วิทยานิพนธ์

ความสัมพันธ์ของปรงในสกุล *Cycas* โดยใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการกระจายพันธุ์

INTERSPECIFIC RELATIONSHIPS AMONG *CYCAS* SPECIES USING CHLOROPLAST DNA COMPARED TO MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND GEOGRAPHIC DISTRIBUTION

นางสาวณัฐฐาพิชามณชุ์ อุดมโภชน์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. ๒๕๕๑

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยาของเซลล์และโมเลกุล)

ปริญญา

ชีววิทยาของเซลล์และโมเลกุล	วิทยาศาสตร์พื้นพิภพ
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง ความสัมพันธ์ของปรงในสกุล *Cycas* โดยใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการกระจายพันธุ์

Intraspecific Relationships among *Cycas* Species Using Chloroplast DNA Compared to Morphological Characteristics and Geographic Distribution

นามผู้วิจัย นางสาวณัฐฐาพิชามณชุ์ อุดมโภชน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์มิ่งขวัญ มิ่งเมือง, Ph.D.)

กรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์อมรา ทองปาน, Ph.D.)

กรรมการ .....

(รองศาสตราจารย์มาลี ณ นคร, M.S.)

กรรมการ .....

(อาจารย์กุลศิริ ช. กรับส์, Ph.D)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พรสวาท วัฒนกูล, Dr.rer.nat.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความสัมพันธ์ของปรงในสกุล *Cycas* โดยใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการกระจายพันธุ์

Interspecific Relationships among *Cycas* Species Using Chloroplast DNA Compared to Morphological Characteristics and Geographic Distribution

โดย

นางสาวณัฐฐาพิชามณชุ์ อุดมโภชน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยาของเซลล์และโมเลกุล)
พ.ศ. 2551

ณัฐฐาพิชามณชุ์ อุดมโภชน์ 2551: ความสัมพันธ์ของปรงในสกุล *Cycas* โดยใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการกระจายพันธุ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยาของเซลล์และโมเลกุล) สาขาวิชาชีววิทยาของเซลล์และโมเลกุล ภาควิชาวิทยาศาสตร์พื้นพิภพ ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์มิ่งขวัญ มิ่งเมือง, Ph.D. 120 หน้า

การจัดจำแนกและหาความสัมพันธ์ของปรงในสกุล *Cycas* 22 ชนิด จากทวีปเอเชียและออสเตรเลียซึ่งปลูกอยู่ที่สวนนงนุช จังหวัดชลบุรี โดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความแตกต่างของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ ทั้งนี้เมื่อทดลองใช้ไพรเมอร์ 5 ชนิด เพื่อตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ psbM^{F}-trnD^{GUCR} ชนิดเดียวเท่านั้นที่สามารถใช้จำแนก *Cycas* ทั้ง 22 ชนิดนี้ได้ โดยให้ขนาดความยาวของนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 969 ถึง 984 คู่เบส นอกจากนี้บริเวณ psbM^{F}-trnD^{GUCR} intergenic spacer ของปรงในสกุล *Cycas* มีค่าเฉลี่ยของเบสดังนี้ อะดีนีน 0.341 ไธมีน 0.286 กัวนีน 0.205 และไซโตซีน 0.168 มีค่ากัวนีน/ไซโตซีน อยู่ในช่วง 34.9-38.6% และมีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ในรูปของ transition/ transversion และ insertion/deletion ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน โดยมีค่าอัตราการเกิด transition ต่อ transversion (Ts/Tv ratio) เท่ากับ 1.406 นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มปรงที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปออสเตรเลียได้แก่ *C. xipholepis, C. cairnsiana, C. angulata* และ *C. campestris* มีการเพิ่มของเบสกัวนีนในตำแหน่งที่ 633 และมีการลดลงของเบสกัวนีนและไธมีนในตำแหน่งที่ 450 และ 481 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มปรงที่มีถิ่นกำเนิดในเวียดนาม ได้แก่ *C. balansae, C. collina, C. branchycantha* และ *C. dolichophylla* มีการเพิ่มของเบสกัวนีนในตำแหน่งที่ 721-752 เมื่อนำข้อแตกต่างเหล่านี้มาประมวลผลเป็นความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนา การโดยใช้โปรแกรม Mega version 4.0 ด้วยวิธี maximum parsimony จัดกลุ่ม *Cycas* ได้ 2 กลุ่มใหญ่ 6 กลุ่มย่อย วิธี neighbour-joining จัดกลุ่มได้ 2 กลุ่มใหญ่ 4 กลุ่มย่อย เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 37 ลักษณะ พบว่ามีความสอดคล้องกันตามลักษณะของลำต้น ใบ เมล็ด โคนเพศผู้และโคนเพศเมียทั้งหมด 24 ลักษณะ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติของปรงแต่ละกลุ่มอีกด้วย

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Natthaphichamon Udomphot 2008: Intraspecific Relationships among *Cycas* Species Using Chloroplast DNA Compared to Morphological Characteristics and Geographic Distribution. Master of Science (Cell and Molecular Biology), Major Field: Cell and Molecular Biology, Department of Eart Sciences. Thesis Advisor: Associate Professor Mingkwan Mingmuang, Ph.D. 120 pages.

Twenty-two species of *Cycas*, naturally distributed in Asia and Australia were collectively grown at NongNooch Garden, Chonburi Province. They were comparatively identified based on their morphology and the difference in chloroplast DNA. Using 5 different primers to find the differences in nucleotide sequence of these *Cycas*, only one primer, i.e., psbM^{F}-trnD^{GUCR}, could positively classify them showing 969 to 984 nucleotide base pair long. The mean base composition of psbM^{F}-trnD^{GUCR} intergenic spacer among these 22 *Cycas* were 0.341 (A) 0.286 (T) 0.205 (G) and 0.168 (C). The G/C content was found ranging from 34.9-38.6%. Changing of nucleotides came in the forms of transitions/transversions and insertion/deletion giving the average ratio of transition/transversion (Ts/Tv) of 1.406. In addition, *Cycas* from Australia, i.e., *C. xipholepis, C. cairnsiana, C. angulata* and *C. campestris* had guanine addition at position 633 and deletion of guanine and thymine at positions 450 and 481, respectively. Moreover, *Cycas* from Vietnam, i.e., *C. balansae, C. collina, C. branchycantha* and *C. dolichophylla* had guanine addition at different position from 721 to 725 basepair. Phylogenetic relations were drawn based on Mega version 4.0 using "maximum parsimony" and "neighbour-joining" methods. The former method classified the 22 species of *Cycas* into 2 groups and 6 subgroups while the latter made them into 2 groups and 4 subgroups Twenty-four out of 37 morphological characteristics, mostly in the forms of stem, leaf, seed, male and female cone, supported their genetic identification and also agreed with their natural geographic distribution.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มิ่งขวัญ มิ่งเมือง ประธานกรรมการที่ปรึกษา ในความกรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่และสนับสนุนการศึกษาวิจัยตลอดจนให้คำปรึกษาและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมรา ทองปาน กรรมการวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร. มาลี ณ นคร และ ดร. กุลศิริ ช. กรับส์ กรรมการวิชารอง และ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้อย่างดียิ่ง

ขอกราบขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาสนับสนุนเงินทุนในการดำเนินงานวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ คุณกัมพล ตันสัจจา ผู้อำนวยการสวนนงนุช คุณปทิตตา พักดีวิเศษ เลขาผู้อำนวยการ และคุณ Anders J. Lindstrom ผู้จัดการแผนกรวบรวมพันธุ์ไม้สวนนงนุช ซึ่งอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างและให้คำแนะนำ

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วง สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และทุกๆ คนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังในในการศึกษาตลอดมา

ณัฐฐาพิชามณชุ์ อุดมโภชน์

เมษายน 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	27
สรุป	98
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	100
ภาคผนวก	107

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงชนิดและถิ่นกำเนิดของปรงสกุล *Cycas* ที่ใช้ในการทดลอง	19
2	แสดงชนิดของไพรเมอร์ และสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม	23
3	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาลำต้นและใบของปรงในสกุล *Cycas* 22 ชนิด	39
4	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาก้านใบและใบย่อยของปรงในสกุล *Cycas* 22 ชนิด	40
5	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเส้นกลางใบย่อยและเกล็ดใบของปรงในสกุล *Cycas* 22 ชนิด	41
6	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาโคนเพศผู้ โคนเพศเมียและเมล็ดของปรงในสกุล *Cycas* 22 ชนิด	42
7	แสดงองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ psbM-trnD intergenic spacer และเปรียบเทียบข้อมูลเบสกับปรงสกุล *Cycas* 22 ชนิด	67
8	แสดงอัตราการเกิด transition (Ts) และ transversion (Tv)	78
9	แสดงค่าเฉลี่ยของระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของปรงสกุล *Cycas* โดยใช้โปรแกรม MEGA 4.0	79
10	แสดงค่า tree length, ค่า consistency index สำหรับทุก sites และค่าเฉพาะ parsimony informative site	80

ตารางผนวกที่

1	แสดงส่วนเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับพลาสมิด	108
2	แสดงสูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	109

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ของปรงสกุล *Cycas*	12
2	ภาพภ่ายแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรงในสกุล *Cycas*	45
3	ภาพถ่ายแสดงลักษณะลำต้นของปรงสกุล *Cycas*	46
4	ภาพถ่ายแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบปรงในสกุล *Cycas*	47
5	ภาพถ่ายแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบย่อย โดยแสดงรูปร่าง สี และ	49
6	ภาพถ่ายแสดงลักษณะใบย่อยส่วนปลายใบในปรงสกุล *Cycas*	50
7	ภาพถ่ายลักษณะการโค้งตัวของใบเมื่อเทียบกับแกนกลางลำต้น	51
8	ภาพถ่ายแสดงลักษณะเกล็ดใบหุ้มยอด (cataphyll) ของปรงสกุล *Cycas*	52
9	ภาพวาดแสดงรูปร่างของลักษณะโคนเพศผู้	53
10	ภาพวาดแสดงของลักษณะรูปร่างของ megasporophyll lamina	54
11	ภาพวาดแสดงลักษณะขอบของ megasporophyll lamina	55
12	ภาพวาดแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Cycas* ที่มีถิ่นกำเนิดแถบทวีปเอเชีย	56
13	ภาพวาดแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Cycas* ที่มีถิ่นกำเนิดแถบทวีปออสเตรเลีย	61
14	Phylogenetic tree ที่สร้างจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา	63
15	แสดงผลการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของปรงสกุล *Cycas* 22 ชนิด	69
16	แสดง maximum parsimony tree สร้างจากข้อมูล psbM-trnD intergenic spacer ของ *Cycas* 22 ชนิด ทดสอบ bootstrap 1,000 ซ้ำ	82
17	แสดง neighbour-joining tree สร้างจากข้อมูล psbM-trnD intergenic spacer ของ *Cycas* 22 ชนิด ทดสอบ bootstrap 1,000 ซ้ำ	84
18	แสดงการจัดกลุ่มปรงสกุล *Cycas* 22 ชนิด โดยใช้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบ maximum parsimony กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา	87
19	แสดงการจักกลุ่มปรงสกุล *Cycas* 22 ชนิด โดยใช้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบ neighbour-joining กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา	93

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
1	แสดงผลการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ trnF^{GAA}-3'trnL^{UAA} ในปรงสกุล *Cycas* 22 ชนิด	111
2	แสดงผลการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ trnS^{UGA}-trnfM^{CAU} ในปรงสกุล *Cycas* 22 ชนิด	113
3	แสดงผลการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 5'trnL^{UAAR}-3'trnL^{UAAF}ปรงสกุล *Cycas* 22 ชนิด	116
4	แสดงผลการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ atpB-rbcLในปรงสกุล *Cycas* 22 ชนิด	118

ความสัมพันธ์ของปรงในสกุล *Cycas* โดยใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการกระจายพันธุ์

Interspecific Relationships among *Cycas* Species Using Chloroplast DNA Compared to Morphological Characteristics and Geographic Distribution

คำนำ

ปรง (cycads) เป็นกลุ่มพืชเมล็ดเปลือย (naked seed) ที่โบราณที่สุดและจัดอยู่ใน Class Gymnospermae ในปัจจุบันถือเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง นิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับเพื่อความสวยงาม เมื่อเจริญเต็มที่จะสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ที่เรียกว่าโคน (cone) ซึ่งอยู่แยกกันระหว่างต้นเพศผู้และต้นเพศเมีย (dioecious)

การจัดจำแนกและการศึกษาความสัมพันธ์ของปรงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาต้องอาศัยความชำนาญและอาจเกิดความผิดพลาดขึ้นได้ถ้าพืชตัวอย่างมีลักษณะใกล้เคียงกันมาก นอกจากนี้ลักษณะพืชอาจเปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อมอีกด้วย การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลจึงได้เข้ามามีส่วนช่วยในการจัดจำแนกและศึกษาความสัมพันธ์ของกลุ่มพืชให้มีความชัดเจนยิ่งขึ้น โดยเริ่มแรกมีการหาลักษณะเฉพาะของเฮเทอโรโครมาทินที่เกิดขึ้นบนโครโมโซม เพื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันรวมไปถึงการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ต่อมามีการศึกษาจากการใช้เทคนิค allozyme แต่มีข้อจำกัดบางประการคือสามารถตรวจสอบได้เพียงบางส่วนของดีเอ็นเอ เนื่องจากเป็นการศึกษาโปรตีนซึ่งแปรรหัสมาจากดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าว และเนื้อเยื่อพืชที่นำมาทำการทดลองจำเป็นต้องมีอายุเท่ากันและมาจากชิ้นส่วนเดียวกัน นอกจากนี้เนื้อเยื่อพืชที่นำมาศึกษาเก็บไว้ได้ระยะเวลาสั้นมาก ในขณะที่การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลซึ่งศึกษาในระดับดีเอ็นเอมีข้อได้เปรียบมากกว่า เนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้พืชที่มีอายุเท่ากันและเป็นเนื้อเยื่อของพืชที่มาจากส่วนใดของต้นก็ได้ ยิ่งไปกว่านั้นยังสามารถเก็บตัวอย่างได้เป็นเวลานาน ด้วยเหตุนี้การศึกษาความสัมพันธ์โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลจึงทำให้การจัดจำแนกพืชทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม่นยำ และรวดเร็วมาก

ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาวิวัฒนาการของพืชในระดับโมเลกุล เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่น คือมีจีโนมขนาดเล็ก เป็นส่วนประกอบที่พบอยู่ทุกส่วนใน

พืช นอกจากนี้ ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ยังประกอบไปด้วยข้อมูลสำคัญที่บ่งชี้ลักษณะเฉพาะของพืชแต่ละชนิด และส่วนของนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์มีการเปลี่ยนแปลงในระดับต่ำ จึงเหมาะสำหรับนำมาศึกษาในงานด้านวิวัฒนาการของพืชในระดับโมเลกุลเป็นอย่างยิ่ง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อจัดจำแนกชนิดของปรงในสกุล *Cycas* โดยใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์

2. ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) จากข้อมูลทางชีวโมเลกุล

การตรวจเอกสาร

ปรง (cycads) เป็นพืชเมล็ดเปลือย (gymnosperm) โดยเมล็ดจะผลิตอยู่ในโคน (cone) ไม่ถูกห่อหุ้มด้วยรังไข่ เพศผู้และเพศเมียอยู่แยกกันคนละต้น (dioecious) เมื่อดูจากลักษณะภายนอกโดยทั่วไปคล้ายพืชจำพวกเฟิร์น หรือ ปาล์ม จึงมักเข้าใจผิดและสับสนได้ง่าย ปรงเป็นพืชที่พบทั่วไปบริเวณเขตร้อน (tropical) กึ่งร้อน (subtropical) และบริเวณที่มีอากาศอบอุ่น (Jones, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่าปรงเป็นพืชที่โบราณที่สุด พืชกลุ่มนี้จัดอยู่ในชั้น (class) Gymnospermae สามารถจัดได้เป็น 7 อันดับ (order) ได้แก่ Cycadofilicales (seed fern), Bennettitales (fossil cycads), Cordaitales (fossils), Cycadales (ปรง), Ginkgoales (แปะก๊วย), Coniferales (สน) และ Gentales (มะเมื่อย) (กาญจนา, 2541) ปรงนั้นเรียกว่าเป็น “living fossil” ซึ่งหมายความว่า ปรงมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แต่ถ้าเทียบกับพืชในวงศ์ (family) เดียวกันปรงถือว่าเป็นพืชที่มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด (ฐิติ, 2549) ปัจจุบันมีปรงอยู่ประมาณ 250 ชนิด จัดอยู่ใน 3 วงศ์ คือ Cycadaceae, Stangeriaceae และ Zamiacece ซึ่งในทั้ง 3 วงศ์นี้ยังจำแนกย่อยได้อีก 11 สกุล (genera) คือ *Cycas*, *Stangeria*, *Bowneia*, *Dioon*, *Encephalartos*, *Macrozamia*, *Lepidozamia*, *Ceratozamia*, *Microcycas*, *Zamia* และ *Chigua* ในปัจจุบันการจัดจำแนกปรงถือตามหลักของ Stevenson (1992) ดังนี้:-

Order Cycadales

Suborder Cycadineae

Family Cycadaceae

Genus *Cycas*

Suborder Zamiineae

Family Stangeriaceae

Subfamily Encephalartoideae

Genus *Stangeria*

Subfamily Bowenioideae

Genus *Bowenia*

Family Zamiaceae

Subfamily Encephalartoideae

Tribe Diooeae

Genus *Dioon*

Tribe Encephalarteae

Subtribe Encephalartinae

Genus *Encephalartos*

Subtribe Macrozamiinae

Genus *Macrozamia* and *Lepidozamia*

Subfamily Zamioideae

Tribe Ceratozamieae

Genus *Ceratozamia*

Tribe Zamieae

Subtribe Microcycadinae

Genus *Microcycas*

Subtribe Zamiinae

Genus *Zamia* and *Chigua*

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของปรง

ปรงสกุล *Cycas* จัดอยู่ในอันดับ Cycadales วงศ์ Cycadaceae มีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทางตอนใต้ของจีน มาเลเซีย ฟิลิปินส์ อินโดนีเซีย นิวกีนี ออสเตรเลีย เกาะต่างๆ ทางตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิก แอฟริกา และ มาดากัสการ์ (Stevenson, 1999) ชื่อสกุล *Cycas* ตั้งขึ้นโดย Carl van Linnaeus เมื่อ ค.ศ. 1753 โดยมีรากศัพท์มาจากภาษากรีก ว่า *koikas* หมายถึง ปาล์มชนิดหนึ่ง ต่อมาเพี้ยนเป็น *kykas* และในปัจจุบันใช้เป็น *Cycas* (Jones, 1998)

ปรงมีราก 2 ชนิดคือ รากแก้ว (tap root) มีขนาดใหญ่หยั่งรากลึกลงสู่ดิน และรากแขนง (lateral root) มีลักษณะรวมเป็นกระจุกหนาแน่น เจริญอยู่ระดับผิวดินและแผ่ออกได้ทุกทิศทาง ปรงบางสกุลที่มีลำต้นใต้ดิน เช่น *Zamia* บางชนิดพบรากแขนงที่ทำหน้าที่สะสมอาหารคล้ายรากแก้ว นอกจากรากแก้วและรากแขนงแล้ว ปรงยังมีรากพิเศษ เรียกว่า รากคอรัลลอยด์ (coralloid root) ซึ่งเกิดจากรากแขนงที่บริเวณปลายรากพองออกเป็นกระเปาะช่วยยึดเหนี่ยวลำต้นไว้กับดิน พบเฉพาะในสกุล *Cycas* ที่เจริญให้หน่อย่อย (bulbil) ภายในรากพิเศษยังพบว่ามีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ที่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศ ช่วยให้ปรงสามารถเจริญอยู่ในสภาวะที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินแร่ธาตุต่ำ (Stevenson, 1980; 1990 ; Webb and Slone, 1987)

ปรงส่วนใหญ่มีลำต้นเหนือดินรูปทรงกระบอก ไม่แตกแขนง แต่ในต้นที่มีอายุมากพบว่ามีการแตกแขนงได้ เช่น ปรงสกุล *Ceratozamia*, *Cycas*, *Dioon*, *Encephalartos*, *Macrozamia* และ *Zamia* มีลำต้นเหนือดินและใต้ดิน (subterranean) ได้แก่ สกุล *Lepidozamia* ส่วนสกุล *Microcycas* จะมีลำต้นเหมือนต้นไม้ (arborescent) สกุล *Stangeria*, *Bowenia* และ *Chigua* มีเฉพาะลำต้นใต้ดิน (Stevenson, 1990; Norstog and Nicholls, 1997)

ใบปรงเป็นใบประกอบแบบขนนก (pinnately compound leaf) แตกจากลำต้นโดยแตกรอบลำต้นแบบเกลียว (spiral) ปรงมีใบสองชนิด คือ เกล็ดใบหุ้มยอด (scale leaves หรือ cataphyll) เป็นใบขนาดเล็กสีน้ำตาล พบบริเวณปลายยอดของลำต้น และใบแท้ (foliage leaves) เป็นใบประกอบแบบขนนกขนาดใหญ่ ความยาวของใบปรงแต่ละชนิดแตกต่างกัน ใบอ่อนของปรงมีขนปกคลุม แต่ใบแก่จะเกลี้ยง ลักษณะของใบอ่อนแรกเกิด (ptyxis) จะม้วนงอ (Stevenson, 1990; Jones, 1993) ส่วนบนก้านใบ และแกนกลางใบพบหนาม มี 2 ชนิด คือ หนามแท้ (true spines) เกิดจากการลดรูปของใบย่อยที่อยู่บริเวณโคนใบ และหนามแบบ prickles เกิดจากเนื้อเยื่อชั้นผิว (epidermal cell) หู

ใบ (stipule) จะอยู่บริเวณโคนใบแท้และเกล็ดใบหุ้มยอด หูใบมีสองแบบ คือ หูใบที่มีลักษณะแคระแกรนเห็นไม่ชัดภายในหูใบไม่มีท่อลำเลียง และหูใบที่เชื่อมติดกันเป็นหลอดหุ้มลำต้น (Stevenson, 1981)

ปรงเป็นพืชที่มีโคนเพศผู้และโคนเพศเมียอยู่ต่างต้นกัน โดยปรงต้นเพศผู้จะสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ เรียกว่า staminate หรือ male cone มีขนาดใหญ่เกิดเดี่ยวๆ บริเวณปลายต้นประกอบด้วยแกนกลางมี microsporophyll เป็นใบพิเศษจัดเรียงเป็นเกลียวเล็กน้อยรอบแกนกลางทำหน้าที่รองรับ microsporangiumนี้ทำหน้าที่สร้าง microspore ส่วนต้นปรงเพศเมียจะสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ เรียกว่า ovulate cone หรือ pistillate cone หรือ female cone รูปร่างและขนาดของโคนเพศเมียมีความแตกต่างกันในปรงแต่ละชนิด โดยจะมีขนสีน้ำตาลปกคลุม ภายในโคนประกอบด้วย megasporophyll ฐานของ megasporophyll อาจมีไข่อ่อน (ovule) ขนาดใหญ่เกาะติดอยู่ เมื่อเกิดการ fertilization ไข่อ่อนจะพัฒนาเป็นเมล็ด (seed) ต่อไป (จันทนา, 2526 ; Jones, 1998)

จำนวนปรงในสกุล *Cycas*

Hill *et al*. (2004) รายงานการพบปรงสกุล *Cycas* ชนิดต่างๆ บริเวณแถบเอเชีย อินเดีย ออสเตรเลีย และ ทางตะวันตกเฉียงใต้ของมหาสมุทรแปซิฟิก พบว่า มีทั้งหมด 99 ชนิด ดังนี้:-

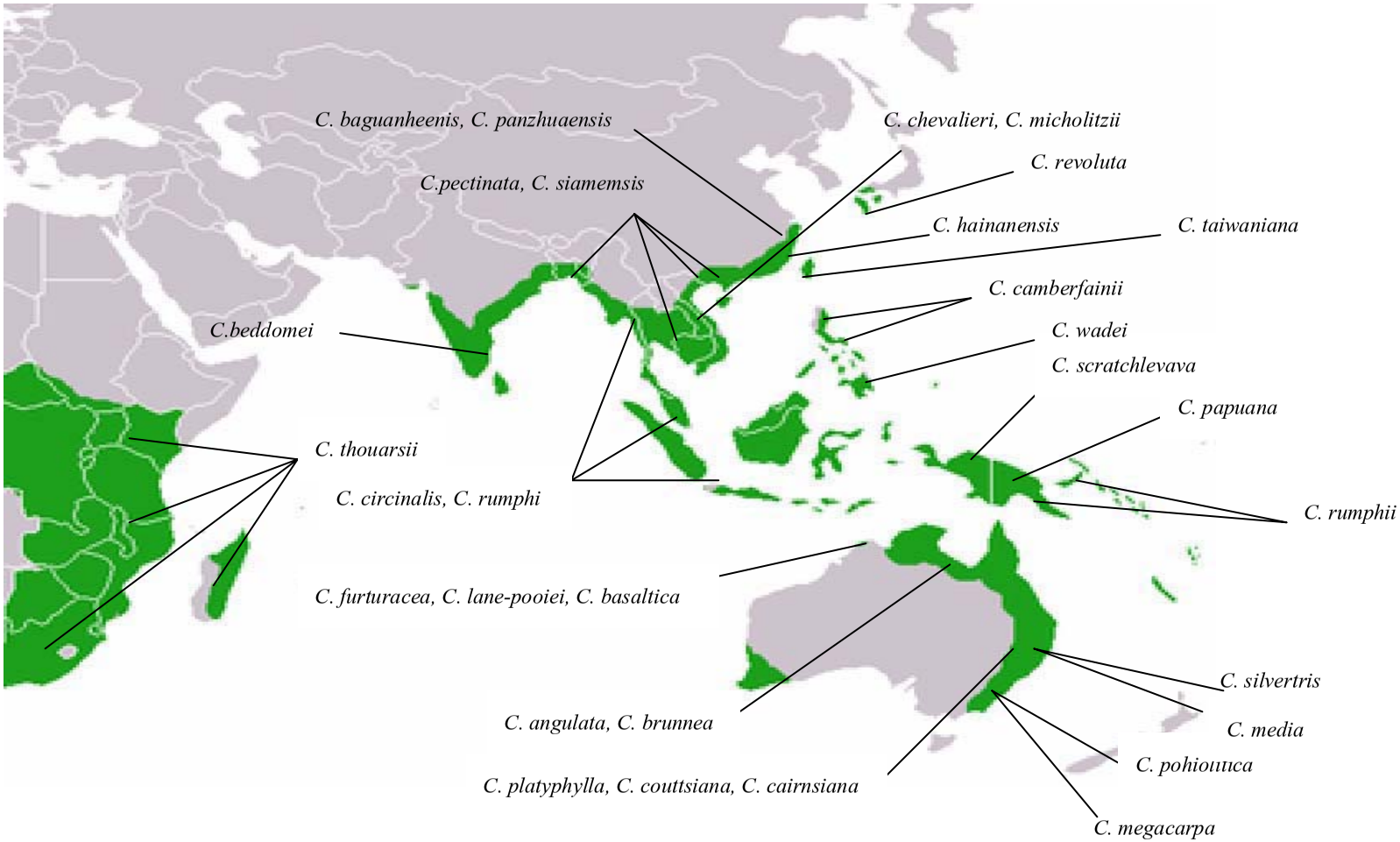
Species	Geographic distribution
1. *C. aculeata*	Vietnam
2. *C. angulata*	Australia
3. *C. apoa*	New Guinea
4. *C. arenicola*	Australia
5. *C. armstrongii*	Australia
6. *C. arnhemica*	Australia
subsp. *muninga*	Australia
subsp. *natja*	Australia
7. *C. badensis*	Australia

Species	Geographic distribution
8. *C. balansae*	China, Vietnam
9. *C. basaltica*	Australia
10. *C. beddomei*	India
11. *C. bifida*	China, Vietnam
12. *C. bougainvilleana*	New Britain, Solomon Islands
13. *C. brachycantha*	Vietnam
14. *C. brunnea*	Australia
15. *C. cairnsiana*	Australia
16. *C. calcicola*	Australia
17. *C. campestris*	New Guinea
18. *C. canalis*	Australia
subsp. *carinata*	Australia
19. *C. candida*	Australia
20. *C. chamaoensis*	Thailand
21. *C. chamberlainii*	Philippines
22. *C. changjiangensis*	China
23. *C. chevalieri*	Vietnam
24. *C. circinalis*	India
25. *C. clivicola*	Malaysia, Thailand
subsp. *lutea*	Cambodia, Thailand, Vietnam
26. *C. collina*	Vietnam
27. *C. condaoensis*	Vietnam
28. *C. conferta*	Australia
29. *C. couttsaina*	Australia
30. *C. cupida*	Australia

Species	Geographic distribution
31. *C. curranii*	Philippines
32. *C. debaoensis*	China
33. *C. desolata*	Australia
34. *C. diannanensis*	China, Vietnam
35. *C. dolichophylla*	China, Vietnam
36. *C. edentata*	Philippines
37. *C. elephantipes*	Thailand
38. *C. elongate*	Vietnam
39. *C. fairylakea*	China
40. *C. falcate*	Indonesia
41. *C. ferruginea*	Vietnam
42. *C. fugax*	Vietnam
43. *C. furfuracea*	Australia
44. *C. glauca*	East Timor, Indonesia
45. *C. guizhouensis*	China
46. *C. hainanensis*	China
47. *C. hoabinensis*	Vietnam
48. *C. hongheensis*	China
49. *C. inermis*	Vietnam
50. *C. javana*	Indonesia
51. *C. lane-poolei*	Australia
52. *C. lindstromii*	Vietnam
53. *C. litoralis*	Indonesia, Malaysia, Myanmar, Thailand, Vietnam
54. *C. maconochiei*	Australia
subsp. *lanata*	Australia
subsp. *viridis*	Australia

Species	Geographic distribution
55. *C. macrocarpa*	Malaysia, Thailand
56. *C. media*	Australia
subsp. *banksii*	Australia
subsp. *ensata*	Australia
57. *C. megacarpa*	Australia
58. *C. micholitzii*	Laos, Vietnam
59. *C. micronesica*	Micronesis
60. *C. multipinnata*	China, Vietnam
61. *C. nathorstii*	Sri Lanka
62. *C. nongnoochiae*	Thailand
63. *C. ophiolitica*	Australia
64. *C. orientis*	Australia
65. *C. pachypoda*	Vietnam
66. *C. panzhihuaensis*	China
67. *C. papuana*	New Guinea
68. *C. pectinata*	Bangladesh, Bhutan, China, India, Laos, Myanmar, Nepal, Thailand, Vietnam
69. *C. petraea*	Thailand
70. *C. platyphylla*	Australia
71. *C. pranburiensis*	Vietnam
72. *C. pruinosa*	Australia
73. *C. revolute*	Japan
74. *C. riuminiana*	Philippines
75. *C. rumphii*	Borneo, Indonesia, Java, Moluccan Islands, New Guinea, Sulawesi
76. *C. saxatilis*	Philippines
77. *C. schumanniana*	New Guinea

Species	Geographic distribution
78. *C. scratchleyana*	New Guinea
79. *C. seemannii*	Pacific Islands, New Caledonia, Tonga, Vanuatu
80. *C. segmentifida*	China, Vietnam
81. *C. semota*	Australia
82. *C. sexseminifera*	China, Vietnam
83. *C. siamensis*	Cambodia, Laos, Myanmar, Thailand, Vietnam
84. *C. silvestris*	Australia
85. *C. simplicipinna*	Laos, Myanmar, Thailand, Vietnam
86. *C. sphaerica*	India
87. *C. sundaica*	Indonesia
88. *C. szechuanensis*	China
89. *C. taitungensis*	Taiwan
90. *C. taiwaniana*	China
91. *C. tanqingii*	China, Vietnam
92. *C. tansachana*	Thailand
93. *C. thouarsii*	Africa, India
94. *C. tropophylla*	Vietnam
95. *C. tuckeri*	Australia
96. *C. wadei*	Philippines
97. *C. xipholepis*	Australia
98. *C. yorkiana*	Australia
99. *C. zeylanica*	Sri Lanka



ภาพที่ 1 การแพร่กระจายทางภูมิศาสตร์ของปรงสกุล *Cycas*

การจัดจำแนกและวิวัฒนาการของปรงสกุล *Cycas*

ปรงสกุล *Cycas* ตั้งชื่อในปี ค.ศ. 1753 โดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Carl von Linnaeus (Jones, 1998) โดย Linnaeus จัดปรงอยู่ในพืชกลุ่มเดียวกับปาล์ม จนกระทั่งปี ค.ศ. 1827 Robert Brown พบว่า ปรงเป็นพืชเมล็ดเปลือย และแตกต่างจากพวกปาล์ม ในช่วงปี ค.ศ. 1831-1840 Lindley และ Endlicher ได้ตั้งชื่อวงศ์ Cycadaceae แต่ก็ยังมีความสับสนในการจัดกลุ่มอนุกรมวิธานของปรงอยู่ จนในปี ค.ศ. 1898 Van Tieghem ได้จัดปรงอยู่ในกลุ่มพืชเมล็ดเปลือย (Norstog and Nicholls, 1997) ต่อมานักวิทยาศาสตร์สนใจที่จะจัดจำแนกปรงสกุล *Cycas* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเริ่มแรกได้มีการแยก *C. revolute* ออกจาก *Cycas* ชนิดอื่นๆ โดยใช้ลักษณะของขอบใบย่อย (Miquel, 1843) และหลังจากนั้นได้ใช้ลักษณะของการมี/ไม่มีขน (Miquel, 1861) ใช้การนับจำนวน ovules ต่อ megasporophyll และ Dehgan and Dehgan (1998) ได้ใช้ลักษณะทางกายวิภาคของใบปรงในการจำแนกชนิดของปรง ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างปรง 3 วงศ์ ประกอบด้วย Cycadaceae, Zamiaceae และ Stangeriaceae โดยใช้ลักษณะของการมี/ไม่มีเส้นกลางใบ และชนิดของเซลล์ที่พบในปรงแต่ละสกุลที่แตกต่างกัน แต่ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างในระดับสกุลได้

ปรงเป็นพืชที่จำแนกสายพันธุ์ได้ยากจึงมีการนำสารเคมีมาใช้ในการจัดจำแนก (chemotaxonomy)ปรง โดย Dossaji *et al.* (1975) ทำการตรวจสอบสาร biflavonoids ของปรง 3 วงศ์ จำนวน 10 สกุล ประกอบด้วยปรงทั้งหมด 82 ชนิด พบว่า ปรงในวงศ์ Stangeriaceae เพียงวงศ์เดียวเท่านั้นที่ไม่พบสาร biflavonoids ส่วนปรงในวงศ์ Zamiaceae ไม่พบสาร hinokiflavone แต่พบในปรงซึ่งอยู่ในวงศ์ Cycadaceae และ Stangeriaceae ต่อมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับพันธุศาสตร์ของเซลล์ในปรง โดยศึกษาจำนวนโครโมโซมของ *Cycas* 2n = 2x = 26 แต่ใน *Zamia* มีจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกันมาก ตั้งแต่ 2n = 2x = 16, 18 ไปจนถึงจำนวนโครโมโซม 22, 23, 24, 25, 26, 27 และ 28 ซึ่งแสดงว่า *Zamia* อาจจะมีวิวัฒนาการเร็วกว่าสกุลอื่นๆ (เมธานี, 2546)

ต่อมาเมื่อมีการศึกษาวิวัฒนาการพืชเพิ่มมากขึ้น จึงได้มีการคิดค้นเทคนิคใหม่ๆ เพื่อนำมาจัดจำแนกกลุ่มของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล ได้แก่ เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ซึ่ง Sangin *et al*. (2006) ได้ใช้เทคนิคนี้ จัดจำแนกปรงในสกุล *Cycas* 19 ชนิด สามารถคัดเลือกไพรเมอร์ได้ 5 ชนิด เพื่อนำมาใช้สังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 87 แถบ เมื่อนำผลที่ได้มาคำนวณโดยใช้โปรแกรม NTSYS เพื่อหาดัชนีความเหมือน และสร้างเป็นแผนภูมิทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ทำให้สามารถจัดกลุ่ม *Cycas* ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม

แรกมีถิ่นกำเนิดในประเทศไทยและกลุ่มที่มีถิ่นกำเนิดจากต่างประเทศ หลังจากนั้น Chaiprasongsuk *et al*. (2007) ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเปรียบเทียบกับการใช้เทคนิค RAPD ในปรงสกุล *Encephalartos* 20 ชนิด จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 19 ลักษณะ พิจารณาเลือกมา 9 ลักษณะ เพื่อใช้ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เปรียบเทียบกับการใช้เทคนิค RAPD เมื่อพิจารณาข้อมูลการใช้ไพรเมอร์ 13 ชนิด สามารถจัดกลุ่มปรงทั้ง 20 ชนิด ออกเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งมีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียง 7 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะลำต้น สีของแกนใบ มีหนาม/ไม่มีหนามที่ก้านใบ จำนวนของ prickle รูปร่างของใบย่อย เอียงทำมุมกับแกนกลางใบและการโค้งตัวของใบ แต่เมื่อพิจารณาข้อมูลจากไพรเมอร์ 8 ชนิด สามารถจัดกลุ่มปรงทั้ง 20 ชนิด ออกเป็น 6 กลุ่ม ซึ่งมีความสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 9 ลักษณะ และต่อมา

ณิชวรรณ (2549) ได้ใช้เทคนิค RAPD หาความสัมพันธ์ของปรงสกุล *Zamia* โดยพิจารณาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์ 12 ชนิด พิจารณาร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา 23 ลักษณะ สามารถจัดกลุ่มปรงที่มีความแตกต่างกันได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่ โดยพบว่าในปรงบางกลุ่มเท่านั้นที่มีความสอดคล้องกันตามลักษณะสัณฐานวิทยา และสอดคล้องกับการกระจายพันธุ์ แต่เมื่อพิจารณาจากไพรเมอร์ 8 ชนิด สามารถจัดกลุ่มปรงทั้ง 30 ชนิด ตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่เช่นกัน ซึ่งมีความสอดคล้องกันตามลักษณะสัณฐานวิทยาของลำต้น ใบ เมล็ด โคนเพศผู้และโคนเพศเมียมากยิ่งขึ้น รวมทั้งยังสอดคล้องกับการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติของปรงแต่ละกลุ่มอีกด้วย

ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์

คลอโรพลาสต์เป็นออร์แกเนลล์ในเซลล์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์แสง โดยเชื่อกันว่าจุดกำเนิดของคลอโรพลาสต์มาจากสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่อยู่อย่างอิสระมาก่อน แล้วเข้ามาอยู่รวมกับเซลล์พืชแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiosis) ต่อมามีการปรับตัวจนกลายเป็นส่วนหนึ่งของเซลล์พืช และไม่สามารถมีชีวิตอิสระได้อีก (สุรินทร์, 2545) จีโนมของคลอโรพลาสต์ประกอบด้วยดีเอ็นเอวงแหวนเกลียวคู่ ความยาวประมาณ 130-160 กิโลเบส มียีนอยู่ประมาณ 100-150 ยีน เรียงตัวอยู่ติดกัน โดยดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์จะมีรูปแบบเดียวกันในพืชแต่ละชนิด และมีลำดับเบสที่จำเพาะ (สุรินทร์, 2545 ; Masahiro, 1992) ดีเอ็นเอในจีโนม แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ unique sequence DNA เป็นช่วงของดีเอ็นเอที่มีการเรียงลำดับของเบสเพียงครั้งเดียวหรือน้อยครั้งใน haploid genome และ repetitive DNA คือช่วงของดีเอ็นเอที่มีการจัดเรียงลำดับเบสแบบเฉพาะ ลักษณะการจัดเรียงของ

เบสดังกล่าวจะซ้ำๆ กันหลายๆ ชุดใน haploid genome เป็นลำดับดีเอ็นเอที่มักจะไม่มีการทำงาน คือ ไม่มีการลอกรหัสและแปรรหัสเป็นโปรตีน (อมรา, 2546)

ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ค้นพบครั้งแรกใน *Chlamydomonas moewusii* โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มีลักษณะคล้ายกับดีเอ็นเอที่พบในนิวคลีโอพลาสซึมของแบคทีเรียเมื่อใส่เอนไซม์ DNase ลงไป เส้นใยดังกล่าวจะหายไป จึงสรุปว่า เส้นใยที่เห็นในคลอโรพลาสต์ คือ ดีเอ็นเอ (Ris and Plant, 1962) จีโนมของคลอโรพลาสต์ในพืชโดยทั่วไปมีขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ขนาดเล็กสุดที่พบประมาณ 115 กิโลเบสคือดีเอ็นเอของ *Sphaerocapos domnellii* (Herrmann *et al*., 1980) และขนาดที่ใหญ่ที่สุดที่พบคือ 189 กิโลเบส ใน *Chlamydomonas reinhardii* (Rochaix, 1978) ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ของพืชชั้นสูงเกือบทุกชนิดมีลำดับเบส 2 ช่วงที่เหมือนกัน แต่กลับทิศทางกัน เรียกว่า inverted repeat ยกเว้นพืชในตระกูลถั่วบางชนิด บริเวณที่เป็น inverted repeat นี้จะทำหน้าที่เป็นรหัสพันธุกรรมสำหรับ rRNA ขนาด 23S และ 16S สำหรับบริเวณที่อยู่ระหว่างปลายทั้งสองด้านของ inverted repeat นั้นมีสองขนาด ส่วนที่ยาวกว่าเรียกว่า large single copy (LSC) และส่วนที่สั้นกว่าเรียกว่า small single copy (SSC) (Palmer and Zamir, 1982)

เนื่องจากในปัจจุบันดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ได้รับความนิยมใช้ศึกษางานวิจัยทางด้านพืชเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีข้อได้เปรียบ คือมีจีโนมขนาดเล็ก ยีนทั้งหมดในจีโนมของคลอโรพลาสต์เป็น single copy gene คือส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสจำเพาะ พบเพียง 1 ครั้ง ต่อ 1 จีโนม แตกต่างจาก nuclear gene ซึ่งเป็นยีนพวก multigene families คือเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเหมือน หรือคล้ายคลึงกันหลายซ้ำ ด้วยเหตุนี้จึงเป็นข้อจำกัดในการนำยีนไปศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ นอกจากนี้ จีโนมในคลอโรพลาสต์ ยังมีการรักษาแบบแผน (conservative) ของการเกิดวิวัฒนาการ มีระดับการเปลี่ยนแปลงของ nucleotide sequence อย่างช้าๆ อีกด้วย (Palmer, 1991 ; Downie and Palmer, 1992)

สำหรับการใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ศึกษาวิวัฒนาการของพืชนั้นมีรายงานว่า Bowman *et al.* (1981) ได้หาตำแหน่งของยีนสำหรับ large subunit ของ ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (RuBisCo) ในข้าวสาลี โดยไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอขนาด 2.8 กิโลเบส ของข้าวโพดที่มียีนสำหรับ large single copy ซึ่งยีนที่สมบูรณ์นั้นจะอยู่ในบริเวณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 9.6 กิโลเบส ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *BamH*I พบว่ายีนนี้อยู่ห่างจากยีนสำหรับสร้าง rRNA ขนาด

16S ประมาณ 35 กิโลเบส ต่อมา Zhou *et al.* (1988) ได้เปรียบเทียบ 5S rRNA ในคลอโรพลาสต์ของ *Cycas revoluta* กับพืชชนิดอื่นอีก 13 ชนิด และหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่ามีความเหมือนกับพืชชั้นสูง 92-97 เปอร์เซ็นต์ แต่เหมือนกับพืชชั้นต่ำเพียง 54 เปอร์เซ็นต์ และส่วนของ 5S rRNA ในคลอโรพลาสต์ของ angiosperm มีความเหมือนกันมากถึง 95-97 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Chaw *et al*. (1997) ได้รายงานความสัมพันธ์ของพืช 5 กลุ่ม ได้แก่ lycophytes, ferns, angiosperm, gymnosperm และ gnetales เพื่อสร้าง phylogenetic tree โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* ใน cpDNA และ mitochondrial small subunit rRNA (mt ssu rRNA) พบว่าพืชเมล็ดเปลือยมีวิวัฒนาการยาวนานที่สุด และพืชกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์น้อยมากกับกลุ่มพืชดอก ต่อมา Treutlein and Wink (2002) ใช้ยีน *rbcL* เพื่อดูวิวัฒนาการของปรงในอันดับ Cycadales พบว่ายีน *rbcL* สามารถใช้หาความสัมพันธ์ของปรงในระดับสกุลได้ และพบด้วยว่าปรงในสกุล *Encephalartos*, *Lepidozamia* และ *Macrozamia* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ในขณะที่ปรงสกุล *Cycas* แตกต่างจากสกุลอื่นมากที่สุด และ Hill *et al*. (2003) ได้หาความสัมพันธ์ของปรงทั้งหมด 11 สกุล โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอของยีน *rbcL* และ *trnL-F* ในดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ และลำดับดีเอ็นเอของยีนส่วน ITS (internal transcribed spacers) ในนิวเคลียส ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าปรงทุกชนิดมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน

Huang *et al*. (2001) พบว่าพฤกษศาสตร์ภูมิศาสตร์ของ *Cycas taitungensis* ซึ่งเป็นพืชประจำถิ่นของไต้หวัน โดยมีประชากรกระจายตัวอยู่ 2 กลุ่ม ตรวจสอบเกี่ยวกับความผันแปรทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของสายพันธุ์ ใช้ยีน *atpB* - *rbcL* ในดีเอ็นเอของคลอโรพลาสต์ และ ดีเอ็นเอในไรโบโซม (rDNA) พบว่าเกิด genetic variation ในระดับสูงของยีนในออแกเนลล์ทั้งสองที่ใช้ตรวจสอบ แต่เกิด genetic differentiation ในระดับต่ำ ต่อมา Soltis *et al*. (2002) ทราบความสัมพันธ์ของ seed plants โดยใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ 4 ยีน ในไมโตคอนเดรีย 3 ยีน และใช้ยีนในนิวเคลียส 1 ยีน ใช้ตัวอย่างในการทดลองทั้งหมด 19 ตัวอย่าง จาก seed plants 5 กลุ่ม นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางพันธุศาสตร์ พบพืชที่มีวิวัฒนาการสูงสุดได้แก่กลุ่มของ พืชดอก พืชเมล็ดเปลือย และพวกเครือมะเมื่อย ตามลำดับ แต่เมื่อใช้ข้อมูลจากยีนในไมโตคอนเดรีย กลับพบว่า พืชในกลุ่ม gnetales มีวิวัฒนาการสูงสุด Kepple *et al*. (2002) พบประชากรของ cycad ในหมู่เกาะแปซิฟิก และได้ใช้วิธี starch-gel electrophoresis ตรวจสอบใน *Cycas seemannii* พบว่าเกิด genetic diversity และ gene flow ของประชากรในระดับต่ำ แต่เกิดการ differentiation ของประชากรในเกณฑ์สูง ต่อมา Rai *et al*. (2003) พบข้อมูลเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของปรง (cycads) โดยใช้ยีนบางส่วนของจีโนมในคลอโรพลาสต์ ทดสอบกับปรงทั้ง 7 ชนิด ได้แก่ *Bowenia*

serrulata, *Certozamia miqueliana*, *Cycas revolute*, *Dioon purpusii*, *Encephalartos barteri*, *Stangeria eriopus* และ *Zamia furfuracea* โดยใช้ *Ginkgo biloba* เป็น outgroup พบว่า cycad เป็นพืชที่มีวิวัฒนาการน้อยกว่า *G. biloba* และ *Cycas* เป็นกลุ่มที่มีวิวัฒนาการสูงสุดในกลุ่มปรงทั้งหมด Bogler and Ortega (2004) หาความสัมพันธ์เกี่ยวกับการจัดกลุ่มของ cycads โดยใช้ยีน *trnL* ของจีโนมในคลอโรพลาสต์ ส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่าง 5.8S และ 26S ribosomal DNA subunits (ITS2) พบว่า cycad มีความสัมพันธ์กันในสกุลเมื่อตรวจสอบด้วยยีน *trnL* ในขณะที่ใช้ยีน ITS2 ตรวจสอบ พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลง (variation) อยู่ในระดับสูง และยังพบว่า sequence ของปรงสกุล *Cycas* มีความแตกต่างจากสกุลอื่นมากที่สุด ปรงสกุล *Dioon* มีความสัมพันธ์แยกจากปรงสกุลอื่น ปรงสกุล *Stangeria* ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุล *Bowenia* สกุล *Lepidozamia* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสกุล *Encephalartos* มากกว่าสกุล *Macrozamia* ส่วนสกุล *Ceratozamia* พบว่าลำดับเบสที่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงในระดับต่ำ สกุล *Microcycas* และ *Zamia* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ต่อมา Xiao *et al*. (2004) ใช้เทคนิค ISSR markers ตรวจสอบ genetic variation ของ *Cycas guizhouensis* ในประชากร 12 กลุ่ม พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำและมีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมระหว่างประชากรอยู่ในระดับสูง เมื่อพิจารณาถึงโครงสร้างทางพันธุกรรม พบว่าเกี่ยวข้องกับ biochemical evolution เกิดขึ้นอย่างช้าๆ genetic drift การผสมพันธุ์ (inbreeding) และขอบเขตการเกิด gene flow ในกลุ่มประชากร ต่อมา Treultein *et al*. (2005) พบความสัมพันธ์ทางชีวโมเลกุลของปรงสกุล *Encephalartos* โดยใช้ดีเอ็นเอในนิวเคลียสได้แก่ ITS1, ITS2 ใช้ยีนในคลอโรพลาสต์ได้แก่ *rbcL* และใช้ genomic ISSR fingerprinting พบว่าลำดับเบสที่ได้จาก ITS1, ITS2, *rbcL* และ ISSR fingerprinting สามารถจำแนกความสัมพันธ์ของปรงในสกุล *Encephalartos* ได้ และจากข้อมูลของ ISSR fingerprinting แสดงให้เห็นว่าปรงสกุล *Encephalartos* เกิด genetic variation ในระดับต่ำ ส่วนข้อมูลที่ได้จาก ITS1 และ ITS2 พบว่ามีความสอดคล้องกับข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และลักษณะการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์โดยแบ่งกลุ่มการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ได้ 3 กลุ่มด้วยกัน Gonzalez-Astroga *et al*. (2005) พบการเปลี่ยนแปลงของ allozyme 3 กลุ่มของประชากร *Dioon angustifolium* Miq. ซึ่งเป็นพืชประจำถิ่นทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศเม็กซิโก โดยได้ทดลองทำ allozyme electrophoresis ใช้ตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยา 14 ตำแหน่งทำการวิเคราะห์ พบว่าได้ผลสอดคล้องกับพืชประจำถิ่นอื่นๆ ที่มีการกระจายตัวของประชากรในวงแคบ และ Chaw *et al*. (2005) หาความสัมพันธ์ของปรงโดยใช้ marker 3 ชนิด คือ chloroplast *matK* gene, *trnK* intron และ nuclear ITS/5.8S rDNA พบว่าปรงในสกุล *Cycas* แตกต่างจากสกุลอื่นมากที่สุด *Encephalartos* และ *Lepidozamia* มีความใกล้ชิดกันมาก

กว่า *Macrozamia* และ *Bowenia* เป็น sister group ของ *Stangeria* จะเห็นได้ว่าการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชในระดับโมเลกุลกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับพืชในระดับโมเลกุล

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างพืช

ปรงสกุล *Cycas* จำนวน 22 ชนิด ดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 1 ได้แก่ *C. collina* *C. angulata*, *C. balansae*, *C. beddomei*, *C. brachycantha*, *C. cairnsiana*, *C. campestris*, *C. indica* *C. chamaoensis*, *C. clivicola*, *C. diannanensis*, *C. dolichophylla*, *C. nathorstii*, *C. pectinata,* *C. guizhouensis*, *C. micronesica*, *C. pranburiensis*, *C. simplicipinna*, *C. tanqingii*, *C. xipholepis*, *C. yunnanensis, C. clivicola* subsp. *lutea* ถูกนำมาใช้ศึกษา และใช้ *Zamia intermis* เป็น outgroup ปรงเหล่านี้มีถิ่นกำเนิดที่มาจากประเทศต่างๆ และรวบรวมมาปลูก ณ สวนนงนุช จังหวัดชลบุรี

ตารางที่ 1 แสดงชนิด และถิ่นกำเนิดของปรงสกุล *Cycas* ที่ใช้ในการทดลอง

Species	Geographic distribution
1. *C. angulata*	Australia
2. *C. balansae*	Vietnam
3. *C. beddomei*	India
4. *C. brachycantha*	Vietnam
5. *C. cairnsiana*	Australia
6. *C. campestris*	Papua New Guinea
7. *C. chamaoensis*	Thailand
8. *C. clivicola*	Thailand
9. *C. clivicola* subsp. *lutea*	Thailand
10. *C. collina*	Vietnam
11. *C. diannanensis*	China

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Species	Geographic distribution
12. *C. dolichophylla*	Vietnam
13. *C. guizhouensis*	China
14. *C. micronesica*	Thailand
15. *C. nathorstii*	Sri Lanka
16. *C. pectinata*	Thailand
17. *C. pranburiensis*	Thailand
18. *C. simplicipinna*	Thailand
19. *C. tanqingii*	China
20. *C. xipholepis*	Australia
21. *C. indica*	India
22. *C. yunnanensis*	China

การเตรียมตัวอย่างพืช

ใช้ใบอ่อนปรง ซึ่งดูได้จากลักษณะลำดับการเกิดของใบ ความนิ่มของใบ และสีของใบ ในการสกัดดีเอ็นเอควรสกัดทันทีหลังจากที่เก็บตัวอย่างพืชมา แต่ถ้ายังไม่สามารถสกัดทันทีได้ให้นำใบอ่อนมาล้างให้สะอาดเช็ดให้แห้งเก็บไว้ในถุงพลาสติกและรัดปากถุงให้แน่น นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 ˚C

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรง

บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรงได้แก่ ลักษณะลำต้น สีใบ ความเงาวาวของใบ การโค้งตัวของใบ จำนวนใบ ลักษณะปลายใบ สีขนที่ปกคลุมใบ ความยาวก้านใบ ลักษณะของก้านใบ ความยาวของใบย่อย ความกว้างของใบย่อย ลักษณะขอบใบย่อย ลักษณะการโค้งของใบย่อย ลักษณะปลายใบย่อย เส้นกลางใบด้านบน/ล่าง ลักษณะของเกล็ดใบหุ้มยอดอ่อนนุ่ม/แหลมคม ขนรูปร่าง เห็นข้อต่อชัดเจน/อยู่ติดกับลำต้น ลักษณะรูปร่าง ความกว้าง/ยาว สีของโคนเพศผู้ ลักษณะ microsporophyll lamina อ่อนนุ่ม/แข็ง ลักษณะ microsporophyll apical spine ความกว้าง/ยาวของ megasporophyll รูปร่างของ megasporophyll lamina ลักษณะของ megasporophyll lamina margin และ apical spine ความกว้าง/ยาวของโคนเพศเมีย จำนวนออวุล ขนาดกว้าง/ยาว และรูปร่างของเมล็ด

การสกัดดีเอ็นเอของปรง

การสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1990) โดยมีขั้นตอนดังนี้

ล้างใบอ่อนของปรงให้สะอาด และเช็ดให้แห้ง นำใบอ่อนน้ำหนักประมาณ 3 กรัม มาบดกับไนโตรเจนเหลวในโกร่งให้ละเอียด เติม extraction buffer (4% CTAB, 2.8 M NaCl, 40 mM EDTA, 200 mM Tris-HCl, pH 8.0) ปริมาตร 10 ml ผสมกับเนื้อเยื่อพืช แล้วใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 ml เติม 10 mM 2-mercaptoethanol จำนวน 20 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 ˚C นาน 1 ชั่วโมง เขย่าโดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้งทุก 15 นาที แล้วจึงเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) (V/V) ปริมาตร 10 ml ลงในหลอดแล้วผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ ประมาณ 1-2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 g นาน 10 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำและ chloroform ออกจาก

กัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายส่วนบนนำไปใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 50 ml หลอดใหม่ เติม absolute ethanol จำนวน 1 เท่าของปริมาตรสารละลายลงในหลอด ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเพื่อทำการตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปเก็บไว้โดยแช่ที่อุณหภูมิ -20 ˚C ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ˚C เทส่วนใสของสารละลายทิ้ง ให้เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอที่อยู่ก้นหลอด ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol เขย่าหลอดกลับไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ˚C หลังจากนั้นตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA) ปริมาตร 500 µl เมื่อตะกอนละลายหมดแล้ว ดูดสารละลายดีเอ็นเอลงในหลอดพลาสติกขนาด 1,000 µl และเติม RNase A จำนวน 5 µl ลงไปผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ˚C นาน 45 นาที สกัดดีเอ็นเอโดยการเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) (V/V) ปริมาตร 500 µl ลงไปผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ˚C ดูดเอาส่วนที่เป็นน้ำใสส่วนบนเก็บไว้ใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1,000 µl แล้วจึงเติม absolute ethanol จำนวน 1 เท่าของปริมาตรของสารละลายลงในหลอด ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา และนำไปไว้โดยแช่ที่อุณหภูมิ -20 ˚C 1 ชั่วโมง ล้างตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งหนึ่งตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว จากนั้นละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 500 µl

เทคนิค PCR โดยใช้คลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอไพรเมอร์

ทำการคัดเลือกไพรเมอร์ (ตารางที่ 2) ที่นำมาใช้ในการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปรงสกุล *Cycas* 22 ชนิด โดยนำไพรเมอร์ที่เลือกทั้งหมด 5 คู่ เพื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ความเข้มข้นของสารต่างๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 10X PCR buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl) ปริมาตร 2.5 µl , 50 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 µl, 10mM dNTP(mix) ปริมาตร 0.5 µl, 10 µl primer (forward/reverse) ปริมาตร 0.25 µl, 5 unit/ µl ของ Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.125 µl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุทธิ 25 µl สังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Perkin Elmer 9600 Thermocycler โดยไพรเมอร์ต่างๆ ที่นำมาใช้จะถูกกำหนดสภาวะของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่างกัน และนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบปริมาณและขนาดของดีเอ็นเอ โดยทำ electrophoresis บน 1% agarose gel เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp) แล้วย้อมเจลด้วย ethidium bromide และตรวจสอบดีเอ็นเอบน UV light box ถ่ายรูป และบันทึกผล

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของไพรเมอร์และสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม

Primer	Denaturation	PCR reaction condition	Extension	References
$trnS^{UGA}$-$trnfM^{CUA}$	80°C, 5 min	(94°C,30s; 55°C,30s; 72°C,2 min)×30	72°C, 5 min	Shaw *et al*., 2005
$trnS^{UGA}$ (For)		GAGAGAGAGGGATTCGAAC		
$trnfM^{CUA}$(Rev)		CATAACCTTGAGGTCACGGG		
$psbM^{F}$-$trnD^{GUCR}$	80°C, 5 min	(94°C,1min; 55°C,1min; 72°C,3.5min)×35	72°C, 5 min	Shaw *et al*., 2005
$psbM^{F}$ (For)		AGCAATAAATGCRAGAATATTTACTTCCAT		
$trnD^{GUCR}$ (Rev)		GGGATTGTAGYTCAATTGGT		
$trnF^{GAA}$-3'$trnL^{UAA}$	80°C, 5 min	(94°C,1min; 50°C,1min; 72°C,5min)×35	72°C, 5 min	Shaw *et al*., 2005
$trnF^{GAA}$ (For)		ATTTGAACTGGTGACACGAG		
3'$trnL^{UAA}$ (Rev)		GGTTCAAGTCCCTCTATCCC		
5'$trnL^{UAA}$-3'$trnL^{UAAR}$	80°C, 5 min	(94°C,1min; 50°C,1min; 72°C,5min)×35	72°C, 5 min	Shaw *et al*., 2005
5'$trnL^{UAA}$ (For)		GGGGATAGAGGGACTTGAAC		
3'$trnL^{UAAR}$ (Rev)		GGGGATAGAGGGACTTGAAC		
atpB-rbcL	80°C, 5 min	(94°C,30s; 49°C,1min; 72°C,1.5min)×35	72°C, 10 min	Chiang *et al*., 1998
atpB (For)		AACACCAGCTTTRAATCCAA		
rbcL (Rev)		ACATCKARTACKGGACCAATAA		

หมายเหตุ For คือ ไพรเมอร์ Forward, Rev คือ ไพรเมอร์ Reverse

การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการหาลำดับเบส

ใช้วิธีทรานสฟอร์เมชั่นในแบคทีเรีย *Escherichia coli* ดัดแปลงจากวิธี Sambrook *et al*. (1989) โดยมีขั้นตอนดังนี้:-

1. สกัดดีเอ็นเอจาก agarose gel โดยใช้ชุดสารละลาย QIA quick gel extraction kit (QIAGEN)

เริ่มจากการตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการไปชั่ง แล้วใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 ml เติมบัฟเฟอร์ QC (solubilization buffer) ลงไปปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล (เจลหนัก 100 กรัม ใช้บัฟเฟอร์ 300 µl) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 ˚C นาน 10 นาที โดยเขย่าทุกๆ 2-3 นาที เพื่อให้เจลละลายเร็ว จากนั้นจึงเติม isopropanol ลงไปในปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน ดูดสาร

ละลายนี้ 750 µl ใส่ลงในหลอดขนาด 2 ml (QIA quick column) ซึ่งมีหลอดขนาดเล็กอยู่ด้านบน ใช้สำหรับแยกดีเอ็นเอออกจากสารละลาย นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 × g นาน 1 นาที เท สารละลายด้านล่างทิ้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ QC ลงไป 500 µl หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 × g นาน 1 นาที เพื่อล้าง agarose gel ออก เทสารละลายข้างล่างทิ้ง และเติมบัฟเฟอร์ PE (wash buffer) จำนวน 750 µl วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 × g นาน 1 นาที เทสารละลาย ด้านล่างทิ้ง และปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 × g อีกครั้งหนึ่งเพื่อกำจัด ethanol ที่ตกค้าง ย้ายหลอดขนาดเล็ก ที่มีชั้นกรองมาวางในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 µl เติมน้ำลงไปกลางหลอดจำนวน 30 µl วางทิ้ง ไว้ที่อุณหภูมิ ห้อง 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 × g นาน 1 นาที ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะถูกชะล้างมา อยู่ที่หลอดด้านล่าง เก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 ˚C

2. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับพลาสมิด (Ligation reaction)

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ กับ พลาสมิด pGEM-T Easy Vector Systems โดยใส่ PCR product 1 µl พลาสมิด 1.0 µl 2X ligase buffer 5.0 µl DNA ligase 1.0 µl และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มี ปริมาตรสุทธิ 10 µl โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 ˚C ข้ามคืน (ตารางผนวกที่ 1)

3. การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ (Competent cell)

การเตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ ดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook *et al*. (1989) โดยนำเชื้อ แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α เพียงโคโลนีเดียวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง 12-16 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลวสูตร LB (Luria-Bertani) (ตารางผนวกที่ 2) 3 ml บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 ˚C เขย่า 150 รอบต่อนาที 12-16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์ที่ได้ปริมาตร 1 ml ย้ายมาเลี้ยงในอาหาร LB 50 ml บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 ˚C เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง เทสารละลาย แบคทีเรียใส่ลงในหลอดอาหารขนาด 50 ml นำไปแช่น้ำแข็งนาน 10 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 4,000 × g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ˚C เทอาหารส่วนบนทิ้ง เติม 0.1 M $CaCl_2$ ที่แช่ เย็นปริมาตร 20 ml ทำให้เซลล์กระจายตัวด้วยการเขย่าเบาๆ จนไม่เหลือตะกอนของเซลล์ แล้วจึงแช่ น้ำแข็งต่ออีก 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 × g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ˚C เท สารละลายทิ้ง แล้วเติม 0.1 M $CaCl_2$ ที่แช่เย็นปริมาตร 2 ml ทำให้เซลล์กระจายตัวโดยการเขย่าเบาๆ จนไม่เหลือตะกอน หลังจากนั้นแบ่งสารละลายใส่หลอดไมโครเซนติฟิวจ์ขนาด 1.5 ml หลอดละ 100 µl นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 ˚C

4. การนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์

เติมสารละลายดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับพลาสมิด 10 µl ลงในหลอดที่มีเซลล์คอมพีเทนต์ 100 µl ผสมให้เข้ากันและแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที ให้ความร้อนทันที (heat shock) โดยจุ่มลงในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 4 ˚C นาน 90 วินาที และนำไปแช่ลงในถังน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้นาน 2 นาที แล้วจึงเติมอาหารสูตร SOC medium (ตารางผนวกที่ 2) ปริมาตร 900 µl นำไปบ่มในอ่างน้ำที่ 37 ˚C และเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายแบคทีเรีย 200 µl มาเกลี่ยให้ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหารแข็งสูตร LA (ตารางผนวกที่ 2) ที่มี ampicillin 50 µg/ml X-gal 40 µg/ ml และ IPTG 4 µg/ml นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 ˚C นาน 12-16 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีของแบคทีเรียสีขาว และสีฟ้าที่เจริญบนอาหาร

5. คัดเลือกโคลนที่มีการ insert ของดีเอ็นเอ และการสกัดพลาสมิด

ดัดแปลงจากวิธีของ Birnbolim and Doly (1979) และ Ish-Horowicz and Burke (1981) โดยคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่ได้จากการทรานสฟอร์เมชั่นในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 2 ml ที่ประกอบด้วย ampicillin 50 µl/ml บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ˚C ข้ามคืน หลังจากนั้นจึงนำแบคทีเรียที่ได้มาสกัดแยกพลาสมิด โดยนำสารละลายแบคทีเรียใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 ml แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 × g ที่อุณหภูมิ 4 ˚C นาน 30 วินาที ทิ้งสารละลายส่วนบน ละลายตะกอนในสารละลาย I (50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA, pH 8.0) ที่เย็นจัด ปริมาตร 100 µl ผสมแรงๆ ให้เข้ากันจนตะกอนละลายหมด เติมสารละลาย II (0.2N NaOH, 1% SDS) ที่เตรียมใหม่ๆ ปริมาตร 200 µl ผสมโดยพลิกหลอดเร็วๆ 5 ครั้ง จะได้สารละสายใสที่มีความหนืดมาก เติมสารลาย III (5M potassium acetate 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, น้ำกลั่น 28.5 ml) ที่เย็นจัดจำนวน 150 µl ผสมโดยพลิกหลอด 10 วินาที แล้ววางบนน้ำแข็ง 3-5 นาที จะเห็นตะกอนสีขาวกระจายอยู่ในสารละลาย และหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 × g ที่อุณหภูมิ 4 ˚C นาน 5 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนที่ใสด้านบนมาเติม phenol : chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) ในปริมาตรที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 × g ที่อุณหภูมิ 4 ˚C นาน 2 นาที แยกเอาส่วนเฉพาะสารละลายใสด้านบนมาตกตะกอนพลาสมิดด้วย 100% ethanol ที่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่า ผสมให้เข้ากัน แล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 × g ที่อุณหภูมิ 4 ˚C นาน 5 นาที ทิ้งสารละลายส่วนบน แล้ววางหลอดคว่ำบน

กระดาษทิชชูให้สารละลายหยดหมด ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 ml ทำการหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 × g ที่อุณหภูมิ 4 ˚C นาน 5 นาที ทิ้งสารละลายส่วนบน ตากตะกอนให้แห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ˚C เมื่อพลาสมิดแห้งจะมีลักษณะใส ละลายตะกอนใน TE buffer 20 µl ผสมเบาๆ นำไปตรวจสอบขนาดโดยวิธี agarose gel electrophoresis และ เก็บที่อุณหภูมิ -20 ˚C

6. การวิเคราะห์ลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ

หาลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ (DNA sequencing) โดยเครื่องอัตโนมัติ (Macrogen, Korea) หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้ มาเปรียบเทียบความเหมือน ความต่าง (alignment), ใช้โปรแกรม CAP3 (Huang and Madan, 1999) เพื่อเชื่อมลำดับนิวคลีโดไทด์ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละครั้งจากชิ้นดีเอ็นเอเดียวกัน (sequesce assembly) เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นเส้นเดียวกันแล้วจะใช้โปรแกรม Clustal W (Thompson *et al*., 1994) และ GeneDoc version 2.6 (Nicholas and Nicholas, 1997) เพื่อทำการ alignment เปรียบเทียบความเหมือนและความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ต่อมาใช้โปรแกรม MEGA version 4.0 (Kumar *et al*., 2007) ใช้ในการสร้าง phylogenetic trees เพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbour - joining (NJ) และ maximum parsimony (MP) โดยแต่ละวิธีทำการตรวจสอบค่าความเชื่อมั่นทางสถิติ (bootstrap) จำนวน 1,000 ซ้ำ เพื่อให้ได้ phylogenetic tree ที่ถูกต้อง (consensus tree)

ผลและวิจารณ์

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรงสกุล *Cycas*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรงสกุล *Cycas* ที่ทำการศึกษาทั้งหมด 37 ลักษณะ ดังต่อไปนี้:-

1. ลักษณะลำต้น (stem type)
   - ลำต้นอยู่บนดิน (arborescent)
   - ลำต้นอยู่ใต้ดิน (acaulescent)

2. สีใบ (colour of leaf)
   - สีเขียวอ่อน (bright green)
   - สีเขียวเข้ม (deep green)
   - สีเทาอมเขียว (grey green)

3. ความเงาวาวของใบ (glossy of leaf)
   - เงาวาว (glossy)
   - ไม่เงาวาว (dull)

4. การโค้งตัวของใบเมื่อเทียบกับแกนกลางลำต้น (keel of leaf)
   - โค้งตัวมาก (strongly keel)
   - โค้งตัวปานกลาง (moderately keel)
   - โค้งตัวเล็กน้อย (slightly keel)
   - ไม่มีการโค้งตัว (flat)

5. จำนวนใบย่อย (leaflet)

6. ลักษณะปลายใบ
   - ลดรูปเป็นหนาม (spine)
   - ปลายใบมีใบย่อยคู่ (paired leaflets)

7. สีของขนที่ปกคลุมใบ (hair colour)
   - สีขาว (white)
   - สีน้ำตาล (brown)
   - สีส้ม (orange)

8. ความยาวของก้านใบ (petiole)

9. ลักษณะของก้านใบ (petiole spine)
   - มีหนาม (spinecent)
   - ไม่มีหนาม (unarmed)

10. ความยาวของใบย่อย

11. ความกว้างของใบย่อย

12. ลักษณะขอบของใบย่อย (leaflet margin)
   - ขอบใบย่อยเรียบ (entire)
   - ขอบใบย่อยเป็นคลื่น (undulated)

13. ลักษณะการโค้งตัวของใบย่อย (keel of leaflet)
   - ไม่มีการโค้งตัวของใบย่อย (flat)
   - ใบย่อยโค้งลงด้านล่างเล็กน้อย (slightly recurved)
   - ใบย่อยโค้งลง (revolute)
   - ใบย่อยเป็นคลื่น (undulated)

14. ลักษณะปลายใบย่อย (apex)
   - ปลายใบแหลม (acute)
   - ปลายใบเรียวแหลม (softly acuminate)
   - ปลายใบเป็นเข็มแหลม (aristate)

15. เส้นกลางใบด้านบน (upper midrib)
   - แบนราบ (flat)
   - นูน (raised)

16. เส้นกลางใบด้านล่าง (lower midrib)
   - แบนราบ (flat)
   - นูน (raised)

17. ลักษณะเกล็ดใบหุ้มยอด (cataphyll)
   - อ่อนนุ่ม (soft)
   - แหลมคม (pungent)

18. ลักษณะขนปกคลุมเกล็ดใบหุ้มยอด (cataphyll hair)
   - มีขนอ่อนปกคลุมบางๆ (thinly sericeous)
   - มีขนยาวและอ่อนนุ่มปกคลุม (pilose)
   - มีขนปุยนุ่มปกคลุมอย่างหนาแน่น (densely floccose)

19. รูปร่างของเกล็ดใบหุ้มยอด
   - เกล็ดใบหุ้มยอดรูปสามเหลี่ยมแคบ (narrowly triangular)
   - เกล็ดใบหุ้มยอดเป็นเส้นตรง (linear)

20. การติดของเกล็ดใบหุ้มยอด (articulated/persistent)
   - เห็นข้อต่อชัดเจน (articulated at base)
   - อยู่ติดกับลำต้นไม่ร่วงหลุดไป (persistent)

21. ขนาดความกว้างของโคนเพศผู้

22. ขนาดความยาวของโคนเพศผู้

23. รูปร่างโคนเพศผู้
   - รูปไข่ (ovoid)
   - รูปไข่แคบ (narrowly ovoid)
   - รูปกระสวย (fusiform)
   - รูปทรงกลม (globose)

24. สีของโคนเพศผู้
   - สีเหลือง (yellow)
   - สีส้ม (orange)
   - สีครีม (cream)

25. ลักษณะ microsporophyll apical spine
   - มีหนาม (prominent)
   - ไม่มีการเจริญของหนาม (rudimentary)
   - ไม่มีหนาม (absent)

26. ลักษณะ microsporophyll lamina
   - อ่อนนุ่ม (soft)
   - แข็ง (firm)

27. ขนาดความยาวของ megasporophyll lamina

28. ขนาดความกว้างของ megasporophyll lamina

29. รูปร่างของ megasporophyll lamina
   - รูปร่างกลม (orbicular)
   - รูปร่างเหมือนใบหอก (lanceolate)
   - รูปไข่ (ovate)

30. ลักษณะของ megasporophyll lamina margin
   - ลักษณะขอบริมแบบซี่หวีเว้าลึก (deeply pectinate)
   - ลักษณะขอบริมแบบซี่หวีแบบตื้น (shallow pectinate)
   - ลักษณะขอบริมแบบใบจักเป็นฟันเลื่อยสม่ำเสมอ (regulary dentate)
   - ลักษณะขอบริมแบบใบจักเป็นฟันเลื่อยไม่แจ่มชัด (obscurely dentate)

31. ลักษณะ megasporophyll apical spine
   - ด้าน apical spine แตกต่างจากด้าน lateral spine
   - ด้าน apical spine ไม่แตกต่างจากด้าน lateral spine

32. ขนาดความยาวของโคนเพศเมีย

33. ขนาดความกว้างของโคนเพศเมีย

34. จำนวนออวุล (ovule)

35. รูปร่างของเมล็ด (seed)
   - เมล็ดรูปไข่ (ovoid)
   - เมล็ดรูปไข่แบน (flattened ovoid)
   - เมล็ดรูปกลม (subglobose)

36. ขนาดความยาวของเมล็ด

37. ขนาดความกว้างของเมล็ด

ปรงสกุล *Cycas* ทั้งหมด 22 ชนิดนี้มีการกระจายพันธุ์บริเวณแถบเอเชีย 18 ชนิด คือ *C. balansae*, *C. beddomei*, *C. brachycantha*, *C. chamaoensis*, *C . clivicola*, *C. clivicola* subsp. *lutea*, *C. collina*, *C. diannanensis*, *C. dolichophylla*, *C. guizhouensis*, *C. nathorstii*, *C. pectinata*, *C. pranburiensis*, *C. simplicipinna*, *C. tanqingii*, *C. indica*, *C. micronesica*, *C. yunnanensis* กลุ่มที่พบในแถบออสเตรเลียมีเพียง 4 ชนิดได้แก่ *C. angulata*, *C. cairnsiana*, *C. campestris*, *C. xipholepis* (Hill *et al*., 2004)

เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าปรงสกุล *Cycas* ส่วนใหญ่มีลำต้นเหนือดิน และบางชนิดเท่านั้นที่มีลำต้นอยู่ใต้ดิน (ภาพที่ 3) กลุ่มที่พบแถบเอเชียมีลำต้นอยู่เหนือดินทั้งหมด 12 ชนิด ยกเว้น *C. simplicipinna*, *C. balansae*, *C. collina*, *C. brachycantha*, *C. diannanensis*, *C. yunnanensis* มีลำต้นอยู่ใต้ดิน ส่วนกลุ่มที่มีการกระจายพันธุ์อยู่บริเวณแถบออสเตรเลียพบว่ามีลำต้นอยู่เหนือดินทั้งหมด (ตารางที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะลำต้นที่อธิบายโดย Hill (1998) และ Jones (1998)

ในส่วนของใบย่อย (ภาพที่ 5) พบว่าสีใบมีทั้งสีเขียวเข้ม สีเขียวอ่อน และสีเทาอมเขียว โดยกลุ่มปรงที่กระจายพันธุ์อยู่บริเวณแถบเอเชียมีใบสีเขียวเข้ม 10 ชนิด ส่วนที่เหลืออีก 7 ชนิด คือ *C. clivicola* subsp. *lutea*, *C. pranburiensis*, *C. clivicola*, *C. dolichophylla*, *C. diannanensis*, *C. nathorstii*, *C. indica* มีใบสีเขียวอ่อน และมี *C. beddomei* เพียงชนิดเดียวที่มีใบสีเทาอมเขียว ในขณะที่ปรงที่พบทางแถบออสเตรเลียซึ่งใช้ศึกษา 4 ชนิด พบว่า *C. xipholepis* มีใบสีเขียวเข้ม และ *C. angulata* มีใบสีเทาอมเขียว นอกจากนั้นมีใบสีเขียวอ่อน ซึ่งสอดคล้องกับสีใบที่รายงานโดย Jones (1998) ความเงาวาวของใบในกลุ่มปรงที่พบแถบเอเชียพบว่าเกือบทั้งหมด (17 ชนิด) มีความเงาวาว (ตารางที่ 3) และพบ *C. beddomei* เพียงชนิดเดียวที่ไม่เงาวาว ส่วนการโค้งตัวของใบเมื่อเทียบกับแกนกลางของลำต้น (ภาพที่ 7) พบว่าจำนวนปรงที่ใบไม่มีการโค้งตัวมีจำนวนเท่ากับที่ใบมีการโค้งตัวเล็กน้อย ในขณะที่ความเงาวาวของปรงที่อยู่แถบออสเตรเลียพบว่าส่วนใหญ่มีความเงาวาว ยกเว้น *C. cairnsiana* เพียงชนิดเดียวที่ไม่เงาวาว ส่วนลักษณะการโค้งตัวของใบพบว่าไม่มีการโค้งตัวของใบในปรงชนิดเดียวคือ *C. xipholepis* ส่วนที่มีการโค้งตัวเล็กน้อย โค้งตัวปานกลางและโค้งตัวมากได้แก่ *C. angulata*, *C. cairnsiana* และ *C. campestris* ตามลำดับ ซึ่งสอด คล้องกับข้อมูลที่รายงานโดย Hill (1998) ใบปรงจะพบรูปแบบของปลายใบย่อยสองแบบ (ภาพที่ 6) คือ ปลายใบมีใบย่อยคู่ กับปลายใบลดรูปกลายเป็นหนาม นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณใบมีขนสีแตกต่างกัน ตั้งแต่สีขาว สีน้ำตาล สีส้ม ซึ่งปรงแถบเอเชียมากถึง 12 ชนิดที่ใบปลายมีใบย่อยคู่ รองมาคือปลายใบลดรูป

เป็นหนาม ได้แก่ *C. pectinata*, *C. clivicola*, *C. chamaoensis*, *C. pranburiensis*, *C. micronesica*, *C. clivicola* subsp. *lutea* และยังพบอีกว่ามีขนสีขาวปกคลุม 10 ชนิด นอกจากนี้ยังมีขนสีส้มปกคลุม ได้แก่ *C. collina*, *C. simplicipinna*, *C. dolichophylla*, *C. tanqingii*, *C. guizhouensis* และมีขนสีน้ำตาลปกคลุมได้แก่ *C. pranburiensis*, *C. balansae*, *C. beddomei* ตามลำดับ ส่วนปรงแถบออสเตรเลียพบใบย่อยส่วนปลายใบส่วนใหญ่เป็นใบย่อยคู่ และมีเพียงชนิดเดียวที่ใบย่อยส่วนปลายใบลดรูปเป็นหนาม คือ *C. xipholepis* และพบว่าส่วนใหญ่มีขนสีส้มปกคลุม ยกเว้น *C. xipholepis* และ *C. angulata* มีขนสีขาวและสีน้ำตาล ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jones (1998) และ Wang (1996) ก้านใบที่พบมีความยาวน้อยที่สุด 8 เซนติเมตร (ตารางที่ 4) พบใน *C. pranburiensis* และมีความยาวมากสุดถึง 190 เซนติเมตร พบใน *C. collina* โดยพบว่าก้านใบมีหนามถึง 19 ชนิด แบ่งเป็นปรงแถบเอเชีย 16 ชนิด และปรงแถบออสเตรเลีย 3 ชนิด ส่วนปรงที่ก้านใบไม่มีหนามพบเพียง 3 ชนิด แบ่งเป็นแถบเอเชีย 2 ชนิดได้แก่ *C. micronesica* และ *C. pranburiensis* แถบออสเตรเลีย 1 ชนิด ได้แก่ *C. xipholepis* ซึ่งสอดคล้องกับ Jones (1998) ที่ได้เคยรายงานไว้เช่นกัน

ขอบใบย่อยมีลักษณะขอบใบเรียบ และแบบเป็นคลื่น (ตารางที่ 4) โดยลักษณะขอบใบย่อยเป็นคลื่นพบเป็นส่วนใหญ่ในปรงแถบเอเชีย ยกเว้น *C. pectinata, C. clivicola* supsp. *lutea, C. chamaoensis*, *C. brachycantha, C. guizhouensis, C. beddomei, C. nathorstii*, *C. pranburiensis* และ *C. indica* ส่วนปรงแถบออสเตรเลียทุกชนิดมีขอบใบย่อยเรียบ ลักษณะการโค้งตัวของใบย่อย (ตารางที่ 4) พบว่ามี 4 ลักษณะด้วยกัน คือ ไม่มีการโค้งตัว โค้งลงด้านล่างเล็กน้อย โค้งลง และเป็นคลื่น โดยที่ปรงแถบเอเชียพบลักษณะการโค้งของใบย่อยเป็นแบบโค้งลงด้านล่างเล็กน้อย 7 ชนิด คือ *C. pectinata*, *C. clivicola* subsp. *lutea*, *C. micronesica, C. chamaoensis, C. balansae, C. diannanensis* และ *C. yunnanensis* ซึ่งมีจำนวนเท่ากับแบบเป็นคลื่น ได้แก่ *C. simplicipinna, C. dolichophylla, C. collina, C. brachycantha*, *C. tanqingii, C. guizhouensis* และ *C. indica* นอกจากนี้ยังพบใบย่อยไม่มีการโค้งตัว 3 ชนิด ได้แก่ *C. pranburiensis*, *C. clivicola*, *C. nathorstii* โดยที่มี *C. beddomei* เพียงชนิดเดียวที่มีใบย่อยแบบโค้งลง ส่วนแถบออสเตรเลียพบลักษณะการโค้งตัวของใบย่อยเพียง 3 ลักษณะ คือ ลักษณะไม่มีการโค้งตัว พบใน *C. xipholepis* ลักษณะโค้งลงพบใน *C. cairnsiana* และ *C. angulata* และลักษณะที่พบน้อยสุดคือลักษณะใบย่อยโค้งลงด้านล่างเล็กน้อยซึ่งพบใน *C. campestris* เพียงชนิดเดียวในปรงแถบนี้ ลักษณะปลายใบพบ 3 แบบด้วยกัน คือ ปลายใบมีลักษณะแหลม เรียวแหลม และเข็มแหลม พบปรงที่มีปลายใบแหลม 10 ชนิด ปลายใบเรียวแหลม 7 ชนิด ทั้งสองลักษณะนี้พบในปรงแถบเอเชียเท่านั้น ในขณะที่ปรงแถบออสเตรเลีย

ทั้งหมดมีปลายใบแบบเข็มแหลม และมีปรงแถบเอเชียเพียงชนิดเดียวที่มีปลายใบแบบเข็มแหลม คือ *C. tanqingii* เส้นกลางใบของปรงที่มีการกระจายพันธุ์บริเวณแถบเอเชีย มีเส้นกลางใบด้านบนนูนถึง 17 ชนิด (ตารางที่ 5) ยกเว้น *C. micronesica* เพียงชนิดเดียวที่มีลักษณะแบนราบ เส้นกลางใบด้านล่างนูน 11 ชนิด ที่เหลืออีก 7 ชนิดมีเส้นกลางใบด้านล่างแบนราบ ได้แก่ *C. simplicipinna*, *C. balansae*, *C. dolichophylla*, *C. brachycantha*, *C. yunnanensis*, *C. beddomei* และ *C. guizhouensis* ส่วนปรงในแถบออสเตรเลียพบเส้นกลางใบด้านบนทั้งหมดมีลักษณะแบนราบ ยกเว้น *C. xipholepis* เพียงชนิดเดียวที่มีเส้นกลางใบด้านบนนูน เส้นกลางใบด้านล่างของปรงในแถบนี้พบลักษณะนูนเพียงลักษณะเดียว ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ de Laubenfel and Adema (1998) ; Hill (1998) ; Jones (1998) เกล็ดใบหุ้มยอดมีรูปร่าง 2 แบบ (ภาพที่ 8) คือ สามเหลี่ยมแคบกับรูปร่างเป็นเส้นตรง เกล็ดใบหุ้มยอดอาจจะติดอยู่กับลำต้นไม่หลุดร่วงไป หรือมีข้อต่อเห็นชัดเจน โดยเกล็ดใบหุ้มยอดอาจมีลักษณะอ่อนนุ่ม หรือแหลมคม และอาจปกคลุมด้วยขนอ่อนปกคลุมบางๆ มีขนยาวและอ่อนนุ่มปกคลุม หรือมีขนปุยนุ่มปกคลุมอย่างหนาแน่น (ตารางที่ 5) ปรงในแถบเอเชียพบเกล็ดใบหุ้มยอดมีรูปร่างสามเหลี่ยมแคบ 16 ชนิด ยกเว้น *C. micronesica*, และ *C. diannanensis* เท่านั้นที่มีรูปร่างเป็นเส้นตรง เกล็ดใบหุ้มยอดเห็นข้อต่อชัดเจน 11 ชนิด ยกเว้น *C. collina*, *C. micronesica*, *C. diannanensis*, *C. tanqingii*, *C. beddomei*, *C. guizhouensis* และ *C. nathorstii* เท่านั้นที่เกล็ดใบหุ้มยอดติดอยู่กับลำต้นไม่หลุดร่วงไป ซึ่งเกล็ดใบหุ้มยอดพบมีลักษณะอ่อนนุ่ม 15 ชนิด ยกเว้น *C. micronesica*, *C. brachycantha* และ *C. diannanensis* มีลักษณะแหลมคม นอกจากนี้ยังพบว่าเกล็ดใบหุ้มยอดมีขนปกคลุม โดยมีขนเส้นยาวและอ่อนนุ่มปกคลุม 13 ชนิด ยกเว้น , *C. beddomei, C. pranburiensis*, *C. brachycantha*, *C. guizhouensis* ที่มีขนอ่อนปกคลุมบางๆ และมี *C. yunnanensis* เพียงชนิดเดียวที่มีขนปุยนุ่มปกคลุมอย่างหนาแน่น ทางด้านปรงในแถบออสเตรเลียพบว่า รูปร่างของเกล็ดใบหุ้มยอดเป็นแบบเส้นตรง ยกเว้น *C. campestris* ที่มีเกล็ดใบหุ้มยอดรูปร่างสามเหลี่ยมแคบ และยังพบว่าปรงในแถบนี้เกล็ดใบหุ้มยอดทั้งหมดเห็นข้อต่อชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่าเกล็ดใบหุ้มยอดมีลักษณะแหลมคม ได้แก่ *C. xipholepis* กับ *C. angulata* ส่วนที่เหลือจะมีลักษณะอ่อนนุ่ม ขนที่ปกคลุมเกล็ดใบหุ้มยอดของปรงในแถบนี้ พบดังนี้คือ *C. angulata* กับ *C. campestris* มีขนยาวและอ่อนนุ่มปกคลุมอย่างหนาแน่น และ *C. xipholepis* มีขนอ่อนๆ ปกคลุมซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jones (1998)

เมื่อพิจารณาลักษณะโคนเพศผู้ (ภาพที่ 9) ในปรงสกุล *Cycas* ทั้ง 22 ชนิด พบว่าปรงที่มีการกระจายพันธุ์แถบบริเวณเอเชียมีรูปร่างแบบกระสวย 8 ชนิดได้แก่ *C. simplicipinna, C. indica C. micronesica, C. balansae, C. brachycantha, C. yunnanensis, C. tanqingii* และ *C. guizhouensis*

มีจำนวน 8 ชนิดเท่ากับแบบไข่แคบ (ตารางที่ 6) ซึ่งได้แก่ *C. clivicola subsp. lutea*, *C. collina*, *C. chamaoensis, C. clivicola, C. dolichophylla, C. diannanensis, C. beddomei* และ *C. nathorstii* นอกจากนี้มีเพียง *C. pectinata* และ *C. pranburiensis* เท่านั้นที่มีโคนเพศผู้รูปไข่ ส่วนสีของโคนพบว่ามีสีเหลือง 11 ชนิด ยกเว้น *C. chamaoensis*, *C. micronesica*, *C. tanqingii*, *C. beddomei*, *C. nathorstii* มีโคนสีส้ม และ *C. simplicipinna* มีโคนสีครีม ตามลำดับ โดยมีขนาดของโคนยาวตั้งแต่ 12.0 – 60.0 เซนติเมตร และกว้างตั้งแต่ 2.0 – 22.0 เซนติเมตร ในขณะที่ปรงบริเวณแถบออสเตรเลียพบโคนเพศผู้รูปไข่ ได้แก่ *C. cairnsiana* ทรงไข่แคบ ได้แก่ *C. campestris* กับ *C. xipholepis* และทรงกลม ได้แก่ *C. angulata* ส่วนสีของโคนที่พบในปรงแถบนี้ส่วนใหญ่มีสีส้ม ยกเว้น *C. xipholepis* เพียงชนิดเดียวที่มีโคนสีเหลือง โดยมีขนาดของโคนยาว 4.0 – 25.0 เซนติเมตร และกว้างตั้งแต่ 2.0 – 15.0 เซนติเมตร ผลที่พบสอดคล้องกับรายงานของ de Laubenfels and Adema (1998) ; Hill (1998) ; Jones (1998) ลักษณะของ microsporophyll lamina ของปรงในแถบเอเชียพบว่ามีลักษณะแข็ง 9 ชนิด คือ *C. pectinata, C. clivicola* subsp. *lutea, C. chamaoensis, C. pranburiensis, C. micronesica*, *C. indica, C. clivicola, C. beddomei* และ *C. nathorstii* ในขณะที่ *C. simlpicipinna*, *C. balansae*, *C. dolichophylla*, *C. collina*, *C. brachycantha*, *C. diannanensis*, *C. yunnanensis*, *C. tanqingii*, *C. guizhouensis* มีลักษณะอ่อนนุ่ม ส่วนลักษณะของ microsporophyll apical spine พบว่ามีหนามยื่นออกมา 8 ชนิดคือ *C. pectinata, C. clivicola* subsp. *lutea, C. chamaoensis, C. pranburiensis*, *C. clivicola, C. tanqingii, C. beddomei* และ *C. nathorstii* แต่อีก 8 ชนิด คือ *C. simplicipinna*, *C. collina*, *C. balansae*, *C. brachycantha*, *C. indica, C. diannanensis*, *C. yunnanensis*, *C. guizhouensis* ไม่มีหนาม มีเพียง *C. micronesica* และ *C. dolichophylla* เพียงสองชนิดที่ไม่มีการเจริญของหนามส่วนบน ปรงในแถบออสเตรเลียพบว่าทุกชนิดมีลักษณะของ microsporophyll apical spine โผล่ยื่นออกมา

โคนเพศเมียประกอบด้วย megasporophyll lamina เรียงตัวกันอย่างหลวมๆ ปรงที่มีเขตกระจายพันธุ์อยู่บริเวณแถบเอเชียพบว่า megasporophyll lamina มีรูปร่างกลม 7 ชนิด (ตารางที่ 6) คือ *C. pectinata, C. clivicola* subsp. *lutea, C. chamaoensis, C. clivicola, C. dolichophylla*, *C. tanqingii* และ *C. guizhouensis* แต่ *C. simplicipinna*, *C. micronesica*, *C. balansae*, *C. collina*, *C. brachycantha*, *C. diannanensis*, *C. yunnanensis* มี megasporophyll lamina รูปไข่ ในขณะที่ *C. pranburiensis*, *C. beddomei*, *C. nathorstii* และ *C. indica* มี megasporophyll lamina รูปหอก (ภาพที่ 10) นอกจากนี้ลักษณะขอบ megasporophyll lamina ยังมีหลายแบบ (ภาพที่ 11) ได้แก่ ลักษณะขอบริมแบบซี่หวีเว้าลึกพบทั้งหมด 16 ชนิด ยกเว้น *C. beddomei* มีลักษณะขอบริมใบจัก

แบบฟันเลื่อยสม่ำเสมอ และ *C. nathorstii* ขอบริมใบจักแบบฟันเลื่อยไม่แจ่มชัด นอกจากนี้ยังพบว่า megasporophyll apical spine แตกต่างจากด้าน lateral spine ทั้งหมด 12 ชนิด ยกเว้น *C. balansae, C. simplicipinna, C. dolichophylla*, *C. collina*, *C. brachycantha*, *C. diannanensis* ที่มีด้าน apical spine เหมือนกับด้าน lateral spine ส่วนขนาด megasporophyll lamina พบว่ามีความกว้างตั้งแต่ 1.2 - 13.0 เซนติเมตร และมีความยาวตั้งแต่ 2.5 - 14.0 เซนติเมตร ส่วนปรงที่มีเขตกระจายพันธุ์อยู่แถบบริเวณออสเตรเลีย พบว่า megasporophyll lamina มีรูปร่างแบบใบหอก ยกเว้น *C. campestris* ที่มี megasporophyll lamina เป็นรูปไข่ ลักษณะขอบของ megasporophyll lamina พบลักษณะขอบริมแบบซี่หวีแบบตื้น ได้แก่ *C. campestris* ลักษณะขอบริมแบบใบจักฟันเลื่อยแบบสม่ำเสมอ ได้แก่ *C. xipholepis* และ *C. angulata* ลักษณะขอบริมใบจักฟันเลื่อยไม่แจ่มชัด ได้แก่ *C. cairnsiana* นอกจากนี้ยังพบว่า megasporophyll apical spine แตกต่างจากด้าน lateral spine และ megasporophyll lamina กว้างตั้งแต่ 1.5 - 4.0 เซนติเมตร ยาวตั้งแต่ 3.5 – 10.5 เซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jones (1998) ; Smitinand (1971) เมล็ดของปรงที่มีเขตกระจายพันธุ์อยู่แถบเอเชีย พบว่าเมล็ดมีรูปร่างเป็นรูปไข่ทั้งหมด 10 ชนิด ยกเว้น *C. pectinata*, *C. clivicola* subsp. *lutea*, *C. chamaoensis*, *C. clivicola, C. micronesica*, *C. nathorstii* มีเมล็ดรูปร่างไข่แบน และ *C. tanqingii* กับ *C. guizhouensis* เท่านั้นที่มีเมล็ดรูปร่างกลมตามลำดับ และเมล็ดมีขนาดความกว้างตั้งแต่ 1.8 – 5.0 เซนติเมตร และมีความยาวตั้งแต่ 2.3 – 6.4 เซนติเมตร ทางด้านปรงที่มีเขตกระจายพันธุ์อยู่แถบออสเตรเลีย พบว่าเมล็ดมีรูปร่างแบบไข่แบน คือ *C. xipholepis*, *C. cairnsiana* และ *C. campestris* นอกจากนี้ยังพบเมล็ดรูปไข่คือ *C. angulata* อีกด้วย ส่วนขนาดความกว้างของเมล็ดพบตั้งแต่ 2.0 – 4.0 เซนติเมตร และยาวตั้งแต่ 4.2 – 6.0 เซนติเมตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wang (1996) เช่นกัน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรงสกุล *Cycas* ที่มีเขตกระจายพันธุ์แถบทวีปเอเชีย และทวีปออสเตรเลีย เมื่อพิจารณาจาก *Cycas* ทั้งหมด 22 ชนิด แบ่งเป็นแถบทวีปเอเชีย 18 ชนิด และทวีปออสเตรเลีย 4 ชนิด จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรงในสกุลนี้ไม่พบลักษณะที่จำเพาะที่จะสามารถบ่งบอกได้ว่าเป็น *Cycas* ที่มีถิ่นกำเนิดมาจากแถบใด เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรงสกุลนี้ค่อนข้างใกล้เคียงกันมาก (Jones, 1998) แต่จะมีบางชนิดที่มีลักษณะเด่นเช่น *C. beddomei* เป็นปรงแถบเอเชียชนิดเดียวที่มีใบสีเทาไม่เงาวาว และไม่มีการโค้งตัวของใบเมื่อเทียบกับแกนกลางลำต้น ส่วน *C. angulata* เป็นปรงแถบออสเตรเลียเพียงชนิดเดียวเช่นกันที่มีใบสีเทา แต่มีความเงาวาวของใบและมีการโค้งตัวของใบเมื่อเทียบกับแกนกลางของลำต้น

C. branburiensis และ *C. micronesica* เป็นปรงแถบเอเชียที่ลักษณะก้านใบไม่มีหนาม *Cycas* แถบทวีปออสเตรเลียมีปลายใบย่อยเป็นเข็มแหลมทั้งหมด ส่วนแถบเอเชียมีเพียง *C. tanqingii* เพียงชนิดเดียวที่ปลายใบย่อยมีลักษณะเป็นเข็มแหลม ลักษณะของขนที่ปกคลุมเกล็ดใบหุ้มยอด พบว่ามี *C. cairnsiana* เพียงชนิดเดียวที่มีขนปุยนุ่มปกคลุมเกล็ดใบหุ้มยอดอย่างหนาแน่น ส่วน *C. angulata* มีโคนเพศผู้รูปร่างกลมเพียงชนิดเดียวเท่านั้น และลักษณะขอบของ megasporophyll lamina ใน *Cycas* แถบออสเตรเลียทุกชนิดจะไม่พบลักษณะขอบแบบ deeply pectinate เลย เมื่อพิจารณาด้านเขตการกระจายพันธุ์ พบว่า *Cycas* เกือบทั้งหมดพบในบริเวณเขตร้อน และมีเป็นส่วนน้อยที่พบเจริญเติบโตปรับตัวอยู่ในบริเวณที่มีอุณหภูมิหนาวเย็นซึ่งต้องพยายามปรับตัวเพื่อความอยู่รอด จึงอาจพบลักษณะทางสัณฐานภายนอกของปรงชนิดเดียวกัน ต่างแหล่งที่มา มีลักษณะบางลักษณะแตกต่างกันไปบ้าง (Jones, 1998)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้นำมาจัดจำแนก *Cycas* สอดคล้องกับ Hill (2004) ยกเว้น ลักษณะของออวุล (ovule) เกลี้ยง (glabrous) หรือมีขนสั้นหนานุ่ม (tomentose) ลักษณะของ sclerotesta เรียบ (smooth) มีริ้ว (striate) เป็นสัน (ribbed) เป็นตุ่ม (vernicose) และยอดสัน (crested) ลักษณะมีหรือไม่มี spongy megagametophytic tissue ลักษณะมีหรือไม่มี fibrous sarcotesta ลักษณะเปิดหรือปิดของ seed cone นอกจากนี้ยังใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สอดคล้องกับ Hill (2004) แต่ได้เพิ่มลักษณะเข้ามาร่วมใช้ในการจัดจำแนกด้วยคือ ลักษณะรูปร่างโคนเพศผู้ (pollen cone) รูปทรงกระบอก (cylindrical) รูปไข่ (ovoid) ส่วนลักษณะที่พบเพิ่มได้แก่ ลักษณะรูปไข่แคบ (narrowly ovoid) รูปกระสวย (fusiform) และรูปทรงกลม (globose) ลักษณะขอบริมของใบย่อย (leaflet margins) เรียบ (flat) ม้วนลง (revolute) ลักษณะที่พบเพิ่มได้แก่ ลักษณะม้วนลง (undulated) โค้งลงด้านล่างเล็กน้อย (slightly recurved) และลักษณะปลายใบย่อย (leaflet apex) ได้แก่ปลายใบอ่อนนุ่ม (soft) ปลายใบมีหนาม (spinescent) ปลายใบแหลมคม (acute) และลักษณะที่พบเพิ่มคือ ปลายใบเรียวแหลม (softly acuminate) ลักษณะที่พบและใช้นำมาจักจำแนก *Cycas* แตกต่างกันอาจเนื่องจาก *Cycas* ที่ใช้ในการจัดจำแนกมีสภาพภูมิอากาศในเขตที่ปลูกต่างกัน ซึ่งสิ่งแวดล้อมมีผลต่อลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป และนอกจากนี้ Lindstrom (2004) ใช้ลักษณะการจัดจำแนกทางสัณฐานวิทยาที่ต่างออกไปคือ ใช้วิธีการวัดความกว้าง ยาว และเส้นผ่านศูนย์กลางแล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ย จากนั้นจึงนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ ซึ่งวิธีนี้เหมาะกับการจัดจำแนก *Cycas* ที่มีลักษณะภายนอกคล้ายกันมากๆ การจัดจำแนก *Cycas* อาจจะต้องใช้หลายวิธีร่วมกันประกอบการจัดจำแนกเพื่อให้ได้ผลที่ถูกต้องมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้การจัดจำแนก *Cycas* โดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน

วิทยาเพียงอย่างเดียวอาจทำได้เพียงจำแนกชนิดได้ในเบื้องต้น เนื่องจาก *Cycas* เป็นปรงที่บางชนิดมีลักษณะภายนอกเหมือนกันมาก (Hill, 1998)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคนเพศผู้และเพศเมีย ในปรงสกุล *Cycas* ทั้ง 22 ชนิด พบว่าบางชนิดไม่อยู่ในช่วงสร้างโคนเพศผู้และเพศเมีย ดังนั้นลักษณะทางสัณฐานวิทยาอันประกอบด้วย ขนาด รูปร่าง สี ลักษณะของ microsporophyll megasporophyll และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ด ได้แก่ รูปร่าง สี ขนาด จึงอ้างอิงลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังกล่าวโดย Hill (1998)

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาลำต้นและใบของปรงในสกุล *Cycas* 22 ชนิด

Species	Stem type	Leaf					
		Colour	Glossy	Keel of leaf	No.	Terminus	Hair colour
C. pectinata	arborescent	deep green	glossy	flat	180 - 312	spine	white
C. clivicola subsp. *lutea*	arborescent	bright green	glossy	slightly keel	90 - 220	spine	white
C. chamaoensis	arborescent	deep green	glossy	flat	170 - 310	spine	white
C. pranburiensis	arborescent	bright green	glossy	slightly keel	65 - 105	spine	brown
C. simplicipinna	acaulescent	deep green	glossy	flat	35 - 90	paired leaflets	orange
C. micronesica	arborescent	deep green	glossy	flat	130 - 140	spine	white
C. clivicola	arborescent	bright green	glossy	slightly keel	90 - 220	spine	white
C. balansae	acaulescent	deep green	glossy	slightly keel	90 - 160	paired leaflets	brown
C. dolichophylla	arborescent	bright reen	glossy	flat	150 - 170	paired leaflets	orange
C. collina	acaulescent	deep green	glossy	slightly keel	110 - 180	paired leaflets	orange
C. brachycantha	acaulescent	deep green	glossy	slightly keel	100 - 210	paired leaflets	white
C. diannanensis	acaulescent	bright green	glossy	slightly keel	160 - 230	paired leaflets	white
C. yunnanensis	acaulescent	deep green	glossy	slightly keel	90 - 190	paired leaflets	white
C. tanqingii	arborescent	deep green	glossy	flat	100 - 120	paired leaflets	orange
C. guiznouensis	arborescent	deep green	glossy	slightly keel	110 - 210	paired leaflets	orange
C. beddomei	arborescent	grey green	dull	flat	170- 320	paired leaflets	brown
C. nathorstii	arborescent	bright green	glossy	flat	140 - 170	paired leaflets	white
C. indica	arborescent	bright green	glossy	flat	130 - 172	paired leaflets	white
C. xipholepis	arborescent	deep green	glossy	flat	120 - 210	spine	white
C. cairnsiana	arborescent	bright green	dull	moderately keel	120 - 230	paired leaflets	orange
C. angulata	arborescent	grey green	glossy	slightly keel	180 - 320	paired leaflets	brown
C. campestris	arborescent	bright green	glossy	strongly keel	120 - 230	paired leaflets	orange

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาก้านใบและใบย่อยของปรงในสกุล *Cycas* 22 ชนิด

Species	Petiole		Leaflet				
	Length (cm)	Spines	Leaflet margin	Keel of leaflet	Apex	Length (mm)	Width (mm)
C. pectinata	30 - 80	spinescent	entire	slightly recurved	acute	200 - 315	7.5 - 10.5
C. clivicola subsp. *lutea*	15 - 55	spinescent	entire	slightly recurved	acute	50 - 200	5.0 - 11.0
C. chamaoensis	30 - 60	spinescent	entire	slightly recurved	acute	160 - 300	7.0 - 11.0
C. pranburiensis	8 - 30	unarmed	entire	flat	acute	140 - 240	8.5 - 13.5
C. simplicipinna	35 - 140	spinescent	undulated	undulated	softly acuminate	200 - 600	14.0 - 20.0
C. micronesica	35 - 40	unarmed	undulated	slightly recurved	acute	160 - 260	11.0 - 16.5
C. clivicola	15 - 55	spinescent	undulated	flat	acute	50 - 200	5.0 - 11.0
C. balansae	40 - 160	spinescent	undulated	slightly recurved	softly acuminate	220 - 300	10.0 - 15.0
C. dolichophylla	40 - 110	spinescent	undulated	undulated	softly acuminate	190 - 240	14.0 - 25.0
C. collina	70 - 190	spinescent	undulated	undulated	softly acuminate	280 - 410	17.0 - 23.0
C. brachycantha	50 - 90	spinescent	entire	undulated	softly acuminate	200 - 250	10.0 - 14.0
C. diannanensis	45 - 100	spinescent	undulated	slightly recurved	acute	130 - 320	9.0 - 16.0
C. yunnanensis	85 - 145	spinescent	undulated	slightly recurved	softly acuminate	250 - 400	15.0 - 19.0
C. tanqingii	70 - 160	spinescent	undulated	undulated	aristate	300 - 450	15.0 - 22.0
C. guiznouensis	30 - 60	spinescent	entire	undulated	acute	160 - 370	8.0 - 12.0
C. beddomei	10 - 15	spinescent	entire	revolute	acute	100 - 175	3.0 - 4.0
C. nathorstii	45 - 55	spinescent	entire	flat	softly acuminate	190 - 310	9.0 - 14.0
C. indica	32 - 41	spinescent	entire	undulated	acute	170 - 330	8.5 - 12.0
C. xipholepis	23 - 35	spinescent	entire	flat	aristate	75 - 150	4.5 - 7.0
C. cairnsiana	18 - 27	spinescent	entire	revolute	aristate	80 - 180	2.0 - 3.0
C. angulata	28 - 52	spinescent	entire	revolute	aristate	140 - 230	4.5 - 6.5
C. campestris	15 - 90	spinescent	entire	slightly recurved	aristate	85 - 166	5.0 - 8.0

ตารางที่ 5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเส้นกลางใบย่อยและเกล็ดใบหุ้มยอดของปรงในสกุล *Cycas* 22 ชนิด

Species	Midrib		Cataphylls			
	upper	lower	Cataphyll	Cataphyll hair	Shape	Articulated/Persistent
C. pectinata	raised	raised	soft	pilose	narrowly triangular	articulated
C. clivicola subsp. *lutea*	raised	raised	soft	pilose	narrowly triangular	articulated
C. chamaoensis	raised	raised	soft	pilose	narrowly triangular	articulated
C. pranburiensis	raised	raised	soft	thinly sericeous	narrowly triangular	articulated
C. simplicipinna	raised	flat	soft	pilose	narrowly triangular	articulated
C. micronesica	flat	raised	pungent	pilose	linear	persistent
C. clivicola	raised	raised	soft	pilose	narrowly triangular	articulated
C. balansae	raised	flat	soft	pilose	narrowly triangular	articulated
C. dolichophylla	raised	flat	soft	pilose	narrowly triangular	articulated
C. collina	raised	raised	soft	pilose	narrowly triangular	persistent
C. brachycantha	raised	flat	pungent	thinly sericeous	narrowly triangular	articulated
C. diannanensis	raised	raised	pungent	pilose	linear	persistent
C. yunnanensis	raised	flat	soft	densely	narrowly triangular	articulated
C. tanqingii	raised	raised	soft	pilose	narrowly triangular	persistent
C. guiznouensis	raised	flat	soft	thinly sericeous	narrowly triangular	persistent
C. beddomei	raised	flat	soft	thinly sericeous	narrowly triangular	persistent
C. nathorstii	raised	raised	soft	pilose	narrowly triangular	persistent
C. indica	raised	raised	soft	pilose	narrowly triangular	articulated
C. xipholepis	raised	raised	pungent	thinly sericeous	linear	persistent
C. cairnsiana	flat	raised	soft	densely floccous	linear	persistent
C. angulata	flat	raised	pungent	pilose	linear	persistent
C. campestris	flat	raised	soft	pilose	narrowly triangular	persistent

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาโคนเพศผู้ โคนเพศเมียและเมล็ดของปรงในสกุล *Cycas* 22 ชนิด

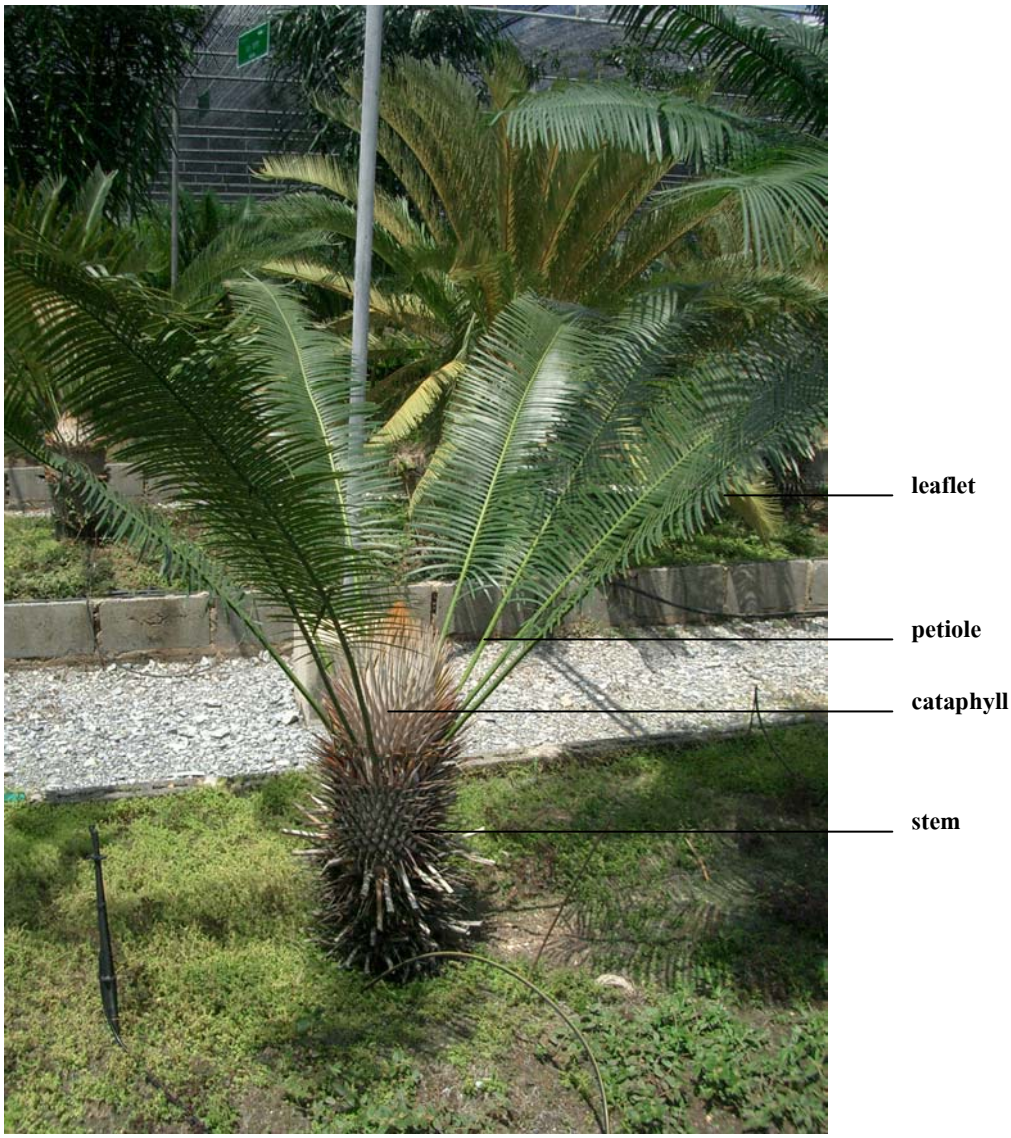
Species	Microsporophyll					
	Shape	Colour	Length (cm)	Width (cm)	Apical spine	Lamina
C. pectinata	oviod	yellow	30 - 35	16 - 22	prominent	firm
C. clivicola subsp. *lutea*	narrowly ovoid	yellow	25 - 50	8 - 11	prominent	firm
C. chamaoensis	narrowly ovoid	orange	50 - 60	12 - 13	prominent	firm
C. pranburiensis	ovoid	yellow	20 - 25	8 - 10	prominent	firm
C. simplicipinna	fusiform	cream	15 - 21	2 - 2.4	absent	soft
C. micronesica	fusiform	orange	40	8	rudimentary	firm
C. clivicola	narrowly ovoid	yellow	25 - 50	8 - 11	prominent	firm
C. balansae	fusiform	yellow	20 - 25	4 - 7	absent	soft
C. dolichophylla	narrowly ovoid	yellow	35 - 50	8 - 10	rudimentary	soft
C. collina	narrowly ovoid	yellow	25 - 35	7 - 9	absent	soft
C. brachycantha	fusiform	yellow	12 - 14	3 - 4	absent	soft
C. diannanensis	narrowly ovoid	yellow	50 - 65	9 - 13	absent	soft
C. yunnanensis	fusiform	yellow	25 - 60	6 - 10	absent	soft
C. tanqingii	fusiform	orange	40	5 - 8	prominent	soft
C. guiznouensis	fusiform	orange	24 - 40	6 - 14	absent	soft
C. beddomei	narrowly ovoid	orange	30	7.5	prominent	firm
C. nathorstii	narrowly ovoid	orange	30 - 40	15 - 22	prominent	firm
C. indica	fusiform	yellow	16 - 25	7 - 9	absent	firm
C. xipholepis	narrowly ovoid	yellow	4.0 - 6.5	2 - 2	prominent	firm
C. cairnsiana	ovoid	orange	16 - 20	7 - 10	prominent	firm
C. angulata	globose	orange	20 - 25	15 - 15	prominent	firm
C. campestris	narrowly ovoid	orange	13 - 17	7 - 9	prominent	firm

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Species	Megasporophyll				
	Length (cm)	**Lamina shape**	**Lamina margin**	**Lamina length (mm)**	**Lamina width (mm)**
C. pectinata	22 - 30	orbicular	deeply pectinate	80 - 110	100 - 13
C. clivicola subsp. *lutea*	12 - 22	orbicular	deeply pectinate	70 - 140	45 - 95
C. chamaoensis	13 - 18	orbicular	deeply pectinate	60 - 90	60 - 90
C. pranburiensis	17 - 24	lanceolate	deeply pectinate	60 - 90	12 - 27
C. simplicipinna	7 -12	ovate	deeply pectinate	45 - 55	18 - 35
C. micronesica	30	ovate	deeply pectinate	45 - 50	38 - 40
C. clivicola	12 - 22	orbicular	deeply pectinate	69 - 139	45 - 95
C. balansae	8 - 12	ovate	deeply pectinate	40 - 60	30 - 55
C. dolichophylla	15 - 26	orbicular	deeply pectinate	60 - 120	50 - 100
C. collina	8 - 14	ovate	deeply pectinate	60	30
C. brachycantha	8 - 12	ovate	deeply pectinate	25 - 40	15 - 25
C. diannanensis	9 - 15	ovate	deeply pectinate	46 - 80	24 - 30
C. yunnanensis	8 - 14	ovate	deeply pectinate	50 - 70	30 - 70
C. tanqingii	10 - 12	orbicular	deeply pectinate	50 - 55	50 - 65
C. guiznouensis	10 - 20	orbicular	deeply pectinate	60 - 70	60 - 80
C. beddomei	15 - 20	lanceolate	regulary dentate	75	25
C. nathorstii	15 - 30	lanceolate	obscurely dentate	40 - 65	18 - 25
C. indica	13 - 24	lanceolate	deeply pectinate	20 - 35	12 - 17
C. xipholepis	15 - 27	lanceolate	regulary dentate	40 - 65	20 - 30
C. cairnsiana	16 - 21	lanceolate	obscurely dentate	40 - 70	15 - 25
C. angulata	25 - 50	lanceolate	regulary dentate	50 - 105	25 - 35
C. campestris	13 - 25	ovate	shallow pectinate	35 - 50	20 - 40

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Species	Megasporophyll		Seed		
	No. Ovule	Apical spine	Shape	Length (mm)	Width (mm)
C. pectinata	2 - 4	distinct form leteral spines	flattened ovoid	35 - 39	26 - 35
C. clivicola subsp. *lutea*	2 - 4	distinct form leteral spines	flattened ovoid	35 - 39	26 - 35
C. chamaoensis	2 - 4	distinct form leteral spines	flattened ovoid	35 - 40	30 - 40
C. pranburiensis	2 - 4	distinct form leteral spines	ovoid	35 - 40	29 - 32
C. simplicipinna	2	not distinct from leteral spines	ovoid	25 - 27	18 - 21
C. micronesica	2 - 6	distinct from leteral spines	flattened ovoid	60	50
C. clivicola	-	distinct from leteral spines	flattened ovoid	30 - 34	20- 23
C. balansae	2 - 4	not distinct from leteral spines	ovoid	25 - 27	20
C. dolichophylla	2 - 4	not distinct from leteral spines	ovoid	40 - 64	33 - 36
C. collina	2 - 4	not distinct from leteral spines	ovoid	25 - 27	20 - 25
C. brachycantha	2 - 4	not distinct from leteral spines	ovoid	25 - 27	20
C. diannanensis	4 - 8	not distinct from leteral spines	ovoid	28 - 40	20 - 32
C. yunnanensis	2 - 4	distinct from leteral spines	ovoid	25 - 27	20 - 22
C. tanqingii	2	distinct from leteral spines	subglobose	35 - 40	30 - 35
C. guiznouensis	4 - 8	distinct from leteral spines	subglobose	23 - 29	22 - 28
C. beddomei	2	distinct from leteral spines	ovoid	25 -30	20 - 25
C. nathorstii	6 - 10	distinct from leteral spines	flattened ovoid	40 - 45	34 - 37
C. indica	8	distinct from leteral spines	ovoid	25 - 27	20 - 22
C. xipholepis	2 - 6	distinct from leteral spines	flattened ovoid	33	28
C. cairnsiana	2 - 4	distinct from leteral spines	flattened ovoid	36 - 42	30 - 37
C. angulata	6 - 12	distinct from leteral spines	ovoid	45 -60	40 - 50
C. campestris	2 - 6	distinct from leteral spines	flattened ovoid	35 - 50	20 - 40



ภาพที่ 2 ภาพถ่ายแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรงในสกุล *Cycas*

(ก)

(ข)

ภาพที่ 3 ภาพถ่ายแสดงลักษณะลำต้นของปรงในสกุล *Cycas*

(ก) แสดงลักษณะลำต้นอยู่ใต้ดิน (acaulescent)

(ข) แสดงลักษณะลำต้นอยู่บนดิน (aborescent)

ภาพที่ 4 ภาพถ่ายแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบปรงในสกุล *Cycas*

(ก) แสดงลักษณะไม่มีการโค้งตัวของใบย่อย (flat)

(ข) แสดงลักษณะใบย่อยโค้งลงด้านล่างเล็กน้อย (slightly recurved)

(ค) แสดงลักษณะใบย่อยโค้งลง (revolute)

(ง) แสดงลักษณะเป็นคลื่น (undulated)

(จ) แสดงลักษณะปลายใบย่อย ; acute คือ ปลายใบแหลมคม

softly acuminate คือ ปลายใบเรียวแหลม

aristate คือ ปลายใบเป็นเข็มแหลม

flat

(ก)

undulated

(ง)

slightly recurved

(ข)

revolute

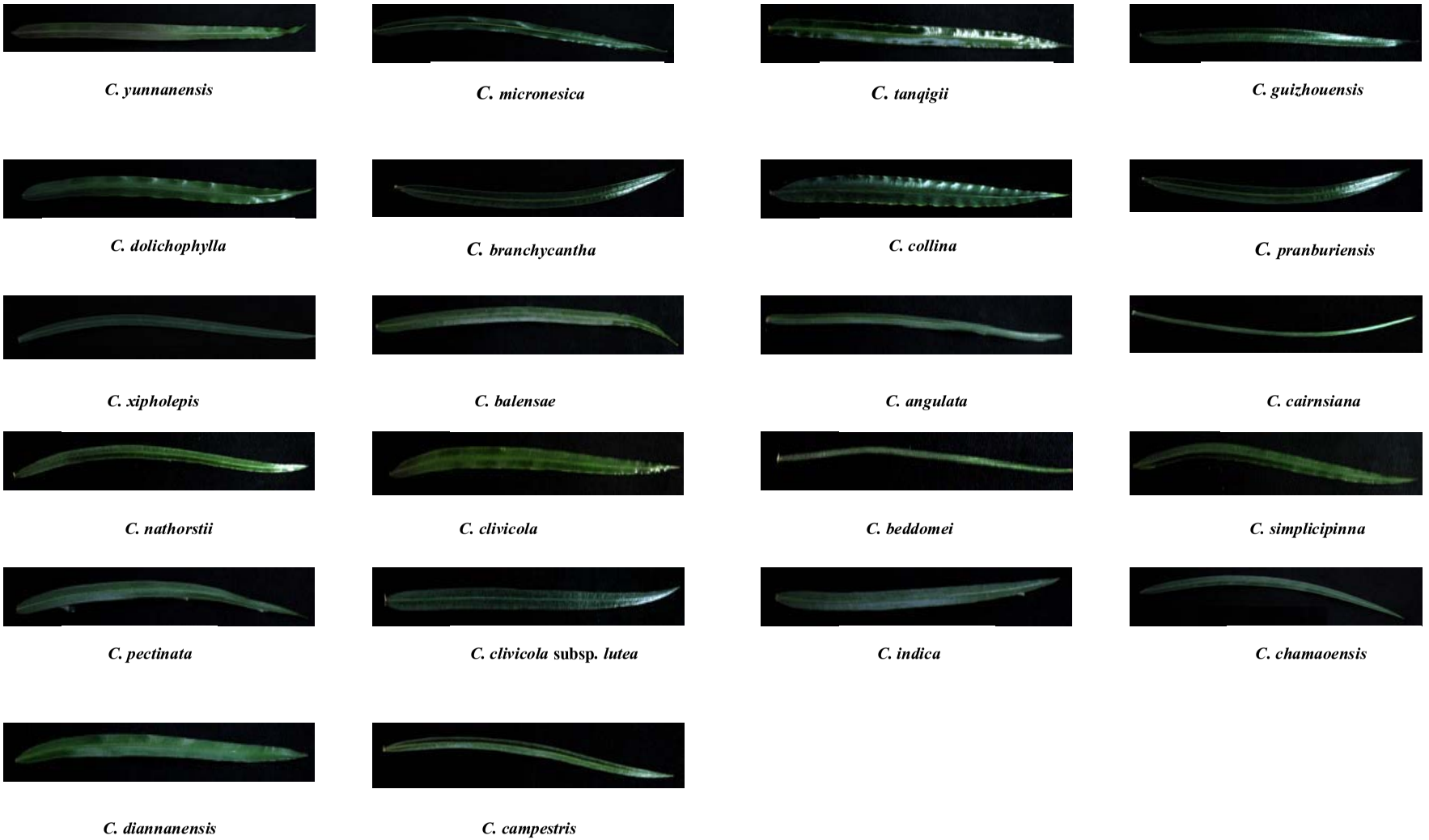
(ค)

acute

softly acuminate

aristate

(จ)



ภาพที่ 5 ภาพถ่ายแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบย่อย โดยแสดงรูปร่าง สี และลักษณะของขอบใบย่อยของปรงในสกุล *Cycas* 22 ชนิด

(ก)

(ข)

ภาพที่ 6 ภาพถ่ายแสดงลักษณะใบย่อยส่วนปลายใบในปรงในสกุล *Cycas*

(ก) ลักษณะใบย่อยส่วนปลายใบลดรูปเป็นหนาม (spine)

(ข) ลักษณะใบย่อยส่วนปลายใบเป็นใบคู่ (paired leaflets)

(ก)

(ข)

(ค)

(ง)

ภาพที่ 7 ภาพถ่ายแสดงลักษณะการโค้งตัวของใบเมื่อเทียบกับแกนกลางลำต้นในปรงในสกุล *Cycas*

(ก) ลักษณะไม่มีการโค้งตัวของใบ (flat)

(ข) ลักษณะใบโค้งตัวเล็กน้อย (slightly keel)

(ค) ลักษณะใบโค้งตัวปานกลาง (moderately keel)

(ง) ลักษณะใบโค้งตัวมาก (strongly keel)

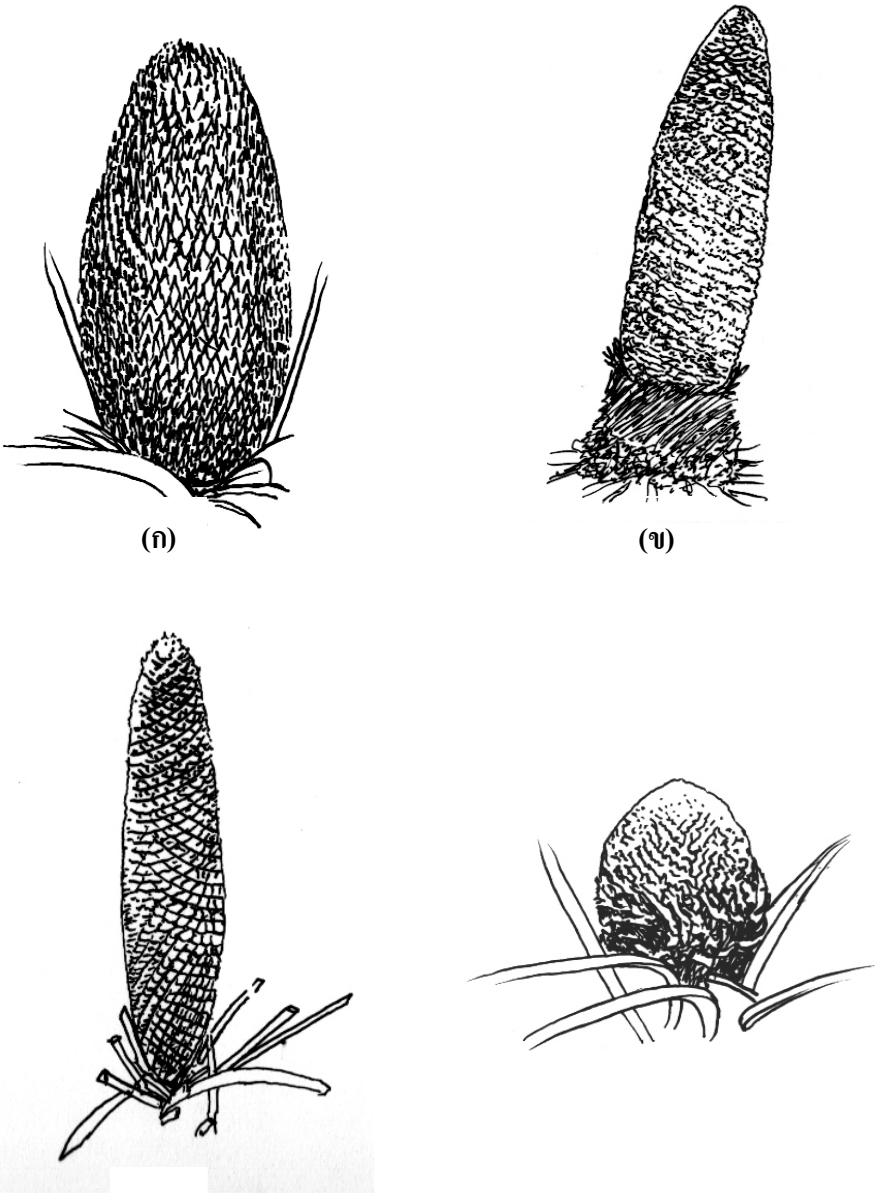
(ก)

(ข)

ภาพที่ 8 ภาพถ่ายแสดงรูปร่างเกล็ดใบหุ้มยอด (cataphyll) ของปรงสกุล *Cycas*

(ก) เกล็ดใบหุ้มยอดเป็นรูปสามเหลี่ยมแคบ (narrowly triangular)

(ข) เกล็ดใบหุ้มยอดเป็นเส้นยาว (linear)



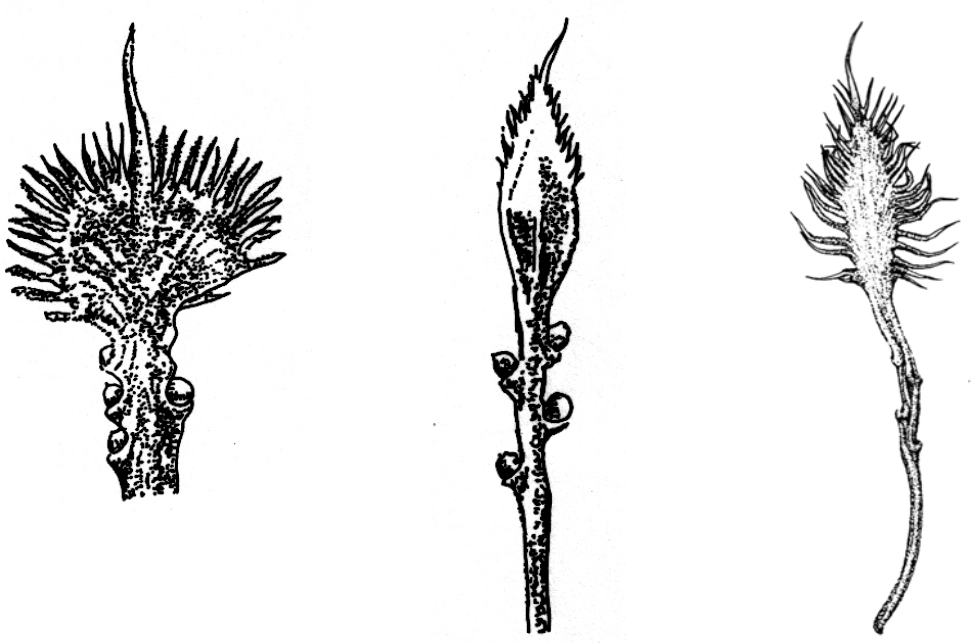
ภาพที่ 9 ภาพวาดแสดงลักษณะรูปร่างโคนเพศผู้

(ก) รูปไข่ (ovoid)

(ข) รูปไข่แคบ (narrowly ovoid)

(ค) รูปกระสวย (fusiform)

(ง) รูปทรงกลม (globose)



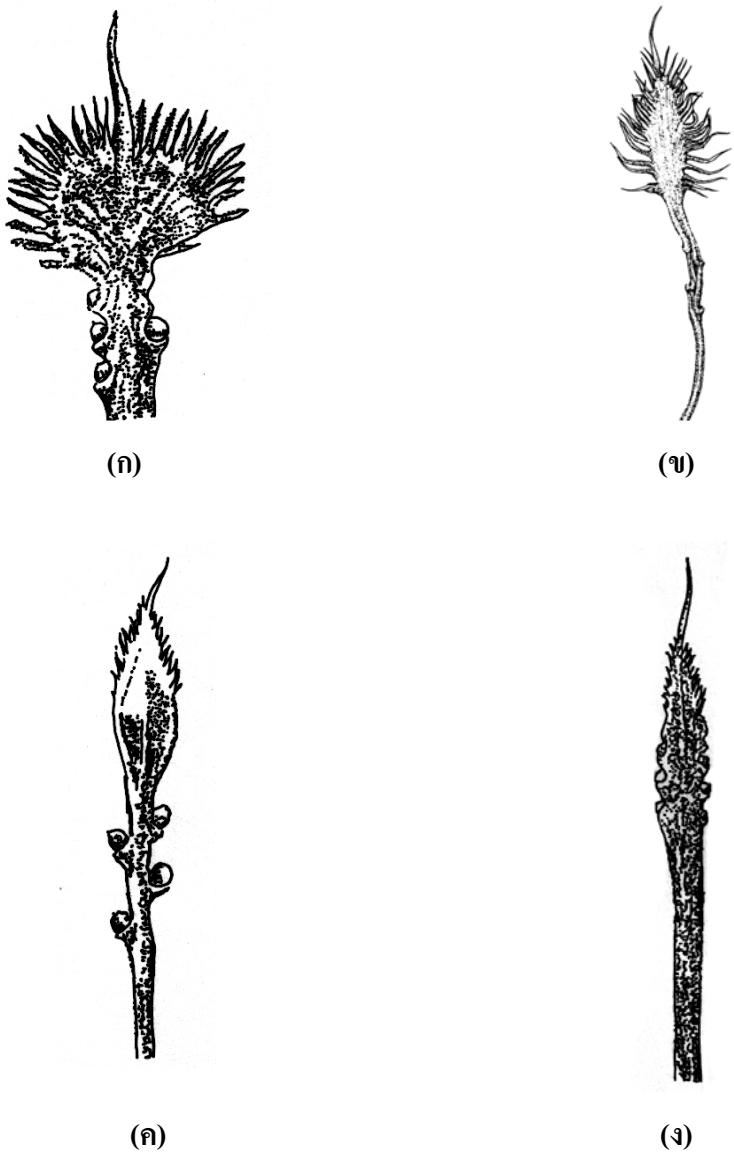
(ก) **(ข)** **(ค)**

ภาพที่ 10 ภาพวาดแสดงลักษณะรูปร่างของ megasporophyll lamina

(ก) รูปกลม (orbicular)

(ข) รูปใบหอก (lanceolate)

(ค) รูปไข่ (ovate)



(ก) **(ข)**

(ค) **(ง)**

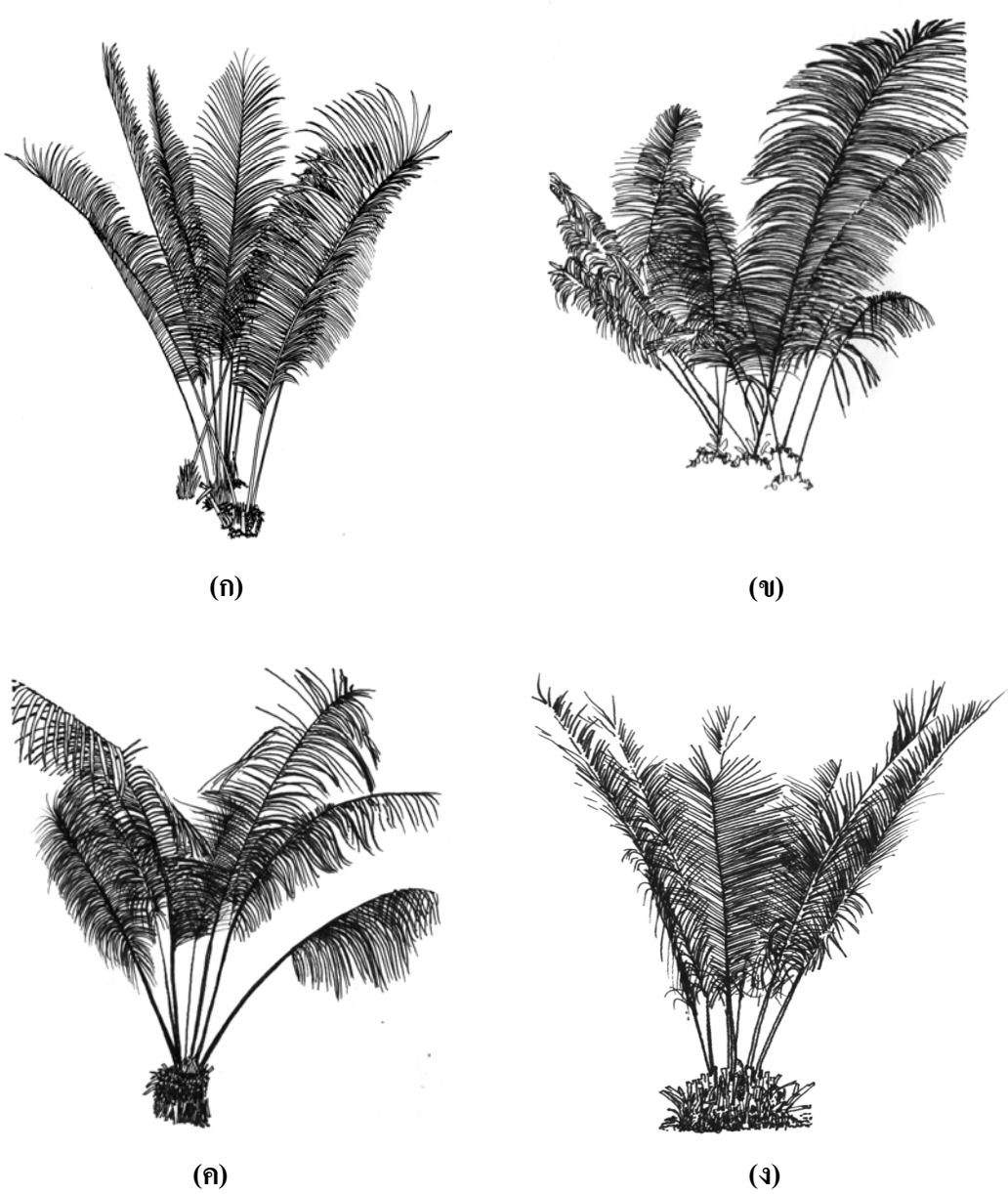
ภาพที่ 11 ภาพวาดแสดงลักษณะขอบของ megasporophyll lamina

(ก) ขอบริมแบบซี่หวีเว้าลึก (deeply pectinate)

(ข) ขอบริมแบบซี่ฟันหวีแบบตื้น (shallow pectinate)

(ค) ขอบริมแบบใบจักเป็นฟันเลื่อยสม่ำเสมอ (regulary dentate)

(ง) ขอบริมแบบใบจักฟันเลื่อยไม่แจ่มชัด (obscure dentate)



ภาพที่ 12 ภาพวาดแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Cycas* ที่มีถิ่นกำเนิดแถบทวีปเอเชีย

(ก) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. diannanensis*

(ข) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. yunnanensis*

(ค) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. tanqingii*

(ง) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. guizhouensis*

(จ)

(ฉ)

(ช)

(ซ)

ภาพที่ 12 (ต่อ)

(จ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. pranburiensis*

(ฉ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. pectinata*

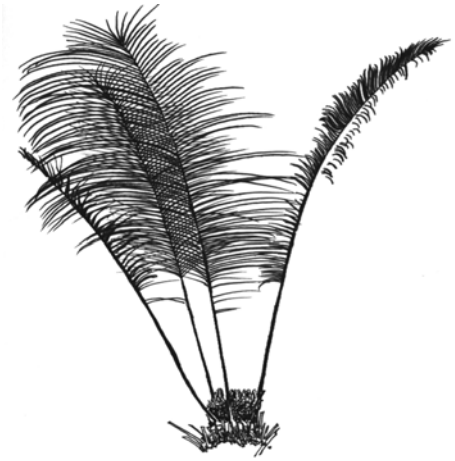
(ช) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. chamaoensis*

(ซ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. clivicola* subsp. *lutea*

(ฌ)

(ญ)

(ฎ)



(ฏ)

ภาพที่ 12 (ต่อ)

(ฌ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. clivicola*

(ญ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. micronesica*

(ฎ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. simplicipinna*

(ฏ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. balansae*

(ฐ)

(ฑ)

(ฒ)

(ณ)

ภาพที่ 12 (ต่อ)

(ฐ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. branchycantha*

(ฑ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. dolichophylla*

(ฒ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. collina*

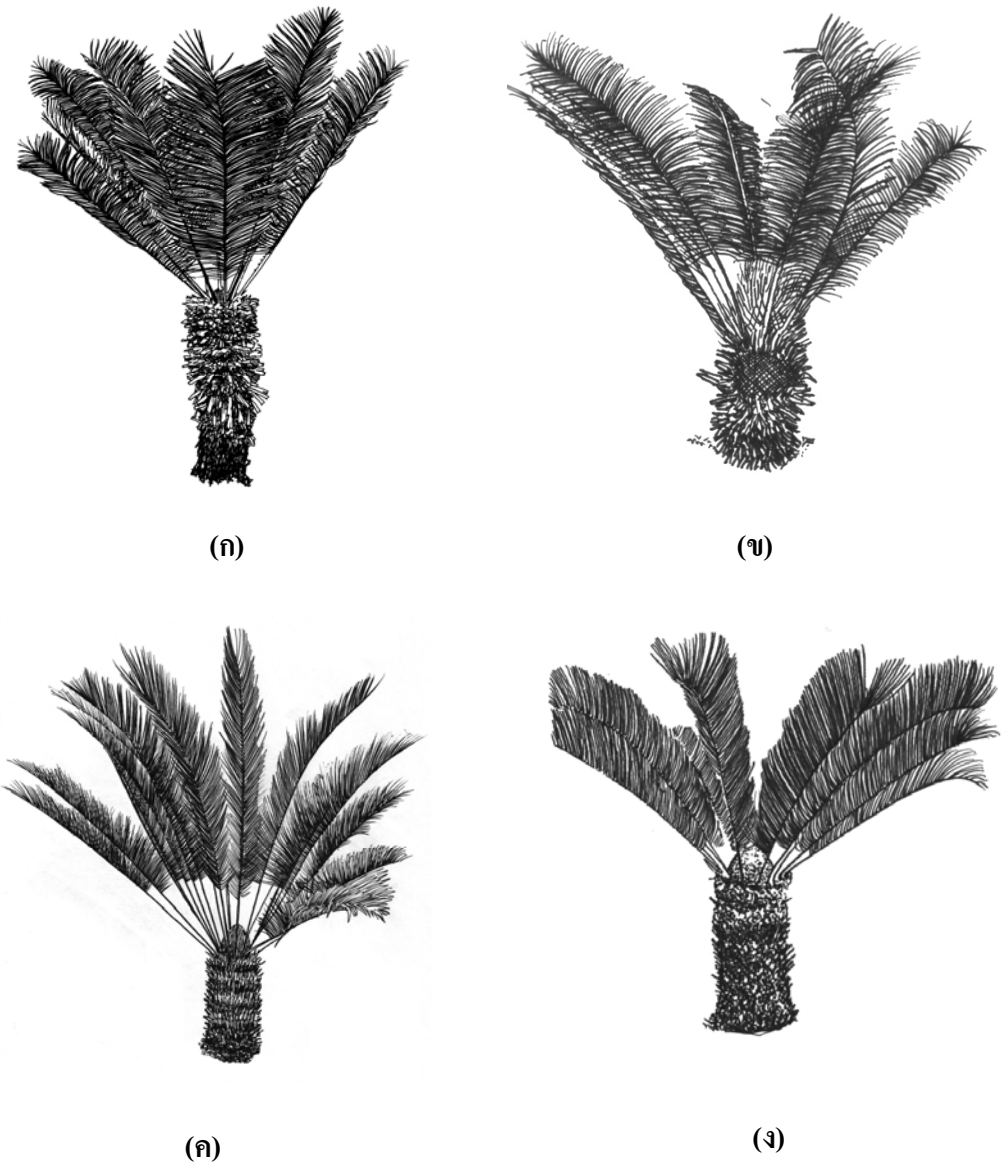
(ณ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. beddomei*

(ด) **(ต)**

ภาพที่ 12 (ต่อ)

(ด) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. nathorstii*

(ต) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. indica*



(ก) **(ข)**

(ค) **(ง)**

ภาพที่ 13 ภาพวาดแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Cycas* ที่มีถิ่นกำเนิดแถบทวีปออสเตรเลีย

(ก) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. xipholepis*

(ข) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. cairnsiana*

(ค) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. angulata*

(ง) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *C. campestris*

Phenogram ที่สร้างจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เมื่อใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.0 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ *Cycas* ทั้งหมด 22 ชนิดโดยนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 24 ลักษณะมาสร้างเป็น phenogram (ภาพที่ 14) โดยสามารถแบ่งกลุ่ม *Cycas* ได้เป็นกลุ่มได้ 4 กลุ่ม โดยไม่แยกตามถิ่นกำเนิด

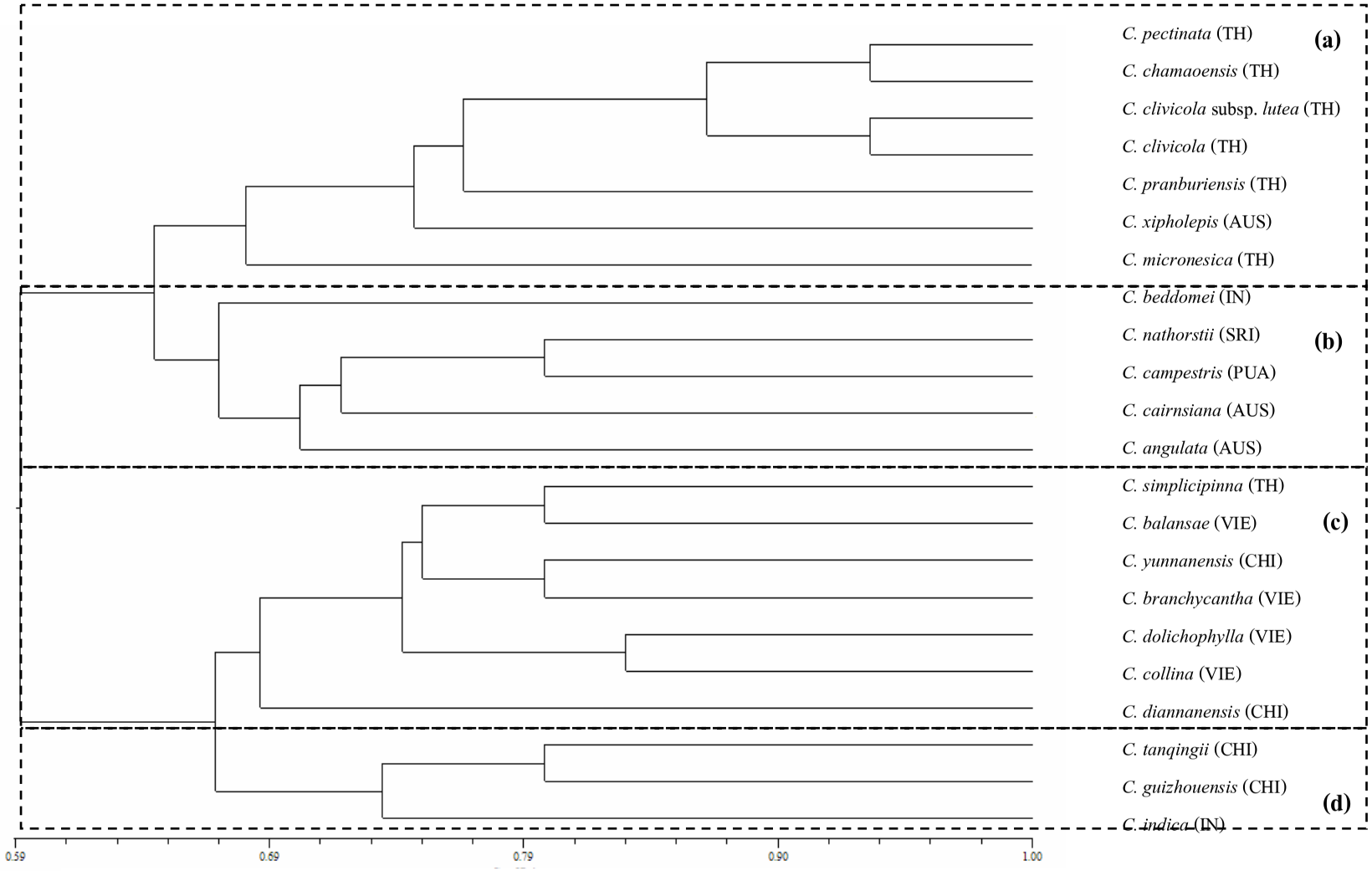
กลุ่ม a ประกอบด้วย *C. pectianta*, *C. chamaoensis*, *C. clivicola* subsp. *lutea* , *C. clivicola*, *C. pranburiensis*, *C. xipholepis* และ *C. micronesica* ปรงในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จัดอยู่ใน section *Indosinenses* ยกเว้น *C. micronesica* จัดอยู่ใน section *Stangerioides* และ *C. xipholepis* จัดอยู่ใน section *Cycas* subsection *Endemicae* (Hill, 2004) ส่วนใหญ่ปรงในกลุ่มย่อยนี้มีถิ่นกำเนิดจากประเทศไทย แต่มีเพียงชนิดเดียวคือ *C. xipholepis* มีถิ่นกำเนิดมาจากทวีปออสเตรเลีย

กลุ่ม b ประกอบด้วย *C. beddomei*, *C. nathorstii* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชีย จัดอยู่ใน section *Cycas* และ *C. campestris*, *C. cairnsiana*, *C. angulata* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปออสเตรเลียจัดอยู่ใน section *Cycas* subsection *Endemicae* (Hill, 2004)

กลุ่ม c ประกอบด้วย *C. simplicipinna* , *C. balansae*, *C. yunnanensis*, *C. collina*, *C. branchycantha*, *C. dolichophylla* และ *C. diannanensis* ปรงในกลุ่มย่อยนี้ส่วนใหญ่มีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศเวียดนาม ยกเว้น *C. yunnanensis* และ *C. diannanensis* มีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศจีน แต่ปรงทุกชนิดในกลุ่มย่อยนี้จัดอยู่ใน section *Stangerioides* (Hill, 2004)

กลุ่ม d ประกอบด้วย *C. tanqingii*, *C .guizhouensis* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศจีน จัดอยู่ใน section *Stangerioides* และ *C. indica* มีถิ่นกำเนิดจากประเทศอินเดีย และจัดอยู่ใน section *Cycas* (Hill, 2004)

เมื่อพิจารณา phenogram ที่สร้างจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่ากลุ่ม a มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่ม b มากกว่ากลุ่ม a กับกลุ่ม c และกลุ่ม a กับกลุ่ม d ส่วนกลุ่ม c มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่ม d มากกว่ากลุ่ม c กับกลุ่ม a และกลุ่ม c กับกลุ่ม b เมื่อพิจารณาถึงด้านเขตการกระจายพันธุ์และถิ่นกำเนิด พบว่า phenogram ที่สร้างจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่มีความสอดคล้องกับลักษณะการกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติและถิ่นกำเนิดของปรง



ภาพที่ 14 Phenogram สร้างจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 24 ลักษณะ ของ *Cycas* ทั้ง 22 ชนิด

หมายเหตุ TH = Thailand, AUS = Australia, CHI = China, VIE = Vietnam, PUA = Papua new guinea, SRI = Srilanka, IN = India

2. การสกัดดีเอ็นเอจากปรงในสกุล *Cycas*

จากการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของปรงสกุล *Cycas* โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1990) เมื่อใช้ CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) เป็นส่วนประกอบบัฟเฟอร์ พบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับดีเอ็นเอเมื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เนื่องจากได้ดีเอ็นเอประมาณ 2 µg ต่อใบปรง 1 กรัม โดยตรวจสอบความเข้มข้นจากค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

3. การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก *Cycas* จะนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ 5 คู่ คือ $trnS^{UGA}$-$trnfM^{CAU}$, $psbM^{F}$-$trnD^{GUCR}$, $trnF^{GAA}$-3'$trnL^{UAA}$, 3'$trnL^{UAAR}$-5'$trnL^{UAAF}$ และ atpB-rbcL เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปรงสกุล *Cycas* ด้วยไพรเมอร์ $trnS^{UGA}$-$trnsM^{CAU}$ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 868 คู่เบส, ไพรเมอร์ $psbM^{F}$-$trnD^{GUCR}$ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 969-984 คู่เบส, ไพรเมอร์ $trnF^{GAA}$-3'$trnL^{UAA}$ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 410 คู่เบส, ไพรเมอร์ 3'$trnL^{UAAR}$-5'$trnL^{UAAF}$ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 523 คู่เบส และไพรเมอร์ atpB-rbcL พบดีเอ็นเอขนาด 742 คู่เบส เมื่อตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธี electrophoresis ใน agarose gel ความเข้มข้น 1%

4. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้

4.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ $trnF^{GAA}$-3'$trnL^{UAA}$

จากการใช้ไพรเมอร์ $trnF^{GAA}$-3'$trnL^{UAA}$ ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของปรง สกุล *Cycas* จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *C. balansae*, *C. beddensis*, *C. cairnsiana*, *C. yorkiana*, *C. semota* และใช้ *Z. intermis* เป็น outgroup โดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6 (Nicholas and Nicholas, 1997) ประมวลผล พบว่ามีความยาวของสายนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 410 คู่เบส ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ค่อนข้างอนุรักษ์ (conserved) ยกเว้นมีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่ 73, 315, 317-322, 325,326, 328, 329, 331-335, 338-340, 343, 345-360 ใน *C. balansae* เปลี่ยนแปลงใน *C. cairnsiana* ตำแหน่งที่ 111, 182 และ 285 เปลี่ยนแปลงใน *C. badensis* ตำแหน่งที่ 125, 187 และ 223 เปลี่ยนแปลงใน

C. yorkiana ตำแหน่งที่ 46, 219 และ 313 เปลี่ยนแปลงใน *C. semota* ในตำแหน่งที่ 275 กับ 284 (ภาพผนวกที่1)

4.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ $trnS^{UGA}$-$trnfM^{CAU}$

จากการใช้ไพรเมอร์ $trnS^{UGA}$-$trnfM^{CAU}$ ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของปรงสกุล *Cycas* จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *C. campestris*, *C. micronesica*, *C chamaoensis*, *C. dolichophylla*, *C. nathorstii* และใช้ *Z. intermis* เป็น outgroup โดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6 (Nicholas and Nicholas, 1997) ประมวลผล พบว่ามีความยาวของสายนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 868 คู่เบส ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นแบบอนุรักษ์ ยกเว้นมีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งที่ 69 กับ 261 ใน *C. campestris* และตำแหน่งที่ 610 กับ 669 ใน *C. nathorstii* เพียง 2 ชนิดเท่านั้น (ภาพผนวกที่ 2)

4.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ 3'$trnL^{UAAR}$-5'$trnL^{UAAF}$

จากการใช้ไพรเมอร์ 3'$trnL^{UAAR}$-5'$trnL^{UAAF}$ ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของปรง สกุล *Cycas* จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *C. campestris*, *C. micronesica*, *C. balansae*, *C. cairnsiana*, *C. badensis* และใช้ *Z. intermis* เป็น outgroup โดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6 (Nicholas and Nicholas, 1997) ประมวลผล พบว่ามีความยาวของสายนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 523 คู่เบส ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ค่อนข้างอนุรักษ์ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ใน *C. balansae* มากที่สุด และมีการเปลี่ยนแปลงใน *C. cairnsiana* ในตำแหน่งที่ 513, 514, 516, 517, 518, 522, 523 *C. badensis* เปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่ง 145, 158, 468, 520, 522, 523 และ *C. micronesica* เปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 217 เพียงตำแหน่งเดียว (ภาพผนวกที่ 3)

4.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ atpB-rbcL

จากการใช้ไพรเมอร์ atpB-rbcL ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของปรง สกุล *Cycas* จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *C. balansae*, *C. cairnsiana*, *C. yorkiana*, *C. fugax, C. badensis* และใช้ *Z. intermis* เป็น outgroup โดยใช้โปรแกรม GeneDoc version 2.6 (Nicholas and Nicholas, 1997) ประมวลผล พบว่ามีความยาวของสายนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 742 คู่เบส ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ค่อนข้างอนุรักษ์

ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. yorkiana* ในตำแหน่งที่ 110 เพียงตำแหน่งเดียว (ภาพผนวกที่ 4)

จากการศึกษาไพรเมอร์ข้างต้น อันได้แก่ $trnS^{UGA}$-$trnfM^{CAU}$, $trnF^{GAA}$-3'$trnL^{UAA}$, 3'$trnL^{UAAR}$-5'$trnL^{UAAF}$ และ atpB-rbcL พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ค่อนข้างเป็นแบบอนุรักษ์ จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการจัดจำแนกความแตกต่างของ *Cycas* ได้

5. ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ $psbM^{F}$-$trnD^{GUCR}$ **จาก chloroplast DNA ในปรงสกุล *Cycas***

ความยาวของ $psbM^{F}$-$trnD^{GUCR}$ intergenic spacer อยู่ระหว่าง 969 ถึง 984 คู่เบส โดยมีชนิดของเบสอะดีนีน (adenine) ตั้งแต่ 33.1-35.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยที่ 34.1 เปอร์เซ็นต์ เบสไธมีน (thymine) 27.2-30.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยที่ 28.6 เปอร์เซ็นต์ เบสกัวนีน (guanine) 19.3-21.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยที่ 20.5 เปอร์เซ็นต์ และเบสไซโตซีน (cytosine) 15.5-18.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยที่ 16.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *Cycas* ทั้งหมดมีปริมาณเบสกัวนีนกับเบสไซโตซีน (GC) รวมกันตั้งแต่ 36.4-38.6 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยที่ 37.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเบสอะดีนีนกับเบสไธมีน (AT) มีปริมาณรวมกันตั้งแต่ 61.4-65.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ย 62.6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ข้างต้นส่วนใหญ่ให้ข้อมูล AT rich ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะจีโนมของคลอโรพลาสต์ทั่วไปที่พบส่วนประกอบของ AT rich อยู่ทุกๆ ที่ (Whitfeld and Bottemley, 1983; Chaw *et al.,* 2004)

ตารางที่ 7 แสดงองค์ประกอบของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน psbM^{F}-trnD^{GUCR} intergenic spacer และเปรียบเทียบข้อมูลกับ *Cycas* ทั้ง 22 ชนิด

Species	(Adenine) (%)	(Thymine) (%)	(Guanine) (%)	(Cytosine) (%)	%GC	% AT
C. pectinata	33.6	28.7	20.6	17.0	37.6	62.3
C. clivicola subsp. *lutea*	33.6	28.4	20.8	17.2	38.0	62.0
C. chamaoensis	33.5	28.8	20.7	16.9	37.6	62.3
C. pranburiensis	33.2	29.0	20.9	16.9	37.8	62.2
C. simplicipinna	33.1	28.6	21.5	16.8	38.3	61.7
C. clivicola	33.4	28.4	21.1	17.1	38.2	61.8
C. micronesica	34.0	28.4	20.5	17.1	37.6	62.4
C. balansae	34.7	28.8	19.9	16.6	36.5	63.5
C. dolichophylla	34.3	27.3	20.5	17.9	38.4	61.6
C. collina	34.2	27.8	20.6	17.3	37.9	62.0
C. brachycantha	33.8	30.1	20.9	15.5	36.4	63.9
C. diannanensis	34.4	28.3	20.5	17.0	37.5	62.7
C. yunnanensis	34.1	28.7	20.8	16.5	37.3	62.8
C. tanqingii	33.8	28.3	21.0	16.9	37.9	62.1
C. guizhouensis	34.0	28.4	20.8	16.8	37.6	62.4
C. beddomei	34.4	28.5	20.2	16.9	37.1	62.9
C. nathorstii	34.8	30.3	19.3	15.6	34.9	65.1
C. indica	35.0	30.1	19.4	15.5	38.6	65.1
C. xipholepis	34.2	27.2	20.5	18.1	37.3	61.4
C. cairnsiana	34.3	28.4	20.3	17.0	37.3	62.7
C. angulata	34.4	28.3	20.4	16.9	37.6	62.7
C. campestris	34.1	28.3	20.6	17.0	37.6	62.4
ค่าเฉลี่ย	34.1	28.6	20.5	16.8	37.4	62.6

การแทนที่เบส (base substitution) เหมาะสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสปีชีส์ต่างๆ เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *C. pectinata* เป็นสายมาตรฐาน (standard sequence) เนื่องจากเป็นปรงที่พบอยู่ทั่วไปและพบเห็นได้ง่ายจึงใช้เป็นตำแหน่งเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จาก *Cycas* ทั้งหมด 22 ชนิด พบว่าเกิดการแทนที่ระหว่างเบสกลุ่มเดียวกัน (transition) คือการเทนที่เบสพิวรีนด้วยเบสพิวรีน และการแทนที่เบสไพริมิดีนด้วยเบสไพริมิดีน นอกจากนี้ยังพบการแทนที่ระหว่างเบสต่างกลุ่ม (transversion) มี 2 แบบเช่นกันคือ การแทนที่เบสกลุ่มไพริมิดีนด้วยเบสพิวรีน และการแทนที่เบสพิวรีนด้วยเบสกลุ่มไพริมิดีน (ภาพที่ 15) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Cycas* ทั้ง 22 ชนิด มีค่า transition (Ts) เท่ากับ 1.850 มีค่า transversion (Tv) เท่ากับ 1.315 และมีค่า Ts/Tv ratio เท่ากับ 1.406 ซึ่งค่าที่ได้นี้เกิดจากการ alignment จากนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 933 คู่เบส (ตารางที่ 8)

ส่วนการเพิ่ม/ลดของเบส (insertion or deletion) คือการขาดหายไป หรือการเพิ่มขึ้นมาของคู่เบส คือ พิวรินและไพริมิดีนในสายของ DNA ทำให้การเรียงลำดับของเบสเปลี่ยนไปจากเดิม เมื่อตรวจสอบดูสายนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดเปรียบเทียบกับสายมาตรฐานพบว่า *C. xipholepis* มีการเพิ่มของเบสไธมีนในตำแหน่งลำดับเบสที่ 20 กลุ่มปรงที่มีถิ่นกำเนิดจากทวีปออสเตรเลีย ได้แก่ *C. angulata*, *C. campestris*, *C. cairnsiana* และ *C. xipholepis* มีการเพิ่มของเบสกัวนีนในตำแหน่งลำดับเบสที่ 633 และมีการลดลงของเบสกัวนีนในตำแหน่งลำดับเบสที่ 450 และเบสไธมีนตำแหน่งลำดับเบสที่ 481 กลุ่มปรงที่มีถิ่นกำเนิดจากประเทศเวียดนามได้แก่ *C. balansae*, *C. branchycantha*, *C. dolichophylla* และ *C. collina* มีการเพิ่มขึ้นของเบสกัวนีนในตำแหน่งที่ 721-725 ส่วน *C. yunnanensis* มีการเพิ่มของเบสไซโตซีนเพียงชนิดเดียวในตำแหน่งที่ 721 นอกจากนี้ยังพบว่า ในกลุ่มปรงที่มีถิ่นกำเนิดจากทวีปออสเตรเลียทั้งหมดได้แก่ *C. angulata*, *C. campestris*, *C. cairnsiana* และ *C. xipholepis* จากข้อมูลลำดับเบสบริเวณ psbM^{F}-trnD^{GUCR} intergenic spacer เมื่อเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์สายมาตรฐาน ถือว่ามีการแปรผันต่ำ คือเกิดการเพิ่มหรือการขาดหายไปของเบสอยู่ในเกณฑ์ต่ำอาจเนื่องมาจาก *Cycas* มีวิวัฒนาการแบบค่อยๆ เป็นค่อยๆ ไป

```
                    CLUSTAL 2.0.5 multiple sequence alignment

C_pectinata         GATCTTATCATTTTCGCTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_indica            GATCTTATCATTTTCGCTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_nathorstii        GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_chamaoensis       GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_pranburiensis     GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_beddomei          GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_lutea             GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_clivicola         GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_micronesica       GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAGTAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_diannanensis      GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_yunnanensis       GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_tanqingii         GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_guizhouensis      GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_balansae          GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_branchycantha     GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_dolichophylla     GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_collina           GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCATAAAGATGAT 59
C_simplicipinna     GATCTTATCATTTTCACTT-CGTTCTACAATAACTCGAGATTTGATCTCCTAAAGATGAT 59
C_angulata          GATCTTATCATTTTCACTT-CCTTCTACAATAACTCCAGATTTGATCTCCTAAAGATGAT 59
C_campestris        GATCTTATCATTTTCACTT-CCTTCTACAATAACTCCAGATTTGATCTCCTAAAGATGAT 59
C_cairnsiana        GATCTTATCATTTTCACTT-CCTTCTACAATAACTCCAGATTTGATCTCCTAAAGATGAT 59
C_xipholepis        GATCT-ATCATTTTCACTTTCCTTCTACAATAACTCCAGATTTGATCTCCTAAAGATGAT 59
                    ***** ********* *** * ******* ****** ************ **********


C_pectinata         GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATATGATTTATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTAGAT 119
C_indica            GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATATGATTTATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTAGAT 119
C_nathorstii        GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATGTGATTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_chamaoensis       GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATGTGATTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_pranburiensis     GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATGTGATTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_beddomei          GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATGTGATTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGTAC 119
C_lutea             GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATGTGGTTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_clivicola         GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATGTGGTTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_micronesica       GAATCCCTTTTAAGGACCCATAAATGTGATTGATTGAATACCTGGAGTATGAGACTGGAC 119
C_diannanensis      GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATGTGATTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_yunnanensis       GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATGTGATTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_tanqingii         GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATGTGATTGATTGAGTCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_guizhouensis      GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATGTGATTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_balansae          GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATGTGATTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_branchycantha     GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATGTGATTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_dolichophylla     GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATGTGATTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_collina           GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATGTGATTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_simplicipinna     GAATCCCTTTTAAGGATCCATAAATGTGATTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_angulata          GAATCCCTTTTAAGGATCCCTAAATGTGATTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_campestris        GAATCCCTTTTAAGGATCCCTAAATGTGATTGATTGTATCCCTGCAGTATGAGATTGGAC 119
C_cairnsiana        GAATCCCTTTTAAGGATCCCTAAATGTGATTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
C_xipholepis        GAATCCCTTTTAAGGATCCCTAAATGTGATTGATTGAATCCCTGGAGTATGAGATTGGAC 119
                    ***************** ** ***** ** ** ****  * **** ********* *  *
```

ภาพที่ 15 ผลการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ $psbM^{F}$-$trnD^{GUCR}$ intergenic spacer ของปรง ของปรงสกุล *Cycas* 22 ชนิด

หมายเหตุ A = เบสอะดีนีน (Adenine), T = เบสไธมีน (Thymine)

G = เบสกัวนีน (Guanine) และ C = เบสไซโตซีน (Cytosine)

```
C_pectinana          GAATAGAATCAATTTGAATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGAATTACTCAATGGAAATG 179
C_indica             GAATAGAATCAATTTGAATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGAATTACTCAATGGAAATG 179
C_nathorstii         GAATAGAATCAATTTGAATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGAATTACTCAATGGAAATG 179
C_chamaoensis        GAATAGAATCAATTTGAATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGAATTACTCAATGGAAATG 179
C_pranburiensis      GAATAGAATCAATTTGAATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGAATTACTCAATGGAAATG 179
C_beddomei           GAAGATAATCAATTTGAATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGCATTACTCAATGGAAATG 179
C_lutea              GAATAGAATCAATTTGAATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGAATTACTCAATGGAAATG 179
C_clivicola          GAATAGAATCAATTTGAATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGAATTACTCAATGGAAATG 179
C_micronesica        GAATAGAATCAATTTGAATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGAATTACTCAATGGAAATG 179
C_diannanensis       GAATAGAATCAATTTGAATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGAATTACTCAATGGAAATG 179
C_yunnanensis        GAATAGAATCAATTTGAATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGAATTAATCAATGGAAATG 179
C_tanqingii          GAATAGAATCAATTTGAATAGTAAAATCTGATGGATCTAATGAATTACTCAATGGAAATG 179
C_guizhouensis       GAATAGAATCAATTTGAATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGAATTACTCAATGGAAATG 179
C_balansae           GAATAGAATCAATTTGGATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGAATTACTCAATGGAAATG 179
C_branchycantha      GAATAGAATCAATTTGGATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGAATTACTCAATGGAAATG 179
C_dolichophylla      GAATAGAATCAATTTGGATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGAATTACTCAATGGAAATG 179
C_collina            GAATAGAATCAATTTGGATAGCAAAATCTGATGGATCTAATGAATTACTCAATGGAAATG 179
C_simplicipinna      GAATAGAATCAATTTGAATAGCAAAATCTGATGGATCTAGTGAATTACTCAATGGATATG 179
C_angulata           CAATAGAATCCATTTGAATAGCCAAATCTGATGGATCTAACGAATTACTCCACGGAAATG 179
C_campestris         CAATAGAATCCATTTGAATAGCCTAATCTGATGGATCTAACGAATTACTCCACGGAAATG 179
C_cairnsiana         CAATAGAATCCATTTGAATAGCCAAATCTGATGGATCTAACGAATTACTCGACGGAAATG 179
C_xipholepis         CAATAGAATCCATTTGAATAGCCAAATCTGATGGATCTAACGAATTACTCCACGGAAATG 179
                      ** * **** ***** ****   ***************  * **** ** * *** ***
```

```
C_pectinata          AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACTGGATCCAGTAATTTGATTCGCAATCGAT 239
C_indica             AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACTGGATCCAGTAATTTGATTCCCAATCGAT 239
C_nathorstii         AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTTGATTCCCAATCGAT 239
C_chamaoensis        AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTTGATTCCCAATCGAT 239
C_pranburiensis      AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTTGATTCCCAATCGAT 239
C_beddomei           AGTATAACATAAGATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTTGATTCCCAATCGAT 239
C_lutea              AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTTGATTCCCAATCGAT 239
C_clivicola          AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTTGATTCCCAATCGAT 239
C_micronesica        TGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTTGATTCGCAATCGAT 239
C_diannanensis       AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTTGATTCCCAATCGAT 239
C_yunnanensis        AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTTGATTTCCAATCGAT 239
C_tanqingii          AGTATAACATAATAGGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTTGATTCCCAATCGAT 239
C_guizhouensis       AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTTGATTCCCAATCGAT 239
C_balansae           AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTCGATTCCCAATCGAT 239
C_branchycantha      AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTCGATTCCCAATCGAT 239
C_dolichophylla      AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTCGATTCCCAATCGAT 239
C_collina            AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTCGATTCCCAATCGAT 239
C_simplicipinna      AGTATCACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTTGATTCCCAATCGAT 239
C_angulata           AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTCGATTCCCAATCGAT 239
C_campestris         AGTATGACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTCGATTGCCAATCGAT 239
C_cairnsiana         AGTATAACATAATATGATCCTGTATTCATACCGGATCCAGTAATTCGATTCCCAATCGAT 239
C_xipholepis         AGTATAACATAATATGATCCTTTATTCATACCGGATCCAGTAATTCGATTCCCATTCGAT 239
                      **** ****** * ****** ********* ************* ****  ** *****
```

ภาพที่ 15 (ต่อ)

```
C_pectinata          CATATTTGTCCCACTCTACTCATATAGTCACATTTCTCGCCTTACTTATGTAATAAGATT 299
C_indica             CATATTTGTACCACTCAACTCATATAGTCACATTTCTCGCCTTACTTATGTAATAAGATT 299
C_nathorstii         CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATT 299
C_chamaoensis        CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATT 299
C_pranburiensis      CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATT 299
C_beddomei           CATATTTGTCTCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATA 299
C_lutea              CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATT 299
C_clivicola          CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATT 299
C_micronesica        CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATT 299
C_diannanensis       CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATT 299
C_yunnanensis        CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAGGATT 299
C_tanqingii          CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATGTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATT 299
C_guizhouensis       CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATT 299
C_balansae           CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATT 299
C_branchycantha      CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATT 299
C_dolichophylla      CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATT 299
C_collina            CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATT 299
C_simplicipinna      CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATT 299
C_angulata           CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGAAT 299
C_campestris         CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGTAATAAGAAT 299
C_cairnsiana         CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACAGTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATT 299
C_xipholepis         CATATTTGTCCCACTCAACTCATATAGTCACATTTATCGCCTTACTTATGCAATAAGATG 299
                     *********  ***** ***************  * ************** **** **


C_pectinata          TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGTGTTATAGATATGATAGGGATA 359
C_indica             TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGTGTTATAGATATGATAGGGATA 359
C_nathorstii         TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_chamaoensis        TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_pranburiensis      TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_beddomei           TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_lutea              TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_clivicola          TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_micronesica        GTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGTCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_diannanensis       TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_yunnanensis        TTGCCACTAATACTGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_tanqingii          TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATGTGGTAGCGAAA 359
C_guizhouensis       TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATGTGGTAGGGAAA 359
C_balansae           TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_branchycantha      TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_dolichophylla      TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_collina            TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_simplicipinna      TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_angulata           TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATATGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_campestris         TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATATGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_cairnsiana         TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCTAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
C_xipholepis         TTGCCACTAATACAGATTCTATTGGACATAGGCCGAAGCGTTACAGATATGGTAGGGATA 359
                      ************ ***************  ** *** **** **** ** *** ** *
```

ภาพที่ 15 (ต่อ)

```
C_pectinata          TGATGGAAGAATCACCTTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTACTATTTAGAAG 419
C_indica             TGAGGGAAGAATCACCTTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTACTATTTAGAAG 419
C_nathorstii         TGAGGGAAGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
C_chamaoensis        TGAGGGAAGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
C_pranburiensis      TGAGGGAAGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
C_beddomei           TGAGGGAAGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
C_lutea              TGAGGGAAGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
C_clivicola          TGAGGGAAGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
C_micronesica        TGAGAGAAGAATCACCCTGAGCGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
C_diannanensis       TAAGGGAGGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
C_yunnanensis        TGAGGGAGGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
C_tanqingii          TGAGGGAGGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
C_guizhouensis       TGAGGGAGGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
C_balansae           TGAGGGAAGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
C_branchycantha      TGAGGCAAGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
C_dolichophylla      TGAGGGAAGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
C_collina            TGAGGGAAGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
C_simplicipinna      TGAGGGAAGAATCACCCTGAACGGGTGACGTTATGGATGATCCATGTTGCTATTCGGAAG 419
C_angulata           TGAGGGAAGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATCAGGAAG 419
C_campestris         TGAGGGAAGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATCAGGAAG 419
C_cairnsiana         TGAGGTAAGAATCACCCTGAACGGGTGTAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATCAGGAAG 419
C_xipholepis         TGAGGGAAGAATCACCCTGAACGGGTGAAGTTAATGATAATCCAAATTGCTATTCGGAAG 419
                     * *   * ******** *** ******  ****  *** *****  ** ****   ****
```

```
C_pectinata          ACAAAAAAGTAGGATAAAGACTGATTTGATGAATAGTATTAAGAATCTCATATTCTGATC 479
C_indica             ACAAAAAAGTAGGATAAAGACTGATTTGATGAATAGTATTAAGAATCTCATATTCTGATC 479
C_nathorstii         ACAGAAAAGTAGGATAAAGACCGATTCCGTGAATAGTATTAAGAATCTTCTATTCTGATC 479
C_chamaoensis        ACAGAAAAGTAGGATAAAGACCGATTCCGTGAATAGTATTAAGAATCTTCTATTCTGATC 479
C_pranburiensis      ACAGAAAAGTAGGATAAAGACCGATTCCGTGAATAGTATTAAGAATCTTCTATTCTGATC 479
C_beddomei           ACAGAAAAGTAGGATAAAGACCGATTCGATGAATAGTATTAAGAATCTCATATTCTGATC 479
C_lutea              ACAGAAAAGTAGGATAAAGACCGATTCGATGAATAGTATTAAGAATCTCATATTCTGATC 479
C_clivicola          ACAGAAAAGTAGGATAAAGACCGATTCGATGAATAGTATTAAGAATCTCATATTCTGATC 479
C_micronesica        ACAGAAAAGTAGGATAAAGACCGATTCGATGTATAGTATTAAGAATCTCATATTCTGATC 479
C_diannanensis       ACAGAAAAGTAGGATAAAGACCGATTCGATGAATAGTATTAAGAATCTCATATTCTGATC 479
C_yunnanensis        ACAGAAAAGTAGGATAGAGACGGATTCGATGAATAGTATTAATAATCTCATATTCTGATC 479
C_tanqingii          ACAGAGAAGTAGGATAAAGACCGATTCGATGAATAGTATTAAGAATCTCATATTCTGATC 479
C_guizhouensis       ACAGAAAAGTAGGATAAAGACCGATTCGATGAATAGTATTAAGAATCTCATATTCTGATC 479
C_balansae           ACAGAAAAGTAGGATAAAGACCGATTCGATGAATAGTATTAAGAATCTCATATTCTGATC 479
C_branchycantha      ACAGAAGAGTAGGATAAAGACCGATTCGATGAATAGTATTAAGAATCTCATATTCTGATC 479
C_dolichophylla      ACAGAAAAGTAGGATAAAGACCGATTCGATGAATAGTATTAAGAATCTCATATTCTGATC 479
C_collina            ACAGAAAAGTAGGATAAAGACCGATTCGATGAATCTTATTAAGAATCTCATATTCTGATC 479
C_simplicipinna      ATGGAATAGTAGGATAAAGACCGATTCGATGAATAGTATCGAGAATCTCATATTCTGATC 479
C_angulata           ACAGAAAAGTAGGATAAAGACCGATTCGAT-CATAGTATTAAGAATCTCATAAGCTGATC 478
C_campestris         ACAGAAAAGTAGGATAAAGACCGATTCGAT-CATAGTATTAAGAATCTCATAAGCTGATC 478
C_cairnsiana         ACAGAAAAGTAGGATAGAGACCGATTCGAT-CATAGTATTAAGAATCTCATAAGCTGATC 478
C_xipholepis         ACAGAAAAGTAGGATAAAGACCGATTCGAT-AATAGTATTAAGAATCTCATAAGCTGATC 478
                     *   *  ********* **** ****   ** **  ***  * *****  **  ******
```

ภาพที่ 15 (ต่อ)

```
C_pectinata          AATTTCCTATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAAAACCCTACATCATTAGAGAGAGTA 539
C_indica             AATTTCCTATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAAAACCCTACATCATTAGAGAGAGTA 539
C_nathorstii         AATTTCCTATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAAAACCCTACATCATTGGAGAGAGTA 539
C_chamaoensis        AATTTCCTATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAAAACCCTACATCATTGGAGAGAGTA 539
C_pranburiensis      AATTTCCTATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAGAACCCTACATCATTGGAGAGAGTA 539
C_beddomei           AATTTCCTATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAAAACCCTACATCATTGGAGAGAGTA 539
C_lutea              AATTTCCTATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAAAACCCTACATCATTGGAGAGAGTA 539
C_clivicola          AATTTCCTATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAAAACCCTACATCATTGGAGAGAGTA 539
C_micronesica        AATTTCCTATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGCAATACCCTACATCATTGGAGAGAGTA 539
C_diannanensis       AATTTCATATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAAAACCCTACATCATTGGAGAGAGTA 539
C_yunnanensis        AATTTCATATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAAAACCCTACGTCATTGGAGAGAGTA 539
C_tanqingii          AATTTCATATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAAAACCCTACATCATTGGAGAGAGTA 539
C_guizhouensis       AATTTCATATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAAAACCCTACATCATTGGAGAGAGTA 539
C_balansae           AATTTCCTATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAAAACCCTACATCATTAGAGAGAGTA 539
C_branchycantha      AATTTCCTATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAATACCCTACATCATTAGAGAGAGTA 539
C_dolichophylla      AATTTCCTATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAAAACCCTACATCATTAGAGAGAGTA 539
C_collina            AATTTCCTATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAAAACCCTACATCATTAGAGAGAGTA 539
C_simplicipinna      AATTTCCTATTTTGATAGGACCAATTGGGTAGGGAAAACCGTACATCATTGGAGAGAGTA 539
C_angulata           AA-TTCCTATTTTGATAGAACCTATTGGTAAGCGTAGTGGCTACATCATAAGAGAGAGTA 537
C_campestris         AA-TTCCTATTTTGATAGAACCTATTGGTAAGCGTAGTGGCTACATCATAAGAGAGAGTA 537
C_cairnsiana         AA-TTCCTATTTTGATAGAACCTATTGGTAAGCGTAGTGGCTACATCATAAGAGAGAGTA 537
C_xipholepis         AA-TTCCTATTTTGATAGAACCAATTGGTAAGGGTAGTCCCTACATCATAAGGGAGAGTA 537
                     ****** *********** *** *****  **         *** ****  * *******


C_pectinata          CATCTTTATTAGTACCCCGTATGTCCCAATATGGGATGTATATATGCAGAATCGATCGTA 599
C_indica             CATCTTTATTAGTACCCCGTATGTCCCAATATGGGATGTATATATGCAGAATCGATCGTA 599
C_nathorstii         CATCTTTATCAGTACCCTGTATGTCCCAATATGAGATGTACATATGGAGAATCGATCCTA 599
C_chamaoensis        CATCTTTATCAGTACCCTGTATGTCCCAATATGAGATGTACATATGGAGAATCGATCCTA 599
C_pranburiensis      CATCTTTATCAGTACCCTGTATGTCCCAATATGAGCTGTACATATGGAGAATCGATCCTA 599
C_beddomei           CATCTTTATCAGTACCCCGTATGTCCCAATATGAGATGTATATATGGAGAATCGATCCTA 599
C_lutea              CATCTTTATCAGTACCCCGTATGTCCCAATATGAGATGTATATATGGAGAATCGATCCTA 599
C_clivicola          CATCTTTATCAGTACCCCGTATGTCCCAATATGAGATGTATATATGGAGGATCGATCCTA 599
C_micronesica        CATCTTTATCAGTACCCCGTATGTCCCAATATGAGATATATATATGGAGAATCGATCCTA 599
C_diannanensis       CATCTTTATCAGTACCCCGTATGTCCCAATATGAGATGTATATATGGAGAATCGATCCTA 599
C_yunnanensis        CATCTGTATCAGTACCCCGTATGTCCCAATATGAGATGTATATATGGAGAATCGATCCTA 599
C_tanqingii          CATCTTTATCAGTACCCCGTATGTCCCAATATGAGATGTATATATGGAGAATCGATCCTA 599
C_guizhouensis       CATCTTTATCAGTACCCCGTATGTCCCAATATGAGATGTATATATGGAGAATCGATCCTA 599
C_balansae           GATCTTTATCAGTACCCCGTATGTCCCAATATGAGATGTATATATGGAGAATCGATCCTA 599
C_branchycantha      GATCTTTATCAGTACCCCGTATGTCCCAATATGAGATGTATATATGGAGAATCGATCCTA 599
C_dolichophylla      CATCTTTATCAGTACCCCGTATGTCCCAATATGAGATGTATATATGGAGAATCGATCCTA 599
C_collina            CATCTTTATCAGTACCCCGTATGTCCCAATATGAGATGTATATATGGAGAATCGATCCTA 599
C_simplicipinna      CATCTTTATCAGTACCCCGTATGTCCCAATATGAGATGTACGTATGGAGAATCGATCCTA 599
C_angulata           CATCTTTATCAGTACCCGGTATGTCCCAATATGAGAGGTATATATGGAGAATCGATCCTA 597
C_campestris         CATCTTTATCAGTACCCGGTATGTCCCAATATGAGAGGTATATATGGAGAATCGATCCTA 597
C_cairnsiana         CATCTTTATCAGTACCCGGTATGTCCCAATATGAGAGGTATATATGGAGAATCGATCCTA 597
C_xipholepis         CATCTTTATCAGTACCCGGTATGTCCCAATATGAGAGGTATATATGGAGAATCGATCCTA 597
                      **** *** ******* *************** *   **  **** ** ******* **
```

ภาพที่ 15 (ต่อ)

```
C_pectinata          CAGATCAAGCAAATGAACAAGGATGGATTAGACAGT-TCTCCTGATTCGTGTAGGAGAGA 658
C_indica             CAGATCAAGCAAATGAACAAGGATGGATTAGACAGT-TCTCCTGATTCGTGTAGGAGAGA 658
C_nathorstii         CGGATCGAGGAAATGAACAAGGATGTGTCGGACTCT-TCTCGCGATTCGAGTAGGAGAGA 658
C_chamaoensis        CGGATCGAGGAAATGAACAAGGATGTGTCGGACTCT-TCTCGCGATTCGAGTAGGAGAGA 658
C_pranburiensis      CGGATCGAGGAAATGAACAAGGATGTGTCGGACTCT-TCTCGCGATTCGAGTAGGAGAGA 658
C_beddomei           CGGATCGAGGAAATGAACAAGGATGGATCGGACAGT-TCTCCTGATTCGAGTCTGAGAGA 658
C_lutea              CGGATCGAGGAAATGAACAAGGATGGATCGAACAGT-TCTCCCGATTCGAGTAGGAGAGA 658
C_clivicola          CGGATCGAGGAAATGAACAAGGATGGATCGGACAGT-TCTCCCGATTCGAGTAGGAGAGA 658
C_micronesica        CGGATCGAGGAAATGAACAAGGATGGATGGGACAGT-TCTCCCGATTCGAGTAGGAGAGA 658
C_diannanensis       CGGATCGAGGAAATGAACAAGGATGGATCGGACAGT-TCTCCCGATTCGAGTAGGAGAGA 658
C_yunnanensis        CGGATCGAGGAAATGAACAAGGATGGATCGGACAGT-TCTCCCGATTCGAGTAGGAGAGA 658
C_tanqingii          CGGATCGAGGTAATGAACAGGGATGGATCGGACAGT-TCTCCCGATTCGAGTAGGAGAGA 658
C_guizhouensis       CGGATCGAGGTAATGAACAAGGATGGATCGGACAGT-TCTCCCGATTCGAGTAGGAGAGA 658
C_balansae           CGGATCGAGGAAATGAACAAAGATGGATCGGACAGT-TCTCCCGATTCGAGTAGGAGAGA 658
C_branchycantha      CGGATCGAGGAAATGAACAAAGATGGATCGGACAGT-TCTCCCGATTCGAGTAGGAGAGA 658
C_dolichophylla      CGGATCGAGGAAATGAACAAAGATGGATCGGACAGT-TCTCCCGATTCGAGTAGGAGAGA 658
C_collina            CGGATCGAGGAAATGAACAAAGATGGATCGGACAGT-TCTCCCGATTCGAGTAGGAGAGA 658
C_simplicipinna      CGGATCGAGGAAATGAACAAGGATGGATCGGACAGT-TTCGCCGATTCGAGTAGGAGAGA 658
C_angulata           CCGATCGAGGAAATGAACAAGGATGGATCCGATGGTGTTACCCCAGGACAGTAGGATAAA 657
C_campestris         CCGATCGAGGAAATGAACAAGGATGGATCCGATGGTGTTACCCCAGGACAGTAGGATAAA 657
C_cairnsiana         CCGATCGAGGAAATGAACAAGGATGGATCCGATGGTGTGACCGCAGCACAGTAGGATAAA 657
C_xipholepis         CCGATCGAGGAAATGAACAAGGATGGATCCGACAGTGTTACCCCAGGACAGTAGGATAAA 657
                     * **** **  ********  ****  *   *   * *      *     **  ** * *
```

```
C_pectinata          TGCCCAAAATTGTACTAATTCCCCATGACAAAGAAATGATAGTTCAAATTGCCTCTGGGG 718
C_indica             TGCCCAAAATTGTACTAATTCCCCATGACAAAGAAATGATAGTTCAAATTGCCTCTGGGG 718
C_nathorstii         TACCCAAAATTGCACTAATTCCCCATGACAAAGAAATGATAGTTCAAATTTTCTCCGGGG 718
C_chamaoensis        TACCCAAAATTGCACTAATTCCCCATGACAAAGAAATGATAGTTCAAATTTTCTCCGGGG 718
C_pranburiensis      TACCCAAAATTGCACTAATTCCCCATGTGAAAGAAATGATAGTTCAAATTTTCTCCGGTG 718
C_beddomei           TACCCAAAAATGCACTAATTCCCCATGACAAAGAAATGATAGTTGAAATTATCTCCGGTC 718
C_lutea              TACCCAAAATTGCACTAATTCCCCATGACAAAGTGATGATAGTTCAAATTTTCTCCGGGG 718
C_clivicola          TACCCAAAATTGCACTAATTCCCTATGACAAAGTGATGATAGTTCAAATTTTCTCCGGGG 718
C_micronesica        TACCCAAAATTGCACTAATTCCCCATGACAGAGAAATGATAGTTCAAATTTTCTCCGGGG 718
C_diannanensis       TACCCAAAATTGCACTAATTCCCCATGACAAAGAAATGATAGTTCAAATTTTCTCCGGGG 718
C_yunnanensis        TACCCAAAATTGCACTAATTCCCCATGACAAAGAAATGATAGTTCAAATTTTCTCCGGGG 718
C_tanqingii          TACCCAAAATTGCACTAATTCCCCATGACAAAGAAATGATAGTTCAAATTTTCTCCGGGG 718
C_guizhouensis       TACCCAAAATTGCACTAATTCCCCATGACAAAGAAATGATAGTTCAAATTTTCTCCGGGG 718
C_balansae           TACCCAAAATTGCACTAATTCCCCATGACAAAGAAATGATAGTTCAAATTTTCTCCGTAG 718
C_branchycantha      TACCCAAAATTGCACTAATTCCCCATGACGAAGAAATGATAGTTCAAATTTTCTCCGTAG 718
C_dolichophylla      TACCCAAAATTGCACTAATTCCCCATGACAAAGAAATGATAGTTCAAATTTTCTCCGGGG 718
C_collina            TACCCAAAATTGCACTAATTCCCCATGACAAAGAAATGATAGTTCAAATTTTCTCCGGGG 718
C_simplicipinna      TACCCAAAATTGCACTAATTCCCCATGACAAAGAAATGATAGTTCAAATTTTCTCCGGGG 718
C_angulata           TGCCCAAAATGGCACTAATTCCCCATCACAAAAAAAGGATAGTCCAAATTTCCTCCGGAA 717
C_campestris         TGCCCAAAATGGCACTAATTCCCCATCACAAAAAAAGGATAGTCCAAATTTCCTCCGGAA 717
C_cairnsiana         TGCCCAAAATGGCACTAATTCCCCATCACAAAAAAAGGATAGTCCAAATTTCCTCCGGAA 717
C_xipholepis         TGCCCAAAATGGCACTAATTCCCCATGACAAAAAAAGGATAGTCCAAATTTCCTCCGGAA 717
                     * *******  * ********** **     *   * ******  *****  *** *
```

ภาพที่ 15 (ต่อ)

```
C_pectinata          GG-----ATAAACCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTGTGTAGGAAGCCCAAGGA 773
C_indica             GG-----ATAAACCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTGTGTAGGAAGCCCAAGGA 773
C_nathorstii         GG-----ATAACCCATGACCCAGGAACTATAACCACTATTTTGAATAGGAAGTCCAAGGA 773
C_chamaoensis        GG-----ATAACCCATGACCCAGGAACTATAACCATTATTTTGAATAGGAAGTCCAAGGA 773
C_pranburiensis      GG-----ATAACCCATGACCCAGGAACTATAACCACTATTTTGAATAGGAAGTCCAAGGA 773
C_beddomei           GG-----ATAACCCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTGAATAGGAAGTCCAAGGA 773
C_lutea              GG-----ATAACCCATGACCCAGGAACTATAAATGCTATTTTGAATAGGAAGCCCAAGGA 773
C_clivicola          GG-----ATAACCCATGACCCAGGAGCTATAAATGCTATTTTGAATAGGAAGCCCAAGGA 773
C_micronesica        GG-----ATAACCCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTTAATAGGAAGTCCAAGGA 773
C_diannanensis       GG-----ATAACCCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTGAATAGGAAGTCCAAGGA 773
C_yunnanensis        TAC----ATAACCCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTGAATAGGAAGTGTCAGGA 774
C_tanqingii          GG-----ATAACCCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTGAATGGGAAGTCCAAGGA 773
C_guizhouensis       GG-----ATAACCCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTGAATGGGAAGTCCAAGGA 773
C_balansae           GGGGGGGATAACCCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTGAATAGGAAGTCCAAGGA 778
C_branchycantha      GGGGGGGATAACCCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTGAATAGGAAGTCCAAGGA 778
C_dolichophylla      GGGGGGGATAACCCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTGAATAGGAAGTCCAAGGA 778
C_collina            GGGGGGGATAACCCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTGAATAGGAAGTCCAAGGA 778
C_simplicipinna      GG-----ATAACCCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTGAATAGGAAGTCCAAGGA 773
C_angulata           GG-----ATAACCCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTGAACGGGAAGTCCAAGGA 772
C_campestris         GG-----ATAACCCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTGAACGGGAAGTCCAAGGA 772
C_cairnsiana         CG-----ATAACCCATGACCCAGGAACTATAAGAACTATTTGGAACGGGAAGTCCATGGA 772
C_xipholepis         GG-----ATAACCCATGACCCAGGAACTATAAAAACTATTTTGAATAGGAAGTCCAAGGA 772
                            **** ************* ******    *****      *****     ***
```

```
C_pectinata          TCATTCAATTCTTATATGAGAATTCTTAAAAATTATAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 833
C_indica             TCATTCAATTCTTATATGAGAATTCTTAAAAATTATAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 833
C_nathorstii         TCATTCAATTATTACATGAGAATTCTTAATAATTGCAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 833
C_chamaoensis        TCATTCAATTATTACATGAGAATTCTTAATAATTGCAGTGTTCAGGGATCTATGATATGG 833
C_pranburiensis      TCATTCAATTATTACATGAGAATTCTTAATAATTGCAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 833
C_beddomei           TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAAATTGCAGTGTTCAAGGATCTTCGATATGG 833
C_lutea              TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAACGTGCAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 833
C_clivicola          TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAACGTGCAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 833
C_micronesica        TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAGATTGCAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 833
C_diannanensis       TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAAATTGCAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 833
C_yunnanensis        TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAAATTGCAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 834
C_tanqingii          TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAAATTGCAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 833
C_guizhouensis       TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAAATTGCAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 833
C_balansae           TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAAATTGCAGTGTTCAAGGATCTCTGATATGG 838
C_branchycantha      TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAAATTGCAGTGTTCAAGGATCTCTGATATGG 838
C_dolichophylla      TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAAATTGCAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 838
C_collina            TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAAATTGCACGGTTCAAGGATCTGTGATATGG 838
C_simplicipinna      TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAAATTGCAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 833
C_angulata           TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAAATTGCAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 832
C_campestris         TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAAATTGCAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 832
C_cairnsiana         TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAAATTGCAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 832
C_xipholepis         TCATTCAATTCTTACATGAGAATTCTTAAAAATTGCAGTGTTCAAGGATCTATGATATGG 832
                     ********** *** **************    *  *  ***** ******  *******
```

ภาพที่ 15 (ต่อ)

```
C_pectinata          CTAGTCATGACCGAAAGATACTAGTGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGACATGTCTTT 893
C_indica             CTAGTCATGACCGAAAGATACTAGTGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGACATGTCTTT 893
C_nathorstii         CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGACATGTCTTT 893
C_chamaoensis        CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGACATGTCTTT 893
C_pranburiensis      CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGTCGTGTCTTT 893
C_beddomei           CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGTAATGTCTTT 893
C_lutea              CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGACTTGTCTTT 893
C_clivicola          CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGACATGTCTTT 893
C_micronesica        CTGCTCATGAGAAAAAGATACTAACGAGTGTGTAATAATAACAATATTAGACATGTCTTT 893
C_diannanensis       CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGACATGTCTTT 893
C_yunnanensis        CTGGTCATGAGAATAAGAGACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGACATGTCTTT 894
C_tanqingii          CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGACATGTCTTT 893
C_guizhouensis       CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGACATGTCTTT 893
C_balansae           CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGACATGTCTTT 898
C_branchycantha      CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGACATGTCTTT 898
C_dolichophylla      CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGACATGTCTTT 898
C_collina            CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGACATGTCTTT 898
C_simplicipinna      CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAATATTAGACATGTCTTT 893
C_angulata           CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAGTATTAGACATGTCTTT 892
C_campestris         CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAGTATTAGACATGTCTTT 892
C_cairnsiana         CTGGTCATCAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAACGACAGTATTAGAGATGTCTTT 892
C_xipholepis         CTGGTCATGAGAAAAAGATACTAGCGAGTGTGGAATAATAACAGTATTAGACATGTCTTT 892
                     **  **** *    **** ****  ******* *****  *** ******   ******* 

C_pectinata          TAGAATGAATAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTAGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 953
C_indica             TAGAATGAATAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTAGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 953
C_nathorstii         TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 953
C_chamaoensis        TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 953
C_pranburiensis      TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 953
C_beddomei           TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATGTTCAGGAATGATCTAGA 953
C_lutea              TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 953
C_clivicola          TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 953
C_micronesica        TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGAGCTAGA 953
C_diannanensis       TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 953
C_yunnanensis        TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAAGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 954
C_tanqingii          TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 953
C_guizhouensis       TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 953
C_balansae           TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGCGTATCATCAGGAATGATCTAGA 958
C_branchycantha      TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGCGTATCATCAGGAATGATCTAGA 958
C_dolichophylla      TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 958
C_collina            TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 958
C_simplicipinna      TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 953
C_angulata           TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 955
C_campestris         TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGA------ 946
C_cairnsiana         TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 952
C_xipholepis         TAGAATGAACAGGAAAGAGATGGAGGGGTGTATACTGGGTATCATCAGGAATGATCTAGA 952
                     ********* ************** ***********  ****  **********
```

ภาพที่ 15 (ต่อ)

```
C_pectinata          CCCTGGCTGGAGGTGCTTGCCATCAGA--------- 980
C_indica             CCCTGGATGGCGGTTCTGGCCATCAGA--------- 980
C_nathorstii         CCCTGGCTGGAGGTGCGTTCCATGAGAC-------- 981
C_chamaoensis        CCCTGGCTGGAGGTGCGTCGTACACTGC-------- 981
C_pranburiensis      CCCTGGCTGGAGGTGCGTCGTACACTGC-------- 981
C_beddomei           CCCTGGCTGGAGGTGCAGTACGTTACTCTG------ 983
C_lutea              CCCTGGCTGGAGGTGCGTTCCATGAGACTGCA---- 984
C_clivicola          CCCTGGCTGGAGGTGCGTTCCATGAGACTGCA---- 984
C_micronesica        CCCTGGCTGGAGGTGAGTCAGGACGGTATGCTGG-- 987
C_diannanensis       CCCTGGCTGGAGGTGCACCCT--------------- 974
C_yunnanensis        CTCTGGCTGGAGGTGCGT------------------ 972
C_tanqingii          CCCTGGCTGGAGGTGCACTCTACTCTG--------- 980
C_guizhouensis       CCCTGGCTGGAGGTGCACTCTACTCTG--------- 980
C_balansae           CTTGGGATGACTACGT-------------------- 969
C_branchycantha      ACCGAGCGAGCTGCAC-------------------- 969
C_dolichophylla      CCCTGGCTGGAGGTGC-------------------- 969
C_collina            ------------------------------------ 952
C_simplicipinna      CCCTGGCTGGAGGTGC-------------------- 969
C_angulata           TACTGGCTGGGAGCTCGTTCCATGAGACACC----- 980
C_campestris         TACTGGGCGGAGAGCTCTTCCATGAGACACC----- 980
C_cairnsiana         TACTGGGCGGATAAGAGCTCCATGAGACACC----- 980
C_xipholepis         TCATGTAGAGGGACTGACCTCAA------------- 972
```

ภาพที่ 15 (ต่อ)

ตารางที่ 8 แสดงอัตราการเกิด transition (Ts) และ transversion (Tv)

Region	Alignment	Base				Ts	Tv	Ts/Tv
		A	C	G	T			
psbM-trnD	933	34.1	16.8	20.5	28.6	1.850	1.315	1.406

การคำนวณระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) เป็นการคำนวณความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Cycas* ทั้งหมดโดยใช้ข้อมูลการแทนที่เบส(transition/transversion) ที่ได้จากการ alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ psbM^{F}-trnD^{GUCR} intergenic spacer ของ *Cycas* ทั้งหมด 22 ชนิด โดยใช้ *Z. intermis* เป็น outgroup ในการศึกษาครั้งนี้ ระยะห่างทางพันธุกรรมได้จากการเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างแต่ละคู่ (pairwise distance calculation) โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 (Kumar *et al*., 2007) ซึ่งระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณได้จะใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปรง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ระยะห่างทางพันธุกรรมภายในกลุ่มและหว่างกลุ่มปรงทั้งหมด (*Cycas* 22 ชนิด กับ *Z. intermis*) กลุ่มที่ 2 ข้อมูลอยู่ในรูประยะห่างทางพันธุกรรมเปรียบเทียบระหว่าง *Cycas* แต่ละคู่ (pairwise distance)

การเปรียบเทียบ *Cycas* แต่ละคู่พบค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.002-0.939 (ตารางที่ 6) ซึ่งผลการวิเคราะห์ genetic distance ในปรงสกุล *Cycas* ทั้งหมดพบว่า *C. chamaoensis* เปรียบเทียบกับ *C. pectinata* มีค่า genetic distance เฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 0.002 จนถึงสูงสุดใน *C. angulata* เปรียบเทียบกับ *C. branchycantha* เท่ากับ 0.941 ส่วน outgroup คือ *Z. intermis* มีค่า genetic distance ระหว่าง 2.246-3.232 คือเมื่อ *Z. intermis* เปรียบเทียบกับ *C. cairnsiana* มีค่าเท่ากับ 2.246 และเมื่อ *Z. intermis* เปรียบเทียบกับ *C. chamaoensis* มีค่าเท่ากับ 3.232 การเปรียบเทียบค่า genetic distance ระหว่างปรงสกุล *Cycas* กับ *Z. intermis* (outgroup) พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในสกุลต่ำกว่าระหว่างสกุล แสดงให้เห็นว่าการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปรงสกุล *Cycas* โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ psbM^{F}-trnD^{GUCR} intergenic spacer มีประสิทธิภาพสูงช่วยในการแบ่งความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของ *Cycas* ได้ในกรณีที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่คล้ายคลึงกัน โดยจำแนกได้ว่าเป็นคนละชนิดกัน

	C. pectinata	*C. clivicola* subsp.*lutea*	*C. chamaoensis*	*C. pranburiensis*	*C. simplicipinna*	*C. clivicola*	*C. micronesica*	*C. balansae*	*C. diannanensis*	*C. yunnanensis*	*C. tanqingii*	*c. guizhouensis*	*C. beddomei*	*C. nathorstii*	*C. branchycantha*	*C. dolichophylla*	*C. collina*	*C. indica*	*C. campestris*	*C. cairnsiana*	*C. xipholepis*	*C. angulata*	*Z. intermis*
C. pectinata																							
C. clivicola subsp.*lutea*	0.034																						
C. chamaoensis	0.002	0.037																					
C. pranburiensis	0.007	0.041	0.009																				
C. simplicipinna	0.036	0.033	0.038	0.044																			
C. clivicola	0.036	0.005	0.038	0.043	0.034																		
C. micronesica	0.044	0.046	0.046	0.052	0.046	0.047																	
C. balansae	0.238	0.230	0.238	0.245	0.249	0.231	0.240																
C. diannanensis	0.023	0.017	0.025	0.030	0.025	0.018	0.031	0.223															
C. yunnanensis	0.039	0.035	0.041	0.047	0.045	0.036	0.047	0.230	0.023														
C. tanqingii	0.040	0.033	0.042	0.047	0.036	0.034	0.049	0.236	0.012	0.034													
C. guizhouensis	0.032	0.026	0.035	0.040	0.028	0.027	0.041	0.226	0.005	0.026	0.007												
C. beddomei	0.049	0.045	0.051	0.052	0.045	0.046	0.057	0.237	0.028	0.047	0.044	0.037											
C. nathorstii	0.085	0.074	0.087	0.093	0.083	0.075	0.090	0.278	0.066	0.084	0.084	0.076	0.089										
C. branchycantha	0.331	0.323	0.333	0.335	0.342	0.023	0.339	0.306	0.318	0.334	0.332	0.321	0.327	0.361									
C. dolichophylla	0.100	0.096	0.102	0.160	0.104	0.095	0.107	0.297	0.088	0.110	0.097	0.089	0.105	0.137	0.228								
C. collina	0.110	0.106	0.112	0.116	0.112	0.105	0.116	0.287	0.097	0.118	0.107	0.099	0.113	0.142	0.220	0.007							
C. indica	0.083	0.072	0.085	0.091	0.080	0.073	0.090	0.275	0.064	0.081	0.082	0.074	0.085	0.005	0.357	0.134	0.139						
C. campestris	0.829	0.857	0.829	0.826	0.850	0.857	0.880	0.853	0.830	0.866	0.858	0.836	0.819	0.872	0.939	0.881	0.891	0.868					
C. cairnsiana	0.854	0.883	0.854	0.845	0.876	0.883	0.900	0.868	0.855	0.893	0.844	0.861	0.836	0.892	0.934	0.888	0.892	0.888	0.015				
C. xipholepis	0.871	0.893	0.871	0.864	0.904	0.896	0.921	0.892	0.876	0.904	0.899	0.876	0.894	0.890	0.882	0.851	0.855	0.886	0.087	0.090			
C. angulata	0.832	0.860	0.832	0.829	0.853	0.860	0.883	0.858	0.833	0.870	0.861	0.839	0.822	0.869	0.941	0.884	0.892	0.865	0.006	0.010	0.080		
Z. intermis	3.195	2.917	3.232	3.196	3.021	2.941	2.820	2.839	2.846	2.903	2.919	2.919	2.884	2.960	2.808	2.927	3.006	2.805	2.344	2.246	2.317	2.334	

ตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยของระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ของปรงสกุล *Cycas* โดยใช้โปรแกรม MEGA 4.0 (Kumar *et al*., 2007)

6. ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

การสร้าง phylogenetic tree ของปรงทั้งหมดโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ $psbM^{F}$-$trnD^{GUCR}$ intergenic spacer นำมาสร้าง phylogenetic tree 2 แบบ คือ maximum parsimony (MP) และ neighbour-joining (NJ) ซึ่งทั้งสองแบบนี้ใช้โปรแกรม MEGA 4 (Kumar *et al*., 2007) ในการสร้าง

6.1 Phylogenetic tree ที่สร้างจากวิธี maximum parsimony

การสร้าง phylogenetic tree แบบ maximum parsimony ด้วยวิธี heuristic search (close-neighbour interchange) (ภาพที่ 16) โดยมีการสร้าง MP tree ชั่วคราวขึ้น หลังจากนั้นมีการสลับตำแหน่งของ branch เพื่อหา tree ที่ดีที่สุด การสร้าง phylogenetic tree แบบ maximum parsimony ใช้วิธี close-neighbor interchange (CNI) โดยกำหนดค่า random addition 100 replication และทดสอบค่าความเชื่อมั่น (bootstrap) 1,000 ซ้ำ ผลที่ได้คือ ได้ phylogenetic tree ที่มีความยาว (tree length) เท่ากับ 1,605 มีค่า consistency index (CI) เท่ากับ 0.826791 และค่า retention index (RI) เท่ากับ 0.862716 ส่วนค่า consistency index for all sites ที่ 944 positions (RCI) เท่ากับ 0.713286 ส่วนค่า ที่ได้จาก parsimony informative site คือ 0.786154, 0.862716 และ 0.6782289 ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 แสดงค่า tree length, ค่า consistency index สำหรับทุก sites และค่าเฉพาะ parsimony informative sites

Tree length	Sites	All sites			Parsimony informative sites		
		CI	RI	RCI	iCI	iRI	iRCI
1,605	944	0.826791	0.826716	0.713286	0.786154	0.862716	0.678228

จาก phylogenetic tree ที่สร้างจากวิธี maximum parsimony (ภาพที่ 16) สามารถแบ่งกลุ่ม *Cycas* ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม A และ กลุ่ม B เมื่อพิจารณาชนิดของ *Cycas* ในกลุ่ม A พบว่ามีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชีย ส่วนกลุ่ม B มีถิ่นกำเนิดอยู่แถบทวีปออสเตรเลีย ซึ่งคล้ายกับการจัดกลุ่ม

Cycas ของ Sagin *et al*. (2006) ซึ่งแบ่ง *Cycas* ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กล่าวคือกลุ่มที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศไทย และกลุ่มที่มีถิ่นกำเนิดนอกประเทศไทย

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งกลุ่ม A ได้เป็น 6 กลุ่มย่อย (กลุ่มย่อย a ถึง กลุ่มย่อย f) ซึ่งมีความสอดคล้องกับการกระจายพันธุ์ โดยที่กลุ่มย่อย a ประกอบด้วย *C. pectinata, C. chamaoensis, C. pranburiensis* และ *C. simplicipinna* ส่วนใหญ่จัดอยู่ใน section *Indosinenses* ยกเว้น *C. simplicipinna* เพียงชนิดเดียวจัดอยู่ใน section *Stangerioides* (Hill, 2004) ปรงทั้งหมดในกลุ่มย่อยนี้มีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศไทย

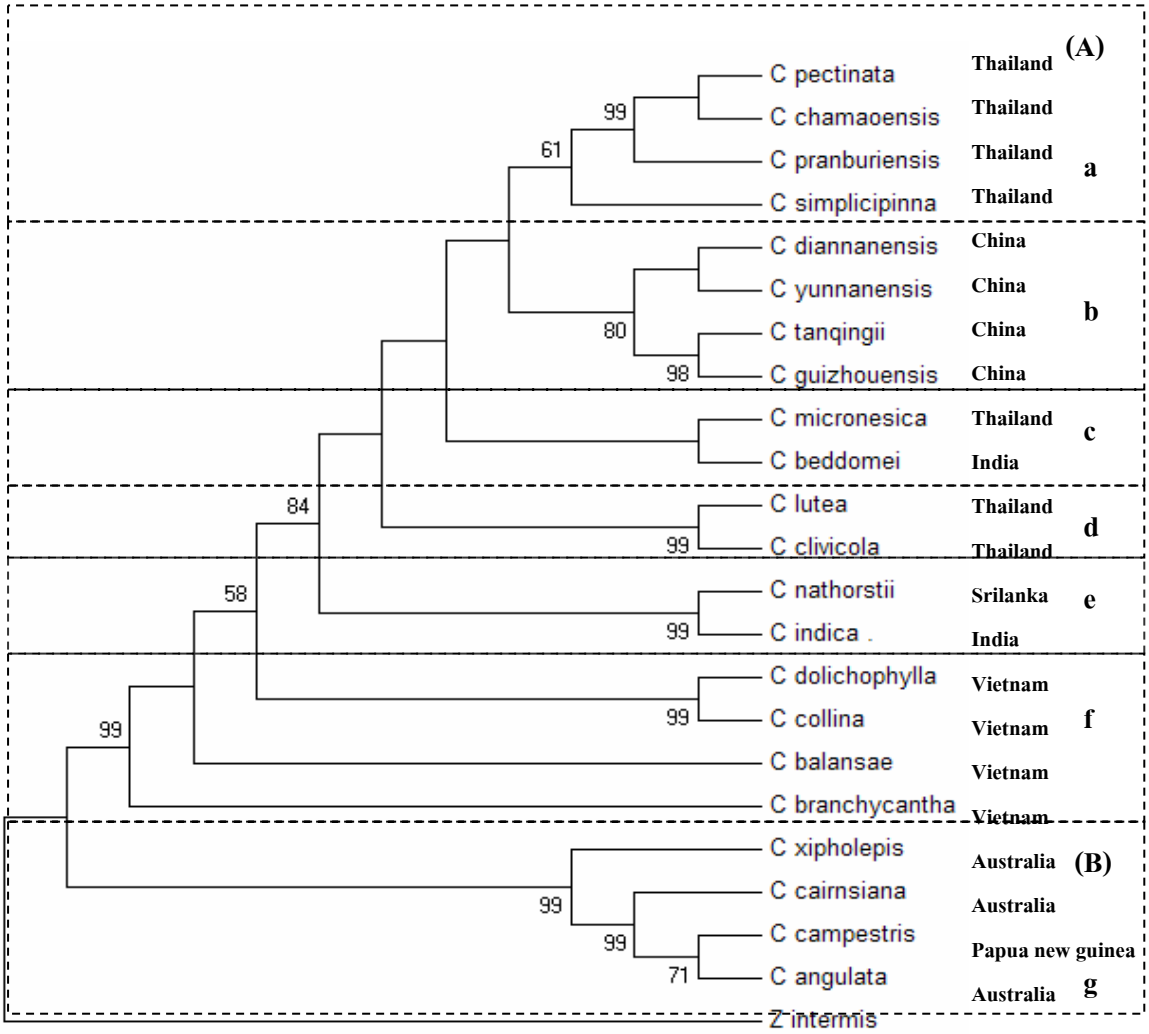
กลุ่มย่อย b ประกอบด้วย *C. diannanensis*, *C. yunnanensis*, *C. tanqingii* และ *C. guizhouensis* ปรงทั้งหมดในกลุ่มนี้จัดอยู่ใน section *Stangerioides* ซึ่งสอดคล้องกับการจัดกลุ่มปรงของ Wang (1996) ปรงในกลุ่มย่อยนี้มีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศจีนเหมือนกันและมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับกลุ่มย่อย a มากที่สุด

กลุ่มย่อย c ประกอบด้วย *C. micronesica* และ *C. beddomiei* จัดอยู่ใน section *Rumphiae* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศไทย และ section *Cycas* (Hill, 2004) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศอินเดีย สังเกตได้ว่า ปรงทั้งสองชนิดนี้มีถิ่นกำเนิดจากคนละประเทศแต่จัดอยู่ในทวีปเอเชียเหมือนกัน

กลุ่มย่อย d ประกอบ *C . clivicola* subsp. *lutea* และ *C. clivicola* จัดอยู่ใน section *Indosinenses* (Hill, 2004) มีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศไทย

กลุ่มย่อย e ประกอบด้วย *C. nathorstii* และ *C. indica* จัดอยู่ใน section *Cycas* (Hill, 2004) มีถิ่นกำเนิดจากประเทศศรีลังกาและประเทศอินเดียตามลำดับ

กลุ่มย่อย f ประกอบด้วย *C. dolichophylla* , *C. collina*, *C .balansae* และ *C. branchycantha* ปรงทั้งหมดในกลุ่มย่อยนี้จัดอยู่ใน section *Stangerioides* (Hill, 2004) และมีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศเวียดนาม



ภาพที่ 16 แสดง Maximum parsimony tree ที่สร้างจากข้อมูล psbM^{F}-trnD^{GUCR} sequence ของ *Cycas* 22 ชนิด โดยใช้ *Z. intermis* เป็น outgroup ทดสอบ bootstrap 1,000 ซ้ำ เป็น tree ที่ดีที่สุดจากการสร้างทั้งหมด 25 tree และมีค่า tree length เท่ากับ 1,605 มีค่า CI = 0.826791, RI = 0.826716, RCI = 0.713286

หมายเหตุ C lutea คือ *C. clivicola* subsp. *lutea*

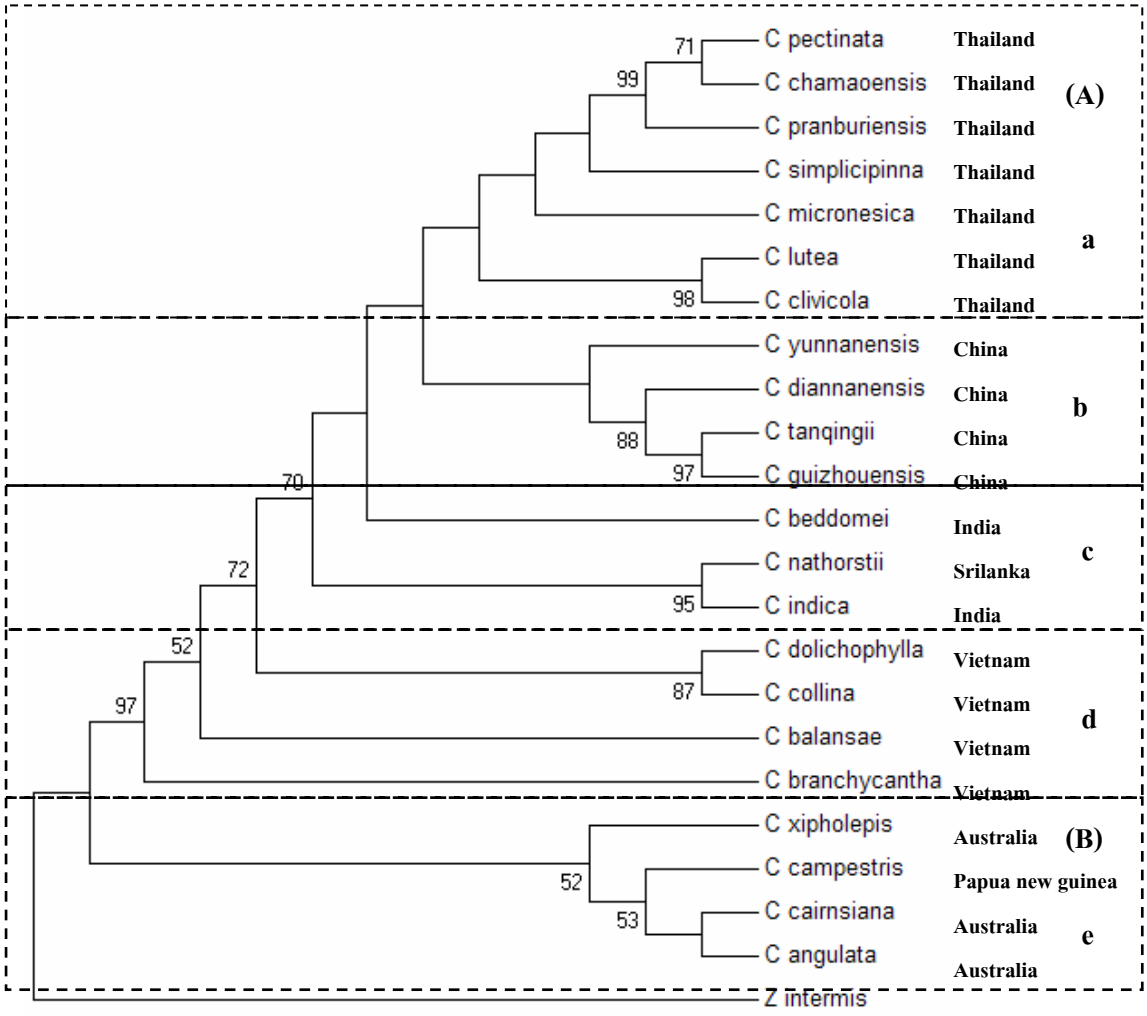
กลุ่ม B (หรือกลุ่มย่อย g) ประกอบด้วย *C. xipholepis, C. cairnsiana, C .campestris* และ *C. angulata* ปรงทั้งหมดในกลุ่มนี้จัดอยู่ใน section *Cycas* subsection *Endemicae* (Hill, 2004) และมีถิ่นกำเนิดมาจากทวีปออสเตรเลีย เมื่อพิจารณาจากความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพบว่า กลุ่มย่อย a มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มย่อย b มากที่สุด และมีความสัมพันธ์กับกลุ่ม B น้อยที่สุด และกลุ่ม B มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มย่อย f มากที่สุด และลักษณะของ Maximum parsimony tree สามารถบอกได้ว่า *Cycas* ที่พบใน ออสเตรเลีย และ ปาปัวนิวกินี เกิดก่อน *Cycas* ชนิดอื่น และเกิดการแพร่กระจายไปยังเวียดนาม อินเดียและ ไทย ตามลำดับ

6.2 Phylogenetic tree ที่สร้างจากวิธี neighbour-joining

การสร้าง phylogenetic tree แบบ neighbour-joining ด้วยวิธี nucleotide substitution (maximum composite likelihood method) โดยมีการรวมกลุ่มตัวอย่างเข้าเป็นกลุ่มๆ ค่า distance ระหว่างตัวอย่างแต่ละคู่คำนวณมาจากแบบจำลองการแทนที่เบสที่เหมาะสม โดย phylogenetic tree ที่มีผลของความยาวกิ่ง (branch length) น้อยที่สุด คือ tree ที่ดีที่สุด ในการทดลองครั้งนี้ได้กำหนดค่าความเชื่อมั่น (bootstrap) 1,000 ซ้ำ เมื่อสร้าง tree ด้วยวิธีนี้แล้ว พบว่ามีความยาวกิ่ง (sum of branch length) เท่ากับ 3.62703998

จาก phylogenetic tree ที่สร้างโดยวิธี neighbour-joining (ภาพที่17) สามารถแบ่ง *Cycas* ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่ม A และ B โดยที่ *Cycas* ในกลุ่ม A พบว่ามีถิ่นกำเนิดอยู่แถบทวีปเอเชีย กลุ่ม B มีถิ่นกำเนิดแถบทวีปออสเตรเลีย สอดคล้องกับ Sagin *et al*. (2006) ในกลุ่ม A สามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้ 4 กลุ่ม (กลุ่มย่อย a ถึง กลุ่มย่อย d) โดยมีความสอดคล้องกับการกระจายพันธุ์ กลุ่มย่อย a ประกอบด้วย *C. pectinata*, *C. chamaoensis*, *C . pranburiensis* , *C. simplicipinna*, *C. micronesica* , *C. clivicola* subsp. *lutea*, *C. clivicola* ปรงในกลุ่มย่อยนี้ส่วนใหญ่จัดอยู่ใน section *Indosinenses* ยกเว้น *C. simplicipinna* และ *C. micronesica* จัดอยู่ใน section *Stangerioides* (Hill, 2004) ปรงในกลุ่มย่อยนี้ทั้งหมดมีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศไทย

กลุ่มย่อย b ประกอบด้วย *C. yunnanensis*, *C. diannanensis*, *C . tanqingii* และ *C. guizhouensis* จัดอยู่ใน section เดียวกันคือ *Stangerioides* ซึ่งสอดคล้องกับการจัดกลุ่มของ Wang (1996) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศจีน โดยกลุ่มย่อย b จะมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มย่อย a มากที่สุด



ภาพที่ 17 แสดง Neighbor-joing tree ที่สร้างจากข้อมูล psbM^{F}-trnD^{GUCR} sequence ของ *Cycas* 22 ชนิด โดยใช้ *Z. intermis* เป็น outgroup ทดสอบ bootstrap 1,000 ซ้ำ และมีค่า branch length เท่ากับ 3.62703998

หมายเหตุ C lutea คือ *C. clivicola* subsp. *lutea*

กลุ่มย่อย c ประกอบด้วย *C. beddomei*, *C. nathorstii* และ *C. indica* ปรงในกลุ่มย่อยนี้ทุกชนิดจัดอยู่ใน section *Cycas* (Hill, 2004) โดยที่ *C. beddomei* และ *C. indica* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศอินเดีย ส่วน *C. nathorstii* มีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศศรีลังกา

กลุ่มย่อย d ประกอบด้วย *C. dolichophylla, C. collina, C. balansae* และ *C. branchycantha* ปรงทั้งหมดในกลุ่มนี้จัดอยู่ใน section *Stangerioides* (Hill, 2004) และปรงในกลุ่มย่อยนี้ทุกชนิดมีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศเวียดนาม

กลุ่ม B (กลุ่มย่อย e) ประกอบด้วย *C. xipholepis*, *C. cairnsiana*, *C. campestris* และ *C. angulata* ซึ่งปรงทั้งหมดในกลุ่มนี้จัดอยู่ใน section *Cycas* subsection *Endemicae* (Hill, 2004) และมีถิ่นกำเนิดมาจากทวีปออสเตรเลีย เมื่อพิจารณาถึงความคล้ายคลึงกันพบว่าปรงในกลุ่มย่อย a มีความคลายคลึงกับกลุ่มย่อย b มากที่สุด และมีความแตกต่างจากกลุ่ม b มากที่สุดเช่นกัน ปรงในกลุ่ม B จะมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มย่อย d มากที่สุด ลักษณะของ Neighbour-joining tree สามารถอธิบายได้ว่า *Cycas* จากประเทศไทยคล้ายคลึงกับจีนมากที่สุด รองมาคือ อินเดีย และเวียดนามตามลำดับ

7. ความสัมพันธ์ของปรงสกุล *Cycas* เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

7.1 Phylogenetic tree ที่สร้างโดยวิธี maximum parsimony เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การจัดกลุ่มปรงทั้ง 22 ชนิด โดยใช้ phylogenetic tree เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำต้น ใบ เมล็ด โคนเพศผู้และโคนเพศเมีย ทั้งหมด 24 ลักษณะ ร่วมกับการกระจายพันธุ์ของปรงแต่ละชนิดเพื่อเปรียบเทียบและยืนยันผลการจัดกลุ่มปรง

จาก phylogenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี maximum parsimony สามารถแบ่งกลุ่มปรงได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (A-B) และ 7 กลุ่มย่อย (a-g) (ภาพที่18) โดยเริ่มจากกลุ่ม A สามารถแบ่งกลุ่มได้อีก 6 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อย a เป็นกลุ่มแรกประกอบด้วย *C. pectinata*, *C. chamaoensis* , *C. pranburiensis*, *C.simplicipinna* เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำต้น ใบ เมล็ด โคนเพศผู้และเพศเมียสอดคล้องกันทั้งหมด 7 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะปลายใบลดรูปเป็นหนาม ไม่มีการโค้งตัวของใบย่อย เส้นกลางใบด้านบนนูน เกล็ดใบหุ้มยอดอ่อนนุ่ม มีรูปร่างสามเหลี่ยมแคบ และเห็นข้อต่อ

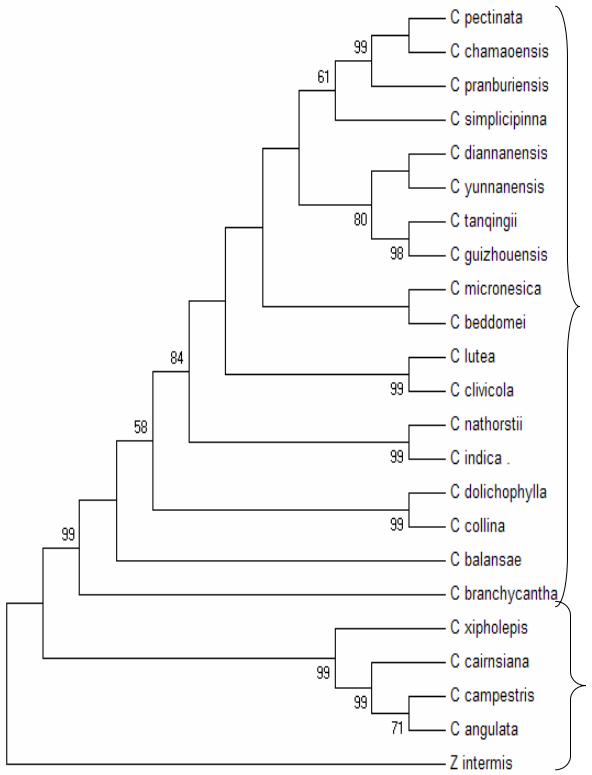
ชัดเจน ลักษณะของ megasporophyll lamina margin เป็นแบบซี่หวีเว้าลึก เมื่อพิจารณาถึงถิ่นกำเนิด พบว่า ปรงในกลุ่มย่อยแรกมีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศไทยเหมือนกัน

กลุ่มย่อย b ประกอบด้วย *C. diannanensis*, *C. yunnanensis*, *C. tanqingii*, *C. guizhouensis* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สอดคล้องกันทั้งหมด 5 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะปลายใบมีใบย่อยคู่ก้านใบมีหนาม เส้นกลางใบด้านบนนูน microsporophyll lamina อ่อนนุ่ม และ megasporophyll lamina margin มีขอบแบบซี่หวีเว้าลึก จะสังเกตได้ว่า ปรงในกลุ่มย่อยนี้ทุกชนิดมีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศจีน

กลุ่มย่อย c ประกอบด้วย *C. micronesica* และ *C. beddomei* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกันทั้งหมด 10 ลักษณะ ได้แก่ลักษณะมีลำต้นเหนือดิน ไม่มีการโค้งตัวของใบเมื่อเทียบกับแกนกลางของลำต้น ไม่มีการโค้งตัวของใบย่อย ปลายใบย่อยแหลมคม เส้นกลางใบด้านบนนูน เกล็ดใบหุ้มยอดรูปสามเหลี่ยมแคบและติดอยู่กับลำต้นไม่ร่วงหลุดไป microsporophyll lamina มีลักษณะแข็ง megasporophyll lamina ด้าน apical spine แตกต่างจากด้าน lateral spine และมีขอบริมแบบซี่ฟันหวีเว้าลึกเมื่อพิจารณาถึงแหล่งกำเนิดพบว่ามีแหล่งกำเนิดจากคนละประเทศ เนื่องจาก *C. micronesica* มีแหล่งกำเนิดอยู่ในประเทศไทย ส่วน *C. beddomei* มีแหล่งกำเนิดอยู่ในประเทศอินเดีย แต่ทั้งสองชนิดมีแหล่งกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชีย

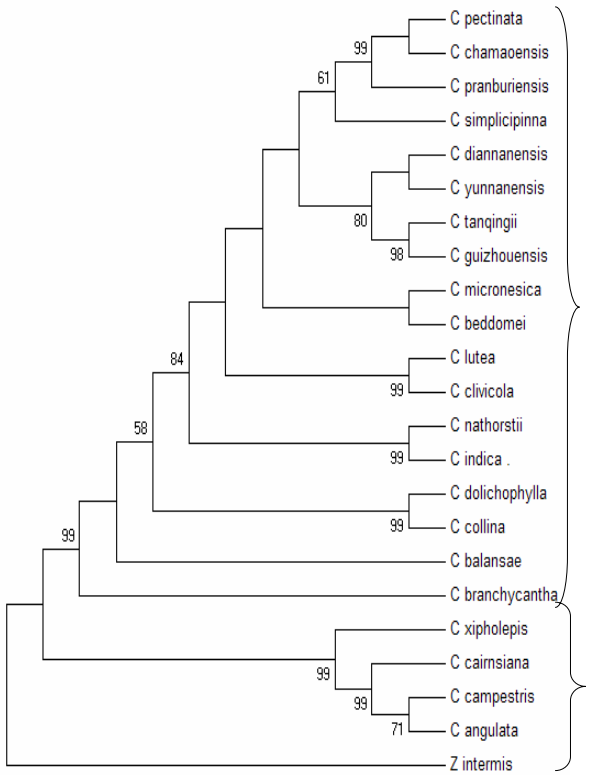
กลุ่มย่อย d ประกอบด้วย *C. clivicola* subsp. *lutea* และ *C. clivicola* ปรงกลุ่มนี้ประกอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สอดคล้องกันทั้งหมด 22 ลักษณะ อันได้แก่ ลักษณะการมีลำต้นเหนือดิน ใบมีสีเขียวอ่อนเงาวาว และไม่มีการโค้งตัวของใบเมื่อเทียบกับแกนกลางของลำต้น ปลายใบลดรูปเป็นหนาม มีขนสีขาวปกคลุม ก้านใบมีหนาม ไม่มีการโค้งตัวของใบย่อย ปลายใบย่อยแหลมคม เส้นกลางใบด้านบนและด้านล่างนูน เกล็ดใบหุ้มยอดมีลักษณะรูปร่างสามเหลี่ยมแคบและมีข้อต่อเห็นชัดเจน โคนเพศผู้มีรูปไข่แคบสีเหลือง microsporophyll lamina แข็ง apical spine มีลักษณะคล้ายหนาม megasporophyll lamina มีรูปร่างกลม apical spine ของ megasporophyll lamina แตกต่างจากด้าน lateral spine และมีขอบริมแบบซี่หวีเว้าลึก และมีแหล่งกำเนิดมาจากประเทศไทยเหมือนกัน

กลุ่มย่อย e ประกอบด้วย *C. nathorstii* และ *C. indica* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สอดคล้องกัน 16 ลักษณะ ได้แก่ลักษณะลำต้นอยู่บนดิน มีใบสีเขียวอ่อนเงาวาว ไม่มีการโค้งตัวของ



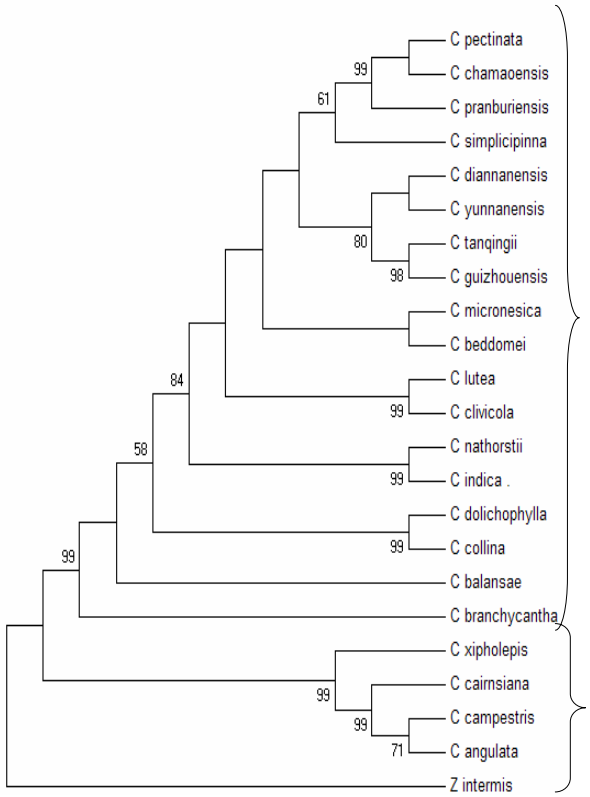
	Stem type	Leaf colour	Glossy of leaf	Keel of leaf	Terminus of leaf	Hair colour
C pectinata	acaulescent	bright green	glossy	slighily keel	paired leaflets	white
C chamaoensis	acaulescent	deep green	glossy	slighily keel	paired leaflets	white
C pranburiensis	arborescent	deep green	glossy	flat	paired leaflets	orange
C simplicipinna	arborescent	deep green	glossy	slighily keel	paired leaflets	orange
C diannanensis	arborescent	bright green	glossy	slighily keel	spine	brown
C yunnanensis	arborescent	deep green	glossy	flat	spine	white
C tanqingii	arborescent	deep green	glossy	flat	spine	white
C guizhouensis	arborescent	bright green	glossy	slighily keel	spine	white
C micronesica	arborescent	bright green	glossy	slighily keel	spine	white
C beddomei	arborescent	deep green	glossy	flat	spine	white
C lutea	acaulescent	deep green	glossy	flat	paired leaflets	orange
C clivicola	acaulescent	deep green	glossy	slighily keel	paired leaflets	brown
C nathorstii	acaulescent	deep green	glossy	slighily keel	paired leaflets	white
C indica .	arborescent	bright green	glossy	flat	paired leaflets	orange
C dolichophylla	acaulescent	deep green	glossy	slighily keel	paired leaflets	orange
C collina	arborescent	grey green	dull	flat	paired leaflets	rown
C balansae	arborescent	bright green	glossy	flat	paired leaflets	white
C branchycantha	arborescent	bright green	glossy	flat	paired leaflets	white
C xipholepis	arborescent	deep green	glossy	flat	spine	white
C cairnsiana	arborescent	bright green	dull	slighily keel	paired leaflets	orange
C campestris	arborescent	grey green	glossy	moderately keel	paired leaflets	brown
C angulata	arborescent	gright green	glossy	slightly keel	paired leaflets	orange
Z intermis						

ภาพที่ 18 แสดงการจัดกลุ่มปรงสกุล *Cycas* 22 ชนิด โดยใช้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบ maximum parsimony กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา



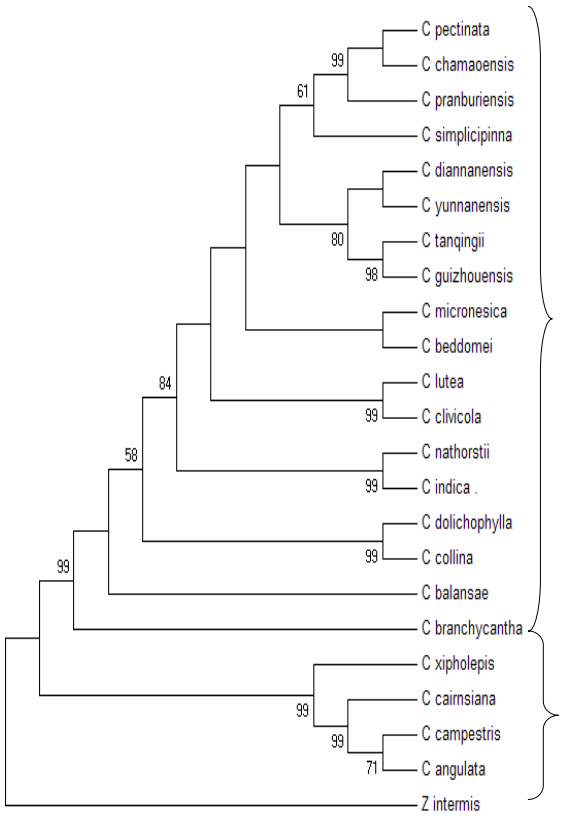
	Petiole spine	Leaflet margin	Keel of leaflet	Apex	Midrib upper	Midrib lower
C pectinata	spinesant	entire	slightly recurved	acute	raised	raised
C chamaoensis	spinesant	entire	slightly recurved	softly acuminate	raised	flat
C pranburiensis	spinesant	entire	undulated	aristate	raised	raised
C simplicipinna	spinesant	undulated	undulated	acute	raised	flat
C diannanensis	unarmed	undulated	flat	acute	raised	raised
C yunnanensis	spinesant	undulated	slightly recurved	acute	raised	raised
C tanqingii		undulated	slightly recurved	acute	raised	raised
C guizhouensis	spinesant	entire	slightly recurved	acute	raised	raised
C micronesica	spinesant	undulated	slightly recurved	acute	raised	raised
C beddomei	unarmed	entire	slightly recurved	acute	flat	raised
C lutea	spinesant	entire	undulated	softly acuminate	raised	flat
C clivicola	spinesant	undulated	undulated	softly acuminate	raised	flat
C nathorstii	spinesant	entire	undulated	softly acuminate	raised	flat
C indica .	spinesant	undulated	undulated	softly acuminate	raised	flat
C dolichophylla	spinesant	undulated	undulated	softly acuminate	raised	raised
C collina	spinesant	undulated	revolute	acute	raised	flat
C balansae	spinesant	undulated	undulated	softly acuminate	raised	raised
C branchycantha	spinesant	entire	flat	acute	raised	raised
C xipholepis	spinesant	entire	flat	aritate	raised	raised
C cairnsiana	spinesant	entire	flat	aritate	raised	raised
C campestris	spinesant	entire	flat	aritate	raised	raised
C angulata	spinesant	entire	flat	aritate	raised	raised
Z intermis						

ภาพที่ 18 (ต่อ)



	Cataphyll	Cataphyll hair	Cataphyll shape	Articulated/Persistent	Male cone	Colour
C pectinata	pungent	pilose	linear	pensistent	narrowly ovoid	yellow
C chamaoensis	soft	densely	narrowly triangular	articulated	fusiform	yellow
C pranburiensis	soft	pilose	narrowly triangular	pensistent	fusiform	orange
C simplicipinna	soft	thinly sericeous	narrowly triangular	pensistent	fusiform	orange
C diannanensis	soft	thinly sericeous	narrowly triangular	articulated	ovoid	yellow
C yunnanensis	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	ovoid	yellow
C tanqingii	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	narrowly ovoid	orange
C guizhouensis	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	narrowly ovoid	yellow
C micronesica	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	narrowly ovoid	yellow
C beddomei	pungent	pilose	linear	persistent	fusiform	orange
C lutea	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	fusiform	cream
C clivicola	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	fusiform	yellow
C nathorstii	pungent	thinly seriuous	narrowly triangular	articulated	fusiform	yellow
C indica .	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	narrowly ovoid	yellow
C dolichophylla	soft	pilose	narrowly triangular	persistent	narrowly ovoid	yellow
C collina	soft	thinly seruous	narrowly triangular	persistent	narrowly ovoid	orange
C balansae	soft	pilose	narrowly triangular	persistent	narrowly ovoid	orange
C branchycantha	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	fusiform	yellow
C xipholepis	pungent	thinly seriuous	linear	persistent	narrowly ovoid	yellow
C cairnsiana	soft	densely	linear	persistent	ovoid	orange
C campestris	pungent	pilose	linear	persistent	globus	orange
C angulata	soft	pilose	narrowly triangular	persistent	narrowly ovoid	orange

ภาพที่ 18 (ต่อ)



Apical spine	Lamina	Female lamina shape	Female lamina margin	Seed Shape	Female cone apical spine
absent	soft	ovate	deeply pectinate	ovoid	not distinct from leteral spines
absent	soft	ovate	deeply pectinate	ovoid	distinct from leteral spines
prominent	soft	orbicular	deeply pectinate	subglobose	distinct from leteral spines
absent	soft	orbicular	deeply pectinate	subglobose	distinct from leteral spines
prominent	firm	lanceolate	deeply pectinate	ovoid	distinct from leteral spines
prominent	firm	orbicular	deeply pectinate	flattened ovoid	distinct from leteral spines
prominent	firm	orbicular	deeply pectinate	flattened ovoid	distinct from lereral spines
prominent	firm	orbicular	deeply pectinate	flattened ovoid	distinct from leteral spines
prominent	firm	orbicular	deeply pectinate	flattened ovoid	distinct from leteral spines
rudimentary	firm	ovate	deeply pectinate	flattened ovoid	not distinct from leteral spines
absent	soft	ovate	deeply pectinate	ovoid	not distinct from leteral spines
absent	soft	ovate	deeply pectinate	ovoid	not distinct from leteral spines
absent	soft	ovate	deeply pectinate	ovoid	not distinct from leteral spines
rudimentary	soft	orbicular	deeply pectinate	ovoid	not distinct from leteral spines
absent	soft	ovate	deeply pectinate	ovoid	distinct from leteral spines
prominent	firm	lanceolate	regulary dentate	ovoid	distinct from leteral spines
prominent	firm	lanceolate	obscurelt dentate	flattened ovoid	distinct from leteral spines
absent	firm	lanceolate	deeply pectinate	ovoid	distinct from leteral spines
prominent	firm	lanceolate	regulary dentate	flattened ovoid	distinct from leteral spines
prominent	firm	lanceolate	obscurely dentate	flattened ovoid	distinct from leteral spines
prominent	firm	lanceolate	regulary dentate	ovoid	distinct from leteral spines
prominent	firm	ovate	shollow pectinate	flattened ovoid	distinct from leteral spines

ภาพที่ 18 (ต่อ)

ใบเมื่อเทียบกับแกนกลางของลำต้น ปลายใบมีใบย่อยคู่ มีขนสีขาว ก้านใบมีหนาม เส้นกลางใบด้านบนและด้านล่างนูน เกล็ดใบหุ้มยอดรูปสามเหลี่ยมแคบ อ่อนนุ่ม มีขนยาวปกคลุม เกล็ดใบหุ้มยอดอยู่ติดกับลำต้นไม่ร่วงหลุดไป microsporophyll มีลักษณะแข็ง megasporophyll รูปร่างเหมือนใบหอก ด้าน apical spine ของ megasporophyll แตกต่างจากด้าน lateral spine เมื่อพิจารณาถึงถิ่นกำเนิด พบว่ามีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศอินเดีย

กลุ่มย่อย f ประกอบด้วย *C. dolichophylla*, *C. collina, C. balansae* และ *C. branchycantha* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สอดคล้องกัน 4 ลักษณะ ได้แก่ ปลายใบมีใบย่อยคู่ ก้านใบมีหนาม ปลายใบย่อยเรียวแหลม megasporophyll lamina มีขอบแบบซี่หวีเว้าลึก เมื่อพิจารณาถึงถิ่นกำเนิด พบว่ามีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศเวียดนามเหมือนกัน

กลุ่มสุดท้ายคือกลุ่ม B (กลุ่มย่อย g) ประกอบด้วย *C. xipholepis* , *C. cairnsiana*, *C. campestris* และ *C. angulata* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกัน 9 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะมีลำต้นเหนือดิน ก้านใบมีหนาม ปลายใบย่อยเป็นเข็มแหลม เส้นกลางใบด้านบนและด้านล่างนูน เกล็ดใบหุ้มยอดไม่หลุดร่วงไป microsporophyll lamina แข็ง และส่วน apical spine มีลักษณะคล้ายหนามยื่นออกมา megasporophyll ส่วน apical spine แตกต่างจากด้าน lateral spine เมื่อพิจารณาถึงเขตการกระจายพันธุ์พบว่า ปรงทุกชนิดในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ซึ่งสอดคล้องกับการกระจายพันธุ์ของปรงที่พบบริเวณทวีปออสเตรเลีย

7.2 Phylogenetic tree ที่สร้างโดยวิธี neighbour-joining เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

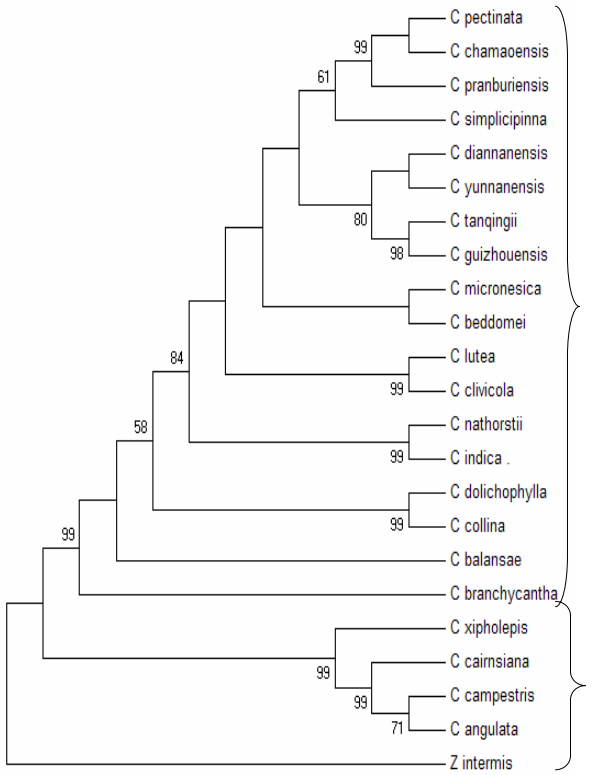
จาก phylogenetic tree ที่สร้างด้วยวิธี neighbour-joining (ภาพที่ 19) สามารถแบ่งกลุ่มปรงได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (A-B) และแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 5 กลุ่มย่อย (a-e) กลุ่มย่อยแรกคือ กลุ่มย่อย a ประกอบด้วย *C. pectinata*, *C. chamaoensis* , *C. pranburiensis* , *C. simplicipinna*, *C. clivicola*, *C. micronesica* และ *C. clivicola* subsp. *lutea* เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำต้น ใบเมล็ด โคนเพศผู้และโคนเพศเมียทั้งหมด 24 ลักษณะ พบลักษณะสอดคล้องกันทั้งหมด 5 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะปลายใบมีใบย่อยคู่ ไม่มีการโค้งตัวของใบเมื่อเทียบกับแกนกลางของลำต้น เส้นกลางใบด้านบนนูน เกล็ดใบหุ้มยอดรูปร่างสามเหลี่ยมแคบ megasporophyll lamina magin เป็นแบบซี่หวีเว้าลึก และปรงในกลุ่มนี้มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศไทยทั้งหมด

กลุ่มย่อย b ประกอบด้วย *C. yunnanensis, C. diannanensis*, *C. tanqingii*, *C. guizhouensis* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สอดคล้องกันทั้งหมด 5 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะปลายใบมีใบย่อยคู่ ก้านใบมีหนาม เส้นกลางใบด้านบนนูน microsporophyll lamina อ่อนนุ่ม และ megasporophyll lamina margin มีขอบแบบซี่หวีเว้าลึก จะสังเกตได้ว่า ปรงในกลุ่มย่อยนี้ทุกชนิดมีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศจีนทั้งสิ้น

กลุ่มย่อย c ประกอบด้วย *C. beddomei* , *C. nathorstii* และ *C. indica* ประกอบด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สอดคล้องกัน 11 ลักษณะ ได้แก่ลักษณะลำต้นอยู่บนดิน ไม่มีการโค้งตัวของใบเมื่อเทียบกับแกนกลางของลำต้น ปลายใบมีใบย่อยคู่ ก้านใบมีหนาม เส้นกลางใบด้านบนและด้านล่างนูน เกล็ดใบหุ้มยอดรูปสามเหลี่ยมแคบ อ่อนนุ่ม เกล็ดใบหุ้มยอดอยู่ติดกับลำต้นไม่ร่วงหลุดไป microsporophyll มีลักษณะแข็ง megasporophyll รูปร่างเหมือนใบหอก ด้าน apical spine ของ megasporophyll แตกต่างจากด้าน lateral spine เมื่อพิจารณาถึงถิ่นกำเนิด พบว่ามีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศอินเดียทั้งหมด

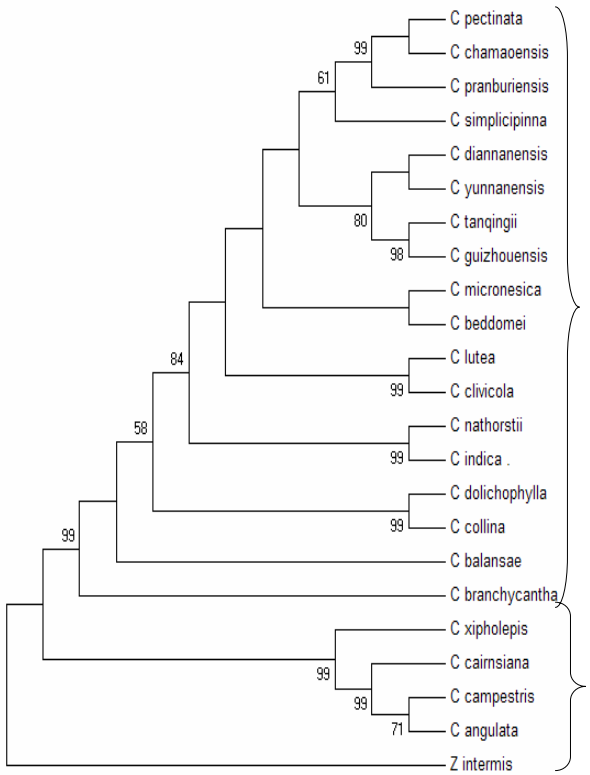
กลุ่มย่อย d ประกอบด้วย *C. dolichophylla* , *C. collina, C. balansae* และ *C. branchycantha* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สอดคล้องกัน 8 ลักษณะ ได้แก่ ปลายใบมีใบย่อยคู่ ก้านใบมีหนาม ปลายใบย่อยเรียวแหลม เกล็ดใบหุ้มยอดรูปสามเหลี่ยมแคบ เห็นข้อต่อชัดเจน microsporophyll อ่อนนุ่ม ด้าน apical spine ของ megasporophyll แตกต่างจากด้าน lateral spine และมีขอบริมแบบซี่หวีเว้าลึก เมื่อพิจารณาถึงถิ่นกำเนิด พบว่ามีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศเวียดนามเหมือนๆ กันทั้งหมด

กลุ่มสุดท้ายคือกลุ่ม B (กลุ่มย่อย e) ประกอบด้วย *C. xipholepis* , *C. cairnsiana*, *C. campestris* และ *C. angulata* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาสอดคล้องกัน 9 ลักษณะ ได้แก่ ลักษณะมีลำต้นเหนือดิน ก้านใบมีหนาม ปลายใบย่อยเป็นเข็มแหลม เส้นกลางใบด้านบนและด้านล่างนูน เกล็ดใบหุ้มยอดไม่หลุดร่วงไป microsporophyll lamina แข็ง และส่วน apical spine มีลักษณะคล้ายหนามยื่นออกมา megasporophyll ส่วน apical spine แตกต่างจากด้าน lateral spine เมื่อพิจารณาถึงเขตการกระจายพันธุ์พบว่า ปรงทุกชนิดในกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ซึ่งสอดคล้องกับการกระจายพันธุ์ของปรงที่พบบริเวณทวีปออสเตรเลียทั้งสิ้น



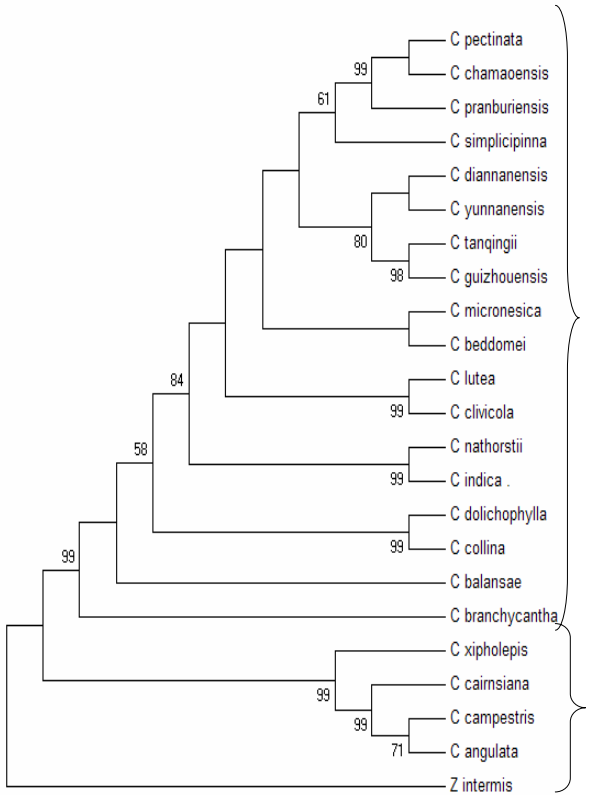
	Stem type	Leaf colour	Glossy of leaf	Keel of leaf	Terminus of leaf	Hair colour
C pectinata	acaulescent	bright green	glossy	slighily keel	paired leaflets	white
C chamaoensis	acaulescent	deep green	glossy	slighily keel	paired leaflets	white
C pranburiensis	arborescent	deep green	glossy	flat	paired leaflets	orange
C simplicipinna	arborescent	deep green	glossy	slighily keel	paired leaflets	orange
C diannanensis	arborescent	bright green	glossy	slighily keel	spine	brown
C yunnanensis	arborescent	deep green	glossy	flat	spine	white
C tanqingii	arborescent	deep green	glossy	flat	spine	white
C guizhouensis	arborescent	bright green	glossy	slighily keel	spine	white
C micronesica	arborescent	bright green	glossy	slighily keel	spine	white
C beddomei	arborescent	deep green	glossy	flat	spine	white
C lutea	acaulescent	deep green	glossy	flat	paired leaflets	orange
C clivicola	acaulescent	deep green	glossy	slighily keel	paired leaflets	brown
C nathorstii	acaulescent	deep green	glossy	slighily keel	paired leaflets	white
C indica .	arborescent	bright green	glossy	flat	paired leaflets	orange
C dolichophylla	acaulescent	deep green	glossy	slighily keel	paired leaflets	orange
C collina	arborescent	grey green	dull	flat	paired leaflets	rown
C balansae	arborescent	bright green	glossy	flat	paired leaflets	white
C branchycantha	arborescent	bright green	glossy	flat	paired leaflets	white
C xipholepis	arborescent	deep green	glossy	flat	spine	white
C cairnsiana	arborescent	bright green	dull	slighily keel	paired leaflets	orange
C campestris	arborescent	grey green	glossy	moderately keel	paired leaflets	brown
C angulata	arborescent	gright green	glossy	slightly keel	paired leaflets	orange
Z intermis						

ภาพที่ 18 แสดงการจัดกลุ่มปรงสกุล *Cycas* 22 ชนิด โดยใช้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบ maximum parsimony กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา



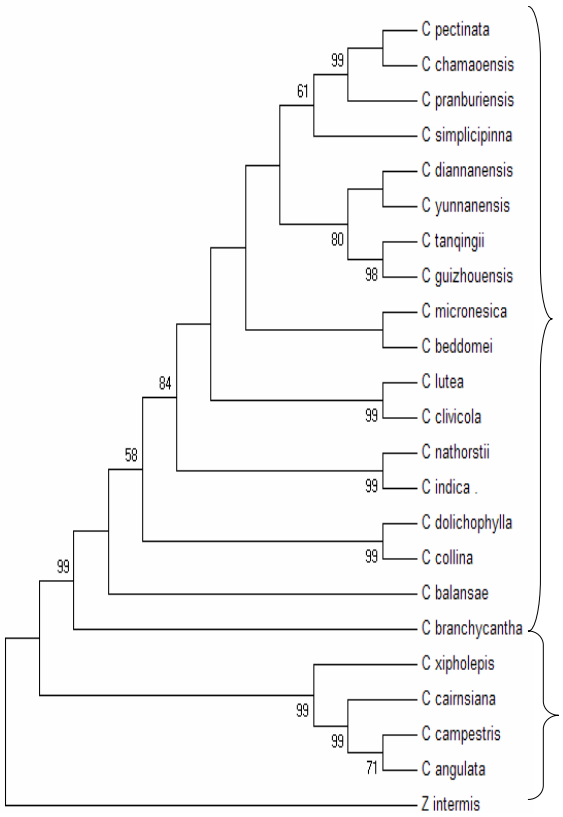
	Petiole spine	Leaflet margin	Keel of leaflet	Apex	Midrib upper	Midrib lower
C pectinata	spinesant	entire	slightly recurved	acute	raised	raised
C chamaoensis	spinesant	entire	slightly recurved	softly acuminate	raised	flat
C pranburiensis	spinesant	entire	undulated	aristate	raised	raised
C simplicipinna	spinesant	undulated	undulated	acute	raised	flat
C diannanensis	unarmed	undulated	flat	acute	raised	raised
C yunnanensis	spinesant	undulated	slightly recurved	acute	raised	raised
C tanqingii		undulated	slightly recurved	acute	raised	raised
C guizhouensis	spinesant	entire	slightly recurved	acute	raised	raised
C micronesica	spinesant	undulated	slightly recurved	acute	raised	raised
C beddomei	unarmed	entire	slightly recurved	acute	flat	raised
C lutea	spinesant	entire	undulated	softly acuminate	raised	flat
C clivicola	spinesant	undulated	undulated	softly acuminate	raised	flat
C nathorstii	spinesant	entire	undulated	softly acuminate	raised	flat
C indica .	spinesant	undulated	undulated	softly acuminate	raised	flat
C dolichophylla	spinesant	undulated	undulated	softly acuminate	raised	raised
C collina	spinesant	undulated	revolute	acute	raised	flat
C balansae	spinesant	undulated	undulated	softly acuminate	raised	raised
C branchycantha	spinesant	entire	flat	acute	raised	raised
C xipholepis	spinesant	entire	flat	aritate	raised	raised
C cairnsiana	spinesant	entire	flat	aritate	raised	raised
C campestris	spinesant	entire	flat	aritate	raised	raised
C angulata	spinesant	entire	flat	aritate	raised	raised
Z intermis						

ภาพที่ 18 (ต่อ)



	Cataphyll	Cataphyll hair	Cataphyll shape	Articulated/Persistent	Male cone	Colour
C pectinata	pungent	pilose	linear	pensistent	narrowly ovoid	yellow
C chamaoensis	soft	densely	narrowly triangular	articulated	fusiform	yellow
C pranburiensis	soft	pilose	narrowly triangular	pensistent	fusiform	orange
C simplicipinna	soft	thinly sericeous	narrowly triangular	pensistent	fusiform	orange
C diannanensis	soft	thinly sericeous	narrowly triangular	articulated	ovoid	yellow
C yunnanensis	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	ovoid	yellow
C tanqingii	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	narrowly ovoid	orange
C guizhouensis	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	narrowly ovoid	yellow
C micronesica	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	narrowly ovoid	yellow
C beddomei	pungent	pilose	linear	persistent	fusiform	orange
C lutea	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	fusiform	cream
C clivicola	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	fusiform	yellow
C nathorstii	pungent	thinly seriuous	narrowly triangular	articulated	fusiform	yellow
C indica .	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	narrowly ovoid	yellow
C dolichophylla	soft	pilose	narrowly triangular	persistent	narrowly ovoid	yellow
C collina	soft	thinly seruous	narrowly triangular	persistent	narrowly ovoid	orange
C balansae	soft	pilose	narrowly triangular	persistent	narrowly ovoid	orange
C branchycantha	soft	pilose	narrowly triangular	articulated	fusiform	yellow
C xipholepis	pungent	thinly seriuous	linear	persistent	narrowly ovoid	yellow
C cairnsiana	soft	densely	linear	persistent	ovoid	orange
C campestris	pungent	pilose	linear	persistent	globus	orange
C angulata	soft	pilose	narrowly triangular	persistent	narrowly ovoid	orange

ภาพที่ 18 (ต่อ)



	Apical spine	Lamina	Female lamina shape	Female lamina margin	Seed Shape	Female cone apical spine
C pectinata	absent	soft	ovate	deeply pectinate	ovoid	not distinct from leteral spines
C chamaoensis	absent	soft	ovate	deeply pectinate	ovoid	distinct from leteral spines
C pranburiensis	prominent	soft	orbicular	deeply pectinate	subglobose	distinct from leteral spines
C simplicipinna	absent	soft	orbicular	deeply pectinate	subglobose	distinct from leteral spines
C diannanensis	prominent	firm	lanceolate	deeply pectinate	ovoid	distinct from leteral spines
C yunnanensis	prominent	firm	orbicular	deeply pectinate	flattened ovoid	distinct from leteral spines
C tanqingii	prominent	firm	orbicular	deeply pectinate	flattened ovoid	distinct from lereral spines
C guizhouensis	prominent	firm	orbicular	deeply pectinate	flattened ovoid	distinct from leteral spines
C micronesica	prominent	firm	orbicular	deeply pectinate	flattened ovoid	distinct from leteral spines
C beddomei	rudimentary	firm	ovate	deeply pectinate	flattened ovoid	not distinct from leteral spines
C lutea	absent	soft	ovate	deeply pectinate	ovoid	not distinct from leteral spines
C clivicola	absent	soft	ovate	deeply pectinate	ovoid	not distinct from leteral spines
C nathorstii	absent	soft	ovate	deeply pectinate	ovoid	not distinct from leteral spines
C indica .	rudimentary	soft	orbicular	deeply pectinate	ovoid	not distinct from leteral spines
C dolichophylla	absent	soft	ovate	deeply pectinate	ovoid	distinct from leteral spines
C collina	prominent	firm	lanceolate	regulary dentate	ovoid	distinct from leteral spines
C balansae	prominent	firm	lanceolate	obscurelt dentate	flattened ovoid	distinct from leteral spines
C branchycantha	absent	firm	lanceolate	deeply pectinate	ovoid	distinct from leteral spines
C xipholepis	prominent	firm	lanceolate	regulary dentate	flattened ovoid	distinct from leteral spines
C cairnsiana	prominent	firm	lanceolate	obscurely dentate	flattened ovoid	distinct from leteral spines
C campestris	prominent	firm	lanceolate	regulary dentate	ovoid	distinct from leteral spines
C angulata	prominent	firm	ovate	shollow pectinate	flattened ovoid	distinct from leteral spines
Z intermis						

ภาพที่ 18 (ต่อ)

เนื่องจาก phylogenetic tree ที่สร้างจากวิธี maximum parsimony และแบบ neighbour-joining มีลักษณะความสัมพันธ์คล้ายกัน โดย maximum parsimony จะบ่งบอกถึงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ส่วน neighbour-joining จะบอกถึงความคล้ายคลึงกันของกลุ่มปรงแต่ละกลุ่ม โดยทั้งสองวิธีนี้สามารถแบ่งกลุ่มปรงได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่เหมือนกัน แต่ maximum parsimony จะแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 6 กลุ่ม และ neighbour-joining แบ่งได้ 4 กลุ่มย่อย โดยแยกตามเขตการกระจายพันธุ์และยังสอดคล้องกันตามถิ่นกำเนิดอีกด้วย ซึ่งข้อมูลที่ได้สอดคล้องกับการใช้เทคนิค RAPD จัดจำแนก *Cycas* ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ แบ่งเป็นกลุ่มที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย และกลุ่มที่มีถิ่นกำเนิดอยู่นอกประเทศไทย Sagin *et al*.(2006)

เมื่อนำผลทางสัณฐานวิทยามาเปรียบเทียบกับ phylogenetic tree พบว่าจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา 37 ลักษณะ มีเพียง 24 ลักษณะที่สอดคล้องกับ phylogenetic tree เนื่องจากวิวัฒนาการของลักษณะสัณฐานภายนอกอาจขึ้นกับการดำรงชีวิตของพืช เช่น แสง พื้นที่ สภาพภูมิอากาศ เป็นต้น ทำให้มีการปรับตัวและเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ Cycas เป็นพืชเมล็ดเปลือยยังไม่มีดอกทำให้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างจำกัด การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานภายนอกกับลำดับนิวคลีโอไทด์สามารถใช้เป็นเหตุผลในการตัดสินใจจำแนกความแตกต่างในปรงที่มีลักษณะคล้ายคลึงกันทางอนุกรมวิธาน เพื่อทำให้ผลในการจัดจำแนกถูกต้องและชัดเจนมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ $psbM^{F}$-$trnD^{GUCR}$ intergenic spacer ที่ได้จาก *Cycas* ทั้ง 22 ชนิด จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาและเป็นฐานข้อมูลสืบค้นใน Gene Bank ต่อไป

สรุป

1. จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรงในสกุล *Cycas* ทั้งหมด 37 ลักษณะ พิจาณาเลือกมา 24 ลักษณะ อันได้แก่ ลักษณะลำต้น สีใบ ความเงาวาวของใบ การโค้งตัวของใบเมื่อเทียบกับแกนกลางของลำต้น ลักษณะปลายใบ ก้านใบมีหนาม – ไม่มีหนาม การโค้งตัวของใบย่อย ขอบและปลายใบย่อย เส้นกลางใบด้านบน – ล่าง ลักษณะและรูปร่างของเกล็ดใบหุ้มยอด เกล็ดใบหุ้มยอดติดอยู่ไม่ร่วงหลุดไปหรือเห็นข้อต่อชัดเจน ลักษณะขนบริเวณเกล็ดใบหุ้มยอด รูปร่าง สีโคนเพศผู้ microsporophyll lamina มีหนามหรือไม่มีหนาม อ่อนนุ่มหรือแข็ง รูปร่างสีของโคนเพศเมีย megasporophyll lamina margin ลักษณะ apical spine เหมือนหรือแตกต่างจากด้าน lateral spine เพื่อนำมาใช้จัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของปรงสกุล *Cycas* ทั้ง 22 ชนิด

2. จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 5 ชนิด (trns ^{UGA}-trnfM^{CAU}, psbM^{F}-trnD^{GUCR}, 3'trnL^{UAA}-5'trnL^{UAAF}, rbcL-atpB) พบว่าไพรเมอร์ psbM^{F}-trnD^{GUCR} เพียงคู่เดียวที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ซึ่งใช้จำแนก *Cycas* ทั้ง 22 ชนิดได้

3. เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ psbM^{F}-trnD^{GUCR} intergenic spacer ของปรงสกุล *Cycas* ทั้ง 22 ชนิด พบว่ามีความยาวของสายนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ 969 ถึง 984 คู่เบส ปรงทั้งหมดมีปริมาณเบสอะดีนีน และไธมีน รวมกันมากที่สุดโดยมีค่าเฉลี่ย 62.6 เปอร์เซ็นต์ (AT-rich) และความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงแบบการแทนที่เบส transition/transversion) มีอัตราการเกิด transition (Ts) เท่ากับ 1.850 อัตราการเกิด transversion เท่ากับ (Tv) เท่ากับ 1.315 และมีค่า ratio (Ts/Tv) เท่ากับ 1.406 นอกจากนี้ยังพบว่าเกิดการเพิ่มหรือลดของเบส (insertion/deletion) อยู่ในระดับต่ำ

4. จากข้อมูลแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ที่สร้างจากวิธี maximum parsimony สามารถจัดกลุ่ม *Cycas* ได้ 2 กลุ่มใหญ่ และ 6 กลุ่มย่อย ส่วน neighbour-joining จัดกลุ่ม *Cycas* ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่เหมือนกัน และแบ่งกลุ่มได้ 4 กลุ่มย่อย ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้สามารถจัดกลุ่มปรงได้สอดคล้องกับการกระจายพันธุ์และถิ่นกำเนิด และยังมีความสอดคล้องกันตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำต้น ใบ เมล็ด โคนเพศผู้และโคนเพศเมีย โดย maximum parsimony จะจัดกลุ่มปรงโดยอาศัยความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ส่วน neighbour-joining จะจัดกลุ่มปรงโดยอาศัยความคล้ายคลึงกันของกลุ่มปรงเป็นหลัก

5. เมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งหมด 24 ลักษณะ มาสร้างเป็น phenogram สามารถจัดกลุ่ม *Cycas* ได้เป็น 4 กลุ่ม แต่ผลที่ได้ไม่สอดคล้องตามลักษณะการกระจายพันธุ์และถิ่นกำเนิด

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กาญจนา สาลีติ๊ด. 2541. **พฤกษศาสตร์ทั่วไป.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

จันทนา สุขปรีดี. 2526. **อาณาจักรพืช**. ภาควิชาพฤกษศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ฐิติ กาญจนเกตุ. 2549. **การตรวจหาเครื่องหมายที่ใช้บ่งชี้ลักษณะทางเพศของ *Cycas* และ *Zamia* บางชนิดโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี และการประยุกต์ใช้ Bulked segregant analysis**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณิชวรรณ เรเชียงแสน. 2549. **การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของปรงสกุล *Zamia* โดยใช้เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เมธานี เตาะสกุล. 2546. **การเปรียบเทียบทางพันธุศาสตร์ของเซลล์ระหว่างเพศผู้และเพศเมียของ *Cycas* และ *Zamia***. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อมรา คัมภิรานนท์. 2546. **พันธุศาสตร์ของเซลล์**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Birnbolim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucl. Acid Res**. 7: 1516.

Bogler, D.J. and J.F. Ortega. 2004. Molecular systematic studies on cycads : evidence from *trnL* intron and ITS2 rDNA sequences. **Bot. Rev**. 70: 260-273.

Bowman, C.M., B. Kollre, H. Deliusand and T.A. Dyer. 1981. A physical map of wheat chloroplast DNA show the location of the structure genes for the ribosomal RNAs and large subunit of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. **Mol. Gen. Genet.** 183: 93-101.

Chaiprasongsuk, M., M. Mingmuang, A. Thongpan and K. Namwongprom. 2007. Molecular identification of *Encephalartos (*Zamiaceae) species and their relationships to morphological characters. Kasetsart J. 41: 43-60.

Chaw, S.M., T.W. Walters, C.C. Chang, S.H. Hu and S.H. Chen. 2005. A phylogeny of cycads (Cycadales) inferred from chloroplast *matK* gene, *trnK* intron and nuclear rDNA ITS region. **Mol. Phylogenet. Evol.** 31: 214-234.

Chaw, S-W., A. Zharkitkh, H-M.M. Sung, T-C. Lau and M.H. Li. 1997. Molecular phylogeny of extant gymnosperm and seed plant evolution analysis of nuclear 18S RNA sequence. **Mol. Biol. Evol.** 14(1): 56-68.

Chiang, T.Y., B.A. Schaal and C.I. Peng. 1998. Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between the *atpB* and *rbcL* genes of chloroplast DNA. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 39: 245-250.

Dehgan, B. and N.B. Dehgan. 1988. Comparative pollen morphology and taxonomic affinities in Cycadales. **Amer. J. Bot.** 75: 1501-1516.

De Laubenfels, D.J. and F. Adema. 1998. A taxonomic revision of the genera *Cycas* and *Epicycas* Gen. Nov. (Cycadaceae). **Blumea** 43: 351-400.

Dossaji, S.F., T.J. Mabry and E.A. Bell. 1975. Bioflavonoids of the Cycadales. **Biochem. Syst. Ecol.** 2: 171-175.

Dowine, S.R. and J.D. Palmer. 1992. Use of chloroplast DNA rearrangement in reconstructing plant phylogeny. pp 14-35. *In* P.S. Soltis, D.E. Soltis and J.J. Doyle (eds). **Molecular Systematics of Plants.** Chapman&Hall, New York.

Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 12-15.

Gonzalez-Astorga, J., A.P. Vovides, A. Cruz-Angon, P. Octavio-Aguilar and C. Iglesias. 2005. Allozyme variation in the three extant populations of the narrowly endemic cycad *Dioon angustifolium* Miq. (Zamiaceae) from North-eastern Mexico. **Ann. Bot.** 95: 999-1007.

Herrmann, R.G., H.K. Plata and K.V. Kowallik. 1980. Chloroplast DNA from three Archegoniates. **Planta** 148: 319-327.

Hill, K.D. 1998. **The Cycad Pages.** Available source : http://plantnet.rbgsyd.gov.au.ac/cgi-bin, March 17, 2007.

Hill, K.D., D.W. Stevenson, M.W. Chase, H.G. Hill and B. Schutzman. 2003. The families and genera of cycads : A molecular phylogenetic analysis of cycadophyta based on nuclear and plastid DNA sequence**. Int. J. Plant Sci.** 164: 933-937.

Hill, K.D., D.W. Stevenson and R. Osborne. 2004. The world list of cycad, pp. 208-209. *In* A.J. Linstrom (ed). **The Biology, Structure and Systematics of the Cycadales.** Nong Nooch Tropical Botanical Garden, Thailand.

Hill, K.D., D.W. Stevenson and R. Osborne. 2004. The world list of cycad, pp. 219-235. *In*: T. Walters and R. Osborne (eds). **Cycad Classification Concepts and Recommendations.** CABI Publishing, Wallingford, U.K.

Huang, S., Y.C. Chiang, B.A. Schaal, C.H. Chou and T.Y. Chiang. 2001. Organelle DNA phylogeography of *Cycas taitungensis*, a relict species in Taiwan. **Mol. Ecol.** 10 : 2669-2681.

Huang, X. and A. Madan. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Res.** 9: 868-877.

Ish-Horowicz, D. and F.J. Burke. 1981. Rapid and efficient cosmid cloning. **Nucl. Acid Res.** 9: 2989.

Jones, C.L. 1993. Genus *Cycas*. ***Cycas* Description.** Available source: http://www.conifers.org/cy/cy/index.htm, March 17, 2007.

Jones, D.L. 1998. **Cycads of the World.** Reed New Holland, Sydney.

Kepple, G., S.W. Lee and D.D. Hodgskin. 2002. Evidence for long isolation among populations of a Pacific cycad : genetic diversity and differentiation in *Cycas seemannii* A.Br. (Cycadaceae). **Amer. Genet. Associ.** 93: 133-159.

Kumar, S., K. Tamura and M. Nei. 2007. MEGA4 : Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and alignment. **Bioinformatics** 5: 150-163.

Masahiro, S. 1992. The chloroplast genome. **Plant Mol. Biol.** 19: 149-168.

Miqeul, F.A.W. 1843. Genera et species *Cycadearum viventium*. **Linnaea** 17: 675-744.

_____. 1861. **Prodromus Systematics Cycadearum**. van der post, Utrecht, Holland, 35pp.

Nicholas, K.B. and H.B. Nicholas. 1997. **GeneDoc : analysis and visualization of genetic variation**. Available source: http://www.psc.edu/biomed/genedoc/, March 12, 2007.

Norstog, K.J. and T.J. Nicholls. 1997. **The Biology of Cycads.** Cornell University Press, London.

Palmer, J.D. 1991. Plastid chromosomes : Structure and evolution. pp. 97-106. *In* I.K. Vasil (ed) . **Biology of Plastids.** Academic Press, New York.

_____. and D. Zamir. 1982. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. **PNAS.** USA. 79: 5006-5010.

Rai, H.S., H.E. O'Brien, P.A. Reeves, R.G. Olmstead and S.W. Graham. 2003. Inference of higher-order relationships in the cycads from a large chloroplast data set. **Mol. Phylogenet. Evol.** 29: 350-359.

Ris, H. and W. Plant. 1962. Ultrastructure of DNA-containing areas on chloroplast of *Chlamydomonas*. **J. Cell Biol.** 13: 383-391.

Rochaix, J.D. 1978. Restriction endonuclease map of the chloroplast DNA of *Chlamydomonas reinhardii*. **J. Mol. Biol**. 122: 597-617.

Sambrook, J., E.F. Fritsoh and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd Ed.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.

Shaw, J., E.B. Lickey, J.T. Beck, S.S. Farmer, W. Leu J. Miller, K.C. Siripun, C.T. Winder, E.E. Schilling and R.L. Small. 2005. The tortoise and the hare II : relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **Amer. J. Bot.** 92: 142-166.

Smitinand, T. 1971. The genus *Cycas* Linn. (Cycadaceae) in Thailand**. Nat. Hist. Bull. Siam Soc.** 24: 163-175.

Norstog, K.J. and T.J. Nicholls. 1997. **The Biology of Cycads.** Cornell University Press, London.

Palmer, J.D. 1991. Plastid chromosomes : Structure and evolution. pp. 97-106. *In* I.K. Vasil (ed) . **Biology of Plastids.** Academic Press, New York.

_____. and D. Zamir. 1982. Chloroplast DNA evolution and phylogenetic relationships in *Lycopersicon*. **PNAS.** USA. 79: 5006-5010.

Rai, H.S., H.E. O'Brien, P.A. Reeves, R.G. Olmstead and S.W. Graham. 2003. Inference of higher-order relationships in the cycads from a large chloroplast data set. **Mol. Phylogenet. Evol.** 29: 350-359.

Ris, H. and W. Plant. 1962. Ultrastructure of DNA-containing areas on chloroplast of *Chlamydomonas*. **J. Cell Biol.** 13: 383-391.

Rochaix, J.D. 1978. Restriction endonuclease map of the chloroplast DNA of *Chlamydomonas reinhardii*. **J. Mol. Biol**. 122: 597-617.

Sambrook, J., E.F. Fritsoh and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd Ed.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.

Shaw, J., E.B. Lickey, J.T. Beck, S.S. Farmer, W. Leu J. Miller, K.C. Siripun, C.T. Winder, E.E. Schilling and R.L. Small. 2005. The tortoise and the hare II : relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. **Amer. J. Bot.** 92: 142-166.

Smitinand, T. 1971. The genus *Cycas* Linn. (Cycadaceae) in Thailand**. Nat. Hist. Bull. Siam Soc.** 24: 163-175.

Wang, D.Y. 1996. Systematic classification and taxonomy, pp. 9-142. *In* F.X. Wang and H.B. Liang (eds). **Cycads in China**. Guangdong Science and Technology Press, Guangdong, China.

Webb, D.T. and J.H. Slone. 1987. Anatomy of *Macrozamia communis* lateral roots and root nodules formal *in vitro* studies with light and electron microscopy. **Amer. J. Bot.** 74: 1625-1694.

Xiao, L.Q.,X.J. Ge, X. Gong, G. Hao and S.X. Zheng. 2004. ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas quizhouensis* (Cycadaceae). **Ann. Bot.** 94: 133-138.

Zhou, X.Q., W.Y. Lin and M.Q. Wang. 1988. Comparative study on the evolution of chloroplast ribosomal 5S RNA of living fossil plant, *Cycas revoluta* Thumb. **FEB Lett.** 235: 30-34.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ปฏิกิริยาเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับพลาสมิด

สารที่ใช้ในปฏิกิริยา	Standard reaction	Positive control
2X Rapid ligation buffer	5 ไมโครลิตร	5 ไมโครลิตร
pGEM-TEasy Vector 50 นาโนกรัม	1 ไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร
PCR product	*	-
T4 DNA ligase (3 Weiss Unit/ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น	10 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร

*PCR product

ปริมาณของ DNA ที่ใช้เชื่อมต่อกับพลาสมิดต่อจำนวนพลาสมิดเท่ากับ 3 : 1 ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\text{DNA (นาโนกรัม)} = \frac{\text{พลาสมิด (นาโนกรัม)} \times \text{ขนาดของ DNA (กิโลเบส)} \times \text{อัตราส่วนของ DNA กับพลาสมิด}}{\text{ขนาดของพลาสมิด (กิโลเบส)}}$$

ที่มา: Promega Corporation (2000)

ตารางผนวกที่ 2 สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB (Luria-Bertani broth)

สาร	ปริมาณ
Tryptone	10.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
NaCl	5.0 กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.5 แบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ ปริมาตรตามต้องการ ปิดปากขวดด้วยสำลีและอลูมิเนียมฟอยด์ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121 ˚C) นาน 15 นาที

2. LB (Luria-Bertani) agar

สาร	ปริมาณ
Tryptone	10.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
NaCl	5.0 กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH เป็น 7.5 เติมวุ้น 15 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121 ˚C) นาน 15 นาที เทใส่จานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละ 15-20 มิลลิลิตร หากต้องการเติมนาปฏิชีวนะในอาหาร ต้องรอให้อาหารเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50˚C ก่อน แล้วจึงเติมยาปฏิชีวนะลงไป ผสมให้เข้ากันก่อนที่จะเทลงในจานเพาะเลี้ยง

1. **SOC medium** ใช้สำหรับเลี้ยง *E. coli* เตรียมเซลล์คอมพีเทนต์ หรือใช้ในระหว่างการทรานสฟอร์เมชั่น

สาร	ปริมาณ
Tryptone	20.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
NaCl	0.5 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดลงในน้ำกลั่น 965 มิลลิลิตร แล้วเติม 250mM KCl จำนวน 10 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (121˚C) นาน 15 นาที วางทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติม 1M glucose ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ก่อนนำไปเติม 2M $MgCl_2$ ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 5 มิลลิลิตร

หมายเหตุ วิธีฆ่าเชื้อกลูโคส คือ หลังจากละลายกลูโคสดีแล้วให้กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

```
C_balansae   : ..................................................... :  50
C_cairnsiana : ..................................................... :  50
C_badensis   : ..................................................... :  50
C_yorkiana   : .................................................A.... :  50
C_semota     : ..................................................... :  50
Z_intermis   : CTCGA.AGTCTT.TGTAA...TACCGGNTTT.CAAGACCGGGAG..A..N :  50
               gatttTcagtccTctgctCTAccaactgagcTatcccggctcttCccTGt

C_balansae   : ......................A.......................... : 100
C_cairnsiana : ..................................................... : 100
C_badensis   : ..................................................... : 100
C_yorkiana   : ..................................................... : 100
C_semota     : ..................................................... : 100
Z_intermis   : AACCAC.CGGCCATCTCTC..A.GGNACAAT.TCTA.TTTACTC..CC.G : 100
               gcatcaTtctaacataggaCCtgaacttgtgTcaacTgaagggaCCatAa

C_balansae   : ..................................................... : 150
C_cairnsiana : ..........G.......................................... : 150
C_badensis   : ..................................................... : 150
C_yorkiana   : ........................C.......................... : 150
C_semota     : ..................................................... : 150
Z_intermis   : .G...ATCTGACCA.AGGG.T.A..CC.TGACCG.A.ATGCAT.T...G. : 150
               AaAATgggga tttTttccTaGtTaaaAaattatTtTcgaacaAaATTtA

C_balansae   : ..................................................... : 200
C_cairnsiana : ...............................T..................... : 200
C_badensis   : ....................................G............... : 200
C_yorkiana   : ..................................................... : 200
C_semota     : ..........................C.......................... : 200
Z_intermis   : T.C.TGTAT.TGGCAT...CCT.TATACATAG.TTGAT.C.TGTA.A.GG : 200
               cGgGaagtaAccattcATGagaAgg ctgct Acga cGaAgaatTtTca

C_balansae   : ..................................................... : 250
C_cairnsiana : ..................................................... : 250
C_badensis   : ......................A.......................... : 250
C_yorkiana   : ...................T.............................. : 250
C_semota     : ..................................................... : 250
Z_intermis   : CA.A.ACC.ATGTG.G.C...GGA.CTT....AT....ATCTGGA.A.AT : 250
               atTcTctaTccagaTtGgaTAt tCagaTATCtaGATCtctatatAtAga

C_balansae   : ..................................................... : 300
C_cairnsiana : ..................................C.................. : 300
C_badensis   : ..................................A.................. : 300
C_yorkiana   : ..................................................... : 300
C_semota     : ........................T........C.................. : 300
Z_intermis   : A.TTTCC..CCTCC.TC.CGCCCGA....GA.TTCGA.GGG.A.AAGT.C : 300
               tAgagatCTagataTctAtctata ATAAtgAg g  TcctAcTtctaTt
```

ภาพผนวกที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ trnF^{GAA}-3'trnL^{UAA} ทดสอบใน *Cycas* 5 ชนิด

```
C_balansae   : ..............T.AATAAA..GA.TC.ATTCG..AGT..G.A.T.C. : 350
C_cairnsiana : ................................................... : 350
C_badensis   : ................................................... : 350
C_yorkiana   : ............C..................................... : 350
C_semota     : ................................................... : 350
Z_intermis   : GAGCG.GAA.CTT.ATTAAT.C.TA.CC..ATTGA.TC.TTTC.CCAT.G : 350
               tcttcAtggGgg G g    t Aa ga aA     Aa t ga A t aga

C_balansae   : .A.T.G..A.T.T.TAAAA.A......G.G...TC..TC..TC.GG.ACG : 400
C_cairnsiana : ................................................... : 400
C_badensis   : ................................................... : 400
C_yorkiana   : ................................................... : 400
C_semota     : ............T.................................... : 400
Z_intermis   : TG.GGTGCA.TTGGGGAAA..TTCGCCGG.TGGG..TCG.ATG..ATAGT : 400
               a T c aa T g a     Ataaaaaa aaaaa gAg  At  Gt a

C_balansae   : AACTCGACTT : 410
C_cairnsiana : .......... : 410
C_badensis   : .......... : 410
C_yorkiana   : .......... : 410
C_semota     : .......... : 410
Z_intermis   : CCATTTC.TT : 410
                       a
```

ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)

```
C.campestris    : ..................................................  :  50
C.micronesica   : ..................................................  :  50
C.chamaoensis   : ..................................................  :  50
C.dolichophylla : ..................................................  :  50
C.nathorstii    : ..................................................  :  50
Z.intermis      : .........C.........T.......N...TC.AGA.C.G.AGCCATGN  :  50
                  CTCGATAGTtTTTTGTAACcATACCGGtTTTcaAgacCgGaGccatgaac

C.campestris    : ..............................................A....  : 100
C.micronesica   : ..................................................  : 100
C.chamaoensis   : ..................................................  : 100
C.dolichophylla : ..................................................  : 100
C.nathorstii    : ..................................................  : 100
Z.intermis      : A..CACT.GGC.ATCT.TCCCAGGGNACAA.T.C.ATT.TA.T.CCCC.G  : 100
                  cACtcggCcatCtctcCcggggataattttTaTtTtacTccCcCa ggAa

C.campestris    : ..................................................  : 150
C.micronesica   : ..................................................  : 150
C.chamaoensis   : ..................................................  : 150
C.dolichophylla : ..................................................  : 150
C.nathorstii    : ..................................................  : 150
Z.intermis      : AGAA.AT..GACCATAGGG.TGATACCAT.ACCG.AT..GC..AT..TG.  : 150
                  tatcTgcCTatatggtttaTaccatgaccGtataTgcATagATtgATgcA

C.campestris    : ..................................................  : 200
C.micronesica   : ..................................................  : 200
C.chamaoensis   : ..................................................  : 200
C.dolichophylla : ..................................................  : 200
C.nathorstii    : ..................................................  : 200
Z.intermis      : ..CG.G.ATATGGC.TA.GCCTA....C..AGAT.GATGCATG.ATATGG  : 200
                  TGtaTaTgacatatAccTataccTATAtATgacaTaggattctTtatcat

C.campestris    : ..................................................  : 250
C.micronesica   : ..................................................  : 250
C.chamaoensis   : ..................................................  : 250
C.dolichophylla : ..................................................  : 250
C.nathorstii    : ..................................................  : 250
Z.intermis      : C..ATA.CTATGTGT.GCA.AGGAC.T.TA.CATGAT.ATCTGG.A..A.  : 250
                  gATcatCtggaaaaaGaatTtccctCcTccTtcacgcCcgaataAgAAtT

C.campestris    : ..........A.......................................  : 300
C.micronesica   : ..................................................  : 300
C.chamaoensis   : ..................................................  : 300
C.dolichophylla : ..................................................  : 300
C.nathorstii    : ..................................................  : 300
Z.intermis      : AAT.TC..TCCTCCTTCAC.CCCG..TAAGAATTC......A..AA.T.C  : 300
                  cgaTggCCat gtgcatttGgggaAAatttcgccgGATGGGgATcgGaTg
```

ภาพผนวกที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ $trnS^{UGA}$-$trnfM^{CAU}$ ทดสอบใน *Cycas* 5 ชนิด

```
C.campestris    : ..................................................... : 350
C.micronesica   : ..................................................... : 350
C.chamaoensis   : ..................................................... : 350
C.dolichophylla : ..................................................... : 350
C.nathorstii    : ..................................................... : 350
Z.intermis      : .AGCGAGAAGC..G.TTAA.TCAT...CAAATT.AATCTTTT..CC.TGG : 350
                  GtatagtccatTTcAcccgTcggaAGCttgtggGgtcacaaaCAtgActa

C.campestris    : ..................................................... : 400
C.micronesica   : .....................................................T... : 400
C.chamaoensis   : ..................................................... : 400
C.dolichophylla : ..................................................... : 400
C.nathorstii    : ..................................................... : 400
Z.intermis      : .GTGG.G.ATT.G..GAAAA...CGCCGG..G.GG..CGA..GGTATAGT : 400
                  TtgctTtCcaaTtGGccgtgTTTgcattaATtGctATttcATtcct cta

C.campestris    : ..................................................... : 450
C.micronesica   : ..................................................... : 450
C.chamaoensis   : ..................................................... : 450
C.dolichophylla : ..................................................... : 450
C.nathorstii    : ..................................................... : 450
Z.intermis      : CCAT..CA.TC..TG.AA.CTTA..GGATCA.AAC.ATGACTATTGC.TT : 450
                  gtgaTTggTgtACctGtcGtactTGcctctcCtgaTggttggtcaagTaa

C.campestris    : ..................................................... : 500
C.micronesica   : ..................................................... : 500
C.chamaoensis   : ..................................................... : 500
C.dolichophylla : ..................................................... : 500
C.nathorstii    : ..................................................... : 500
Z.intermis      : .C..TTG.CCG.G...G.ATTAATTG.TA.T.CAT.CCTC.....GA..G : 500
                  CaAAaatGttaTaTTTtCgggtgcatCatTaTggaTtggaTTAGTctTTt

C.campestris    : ..................................................... : 550
C.micronesica   : ..................................................... : 550
C.chamaoensis   : ..................................................... : 550
C.dolichophylla : ..................................................... : 550
C.nathorstii    : ..................................................... : 550
Z.intermis      : GT..GCC.G..G.ACT.G.C.CTCCCGA.GGTTGGTC..G.AGCAAAAA. : 550
                  tgGTaggTaTCcTtaaTtCtTtcatatcTtaaattggAAaTgtttcgggT

C.campestris    : ..................................................... : 600
C.micronesica   : ..................................................... : 600
C.chamaoensis   : ..................................................... : 600
C.dolichophylla : ..................................................... : 600
C.nathorstii    : ..................................................... : 600
Z.intermis      : GTTCTA..TTCAGGTG.ATCAT.ATGGA.TGGA..AGTTTTTTGG.A.. : 600
                  tagaatTTcctccccaCtcagaTggcatTctagTTctgaagggcatTtGG
```

ภาพผนวกที่ 2 (ต่อ)

```
C.campestris    : ..................................................  : 650
C.micronesica   : ..................................................  : 650
C.chamaoensis   : ..................................................  : 650
C.dolichophylla : ..................................................  : 650
C.nathorstii    : .........T........................................  : 650
Z.intermis      : ...CCT.AATTCTTTCAT.TC.C...T.TG.T.GAAAT.TTT.GGG..G.  : 650
                  TATaagTtc aagaaacaAaaTaAAAgTgtTcGagggaGgggTtctTTcG

C.campestris    : ..................................................  : 700
C.micronesica   : ..................................................  : 700
C.chamaoensis   : ..................................................  : 700
C.dolichophylla : ..................................................  : 700
C.nathorstii    : ..................G...............................  : 700
Z.intermis      : AAT.CCCCC.C.C.ACC.CAGAGGGCAT.C.AGTTCTGA.GGGC.T.T..  : 700
                  ctaTaatgtAaCaTtatT cataaatggTaTctaaacatAtacaAaTgAG

C.campestris    : ..................................................  : 750
C.micronesica   : ..................................................  : 750
C.chamaoensis   : ..................................................  : 750
C.dolichophylla : ..................................................  : 750
C.nathorstii    : ..................................................  : 750
Z.intermis      : TAGAAGCC.C.AGAAACA.A...AAAGTG.TCGAGGGAGGG.T..TT.CA  : 750
                  atatctatCtAtatctatAgATAtgttcaTatctatagataGaTAgaTat

C.campestris    : ..................................................  : 800
C.micronesica   : ..................................................  : 800
C.chamaoensis   : ..................................................  : 800
C.dolichophylla : ..................................................  : 800
C.nathorstii    : ..................................................  : 800
Z.intermis      : C.AG.ATGTA.T.TCCT.CCA.A.ATGG...C.AAC...ATAC.AATGGG  : 800
                  aTctAtatagAaAcataTatgTtAtataTATgTgtaTATcggaAtgacta

C.campestris    : ..................................................  : 850
C.micronesica   : ..................................................  : 850
C.chamaoensis   : ..................................................  : 850
C.dolichophylla : ..................................................  : 850
C.nathorstii    : ..................................................  : 850
Z.intermis      : .T.T.TATCTATA.ATGTA.A.CT.TA.ATCTA.A.AT.T.TTC.TATCT  : 850
                  AgAgCgggtatggTtgagtGgTaaAatTtctccTtGccAaGgagAagatg

C.campestris    : .................  : 868
C.micronesica   : .................  : 868
C.chamaoensis   : .................  : 868
C.dolichophylla : .................  : 868
C.nathorstii    : .................  : 868
Z.intermis      : ATA.A.AT..AGATCTAC  : 868
                  cggGtTcgATtcccgcta
```

ภาพผนวกที่ 2 (ต่อ)

```
C_balansae    : ..............G.............G..................... :  50
C_cairnsiana  : ..................................................... :  50
C_badensis    : ..................................................... :  50
C_campestris  : ..................................................... :  50
C_micronesica : ..................................................... :  50
Z_intermis    : TCA.CTGGAA.A...TC..AATTAG.A.C.T.ACG.TGT.A.TA..T.CT :  50
                gacTtgatcgAgTTG gCCttggtaTgGaaaCctaCcaaGtGatAGcTtc

C_balansae    : .................G.........................G...... : 100
C_cairnsiana  : ..................................................... : 100
C_badensis    : ..................................................... : 100
C_campestris  : ..................................................... : 100
C_micronesica : ..................................................... : 100
Z_intermis    : A..CCATTTTTTTATTGTT.TAT.A.CTCTAATCTT.CTACTCGATG.G. : 100
                cAAatccagggaaccct gGacaTtTagaatgggcaAtcctga ccaAaT

C_balansae    : ..............G.............T.........GA..G........ : 150
C_cairnsiana  : ..................................................... : 150
C_badensis    : ..........................................A...... : 150
C_campestris  : ..........................................C..... : 150
C_micronesica : ..................................................... : 150
Z_intermis    : TTTCGG..TTATCT.T..TT..AA....GAGCA.GTTCC.TTCAT.GTT. : 150
                ccagttTAcagag CaATagTTtcCTTgactagGaag  Aa g  TaggT

C_balansae    : ..........A................................A..... : 200
C_cairnsiana  : ..................................................... : 200
C_badensis    : ..................................................... : 200
C_campestris  : .......T.............................................. : 200
C_micronesica : ..................................................... : 200
Z_intermis    : TTTTCAT.ATAG..A.TAAA..CAACTGCTT.A.CAC..G.GCCTGAACA : 200
                gcagagactc aTGgAagctATtctaacgaaTgAataTTcTttt cccag

C_balansae    : ...C..................GC...........T..........G... : 250
C_cairnsiana  : ..................................................... : 250
C_badensis    : .................C................................... : 250
C_campestris  : ..................................................... : 250
C_micronesica : .................G................................... : 250
Z_intermis    : CCA.ATCCA.CC...TGGC..GAGTTT..C.GCAAGATGGG.ATA..GG. : 250
                tgctgcatcTatGGAa  aTCt  acaTTtAcact caaaaGtggGaatG

C_balansae    : ...T..G..............................G...GC....... : 300
C_cairnsiana  : ..................................................... : 300
C_badensis    : ..................................................... : 300
C_campestris  : ....................................T............ : 300
C_micronesica : ..................................................... : 300
Z_intermis    : ACTTGA...C...C.GTCTA.AA.GCCGAC...T..TCC..T.AC.GCAA : 300
                gtc ataCTaTCAaGcaaagTtcAtgatcgGGAcTTg  TC tttTatgc
```

ภาพผนวกที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ 3'trnL^{UAAR}-5'trnL^{UAAF}ทดสอบใน *Cycas* 5 ชนิด

```
C_balansae    : ........GC........T............C.C.....G.......G.. : 350
C_cairnsiana  : ..................................................... : 350
C_badensis    : ....................................T......... : 350
C_campestris  : ..................................................... : 350
C_micronesica : ..................................................... : 350
Z_intermis    : T..G..T.G..GT..GC.TTGACAT..AG.AC.GG.C.CT.TCTTTATCC : 350
                aTTtCAcT tTagTGagA gcttggGTcaAt T aAgTt aaggaat at

C_balansae    : ........................G...A..T...AA.......G.... : 400
C_cairnsiana  : ..................................................... : 400
C_badensis    : ..................................................... : 400
C_campestris  : ..................................................... : 400
C_micronesica : ..................................................... : 400
Z_intermis    : ...T.GAA..A.TCA.TCCA.GAATCGA..CGACTT.CTCTTTA.GGAGG : 400
                TCGaCattAAgTaatCcaatGatta ctTcac tccc aaagagG agtc

C_balansae    : ..............G..A....C.......................... : 450
C_cairnsiana  : ..................................................... : 450
C_badensis    : ..................................................... : 450
C_campestris  : ..................................................... : 450
C_micronesica : ..................................................... : 450
Z_intermis    : T..AGTTAAT.ATTG.ATT.C..AAT.T...ATTATTCCT.TA.C.TA.A : 450
                gGAtcgattcCtgg Gt aAtTtttcGaCGAggataaagaTagAgTccAg

C_balansae    : ......................C.......................... : 500
C_cairnsiana  : ..................................................... : 500
C_badensis    : ..................................................... : 500
C_campestris  : ..................T................................. : 500
C_micronesica : ................T..................................... : 500
Z_intermis    : A.TG..CCAAGCG.CT..CT..T.G..A..TGCAT.AA.T..TTC..G.. : 500
                tTctACatgtcaaTg CaacAacAaTGcAAattgcAgtAaGAggaAAaTC

C_balansae    : ......T.............. : 523
C_cairnsiana  : ............TA.GGC...TT : 523
C_badensis    : ...................... : 523
C_campestris  : ...................ATCG : 523
C_micronesica : ...................... : 523
Z_intermis    : .CGATCA.GA.CTTTG.T...T. : 523
                Cgtcgg TttAt  a c Tga
```

ภาพผนวกที่ 3 (ต่อ)

```
C_balansae   : ..................................................... :  50
C_cairnsiana : ..................................................... :  50
C_badensis   : ..................................................... :  50
C_yorkiana   : ..................................................... :  50
C_fugax      : ..................................................... :  50
Z_intermis   : C.GCCTT.G.C.C.GTTTTTGGTGACATA.GTCCCTCCCT.CAA.TC.TC :  50
               tTtgaacAaTaTgTcccacattcttttccAcaagtgtgggAaccCcaAga

C_balansae   : ..................................................... : 100
C_cairnsiana : ..................................................... : 100
C_badensis   : ..................................................... : 100
C_yorkiana   : ..................................................... : 100
C_fugax      : ..................................................... : 100
Z_intermis   : AATTA.TA.C.CT.G.AAGG.CG..GTCTGCTC..C.CGGA.CGA.CG.A : 100
               gcaagAggAtTggTtCtcatAatAAtaaaaaggGAgAtttgTtcgAatTg

C_balansae   : ..................................................... : 150
C_cairnsiana : ..................................................... : 150
C_badensis   : ..................................................... : 150
C_yorkiana   : .........C........................................... : 150
C_fugax      : ..................................................... : 150
Z_intermis   : AAGAAAT.ATT.CAC.GG...C.CCT.CGGAACCAT..A.TAACTCAAG. : 150
               ctcgctaAt cTattAaaAATgTttaGtatcgaatcGAtCagttcatgaT

C_balansae   : ..................................................... : 200
C_cairnsiana : ..................................................... : 200
C_badensis   : ..................................................... : 200
C_yorkiana   : ..................................................... : 200
C_fugax      : ..................................................... : 200
Z_intermis   : CGTCCGTTA..GTGCAA.AATCTA.TA.TTGCCA.A.A.A..AT.ATT.. : 200
               gaatgagagTTaccaccTtgatctActTagtgatAtTtCgCTtcTcaaGT

C_balansae   : ..................................................... : 250
C_cairnsiana : ..................................................... : 250
C_badensis   : ..................................................... : 250
C_yorkiana   : ..................................................... : 250
C_fugax      : ..................................................... : 250
Z_intermis   : AT..TG..CT..A..T.TGACGCAACCCG.TC.TTGCT.TTCA..TTTT. : 250
               tcAActTTtaTTtTGaAcatgaagtagatGgaTaaaaaTcatgAGaaagT

C_balansae   : ..................................................... : 300
C_cairnsiana : ..................................................... : 300
C_badensis   : ..................................................... : 300
C_yorkiana   : ..................................................... : 300
C_fugax      : ..................................................... : 300
Z_intermis   : .CATGCA...A..CAGGGACCCTC..GC.ATTAGACT.A.TAA.GA.TC. : 300
               CttcaatTTGtCCataactataagCAttTcacccagAtTgcgTccAgaT
```

ภาพผนวกที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ atpB-rbcLทดสอบใน *Cycas* 5 ชนิด

```
C_balansae   : ..................................................... : 350
C_cairnsiana : ..................................................... : 350
C_badensis   : ..................................................... : 350
C_yorkiana   : ..................................................... : 350
C_fugax      : ..................................................... : 350
Z_intermis   : A.GGTTAATG.AT.TA..GAACCGAATCGAC.T.TTA.CC.AATAG..AA : 350
               tAtccattcaAtgCggAActtgaaccctattCaTaatCttTctctcATcg

C_balansae   : ..................................................... : 400
C_cairnsiana : ..................................................... : 400
C_badensis   : .G................................................... : 400
C_yorkiana   : ..................................................... : 400
C_fugax      : ..................................................... : 400
Z_intermis   : TGT..GTGTGTG.GAACCGTAGGTGTA.AAGTAAACA.A.GGAACGAGAA : 400
               g cGTtgtctctTcctttcatacgcacAtctatttttTcTttttttctttt

C_balansae   : ..................................................... : 450
C_cairnsiana : ..................................................... : 450
C_badensis   : ..................................................... : 450
C_yorkiana   : ..................................................... : 450
C_fugax      : ..................................................... : 450
Z_intermis   : .AAA.AAAA.AGAT..ATGT.GCG.A..AAAGG.AGAAACA.CGACCG.T : 450
               TtttTttttTtttcGTcctaTataTcTGcttttAgatctacAatctacAc

C_balansae   : ..................................................... : 500
C_cairnsiana : ..................................................... : 500
C_badensis   : ..................................................... : 500
C_yorkiana   : ..................................................... : 500
C_fugax      : ..................................................... : 500
Z_intermis   : CAGAGA.AGA.TCTG.A..A.G..C...T..CG..AC.CAT.GA.TGGAT : 500
               atacatAtatTatctAtTAgGaTCaAAGgTCgaTTcgGttcTttAaatcc

       *  520   *  540   *
C_balansae   : ..................................................... : 550
C_cairnsiana : ..................................................... : 550
C_badensis   : ..................................................... : 550
C_yorkiana   : ..................................................... : 550
C_fugax      : ..................................................... : 550
Z_intermis   : GA.CTGGGCG.A.CCT.GG.TG.AA.G...ATAGTT...G.CAA.TC..A : 550
               atTaactagtCtAataGctGaaAggTcCTTgggtcaATGcAtggAggAAc

C_balansae   : ..................................................... : 600
C_cairnsiana : ..................................................... : 600
C_badensis   : ..................................................... : 600
C_yorkiana   : ..................................................... : 600
C_fugax      : ..................................................... : 600
Z_intermis   : AACCTTCT..TGATATTTA.CCAT.T.CTTCATGTTC.A.A.CA.AGT.G : 600
               ttgaaaagCAaagatagggTtgcgCcAtacataaagaAcAtTatAcaaTa
```

ภาพผนวกที่ 4 (ต่อ)

```
C_balansae   : ..................................................... : 650
C_cairnsiana : ..................................................... : 650
C_badensis   : ..................................................... : 650
C_yorkiana   : .................................................A.. : 650
C_fugax      : ..................................................... : 650
Z_intermis   : .ACT..ATAAGCAA..TATCAC.A.TAG.TC..G.TGGT.AC.CTCA.TC : 650
               AtagTGtatttggcAAatcttaTtGcccAatAAcGgacgActTgagttag

C_balansae   : ..................................................... : 700
C_cairnsiana : ..................................................... : 700
C_badensis   : ..................................................... : 700
C_yorkiana   : ..................................................... : 700
C_fugax      : ..................................................... : 700
Z_intermis   : A.....AACTGATC.ACTCGATA.CGA.C..TT..AA.G.TAT.AGCGAG : 700
               tTCATGgttccgcaGgagattccTgtgAaATccTTtcTtTacgTtcgatc

C_balansae   : ........................................ : 742
C_cairnsiana : ........................................ : 742
C_badensis   : ........................................ : 742
C_yorkiana   : ........................................ : 742
C_fugax      : ........................................ : 742
Z_intermis   : ..AT.T..A..A.T..TC.TT.ATT.TT.T.ATGAG.ACC.A : 742
               CAtgTcGAgCAgAcCTcgTccTtgcAagAgTtattaAttgAt
```

ภาพผนวกที่ 4 (ต่อ)