



วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เชื่อมโยงกับลักษณะเพศของ *Cycas* และ *Zamia* บางชนิด  
โดยใช้เทคนิค RAPD และ MSAP กับการประยุกต์ใช้ Bulk segregant analysis

Identification of molecular markers linked to sex determination in some *Cycas* and *Zamia*  
using RAPD and MSAP with modified Bulk segregant analysis

โดย

นายฐิติ กาญจนเกตุ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)  
พ.ศ. 2549

ISBN 974-16-1359-8

ฐิติ กาญจนเกตุ 2549: การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้บ่งชี้ลักษณะเพศของ *Cycas* และ *Zamia* บางชนิดโดยใช้เทคนิค RAPD และ MSAP กับการประยุกต์ใช้ Bulk segregant analysis ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ ภาชานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์นิตยศรี แสงเดือน, Ph.D. 97 หน้า

ISBN 974-16-1359-8

การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้บ่งชี้ลักษณะเพศของปรังสกุล *Cycas* 6 ชนิดและสกุล *Zamia* 6 ชนิด โดยใช้เทคนิค RAPD และ MSAP ร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคนิค Bulk segregant analysis จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 216 ชนิดพบว่ามียไพรเมอร์ 38 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดี ผลการวิเคราะห์ปรังแต่ละตัวอย่าง (individual) ได้แถบดีเอ็นเอ 386 แถบ ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศในปรังบางชนิด และจำเพาะต่อปรังแต่ละสกุล แถบดีเอ็นเอเหล่านี้ไม่มีแถบใดจำเพาะต่อเพศของปรังทุกชนิดและไม่มีไพรเมอร์ที่สามารถระบุเพศได้ในปรังทั้ง 12 พันธุ์ นำแถบดีเอ็นเอ 386 แถบนี้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc เวอร์ชัน 2.02i พบว่าสามารถจำแนกปรังทั้ง 2 สกุลออกจากกันได้อย่างชัดเจน การใช้เทคนิค pooled DNA analysis ร่วมกับเทคนิค RAPD ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากว่าการวิเคราะห์ปรังแยกแต่ละตัวอย่าง แต่ก็ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่สามารถบ่งชี้เพศในปรังได้เช่นกัน การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่ประยุกต์มาจากเทคนิค AFLP เพื่อใช้ตรวจสอบการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอที่เรียกว่า Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP) โดยใช้เอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* จากการศึกษาโดยใช้ไพรเมอร์ 7 คู่ ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 364 แถบ ซึ่งแถบดีเอ็นเอบางส่วนบ่งชี้ความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย จึงอาจเป็นไปได้ว่าการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอมีผลต่อระบบการกำหนดเพศในปรัง แต่ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์ข้อเสนอดังกล่าวต่อไป

ฐิติ กาญจนเกตุ  
ลายมือชื่อนิตยศรี

กนกพร 11/01/2549 28 / 11.11. / 2549  
ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Thiti Kanchanaketu 2006: Identification of molecular markers linked to sex determination in some *Cycas* and *Zamia* using RAPD and MSAP with modified Bulk segregant analysis. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Associate Professor Nitsri Sangduen, Ph.D. 97 pages.

ISBN 974-16-1359-8

Identification of molecular markers linked to sex in 6 *Cycas* and 6 *Zamia* species has been done using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and MSAP technique with modified bulk segregant analysis. 216 primers were used for screening and 38 primers producing clear bands were selected. 386 bands from individual sample analysis indicated sex-specificity in some cycads and genus-specificity also observed. However there was no sex-specific band for all cycad samples. Phylogenetic tree analysis using NTSYS-pc. version 2.02i. could identified *Cycas* and *Zamia* separately. When DNA pooled analysis were used with RAPD, more DNA bands were produced but still no sex-specific band in all samples was observed. Modification of AFLP technique using isochizomer enzyme (*MspI* and *HpaII*) called Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP) was carried out to access pattern of cytosine methylation in both sex of *Cycas* and *Zamia*. Using 7 pairs of primers, 364 bands with some sex-specific were produced. It is possible that sex in cycads may depend on DNA methylation events, but further study is required.

Thiti Kanchanaketu.

Student's signature

Nitsri Sangduen 28 / 03 / 06

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. นิตย์ศรี แสงเดือน ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ให้โอกาสในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้ และให้คำแนะนำที่มีประโยชน์ ตลอดจนสนับสนุนในด้านต่าง ๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ดำเนินไปได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณ ดร. วิภา หงษ์ตระกูล กรรมการวิชาเอก ที่ได้ถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์ด้านเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลให้กับข้าพเจ้า และเสนอแนะแนวทางการแก้ไขปัญหาดังกล่าว ตลอดช่วงการทำวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์กมลพรรณ นามวงศ์พรหม กรรมการวิชารอง และ รองศาสตราจารย์ ดร. วิทยา สุริยาภณานนท์ อาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ข้อเสนอแนะและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อารมย์ ศรีพิจิตต์ อาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช และ โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง ที่อนุเคราะห์อุปกรณ์บางส่วนในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณกัมพล ต้นสัจจา คุณปัทมา พักดีพิเศษ และ Mr. Anders J. Linstrom ตลอดจนเจ้าหน้าที่สวนนงนุช จังหวัดชลบุรี ทุกคน ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างปรงทั้งหมดในการทำวิทยานิพนธ์นี้และอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเป็นอย่างดี ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความรู้อบรมสั่งสอนและให้ข้อคิดต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ในการดำเนินชีวิต ขอขอบคุณพี่น้อง และเพื่อน ๆ ทุกคนสำหรับความช่วยเหลือ กำลังใจ และคำปรึกษาที่ดี ขอขอบคุณพี่น้องที่ห้องปฏิบัติการ MG 4511(4505 เดิม) ทุกคน สำหรับความรู้ เทคนิคต่าง ๆ คำปรึกษาและความเข้าใจที่มีให้กันเสมอมา

สุดท้ายข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ สำหรับความรัก ความเข้าใจ โอกาสทางการศึกษา และกำลังใจที่มีให้ข้าพเจ้าอย่างมากมาเสมอมา

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับโท-เอก จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2547

ฐิติ กาญจนเกตุ  
กุมภาพันธ์ 2549

## สารบัญ

## หน้า

สารบัญ.....	(1)
สารบัญตาราง.....	(2)
สารบัญภาพ.....	(3)
คำนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	3
การตรวจเอกสาร.....	4
ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับปรง.....	4
การกำหนดเพศของสิ่งมีชีวิต.....	10
การศึกษาเกี่ยวกับเพศของสิ่งมีชีวิตโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล.....	13
เทคนิค RAPD.....	19
การเติมหมู่เมธิลในลำดับนิวคลีโอไทด์.....	22
การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค MSAP.....	25
อุปกรณ์และวิธีการ.....	28
อุปกรณ์.....	28
วิธีการ.....	32
การเก็บตัวอย่างปรง.....	32
การสกัดดีเอ็นเอจากใบปรง.....	32
การรวมดีเอ็นเอ.....	33
การวิเคราะห์โดยเทคนิค RAPD.....	34
การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MSAP.....	39
ผลและการวิจารณ์ผลการทดลอง.....	46
การเตรียมดีเอ็นเอจากปรง.....	46
การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD.....	48
การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค MSAP.....	72
สรุป.....	86
เอกสารและสิ่งอ้างอิง.....	87

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	รูปแบบของเพศแบบต่าง ๆ ในพืช โดยพิจารณาจากดอก.....11
2	ตัวอย่างปรังที่ใช้ในการศึกษา.....28
3	องค์ประกอบและปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในเทคนิค RAPD.....34
4	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD..... 37
5	องค์ประกอบและปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อกับ adapter.....39
6	ลำดับเบสของ adapter ที่ใช้ในเทคนิค MSAP.....40
7	องค์ประกอบและปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยา Preselective amplification.....41
8	ลำดับเบสของ primer+3 ที่ใช้ในเทคนิค MSAP.....42
9	องค์ประกอบและปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยา Selective amplification.....42
10	ไพรเมอร์ 38 ชนิด ที่คัดเลือกมาทำ RAPD กับตัวอย่างปรังทั้ง 12 พันธุ์.....48
11	ลำดับเบสของไพรเมอร์ 20 ชนิดที่คัดเลือกมาวิเคราะห์ แบบ pooled DNA analysis.....65
12	คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MSAP.....72
13	รูปแบบของแถบดีเอ็นเอและจำนวนของรูปแบบจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ MSAP ของปรัง.....78
14	การประเมินรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลในปรังแต่ละเพศจากแถบ ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค MSAP.....79
15	จำนวนเครื่องหมาย MSAP ในปรังเพศผู้และเพศเมียที่แสดงการเติมหมู่เมธิล ให้ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง CCGG ในแต่ละแบบ.....81

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การจับระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ.....	20
2 จีโนมิกดีเอ็นเอของปรงสกุล <i>Cycas</i> .....	47
3 จีโนมิกดีเอ็นเอของปรงสกุล <i>Zamia</i> .....	47
4 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ OPA-11.....	52
5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ OPA-08.....	53
6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ OPF-15.....	54
7 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ OPK-16.....	55
8 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ OPA-07.....	56
9 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ AC-19.....	57
10 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ OPF-06.....	58
11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ OPD-06.....	59
12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ OPF-13.....	60
13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ OPB-08.....	61
14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ AH-02.....	62
15 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ AA-11.....	64
16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD ที่วิเคราะห์ร่วมกับ การรวมดีเอ็นเอ โดยไพรเมอร์ OPD-06, OPK-16 และ OPA-11.....	66
17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD ที่วิเคราะห์ร่วมกับ การรวมดีเอ็นเอ โดยไพรเมอร์ OPA-07, OPB-08, AB-11 และ OPF-15.....	67
18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD ที่วิเคราะห์ร่วมกับ การรวมดีเอ็นเอ โดยไพรเมอร์ OPA-01, U.B.C.09, OPF-06, AH-02 และ AI-12.....	67
19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD ที่วิเคราะห์ร่วมกับ การรวมดีเอ็นเอ โดยไพรเมอร์ OPF-03, AC-19, AC-10 และ AA-11.....	68
20 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD ที่วิเคราะห์ร่วมกับ การรวมดีเอ็นเอ โดยไพรเมอร์ AC-05, OPX-05, OPI-14 และ OPA-09.....	68

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
21	Phylogenetic tree ของปรังทั้ง 12 ชนิด สร้างจากแถบดีเอ็นเอ 386 แถบ จากเทคนิค RAPD โดยโปรแกรม NTSYSpc เวอร์ชัน 2.02i.....70
22	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค MSAP โดยคู่ไพรมอร์ E+ACG กับ HM+TTC และ E+ACT กับ HM+TAA.....74
23	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค MSAP โดยคู่ไพรมอร์ E+ACG กับ HM+TAA.....75
24	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค MSAP โดยคู่ไพรมอร์ E+AGT กับ HM+TAA และ E+ACT กับ HM+TTC.....76
25	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค MSAP โดยคู่ไพรมอร์ E+AGT กับ HM+TTC และ E+AAC กับ HM+TAA.....77
26	ความสามารถของเอนไซม์ <i>MspI</i> และ <i>HpaII</i> ในการตัดดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่งจดจำการเติมหมู่เมทิลแบบ full methylation of both cytosine เปรียบเทียบกับไม่มีการเติมหมู่เมทิล.....83
27	ความสามารถของเอนไซม์ <i>MspI</i> และ <i>HpaII</i> ในการตัดดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่งจดจำการเติมหมู่เมทิลแบบ full methylation of the internal cytosine เปรียบเทียบกับการเติมหมู่เมทิลแบบ hemi-methylation at the external cytosine .....84

การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้บ่งชี้ลักษณะเพศของ *Cycas* และ *Zamia* บางชนิด  
โดยใช้เทคนิค RAPD และ MSAP กับการประยุกต์ใช้ Bulk segregant analysis

Identification of molecular markers linked to sex determination in some *Cycas*  
and *Zamia* using RAPD and MSAP with modified Bulk segregant analysis

คำนำ

ปรง (cycads) เป็นพืชที่มีโคนแยกเพศต่างต้น มีเมล็ดแต่ไม่มีดอก จัดเป็นพืชโบราณ พบกำเนิดตั้งแต่ยุค Paleozoic มีความทนทานต่อสภาวะแห้งแล้งได้เป็นอย่างดี ปัจจุบันพบปรากฏทั่วโลกเพียงประมาณ 290 ชนิด และมีการนำปรงหลายสกุลมาใช้ในการประดับตกแต่งสวน เนื่องจากมีโครงสร้างที่สวยงามและดูแลรักษาไม่ยากนักเพราะปรงจัดเป็นพืชที่ทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี ปรงสามารถนำมาใช้เป็นยาหรือเป็นอาหาร จึงจัดว่าเป็นพืชที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจอยู่ในระดับหนึ่ง นอกจากนี้ปรงยังสามารถตรึงแก๊สไนโตรเจนในบรรยากาศ ช่วยให้คุณภาพของดินดีอีกด้วย ในการคัดแยกปรงเพื่อการผสมเกสรหรือการปรับปรุงพันธุ์กระทำได้อย่างมีประสิทธิภาพนอกของปรงทั้ง 2 เพศคล้ายกันมาก การจำแนกปรงเพศผู้และเพศเมียต้องสังเกตจากลักษณะของโคน (cone) ซึ่งเป็นลักษณะภายนอกเพียงลักษณะเดียวที่แตกต่างกัน แต่การเกิดโคนนั้นก็ไม่ได้เกิดตลอดปีและปรงจะสร้างโคนก็ต่อเมื่อเจริญเต็มวัยแล้วเท่านั้นซึ่งใช้ระยะเวลาค่อนข้างมากตั้งแต่ 3-5 ปี หรืออาจจะมากกว่า 10 ปี แตกต่างไปตามชนิดและความสมบูรณ์ของแต่ละพื้นที่ ทำให้ต้องใช้เวลานานในการตรวจสอบเพศของปรงจากโคน โดยธรรมชาติแล้ว ปรงเพศผู้ 1 ต้นที่สร้างโคนจะมีเรณูจำนวนมากสามารถผสมกับปรงเพศเมียได้จำนวนมาก ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงรวมถึงการปรับปรุงพันธุ์ปรงจึงต้องการปรงเพศเมียในปริมาณมากกว่าปรงเพศผู้ หากสามารถตรวจสอบเพศได้ตั้งแต่ระยะที่เป็นต้นอ่อนจะช่วยให้การคัดเลือกเพศและสามารถเตรียมต้นปรงเพศผู้เพศเมียได้รวดเร็วและตรงตามความต้องการ จึงมีความพยายามในการแยกเพศของปรงโดยวิธีอื่น เช่น การแยกเพศปรงจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการ และวิธีการทางพันธุศาสตร์ของเซลล์ ซึ่งพบว่าสามารถแยกเพศของปรงได้ในปรงบางชนิด แต่ปรงบางชนิดยังไม่พบความแตกต่างในระดับโครโมโซมที่ศึกษา จำเป็นต้องหาข้อมูลที่ลึกซึ้งมากยิ่งขึ้น ปัจจุบันเทคนิคทางโมเลกุลมีบทบาทสำคัญในการวิจัยหลาย ๆ ด้าน จึงน่าจะนำเทคนิคโมเลกุลหรือใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) มาตรวจสอบเพศของปรงตั้งแต่เป็นต้นอ่อน เพื่อประโยชน์ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์

รวมถึงการเก็บรักษาเพื่ออนุรักษ์พันธุ์ปรง นอกจากนี้ยังนำไปสู่การศึกษาต่อถึงกลไกการกำหนดเพศของปรงต่อไป

ในงานวิจัยนี้ เป็นการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถใช้ระบุเพศของปรง 2 สกุล คือ *Cycas* และ *Zamia* โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดหนึ่ง สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย และไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มากนัก โดยประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค Bulked segregant analysis เพื่อปรับให้พื้นฐานพันธุกรรมอยู่ในระดับเดียวกัน ทำให้สามารถระบุแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ได้ชัดเจนมากขึ้น และใช้เทคนิค MSAP (Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism) ซึ่งเป็นการประยุกต์เทคนิค AFLP เพื่อใช้ตรวจสอบรูปแบบของการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอของปรงแต่ละเพศ ผลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีประสิทธิภาพในการระบุเพศของปรง เมื่อสามารถระบุเพศของปรงตั้งแต่เป็นต้นอ่อนจะสามารถบอกได้ว่าลูกผสมที่ได้เป็นเพศใด เพื่อจะคัดเลือกต้นปรงที่มีเพศตามต้องการ ไร่ปลูกต่อไป รวมถึงการวางแผนผสมพันธุ์เพื่อสนับสนุนงานขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ปรงให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น การทราบเพศของปรงยังช่วยในงานด้านการอนุรักษ์พันธุ์ปรงซึ่งปัจจุบันจำนวนปรงได้ลดลงอย่างมากอีกด้วย นอกจากนี้ข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการศึกษาระบบการกำหนดเพศในพืชเมล็ดเปลือย เช่น ปรง รวมถึงกระบวนการเกิดเพศที่แยกกัน (dioecy) ในสิ่งมีชีวิต ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาในขั้นสูงต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะต่อเพศของปรังบางชนิด โดยใช้เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคนิค Bulk segregant analysis
2. เพื่อศึกษารูปแบบของการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอของปรังแต่ละเพศโดยใช้เทคนิค MSAP (Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism)

## การตรวจเอกสาร

### 1. ข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับปรง

ปรงเป็นพืชในกลุ่มที่เรียกว่า gymnosperm ซึ่งคำนี้มีรากศัพท์มาจากคำว่า gymnos แปลว่า เปลือย และคำว่า sperm ที่หมายถึงเมล็ด นั่นคือพืชในกลุ่มนี้มีเมล็ด แต่ไม่มีรังไข่ห่อหุ้ม (naked ovules) บางครั้งอาจเรียกว่าพืชเมล็ดเปลือย พืชในกลุ่มนี้จัดอยู่ในชั้น (class) Gymnospermae ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 7 อันดับ (order) ได้แก่ Cycadofilicales (พืชพวก seed fern) Bennettitales (พืชพวก fossil cycads) Cordaitales (fossils) Cycadales (พืชพวกปรง) Ginkgoales (พืชพวกแปะก๊วย) Coniferales (พืชพวกสน) และ Gnetales (พืชพวกมะเมื่อย) ซึ่งพืชใน 3 อันดับแรกปัจจุบันสูญพันธุ์ไปหมดแล้ว และในบางอันดับเช่น Ginkgoales ปัจจุบันเหลือเพียงชนิดเดียวคือ *Ginkgo biloba* (อักษร, 2521; ณพพร, 2530; กิตติมา, 2534) สำหรับปรงนั้นพบกำเนิดครั้งแรกตั้งแต่ยุค Permian หรือเมื่อประมาณ 280 ล้านปีก่อน ซึ่งในยุคนี้มีการเปลี่ยนแปลงของโลกมาก สัตว์หลายชนิดสูญพันธุ์ไปในยุคนี้ จะเห็นได้ว่าปรงถือเป็นสิ่งมีชีวิตที่กำเนิดในช่วงแรก ๆ ของโลกเลยทีเดียว และในช่วงมหายุค Mesozoic พืชพวก seed fern เริ่มสูญพันธุ์ ขณะที่ปรงมีการแพร่กระจายเป็นอย่างมาก และกลายเป็นอาหารของไดโนเสาร์ จึงอาจกล่าวได้ว่าในยุคนี้มันได้เป็นแคบुकของไดโนเสาร์แต่ยังเป็นยุคของปรงด้วย (Brenner *et al.*, 2003b) ปรงและพืชกลุ่ม gymnosperm นี้มีความสำคัญในการศึกษาเกี่ยวกับวิวัฒนาการของพืชมีดอก (angiosperm) ซึ่งพบกำเนิดภายหลังในยุค Jurassic หรือเมื่อ 181 ล้านปีก่อน

ปรงมีชื่อเรียกทั่วไปในภาษาอังกฤษว่า cycads ในปี ค.ศ. 1737 Linnaeus ได้ตั้งชื่อเรียกสำหรับปรงสกุลหนึ่งว่า *Cycas* อันมีรากศัพท์มาจากภาษากรีกว่า *koikos* ซึ่ง Theophrastus เคยใช้เรียก doum palm ของอียิปต์ (*Hyphaene thebaica*) แต่ Linnaeus จัดปรงอยู่ในพืชกลุ่มเดียวกับปาล์ม จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1827 Robert Brown พบว่าปรงเป็นพืชเมล็ดเปลือย และแตกต่างจากพวกปาล์ม ต่อมาในช่วงปี ค.ศ. 1831-1840 Lindley และ Endlicher ได้ตั้งชื่อวงศ์ (family) Cycadaceae ขึ้นแต่ก็ยังคงมีความสับสนในการจัดอนุกรมวิธานของปรงอยู่ จนในปี ค.ศ. 1898 Van Tieghem ได้จัดปรงอยู่ในพืชกลุ่มเมล็ดเปลือย (Nostog and Nicholls, 1997)

ปรังนั้นถูกเรียกว่าเป็น living fossil ซึ่งหมายความว่าปรังมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในช่วงหลายล้านปี แต่ถ้าเทียบกับพืชในกลุ่มเดียวกันแล้วปรังถือว่าเป็นพืชที่มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, 2003) ปัจจุบันปรังหลายสกุลเช่น *Leptocyca*, *Bijuwa*, *Nilssonia* และ *Baewa* ได้สูญพันธุ์ไปหมดแล้ว สำหรับปรังในยุคปัจจุบันเหลืออยู่ประมาณ 290-300 ชนิดแบ่งเป็น 11 สกุล 3 วงศ์ คือ วงศ์ Cycadaceae ประกอบด้วยปรังสกุล *Cycas* เพียงสกุลเดียว พบบริเวณแถบตะวันออกเฉียงของทวีปแอฟริกา แถบประเทศอินโดจีน และประเทศออสเตรเลีย วงศ์ Stangeriaceae ประกอบด้วยปรังสกุล *Bowenia* พบได้แถบประเทศออสเตรเลีย และสกุล *Stangeria* ซึ่งพบมากในทวีปแอฟริกา วงศ์ Zamiaceae ซึ่งเป็นปรังที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากที่สุดโดยพบแม้กระทั่งความผันแปรของแคโรไทป์ภายในชนิด (Cafasso *et al.*, 2003) ประกอบด้วยปรังสกุล *Encephalartos*, *Macrozamia*, *Lepidozamia*, *Zamia*, *Ceratozamia*, *Dioon*, *Chigua* และ *Microcycas* ปรังในวงศ์นี้พบได้บริเวณทวีปอเมริกาเหนือ ยุโรป ออสเตรเลีย อเมริกาใต้ และแอนตาร์กติกา (Donaldson, 2003)

เมื่อจัดปรังทั้ง 11 สกุลตามลำดับอนุกรมวิธานจะสามารถจัดได้ดังนี้ (Nostog and Nicholls, 1997)

#### Order Cycadales

##### Suborder Cycadineae

##### Family Cycadaceae

##### *Cycas*

##### Suborder Zamiineae

##### Family Stangeriaceae

##### Subfamily Stangerioideae

##### *Stangeria*

##### Subfamily Bowenioideae

##### *Bowenia*

##### Family Zamiaceae

##### Subfamily Encephalartoideae

##### Tribe Diooae

*Dioon*

Tribe Encephalarteae

Subtribe Encephalartinae

*Encephalartos*

Subtribe Macrozamiinae

*Macrozamia**Lepidozamia*

Subfamily Zamiadeae

Tribe Ceratozamiaceae

*Ceratozamia*

Subtribe Microcycadinae

*Microcycas*

Subtribe Zamiinae

*Zamia**Chigule*

โดยทั่วไปปรงมีใบแบบขนนก (pinnately compound leaf) ปรงบางสกุลจะมีใบที่มีลักษณะแข็งและหนาค้ำกับปาล์ม บางสกุลใบจะอ่อนบางคล้ายเฟิร์นบางชนิด โดยที่ใบของปรงจะรวมกันอยู่ที่ปลายยอดสุดของต้นเรียกว่า เรือนยอด (crown) ลำต้นของปรงจะไม่มีการแตกกิ่งก้าน มักฝังลึกลงใต้ดิน (tuber) มีลักษณะเป็นข้อสั้น ๆ รูปร่างคล้ายทรงกระบอกบางส่วนเจริญขึ้นมาเหนือดิน การที่ลำต้นของปรงมีขนาดเล็กและอยู่ใต้ดินก็เพื่อที่จะสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแห้งแล้งหรือไฟป่าได้ดี รากของปรงมี 3 ระบบ คือ 1) ระบบรากแก้ว (tap root system) มีหน้าที่ลำเลียงน้ำและอาหาร 2) Coralloid root เป็นรากพิเศษที่มีสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินอาศัยอยู่ร่วมกันแบบภาวะพึ่งพา (symbiosis) ทำให้สามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ 3) Adventitious root พบเฉพาะในสกุล *Cycas* เจริญให้หน่อย่อย (bulbil) ปรงบางชนิดอาจมีลักษณะพิเศษ เช่น *Zamia vazquezii* ใบจะคล้ายใบเฟิร์นมาก *Zamia pseudoparasitica* ซึ่งพบตามป่าดิบชื้นแถบประเทศปานามา จะดำรงชีวิตแบบปรสิต โดยอาศัยอยู่บนต้นไม้ใหญ่ ปรงส่วนมากจะเป็นพืชทนแล้ง (xerophyte) ทำให้สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่แห้งแล้ง จึงอาจพบหนามในปรงหลายชนิด อย่างไรก็ตามปรงบางชนิด เช่น *Zamia pumila* และปรงสกุล *Ceratozamia* มักจะเจริญเติบโตได้ดีใน

ที่ที่มีร่มเงาและมีความชื้น นอกจากนี้ปรงทุกชนิดจะมี contractile root โดยเฉพาะในช่วงที่ยังเป็นต้นอ่อน เพื่อให้เอื้อต่อการเจริญลงไปดิน (Nostog and Nicholls, 1997; Jones, 1998)

ปรงทุกชนิดเป็นพืชที่มีเพศผู้เพศเมียต่างต้น (dioecious) เดิมเชื่อว่าปรงอาศัยลมในการขยายพันธุ์ แต่จากการศึกษาพบว่าปรงผสมเกสรโดยใช้แมลงเป็นพาหะโดยเฉพาะด้วงและแมลงปีกแข็งอื่น ๆ การสืบพันธุ์ของปรงจะเกิดขึ้นเมื่อมีการสร้างโคน (cone) ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งชี้เพศของปรง ทั้งนี้โคนเพศผู้มักมีการสร้างในปริมาณต่อต้นมากกว่าโคนเพศเมีย โดยทั่วไปโคนของปรงจะเกิดจากสปอโรฟิลล์ของเพศผู้และเพศเมียเรียงตัวกันแน่น ยกเว้นในปรงสกุล *Cycas* ซึ่งใบสร้างอับเมกะสปอร์ (megasporophyll) จะเรียงตัวกันหลวม ๆ ไม่แน่นเป็นโคน ขนาดของโคนในปรงมีหลากหลายตั้งแต่ 2 ซม. จนถึง 80-100 ซม. โคนเพศเมียที่เจริญเต็มที่ของ *Dioon spinulosum* มีขนาดประมาณ 61 ซม. และหนักประมาณ 28 กก. กระบวนการสร้างความร้อน (thermogenesis) เป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นกับโคนของปรงประมาณ 42 ชนิด การสร้างความร้อนนี้จะวนเวียนเป็นวัฏจักร โดยความร้อนและความคงทนของความร้อนจะแปรผันตรงกับขนาดของโคน จากการศึกษาพบว่าโคนเพศผู้มีปริมาณแป้งมากกว่า ซึ่งอาจทำให้พลังงานความร้อนที่มากกว่า นอกจากนี้โคนของปรงแต่ละชนิดก็จะมีกลิ่นที่แตกต่างกันออกไปบ้างก็หอมบ้างก็เหม็นอับ การสร้างความร้อนจะช่วยทำให้กลิ่นระเหยออกไปได้ดีขึ้นเพื่อดึงดูดความสนใจของแมลงให้มาช่วยผสมเกสร (Biswas and Johri, 1997; Nostog and Nicholls, 1997; Jones, 1998) อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบการกลับเพศในปรง ซึ่งมักพบจากการกลับไปสำรวจซ้ำในปรงตามธรรมชาติที่ทราบเพศอยู่เดิม พบการกลับเพศในปรงสกุล *Cycas*, *Encephalartos*, *Stangeria* และ *Zamia* รวมกันมากกว่า 33 กรณี แต่พบได้น้อยและเป็นเหตุการณ์ที่ไม่ปกตินัก สาเหตุที่มีการกลับเพศอาจเกิดจากการย้ายที่ปลูกหรือการเปลี่ยนแปลงของธรรมชาติอย่างมาก ในปรง *Encephalartos woodii* มักพบแต่เพศผู้เท่านั้นที่หลงเหลืออยู่ทั้งในธรรมชาติและในสวนพฤกษศาสตร์ต่าง ๆ ยังไม่พบว่ามี การกลับเพศเกิดขึ้นจึงมีความเสี่ยงในการสูญพันธุ์สูง (Nostog and Nicholls, 1997) เนื่องจากปรงเป็นพืชที่เจริญเติบโตช้า กว่าที่ปรงจะเจริญเต็มวัยและสร้างโคนจึงใช้ระยะเวลาค่อนข้างยาวนาน เช่น ปรงสกุล *Zamia* จะใช้เวลา 2-3 ปี ปรงสกุล *Cycas* อาจนานถึง 5 ปี โดยเฉพาะปรงสกุล *Encephalartos*, *Dioon* อาจนานถึง 10-12 ปี ทำให้ไม่สามารถแยกเพศของปรงได้ จึงมีผู้ศึกษาวิธีแยกเพศของปรงนอกจากการสังเกตโคน เช่น Sanchez-Tinoco *et al.* (1993) ศึกษาความแตกต่างระหว่างเพศของปรง *Ceratozamia mexicana* จากก้านใบ การศึกษาทางพันธุศาสตร์ของเซลล์ในปรง *Cycas revoluta* และ *C. circinalis* โดย Shetty and Subramanyan (1962) พบ heteromorphic chromosome ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศ เช่นเดียวกับ Abraham and Matthew (1962) ศึกษาปรงสกุล *Cycas*

พบว่าในปรังเพศผู้จะประกอบด้วยโครโมโซมที่มี satellite 1 satellite ขณะที่ปรังเพศเมียโครโมโซม ทั้ง 2 โครโมโซมจะพบ satellite 2 satellite อย่างไรก็ตามจากการศึกษาดังกล่าวยังไม่สามารถใช้ระบุ เพศของปรังได้อย่างชัดเจน (Nostog and Nicholls, 1997) ต่อมา เมธานี (2546) ได้ศึกษาโครโมโซม ของปรังสกุล *Cycas* 5 ชนิดและ สกุล *Zamia* 6 ชนิด พบว่าปรังสกุล *Cycas* ทั้ง 5 ชนิดที่ศึกษามี จำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ  $2n=2x=22$  ส่วนปรังสกุล *Zamia* มีจำนวนโครโมโซมหลากหลาย ตั้งแต่  $2n=2x=16$  จนถึง  $2n=2x=24$  เมื่อพิจารณา satellite บนโครโมโซม พบว่ามีความแตกต่างของ จำนวน satellite ระหว่างเพศในปรังสกุล *Cycas* ทั้ง 5 ชนิดคือ *Cycas clivicola*, *C. edentata*, *C. pectinata*, *C. siamensis* และ *C. tansachana* รวมถึงปรังสกุล *Zamia* อีก 1 ชนิดคือ *Zamia pumila* ในขณะที่ *Zamia muricata* พบจำนวนโครโมโซมในเพศผู้และเพศเมียไม่เท่ากัน ในเพศผู้ พบว่ามี  $2n=2x=23$  แต่เพศเมียมี  $2n=2x=24$  *Zamia pygmaea* และ *Zamia vazquezii* ทั้งสองเพศมี จำนวน satellite บนโครโมโซมเท่ากัน ส่วน *Zamia herrerae*, *Zamia integrifolia* และ *Zamia monticola* ไม่ปรากฏ satellite บนโครโมโซมและไม่พบความแตกต่างใด ๆ ในแคโรไทป์ของทั้ง 2 เพศ

นอกจากการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ของเซลล์แล้ว ก็ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับเพศของปรัง โดยวิธีการทางโมเลกุลเช่นกัน สจี (2547) ศึกษาความแตกต่างระหว่างเพศของปรังสกุล *Cycas* 6 ชนิด และ *Zamia* 8 ชนิด โดยใช้เทคนิค AFLP จากการทดสอบโดยใช้ 64 คู่ไพรเมอร์พบว่ามี 10 คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนจึงนำมาศึกษาความแตกต่างระหว่างเพศ พบแถบดีเอ็นเอที่ จำเพาะกับปรังแต่ละสกุล และพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับปรังบางชนิด เช่น คู่ไพรเมอร์ E-AAC และ M-CTA ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,750 คู่เบสในเพศผู้ของ *Z. loddigesii*, *Z. inermis* และให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,750 คู่เบส ในเพศผู้ของ *C. chamoensis*, *C. elephantipes*, *Z. loddigesii* และ *Z. herraea* คู่ไพรเมอร์ E-ACA กับ M-CTG ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 คู่เบสที่จำเพาะในเพศ เมียของ *C. edentata* และ *Z. inermis* เป็นต้น อย่างไรก็ตาม 8 คู่ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างระหว่าง เพศในตัวอย่างปรังบางชนิดนั้นยังไม่สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศผู้หรือเพศเมียในปรัง ทุกชนิดได้ เมื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค AFLP มาวิเคราะห์แบบจัดกลุ่มโดยใช้ UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean) และ PCA (Principle Component Analysis) สามารถจัดปรังในกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 4 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นปรังสกุล *Cycas* กลุ่มที่ 2 เป็นปรังสกุล *Zamia* ที่มีโครโมโซมเท่ากับ 16 โครโมโซม กลุ่มที่ 3 เป็นปรังสกุล *Zamia* ที่มีจำนวน โครโมโซมมากกว่า 16 โครโมโซม และกลุ่มที่ 4 เป็นปรังสกุล *Zamia* ที่มีโครโมโซมแบบอนิว- พลอยดิย์ Zhang et al. (2002) ค้นพบยีน *Fortune-1 (Ft-1)* ซึ่งคาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับเพศในปรัง

*Cycas edentata* โดย cDNA ของยีน *Ft-1* นี้ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 593 คู่เบส มี open reading frame 223 คู่เบส และแปลรหัสได้ลำดับกรดแอมิโน 77 residues เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยวิธี *in situ hybridization* พบว่ายีน *Ft-1* มีการแสดงออกมากในโคนเพศผู้และใบสร้างอับไมโครสปอร์ (microsporophyll) ส่วนในใบสร้างอับเมกะสปอร์ ราก ลำต้น แทะไม่พบการแสดงออกของยีนนี้เลย ผลจากการทำ BlastX พบว่ายีน *Ft-1* ไม่มีความคล้ายคลึงกับยีนใดในฐานข้อมูลเลย จึงคาดว่า ยีน *Ft-1* น่าจะเป็นยีนใหม่ (novel gene)

เป็นที่น่าเสียดายว่างานวิจัยเกี่ยวกับปรอง รวมถึงข้อมูลของปรองในด้านต่าง ๆ ยังมีอยู่น้อยมาก ทำให้เรายังไม่ทราบรายละเอียดของพืชโบราณเช่นปรองมากนัก ทั้งที่การศึกษาวิวัฒนาการของพืชโบราณเช่นปรองนั้นสามารถทำให้เราเข้าใจและสามารถตอบคำถาม 2 ข้อหลัก ๆ คือ พวกพืชที่มีเมล็ด (spermatophyte) เกิดขึ้นมาได้อย่างไร และพืชมีดอก (angiosperm) ถือกำเนิดบนโลกได้อย่างไร และทำไมถึงแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว การศึกษาปรองจะช่วยให้เข้าใจถึงวิวัฒนาการของพืชได้เป็นอย่างดี (Brenner *et al.*, 2003b) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบสารพิษในปรองมาก เป็นที่ทราบกันดีว่าปรองเป็นแหล่งของสารทุติยภูมิ (secondary compound) ซึ่งบางชนิดก็เป็นพิษ โดยในปี ค.ศ. 1963 Marjorie Whiting เป็นบุคคลแรกที่เสนอว่าปรองอาจเป็นสาเหตุของโรค Guam's dementia การศึกษาในเวลาต่อมาพบสารประกอบที่เป็นพิษต่อระบบประสาทที่เรียกว่า BMAA (beta-methylamino-L-alanine) ซึ่งปรองเป็นพืชชนิดเดียวที่มีการสร้างสารชนิดนี้ สารชนิดนี้จะส่งผลโดยตรงต่อระบบประสาทและเป็นสาเหตุของโรค Guam's dementia จากการศึกษายังพบสารอื่นๆ อีก เช่น cycasin และ macrozamin สารกลุ่มนี้พบในปรองแทบทุกชนิด โดยปกติแล้วสารพวกนี้จะไม่มีความเป็นพิษแต่เมื่อใดที่ถูกดูดซึมในลำไส้ สารพวกนี้จะถูกไฮโดรไลซ์เป็น MAM (Methylazoxymethanol) ซึ่งมีสภาพเป็นพิษ นอกจาก BMAA และ MAM แล้วยังมีสารกลุ่ม sterol beta-D-glucoside ที่มีความเป็นพิษ อย่างไรก็ตาม BMAA เป็นสารที่มีการศึกษามากที่สุด มีผู้ศึกษาถึงบทบาทของ BMAA ในพืช พบว่า BMAA ในความเข้มข้นต่ำ ๆ สามารถชักนำให้ต้นอ่อนใต้ใบเลี้ยง (hypocotyls) ของ *Arabidopsis* ยาวกว่าเดิม 2-3 เท่า เมื่อปลูกในที่ที่มีแสง จึงคาดว่ากลูตาเมต และ BMAA อาจมีบทบาทในกระบวนการ signal transduction ของ *Arabidopsis* อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาต่อไปถึงบทบาทหน้าที่ที่แท้จริงของ BMAA ในปรอง (Nostog and Nicholls, 1997; Brenner *et al.*, 2003b)

ปรองมีความสัมพันธ์กับมนุษย์มาอย่างยาวนาน มนุษย์ใช้พืชตระกูลปรองเพื่อวัตถุประสงค์ต่าง ๆ มากมาย เช่น ในเม็กซิโก และ แอฟริกาใต้ใช้ปรองประดับในงานเฉลิมฉลอง จนแพร่ในเมือง

แถบเอเชียและในแอฟริกาใช้ส่วนของ ใบ ราก ลำต้น และเมล็ดเป็นอาหาร นอกจากนี้รากและลำต้นของปรังยังใช้เป็นยาได้ ใบปรังสามารถนำมาสานเป็นตระกร้า ส่วนในภาคอุตสาหกรรมใช้ปรังในการผลิตแป้ง ในช่วงประมาณปี ค.ศ. 1900 ประเทศสหรัฐอเมริกามีโรงงานผลิตแป้งจากปรัง *Zamia integrifolia* เป็นจำนวนมาก ให้ผลผลิตแป้ง 24,000 ปอนด์ต่อสัปดาห์ และต้องการต้นปรังดังกล่าว 8,000-12,000 ต้นต่อสัปดาห์ จึงนับว่าปรังมีบทบาทสำคัญทางเศรษฐกิจในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตามจากการที่ปรังลดจำนวนลงอย่างมากทำให้อุตสาหกรรมนี้ล้มละลายลงไปใน ค.ศ.1925 ขณะที่ประเทศออสเตรเลียใช้ปรัง *Macrozamia communis* ในอุตสาหกรรมการผลิตแป้งแต่อุตสาหกรรมนี้ก็ล้มละลายในเวลาต่อมาเช่นกัน ปรังยังมีความสำคัญทางเศรษฐกิจในด้านการเป็นไม้ประดับ ในช่วงปี ค.ศ. 1977 - 2001 มีการค้าขายปรังมากกว่า 30 ล้านต้น แต่อันที่จริงแล้วมีการใช้ปรังเป็นไม้ประดับในหลายพื้นที่ของทวีปเอเชีย เช่น จีนและญี่ปุ่นมานานแล้ว โดยปรังที่ได้รับความนิยมมากชนิดหนึ่งคือ *Cycas revoluta* พอถึงช่วงศตวรรษที่ 20 ความนิยมในการใช้ปรังในการตกแต่งสวนเริ่มแพร่หลายจากทวีปเอเชีย สู่ทวีปแอฟริกา อเมริกา ออสเตรเลีย หลายพื้นที่ของยุโรป และเป็นที่นิยมทั่วโลกในปัจจุบัน (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, 2003)

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับจีโนมของสิ่งมีชีวิตหลาย ๆ ชนิด สำหรับปรังเองก็มีการศึกษาเช่นกัน โดย New York Botanical Garden ศึกษาจีโนมของพืชเมล็ดเปลือยโดยเฉพาะปรัง เนื่องจากปรังเป็นพืชมีเมล็ดที่เก่าแก่ที่สุด การศึกษาจีโนมของปรังจะทำให้ทราบถึงโครงสร้างและหน้าที่ของยีนต่าง ๆ ในพืชมีเมล็ดซึ่งมีกำเนิดมายาวนานเปรียบเทียบกับพืชดอกสมัยใหม่ จากการศึกษา Expressed sequence tags (ESTs) จากปรัง *Cycas rumphii* พบว่าจาก 4,200 EST สามารถจัดได้เป็น 2,458 contig ซึ่ง 1,718 contig มีความเหมือนกับพืชดอก ขณะที่ 1,310 contig มีความเหมือนกับยีนของพืชเมล็ดเปลือยอื่น ๆ และ 734 contig มีความเหมือนกับพืชที่ไม่มีเมล็ด (Brenner *et al.*, 2003a)

## 2. การกำหนดเพศของสิ่งมีชีวิต (Sex determination)

การที่สิ่งมีชีวิตใด ๆ จะสามารถสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศได้นั้น สิ่งมีชีวิตนั้นจะต้องมีเพศซึ่งรูปแบบของเพศก็จะแตกต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่น มนุษย์ (*Homo sapiens*) มี 2 เพศคือ เพศชายและเพศหญิง ในสัตว์บางชนิด เช่น ไม้เตียน อาจมี 2 เพศในตัวเดียวกัน กล่าวคือในแต่ละสิ่งมีชีวิตก็จะมีรูปแบบของเพศที่แตกต่างกันไป สำหรับในพืชก็เช่นกัน เพศของพืชนั้นอาจแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ (ตารางที่ 1) คือ sexually monomorphic และ sexually polymorphic สิ่งมีชีวิตที่เป็น

ตารางที่ 1 รูปแบบของเพศแบบต่าง ๆ ในพืช โดยพิจารณาจากดอก

รูปแบบ	คำอธิบาย	ตัวอย่างพืชที่พบ
Sexually monomorphic		
- Hermaphrodite	ใน 1 ดอกมีทั้งเกสรเพศผู้และเพศเมีย	พืชดอกประมาณ 90 %
- Monoecious	ใน 1 ต้นมีทั้งดอกเพศผู้และดอกเพศเมีย	พืชดอกประมาณ 5 %
- Gynomonoecious	ใน 1 ต้นมีทั้งดอกเพศเมียและดอกสมบูรณ์เพศ	ดอกเคซี
- Andromonoecious	ใน 1 ต้นมีทั้งดอกเพศผู้และดอกสมบูรณ์เพศ	
Sexually polymorphic		
- Dioecious	ใน 1 ต้นมีดอกเพศผู้หรือดอกเพศเมีย	พืชดอกประมาณ 5 %
- Androdioecious	ใน 1 ต้นมีทั้งดอกเพศผู้หรือดอกสมบูรณ์เพศ	พบได้น้อยมาก

ที่มา: Charlesworth (2002)

sexually monomorphic จะมีรูปแบบของเพศเพียงแบบเดียว กล่าวคือแต่ละหน่วย (individual) จะมีเซลล์สืบพันธุ์ทั้ง 2 ชนิดซึ่งเพียงพอต่อการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแล้ว โดยไม่ต้องการเซลล์สืบพันธุ์จากหน่วยสิ่งมีชีวิตอื่นอีก ตัวอย่างในกลุ่มนี้ เช่น สิ่งมีชีวิตที่มีดอกแยกเพศร่วมต้น (monoecious) พวกนี้จะมีดอกเพศผู้และเพศเมียแยกกันแต่อยู่บนต้นเดียวกัน อีกตัวอย่างคือพวกสมบูรณ์เพศ (hermaphrodite) พวกนี้จะมีดอกที่มีทั้งเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียอยู่ในดอกเดียวกัน เรียกดอกแบบนี้ว่าดอกสมบูรณ์ (perfect flower) ส่วนพวก sexually polymorphic จะมีรูปแบบของเพศมากกว่า 1 แบบ กล่าวคือ พืชพวกนี้จะไม่สามารถผสมตัวเองได้ แต่ละหน่วยจะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้เพียง 1 ชนิดซึ่งไม่เพียงพอต่อการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแล้วจึงต้องการเซลล์สืบพันธุ์จากหน่วยสิ่งมีชีวิตอื่นอีก ตัวอย่างเห็นได้ชัดมากคือ พวกที่มีดอกแยกเพศต่างต้น (dioecious) ในแต่ละต้นจะมีดอกเพียงเพศเดียวเท่านั้น (Charlesworth and Guttman, 1999) พืชดอกประมาณ 90 % จะเป็นพวกสมบูรณ์เพศ (Ainsworth, 2000) ส่วนพืชเมล็ดเปลือยจะมีเพศต่างกันออกไป พวกสน (pines) จะเป็นพวกดอกแยกเพศร่วมต้น ส่วนพวกปรง (cycads) จะเป็นพวกดอกแยกเพศต่างต้น การเกิด dioecy เป็นสิ่งที่น่าสนใจมาก พืชพวกดอกแยกเพศต่างต้น จะมีกลไกการป้องกันการผสมตัวเองได้ ซึ่งต่างจากพวกดอกแยกเพศร่วมต้น นอกจากนี้ dioecy ยังถือว่าเป็นกลไกที่ป้องกัน deleterious effect ซึ่งเป็นผลมาจาก inbreeding และเมื่อไม่สามารถผสมตัวเองได้จึงทำให้เกิดความหลากหลายของ

สิ่งมีชีวิตมากขึ้น รวมถึงทำให้สามารถแพร่กระจายไปได้ในพื้นที่ที่ห่างไกล (Nostog and Nicholls, 1997; Ainsworth, 2000; Negrutiu *et. al.*, 2001)

นอกจากระบบเพศของสิ่งมีชีวิตจะมีความแตกต่างกันแล้ว กลไกการกำหนดเพศของสิ่งมีชีวิต (sex determination mechanism) ก็ยังมีความแตกต่างกันด้วย โดยการกำหนดเพศนั้นอาจขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมหรือพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต หรืออาจเกิดจาก 2 ปัจจัยร่วมกันก็ได้ สำหรับกลไกการกำหนดเพศของสิ่งมีชีวิตอาจกล่าวรวม ๆ ได้ว่ามี 5 รูปแบบหลัก ๆ คือ 1) กำหนดเพศโดยระบบโครโมโซม (sex chromosome mechanism) 2) Genic balance ตัวอย่างเช่นในแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) การกำหนดเพศจะขึ้นกับอัตราส่วนของโครโมโซม X ต่อโครโมโซมร่างกาย (autosome) ถ้าอัตราส่วนดังกล่าวเท่ากับ 1 แมลงหวี่ตัวนั้นจะเป็นเพศเมีย แต่ถ้าอัตราส่วนเป็น 0.5 แมลงหวี่จะเป็นเพศผู้ ในพืชก็มีตัวอย่างเช่นกัน มีการศึกษาโครโมโซมในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศของ *Melandrium* (Campion) พบว่าอัตราส่วนของโครโมโซม X ต่อ Y เป็นส่วนสำคัญในการกำหนดเพศ นั่นคือ ยีนที่อยู่บนโครโมโซมเพศจะแสดงลักษณะของเพศ ในการศึกษาพืชที่ฉายรังสีแล้วมีการขาดหายของ โครโมโซม X และ Y แสดงให้เห็นว่าโครโมโซม Y มียีนบางส่วนที่ยับยั้งการพัฒนาเป็นเพศเมียและชักนำให้พัฒนาเป็นเพศผู้ ขณะที่โครโมโซม X มีส่วนที่กระตุ้นให้มีการพัฒนาเป็นเพศเมีย (Winter, 1998) 3) ระบบ Haplodiploidy พบได้ในแมลงในอันดับ Hymenoptera เช่น ผึ้ง โดยผึ้งเพศผู้จะเกิดจากไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิจึงมีสภาพเป็นแฮพลอยด์ ส่วนเพศเมียจะพัฒนามาจากไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ โดยโครโมโซมเพศจะไม่มิตบาทในการกำหนดเพศแบบนี้เลย 4) ระบบการกำหนดเพศด้วยยีน เช่นในข้าวโพด การกำหนดเพศจะถูกควบคุมด้วยยีน 2 คู่ คือ  $ba/ba^+$  และ  $ts/ts^+$  ข้าวโพดที่มีจีโนไทป์  $ba/ba\ ts/ts$  จะเป็นต้นตัวเมียไม่มีดอกเพศผู้ ส่วนต้นที่มีจีโนไทป์  $ba/ba\ ts^+/ts^+$  จะเป็นต้นตัวผู้ แต่ถ้าเป็นต้นที่มีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียจะมีจีโนไทป์  $ba^+/ts^+$  5) การกำหนดเพศโดยอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม โดยเป็นผลจากปัจจัยทางกายภาพ เช่น ความร้อน แสง อุณหภูมิขณะพักไข่ เป็นต้น (สุภาพร, 2546; Elrod and Stansfield, 2002)

จากการศึกษาพบว่าพืชส่วนมากจะใช้ระบบโครโมโซมในการกำหนดเพศ อย่างไรก็ตาม ในพืชดอกซึ่งเป็นพวกสมบูรณเพศและมีดอกสมบูรณเพศจะไม่พบโครโมโซมเพศเลย (Ainsworth, 2000) ซึ่งโครโมโซมที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศจะเรียกว่า โครโมโซมเพศ (sex chromosome) ถ้าหากยีนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศอยู่บนคู่ของโครโมโซมที่มีลักษณะไม่แตกต่างกันจะเรียกว่า homomorphic sex chromosome หากโครโมโซมเพศสามารถจำแนกได้จาก

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเรียกว่า heteromorphic sex chromosome แต่ถ้าพบโครโมโซมเพศมากกว่า 2 รูปแบบใน 1 หน่วยสิ่งมีชีวิตจะเรียกว่า polymorphic sex chromosome ตัวอย่างเช่น sorrel (*Rumex acetosa*) เพศผู้จะมีโครโมโซมแบบ  $XY_1Y_2$  ส่วนเพศเมียจะเป็น XX และ *Humulus lupulus* var. *cordiflorus* เพศผู้จะมีโครโมโซมแบบ  $X_1X_2Y_1Y_2$  ส่วนเพศเมียจะเป็น  $X_1X_1X_2X_2$  (Vyskot and Hobza, 2004) ในปัจจุบันมีการศึกษาโครโมโซมในพืชที่มีดอกแยกเพศต่างต้นหลายชนิด ซึ่งพืชแต่ละชนิดก็จะมีระบบโครโมโซมที่แตกต่างกันไป การกำหนดเพศโดยโครโมโซมในพืชมีหลายรูปแบบดังนี้ 1) male heterogametic sex เพศผู้จะมีโครโมโซมเพศเป็น XY สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ 2 แบบ ส่วนเพศเมียจะมีโครโมโซมเพศเป็น XX เช่น *Humulus lupulus* และ *Rumex angiocarpus* 2) female heterogametic sex เพศเมียจะมีโครโมโซมเพศเป็น XY และ เพศผู้จะมีโครโมโซมเพศเป็น XX เช่น *Fragaria elatior* และ *Salix viminalis* 3) X-A system หรืออัตราส่วนระหว่างโครโมโซม X ต่อโครโมโซมร่างกาย เช่น *Cannabis sativa* และ *Rumex thyrsiflorus* 4) จำนวนโครโมโซมที่ไม่เท่ากันในแต่ละเพศ เช่น *Phoradendron flavescens* และ *P. villosum* ในต้นเพศผู้จะมีจำนวนโครโมโซมมากกว่าต้นเพศเมีย 5) ระบบ compound chromosome เช่น *Rumex acetosa* และ *Humulus japonicus* (Burnham, 1964; Vyskot and Hobza, 2004) นอกจากนี้ยังมีหลักฐานว่าการแสดงออกของเพศขึ้นอยู่กับอันตรกิริยา (interaction) ของฮอร์โมนหลายชนิดเช่น auxin, cytokinin, gibberellins ( $GA_3$ ) และ ethylene มีรายงานว่า  $GA_3$  สามารถชักนำให้เกิดเป็นเพศเมียได้ในข้าวโพด แต่ชักนำให้เกิดเพศผู้ในพวงที่มีดอกแยกเพศรวมต้นหลายชนิด ส่วน auxin และ ethylene มักชักนำให้เกิดเป็นเพศเมีย (Negrutiu and Sala, 1991)

### 3. การศึกษาเกี่ยวกับเพศของสิ่งมีชีวิตโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต หรือบ่งชี้ลักษณะที่แตกต่างบางประการระหว่างสิ่งมีชีวิต จำเป็นต้องมีสิ่งที่สามารถใช้จำแนกความแตกต่างดังกล่าวซึ่งก็คือ เครื่องหมาย (markers) เครื่องหมายที่ดีต้องมีความผันแปรทางพันธุกรรมสูง สามารถตรวจสอบและติดตามได้ง่ายในทุกชั่วรุ่น (อมรา, 2542; Grechko, 2002) เครื่องหมายอาจจำแนกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้ (สุรินทร์, 2545; Kumar, 1999)

### 3.1 เครื่องหมายสัณฐานวิทยา (Morphological markers)

เครื่องหมายชนิดนี้เป็นการจำแนกความแตกต่างที่พบจากลักษณะภายนอกที่ปรากฏ (phenotype) เช่น การเปรียบเทียบรูปร่างหรืออวัยวะต่าง ๆ ลักษณะที่ใช้เป็นเครื่องหมายมักควบคุมด้วยตำแหน่ง (locus) เดียวและมักเป็นลักษณะซึ่งสิ่งแวดล้อมไม่มีผลกระทบต่อการแสดงออกมากนัก อย่างไรก็ตามเครื่องหมายสัณฐานวิทยามีข้อจำกัดมาก เนื่องจากมีผลจากอันตรกิริยาของยีน ทำให้บางครั้งไม่สามารถจำแนกจีโนไทป์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัสออกจากโฮโมไซกัสได้ นอกจากนี้ลักษณะบางลักษณะอาจมีฟีโนไทป์ที่เหมือนหรือคล้ายกัน แต่มีจีโนไทป์ต่างกันทำให้อาจเกิดความผิดพลาดในการจำแนกได้ จึงมักใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นเครื่องหมายเบื้องต้นเท่านั้น

### 3.2 เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers) แบ่งได้เป็น 2 ระดับ

3.2.1 เครื่องหมายโปรตีน (Protein markers or Biochemical markers) เป็นรูปแบบของโปรตีน ซึ่งเป็นผลผลิตจากยีนที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น การศึกษา allozyme และ isozyme เครื่องหมายโปรตีนสามารถบอกความแตกต่างในลำดับเบสของยีน และเป็นเครื่องหมายแบบข่มร่วม (co-dominant) กล่าวคือสามารถระบุความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัสและโฮโมไซกัสได้ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบได้หลายตำแหน่ง แต่ยังมีข้อจำกัดอยู่เนื่องจากไม่สามารถตรวจสอบครอบคลุมทั่วทั้งจีโนมได้ จะตรวจสอบได้เฉพาะส่วนของยีนที่มีการแสดงออกเท่านั้น

3.2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) เป็นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอทั้งส่วนที่เป็นยีนและไม่ใช่นยีน สามารถตรวจสอบได้ทั่วทั้งจีโนมโดยไม่มีอิทธิพลจากอันตรกิริยาของยีนมาเกี่ยวข้อง เครื่องหมายดีเอ็นเอยังจำแนกออกได้เป็น 2 แบบ คือ

ก. Hybridization-based DNA markers เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในยุคแรก ๆ โดยจะตรวจสอบโดยวิธีการไฮบริไดเซชัน (hybridization) กล่าวคือนำ genomic DNA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกขนาดดีเอ็นเอในกระแสไฟฟ้า (gel electrophoresis) จากนั้นย้ายดีเอ็นเอไปยังแผ่นเมมเบรน แล้วนำไปไฮบริไดซ์กับโพรบซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ มักออกแบบมาจากส่วนของยีนที่ติดฉลากไว้ การตรวจสอบผลจะตรวจสอบบนแผ่นฟิล์ม หากดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบมีความคล้ายคลึงกับโพรบก็จะปรากฏสัญญาณบนแผ่นฟิล์ม เราอาจเรียกการตรวจสอบแบบนี้ว่า

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) วิธีการนี้เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมาก สามารถระบุความแตกต่างระหว่างจีโนมไทป์ที่เป็นเฮเทอโรไซกัสและโฮโมไซกัสได้ แต่ค่อนข้างใช้แรงงานและค่าใช้จ่ายมากและยังมีอันตรายจากการใช้สารกัมมันตรังสีด้วย อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

ข. PCR-based DNA markers ในปี ค.ศ. 1985 Kary Mullis ได้คิดค้นปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR) ขึ้นซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในส่วนที่ต้องการได้หลายเท่าตัวในระยะสั้น ๆ โดยประกอบด้วยปฏิกิริยา 3 ขั้นตอน คือ 1) การทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบเสียสภาพแยกออกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) 2) การลดอุณหภูมิลงให้พอเหมาะเพื่อให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจับกับไพรเมอร์ (annealing) 3) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (extension) หลังจากปฏิกิริยาพีซีอาร์เสร็จสมบูรณ์ดีเอ็นเอเป้าหมายจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น  $2^n$  เท่า โดย  $n$  เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ปฏิกิริยา PCR นี้มีบทบาทต่องานด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลเป็นอย่างมาก และทำให้เกิดการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ตรวจสอบจีโนมของสิ่งมีชีวิตหลากหลายรูปแบบ โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้สามารถเป็นได้ทั้งแบบสุ่มและแบบจำเพาะขึ้นอยู่กับชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้และวิธีการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันออกไป (อมรา, 2542; สุรินทร์, 2545; Treuran, 2000) ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ PCR เช่น

1) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) เป็นลำดับเบสดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณในจีโนมโดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับไพรเมอร์ที่สุ่มเพียงชนิดเดียว

2) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ถือว่าเป็นการรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิคอาร์เอฟแอลพีและประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์เข้าด้วยกัน

3) microsatellite หรือ Short Tandem Repeat (STR) เป็นเครื่องหมายที่มีภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) สูงเนื่องจากเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นชุดซ้ำประมาณ 1-4 นิวคลีโอไทด์ ความหลากหลายจะเกิดจากจำนวนซ้ำของนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เท่ากัน

4) CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) เป็นซันดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ขนาด 20-25 คู่เบสแล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งจะต่างจากรFLP ตรงที่การตรวจสอบจะทำให้ยากกว่าเนื่องจากซันดีเอ็นเอมีขนาดเล็กกว่าคือประมาณ 300-1,800 คู่เบส อย่างไรก็ตาม CAPS ไม่ยุ่งยากเหมือนการทำ Southern blot hybridization

5) SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism) เป็นซันดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะขนาด 20-25 คู่เบส แล้วทำอิเล็กโทรโฟริซิส โดยให้ดีเอ็นเออยู่ในรูปของดีเอ็นเอสายเดี่ยวเพื่อตรวจสอบความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ เทคนิคนี้อาศัยการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวซึ่งจะขึ้นอยู่กับโครงสร้างทุติยภูมิของโมเลกุล

6) ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) เป็นซันดีเอ็นเอขนาด 100-3,000 คู่เบสบริเวณรอบ microsatellite ได้จากการทำพีซีอาร์โดยใช้ลำดับเบสบริเวณ microsatellite และบริเวณข้างเคียงเป็นไพรเมอร์ขนาด 16-18 คู่เบส เป็นเทคนิคที่ดีเทคนิคหนึ่งในการทำแผนที่ยีน

7) SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) เป็นซันดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะขนาด 15-30 คู่เบสที่ได้มาจากการทำ RAPD หรือ AFLP ซึ่งลำดับเบสนี้สามารถระบุลักษณะที่สนใจได้ มักใช้ SCAR ในการทำแผนที่ยีนและการทำเครื่องหมายช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection)

ในปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอมีบทบาทสำคัญในงานหลาย ๆ ด้าน เช่น การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ การตรวจหาลักษณะที่สำคัญทางการเกษตร การตรวจสอบลูกผสมในงานปรับปรุงพันธุ์ รวมถึงการใช้ตรวจหาเครื่องหมายที่จำเพาะต่อเพศด้วย มีการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอหลายชนิดในการตรวจหาเครื่องหมายที่มีความจำเพาะกับเพศของพืชต่าง ๆ เช่น การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับเพศขององุ่น (*Actinidia deliciosa* var. *deliciosa*) ซึ่งเป็นพืชที่มีดอกผู้ดอกเมียต่างต้นด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 34 ชนิด พบว่ามี 6 ชนิด คือ OPA-01, OPA-02, OPA-08, OPA-11, OPA-16 และ OPB-01 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเพศเมีย ไพรเมอร์ OPC-05, OPN-01 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเพศผู้ (Shirkot *et al.*, 2002) การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับเพศของ *Eucommia ulmoides* Oliv. ซึ่งเป็นพืชที่พบในประเทศจีน โดยใช้เทคนิค RAPD พบแถบดีเอ็นเอขนาด 569 คู่เบสจากไพรเมอร์ OPF-08 ที่จำเพาะต่อ *Eucommia ulmoides* Oliv. เพศเมีย เรียกแถบดีเอ็นเอนี้ว่า MSDE ต่อมาได้มีการพัฒนา SCAR marker

(SCARmr) จากข้อมูลลำดับเบสของ MSDE จากการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค SCAR และ Southern hybridization พบว่าเครื่องหมายนี้สามารถใช้ตรวจสอบเพศของ *Eucommia ulmoides* Oliv. ได้ตั้งแต่เป็นต้นอ่อนซึ่งช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบได้เป็นอย่างดี (Xu *et al.*, 2004) การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศของมะละกอ (*Carica papaya* L.) โดยเทคนิค RAPD พบแถบดีเอ็นเอขนาด 450 คู่เบสที่เรียกว่า Papaya Sex Determination Marker (PSDM) สามารถจำแนกเพศผู้และพวกสมบูรณเพศออกจากเพศเมียได้ จากนั้นหาลำดับเบสของ PSDM เพื่อสร้างไพรเมอร์ SDR-1 และ SDR-2 หลังจากตรวจสอบด้วยเทคนิค SCAR และเทคนิค Southern hybridization พบว่า PSDM เป็นลำดับเบสที่จำเพาะกับมะละกอเพศผู้และพวกสมบูรณเพศ แต่ไม่พบในเพศเมีย จึงสร้าง SCARps เพื่อเป็นเครื่องหมายในการระบุเพศของมะละกอ (Urasaki *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าไมโครแซเทลไลท์ (GATA)<sub>n</sub> มีความจำเพาะต่อเพศของมะละกอเช่นกัน จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค Southern blot hybridization พบว่า (GATA)<sub>4</sub> และ (GAA)<sub>6</sub> มีความจำเพาะกับมะละกอเพศผู้ จึงอาจเป็นไปได้ว่าไมโครแซเทลไลท์อาจมีบทบาทในการวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศ (Parasnis *et al.*, 1999) การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับเพศของ *Pistacia vera* L. โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าไพรเมอร์ OPO-08 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 905 คู่เบสในเพศเมียทุกต้น แต่ยังพบแถบดีเอ็นเอในเพศผู้บางต้น เมื่อนำแถบดีเอ็นเอนี้ไปหาลำดับเบสแล้วออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในเทคนิค SCAR ผลปรากฏว่าไพรเมอร์ดังกล่าวให้แถบดีเอ็นเอขนาด 905 คู่เบสกับเพศเมียทั้งหมดและแถบดีเอ็นเอขนาด 909 คู่เบสที่จำเพาะกับเพศผู้ จากการหาลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอทั้งสองพบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากแต่พบ point mutation บางตำแหน่งโดยพบ deletion 4 ตำแหน่งในเพศเมียและในเพศผู้อีก 1 ตำแหน่ง จากนั้นออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณที่มีความแตกต่างระหว่างเพศนำมาใช้ร่วมกับเทคนิค Touch down PCR พบแถบดีเอ็นเอขนาด 297 คู่เบสที่จำเพาะกับเพศผู้ ซึ่งสามารถนำมาใช้ตรวจสอบเพศของ *Pistacia vera* L. ได้ (Yakubov *et al.*, 2005) การพัฒนา SCAR primer จากแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับ *Rumex nivalis* เพศผู้ ที่ได้จากเทคนิค AFLP พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 164 คู่เบสในเพศผู้ได้ ซึ่งมีความใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 184 คู่เบสซึ่งมีตำแหน่งบนโครโมโซม Y ของ *Rumex acetosa* ส่วนเพศเมียไม่พบชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าว (Stehlik *et al.*, 2004)

เทคนิค Bulk segregant analysis (BSA) เป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบเครื่องหมายที่ติดตามลักษณะต่าง ๆ ในจีโนมได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น โดยการสร้างกลุ่มตัวอย่างหรือประชากร 2 กลุ่ม ซึ่งทั้ง 2 กลุ่มนี้จะมีพื้นฐานทางพันธุกรรมใกล้เคียงกันมากหรือเหมือนกันแทบทุกประการจะต่างกันที่ลักษณะที่ต้องการศึกษาเพียงลักษณะเดียว วิธีการนี้นำมาใช้ครั้งแรกโดย Michelmore *et al.*

(1991) ซึ่งศึกษาการต้านทาน downy mildew ในกะหล่ำปลีโดยใช้เครื่องหมาย RAPD และ RFLP ข้อดีของเทคนิค BSA นี้จะช่วยให้เราตรวจสอบหาเครื่องหมายที่จำเพาะต่อลักษณะที่เราต้องการศึกษาได้ง่ายและชัดเจนขึ้น เนื่องจากพื้นฐานพันธุกรรมของตัวอย่างทั้ง 2 กลุ่มมีความใกล้เคียงกันมาก BSA สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาเครื่องหมายที่บ่งชี้เพศในพืชหลาย ๆ ชนิด เช่น การใช้เทคนิค BSA ในการระบุเพศของสาหร่ายสีแดง (*Gracilaria gracilis*) โดยรวมดีเอ็นเอเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เป็นเพศผู้แฮพลอยด์ และเพศเมียแฮพลอยด์ พบว่าไพรเมอร์ OPD13 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 430 คู่เบสที่จำเพาะกับ เพศผู้ และแถบดีเอ็นเอขนาด 620 คู่เบส จำเพาะกับเพศเมีย เมื่ออยู่ในสภาพดิพลอยด์ จะมีแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 ปรากฏรวมกันอยู่ เมื่อตรวจสอบในรุ่นลูกพบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPD13 ยังปรากฏในรุ่นลูกและสามารถใช้จำแนกเพศได้ (Martinez *et al.*, 1999) การใช้เทคนิค bulk DNA analysis ร่วมกับ RAPD จำแนกเพศของ nutmeg (*Myristica fragans* Houtt.) โดยรวมดีเอ็นเอเป็น 2 ส่วนคือดีเอ็นเอของเพศเมียและดีเอ็นเอของเพศผู้ นำไปทำ RAPD ด้วยไพรเมอร์ 60 ชนิด แล้วคัดไว้ 19 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ OPE11 (GAGTCTCAGG) ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 416 คู่เบสที่จำเพาะกับเพศเมีย ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอในเพศเมียแถบทุกชนิดเมื่อวิเคราะห์แต่ละสายพันธุ์ โดยไม่พบแถบดีเอ็นเอในเพศผู้เลย (Shibu *et al.*, 2000) การศึกษาเครื่องหมายที่จำเพาะต่อเพศของ *Trichosanthes dioica* Roxb. โดยใช้เทคนิค RAPD การวิเคราะห์ในขั้นแรกจะรวมดีเอ็นเอเป็นกลุ่มเพศผู้และเพศเมีย ทดสอบด้วยไพรเมอร์ 100 ชนิด แล้วเลือกไพรเมอร์ที่คาดว่าน่าจะให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศ ขึ้นต่อมานำไพรเมอร์ที่คัดเลือกมา 5 ชนิดมาวิเคราะห์ซ้ำอีกครั้งหนึ่งและวิเคราะห์ในแบบแยกเดี่ยว (individual) พบว่า ไพรเมอร์ OPC-07 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 567 คู่เบสซึ่งจำเพาะกับเพศเมีย (Singh *et al.*, 2002) การใช้เทคนิค BSA ในการแยกเพศของหน่อไม้ฝรั่ง โดยสร้างประชากรที่แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือเพศผู้และเพศเมียจากการคัดเลือกไมโครสปอร์ที่เป็น X และ Y ออกแล้วเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นลูก double haploid XX และ YY สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเพศละ 10 ตัวอย่างแล้ววิเคราะห์โดยใช้ RAPD พบว่าไพรเมอร์ OF13 สามารถใช้จำแนกเพศของหน่อไม้ฝรั่งได้ (Marziani *et al.*, 1999)

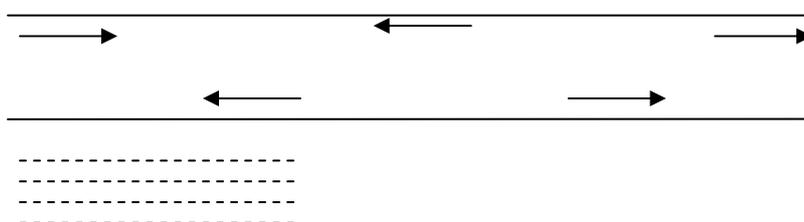
นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิค BSA ไปใช้ในงานด้านอื่น ๆ อีก เช่น การทำแผนที่ยีนของถั่ว (*Phaseolus vulgaris* L.) ให้สมบูรณ์มากขึ้นโดยใช้เทคนิค BSA ร่วมกับ RAPD ในการหาเครื่องหมายที่ระบุ 5 ลักษณะคือ dark green savoy leaf (dgs), blue flower (blu), silvery (หรือ *argentum* ในภาษาละติน) green pod (arg), yellow wax pod (y) และ flat pod ซึ่งเป็นการกลายที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ ผลที่ได้พบว่าเครื่องหมายของทั้ง 5 ยีนนี้สามารถบรรจุลงในแผนที่ยีนเดิมได้ และสามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะต่าง ๆ ได้ (Beltran *et al.*, 2002) การสร้างลูกผสม CP2

จาก *Solanum phureja* clone13 ซึ่งไม่มี leptine ใน foliage กับ *S. chacoense* clone 80-1 ซึ่งมีปริมาณ leptine ใน foliage มาก พบว่า CP2 มีปริมาณ leptine มากแต่เป็นหมัน จึงผสมกลับแบบ reciprocal backcross โดยผสม CP2 กับ phu1-3 คู่ผสม phu1-3 x CP2 เรียกว่า PBCp และคู่ผสม CP2 x phu1-3 เรียก PBCc แล้ววัดปริมาณ leptine ในรูปของ acetylleptinidine (ALD) พบว่า PBCp มี 43 ต้น จาก 87 ต้นแต่ปริมาณ ALD ที่มีน้อยกว่า CP2 ส่วน PBCc มีเพียง 7 ต้นจาก 42 ต้น ที่มี ALD แต่มีปริมาณสูงกว่า CP2 จากนั้นจึงรวม (bulk) ดีเอ็นเอ เป็น 2 ส่วนคือส่วนที่มีปริมาณ leptine สูงและต่ำโดยใช้ประชากรจาก PBCc และ PBCp แล้วใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 214 ไพรเมอร์ พบว่าไพรเมอร์ OPQ-2, OPT-16, OPT-20 สามารถจำแนกประชากรที่มี ALD สูงได้จึงคาดว่าเครื่องหมายนี้เกี่ยวข้องกับกำหนดยีนปริมาณ ALD นอกจากนี้ยังใช้เทคนิค Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) พบเครื่องหมาย GP82A บ่งชี้การสร้าง ALD ในประชากร PBCp (Medina *et al.*, 2002) การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่วางตัวอยู่ใกล้ยีน *ol-2* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทาน powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) ในมะเขือเทศ พบเครื่องหมาย OPU3<sub>1500</sub> จากเทคนิค RAPD ในกลุ่มประชากรที่เป็นโรคจึงเปลี่ยนเครื่องหมาย OPU3<sub>1500</sub> เป็นเครื่องหมาย CAPS และหาระยะทางระหว่างเครื่องหมายดังกล่าวกับยีน *ol-2* ด้วยวิธี linkage analysis นอกจากนี้ยังใช้เทคนิค AFLP ช่วยในการตรวจสอบด้วย (De Giovanni *et al.*, 2004)

#### **4. เทคนิค RAPD**

อาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่อาศัยหลักการของพีซีอาร์ชนิดหนึ่ง พัฒนาขึ้นโดย William *et al.* (1990) อาร์เอพีดีอาจมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันออกไปอีก เช่น Arbitrary-Primed PCR (AP-PCR), DNA Amplification Fingerprint (DAF) หรือเราอาจเรียกเทคนิคเหล่านี้โดยรวม ๆ ว่า Multiple Arbitrary Amplicon Profiling (MAAP) ซึ่งเทคนิคนี้เป็นการใช้ไพรเมอร์อย่างสุ่มเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเป้าหมายที่จำเพาะแต่ไม่ทราบบริเวณในจีโนม โดยแต่ละเทคนิคก็จะมีขนาดของไพรเมอร์ที่ใช้ ความเข้มงวดในปฏิกิริยา (amplification stringency) และวิธีการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันออกไป เทคนิค AP-PCR จะใช้ไพรเมอร์ขนาด 18-24 นิวคลีโอไทด์ ส่วน DAF จะใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้น ๆ เพียง 5-8 นิวคลีโอไทด์ และใช้สัดส่วนของไพรเมอร์ต่อดีเอ็นเอต้นแบบสูงกว่าวิธีการอื่น การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของเทคนิค DAF จะตรวจสอบโดยใช้เจลพอลิอะครีลาไมด์ (Kumar, 1999) สำหรับอาร์เอพีดีจะใช้ไพรเมอร์ขนาด 9-10 นิวคลีโอไทด์ที่มีองค์ประกอบของเบส GC ก่อนข้างสูงคือประมาณ 60-70 % โดยไพรเมอร์จะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบอย่างสุ่ม กล่าวคือมีการสุ่มหาลำดับเบสเป้าหมายที่

กระจายอยู่ที่จีโนม โดยการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับลำดับเบสเป้าหมายมี 2 กรณีคือ จับกันได้ 100 % และจับได้บางส่วน เมื่อมีการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับบริเวณเป้าหมายแล้วจะมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นได้เป็นผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) นำไปตรวจสอบโดยวิธี agarose gel electrophoresis โดยการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอใด ๆ สามารถนำมาเปรียบเทียบเพื่อใช้เป็นข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ได้ (ปรีชา, 2543) การเกิดแถบดีเอ็นเอหลายแถบนั้นเป็นผลจากการที่ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายบริเวณ ถ้าไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ 2 บริเวณที่ไม่ไกลกันมากนัก โดยจับกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางที่หันปลาย 3' เข้าหากันก็จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงบริเวณดังกล่าวได้ แต่ถ้าไพรเมอร์หันไปในทิศทางอื่นก็จะไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้



ภาพที่ 1 รูปแบบการจับระหว่างไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ (5' → 3')

ถ้าไพรเมอร์ที่เข้าไปจับกับดีเอ็นเอเกิดคู่สมได้ 100 % และนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดมีสัดส่วนเท่า ๆ กันในจีโนม สามารถคำนวณค่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่จะเกิดขึ้นจากไพรเมอร์ 1 ชนิดได้จากสมการ  $b = (2000 \times 4^{-2n}) C$  เมื่อ  $b$  คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่คาดหมายจากไพรเมอร์ 1 ชนิด  $n$  คือ ความยาวของไพรเมอร์คิดเป็นนิวคลีโอไทด์ และ  $C$  คือค่าขนาดของจีโนม (C value) หากพิจารณาตามสมการดังกล่าวอาจตีความได้ว่าพืชที่มีจีโนมขนาดใหญ่เมื่อใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกัน น่าจะให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากกว่าพืชที่มีจีโนมขนาดเล็ก แต่จากการศึกษาพบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอไม่ได้ขึ้นกับขนาดของจีโนม บางครั้งพืชจีโนมขนาดใหญ่อาจเกิดแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าพืชจีโนมขนาดเล็กกว่าก็ได้ (สุรินทร์, 2545)

ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิคอาร์เอพีดีอาจเกิดจากบริเวณที่ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing site) อาจมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถจับได้จึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ หรืออาจเกิดจากระยะห่างระหว่างไพรเมอร์ทั้งสองอาจมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสทำให้แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลักษณะนี้

จะตรวจสอบได้ยาก ทั้งนี้ระยะห่างระหว่างไพรเมอร์ที่มากเกินไปก็อาจทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอไม่เกิดขึ้นได้ กล่าวโดยรวมภาวะพหุสัณฐานของอาร์เอพีดีจะเป็นลักษณะการเกิดหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ แถบดีเอ็นเอจากเทคนิคอาร์เอพีดีมักแสดงการข่มต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอจึงอาจเรียกอาร์เอพีดีว่าเป็นเครื่องหมายแบบ dominant ทำให้ไม่สามารถจำแนกลักษณะเซเทอโรไซกัสออกจากโฮโมไซกัสได้ ซึ่งถือเป็นข้อด้อยของอาร์เอพีดี ข้อด้อยที่สำคัญอีกข้อหนึ่งคือการทำอาร์เอพีดีเป็นการสุ่มเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งจีโนมไม่ได้จำเพาะกับบริเวณใด จึงทำให้อาร์เอพีดีไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่าง ๆ มากและมักมีปัญหาในเรื่องของการทำซ้ำ ดังนั้นจึงต้องควบคุมสภาวะสภาวะต่าง ๆ ในปฏิกิริยาให้คงที่ตลอดการทดลอง

ถึงแม้ปัจจุบันจะมีเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดใหม่ ๆ ที่มีความจำเพาะและให้ข้อมูลที่ดีกว่า และอาร์เอพีดีก็ยังมีข้อด้อยที่สำคัญดังที่ได้กล่าวมาแล้ว แต่อาร์เอพีดีก็ยังเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ยังใช้กันอย่างแพร่หลายในงานหลาย ๆ ด้านเนื่องจากเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอต้นแบบ จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในงานวิจัยสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่มีการศึกษามากนัก การใช้ประโยชน์จากอาร์เอพีดีนอกจากจะนำไปใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับเพศดังที่ได้กล่าวไปแล้วยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านอื่นอีก เช่น การใช้อาร์เอพีดีในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Aldrovanda vesiculosa* L. (San Martin *et al.*, 2003) *Alternanthera philoxeroides* (Wang *et al.*, 2005) *Cunila galiodes* Benth (Fracaro *et al.*, 2005) *Amphicarpaea edgeworthii* (Zhang *et al.*, 2005) การใช้อาร์เอพีดีตรวจสอบการกลายของพลาสติด (plastid) ในถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) เมื่อฉายรังสีแกมมา (Atak *et al.*, 2004) การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอในต้นอ่อนของบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) เมื่อชักนำด้วยแคดเมียมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ซึ่งสามารถใช้เป็น biomarker ในการตรวจสอบปริมาณแคดเมียมในมลภาวะ (Liu *et al.*, 2005) การใช้อาร์เอพีดีตรวจสอบ somaclonal variation ที่ให้ลักษณะที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจใน jamrosa (Nayak *et al.*, 2003) การตรวจสอบภาวะพหุสัณฐานระหว่างข้าวพันธุ์ปกติกับข้าวที่เกิด somaclonal variation (Godwin *et al.*, 1997) การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานโรค lethal yellowing ในมะพร้าว (Cardena *et al.*, 2003) การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่บ่งชี้ลักษณะทนเค็มใน *Acacia auriculiformis* และ *Acacia mangium* (Nguyen *et al.*, 2004) เป็นต้น

## 5. การเติมหมู่เมธิลในลำดับนิวคลีโอไทด์

ในบางครั้งรูปแบบการถ่ายทอดและแสดงออกของลักษณะต่างหรือยีนต่าง ๆ อาจไม่ปฏิบัติตามกฎทางพันธุศาสตร์ของเมนเดล คำว่า epigenetic จึงถูกนำมาใช้เรียกปรากฏการณ์ดังกล่าว ความหมายกว้าง ๆ ของ epigenetic จะใช้อธิบายปรากฏการณ์ทางพันธุศาสตร์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับนิวเคลียส (non-nuclear genetic phenomenon) อันตรกิริยาทางพันธุศาสตร์ในช่วงของการพัฒนา (genetic interactions during development) และอิทธิพลทางฝ่ายแม่ที่มีผลต่อลูก (maternal genetic effect) ในด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล epigenetic จะหมายถึง การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน โดยที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ใด ๆ และลักษณะนี้สามารถถ่ายทอดได้ (Spielman *et. al.*, 2001; Kalisz and Purugganan, 2004)

การเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอ (DNA methylation) เป็นกลไกทาง epigenetic รูปแบบหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน ในพืชดอกจีโนมในนิวเคลียสมีขนาดใหญ่มาก มีลำดับเบสซ้ำมาก และเบสไซโทซีนมากกว่า 30 % จะมีการเติมหมู่เมธิล อย่างไรก็ตามเบสไซโทซีนที่มีการเติมหมู่เมธิลเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีน สำหรับเบสไซโทซีนที่มีการเติมหมู่เมธิลมักอยู่บริเวณ non-coding repetitive DNA sequence ซึ่งในทางพันธุศาสตร์ของเซลล์เรียกบริเวณนี้ว่า constitutive heterochromatin และหมู่เมธิลที่อยู่กับเบสไซโทซีนนี้สามารถถ่ายทอดได้โดยผ่านกระบวนการแบ่งเซลล์ (Vyskot, 1999) การเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ cytosine methyltransferase ในการย้ายหมู่เมธิล (-CH<sub>3</sub>) จาก S-adenosyl-2-methionine (SAM) ไปเชื่อมต่อกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโทซีน ซึ่งจะเรียกว่า 5-methylcytosine (5-mC) ในพืชมักพบ 5-mC ในบริเวณที่มีลำดับเบสเป็น CG, CNG, satellite DNA และบริเวณที่ไม่มีการถอดรหัส (non-transcribed region) โดยบริเวณที่มีการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอจะไม่มีการถอดรหัส (transcription) ทำให้ยีนส่วนนั้นไม่แสดงออก ดังนั้นการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอจึงเป็นกลไกหนึ่งที่ควบคุมการแสดงออกของยีน โดยระดับของการเติมหมู่เมธิลที่แตกต่างกันจะทำให้ยีนมีการแสดงออกที่ต่างกันออกไป ทำให้เกิดความหลากหลายในระดับ transcription ซึ่งมีผลต่อการกำหนดลักษณะต่าง ๆ (Gorelick, 2003; Kalisz and Purugganan, 2004) อัตราการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเออาจลดลงจากผลของสาร 5-azacytidine หรือการกลายของยีนในกลุ่ม MET1 ซึ่งเป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ DNA methyltransferase (Finnegan *et al.*, 2000)

มีข้อมูลจำนวนมากที่บ่งชี้ว่าการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาของพืช เช่น Drozdenyuk *et al.* (1976) ศึกษาปริมาณของ 5-mC ในช่วงการงอกเมล็ดของข้าวสาลีพบว่า ระดับของการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอจากช่วงเมล็ดแห้งถึงเมล็ดงอกแล้ว 3 วันลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (25.1% เป็น 21.0% ตามลำดับ) การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเออาจมีส่วนในการควบคุมกิจกรรมของยีนในการพัฒนาเปลี่ยนแปลงของพืชในช่วงต่าง ๆ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Follmann *et al.* (1990) ซึ่งพบว่าปริมาณของ 5-mC ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) ในเมล็ดข้าวสาลีที่กำลังงอก (จาก 23.7% เป็น 15.2%) นอกจากนี้ยังพบว่า 5-mC มีจำนวนเพิ่มขึ้นระหว่างการเกิดโซมาติกเอ็มบริโอ (somatic embryogenesis) ของแครอท (Munksgaard, 1995) ข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าหลังการปฏิสนธิและช่วงการพัฒนาของเมล็ด embryogenic DNA น่าจะมีการเติมหมู่เมทิลแบบ *de novo* เมื่อเมล็ดเริ่มงอกและมีการแบ่งเซลล์เพื่อการเจริญเติบโตการเติมหมู่เมทิลจะลดระดับลง ผลจากการใช้สาร 5-azacytidine (5-azaC) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้การเติมหมู่เมทิลลดระดับลงกับเมล็ดของยาสูบ พบว่าต้นยาสูบจะมีลักษณะเตี้ยแคระ มีเรณูที่สมบูรณ์พันธุ์ (fertile) น้อย นอกจากนี้ยังพบว่าดอกมีการสร้างฝักรูปราง (Vyskot *et al.*, 1995) จากผลการทดลองดังที่ได้กล่าวมาอาจสรุปได้ว่าการเติมหมู่เมทิลมีบทบาทในการพัฒนาของพืชในหลาย ๆ ด้าน นอกจากนี้การเติมหมู่เมทิลยังมีผลต่อรูปร่างของดอก การเกิดรงควัตถุ (pigmentation) ในบริเวณต่าง ๆ ลักษณะการต้านทานโรคบางโรค และการเกิด vernalization ของพืชดอก (Finnegen *et al.*, 2000)

Gorlick (2003) เสนอว่าความแตกต่างของเพศทั้งสองเริ่มเกิดจากการเติมหมู่เมทิลในดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย เมื่อมีการเติมหมู่เมทิลในส่วนของโปรโมเตอร์จะเกิดการยับยั้งการถอดรหัส ซึ่งรวมถึงตำแหน่งที่กำหนดการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และจะเปลี่ยนจากพวกสมบูรณ์เพศ (hermaphrodite) ไปเป็นเพศผู้และเพศเมียที่แยกกัน การเติมหมู่เมทิลที่แตกต่างกันในโครโมโซมเพศจะยับยั้งการเกิด recombination และเพิ่มอัตราการกลาย นอกจากนี้การเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งไม่แน่นอนและบริเวณที่กำหนดเพศ (sex determining region) ไม่ทำงานเนื่องจากถูกเติมหมู่เมทิลจะชักนำให้เกิด selective pressure ที่จะกำจัดตำแหน่งเหล่านี้ออกไปเป็นผลให้โครโมโซม Y หรือ W มีขนาดสั้นลง การเติมหมู่เมทิลยังเป็นสาเหตุของการเกิด dioecy และการกำเนิดของโครโมโซมเพศ จากข้อเสนอดังกล่าวอาจทำให้เกิดแนวความคิดว่าการเติมหมู่เมทิลอาจมีผลต่อการกำหนดเพศ และการที่ดอกเพศผู้ไม่มี sex organ ของเพศเมีย ก็อาจจะเกี่ยวกับการไม่แสดงออกหรือการเกิด hypermethylation ของยีนที่เกี่ยวข้องซึ่งมีตำแหน่งบนโครโมโซม Y จากผลการทดลองของ Janousek *et al.* (1996) ที่ให้สาร 5-azaC ความเข้มข้น 10  $\mu$ M กับ *Melandrium*

*album* เพศผู้โดยตั้งสมมติฐานว่า 5-azaC จะสามารถยับยั้งระบบ female sex organ suppression ในเพศผู้ได้ ผลปรากฏว่า 5-azaC สามารถชักนำให้เกิดการกลับเพศ (sex reversal) ในเพศผู้ 21% ไปเป็น androhermaphrodite หรือเป็นพวกที่ใน 1 ต้นมีทั้งดอกเพศผู้และดอกสมบูรณ์เพศ ขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ที่สังเกตได้ในเพศเมีย สำหรับ androhermaphrodite นี้มีแคโรโอไทป์แบบเดียวกับเพศผู้ปกติ ( $2n=22+XY$ ) จากการศึกษาด้วยเทคนิค RFLP โดยใช้เอนไซม์ที่ไวต่อการเติมหมู่เมธิลในดีเอ็นเอบ่งชี้ว่าระดับการเติมหมู่เมธิลในพวก androhermaphrodite ลดลงประมาณ 10% เมื่อเปรียบเทียบกับเพศผู้ปกติ และเนื่องจาก androhermaphrodite เหล่านี้ไม่เป็นหมัน จึงได้ทดสอบการผสมข้ามและผสมตัวเองในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อตรวจสอบ sexual transmission พบว่าความเป็น androhermaphroditism สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นลูกได้เมื่อผสมตัวเองหรือใช้เป็นต้นฝ่ายพ่อ (pollen parent) แต่ไม่สามารถถ่ายทอดลักษณะนี้ได้ถ้าใช้เป็นต้นฝ่ายแม่ (female line) จึงสรุปได้ว่า การเกิด female sex suppression ใน *M.album* เพศผู้ (XY) ขึ้นอยู่กับการเติมหมู่เมธิลในส่วนของดีเอ็นเอที่จำเพาะ โดยที่ hypomethylating agent เช่น 5-azacytidine สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายในส่วนนี้ และสามารถถ่ายทอดลักษณะที่เกิดจากการกลายนี้สู่รุ่นลูกได้

การเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอยังเป็นส่วนสำคัญของการเกิด imprinting ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่ระดับการแสดงออกของยีนจะขึ้นอยู่กับว่ายีนนั้นถ่ายทอดมาจากพ่อหรือแม่ ถ้าหากยีนที่ถ่ายทอดมาจากแม่มีการลดการแสดงออกลงเมื่อเปรียบเทียบกับยีนที่ถ่ายทอดมาจากพ่อจะเรียกว่า maternally imprinted และ paternally imprinted จะใช้อธิบายยีนที่ถ่ายทอดมาจากแม่มีการแสดงออกมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับยีนที่ถ่ายทอดมาจากพ่อ imprinting นอกจากจะพบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมแล้ว ก็ยังพบในพืชดอกด้วย ซึ่ง imprint นี้จะมีผลกับการแสดงออกของยีนในเอนโดสเปิร์ม ( $3n$ ) โดยการพัฒนาของพืชจะผิดปกติหากอัตราส่วนระหว่างจีโนมฝ่ายแม่ (m) และจีโนมฝ่ายพ่อ (p) ไม่เป็น  $2m:1p$  และจะนำไปสู่การไม่ติดเมล็ด (abortion) ต่อไป การผสมระหว่าง *Arabidopsis* ที่เป็นเทตระพลอยด์ กับ ดิพลอยด์ แสดงให้เห็นว่าอัตราส่วน  $4m:1p$  ในเอนโดสเปิร์มเป็นผลให้การแบ่งเซลล์ในเอนโดสเปิร์มและขนาดของเมล็ดลดลง ในทางตรงกันข้าม ถ้าอัตราส่วนของ paternal : maternal สูงจะให้ผลในทางตรงกันข้ามคือจะเร่งการแบ่งเซลล์ในเอนโดสเปิร์มมากขึ้นและเมล็ดจะมีขนาดใหญ่ แสดงว่ายีนที่เกิดการ imprint มีส่วนในการพัฒนาของเมล็ด หลักฐานอีกอย่างหนึ่งที่ยืนยันว่าการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอมีความสำคัญในการควบคุม imprinting ในพืชคือ ยีน *r* และ *dzr1* ซึ่งเป็นยีนในข้าวโพด จากการศึกษาพบว่าการเติมหมู่เมธิลในดีเอ็นเอที่แตกต่างกันและการแสดงออกของยีนจะสัมพันธ์กับการที่แอลลีลนั้นมาจากพ่อหรือแม่ เมื่อใช้ *Arabidopsis* ที่ทำ antisense ของยีน *MET1* เป็นฝ่ายให้เรณู (pollen donor) พบว่าการแบ่งเซลล์ใน

เอนโดสเปิร์มลดลงและเม็ลลิตมีขนาดลดลง เมื่อนำเม็ลลิตเหล่านี้มาผสม ผลที่ได้จะทำให้มีจำนวนของ จีโนมฝ่ายแม่มากกว่าปกติ หากผสมในทางกลับกันจะได้เม็ลลิตที่มีขนาดใหญ่และมีจำนวนจีโนมฝ่าย พ่อมากกว่าปกติ จึงสรุปได้ว่าการเติมหมู่เม็ลลิตให้ดีเอ็นเอมีบทบาทสำคัญต่อการเกิด imprinting ใน พืช และการเกิด demethylation อาจนำไปสู่ความผิดปกติของการแสดงออกของยีนในเอนโดสเปิร์ม (Finnegan *et al.*, 2000)

## 6. การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค MSAP

MSAP (Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism) เป็นการประยุกต์เทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เพื่อตรวจสอบรูปแบบของการเติมหมู่เม็ลลิตใน ลำดับนิวคลีโอไทด์ เทคนิค MSAP จะต่างจาก AFLP ที่เอนไซม์ที่เป็น frequent cutter โดยจะเปลี่ยน จากเอนไซม์ *MseI* เป็นเอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีตำแหน่งจดจำเดียวกัน แต่มีความไวต่อการเติมหมู่เม็ลลิตในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างรูปแบบกัน เอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* เป็นเอนไซม์ที่เป็น isochizomer กันกล่าวคือมีตำแหน่งจดจำเดียวกัน (5'-CCGG-3') แต่มี ความสามารถในการตัด DNA ที่เกี่ยวข้องกับการเติมหมู่เม็ลลิตในลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดจะสามารถตัด DNA ที่ไม่มีการเติมหมู่เม็ลลิตได้ แต่จะไม่สามารถตัด DNA ที่มี การเติมหมู่เม็ลลิตที่เป็นแบบ full methylation of both cytosine ( $^{5m}C^{5m}CGG/GGC^{5m}C^{5m}$ ) ได้ เอนไซม์ *MspI* จะสามารถตัด DNA ที่มีการเติมหมู่เม็ลลิตที่เป็นแบบ full methylation of the internal cytosine ( $C^{5m}CGG/GGC^{5m}C$ ) ส่วนเอนไซม์ *HpaII* จะตัด DNA ที่มีการเติมหมู่เม็ลลิตที่เป็นแบบ hemi-methylation at the external cytosine ( $^{5m}CCGG/GGCC$ ) ซึ่งความแตกต่างของความสามารถ ในการตัด DNA นี้สามารถนำมาตรวจสอบหารูปแบบของการเติมหมู่เม็ลลิตที่แตกต่างกันได้ (Portis *et al.*, 2004) วิธีการของ MSAP นั้นจะคล้ายคลึงกับ AFLP คือมี 3 ขั้นตอนหลัก ๆ ดังนี้ 1) การตัด ดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ *EcoRI* - *MspI* หรือ *EcoRI* - *HpaII* ในบางงานวิจัยอาจจะ ตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชุดเพื่อเปรียบเทียบกัน จากนั้นเชื่อมดีเอ็นเอที่ตัดเข้ากับ adapter ซึ่งมี 2 ชนิด คือ *EcoRI* adapter และ *HpaII/MspI* adapter 2) การทำพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดย ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ adapter ทั้ง 2 ชนิด โดยในขั้นตอนนี้จะทำพีซีอาร์ 2 รอบคือ preselective amplification และ selective amplification 3) การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis ภาวะพหุสัณฐานของเทคนิค MSAP จะเกิดจากรูปแบบของการ เติมหมู่เม็ลลิตในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน หากตัวอย่างดีเอ็นเอที่นำมาศึกษามีการเติมหมู่

เมธิลในตำแหน่ง 5'-CCGG-3' ต่างกัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MSAP โดยใช้เอนไซม์ *HpaII* และ *MspI* ก็จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

ในช่วงแรก ๆ เทคนิค MSAP ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อตรวจสอบรูปแบบการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในเชื้อรา โดย Reyna-Lopez *et al.* (1997) พัฒนาเทคนิค MSAP เพื่อใช้ประเมินรูปแบบการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอใน *Mucor rouxii*, *Yarrowia lipolytica* และ *Ustilago maydis* ซึ่งเป็นตัวแทนของ zygomycete, ascomycete และ basidiomycete ตามลำดับ โดยตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ร่วมกับเอนไซม์ *MspI* หรือ *HpaII* จากนั้นทำพีซีอาร์ 2 ขั้นตอนตามวิธีการของเทคนิค AFLP ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการเติมหมู่เมธิลที่ต่างกันในแต่ละช่วงของการเกิดสัณฐานของเชื้อรา (fungal morphogenesis) เทคนิค MSAP สามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในงานด้านต่าง ๆ มากมาย เช่น Xiong *et al.* (1999) ใช้เทคนิค MSAP ตรวจสอบการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอที่เบสไซโทซีนในข้าว โดยเปรียบเทียบลายพิมพ์ MSAP ที่ได้จากดีเอ็นเอที่สกัดแยกจากส่วนต่าง ๆ ของข้าว พบว่าในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ มีระดับการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอต่างกัน การศึกษาการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในพริก (*Capsicum annuum* L.) ด้วยเทคนิค MSAP โดยศึกษาตั้งแต่เป็นเมล็ดแห้ง (dry seed) เทียบกับเมล็ดที่กำลังงอก (germination seed) ในช่วงวันที่ 2, 4, 6 และ 8 วัน พบเครื่องหมาย MSAP บางแถบที่ปรากฏเฉพาะในเมล็ดแห้งแต่ไม่พบในเมล็ดที่กำลังงอก ขณะที่บางเครื่องหมายพบเฉพาะในเมล็ดที่กำลังงอกในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงรูปแบบในการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงของการงอกของเมล็ด (Portis *et al.*, 2004) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในจีโนมของกล้วย (*Musa* AAA CV. Grand Naine) ด้วยเทคนิค MSAP โดยเปรียบเทียบระหว่างกล้วยที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากหน่อและยอดดอกตัวผู้กับกล้วยที่ขยายพันธุ์จากหน่อธรรมชาติ พบว่ากล้วยที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากยอดดอกตัวผู้มีภาวะพหุสัณฐานของการเติมหมู่เมธิลเกิดขึ้น 3 % กล้วยที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากหน่อมีความแตกต่างในการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอ 1.7 % ส่วนกล้วยที่ขยายพันธุ์จากหน่อธรรมชาติไม่พบความแตกต่างในการเติมหมู่เมธิล จึงอาจเป็นไปได้ว่าการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีผลต่อการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอ (Peraza-Echeverria *et al.*, 2001) การศึกษารูปแบบของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในจีโนมของแอปเปิล (*Malus domestica* CV. Gala) ในแปลงปลูกและแอปเปิลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยวิธีการที่ประยุกต์จากเทคนิค AFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* - *MspI* และ *EcoRI* - *HpaII* พบแถบดีเอ็นเอประมาณ 25 % ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอบางแถบจำเพาะต่อต้นที่ปลูกในแปลงและจำเพาะต่อต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Xu *et al.*, 2000) การตรวจสอบการ

เปลี่ยนแปลงของการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอในจีโนมของโสมไซบีเรีย (*Eleuterococcus senticosus*) ที่สกัดจาก embryogenic callus และ non-embryogenic callus ด้วยเทคนิค HPLC เปรียบเทียบกับเทคนิค MSAP จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า embryogenic callus มีการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอในอัตราส่วนที่น้อยกว่า เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MSAP พบว่าบริเวณ CCGG ในจีโนมของ non-embryogenic callus มีการเติมหมู่เมทิล 16.99 % ขณะที่ในจีโนมของ embryogenic callus มี 11.20 % แสดงว่า embryogenic callus มีการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอน้อยกว่า non-embryogenic callus (Chakrabarty *et al.*, 2003) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการเติมหมู่เมทิลในจีโนมของ *Brassica napus* L. เมื่อชักนำด้วยสาร potassium dichromate โดยใช้เทคนิค immunolabelling และ MSAP พบว่าผลจากทั้งสองเทคนิคสอดคล้องกันคือมีการเกิด hypermethylation ขึ้นในจีโนมของ *Brassica napus* L. และการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ (DNA alteration) ที่เกิดขึ้นเป็นแบบ dose-dependent กล่าวคือจะแปรผันกับปริมาณของสาร potassium dichromate ที่ได้รับ (Labra *et al.*, 2004) การศึกษาความหลากหลายของกล้วย (plantains) โดยใช้เครื่องหมาย SSR และ AFLP พบว่ากล้วยมีฐานพันธุกรรมที่แคบมาก นอกจากนี้ข้อมูลยังสนับสนุนแนวความคิดที่ว่าพืชพวกนี้แพร่กระจายจากเมล็ดเดี่ยว (single seed) เมื่อนำเทคนิค MSAP มาร่วมวิเคราะห์ พบภาวะพหุ-ลักษณะที่เกิดจากการเติมหมู่เมทิลบริเวณ CCGG สูงมากระดับหนึ่งและสามารถจำแนกกล้วยออกได้เป็น 3 กลุ่ม (Noyer *et al.*, 2005) การใช้เทคนิค MSAP ตรวจสอบรูปแบบของการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโตซีนของข้าวสายพันธุ์ Wase Aikoku3 ที่ยังเป็นต้นอ่อน (seedling) เทียบกับข้าวที่โตเต็มวัย (adult plant) ที่ป่วยเชื้อ *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* ซึ่งข้าวสายพันธุ์นี้ที่โตเต็มวัยจะสามารถต้านทานเชื้อดังกล่าวได้ ผลปรากฏว่ามีการเติมหมู่เมทิลที่แตกต่างกันระหว่างต้นอ่อนและต้นโตเต็มวัยที่ป่วยเชื้อ โดยในข้าวที่โตเต็มวัยจะมีการเติมหมู่เมทิลมากกว่าต้นอ่อน จากการศึกษาลำดับเบสของเครื่องหมาย MSAP และเทคนิค Northern Analysis ทำให้สรุปได้ว่า ต้นอ่อนและต้นโตเต็มวัยมีการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโตซีนที่แตกต่างกัน และการเกิด hypermethylation และ hypomethylation ของยีนบางยีนอาจเกี่ยวข้องกับการต้านทานโรคในข้าว (Sha *et al.*, 2005) การใช้เทคนิค MSAP ตรวจสอบรูปแบบการเติมหมู่เมทิลที่บริเวณ CCGG ในจีโนมของกล้วย พบว่าบริเวณ CCGG ในจีโนม 80% ไม่มีการเติมหมู่เมทิล ประมาณ 5% มีการเติมหมู่เมทิลแบบ internal cytosine และประมาณ 15% มีการเติมหมู่เมทิลแบบ external หรือ both cytosine (Baurens *et al.*, 2003) เป็นต้น

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

#### 1. พันธุ์ปรงที่ใช้ในศึกษา

พันธุ์ปรงที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนนงนุช จังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นแหล่งรวบรวมและอนุรักษ์พันธุ์ปรงหลากหลายสกุล ทั้งปรงที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทย และในต่างประเทศ นับว่าเป็นแหล่งที่มีปรงมากที่สุดในโลกแห่งหนึ่ง ในงานวิจัยนี้ศึกษาปรงสกุล *Cycas* 6 ชนิด และปรงสกุล *Zamia* อีก 6 ชนิด (ตารางที่ 2) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย

#### ตารางที่ 2 ตัวอย่างปรงที่ใช้ในการศึกษา

ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนโครโมโซม	แหล่งที่มา
<i>Cycas chamaoensis</i>	2n=22	จ. จันทบุรี
<i>Cycas clivicola</i>	2n=22	อ. อรัญประเทศ จ. ปราจีนบุรี
<i>Cycas edentata</i>	2n=22	ฟิลิปปินส์
<i>Cycas elephantipes</i>	2n=22	จ. ชัยภูมิ
<i>Cycas pectinata</i>	2n=22	อ. ฟ่าง
<i>Cycas siamensis</i>	2n=22	จ. กาญจนบุรี
<i>Zamia amblyphyllidia</i>	2n=19	เปอร์โตริโก
<i>Zamia harrarae</i>	2n=24	เม็กซิโก
<i>Zamia inermis</i>	2n=16	เม็กซิโก
<i>Zamia integrifolia</i>	2n=16	คิวบา
<i>Zamia loddigesii</i>	2n=18	เม็กซิโก
<i>Zamia pumila</i>	2n=16	สาธารณรัฐโดมินิกัน

## 2. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 2.1 ตู้แช่ -20° C รุ่น FZ-189 GYN (SANYO)
- 2.2 ตู้แช่ -80° C รุ่น 8558 S/N 86935-206 (Forma Scientific)
- 2.3 Water bath รุ่น Isotemp 210 (Fisher Scientific)
- 2.4 เครื่อง PCR รุ่น PTC-100™ (MJ Research, Inc)
- 2.5 เครื่องซั่งสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น TC-205 (Denver Instrument Company)
- 2.6 ชุดเครื่องมือ agarose gel electrophoresis (Syngen)
- 2.7 ชุดอิเล็กทรอนิกส์แนวตั้ง รุ่น V20-CDC (SCIE-PLAS)
- 2.8 เครื่องฉายกระแสไฟฟ้า รุ่น E833 (SCIE-PLAS)
- 2.9 เครื่องฉายแสง UV และถ่ายภาพ (gel documentation) รุ่น TXT-20.M (Vilber Lourmat)
- 2.10 เครื่อง autoclave รุ่น AMA 240S (ASTEEL)
- 2.11 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (refrigerated centrifuge) รุ่น 3K20 (SIGMA)
- 2.12 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วต่ำ (microcentrifuge) รุ่น 1010 (Century Scientific)
- 2.13 เครื่อง spectrophotometer รุ่น Lambda UV/VIS spectrophotometer (Perkin Elmer)
- 2.14 ชุดไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาตรได้ (Gilson) พร้อมทิปขนาด 10, 200 และ 1000 µl.
- 2.15 เครื่อง vortex รุ่น VX100 (LABNET)
- 2.16 หลอดใส่สารขนาด 0.5, 1.5, 15 ml และหลอด PCR ขนาด 0.2 ml
- 2.17 เครื่องแก้ว (Pyrex)
- 2.18 ชุดโกร่งบดตัวอย่าง

## 3. สารเคมี

### 3.1 สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

#### 3.1.1 ไนโตรเจนเหลว

3.1.2 2X CTAB buffer (2% CTAB, 1.4M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1 % Polyvinylpyrrolidone: PVP)

#### 3.1.3 Beta-Mercaptoethanol

#### 3.1.4 10% CTAB ใน 0.7 M NaCl

- 3.1.5 Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) โดยปริมาตร
- 3.1.6 70% Ethanol, 90% Ethanol และ Absolute ethanol
- 3.1.7 10 mg/ml RNase A (US Biological, USA)
- 3.1.8 TE buffer (10:0.1 = 10 mM Tris pH 8.0 : 0.1 mM EDTA)

### 3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD

- 3.2.1 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl)
- 3.2.2 50 mM MgCl<sub>2</sub>
- 3.2.3 2 mM dNTP (Fermentus)
- 3.2.4 เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen)
- 3.2.5 5 pmol RAPD primer
- 3.2.6 น้ำกลั่นบริสุทธิ์

### 3.3 สารเคมีสำหรับ Agarose gel electrophoresis

- 3.3.1 Agarose gel (Research Organic)
- 3.3.2 Loading dye (0.15% Bromphenol blue ใน 50 % Glycerol)
- 3.3.3 1X TBE buffer (10.8 g Tris base, 5.5 g Boric acid และ 4 ml 500 mM EDTA pH 8.0)
- 3.3.4 0.5 mg/ml ethidium bromide (Bio Basic)

### 3.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MSAP

- 3.4.1 10X reaction Buffer (33mM Tris-acetate pH 7.9, 10 mM Magnesium acetate, 66 mM Potassium acetate, 0.1 mg/ml BSA)
- 3.4.2 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*, *MspI* และ *HpaII* (Fermentus)
- 3.4.3 *EcoRI* adapter และ *HpaII*/ *MspI* adapter
- 3.4.4 เอนไซม์ T<sub>4</sub> DNA ligase (Fermentus)

3.4.5 10X T<sub>4</sub> ligation buffer (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 5 mM ATP pH 7.8)

3.4.6 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl)

3.4.7 50 mM MgCl<sub>2</sub>

3.4.8 2 mM dNTP

3.4.9 เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen)

3.4.10 *EcoRI* primer +1, *HpaII*/ *MspI* primer +1

3.4.11 *EcoRI* primer +3, *HpaII*/ *MspI* primer +3

3.4.12 น้ำกลั่นบริสุทธิ

### 3.5 สารเคมีสำหรับ Denaturing Polyacrylamide gel electrophoresis

3.5.1 Bind silane (Plusone)

3.5.2 Repel silane (Plusone)

3.5.3 Glacial acetic acid (Merck)

3.5.4 95 % ethanol

3.5.5 Acrylamide gel และ methylene bisaacrylamide (Plusone)

3.5.6 TBE buffer

3.5.7 Urea (USB)

3.5.8 10% APS (ammonium persulfate)

3.5.9 TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamine)

3.5.10 AFLP loading dye (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.1% xylene cyanol, 0.1 % bromphenol blue)

3.5.11 Developer (2.5% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde, 2 µg/ml sodium thiosulfate)

3.5.12 Silver nitrate (Merck)

3.5.13 น้ำกลั่น

## วิธีการ

### 1. การเก็บตัวอย่างปรง

เก็บใบของปรงจากสวนนงนุช จังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นแหล่งเก็บรวบรวมพันธุ์ปรงหลากหลายชนิด เก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติก เย็บปากถุงด้วยลวดเย็บกระดาษ แล้วนำตัวอย่างใส่ในกล่องที่บรรจุน้ำแข็ง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการ นำใบปรงมาล้างให้สะอาดแล้วแช่ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำไปเก็บที่ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะนำมาใช้งาน หากต้องการเก็บไว้นานนำไปเก็บที่ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ  $-80^{\circ}\text{C}$

### 2. การสกัดดีเอ็นเอจากใบปรง

การสกัดดีเอ็นเอจะสกัดจากใบของปรงแต่ละตัวอย่างโดยใช้วิธีประยุกต์จาก Molecular Biology Laboratory Protocols (2002) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. เตรียมสารละลาย 2X CTAB ใส่หลอดขนาด 15 ml ปริมาตร 5 ml เติม Beta-mercaptoethanol 5  $\mu\text{l}$  เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่  $65^{\circ}\text{C}$  นาน 45 นาที
2. บดตัวอย่างใบปรงในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่างประมาณ 2 กรัมใส่หลอด เขย่าให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว
3. แบ่งสารละลายใส่หลอดขนาด 1.5 ml หลอดละ 750  $\mu\text{l}$  แล้วบ่มที่  $65^{\circ}\text{C}$  นาน 1 ชั่วโมง
4. ตั้งหลอดไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) หลอดละ 750  $\mu\text{l}$  กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน
- 5.ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที
6. ดูดสารละลายใสตอนบนใส่หลอด 1.5 ml หลอดใหม่หลอดละ 500  $\mu\text{l}$  เติมสารละลาย 10% CTAB ปริมาตร 50  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากัน

7. เติมสารละลาย Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) หลอดละ 500  $\mu$ l ปั่นเหวี่ยง 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที

8. คูณสารละลายใสตอนบนหลอดละ 300  $\mu$ l ใส่หลอดใหม่รวมให้ได้หลอดละ 600  $\mu$ l

9. ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Absolute ethanol ปริมาตร 600  $\mu$ l กลับหลอดไปมาเบา ๆ

10. ถ้าตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาก เกี่ยวดีเอ็นเอด้วยแท่งแก้วปลายงอ แต่ถ้าตะกอนดีเอ็นเอที่ได้น้อย ให้ปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

11. ล้างตะกอนด้วย 70% และ 90% Ethanol ตามลำดับ ปล่อยให้ตะกอนแห้ง

12. ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 100  $\mu$ l และเติมเอนไซม์ RNase A หลอดละ 2  $\mu$ l บ่มไว้ที่ 37 °C ซ้ำมคืน และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 °C เพื่อรอใช้งานต่อไป

หลังจากสกัดดีเอ็นเอแล้วตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยการวัดการดูดกลืนคลื่นแสง และตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ 0.8% agarose gel

### 3. การรวมดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ โดยวัดการดูดกลืนคลื่นแสง อัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer ถ้าอัตราส่วนของ  $A_{260}/A_{280}$  อยู่ระหว่าง 1.6-1.8 แสดงว่าสารละลายดีเอ็นเอค่อนข้างบริสุทธิ์ หากมีค่าต่ำกว่า 1.6 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีน แต่ถ้าค่าสูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอ การดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเลตของกรดนิวคลีอิกจะอยู่ในช่วงความยาวคลื่นสูงสุดที่ 260 นาโนเมตร โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตรจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรเท่ากับ 20 หน่วย ( $A_{260}$ ) ดังนั้นสามารถคำนวณปริมาณของกรดนิวคลีอิกได้จาก

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณกรดนิวคลีอิก (mg/\mu l)} &= A_{260} \times 1/20 \\ \text{ปริมาณกรดนิวคลีอิก (ng/ \mu l)} &= A_{260} \times 1/20 \times 1000 \\ &= A_{260} \times 50 \end{aligned}$$

กรณีที่ใช้สารละลายดีเอ็นเอเจือจาง 100 เท่า (ดีเอ็นเอ 3  $\mu$ l ต่อน้ำกลั่น 297  $\mu$ l) ในการตรวจสอบด้วยเครื่อง spectrophotometer จะสามารถคำนวณปริมาณกรดนิวคลีอิกในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตรได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณกรดนิวคลีอิก (ng/ \mu l)} = A_{260} \times 50 \times 100$$

เมื่อทราบปริมาณดีเอ็นเอในสารละลายแล้วจึงปรับให้มีความเข้มข้น 50 หน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร แล้วรวมตัวอย่างดีเอ็นเอเป็น 4 กลุ่มคือ ปรังสกุล *Cycas* เพศผู้, ปรังสกุล *Cycas* เพศเมีย, ปรังสกุล *Zamia* เพศผู้ และปรังสกุล *Zamia* เพศเมีย

#### **4. การวิเคราะห์โดยเทคนิค RAPD**

นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD แต่เนื่องจาก RAPD เป็นเทคนิคที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะมากจึงต้องกำหนดองค์ประกอบของสารและอุณหภูมิในปฏิกิริยาให้เหมือนกันตลอดการทดลองดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 องค์ประกอบและปริมาตรสารที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในเทคนิค RAPD

สารที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร ( $\mu$ l)
50 ng/ $\mu$ l gDNA	1.0
5 pmol RAPD primer	1.5
10X PCR buffer	2.5
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1.0
dNTP mix (2 mM)	2.0

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สารที่ใช้ในปฏิกิริยา	ปริมาตร (μl)
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5U/μl)	0.2
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	16.8
ปริมาตรรวม	25.0

หลังผสมสารต่าง ๆ แล้ว นำเข้าเครื่อง PCR ใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

ขั้นที่ 1	94 °C	3 นาที
ขั้นที่ 2	94 °C	1 นาที
ขั้นที่ 3	38 °C	1 นาที
ขั้นที่ 4	72 °C	1 นาที
ทำซ้ำขั้น 2-4 รวม 40 รอบ		
ขั้นที่ 5	72 °C	5 นาที

การตรวจสอบผลการวิเคราะห์ RAPD ดังนี้

1. เตรียม 1 % agarose gel ในเครื่องทำอเล็กโทรโฟรีซิสแนวราบ
2. หยอดผลผลิต PCR 10 μl ผสมกับ loading dye 2 μl แล้วหยอดลงช่องในเจล
3. ต่อเครื่องทำอเล็กโทรโฟรีซิสกับแหล่งกำเนิดที่ให้ความต่างศักย์ 100 โวลต์
4. ย้อมเจลด้วย 0.5 mg/ml ethidium bromide นาน 10 นาที
5. ต่อดูใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต บันทึกภาพ

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD ในงานวิจัยนี้จะใช้วิธีการเดียวตลอดงานวิจัยดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น สำหรับการวิเคราะห์จะทำการลำดับขั้นตอนดังต่อไปนี้

#### 4.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่จะใช้ในการทำ RAPD นั้นจะทดสอบเบื้องต้นว่าไพรเมอร์นั้นสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและมีแนวโน้มที่จะบ่งชี้เพศในตัวอย่างปรังที่เลือกมาหรือไม่ โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD ทั้งสิ้น 216 ชนิด (ตารางที่ 4) ทดสอบด้วยปรัง *Cycas clivicola* เพศผู้และเพศเมีย อย่างละ 1 ตัวอย่าง ปรัง *Zamia integrifolia* เพศผู้และเพศเมียอีกอย่างละ 1 ตัวอย่าง จากนั้นคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและมีแนวโน้มจะใช้ระบุความแตกต่างระหว่างเพศของตัวอย่างปรังสกุล *Cycas* และ *Zamia* ที่เลือกมาได้ นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกดังกล่าวไปวิเคราะห์กับตัวอย่างปรังที่เหลือ

#### 4.2 การวิเคราะห์ RAPD แบบแยก (individual)

หลังจากที่ทดสอบหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้ความแตกต่างระหว่างเพศในปรังตัวอย่างได้แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ RAPD กับตัวอย่างปรังที่เหลือทั้ง 12 ตัวอย่าง ตรวจสอบผลใน 1% agarose gel

#### 4.3 การวิเคราะห์ RAPD ร่วมกับการประยุกต์เทคนิค bulk analysis

คัดเลือกไพรเมอร์จากข้อ 4.2 ที่มีแนวโน้มจะให้ความแตกต่างระหว่างเพศในตัวอย่างปรังมากที่สุดมาวิเคราะห์ร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคนิค Bulk segregant analysis เพื่อตรวจสอบแถบ ดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างเมื่อวิเคราะห์แบบแยกอีกครั้งหนึ่ง โดยรวมดีเอ็นเอของปรังสกุล *Cycas* เพศผู้และเพศเมีย ปรังสกุล *Zamia* เพศผู้และเพศเมีย รวมตัวอย่างทั้งหมด 4 ชุด นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD สภาวะเดียวกับการวิเคราะห์แบบแยก และตรวจสอบผลใน 1% agarose gel

ตารางที่ 4 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD

ชุดไพรมเมอร์	หมายเลขไพรมเมอร์	ที่มา
AA	01, 03, 07, 09, 11, 16, 18, 19, 20	Operon Technology
AB	01, 04, 05, 06, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technology
AC	02, 03, 05, 07, 08, 09, 10, 13, 14, 15, 19	Operon Technology
AD	02, 03, 05, 06, 11, 19, 20	Operon Technology
AF	04, 06, 07	Operon Technology
AH	01, 02, 09, 11, 12, 16, 17, 18, 19	Operon Technology
AI	05, 08, 11, 12, 13, 14, 15, 16	Operon Technology
AP	11	Operon Technology
APG	03	Operon Technology
APW	01, 02	Operon Technology
E	15	Bioprobe
O	08	Bioprobe
OPA	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technology
OPB	02, 06, 08	Operon Technology
OPC	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technology
OPD	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technology
OPE	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technology
OPF	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technology
OPH	02	Operon Technology
OPI	03, 04, 10, 12, 14, 18	Operon Technology
OPJ	05	Operon Technology
OPK	02, 14, 16	Operon Technology

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชุดไพรเมอร์	หมายเลขไพรเมอร์	ที่มา
OPL	12, 13, 19	Operon Technology
OPN	03, 04, 04, 20	Operon Technology
OPR	02, 03, 05	Operon Technology
OPV	01	Operon Technology
OPX	04, 05	Operon Technology
OPY	02, 03	Operon Technology
PRR	01, 02	Chen <i>et al.</i> (1997)
RS	01	Chen <i>et al.</i> (1997)
RSR	01, 02, 03	Chen <i>et al.</i> (1997)
TPXR	01, 02	Chen <i>et al.</i> (1997)
U.B.C.	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14	Thseng <i>et al.</i> (1999)

#### 4.4 การวิเคราะห์ผลจากเทคนิค RAPD

4.4.1 บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากตัวอย่างดีเอ็นเอของปรังจากแต่ละขั้นตอน และตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะในแต่ละเพศของปรังแต่ละชนิด รวมถึงตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะในแต่ละเพศของปรังแต่ละสกุล

4.4.2 บันทึกแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏโดยอ่านแถบที่ปรากฏบนเจลและบันทึกเป็นสัญลักษณ์ “1” กับกาเกิดแถบดีเอ็นเอ และ “0” กับกาไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) – PC เวอร์ชัน 2.02i ซึ่งจะคำนวณความสัมพันธ์ระหว่างปรังแต่ละชนิดและสร้างเป็น Phylogenetic tree การคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) ใช้วิธีของ Sneath และ Sokal (1973) ดังสมการ

$$S_{ij} = a+d/(a+b+c+d)$$

- เมื่อ  $S_{ij}$  = ค่า similarity ระหว่างพันธุ์  $i$  และพันธุ์  $j$   
 $a$  = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้ง 2 พันธุ์  
 $b$  = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์  $i$  แต่ไม่พบในพันธุ์  $j$   
 $c$  = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในพันธุ์  $j$  แต่ไม่พบในพันธุ์  $i$   
 $d$  = จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ไม่เกิดขึ้นในทั้ง 2 พันธุ์

### 5. การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MSAP

เทคนิค MSAP (Methylation Sensitivity Amplified Polymorphism) เป็นเทคนิคที่ประยุกต์มาจากเทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) วิธีการส่วนใหญ่จึงคล้ายคลึงกับวิธีที่ปฏิบัติใน AFLP แต่จะแตกต่างกันที่เอนไซม์ที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์ที่เป็น rare cutter ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบสยังคงใช้เอนไซม์ *EcoRI* (G/AATTC) แต่เอนไซม์ที่เป็น frequent cutter ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบสจะใช้เอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* แทน เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีตำแหน่งจดจำเหมือนกันคือ C/CGG แต่การตัดหรือไม่ตัดดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งจดจำขึ้นกับการเติมหมู่เมทิล (methylation) วิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MSAP ในงานวิจัยนี้จะใช้วิธีการประยุกต์จาก Portis *et. al.* (2004) โดยจะเริ่มจากการตัดดีเอ็นเอและเชื่อมต่อกับ adapter โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยสารดังตารางที่ 5 และลำดับเบสของ adapter ทั้ง 2 ชนิด ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 5 องค์ประกอบและปริมาตรสารที่ใช้ในปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อกับ adapter

องค์ประกอบ	ปริมาตร ( $\mu$ l)
100 ng/ $\mu$ l gDNA	2.50
<i>EcoRI</i> (10U/ $\mu$ l)	0.25
<i>MspI</i> (10U/ $\mu$ l) หรือ <i>HpaII</i> (10U/ $\mu$ l)	0.50
10x buffer $Y^+$ (สำหรับ <i>MspI</i> ) หรือ	2.50
10x buffer TANGO (สำหรับ <i>HpaII</i> )	
<i>EcoRI</i> adapter (5 pmol/ $\mu$ l)	1.0

ตารางที่ 5 (ต่อ)

องค์ประกอบ	ปริมาตร (μl)
HM adapter (25 pmol/μl)	2.0
T <sub>4</sub> DNA ligase (5U/μl)	0.2
10X T <sub>4</sub> ligase buffer	5.0
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	36.05
ปริมาตรรวม	50.00

ตารางที่ 6 ลำดับเบสของ adapters ที่ใช้ในเทคนิค MSAP

ชนิดของ adapter	ลำดับเบส 5'-3'
<i>EcoRI</i> adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
<i>HpaII/MspI</i> adapter	5'-GATCATGAGTCCTGAT-3' 3'-AGTACTCAGGACGAGC-5'

การวิเคราะห์จะแบ่งปฏิกิริยาเป็น 2 ชุดคือตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI* ชุดหนึ่ง และแทนที่ *MspI* ด้วย *HpaII* อีกชุดหนึ่ง หลังจากผสมสารต่าง ๆ เข้าด้วยกันเพื่อเชื่อมต่อชิ้นส่วนของ ดีเอ็นเอกับ adapter แล้วนำไปป้อนที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 65 °C นาน 10 นาที นำไปเจือจาง 10 เท่าด้วย TE buffer (1mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8) เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเออีก 2 ขั้นตอนดังนี้

1. Preselective amplification ขั้นตอนนี้จะเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ ที่เป็นคู่สมกับส่วนของ adapter และบริเวณจดจำของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัวที่ปลายด้าน 3' (primer+1) คือไพรเมอร์ E+A และ HM+T ซึ่งมีลำดับเบสเป็น

EcoRI primer (E+A)      5'-GACTGCGTACCAATTC**A**-3'

HM primer (HM+T)      5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGT**T**-3'

โดยสารที่เป็นองค์ประกอบในปฏิกิริยาดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 องค์ประกอบและปริมาตรสารที่ใช้ในปฏิกิริยา Preselective amplification

องค์ประกอบ	ปริมาตร( $\mu$ l)
ดีเอ็นเอจากการเชื่อมต่อและเจือจาง 10 เท่า	2.0
<i>Eco</i> RI primer+A (5 pmol/ $\mu$ l)	1.0
HM primer+T (5 pmol/ $\mu$ l)	1.0
dNTP (2mM)	2.5
10x PCR buffer	2.5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.75
<i>Taq</i> DNA polymerase (5U/ $\mu$ l)	0.1
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	15.15
ปริมาตรรวม	25.0

ผสมสารต่าง ๆ เข้าด้วยกัน นำเข้าเครื่อง PCR โดยใช้อุณหภูมิและเวลาดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 ° C 60 วินาที

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 ° C 30 วินาที

ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 55 ° C 30 วินาที

ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 72 ° C 60 วินาที

ทำซ้ำขั้นที่ 2 ถึง 4 รวม 25 รอบ

ขั้นที่ 5 อุณหภูมิ 72 ° C 10 นาที

หลังครบปฏิกิริยาแล้ว แบ่งผลผลิต PCR มาตรวจสอบโดย agarose gel electrophoresis ในเจล 1% agarose gel จากนั้นเจือจาง 30 เท่าด้วย TE buffer เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาขั้นที่ 2 ต่อไป

2. Selective amplification ในขั้นตอนนี้จะเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นคู่สมกับส่วนของ adapter และบริเวณจดจำของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัวที่ปลายด้าน 3' (primer+3) รวมทั้งหมดมี 12 คู่ไพรเมอร์

ตารางที่ 8 ลำดับเบสของ primer+3 ที่ใช้ในการศึกษา

ไพรเมอร์	ลำดับเบส
E+AAC	5'-GACTGCGTACCAATTCA <u>AAC</u> -3'
E+ACG	5'-GACTGCGTACCAATTCA <u>ACG</u> -3'
E+ACT	5'-GACTGCGTACCAATTCA <u>ACT</u> -3'
E+AGT	5'-GACTGCGTACCAATTCA <u>AGT</u> -3'
HM+TAA	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGG <u>TAA</u> -3'
HM+TCC	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGG <u>TCC</u> -3'
HM+TTC	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGG <u>TTC</u> -3'

โดยสารที่เป็นองค์ประกอบในปฏิกิริยาดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 องค์ประกอบและปริมาตรสารที่ใช้ในปฏิกิริยา Selective amplification

องค์ประกอบ	ปริมาตร(μl)
ผลผลิตพีซีอาร์จากขั้นที่แล้วที่เจือจาง 30 เท่า	5.0
<i>Eco</i> RI primer+ANN (5 pmol/μl)	1.0
HM primer+TNN (5 pmol/μl)	1.0
dNTP mix (2mM)	2.0
10x PCR buffer	2.0
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.6
<i>Taq</i> DNA polymerase (5U/μl)	0.1
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	8.3
ปริมาตรรวม	20.0

ผสมสารต่าง ๆ เข้าด้วยกัน นำเข้าเครื่อง PCR โดยใช้อุณหภูมิและเวลาดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 ° C 30 วินาที

ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 65 ° C 30 วินาที

ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72 ° C 60 วินาที

ลดอุณหภูมิในขั้น annealing ลงรอบละ 0.7 ° C จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย

ขั้นที่ 5 อุณหภูมิ 94 ° C 30 วินาที

ขั้นที่ 6 อุณหภูมิ 56 ° C 30 วินาที

ขั้นที่ 7 อุณหภูมิ 72 ° C 60 วินาที

ทำซ้ำขั้นที่ 5 ถึง 7 รวม 23 รอบ

เมื่อครบปฏิกิริยาแล้ว นำผลผลิต PCR 10 µl มาเติม AFLP loading dye (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.1% bromphenol blue และ 0.1% xylene cyanol) 5 µl บ่มที่อุณหภูมิ 94 ° C เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีก่อนทำ polyacrylamide gel electrophoresis

## **6. การวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis**

1. เตรียมแผ่นกระจก 2 แผ่นสำหรับเทเจล โดยล้างกระจกทั้ง 2 แผ่นให้สะอาด เช็ดด้วย 95% ethanol จากนั้นเช็ดกระจกแผ่นตรงด้วย bind silane (bind silane 1 µl, glacial acetic acid 2.5 µl และ 95% ethanol 500 µl) เพื่อให้เจลติดกับกระจกแผ่นนี้และเช็ดกระจกแผ่นหูกระต่ายด้วย repel silane เพื่อไม่ให้เจลติดกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที แล้วประกอบกระจกทั้ง 2 แผ่นเข้าด้วยกันโดยให้ด้านที่ทา bind silane และ repel silane หันเข้าหากัน และวางแผ่น spacer ไว้ด้านข้างทั้งสองเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจก ใช้คลิปหนีบยึดให้อยู่คงที่

2. เตรียม 6 % acrylamide gel โดยมีส่วนประกอบดังนี้ ยูเรีย 13.5 กรัม, 10x TBE 3 ml, 10% APS 300 µl, TEMED 15 µl, 30% acrylamide (29% acrylamide และ 1% methylene bisacrylamide) 6 ml และน้ำกลั่น 10.5 ml ผสมให้เข้ากันแล้วเทเจลลงในช่องว่างระหว่างกระจกจนเต็ม ใส่หัวหลอดด้านบนของกระจก ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2-3 ชั่วโมง

3. เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด ดึงหัวออก แล้วประกอบเข้ากับชุดอิเล็กทรอนิกส์แนวตั้ง เติม TBE buffer ด้านล่างของแผ่นเจล และด้านในของเครื่อง
4. ต่อสายไฟเพื่อทำ pre-run ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 300 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที
5. ปิดเครื่อง ใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์ล้างผิวหน้าเจลบริเวณช่องใส่ตัวอย่าง
6. หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผสม AFLP loading dye (ดีเอ็นเอ 10  $\mu$ l ต่อ loading dye 5  $\mu$ l) 13  $\mu$ l ลงในแต่ละช่องจนครบ ต่อสายไฟเพื่อเดินเครื่อง (run) ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 400 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 20 นาที
7. เมื่อครบเวลา ปิดเครื่องนำกระจกออกจากเครื่อง แยกแผ่นกระจกทั้ง 2 ออกจากกัน เจลจะติดอยู่กับกระจกแผ่นตรง นำไปย้อมด้วยซิลเวอร์ในเทรตต่อไป

#### 7. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยการย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ในเทรต

ดัดแปลงจาก Caetano-Anolles (1997)

1. นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่แช่ในสารละลาย fixative (10% acetic acid) นาน 20 นาที เขย่าเบา ๆ
2. ล้างแผ่นกระจกที่มีเจลในน้ำกลั่นนาน 15 นาที เปลี่ยนน้ำกลั่นใหม่และล้างต่ออีก 15 นาที เขย่าตลอดเวลา
3. นำแผ่นกระจกที่มีเจลแช่ในสารละลายซิลเวอร์ในเทรตเข้มข้น 2% นาน 30 นาที
4. แช่แผ่นกระจกที่มีเจลในน้ำกลั่น 5-10 วินาที
5. ย้อมแผ่นกระจกที่มีเจลด้วย developer (2.5% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde, 2  $\mu$ g/ml sodium thiosulfate)

6. หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นกระจกที่มีเจลแข็งใน stop solution (5% acetic acid และ 3% glycerol) นาน 5-10 นาที

7. นำแผ่นกระจกที่มีเจลแข็งในน้ำกลั่น แล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ

#### **8. การวิเคราะห์ผลจากเทคนิค MSAP**

บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากตัวอย่างดีเอ็นเอของปรอง เปรียบเทียบและวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น

#### **9. สถานที่ทำการทดลอง**

ห้องปฏิบัติการวิจัยภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ

#### **10. ระยะเวลาในการทดลอง**

เริ่มดำเนินการทดลอง มีนาคม พ.ศ. 2547 ถึง กันยายน พ.ศ. 2548

## ผลและการวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. การเตรียมดีเอ็นเอจากปรง

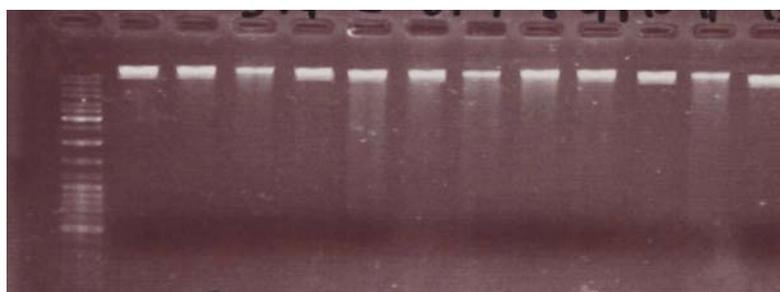
การสกัดดีเอ็นเอจากปรงจะใช้ส่วนของใบ โดยใช้วิธีการที่ประยุกต์จาก Molecular Biology Laboratory Protocols (<http://www.cipotato.org/training/Materials/Molecular/Molecular.htm>) ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้เวลาน้อย ได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และมีคุณภาพกว่าวิธีอื่น กล่าวคือดีเอ็นเอที่ได้ค่อนข้างมีคุณภาพดีคือไม่มีการแตกหักของดีเอ็นเอและการปนเปื้อนของสารพอลิแซคาไรด์ (ภาพที่ 2-3) หลักการของการสกัดดีเอ็นเอวิธีนี้คือ การบดตัวอย่างใบให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่งบดสาร โดยใช้สารที่มีส่วนประกอบของ Cethyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) ซึ่งเป็นสารซักฟอก (detergent) ช่วยทำลายเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อปล่อยดีเอ็นเอออกมาสู่ extraction buffer ซึ่งมี Tris-HCl และ โซเดียมคลอไรด์ช่วยรักษาสภาพความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสมต่อกรดนิวคลีอิก นอกจากนี้ยังมีสารที่ทำหน้าที่อื่น ๆ ดังนี้ Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) จะช่วยป้องกันดีเอ็นเอจากการย่อยสลายจากเอนไซม์ endogenous nuclease โดยกำจัด co-factor ต่าง ๆ ของเอนไซม์ nuclease สาร Beta-Mercaptoethanol ทำหน้าที่ทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของ endogenous nuclease และป้องกันการออกซิไดซ์ของสารกลุ่มฟีนอลิกไปเป็นสารประกอบ quinonic ทำให้ดีเอ็นเอเป็นสีน้ำตาลและเสียหาย กรดนิวคลีอิกจะมีสมบัติทางเคมีเปลี่ยนไปเมื่อจับกับสารพวกฟีนอลิก สาร polyvinylpyrrolidone (PVP) ช่วยกำจัดสารพวกพอลิฟีนอล โดยสร้างพันธะทางเคมีทำให้ไม่สามารถละลายน้ำได้และแยกชั้นออกมา การสกัดแยกโปรตีนจะใช้สารละลาย Chloroform : isoamyl alcohol (24:1) โดยปริมาตร ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้ absolute ethanol จากนั้นละลายดีเอ็นเอใน TE buffer และกำจัด RNA โดยเอนไซม์ RNaseA ทั้งนี้บางครั้งพบว่าสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มีการปนเปื้อนของสารพอลิแซคาไรด์ โดยจะสังเกตได้จากภายในช่องใส่ตัวอย่างของเจลอะกาโรสยังมี ดีเอ็นเอตกค้างอยู่ และสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จะมีลักษณะคล้ายวุ้น สารพวกนี้มีขนาดโมเลกุลใหญ่จึงไม่สามารถผ่านเจลอะกาโรสได้และสารกลุ่มนี้ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ การลดสารพวกพอลิแซคาไรด์ อาจทำได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของ CTAB ในขั้นตอนของการสกัดหรือตกตะกอนดีเอ็นเอในสภาพเกลือสูงซึ่งพอลิแซคาไรด์จะไม่ตกตะกอน ทำให้สามารถแยกดีเอ็นเอได้บริสุทธิ์มากขึ้น การเก็บรักษาดีเอ็นเอจะเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -20° C จนกว่าจะนำมาใช้งาน การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอจะตรวจสอบ 2 วิธีคือการวัดการดูดกลืนคลื่นแสงและตรวจสอบใน agarose gel เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง อัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ( $A_{260}/A_{280}$ ) พบว่าดีเอ็นเอมีค่าการดูดกลืน

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



ภาพที่ 2 จีโนมิกดีเอ็นเอความเข้มข้นประมาณ 500 ng ของปรงสกุล *Cycas* 1: *Cycas chamaoensis* เพศผู้, 2: *Cycas clivicola* เพศผู้, 3: *Cycas edentata* เพศผู้, 4: *Cycas elephantipes* เพศผู้, 5: *Cycas pectinata* เพศผู้, 6: *Cycas siamensis* เพศผู้, 7: *Cycas chamaoensis* เพศเมีย, 8: *Cycas clivicola* เพศเมีย, 9: *Cycas edentata* เพศเมีย, 10: *Cycas elephantipes* เพศเมีย, 11: *Cycas pectinata* เพศเมีย, 12: *Cycas siamensis* เพศเมีย, M: DNA มาตรฐาน (Fermentus)

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



ภาพที่ 3 จีโนมิกดีเอ็นเอความเข้มข้นประมาณ 500 ng ของปรงสกุล *Zamia* 1: *Zamia amblyphillidia* เพศผู้, 2: *Zamia herrarea* เพศผู้, 3: *Zamia inermis* เพศผู้, 4: *Zamia integrifolia* เพศผู้, 5: *Zamia loddigesii* เพศผู้, 6: *Zamia pumila* เพศผู้, 7: *Zamia amblyphillidia* เพศเมีย, 8: *Zamia herrarea* เพศเมีย, 9: *Zamia inermis* เพศเมีย, 10: *Zamia integrifolia* เพศเมีย, 11: *Zamia loddigesii* เพศเมีย, 12: *Zamia pumila* เพศเมีย, M : DNA มาตรฐาน (Fermentus)

คลื่นแสงอยู่ระหว่าง 1.6-1.8 ซึ่งถือว่าดีเอ็นเอมีคุณภาพค่อนข้างดีแต่ยังมีการปนเปื้อนของโปรตีนอยู่บ้างเล็กน้อย อย่างไรก็ตามวิธีการนี้นับเป็นวิธีการที่สามารถสกัดดีเอ็นเอจากปรงได้ดีในระดับหนึ่ง

## 2. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD

จากการทดสอบไพรมอร์ขนาด 10-12 นิวคลีโอไทด์จำนวน 216 ชนิดกับดีเอ็นเอของปรง *Cycas clivicola* และ *Zamia integrifolia* ทั้งเพศผู้และเพศเมียด้วยเทคนิค RAPD พบไพรมอร์จำนวน 38 ชนิด (ตารางที่ 10) คิดเป็น 17.59% ของจำนวนไพรมอร์ทั้งหมดสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดี และมีแนวโน้มที่จะใช้บ่งชี้เพศในปรงได้ จึงคัดเลือกมาวิเคราะห์ต่อในตัวอย่างปรงทั้ง 12 ชนิด

ตารางที่ 10 ไพรมอร์ 38 ชนิดที่คัดเลือกมาทำ RAPD กับตัวอย่างปรงทั้ง 12 พันธุ์

ชุด ไพรมอร์	หมายเลขไพรมอร์
AA	07, 11, 16
AB	11, 18
AC	05, 10, 15, 19
AD	11
AF	07
AH	02, 19
AI	05, 11, 12
OPA	01, 07, 08, 09, 11, 16, 19
OPB	08
OPC	11
OPD	06, 07, 13
OPE	09, 11
OPF	06, 11, 13, 15

ตารางที่ 10 (ต่อ)

ชุด ไพรเมอร์	หมายเลขไพรเมอร์
OPI	14
OPK	16
OPX	05
U.B.C.	09

จากการศึกษาจากไพรเมอร์ 38 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 386 แถบ เฉลี่ย 10.15 แถบต่อไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 70 แถบ (18.13%) ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปรงบางชนิดดังนี้

1. ไพรเมอร์ OPA-11 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบสที่จำเพาะกับ *Cycas chamaoensis* เพศผู้ และ *Cycas clivicola* เพศเมีย แถบดีเอ็นเอขนาด 1,031 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas siamensis* เพศเมีย แถบดีเอ็นเอขนาด 850 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia amblyphyllidia* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 1,031 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia integrifolia* เพศเมีย แถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบสและ 1,200 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia loddigesii* เพศผู้ และแถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia pumila* เพศเมีย รวมทั้งหมด 8 แถบ (ภาพที่ 4)
2. ไพรเมอร์ OPA-08 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 คู่เบสที่จำเพาะกับ *Cycas chamaoensis* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 1,500 คู่เบสที่จำเพาะกับ *Cycas chamaoensis* เพศเมีย แถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบสที่จำเพาะกับ *Cycas pectinata* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบสที่จำเพาะกับ *Zamia amblyphyllidia* เพศผู้ และแถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 คู่เบสที่จำเพาะกับ *Zamia pumila* เพศเมีย รวมทั้งหมด 5 แถบ (ภาพที่ 5)
3. ไพรเมอร์ OPF-15 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas clivicola* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas pectinata* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 550 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas siamensis* เพศเมีย แถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia amblyphyllidia* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia loddigesii* เพศเมีย และ *Zamia pumila* เพศผู้ รวม 6 แถบ (ภาพที่ 6)

4. ไพรเมอร์ OPK-16 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas chamaoensis* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 550 คู่เบส จำเพาะกับ *Cycas siamensis* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 1,500 คู่เบส จำเพาะกับ *Cycas clivicola* เพศเมีย แถบดีเอ็นเอขนาด 600 คู่เบส จำเพาะกับ *Zamia loddigesii* เพศเมีย และแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,031 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia pumila* เพศผู้ รวมทั้งหมด 5 แถบ (ภาพที่ 7)

5. ไพรเมอร์ OPA-07 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 350 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas chamaoensis* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 525 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas clivicola* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 450 คู่เบส *Cycas edentata* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas edentata* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 1,031 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas siamensis* เพศผู้ และแถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas siamensis* เพศเมีย รวมทั้งหมด 6 แถบ (ภาพที่ 8)

6. ไพรเมอร์ AC-19 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas chamaoensis* เพศเมีย แถบดีเอ็นเอขนาด 600 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia amblyphyllidia* เพศเมีย และแถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia loddigesii* เพศผู้ รวมทั้งหมด 3 แถบ (ภาพที่ 9)

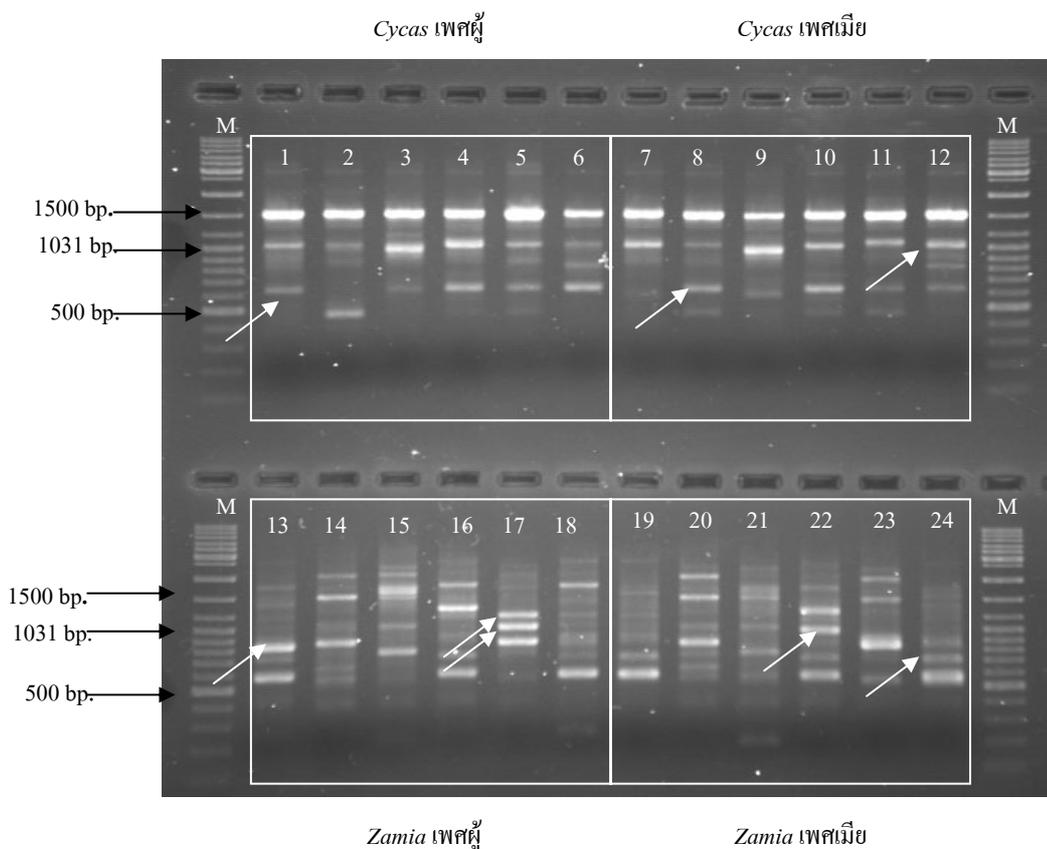
7. ไพรเมอร์ OPF-06 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas clivicola* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas elephantipes* เพศเมีย แถบดีเอ็นเอขนาด 1,031 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas siamensis* เพศเมีย แถบดีเอ็นเอขนาด 3,000 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia herrarea* และ *Zamia loddigesii* เพศผู้ รวมทั้งหมด 5 แถบ (ภาพที่ 10)

8. ไพรเมอร์ OPD-06 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 200 คู่เบสและ 300 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas clivicola* เพศผู้และแถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia inermis* เพศผู้ รวมทั้งหมด 3 แถบ (ภาพที่ 11)

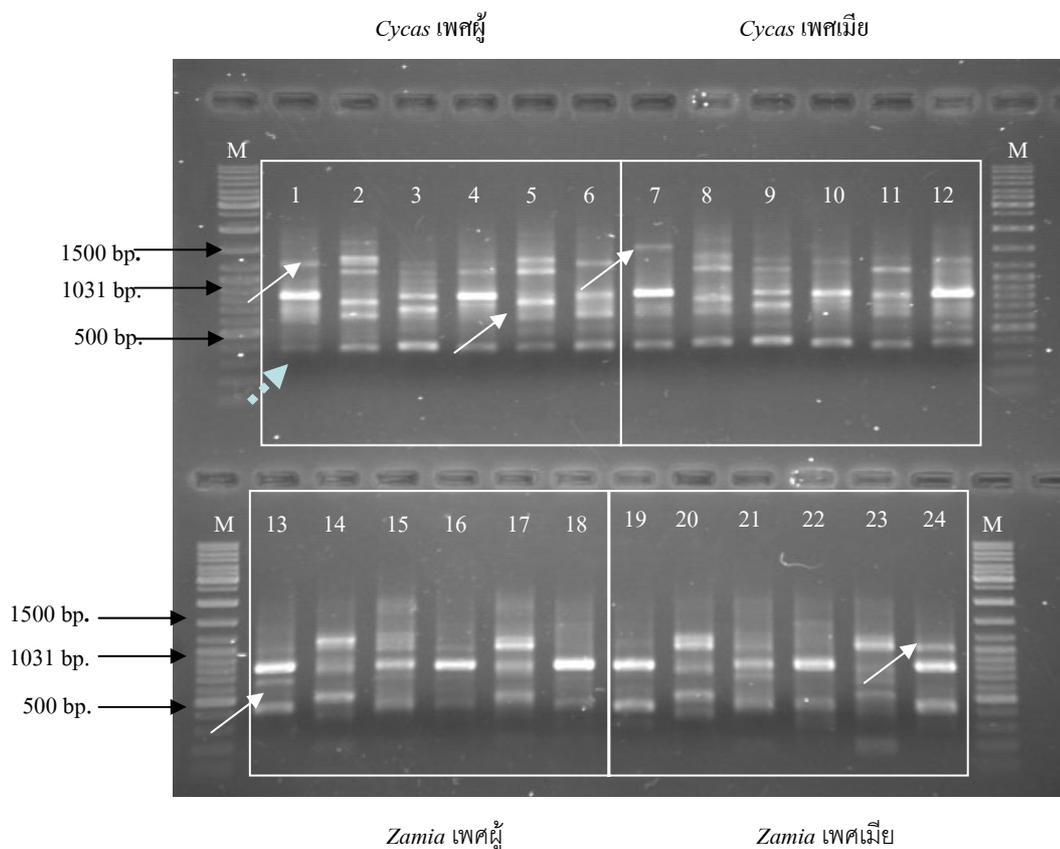
9. ไพรเมอร์ OPF-13 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 600 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia amblyphyllidia* เพศเมีย และ 1,200 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia loddigesii* เพศผู้ รวม 2 แถบ (ภาพที่ 12)

10. ไพรเมอร์ OPB-08 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 850 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia integrifolia* เพศผู้ และแถบดีเอ็นเอขนาด 1,300 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia loddigesii* เพศผู้ รวม 2 แถบ (ภาพที่ 13)

11. ไพรเมอร์ AH-02 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 950 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas siamensis* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia pumila* เพศผู้ และ *Zamia integrifolia* เพศเมีย แถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia inermis* เพศเมีย รวมทั้งหมด 4 แถบ (ภาพที่ 14)
12. ไพรเมอร์ AA-11 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 650 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas clivicola* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 575 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia amblyphyllidia* เพศผู้ และแถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia loddigesii* เพศผู้ รวมทั้งหมด 3 แถบ
13. ไพรเมอร์ OPA-01 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas chamaoensis* เพศเมีย และแถบดีเอ็นเอขนาด 1,031 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia loddigesii* เพศผู้ รวม 2 แถบ
14. ไพรเมอร์ AC-10 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,250 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas chamaoensis* เพศเมีย เพียง 1 แถบ
15. ไพรเมอร์ AB-11 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,600 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas chamaoensis* เพศเมีย และ *Cycas siamensis* เพศเมีย แถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas pectinata* เพศเมีย แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia loddigesii* เพศผู้ และแถบดีเอ็นเอขนาด 950 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia inermis* เพศเมีย รวมทั้งหมด 5 แถบ
16. ไพรเมอร์ OPX-05 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 375 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas clivicola* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 2,000 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas pectinata* เพศผู้ และแถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia amblyphyllidia* เพศผู้ รวมทั้งหมด 3 แถบ
17. ไพรเมอร์ AI-12 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,300 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas clivicola* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 675 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia amblyphyllidia* เพศผู้ และ *Zamia pumila* เพศเมีย แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas pectinata* เพศเมีย รวมทั้งหมด 4 แถบ
18. ไพรเมอร์ U.B.C.09 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 200 คู่เบสจำเพาะกับ *Cycas chamaoensis* เพศผู้ แถบดีเอ็นเอขนาด 350 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia pumila* เพศเมีย และแถบดีเอ็นเอขนาด 1,031 คู่เบสจำเพาะกับ *Zamia loddigesii* เพศผู้ รวม 3 แถบ



ภาพที่ 4 ดายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรังจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ OPA-11 ลูกศรระบุแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศในปรังบางชนิด 1: *Cycas chamaoensis* พืชผู้, 2: *Cycas clivicola* พืชผู้, 3: *Cycas edentata* พืชผู้, 4: *Cycas elephantipes* พืชผู้, 5: *Cycas pectinata* พืชผู้, 6: *Cycas siamensis* พืชผู้, 7: *Cycas chamaoensis* พืชเมีย, 8: *Cycas clivicola* พืชเมีย, 9: *Cycas edentata* พืชเมีย, 10: *Cycas elephantipes* พืชเมีย, 11: *Cycas pectinata* พืชเมีย, 12: *Cycas siamensis* พืชเมีย, 13: *Zamia amblyphillidia* พืชผู้, 14: *Zamia herrarea* พืชผู้, 15: *Zamia inermis* พืชผู้, 16: *Zamia integrifolia* พืชผู้, 17: *Zamia loddigesii* พืชผู้, 18: *Zamia pumila* พืชผู้, 19: *Zamia amblyphillidia* พืชเมีย, 20: *Zamia herrarea* พืชเมีย, 21: *Zamia inermis* พืชเมีย, 22: *Zamia integrifolia* พืชเมีย, 23: *Zamia loddigesii* พืชเมีย, 24: *Zamia pumila* พืชเมีย, M : DNA มาตรฐาน (Fermentus)



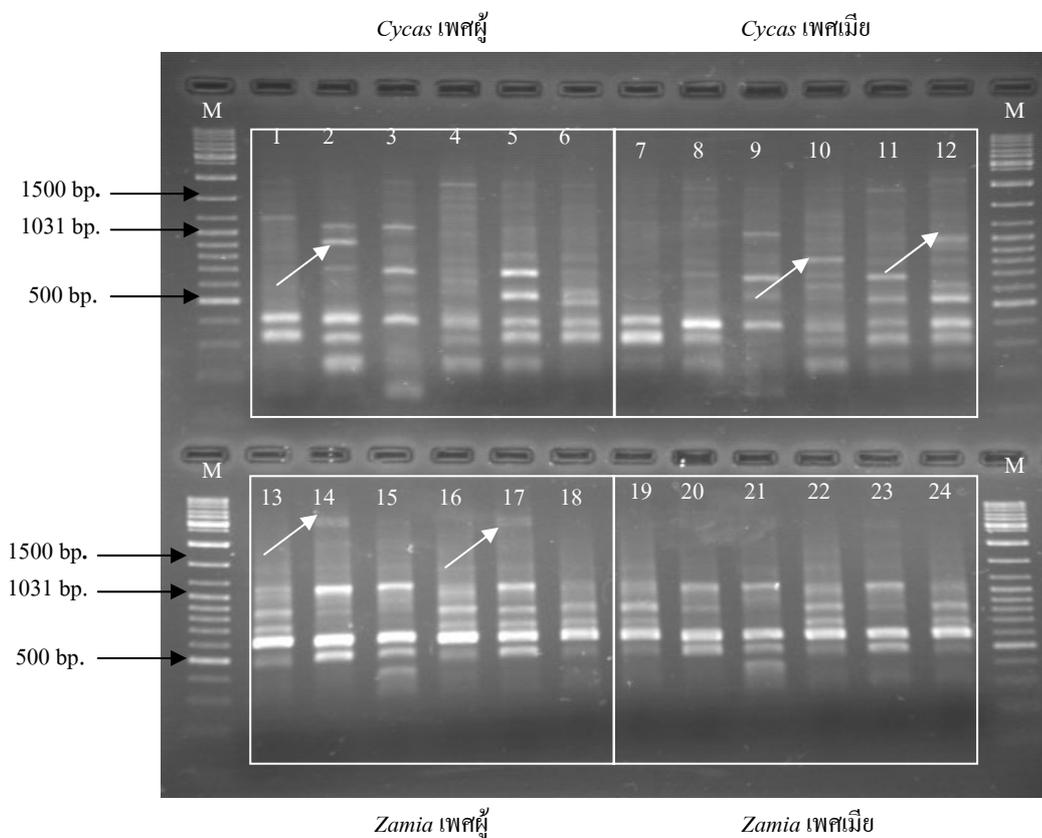
ภาพที่ 5 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรังจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ OPA-08 ลูกศรระบุแถบ ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศในปรังบางชนิด ลูกศรเส้นประระบุแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับปรัง แต่ละสกุล 1: *Cycas chamaoensis* เพศผู้, 2: *Cycas clivicola* เพศผู้, 3: *Cycas edentata* เพศผู้, 4: *Cycas elephantipes* เพศผู้, 5: *Cycas pectinata* เพศผู้, 6: *Cycas siamensis* เพศผู้, 7: *Cycas chamaoensis* เพศเมีย, 8: *Cycas clivicola* เพศเมีย, 9: *Cycas edentata* เพศเมีย, 10: *Cycas elephantipes* เพศเมีย, 11: *Cycas pectinata* เพศเมีย, 12: *Cycas siamensis* เพศเมีย, 13: *Zamia amblyphillidia* เพศผู้, 14: *Zamia herrarea* เพศผู้, 15: *Zamia inermis* เพศผู้, 16: *Zamia integrifolia* เพศผู้, 17: *Zamia loddigesii* เพศผู้, 18: *Zamia pumila* เพศผู้, 19: *Zamia amblyphillidia* เพศเมีย, 20: *Zamia herrarea* เพศเมีย, 21: *Zamia inermis* เพศเมีย, 22: *Zamia integrifolia* เพศเมีย, 23: *Zamia loddigesii* เพศเมีย, 24: *Zamia pumila* เพศเมีย, M : DNA มาตรฐาน (Fermentus)



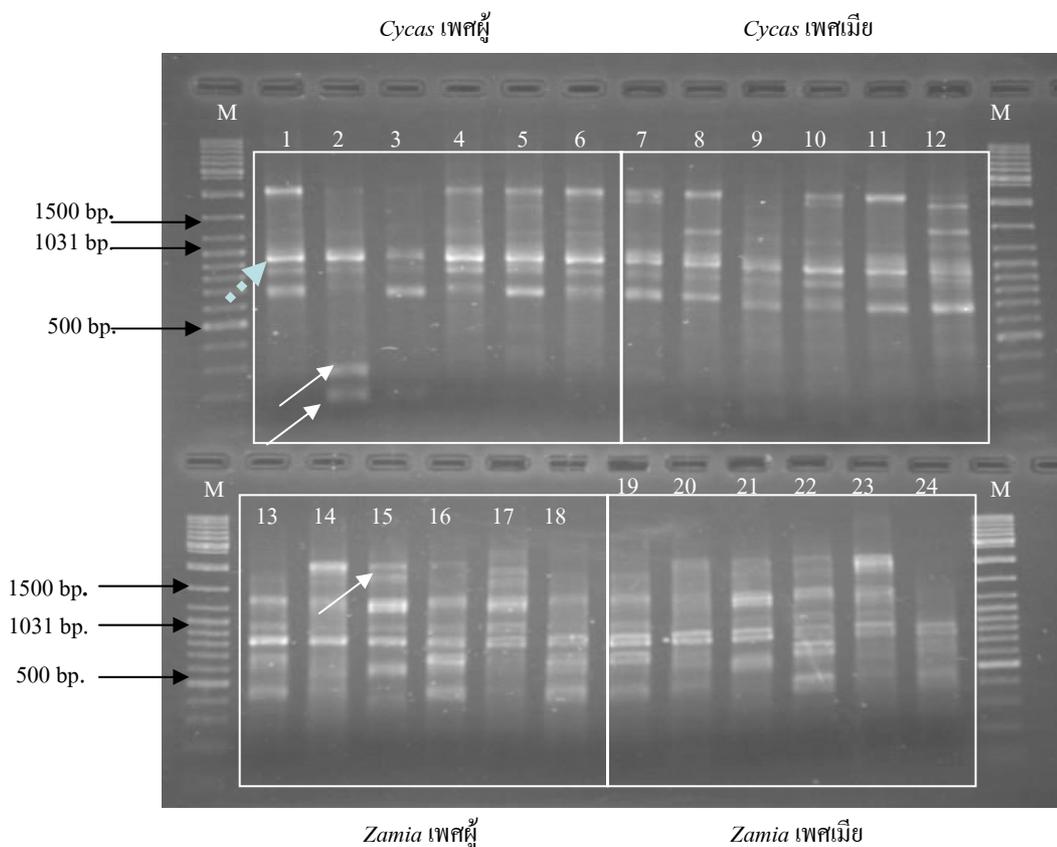








ภาพที่ 10 คลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ OPF-06 ลูกศรระบุแถบ ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศในปรงบางชนิด 1: *Cycas chamaoensis* เพศผู้, 2: *Cycas clivicola* เพศผู้, 3: *Cycas edentata* เพศผู้, 4: *Cycas elephantipes* เพศผู้, 5: *Cycas pectinata* เพศผู้, 6: *Cycas siamensis* เพศผู้, 7: *Cycas chamaoensis* เพศเมีย, 8: *Cycas clivicola* เพศเมีย, 9: *Cycas edentata* เพศเมีย, 10: *Cycas elephantipes* เพศเมีย, 11: *Cycas pectinata* เพศเมีย, 12: *Cycas siamensis* เพศเมีย, 13: *Zamia amblyphillidia* เพศผู้, 14: *Zamia herrarea* เพศผู้, 15: *Zamia inermis* เพศผู้, 16: *Zamia integrifolia* เพศผู้, 17: *Zamia loddigesii* เพศผู้, 18: *Zamia pumila* เพศผู้, 19: *Zamia amblyphillidia* เพศเมีย, 20: *Zamia herrarea* เพศเมีย, 21: *Zamia inermis* เพศเมีย, 22: *Zamia integrifolia* เพศเมีย, 23: *Zamia loddigesii* เพศเมีย, 24: *Zamia pumila* เพศเมีย, M : DNA มาตรฐาน (Fermentus)



ภาพที่ 11 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ OPD-06 ลูกศรระบุแถบ ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศในปรงบางชนิด ลูกศรเส้นประระบุแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับปรง แต่ละสกุล 1: *Cycas chamaoensis* พืชผู้, 2: *Cycas clivicola* พืชผู้, 3: *Cycas edentata* พืชผู้, 4: *Cycas elephantipes* พืชผู้, 5: *Cycas pectinata* พืชผู้, 6: *Cycas siamensis* พืชผู้, 7: *Cycas chamaoensis* พืชเมีย, 8: *Cycas clivicola* พืชเมีย, 9: *Cycas edentata* พืชเมีย, 10: *Cycas elephantipes* พืชเมีย, 11: *Cycas pectinata* พืชเมีย, 12: *Cycas siamensis* พืชเมีย, 13: *Zamia amblyphillidia* พืชผู้, 14: *Zamia herrarea* พืชผู้, 15: *Zamia inermis* พืชผู้, 16: *Zamia integrifolia* พืชผู้, 17: *Zamia loddigesii* พืชผู้, 18: *Zamia pumila* พืชผู้, 19: *Zamia amblyphillidia* พืชเมีย, 20: *Zamia herrarea* พืชเมีย, 21: *Zamia inermis* พืชเมีย, 22: *Zamia integrifolia* พืชเมีย, 23: *Zamia loddigesii* พืชเมีย, 24: *Zamia pumila* พืชเมีย, M : DNA มาตรฐาน (Fermentus)





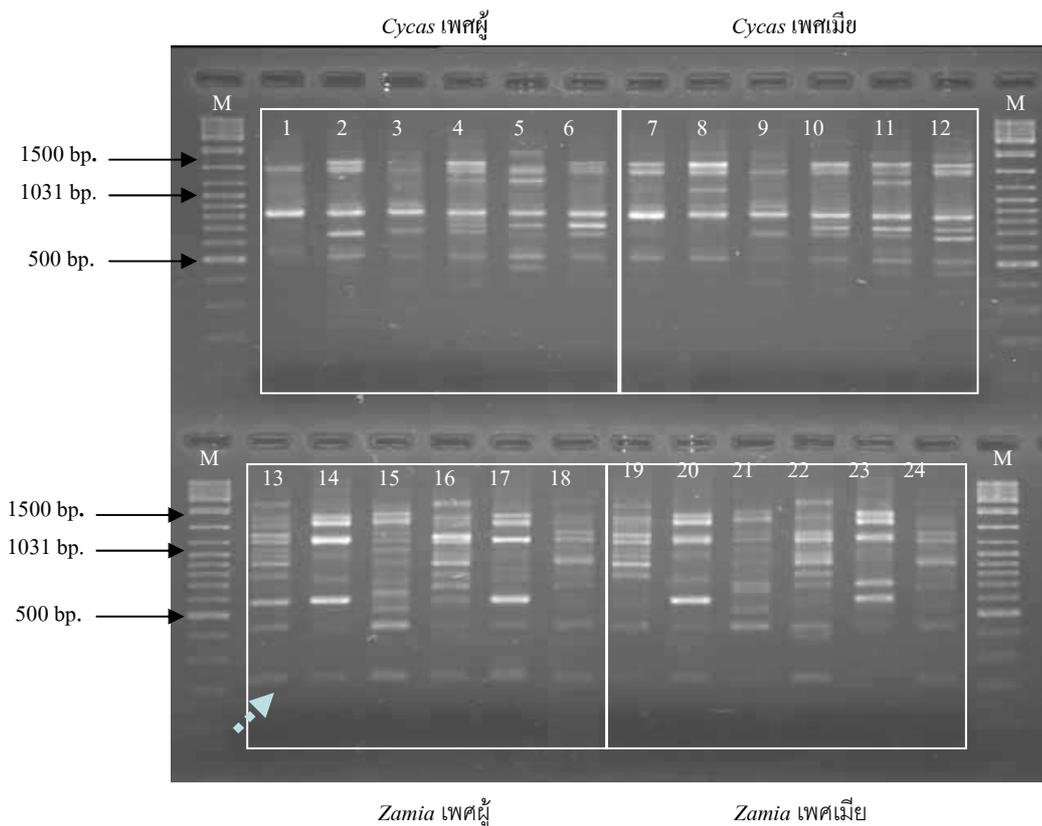


อย่างไรก็ตามแถบดีเอ็นเอทั้ง 70 แถบนี้ไม่มีแถบใดที่สามารถใช้บ่งชี้เพศของปรังได้ทุกชนิด โดยแต่ละไพรเมอร์ก็จะให้แถบดีเอ็นเอที่บ่งชี้เพศในปรังบางชนิดเท่านั้น แต่เมื่อรวมแถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ 4 ชนิดคือ OPA-11 (GTGATCGCAG), OPA-07 (GAAACGGGTG), OPF-06 (GGGAATTCGG) และ AB-11 (GTGCGCAATG) จะสามารถจำแนกเพศของปรังได้หมดทั้ง 12 ชนิด นอกจากนี้แถบดีเอ็นเอบางส่วนที่บ่งชี้เพศแล้ว ยังพบแถบดีเอ็นเอ 10 แถบที่จำเพาะต่อปรังสกุล *Cycas* และแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อปรังสกุล *Zamia* 8 แถบดังนี้

1. ไพรเมอร์ AB-11 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,700 คู่เบสจำเพาะต่อปรังสกุล *Cycas*
2. ไพรเมอร์ OPA-08 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบสจำเพาะต่อปรังสกุล *Cycas* (ภาพที่ 5)
3. ไพรเมอร์ OPF-15 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบสและ 900 คู่เบสจำเพาะต่อปรังสกุล *Cycas* และแถบดีเอ็นเอขนาด 1,031 คู่เบสจำเพาะต่อปรังสกุล *Zamia* (ภาพที่ 6)
4. ไพรเมอร์ OPK-16 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบสจำเพาะต่อปรังสกุล *Zamia* (ภาพที่ 7)
5. ไพรเมอร์ OPA-07 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบสและ 1,500 คู่เบสจำเพาะต่อปรังสกุล *Cycas* และแถบดีเอ็นเอขนาด 950 คู่เบสจำเพาะต่อปรังสกุล *Zamia* (ภาพที่ 8)
6. ไพรเมอร์ AC-19 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 450 คู่เบสและ 1,031 คู่เบสจำเพาะต่อปรังสกุล *Cycas* (ภาพที่ 9)
7. ไพรเมอร์ OPD-06 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,500 คู่เบสจำเพาะต่อปรังสกุล *Zamia* (ภาพที่ 11)
8. ไพรเมอร์ AH-02 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 600 คู่เบสจำเพาะต่อปรังสกุล *Zamia* (ภาพที่ 14)
9. ไพรเมอร์ OPX-05 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบสจำเพาะต่อปรังสกุล *Cycas* และแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบสจำเพาะต่อปรังสกุล *Zamia*

10. ไพรเมอร์ OPA-01 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 700 คู่เบสและ 1500 คู่เบสจำเพาะต่อปรงสกุล *Zamia*

11. ไพรเมอร์ AA-11 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบสจำเพาะต่อปรงสกุล *Zamia* (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรงจากเทคนิค RAPD โดยไพรเมอร์ AA-11 ลูกศรเส้นประระบุแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับปรงแต่ละสกุล 1: *Cycas chamaoensis* เพศผู้, 2: *Cycas clivicola* เพศผู้, 3: *Cycas edentata* เพศผู้, 4: *Cycas elephantipes* เพศผู้, 5: *Cycas pectinata* เพศผู้, 6: *Cycas siamensis* เพศผู้, 7: *Cycas chamaoensis* เพศเมีย, 8: *Cycas clivicola* เพศเมีย, 9: *Cycas edentata* เพศเมีย, 10: *Cycas elephantipes* เพศเมีย, 11: *Cycas pectinata* เพศเมีย, 12: *Cycas siamensis* เพศเมีย, 13: *Zamia amblyphillidia* เพศผู้, 14: *Zamia herrarea* เพศผู้, 15: *Zamia inermis* เพศผู้, 16: *Zamia integrifolia* เพศผู้, 17: *Zamia loddigesii* เพศผู้, 18: *Zamia pumila* เพศผู้, 19: *Zamia amblyphillidia* เพศเมีย, 20: *Zamia herrarea* เพศเมีย, 21: *Zamia inermis* เพศเมีย, 22: *Zamia integrifolia* เพศเมีย, 23: *Zamia loddigesii* เพศเมีย, 24: *Zamia pumila* เพศเมีย, M : DNA มาตรฐาน (Fermentus)

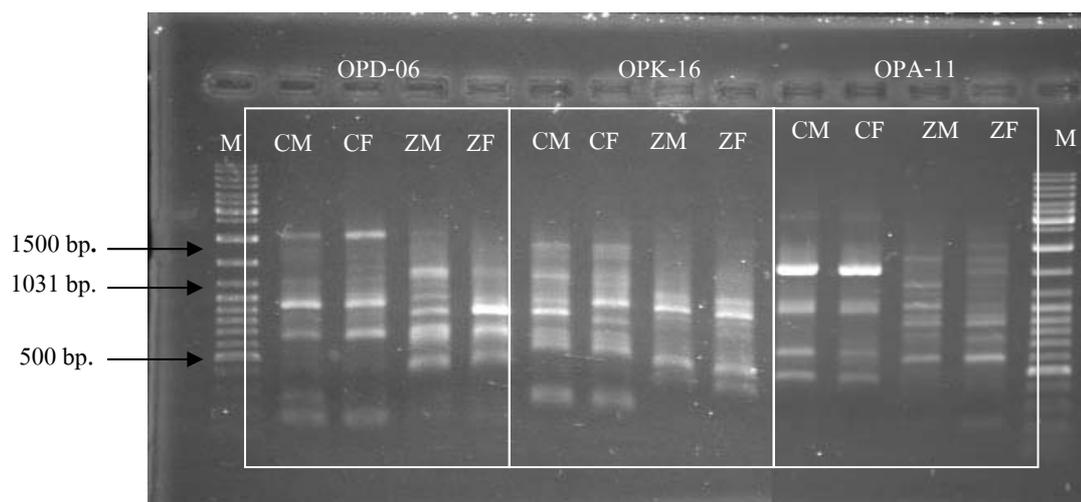
เมื่อคัดเลือกไพรมอร์บางส่วนที่ให้ความแตกต่างในปรนบางชนิดจำนวน 16 ไพรมอร์และไพรมอร์ที่ไม่ได้นำมาวิเคราะห์แบบแยกอีก 4 ชนิด รวม 20 ไพรมอร์ (ตารางที่ 11) มาวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิค pooled DNA analysis โดยรวมดีเอ็นเอเป็น 4 กลุ่มคือ *Cycas* เพศผู้ *Cycas* เพศเมีย *Zamia* เพศผู้ และ *Zamia* เพศเมีย ผลปรากฏว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์แบบแยก (individual) พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการรวมดีเอ็นเอจะให้แถบดีเอ็นเอมากกว่า ขณะที่บางไพรมอร์ก็ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนน้อยกว่าแบบแยก อย่างไรก็ตามไม่พบแถบดีเอ็นเอใด ๆ ที่สามารถบ่งชี้เพศในกลุ่มดีเอ็นเอทั้ง 4 กลุ่ม (ภาพที่ 16-20) ทั้งนี้อาจเกิดจากการวิเคราะห์ด้วย RAPD เป็นการสุ่มจับระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบกับไพรมอร์ ซึ่งหากดีเอ็นเอต้นแบบประกอบด้วยจีโนมหลายจีโนมอยู่รวมกันแล้ว อาจเกิดการแข่งขันในการจับกันของดีเอ็นเอต้นแบบหลาย ๆ ส่วนกับไพรมอร์ โดยส่วนที่จับได้ดีกว่าจะสามารถเพิ่มปริมาณได้เร็วกว่าและมากกว่า ทำให้อาจบดบังแถบดีเอ็นเอบางแถบเมื่อตรวจสอบในเจลอะกาโรส ดังนั้น RAPD อาจไม่เหมาะที่จะใช้วิเคราะห์โดยรวมดีเอ็นเอหลาย ๆ จีโนมที่แตกต่างกันเข้าด้วยกัน

ตารางที่ 11 ลำดับเบสของไพรมอร์ 20 ชนิดที่คัดเลือกมาวิเคราะห์แบบ pooled DNA analysis

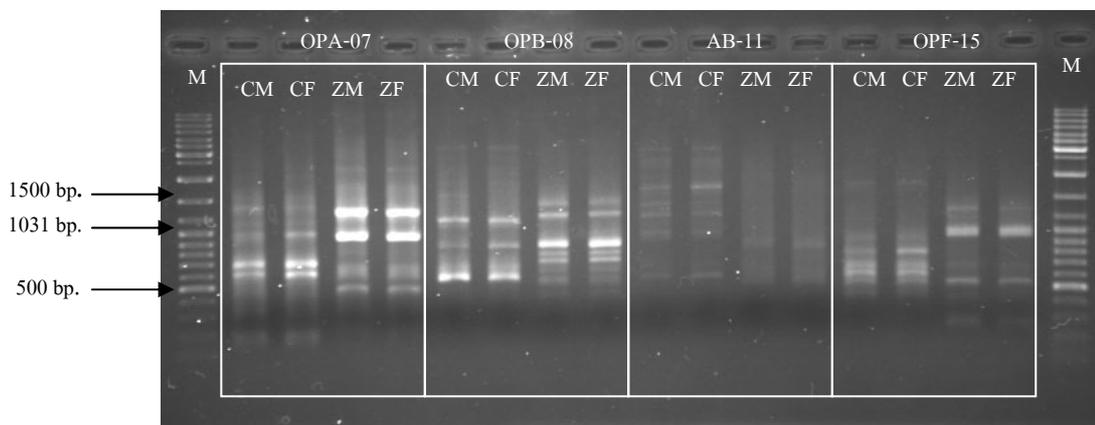
ไพรมอร์	ลำดับเบส
AA11	ACCCGACCTG
AB11	GTGCGCAATG
AC05	GTTAGTGCGG
AC10	AGCAGCGAGG
AC19	AGTCCGCCTG
AH02	CACTTCCGCT
AI12	GACGCGAACC
OPA01	CAGGCCCTTC
OPA07	GAAACGGGTG
OPA09	GGGTAACGCC
OPA11	GTGATCGCAG
OPB08	GTCCACACGG
OPD06	ACCTGAACGG
OPF03	CCTGATCACC

ตารางที่ 11 (ต่อ)

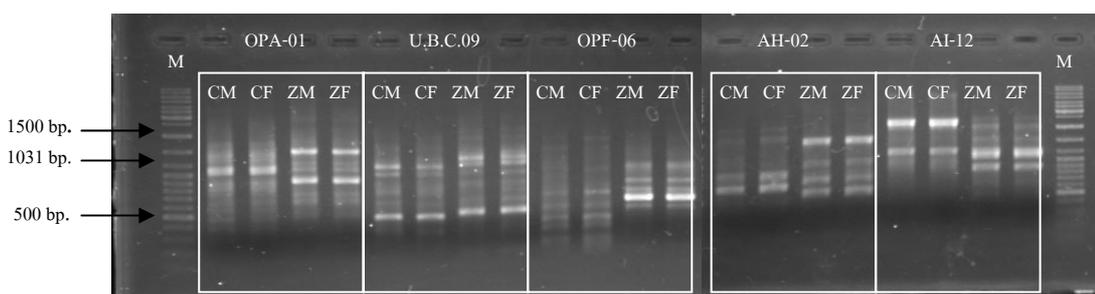
ไพรเมอร์	ลำดับเบส
OPF06	GGGAATTCGG
OPF15	CCAGTACTCC
OPI14	CCGCCTAGTC
OPK16	GAGCGTCGAA
OPX05	CCTTCCCTC
U.B.C. 09	CCTGCGCTTA



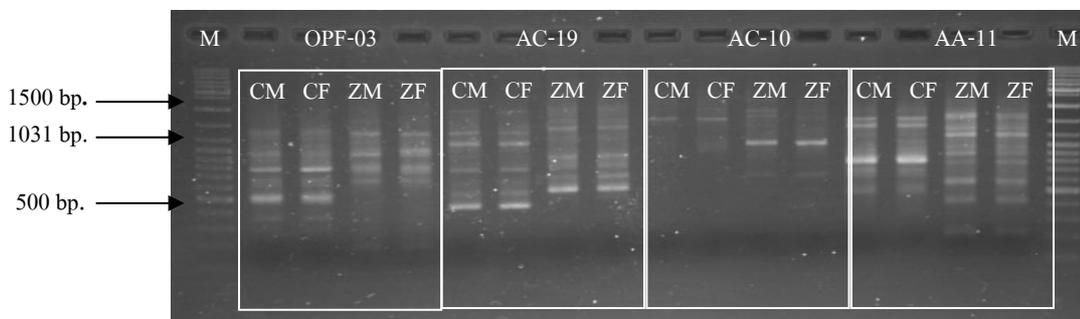
ภาพที่ 16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD ที่วิเคราะห์ร่วมกับการรวมดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ OPD-06, OPK-16 และ OPA-11 ตามลำดับ CM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศผู้, CF: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศเมีย, ZM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศผู้, ZF: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศเมีย, M: DNA มาตรฐาน (*Fermentus*)



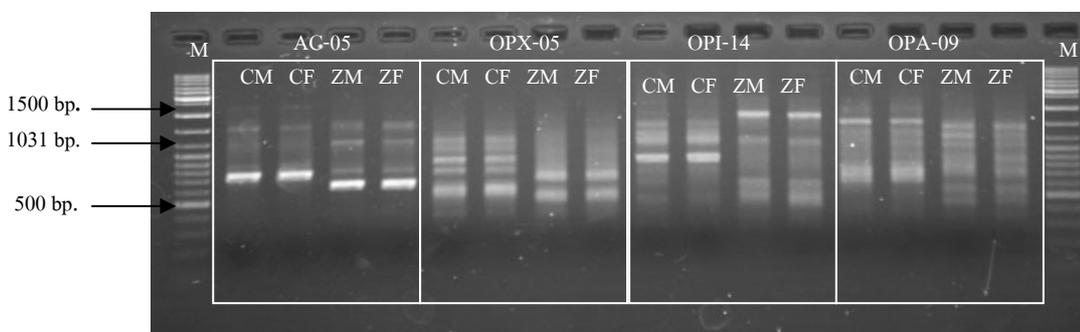
ภาพที่ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD ที่วิเคราะห์ร่วมกับการรวมดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ OPA-07, OPB-08, AB-11 และ OPF-15 ตามลำดับ CM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศผู้, CF: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศเมีย, ZM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศผู้, ZF: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศเมีย, M: DNA มาตรฐาน (Fermentus)



ภาพที่ 18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD ที่วิเคราะห์ร่วมกับการรวมดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ OPA-01, U.B.C.09, OPF-06, AH-02 และ AI-12 ตามลำดับ CM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศผู้, CF: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศเมีย, ZM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศผู้, ZF: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศเมีย, M: DNA มาตรฐาน (Fermentus)



ภาพที่ 19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD ที่วิเคราะห์ร่วมกับการรวมดีเอ็นเอโดยใช้ไพโรเมอร์ OPF-03, AC-19, AC-10 และ AA-11 ตามลำดับ CM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศผู้, CF: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศเมีย, ZM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศผู้, ZF: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศเมีย, M: DNA มาตรฐาน (Fermentus)



ภาพที่ 20 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD ที่วิเคราะห์ร่วมกับการรวมดีเอ็นเอโดยใช้ไพโรเมอร์ AC-05, OPX-05, OPI-14 และ OPA-09 ตามลำดับ CM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศผู้, CF: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศเมีย, ZM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศผู้, ZF: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศเมีย, M: DNA มาตรฐาน (Fermentus)

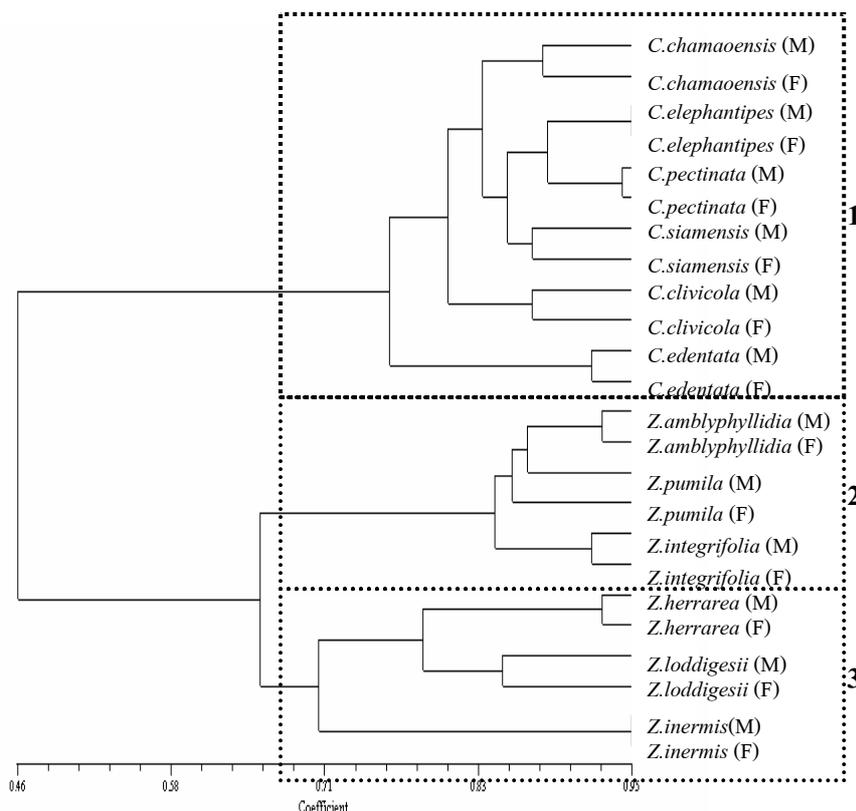
เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์แบบแยกทั้ง 386 แถบมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของปรังทั้ง 12 ชนิดด้วยโปรแกรม NTSYSpc เวอร์ชัน 2.02i และสร้างเป็น phylogenetic tree (ภาพที่ 21) พบว่าสามารถจำแนกปรังทั้งสองสกุลออกจากกันได้อย่างชัดเจน มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.460-0.950 เมื่อวิเคราะห์จาก phylogenetic tree ที่ได้พบว่าสามารถจำแนกเพศของปรังส่วนใหญ่ได้ และเพศผู้ของแต่ละชนิดมีความใกล้เคียงกับเพศเมียของปรังชนิดเดียวกัน ยกเว้น *Cycas elephantipes* และ *Zamia inermis* ที่ไม่สามารถจำแนกทั้งสองเพศด้วย phylogenetic tree ได้ซึ่งอาจเป็นเพราะจำนวน marker ที่ใช้มีจำนวนน้อยเกินไป ที่ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมประมาณ 0.658 สามารถจำแนกปรังทั้ง 12 ชนิดออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยปรังสกุล *Cycas* ทั้ง 6 ชนิดทั้งเพศผู้และเพศเมีย ได้แก่

*C. chamoensis*, *C. elephantipes*, *C. pectinata*, *C. siamensis*, *C. clivicola* และ *C. edentata* ซึ่งปรังทั้ง 6 ชนิดนี้มีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ  $2n=22$  ที่ความเหมือนทางพันธุกรรม 0.750 สามารถจำแนก *C. edentata* ออกจากปรังอีก 5 ชนิดได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลของพันธมน (2545) และ สจิจิ (2547) เนื่องจาก *C. edentata* มีแหล่งกำเนิดในประเทศฟิลิปปินส์ ขณะที่ปรังอีก 5 ชนิดมีแหล่งกำเนิดในประเทศไทย ความแตกต่างที่เกิดอาจมาจากแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกัน

กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *Z. amblyphyllidia* ( $2n=19$ ), *Z. pumila* ( $2n=16$ ) และ *Z. integrifolia* ( $2n=16$ ) ซึ่งมีแหล่งกำเนิดในเปอร์โตริโก สาธารณรัฐโดมินิกัน และคิวบา ตามลำดับ

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *Z. herrarea* ( $2n=24$ ), *Z. loddigesii* ( $2n=18$ ), *Z. inermis* ( $2n=16$ ) ปรังทั้ง 3 ชนิดมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากันแต่เมื่อพิจารณาถึงแหล่งกำเนิดพบว่า ปรังทั้ง 3 ชนิดมีแหล่งกำเนิดจากประเทศเม็กซิโกเหมือนกัน จึงอาจกล่าวได้ว่าความแตกต่างของปรังสกุล *Zamia* ในกลุ่มที่ 2 และ 3 เกิดจากแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกันเช่นเดียวกับกรณีของ *C. edentata* ในกลุ่มที่ 1



ภาพที่ 21 Phylogenetic tree ของปรังทั้ง 12 ชนิด สร้างจากแถบดีเอ็นเอ 386 แถบจากเทคนิค RAPD โดยโปรแกรม NTSYSpc เวอร์ชัน 2.02i (M คือ เพศผู้ และ F คือเพศเมีย)

จากการตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่บ่งชี้เพศในปรังสกุล *Cycas* และ *Zamia* บางชนิดโดยใช้เทคนิค RAPD พบแถบดีเอ็นเอบางส่วนที่จำเพาะต่อเพศของปรังแต่ละชนิด แต่ไม่มีแถบดีเอ็นเอใดเลยที่สามารถระบุเพศได้ในปรังทุกชนิดหรือในปรังสกุลใดสกุลหนึ่ง ในปรังสกุล *Cycas* ที่นำมาศึกษาถึงแม้ว่าจะมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน แต่ก็ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศใดเพศหนึ่งของทั้งสกุล การที่พบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในเพศใดเพศหนึ่งซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศแต่มีขนาดของแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันในปรังแต่ละชนิด อาจเป็นไปได้ว่าแถบดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับเพศนั้นมีความยาวไม่เท่ากันใน *Cycas* แต่ละชนิด ซึ่งคล้ายกับผลจากการตรวจสอบเพศของพืชสกุล *Rumex* โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาด 164 คู่เบสใน *R. navalis* เพศผู้ แต่ใน *R. acetosa* เพศผู้จะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 184 คู่เบสซึ่งภายหลังพบว่าแถบดีเอ็นเอทั้งสองมีลำดับเบสใกล้เคียงกันมาก และแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 แถบนี้มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซม Y เช่นเดียวกัน (Stehlik *et al.*, 2004) จึงอาจเป็นไปได้ว่าแถบดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ที่กระจัดกระจายอาจมีความสัมพันธ์กัน อย่างไรก็ตามยังต้องการการศึกษาเพื่อยืนยันสมมติฐานนี้ต่อไป สำหรับปรังสกุล *Zamia* ก็พบแถบดีเอ็นเอขนาด

ต่าง ๆ ที่จำเพาะกับเพศของปรองสกุล *Zamia* บางชนิดเช่นเดียวกัน แต่เนื่องจากปรองสกุลนี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงมากและจำนวนโครโมโซมของปรองสกุลนี้ที่นำมาศึกษาก็มีจำนวนไม่เท่ากัน แลบดีเอ็นเอที่ปรากฏต่างกันในแต่ละเพศจึงอาจจะเกี่ยวข้องหรือไม่เกี่ยวข้องกันก็ได้ จึงเป็นการยากที่จะตรวจหาเครื่องหมายที่จำเพาะต่อเพศในปรองสกุลนี้

เทคนิค pool DNA analysis เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงมาจากเทคนิค Bulk segregant analysis (BSA) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ช่วยให้ตรวจสอบแลบดีเอ็นเอที่ต้องการได้ง่ายขึ้นเนื่องจากพื้นฐานทางพันธุกรรมของตัวอย่างทั้งสองกลุ่มจะใกล้เคียงกันมาก เทคนิค BSA จะสร้างประชากรให้มีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน โดยจะต่างกันที่ลักษณะที่ต้องการศึกษาเพียงลักษณะเดียว แต่เนื่องจากปรองเป็นพืชที่เจริญเติบโตช้ามากจึงเป็นไปได้ยากที่จะใช้วิธีการสร้างประชากรให้มีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันจึงประยุกต์ใช้วิธี pooled DNA analysis โดยการรวมดีเอ็นเอของปรองแต่ละเพศเข้าด้วยกันเป็น 4 กลุ่มคือ *Cycas* เพศผู้, *Cycas* เพศเมีย, *Zamia* เพศผู้ และ *Zamia* เพศเมีย เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD โดยเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์แบบแยกพบว่ามีแลบดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ มากมาย แต่ก็ยังไม่พบแลบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อดีเอ็นเอกลุ่มใด นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่าแลบดีเอ็นเอบางแถบที่เคยปรากฏเมื่อวิเคราะห์แบบแยกหายไปเมื่อวิเคราะห์แบบรวม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการรวมจีโนมที่ไม่เหมือนกันหลาย ๆ จีโนมเข้าด้วยกันอาจมีผลต่อเครื่องหมายโมเลกุลบางชนิด โดยเฉพาะ RAPD ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม บริเวณใดที่ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้และไพรเมอร์หันด้าน 3' เข้าหากันก็จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงนั้นได้ แต่เนื่องจากมีจีโนมหลายจีโนมเป็นต้นแบบ จึงอาจเกิดการแข่งขันในการแย่งจับกับไพรเมอร์ บริเวณใดที่สามารถจับได้ดีกว่าก็จะเพิ่มปริมาณได้มากกว่า จึงอาจทำให้ไม่พบแลบดีเอ็นเอบางแถบที่เคยพบในการวิเคราะห์แบบแยกเพราะถูกบดบังจากแลบดีเอ็นเอแถบอื่นนั่นเอง จาก phylogenetic tree ที่สร้างจากแลบดีเอ็นเอ 386 แถบ โดยโปรแกรม NTSYSpc ver.2.02i สามารถจำแนกปรองสกุล *Cycas* ออกจากปรองสกุล *Zamia* ได้อย่างชัดเจนซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ Nostog and Nicholl (1997) ที่ระบุว่าปรองทั้ง 2 สกุลนี้มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก และยังสามารถจำแนกปรองบางส่วนออกจากกันโดยใช้ความสัมพันธ์จากแหล่งกำเนิดที่แตกต่างกันเป็นเกณฑ์

สำหรับแนวทางการหาเครื่องหมาย RAPD ที่จำเพาะต่อเพศในปรองอาจกระทำแยกในปรองแต่ละพันธุ์ โดยหาลำดับเบสของแลบดีเอ็นเอที่บ่งชี้เพศในปรองแต่ละชนิด และนำมาเปรียบเทียบเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแลบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศของปรองแต่ละพันธุ์ เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับเพศของปรองมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้ควรเพิ่มชนิดของไพรเมอร์ให้

มากขึ้นเพื่อเป็นการเพิ่มความหลากหลายของไพรเมอร์ที่จะเข้าไปสู่มจับกับบริเวณต่าง ๆ ของจีโนมให้มากขึ้น อย่างไรก็ตามการศึกษาคั้งนี้ก็ให้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับปรนมากในระดับหนึ่ง โดยเฉพาะในเรื่องการกำหนดเพศในปรน

### 3. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค MSAP

จากสมมติฐานของ Gorelick (2003) ที่เสนอว่าความแตกต่างระหว่างเพศอาจไม่ได้มาจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่อาจเกิดจากการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอที่ต่างกัน จึงทดลองนำเทคนิค MSAP (Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism) ซึ่งเป็นการประยุกต์เทคนิค AFLP เพื่อใช้ตรวจสอบรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในปรนแต่ละเพศ จากการตรวจสอบผลของการเติมหมู่เมธิลในลำดับนิวคลีโอไทด์ในปรนทั้ง 2 เพศ โดยใช้กลุ่มดีเอ็นเอ 4 กลุ่มคือ *Cycas* เพศผู้, *Cycas* เพศเมีย, *Zamia* เพศผู้ และ *Zamia* เพศเมีย ด้วยเทคนิค MSAP ที่ได้จากกรดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชุดคือ 1) *EcoRI* และ *MspI* 2) *EcoRI* และ *HpaII* จากนั้นทำพีซีอาร์อีก 2 ขั้นตอนเพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยใช้ไพรเมอร์ E+3 จำนวน 4 ชนิดและ HM+3 จำนวน 3 ชนิด รวมเป็น 12 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 7 คู่ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดี (ตารางที่ 12) จึงนำมาวิเคราะห์รูปแบบของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอต่อไป

ตารางที่ 12 คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MSAP

	HM+TAA	HM+TCC	HM+TTC
E+AAC	O	X	X
E+ACG	O	X	O
E+ACT	O	X	O
E+AGT	O	X	O

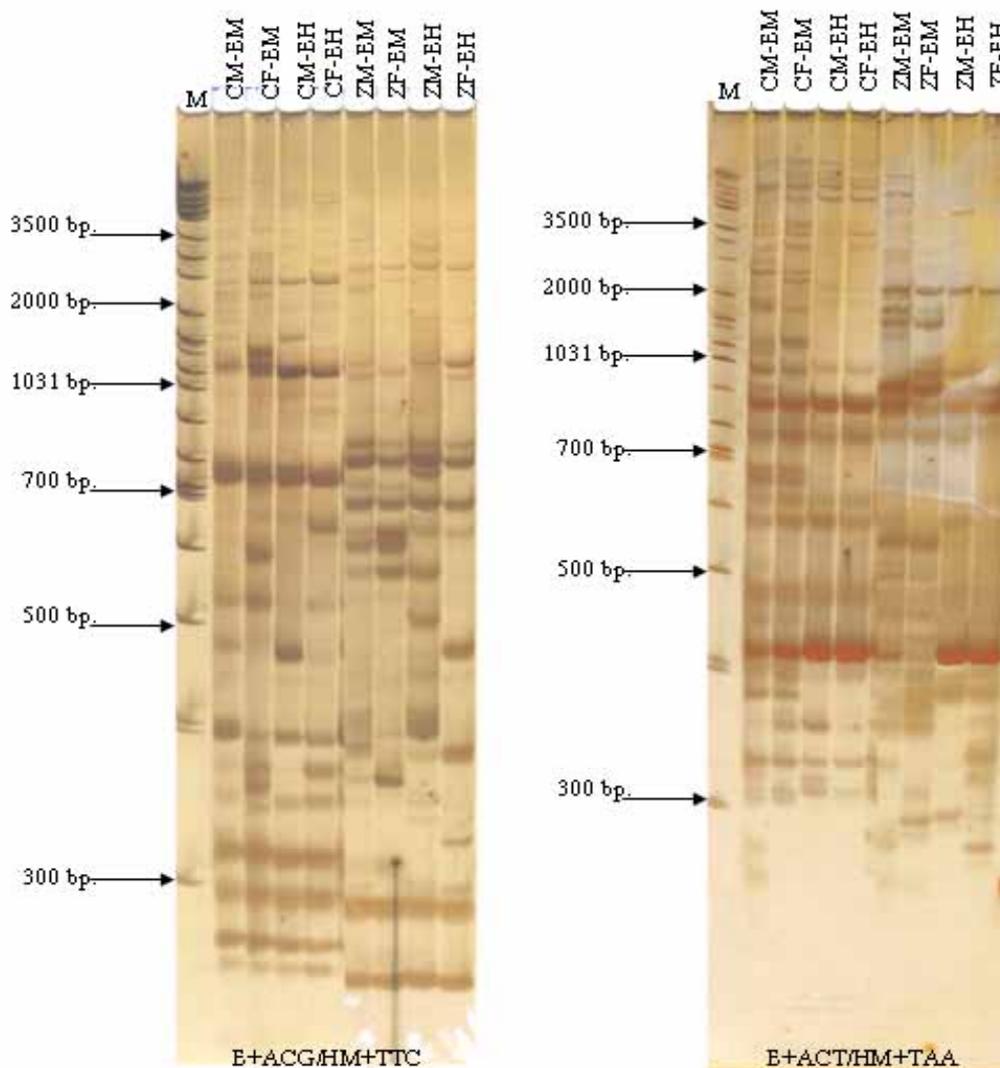
O = คู่ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดี

X = คู่ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ไม่ชัดเจน

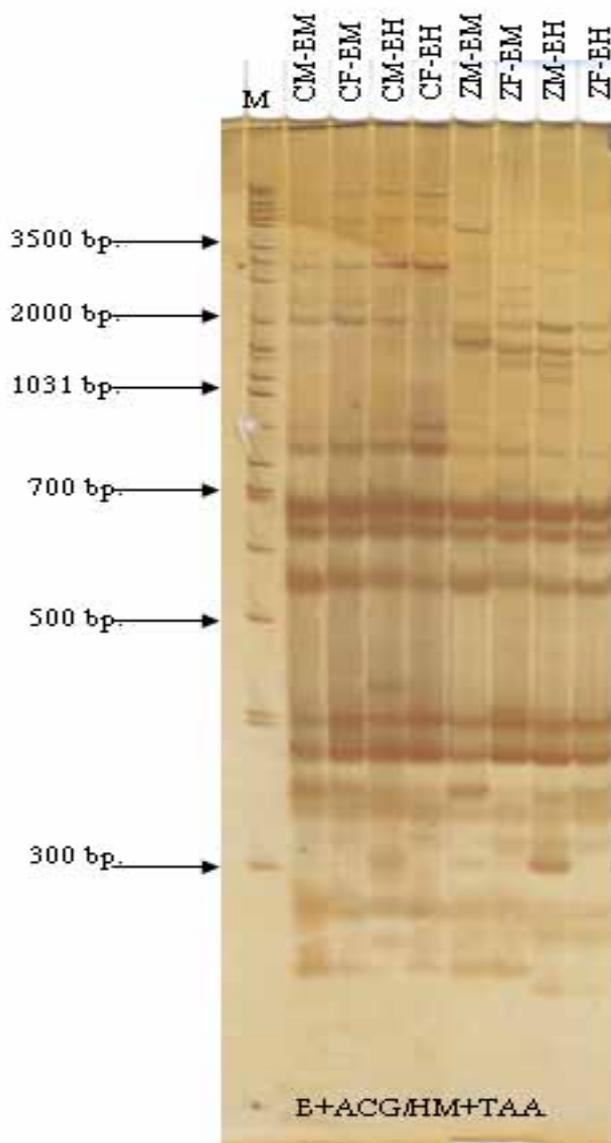
การวิเคราะห์ผลในปรังแต่ละสกุลจะเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอ 4 ช่องคือ กลุ่มดีเอ็นเอของเพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI – MspI* (M-EM), กลุ่มดีเอ็นเอของเพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI – MspI* (F-EM), กลุ่มดีเอ็นเอของเพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI - HpaII* (M-EH) และกลุ่มดีเอ็นเอของเพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI - HpaII* (F-EH) แยกเป็นปรังสกุล *Cycas* (C) และปรังสกุล *Zamia* (Z) ตามลำดับ (ภาพที่ 22-25) โดยหากปรากฏแถบดีเอ็นเอในช่องใดจะนับเป็น “1” แต่หากไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจะนับเป็น “0” จากไพรมอร์ 7 คู่ได้แถบดีเอ็นเอที่เรียกว่าเครื่องหมาย MSAP จำนวน 364 เครื่องหมาย เฉลี่ย 52 เครื่องหมายต่อคู่ไพรมอร์ ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในทั้ง 4 ช่องกล่าวคือ ทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่ว่าจะตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะคู่ใดก็ให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (1111) จึงไม่สามารถใช้ระบุความแตกต่างของเพศได้ แถบดีเอ็นเอเหล่านี้เกิดจากปรังทั้ง 2 เพศมีรูปแบบการเติมหมู่เมธิลบริเวณจดจำของเอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* เหมือนกัน และเป็นรูปแบบที่เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดไม่สามารถระบุความแตกต่างได้ แถบดีเอ็นเอกลุ่มนี้พบมากที่สุดคือประมาณ 69.23 % ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด เครื่องหมาย MSAP จำนวน 19 เครื่องหมายจำเพาะกับปรังสกุล *Cycas* และอีก 11 เครื่องหมายจำเพาะต่อปรังสกุล *Zamia*

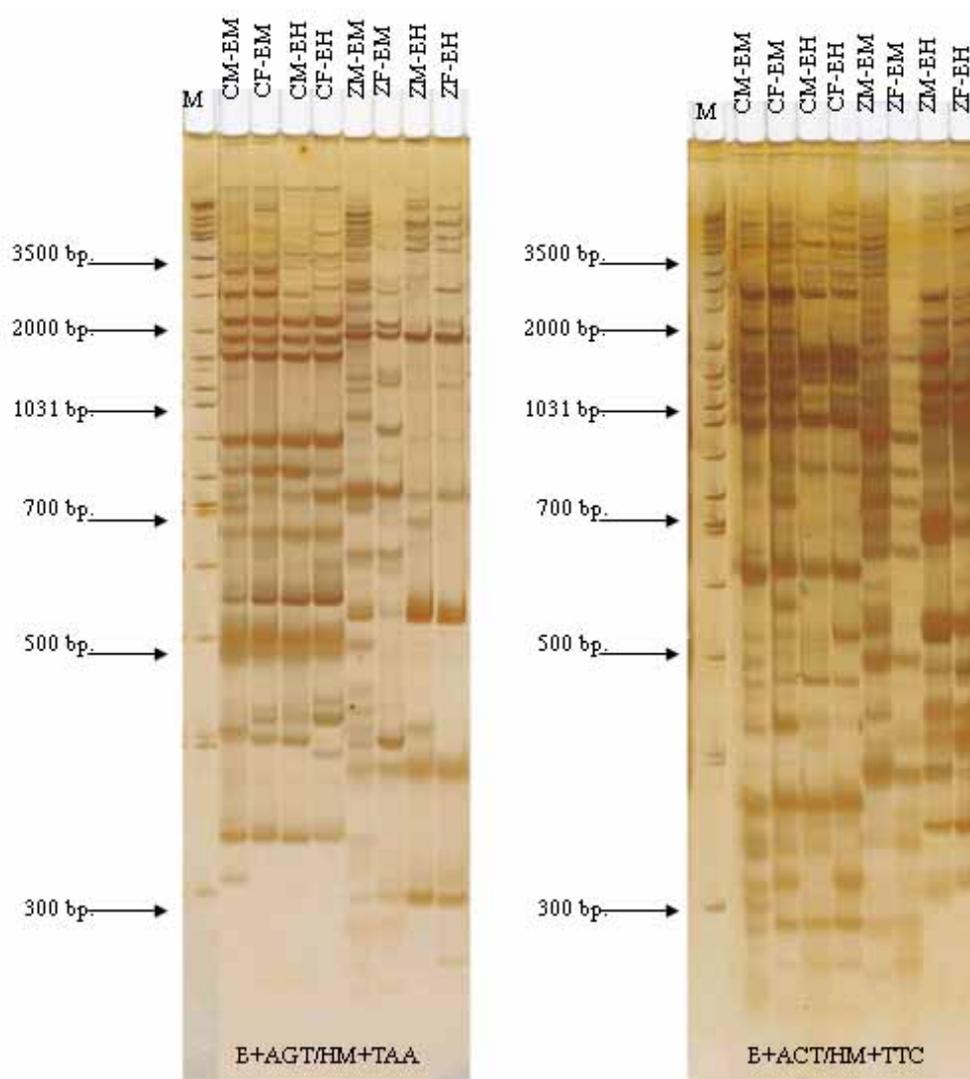
กลุ่มที่ 2 เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างระหว่างการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI – MspI* และ *EcoRI - HpaII* แต่ไม่ให้ความแตกต่างระหว่างเพศ (1100 และ 0011) แถบดีเอ็นเอเหล่านี้เกิดจากความสามารถในการตัดนิวคลีโอไทด์บริเวณ CCGG ที่เติมหมู่เมธิลต่างกันของเอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* แต่เนื่องจากแถบดีเอ็นเอนี้พบทั้งในเพศผู้และเพศเมีย จึงไม่สามารถใช้ระบุความแตกต่างระหว่างเพศได้เช่นกัน ทั้งนี้เครื่องหมาย MSAP จำนวน 13 เครื่องหมายจัดอยู่ในกลุ่มนี้



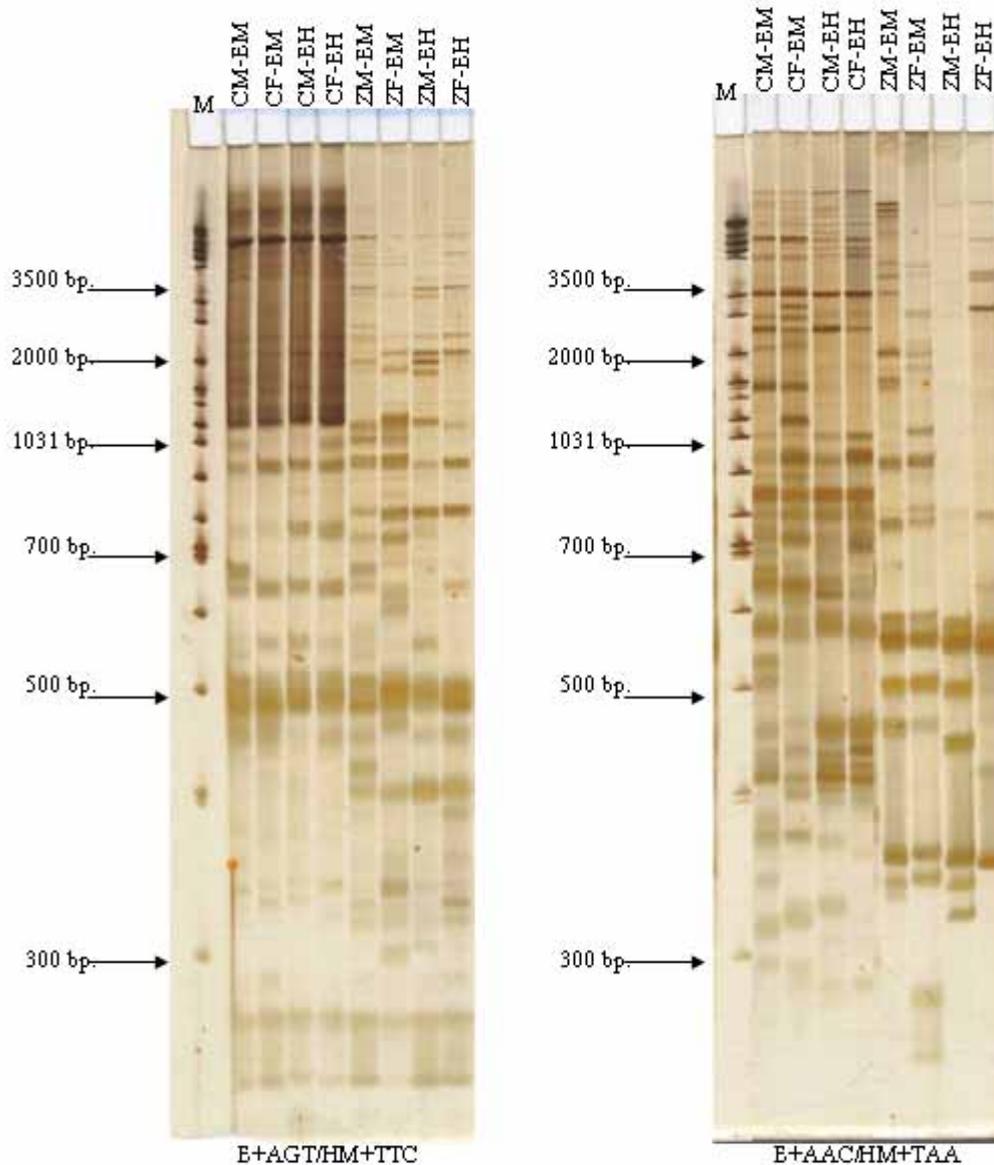
ภาพที่ 22 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค MSAP โดยคู่ไพรเมอร์ E+ACG กับ HM+TTC และ E+ACT กับ HM+TAA CM-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรองสกุล *Cycas* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, CF-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรองสกุล *Cycas* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, CM-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรองสกุล *Cycas* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, CF-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรองสกุล *Cycas* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, ZM-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรองสกุล *Zamia* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, ZF-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรองสกุล *Zamia* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, ZM-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรองสกุล *Zamia* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, ZF-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรองสกุล *Zamia* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, M : DNA มาตรฐาน (Fermentus)



ภาพที่ 23 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค MSAP โดยคู่ไพรมอร์ E+ACG กับ HM+TAA CM-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, CF-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, CM-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, CF-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, ZM-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, ZF-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, ZM-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, ZF-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, M : DNA มาตรฐาน (Fermentus)



ภาพที่ 24 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค MSAP โดยคู่ไพรเมอร์ E+AGT กับ HM+TAA และ E+ACT กับ HM+TTC CM-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, CF-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, CM-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, CF-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, ZM-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, ZF-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, ZM-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, ZF-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, M : DNA มาตรฐาน (Fermentus)



ภาพที่ 25 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค MSAP โดยคู่ไพรเมอร์ E+AGT กับ HM+TTC และ E+AAC กับ HM+TAA CM-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, CF-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, CM-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, CF-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Cycas* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, ZM-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, ZF-EM: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI*, ZM-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศผู้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, ZF-EH: กลุ่มดีเอ็นเอของปรงสกุล *Zamia* เพศเมียที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HpaII*, M: DNA มาตรฐาน (Fermentus)

กลุ่มที่ 3 เป็นแถบดีเอ็นเอที่ระบุว่ามีการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในแต่ละเพศมีรูปแบบที่แตกต่างกัน เครื่องหมาย MSAP จำนวน 99 เครื่องหมายที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ โดยจากไพรเมอร์ทั้ง 7 คู่ ก็จะให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันรวม 12 รูปแบบ (ตารางที่ 13) จากตารางพบว่ารูปแบบ 1000 พบได้มากที่สุดคือ 24 แถบ โดยพบใน *Cycas* 11 แถบ และ *Zamia* 13 แถบ ขณะที่รูปแบบ 0111 พบได้น้อยที่สุดเพียง 2 แถบ และยังพบว่าปรังสกุล *Cycas* มีจำนวนของเหตุการณ์การเติมหมู่เมธิล 39 เหตุการณ์ซึ่งน้อยกว่าปรังสกุล *Zamia* ที่มีถึง 60 เหตุการณ์

ตารางที่ 13 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอและจำนวนของรูปแบบจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ MSAP ของปรัง (1 แทนการเกิดแถบดีเอ็นเอ และ 0 แทนการไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ)

รูปแบบ	จำนวนของรูปแบบ		
	<i>Cycas</i>	<i>Zamia</i>	รวม
0001	6	6	12
0010	2	7	9
0100	6	10	16
0101	1	2	3
0110	2	1	3
0111	0	2	2
1000	11	13	24
1001	1	3	4
1010	3	5	8
1011	0	5	5
1101	5	3	8
1110	2	3	5

การประเมินรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอจากแถบดีเอ็นเอทั้ง 12 รูปแบบจะพิจารณาเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* ซึ่งผลการตัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเป็นผลมาจากการเติมหมู่เมธิลบริเวณ CCGG ที่แตกต่างกันดังนี้

1. การเติมหมู่เมทิลที่คาร์บอนตัวในของตำแหน่งจดจำของดีเอ็นเอทั้ง 2 สาย (full methylation of the internal cytosine:  $C^m$ CGG) ซึ่งเป็นรูปแบบที่เอนไซม์ *MspI* ตัดได้เพียงชนิดเดียว
2. การเติมหมู่เมทิลที่คาร์บอนตัวนอกของตำแหน่งจดจำของดีเอ็นเอเพียงสายเดียว (hemi-methylation at the external cytosine:  $^{hm}CCGG$ ) ซึ่งเป็นรูปแบบที่เอนไซม์ *HpaII* ตัดได้เพียงชนิดเดียว
3. การเติมหมู่เมทิลที่คาร์บอนทั้ง 2 ตัวของตำแหน่งจดจำของดีเอ็นเอทั้ง 2 สาย (full methylation of both cytosine:  $^{m}C^m$ CGG) และ การเติมหมู่เมทิลที่คาร์บอนตัวนอกของดีเอ็นเอทั้ง 2 สาย (full methylation of the external cytosine:  $^{m}CCGG$ ) ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดไม่สามารถตัดได้
4. บริเวณจดจำของเอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* ที่ไม่มีการเติมหมู่เมทิล (CCGG) ซึ่งเป็นรูปแบบที่เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดสามารถตัดได้

เมื่อวิเคราะห์รูปแบบการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอในแต่ละเพศจากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอทั้ง 12 รูปแบบ เปรียบเทียบกับรูปแบบการเติมหมู่เมทิลทั้ง 4 แบบดังกล่าวจะได้ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 การประเมินรูปแบบของการเติมหมู่เมทิลในปรังแต่ละเพศจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค MSAP

รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ	รูปแบบของการเติมหมู่เมทิลที่เป็นไปได้		กรณี
	เพศผู้	เพศเมีย	
0001	$^{m}C^m$ CGG หรือ $^{m}CCGG$	$^{hm}CCGG$	1
0010	$^{hm}CCGG$	$^{m}C^m$ CGG หรือ $^{m}CCGG$	1
0100	$^{m}C^m$ CGG หรือ $^{m}CCGG$	$C^m$ CGG	1
0101	$^{m}C^m$ CGG หรือ $^{m}CCGG$	CCGG	2
0110	$^{hm}CCGG$	$C^m$ CGG	4
0111	$^{hm}CCGG$	CCGG	3

ตารางที่ 14 (ต่อ)

รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ	รูปแบบของการเติมหมู่เมทิลที่เป็นไปได้		กรณี
	เพศผู้	เพศเมีย	
1000	C <sup>m</sup> CGG	<sup>m</sup> C <sup>m</sup> CGG หรือ <sup>m</sup> CCGG	1
1001	C <sup>m</sup> CGG	<sup>hm</sup> CCGG	4
1010	CCGG	<sup>m</sup> C <sup>m</sup> CGG หรือ <sup>m</sup> CCGG	2
1011	CCGG	<sup>hm</sup> CCGG	3
1101	C <sup>m</sup> CGG	CCGG	3
1110	CCGG	C <sup>m</sup> CGG	3

จากตารางที่ 14 สามารถจำแนกรูปแบบของการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอในปรังที่แตกต่างกันในแต่ละเพศได้เป็น 4 กรณี คือ

กรณีที่ 1 เพศใดเพศหนึ่งมีการเติมหมู่เมทิลแบบ full methylation of both cytosine ขณะที่อีกเพศหนึ่งมีการเติมหมู่เมทิลแบบ full methylation of the internal cytosine หรือ hemi-methylation at the external cytosine แบบใดแบบหนึ่ง พบได้มากที่สุดคือ 61 เครื่องหมาย

กรณีที่ 2 เพศใดเพศหนึ่งมีการเติมหมู่เมทิลแบบ full methylation of both cytosine ขณะที่อีกเพศหนึ่งไม่มีการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่งจดจำ CCGG เครื่องหมาย MSAP จำนวน 11 เครื่องหมายจัดอยู่ในกลุ่มนี้

กรณีที่ 3 เพศใดเพศหนึ่งไม่มีการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่งจดจำ CCGG ขณะที่อีกเพศหนึ่งมีการเติมหมู่เมทิลแบบ full methylation of the internal cytosine หรือ hemi-methylation at the external cytosine แบบใดแบบหนึ่ง เครื่องหมาย MSAP จำนวน 20 เครื่องหมายจัดอยู่ในกลุ่มนี้

กรณีที่ 4 เพศใดเพศหนึ่งมีการเติมหมู่เมธิลแบบ full methylation of the internal cytosine ขณะที่อีกเพศหนึ่งมีการเติมหมู่เมธิลแบบ hemi-methylation at the external cytosine เครื่องหมาย MSAP จำนวน 7 เครื่องหมายจัดอยู่ในกลุ่มนี้

หากพิจารณาจำนวนรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง CCGG ทั้ง 4 แบบ จากจำนวนเครื่องหมาย MSAP ทั้ง 99 เครื่องหมาย (ตารางที่ 15) บ่งชี้ว่าในปรองเพศเมียจะมีการเติมหมู่เมธิลแบบ  $^mC^mCGG$  หรือ  $^mCCGG$  และ  $^{hm}CCGG$  มากกว่าเพศผู้ ขณะที่รูปแบบ CCGG ซึ่งไม่มีการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในบริเวณจดจำพบว่าเพศผู้มีจำนวนน้อยกว่าเพศเมีย แต่การเติมหมู่เมธิลแบบ  $C^mCGG$  จะพบในเพศผู้มากกว่าเพศเมีย และเนื่องจากการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอเป็นกระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนที่สามารถผันกลับได้ เมื่อพิจารณาถึงจำนวนรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลที่มีในแต่ละรูปแบบทำให้เกิดข้อเสนอบว่า บริเวณส่วนที่ควบคุมการกำหนดเพศในจีโนมอาจมีการเติมหมู่เมธิลแบบ  $^mC^mCGG$ ,  $^mCCGG$  หรือ  $^{hm}CCGG$  ซึ่งจะทำให้เกิดลักษณะของเพศเมีย แต่ถ้ามีการเติมหมู่เมธิลแบบ  $C^mCGG$  จะแสดงลักษณะของเพศผู้ อย่างไรก็ตามข้อเสนอนี้ยังต้องศึกษาในรายละเอียดที่ลงลึกมากขึ้นเพื่อยืนยันแนวความคิดดังกล่าว

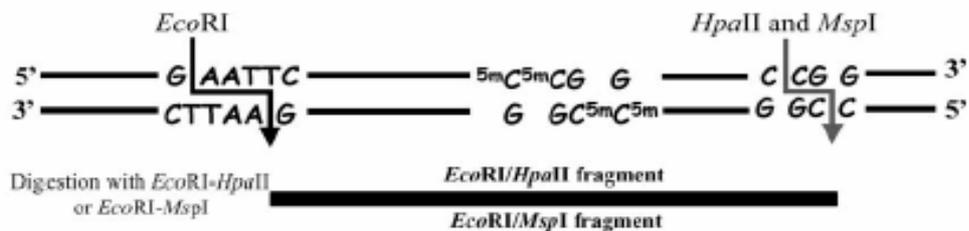
ตารางที่ 15 จำนวนเครื่องหมาย MSAP ในปรองเพศผู้และเพศเมียที่แสดงการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง CCGG ในแต่ละแบบ

รูปแบบการเติมหมู่เมธิล	<i>Cycas</i>		<i>Zamia</i>	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
$^mC^mCGG$ หรือ $^mCCGG$	13	16	18	25
$^{hm}CCGG$	4	7	10	14
$C^mCGG$	17	10	19	14
CCGG	5	6	13	17

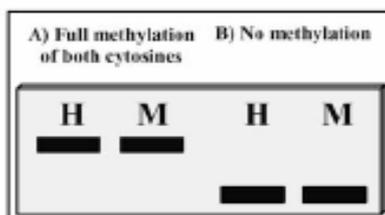
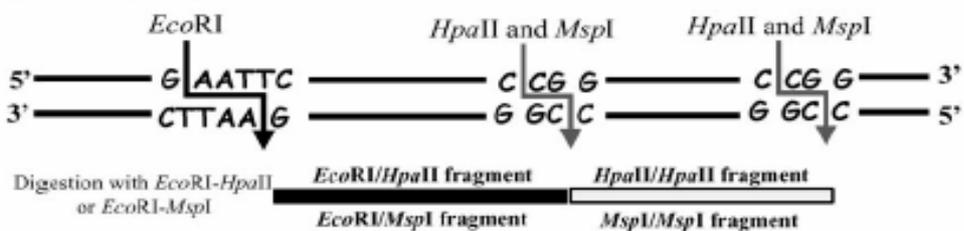
เทคนิค MSAP ซึ่งเป็นการประยุกต์เทคนิค AFLP ที่ในการศึกษาคั้งนี้ นับเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลในจีโนมของสิ่งมีชีวิต ซึ่งแต่เดิมจะใช้วิธีการที่ประยุกต์จากเทคนิค RFLP ดังเช่นงานวิจัยของ Janousek *et al.* (1996) แต่เนื่องจากต้องทราบข้อมูลบางส่วนเพื่อออกแบบโพรบที่เหมาะสม จึงทำให้ยุ่งยากและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก นอกจากนี้ยังมีอันตรายจากสารเรืองแสงดังที่ได้เคยกล่าวไปแล้ว เทคนิค MSAP มีข้อได้เปรียบ

คือไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับจีโนมของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา สามารถตรวจสอบสถานะการเติมหมู่เมทิล (methylation events) ได้เป็นจำนวนมากโดยเพิ่มจำนวนคู่ไพโรมอร์ให้หลากหลายมากยิ่งขึ้น และยังสามารถโคลนและหาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ (Peraza-Echeverria *et al.*, 2001) การตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *EcoRI - MspI* หรือ *EcoRI - HpaII* จะให้ชิ้นดีเอ็นเอ 3 แบบคือ 1) *EcoRI - EcoRI* 2) *EcoRI - MspI* หรือ *EcoRI - HpaII* 3) *MspI - MspI* หรือ *HpaII - HpaII* อย่างไรก็ตามจากขั้นตอนของ PCR จะมีเพียงชิ้นดีเอ็นเอ *EcoRI - MspI* หรือ *EcoRI - HpaII* เท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ เนื่องจากไพโรมอร์ HM มี annealing temperature ต่ำกว่าไพโรมอร์ *EcoRI* เช่นเดียวกับที่ Vos *et al.* (1995) ได้รายงานว่า การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ *EcoRI - MseI* จะเกิดขึ้นได้ดีกว่าการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ *MseI - MseI* เนื่องจาก annealing temperature ของไพโรมอร์ *MseI* ต่ำกว่าไพโรมอร์ *EcoRI* นอกจากนี้ชิ้นดีเอ็นเอ *MseI - MseI* (*MspI - MspI* หรือ *HpaII - HpaII* ในเทคนิค MSAP) มี inverted repeat ที่ปลาย เนื่องจากชิ้นส่วนพวกนี้เพิ่มปริมาณโดยไพโรมอร์เพียงชนิดเดียวจึงเกิดเป็นโครงสร้าง stem-loop ขึ้น เอนไซม์ *EcoRI* มีตำแหน่งจดจำ 5'-GAATTC-3' โดยเฉลี่ยจะพบตำแหน่งจดจำนี้ทุก ๆ 4 กิโลเบส ในขณะที่เอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* มีตำแหน่งจดจำ 5'-CCGG-3' เฉลี่ยจะพบตำแหน่งจดจำทุก ๆ 256 คู่เบส ดังนั้นใน 1 ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *EcoRI* จะขนาดด้วยตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* ประมาณ 16 ตำแหน่ง ถ้าหากตำแหน่งจดจำของ *MspI* และ *HpaII* ไม่มีการเติมหมู่เมทิล ผลการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI - MspI* และ *EcoRI - HpaII* จะเหมือนกัน (ภาพที่ 26) และให้ผลดังเครื่องหมาย MSAP ในกลุ่มที่ 1 แต่หากมีการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่งจดจำ 5'-CCGG-3' ก็จะมีภาวะพหุสถานะเกิดขึ้น โดยหากมีการเติมหมู่เมทิลแบบ full methylation of the internal cytosine เอนไซม์ *MspI* จะสามารถตัดดีเอ็นเอบริเวณนั้นได้และให้เป็นชิ้นดีเอ็นเอ *EcoRI - MspI* ขนาดสั้น ส่วน *HpaII* จะไม่สามารถตัดได้จนกว่าจะพบตำแหน่งจดจำถัดไปที่ไม่มีการเติมหมู่เมทิลจึงจะสามารถตัดดีเอ็นเอส่วนนั้นได้เป็นผลให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่กว่า (Xu *et al.*, 2000; Jaligot *et al.*, 2004; Portis *et al.*, 2004) ในทางกลับกันถ้าตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* มีการเติมหมู่เมทิลแบบ hemi-methylation at the external cytosine จะให้ชิ้นดีเอ็นเอ *EcoRI - MspI* ที่ยาวกว่าชิ้นดีเอ็นเอ *EcoRI - HpaII* ซึ่งจะมีขนาดสั้นกว่า (ภาพที่ 27)

**A) Full methylation of both cytosines**



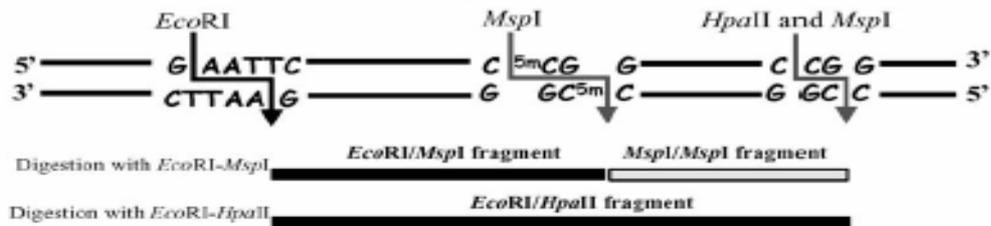
**B) No methylation**



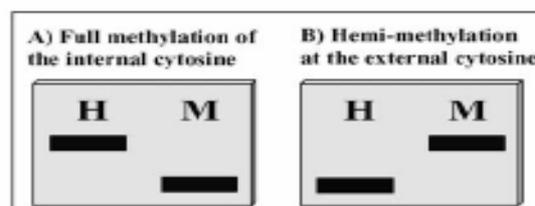
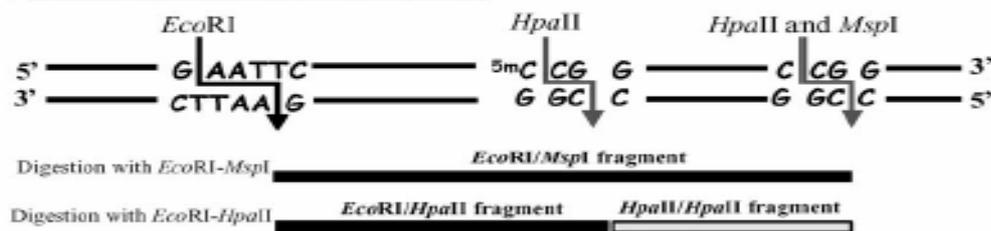
ที่มา: Portis *et al.*, 2004

ภาพที่ 26 ความสามารถของเอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* ในการตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจดจำการเติมหมู่เมทิลแบบ full methylation of both cytosineเปรียบเทียบกับไม่มีการเติมหมู่เมทิล

**A) Full methylation of the internal cytosine**



**B) Hemi-methylation at the external cytosine**



ที่มา: Portis *et al.*, 2004

ภาพที่ 27 ความสามารถของเอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* ในการตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจดจำการเติมหมู่เมธิลแบบ full methylation of the internal cytosine เปรียบเทียบกับการเติมหมู่เมธิลแบบ hemi-methylation at the external cytosine

ในงานวิจัยนี้เป็นการนำเทคนิค MSAP มาใช้ในการตรวจสอบเพศของปรัง ซึ่งเป็นพืชที่แยกเพศต่างต้น (dioecious) ซึ่ง Gorelick (2003) ได้เสนอสมมติฐานว่าการเติมหมู่เมธิลอาจมีผลที่ทำให้เกิดเพศที่แยกกัน (dioecy) ในสิ่งมีชีวิต จึงทำให้เกิดแนวคิดที่ว่าถ้าหากการเติมหมู่เมธิลมีผลต่อการเกิดเพศจริง ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MSAP ก็น่าจะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างในเพศผู้และเพศเมีย ผลจากการศึกษาค้นคว้าพบว่าแถบดีเอ็นเอประมาณ 27.19% จาก 364 แถบบ่งชี้ว่าในแต่ละเพศมีการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอต่างกัน เมื่อวิเคราะห์รูปแบบการเติมหมู่เมธิลที่เป็นไปได้จากแถบดีเอ็นเอจะได้ 12 รูปแบบซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 4 กรณีดังที่ได้กล่าวมาแล้ว แต่จากการศึกษาค้น

นี้ยังไม่สามารถทราบได้ว่าการเติมหมู่เมธิลที่แตกต่างกันนี้เกิดขึ้นกับยีนใด ซึ่งการศึกษาอิทธิพลของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอที่มีต่อการกำหนดเพศเพศในพืชนั้นมีค่อนข้างน้อย โดยส่วนมากจะมีรายงานเพียงว่าหากชักนำด้วย hypomethylation drug ซึ่งเป็นสารที่ทำให้การเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอเกิดได้น้อยลงเช่น 5-azaC จะชักนำให้เกิดการกลับเพศ (sex reversal) แต่ยังไม่มียารายงานในส่วนของยีนที่เกี่ยวข้อง สำหรับปรองเองก็มีรายงานการกลับเพศโดยธรรมชาติเช่นกันจึงอาจเป็นข้อสนับสนุนอีกประการหนึ่งที่บ่งชี้ว่าการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอมีผลต่อการแสดงออกของเพศ (sex expression) ในปรอง ถึงแม้ Xiong *et al.* (1997) จะเสนอว่าเทคนิค MSAP ยังมีข้อจำกัดอยู่ 2 ประการคือ เทคนิคนี้สามารถตรวจสอบการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอได้เฉพาะบริเวณ CCGG เท่านั้นและเทคนิคนี้ยังไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างของการเติมหมู่เมธิลที่เบสไซโตซีนบางรูปแบบได้ เช่น การเติมหมู่เมธิลแบบ full methylation of both cytosine ( $^mC^mCCGG$ ) และการเติมหมู่เมธิลแบบ full methylation of the external cytosine ( $^mCCGG$ ) ซึ่งทั้งเอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* ต่างก็ไม่สามารถตัดบริเวณจดจำนี้ได้จึงอาจทำให้การประเมินผลผิดพลาดได้ แต่เทคนิค MSAP ก็ยังเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการใช้ตรวจสอบการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอที่ดีในระดับหนึ่ง อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาในขั้นต้นเพื่อนำเสนอแนวความคิดเท่านั้น สำหรับการศึกษานี้ต่อไปควรใช้วิธีการแยกศึกษาในปรองแต่ละชนิด โดยเพิ่มจำนวนคู่ไพรเมอร์และอาจเพิ่มเบสในไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้น selective amplification เพื่อให้ได้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่หลากหลายและชัดเจนมากขึ้น ซึ่งหากลำดับเบสส่วนที่ทำหน้าที่กำหนดเพศในปรองถูกควบคุมการแสดงออกด้วยการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอแล้ว แถบดีเอ็นเอที่บ่งชี้ความแตกต่างระหว่างเพศน่าจะมีขนาดใกล้เคียงกันในปรองแต่ละชนิด เมื่อได้แถบดีเอ็นเอที่บ่งชี้เพศจากเทคนิค MSAP แล้วควรนำไปหาลำดับเบสเพื่อตรวจสอบว่าแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมีความเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไรในปรองแต่ละชนิด และนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลว่าลำดับเบสเหมือนหรือคล้ายกับยีนใด ๆ หรือไม่ แล้วอาจนำไปตรวจสอบในระดับของการแสดงออกของยีนนั้น ๆ ต่อไป

## สรุป

1. การสกัดดีเอ็นเอจากวิธีการของ Molecular Biology Laboratory Protocol เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอจากพืชหลายชนิดรวมทั้งปรง เนื่องจากได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพค่อนข้างดี ใช้เวลาในการสกัดน้อยสามารถทำได้หลายตัวอย่างต่อวัน นอกจากนี้ยังสามารถปรับเปลี่ยนปริมาณสารในขั้นต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับพืชชนิดอื่นได้ง่าย

2. การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะต่อเพศของปรงสกุล *Cycas* 6 ชนิดและสกุล *Zamia* 6 ชนิดโดยเทคนิค RAPD จากไพรเมอร์ 38 ชนิดได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 386 แถบ พบว่าแถบดีเอ็นเอจำนวน 70 แถบมีความจำเพาะต่อเพศของปรงชนิดต่าง ๆ แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอแถบใดที่จำเพาะต่อเพศใดเพศหนึ่งของปรงทุกชนิด เมื่อนำแถบดีเอ็นเอทั้ง 386 แถบไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและสร้างเป็น Phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกปรงสกุล *Cycas* และสกุล *Zamia* ออกจากกันได้อย่างชัดเจน และยังสามารถจำแนกปรงสกุล *Zamia* ได้เป็น 2 กลุ่มตามแหล่งกำเนิด การใช้เทคนิค pooled DNA analysis ร่วมกับเทคนิค RAPD จะให้แถบดีเอ็นเอที่มากขึ้นกว่าการวิเคราะห์แบบแยก แต่พบว่าการแข่งขันในการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งมีหลายจีโนมอยู่ร่วมกัน ทำให้แถบดีเอ็นเอบางแถบที่เคยพบในการวิเคราะห์แบบแยกหายไป เทคนิคการรวมดีเอ็นเอที่มีจีโนมต่างกันหลาย ๆ จีโนมจึงอาจไม่เหมาะที่จะนำมาใช้วิเคราะห์ด้วยเทคนิคที่มีความจำเพาะต่ำเช่น RAPD

3. การศึกษารูปแบบการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค MSAP ซึ่งเป็นการใช้ความสามารถของเอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* ที่เป็น isochizomer ซึ่งมีตำแหน่งจดจำเดียวกัน แต่มีความสามารถในการตัดนิวคลีโอไทด์ที่การเติมหมู่เมทิลต่างกัน จากไพรเมอร์ 7 คู่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวน 364 แถบ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอจำนวน 99 แถบที่บ่งชี้ว่าการเติมหมู่เมทิลไม่เหมือนกันในแต่ละเพศรวม 12 รูปแบบ แต่ยังไม่ทราบว่าส่วนที่มีการเติมหมู่เมทิลต่างกันเป็นส่วนของยีนใด จึงกล่าวได้เพียงว่าการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเออาจเกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศในปรง อย่างไรก็ตามยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันข้อสรุปนี้ต่อไป

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กิตติมา เมฆโกมล. 2534. เอกสารประกอบการสอนวิชา ชว111 พฤกษศาสตร์.  
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, สงขลา. 408 น.
- ณพพร ดำรงศิริ. 2530. พฤกษอนุกรมวิธาน. มหาวิทยาลัยรามคำแหง, กรุงเทพฯ. 768 น.
- ปรีชา ประเทพา. 2543. พันธุศาสตร์ยุคใหม่ เทคโนโลยีดีเอ็นเอเพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากร  
พันธุกรรม. อติชาติการพิมพ์, มหาสารคาม. 105 น.
- พันธมน แสงอินทร์. 2545. การจำแนกชนิดของ *Cycas* โดยวิธี Restriction Fragment  
Length Polymorphism (RFLP) และ Random Amplified Polymorphic DNA  
(RAPD). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เมธานี เตาะสกุล. 2546. การศึกษาเปรียบเทียบทางพันธุศาสตร์ของเซลล์ระหว่าง  
เพศผู้และเพศเมียของ *Cycas* และ *Zamia*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สจี อิ่มแดง. 2547. การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้บ่งชี้ลักษณะเพศและความ  
หลากหลายทางชีวภาพของปรังสกุล *Cycas* และ *Zamia* โดยใช้เทคนิค  
เอเอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุภาพร สุกสีเหลือง. 2546. การกำหนดเพศและพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับเพศ ใน  
หลักพันธุศาสตร์. สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย. 416 น.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและ  
เอเอฟแอลพี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 116 น.

อมรา คัมภีรานนท์. 2542. พันธุศาสตร์มนุษย์. เท็กซัส แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น,  
กรุงเทพฯ. 308 น.

อักษร ศรีเปล่ง. 2521. พฤกษศาสตร์ทั่วไป. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 355 น.

Abraham, A. and P.M. Mathew. 1962. Cytological studies in the Cycads: Sex  
chromosome in *Cycas*. **Ann. Bot.** 26: 261-167.

Ainsworth, C. 2000. Boys and Girls come out to play: The molecular Biology of  
dioecious plants. **Ann. Bot.** 86: 211-221.

Atak, C., S. Alikamanoglu, L. Acik and Y. Canbolat. 2004. Induced of plastid mutations  
in soybean plant (*Glycine max* L. Merrill) with gamma radiation and  
determination with RAPD. **Mutat. Res.** 556: 35-44.

Baurens, F. C., F. Bonnot, D. Bienvena, S. Causse and T. Legavre. 2003. Using  
SD-AFLP and MSAP to access CCGG methylation in the banana genome.  
**Plant Mol. Biol. Rep.** 21: 339-348.

Beltran, G.E., G. Jung, J. Nienhuris and M.J. Bassett. 2002. Identification of  
RAPD markers linked to five markers genes (*blu*, *dgs*, *y*, *arg*, and a flat  
*pod* mutant) in common bean. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 127: 685-688.

Biswas, C. and B.M. Johri. 1997. **The Gymnosperms**. Narosa Publishing House,  
New Delhi. 464p.

Brenner, E.D., D.W. Stevenson, R.W McCombie, M.S. Katari, S.A. Rudd, K.F. Mayer,  
P.M. Palenchar, S.J. Runko, R.W. Twigg, G.Dai, R.A. Martiensson, P.N. Benfey  
and G.M. Coruzzi. 2003a. Expressed sequence tag analysis in *Cycas*, the most  
primitive living seed plant. **Genome Biol.** 4: R78.

- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and R.W. Twigg. 2003b. Cycads: evolutionary innovations and the role of plant-derived neurotoxins. **Trends in plant science** 8: 446-452.
- Burnham, C.R. 1964. **Discussions in Cytogenetics**. Burgess Publishing Company, USA.
- Caetano-Anolles, G. 1997. Resolving DNA amplification products using polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining, pp.119-134. *In* R.M. Micheli and R. Bova, eds. **Fingerprinting methods based on PCR**. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Cafasso, D., S. Cozzolino, P.D. Luca and G. Chinali. 2003. An unusual satellite DNA from *Zamia paucijuga* (Cycadales) characterized by two different organizations of the repetitive unit in the plant genome. **Gene** 311: 71-79.
- Cardena, R., G.R. Ashburner and C. Oropeza. 2003. Identification of RAPDs associated with resistance to lethal yellowing of the coconut (*Cocos nucifera* L.) palm. **Sci. Hortic.** 98: 257-263.
- Chakrabarty, D., K.W. Yu and K.Y. Paek. 2003. Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). **Plant Science** 165: 61-68.
- Charlesworth, D. and D.S. Guttman. 1999. The evolution of dioecy and plant sex chromosome systems, pp. 25-49. *In* C.C. Ainsworth, eds. **Sex Determination in Plants**. Bios Scientific Publishers Limited, Oxford. 281p.
- Charlesworth, D. 2002. Plant sex determination and sex chromosome. **Heredity** 88: 94-101.

- Chen, L.F.O., H.Y. Kuo, M.H. Chen, K.N. Lai and S.C.G. Chen. 1997. Reproducibility of the differential amplification between leaf and root DNAs in soybean revealed by RAPD markers. **Theor. Appl. Genet.** 95: 1033-1043.
- De Giovanni, C., P. Dell'Orco, A. Bruno, F. Ciccarese, C. Lotti and L. Ricciardi. 2004. Identification of PCR-based markers (RAPD, AFLP) linked to a novel powdery mildew resistance gene (*ol-2*) in tomato. **Plant Science** 166: 41-48.
- Donaldson, J.S. 2003. **Cycads: Status survey and Conservation Action Plan.** IUCN/SSC Cycad Specialist Group, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Drozdenyuk, A.P, G.E. Sulimova and B.I. Vangushin. 1976. Changes in base composition and molecular population of wheat DNA on germination. **Mol. Biol.** 10: 1378-1386.
- Elrod, S. and W. Stansfield. 2002. **Schaum's Outline of Theory and Problem of Genetics.** McGraw-Hill, USA. 500p.
- Finnegan, E.J., W.J. Peacock and E.S. Dennis. 2000. DNA methylation, A key regulator of plant development and other processes. **Curr. Opin. Genetics Dev.** 10: 217-223.
- Follman, H., H. J. Balzer and R. Schleicher. 1990. Biosynthesis and distribution of methylcytosine in wheat DNA. How different are plant DNA methyltransferases? In: **Nucleic Acid Methylation.** Alan R. Liss, pp. 199-210.
- Fracaro, F., J. Zacaria and S. Echeverrigaray. 2005. RAPD based genetic relationships between populations of three chemotypes of *Cunila galioides* Benth. **Biochem. Sys. Ecol.** 33: 409-417.

- Godwin, I.D., N. Sangduen, R.Kunanuvatchaidach, G. Piperidis and S.W. Adkins. 1997. RAPD polymorphisms among variant and phenotypically normal rice (*Oryza sativa* var. *indica*) somaclonal progenies. **Plant Cell Rep.** 16:320-324.
- Gorelick, R. 2003. Evolution of dioecy and sex chromosome via methylation driving Muller's ratchet. **Biol. J. Linnean Soc.** 80: 353-368.
- Grechko, V.V. 2002. Molecular DNA markers in phylogeny and systematics. **Russ. J. Genet.** 38: 851-868.
- Jaligot, E., T.Beule, F. C. Baurens, N. Billotte and A. Rival. 2004. Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the "mantled" variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Genome** 47: 224-228.
- Janousek, B., J. Siroky and B. Vyskot. 1996. Epigenetic control of sexual phenotype in a dioecious plant, *Melandrium album*. **Mol. Gen. Genet.** 250: 483-490.
- Jones, D.L. 1998. **Cycads of the World**. Reed Nel Holland, Sydney. 312p.
- Kailsz, S. and M.D. Purugganan. 2004. Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution. **Trends Ecol. Evolut.** 19: 309-314.
- Kumar, L.S. 1999. DNA markers in plant improvement: An overview. **Biotechnol. Adv.** 17: 143-182.
- Labra, M., F. Grassi, S. Imazio, T. Di Fabio, S. Citterio, S. Sgorbati and E. Agradi. 2004. Genetic and DNA methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L. **Chemosphere** 54: 1049-1058.

- Liu, W., P.J. Li, X.M. Qi, Q.X. Zhou, L. Zheng, T.H. Sun and Y.S. Yang. 2005. DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedling induced by cadmium pollution using RAPD analysis. **Chemosphere** 61: 158-167.
- Martinez, E.A., C. Destombe, M.C. Quillet and M. Valero. 1999. Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers highly linked to sex determination in red alga *Gracilaria gracilis*. **Mol. Ecol.** 8: 1533-1538.
- Marziani, G., E. Caporali and A. Spada. 1999. Search for Genes Involved in Asparagus Sex Determination. In C.C. Ainsworth (ed.). **Sex determination in Plants**. BIOS Scientific, Oxford.
- Medina, T.B., E. Fogelman, E. Chani, A.R. Miller, I. Levin, D. Levi and R.E. Veilleux. 2002. Identification of molecular markers associated with leptine in reciprocal backcross family of diploid potato. **Theor. Appl. Genet.** 105: 1010-1018.
- Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 88: 9828-9832.
- Munksgaard, D., O. Mattsson and F.T. Okkels. 1995. Somatic embryo development in carrot is associated with an increase in levels of S-adenosylmethionines, S-adenosylhomocysteine and DNA methylation. **Physiol. Plant.** 93: 5-10.
- Nayak, S., B.K. Debata, V.K. Srivastava and N.S. Sangwan. 2003. Evaluation of agronomically useful somaclonal variants in Jamrosa (a hybrid *Cymbopogon*) and detection of genetic changes through RAPD. **Plant Science** 164: 1029-1035.

- Negrutiu, I., B. Vyskot, N. Barbacar, S. Georgiev and F. Moneger. 2001. Dioecious plants: A key to the early events of sex chromosome evolution. **Plant Physiol.** 127: 1418-1424.
- Negrutiu, I., and F. Sala. 1991. Sexual development in plants: an open question of strategic importance. **Plant science** 80: 1-6.
- Nguyen, N.T., R.E.A. Moghaieb, H. Saneoka and K. Fujita. 2004. RAPD markers associated with salt tolerance in *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium*. **Plant Science** 167: 797-805.
- Norstog, K.J. and T.J. Nicholls. 1997. **The Biology of the Cycads**. Cornell University Press, New York. 363p.
- Noyer, J.L., S. Causse, K. Tomekpe, A. Bouet and F.C. Baurens. 2005. A new image of plaintain diversity assessed by SSR, AFLP and MSAP markers. **Genetica** 124:61-69.
- Parasnis, A.S., W.Ramakrishna, K.V. Chowdari, V.S. Gupta and P.K. Ranjekar. 1999. Microsatellite (GATA)<sub>n</sub> reveals sex-specific differences in papaya. **Theor. Appl. Genet.** 99: 1047-1052.
- Peraza-Echeverria, S., V.A. Herrera-Valencia, A. James-Kay. 2001. Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism(MSAP). **Plant Science** 161: 359-367.
- Portis, E., A. Acquadro, C. Comino and S. Lanteri. 2004. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism(MSAP). **Plant Science** 166: 169-178.

- Reyna-Lopez, G.E., J. Simpson and J. Ruiz-Herrera. 1997. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphism. **Mol. Gen. Genet.** 253: 703-710.
- Rohif, H.J. 1993. **NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System.** Applied Biostatistics Inc., New York.
- Sanchez-Tinoco, M.Y., M. Vazquez-Torres and J.A. Alejandre-Rosas. 1993. Determination of sexual dimorphism in a population of *C.mexicana* Brongn. (Zamiaceae) based on vegetative characteristics. In D.W. Stevenson and K.J. Nostog, eds. **Proceedings of the Second International Conference on Cycad Biology**, pp. 131-139. Palm & Cycad Societies of Australia, Milton, Queensland.
- San Martin, A.P.M., L. Adamec, J. Suda, T. H.M. Mes and H. Storchova. 2003. Genetic variation within the endangered species *Aldrovanda vesiculosa* (Droseraceae) as revealed by RAPD analysis. **Aquat. Bot.** 75: 159-172.
- Sha, A.H., X.H. Lin, J.B. Huang and D.P. Zhang. 2005. Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis. **Mol. Gen. Genomics.** 273: 484-490.
- Shetty, B.V. and K. Subramanyan. 1962. Cytology of *Cycas*. **Proceedings of the Indian Science Congress 3** (abstract): 259.
- Shibu, M.P., K.V. Ravishanker, L. Anand, K.N. Ganesshaiah and U.Shaanker. 2000. Identification of sex-specific DNA markers in the dioecious tree, nutmeg (*Myristica fragans* Houtt.). **Plant. Genet. Resour. Lett.** 121: 59-61.
- Shirkot, P., D.R. Sharma and T. Mohapata. 2002. Molecular identification of sex in *Actinidia deliciosa* var *deliciosa* by RAPD markers. **Sci. Hortic.** 94:33-39.

- Singh, M., S. Kumar, A.K. Singh, D.Ram and G. Kalloo. 2002. Female sex-associated RAPD marker in pointed gourd (*Trichosanthes dioica* Roxb.). **Current Science** 82:131-132.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. **Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco.
- Spielman, M., R.Vinkenoog, H.G. Dickinson and R.J. Scott. 2001. The epigenetic basis of gender in flowering plants and mammals. **T.I.G.** 17: 705-711.
- Stehlik, I. and F.R. Blattner. 2004. Sex-specific SCAR markers in the dioecious plant *Rumex nivalis* (Polygonaceae) and implication for the evolution of sex chromosome. **Theor. Appl. Genet.** 108: 238-242.
- The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES). 2003. **Review of Significant Trade Cycads**. Available Source: <http://www.cites.org/eng/com/pc/14/E-PC14-09-02-02-A1.pdf>, October 10, 2005.
- The International Potato Center (CIP). 1999. **Molecular Biology Laboratory Protocols**. Available Source <http://www.cipotato.org/training/Materials/Molecular/Molecular.htm>, April, 2004.
- Thseng, F.S., S.J. Tsai, J. Abe and S.T. Wu. 1999. *Glycine formosana* Hosokawa in Taiwan: pod morphology, allozyme, and DNA polymorphism. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 40: 251-257.
- Treuren, R.V. 2000. **Overview genetic markers. Molecular Genetic Markers**. Available Source: <http://www.cgn.wageningen-ur.nl/pgr/research/molgen/overview.htm>, May 12, 2003.

- Urasaki, N., M. Tokumoto, K. Tarora, T. Ban, T. Kayano, H. Tanaka, H. Oku, I. Chonen and R. Terauchi. 2002. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L. ). **Theor. Appl. Genet.** 104: 281-285.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J.Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nuc. Acid. Res.** 23: 4407-4414.
- Vyskot, B., B. Koukalova, A. Kovarik, L. Sachambula, D. Reynolds and M. Bezdek. 1995. Meiotic transmission of a hypomethylated repetitive DNA family in tobacco. **Theor. Appl. Genet.** 91: 659-664.
- Vyskot, B. 1999. The role of DNA methylation in plant reproductive development, pp. 101-120. In C.C. Ainsworth, eds. **Sex Determination in Plants**. Bios Scientific Publishers Limited, Oxford. 281p.
- Vyskot, B. and R. Hobza. 2004. Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog. **T.I.G.** 20: 432-438.
- Wang, B., W.Li and J. Wang. 2005. Genetic diversity of *Alternanthera philoxeroides* in China. **Aquat. Bot.** 81: 277-283.
- William, J.G.K., A.R. Kubelik, K.I Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acid. Res.** 18: 6231-6235.
- Winter, P.C., G.I. Hickey and H.L. Fletcher. 1998. **Instant Notes in Genetics**. BIOS Scientific Publishers Limited, Belfast. 342p.

- Xiong, L.Z., C.G. Xu, M.A. Saghai Maroof and Q. Zhang. 1999. Pattern of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its potential lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. **Mol. Gen. Genet.** 261:439-446.
- Xu, M., X. Li and S.S. Korban. 2000. AFLP-Based detection of DNA methylation. **Plant Mol. Biol. Rep.** 18: 361-368.
- Xu, W.J., B.W. Wang and K.M. Cui. 2004. RAPD and SCAR markers linked to sex determination in *Eucommia ulmoides* Oliv. **Euphytica** 136:233-238.
- Yakubov, B., O. Barazani and A. Golan-Goldhirsh. 2005. Combination of SCAR primers and Touchdown-PCR for sex identification in *Pistacia vera* L. **Sci. Hortic.** 103: 473-478.
- Zhang, P., K.H. Pwee, T.W. Tan Hugh and P.K. Prakash. 2002. Cloning and characterization of *Fortune-1*, a novel gene with enhanced expression in male reproductive organs of *Cycas edentata*. **Mech. Dev.** 114: 149-152.
- Zhang, Y., J. Yang and G.Y. Rao. 2005. Genetic diversity of an amphicarpic species, *Amphicarpaea edgeworthii* Benth. (Leguminosae) based on RAPD markers. **Biochem. Sys. Ecol.** 33: 1246-1257.