

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างพืช

เก็บใบอ่อนของปรงสกุล *Zamia* 30 ชนิด ได้แก่ *Z. amblyphyllidia*, *Z. angustifolia*, *Z. encephalartoides*, *Z. fairchildiana*, *Z. fischeri*, *Z. furfuracea*, *Z. herrerae*, *Z. inermis*, *Z. integrifolia*, *Z. loddigesii*, *Z. lucayana*, *Z. manicata*, *Z. monticola*, *Z. muricata*, *Z. neurophyllidia*, *Z. obliqua*, *Z. poeppigiana*, *Z. polymorpha*, *Z. portoricensis*, *Z. pseudomonticola*, *Z. pumila*, *Z. purpurea*, *Z. pygmaea*, *Z. roezlii*, *Z. skinneri*, *Z. sp.*, *Z. standleyi*, *Z. tuerckheimii*, *Z. variegata* และ *Z. vazquezii* ปรงเหล่านี้มีแหล่งที่มาจากประเทศต่างๆ ทางตอนเหนือและตอนใต้ของอเมริกา แสดงให้เห็นในตารางที่ 1 โดยถูกรวบรวมมาปลูกไว้เพื่อการศึกษา ณ สวนนงนุช จังหวัดชลบุรี

ตารางที่ 1 แสดงชนิด แหล่งที่มาของปรงสกุล *Zamia* ที่ใช้ทำการวิจัย

ชนิดปรง	แหล่งที่มา
1. <i>Z. pygmaea</i>	Cuba
2. <i>Z. monticola</i>	Guatemala
3. <i>Z. poeppigiana</i> *	Peru
4. <i>Z. fairchildiana</i>	Panama
5. <i>Z. pumila</i>	Dominican Republic
6. <i>Z. roezlii</i> *	Colombia
7. <i>Z. obliqua</i>	Panama
8. <i>Z. skinneri</i>	Panama
9. <i>Z. polymorpha</i>	Mexico
10. <i>Z. muricata</i> *	Venezuela
11. <i>Z. fischeri</i>	Mexico

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดปรง	แหล่งที่มา
12. <i>Z. amblyphyllidia</i>	Jamaica
13. <i>Z. loddigesii</i>	Mexico
14. <i>Z. lucayana</i>	Bahamas
15. <i>Z. herrerae</i>	Mexico
16. <i>Z. manicata</i>	Panama
17. <i>Z. purpurea</i>	Mexico
18. <i>Z. variegata</i>	Mexico
19. <i>Z. portoricensis</i>	Puerto Rico
20. <i>Z. vazquezii</i>	Mexico
21. <i>Z. furfuracea</i>	Mexico
22. <i>Z. sp.</i>	Cuba
23. <i>Z. pseudomonticola</i>	Costa Rica
24. <i>Z. angustifolia</i>	Bahamas
25. <i>Z. neurophyllidia</i>	Costa Rica
26. <i>Z. encephalartoides*</i>	Colombia
27. <i>Z. tuerckheimii</i>	Guatemala
28. <i>Z. inermis</i>	Mexico
29. <i>Z. integrifolia</i>	Bahamas
30. <i>Z. standleyi</i>	Honduras

หมายเหตุ ชื่อปรงที่พิมพ์ตัวเข้มและมีสัญลักษณ์ * คือชนิดของปรงที่มีการกระจายพันธุ์
อยู่ในบริเวณตอนใต้ของทวีปอเมริกา

การเตรียมตัวอย่างพืช

ใช้ใบอ่อนของปรง ซึ่งดูได้จากลักษณะความนิ่มของใบ อาจมีสีน้ำตาลอ่อนหรือเขียวอ่อน ในการสกัดดีเอ็นเอควรจะสกัดทันทีหลังจากที่เก็บตัวอย่างพืชมา แต่ถ้ายังไม่สามารถสกัดในทันที ควรนำใบอ่อนของปรงทุกชนิดมาล้างให้สะอาดและเช็ดให้แห้งเก็บไว้ในถุงพลาสติกและรัดปากถุงให้แน่น นำไปเก็บไว้ที่ -80°C

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรง

บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรง อันได้แก่ ลักษณะลำต้น สีใบ ความยาวของใบ จำนวนใบต่อด้าน รูปร่างของใบย่อย ลักษณะปลายใบและฐานใบ ลักษณะขอบใบย่อยทั้งด้านบน และด้านล่าง ใบย่อยมีหรือไม่มีขนปกคลุม ใบมีหรือไม่มีเส้นใบย่อย การโค้งตัวของใบย่อย ลักษณะระนาบของใบ การเรียงตัวของใบย่อย ลักษณะการติดของใบย่อยกับแกนกลางใบ สีและการโค้งตัวของแกนกลางใบ ก้านใบมีหรือไม่มีหนาม ก้านใบมีหรือไม่มีใบย่อยที่ลดรูปเป็นหนาม โคนเพศผู้และเพศเมีย โดยศึกษาจากรูปร่าง สี และขนาดของโคน การมีขนหรือไม่มีขนปกคลุมโคน และรูปร่าง สี ขนาดของเมล็ด โดยรวบรวมลักษณะทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นในตารางที่ 2 และภาพที่ 2-10

การสกัดดีเอ็นเอจากปรง

ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1990) โดยมีขั้นตอนดังนี้ :-

ล้างใบอ่อนของปรงให้สะอาดและเช็ดให้แห้ง นำใบอ่อนน้ำหนักประมาณ 3 กรัม มาบดกับไนโตรเจนเหลวในโถรงให้ละเอียด 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 ครั้ง ทุก 15 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) (V/V) ปริมาตร 10 ml ลงในหลอดแล้วผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ ประมาณ 1-2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 g นาน 10 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำและ chloroform ออกจากกัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 50 ml หลอดใหม่ เติม

absolute ethanol จำนวน 1 เท่าของปริมาตรของสารละลายลงในหลอด ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปเก็บไว้โดยแช่ที่อุณหภูมิ -20°C ซ้ำมคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เทส่วนใสของสารละลายทิ้งจนหมดให้เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอที่อยู่ก้นหลอด ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % ethanol เขย่าหลอดกลับไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C หลังจากนั้นตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 500 μl เมื่อตะกอนละลายหมดแล้ว

ดูดสารละลายดีเอ็นเอลงในหลอดพลาสติกขนาด 1000 (l และเติม Rnase A จำนวน 10 μl ลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 37°C นาน 45 นาที สกัดดีเอ็นเอโดยการเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) (V/V) ปริมาตร 500 μl ลงไป ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ดูดเอาส่วนที่เป็นน้ำใสส่วนบนเก็บไว้ใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1000 μl แล้วจึงเติม absolute ethanol จำนวน 1 เท่าของปริมาตรของสารละลายลงในหลอด ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา และนำไปเก็บไว้โดยแช่ที่อุณหภูมิ -20°C 1 ชั่วโมง ล้างตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งหนึ่งตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว จากนั้นละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 100 μl

เทคนิค RAPD

คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยนำดีเอ็นเอของปรังสกุล *Zamia* 30 ชนิด มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ (Operon Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา) จำนวน 60 ชนิด (OPA 1-20, OPB 1-20, OPJ 1-20)

ความเข้มข้นของสารต่าง ๆ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย PCR buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 50 mM KCl) ปริมาตร 2.5 μl , 3.0 mM MgCl_2 ปริมาตร 1.5 μl , 1.25 unit Taq polymerase ปริมาตร 0.25 μl , 200 μM dNTP ปริมาตร 0.5 μl , ดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 ng ปริมาตร 2 μl , 0.4 μM ไพรเมอร์ ปริมาตร 1 μl ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุทธิ 25 μl

สังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Perkin Elmer 9600 Thermocycler ตั้งโปรแกรม PCR โดยเริ่มด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย denaturation อีกครั้งที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 1 นาที แล้วจึงทำ annealing ที่อุณหภูมิ 36 °C นาน 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 2 นาที จำนวน 45 รอบ ขั้นสุดท้าย คือ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ

นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบปริมาณและขนาดของ ดีเอ็นเอ โดยทำ electrophoresis บน 1% agarose gel เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอ มาตรฐาน (100 bp) แล้วย้อมเจลด้วย ethidium bromide และตรวจสอบดีเอ็นเอบน UV light box ถ่ายรูป และบันทึกผล

วิเคราะห์ผลของ RAPD

วิเคราะห์ข้อมูลหาความสัมพันธ์ จากค่า Similarity coefficient

แปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอเป็นข้อมูลแบบ binary โดยให้ตำแหน่งที่ปรากฏแถบ ดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 1 และที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจะมีค่าเท่ากับ 0 คำนวณหาความสัมพันธ์ ของแถบดีเอ็นเอในรูปแบบ Similarity coefficient (Nei and Li, 1976) จากสมการ

$$\text{Similarity coefficient, } F = 2X_{1,2} / X_1 + X_2$$

โดยที่ $X_{1,2}$ คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันระหว่างชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2

X_1 คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีทั้งหมดในชนิดที่ 1

X_2 คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีทั้งหมดในชนิดที่ 2

วิเคราะห์การจัดกลุ่ม (Cluster analysis)

1. นำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยวิธี UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic average) (Sneath and Sokal, 1973) จากโปรแกรม NTSYS version 2.0

2. นำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนผังการกระจายตัวและการรวมกลุ่ม โดยใช้วิธี PCA (Principal Component Analysis)

คำนวณหาค่า Polymorphic Information Content (PIC)

$$\text{จากสูตร } H = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2$$

โดย H คือ ค่า PIC เป็นค่าที่บอกถึงโอกาสที่เลือกแบบสุ่มสองตัวอย่างมีรูปแบบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphism)

Pi คือ ความถี่ของแอลลีลที่ i ซึ่ง Pi ประกอบด้วย Pa (absent allele) และ Pp (present allele)

i, k คือ จำนวนตัวอย่าง