

ทำการสุ่มป้อนข้อมูลด้วยวิธี bootstrapping (1,000 ครั้ง) ในการประมาณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Nei's unbiased genetic distance) โดยใช้โปรแกรม TFPGA version 1.3 (Miller, 1997) ซึ่งคำนวณค่าได้จาก

$$D = -\ln I \quad (\text{Nei, 1978})$$

$$\text{เมื่อ } I (\text{genetic distance}) = \frac{j_{xy}}{\sqrt{j_x j_y}}$$

$$\begin{aligned} \text{โดยที่ } j_{xy} &= \sum x_i y_i \\ j_x &= \sum x_i^2 \\ j_y &= \sum y_i^2 \end{aligned}$$

เมื่อ x_i คือ ความถี่อัลลีลใด ๆ ของประชากร x

y_i คือ ความถี่อัลลีลใดๆ ของประชากร y

$$\begin{aligned}\text{ดังนั้น } j_{xy} \text{ เฉลี่ย} &= j_{xy}/r \\ j_x \text{ เฉลี่ย} &= j_x/r \\ j_y \text{ เฉลี่ย} &= j_y/r\end{aligned}$$

เมื่อ r คือ จำนวนตำแหน่งที่ทำการศึกษา

6.2.7 การจัดแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้มาจัดแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) โดยวิธี UPGMA (unweighted pair group method of arithmetic average) (Sneath and Sokal, 1973) โดยใช้โปรแกรม TFPGA version 1.3 (Miller, 1997)

6.2.8 ค่าสัมประสิทธิ์เอฟ (F-coefficient)(Wright, 1978)

ทดสอบว่าประชากรที่ศึกษามีการแบ่งออกเป็นประชากรย่อยหรือไม่ โดยการคำนวณค่าประมาณ $F(F_{it})$, $\theta(F_{st})$ และ $f(F_{is})$ ตามลำดับ (Weir and Cockerham, 1984) ในโปรแกรม TFPGA (Miller, 1997) ซึ่งสามารถคำนวณค่าต่างๆ ได้ดังนี้

$$\begin{aligned}F_{is} &= (H_T - H_S)/H_T \\ F_{it} &= (H_T - H_O)/H_T \\ F_{st} &= (H_S - H_O)/H_S\end{aligned}$$

เมื่อ H_O คือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกตในประชากรนั้น
 H_T คือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากค่าคาดหวังในประชากรทั้งหมด

$$\begin{aligned}\text{โดย } P_k &= \sum P_{ik}/n \\ H_T &= 1 - \sum P_k^2 \\ H_S &\text{ คือ ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากค่าคาดหวังในประชากรกลุ่มย่อย}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{โดย } H_{is} &= 1 - \sum P_{ik}^2 \\ H_s &= H_{is}/n \end{aligned}$$

เมื่อ P_{ik} คือ ค่าความถี่อัลลีลในประชากร k
 N คือ จำนวนประชากรย่อย

7. สถานที่ทำการทดลอง

7.1 ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอและไอโซเอนไซม์ กลุ่มงานวิจัยอนุรักษ์พันธุ์กรรมไม้ป่าและเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้ และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช จตุจักร กรุงเทพฯ

7.2 สถานที่ทดลองปลูกพรรณไม้หินลับ (กรมป่าไม้) อ. บ่อพลอย จ.กาญจนบุรี

7.3 พื้นที่อุทยานแห่งชาติและพื้นที่ป่าอนุรักษ์ตามภาคต่างๆ ในประเทศไทยที่มีกระจายพันธุ์ของไผ่ป่า

8. ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2546

สิ้นสุดการทดลอง เดือน มีนาคม พ.ศ. 2549