



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์ พันธุศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การวิเคราะห์รูปแบบการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอต่อลักษณะเพศของปรงสกุล *Cycas*
ในประเทศไทยโดยเทคนิค Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP)

Analysis of DNA Methylation Pattern Involving Sex Determination Mechanism of *Cycas*
in Thailand using Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP)
Technique

นามผู้วิจัย นางสาวช่อลัดดา แซ่อึ้ง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา หงษ์ตระกูล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์นิตยศรี แสงเดือน, Dr.Agr.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, Dr.Agr.Sci)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... เดือน..... พ.ศ.....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การวิเคราะห์รูปแบบการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอต่อลักษณะเพศของปรงสกุล *Cycas* ในประเทศไทย โดยเทคนิค Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP)

Analysis of DNA Methylation Pattern Involving Sex Determination Mechanism of *Cycas* in Thailand using Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP) Technique

โดย

นางสาวช่อลัดดา แซ่เอ็ง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ช่อลัดดา แซ่อึ้ง 2555: การวิเคราะห์รูปแบบการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอต่อลักษณะเพศของปรังสกุล *Cycas* ในประเทศไทยโดยเทคนิค Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP) ปรังญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรังญาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ภา หงษ์ตระกูล, Ph.D. 99 หน้า

การศึกษาการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอของปรังซึ่งมีแหล่งกำเนิดอยู่ในประเทศไทยจำนวน 10 ชนิด และ 1 ชนิดย่อย โดยใช้เทคนิค methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP) จำนวน 11 คู่ โพรเมอร์ ได้เครื่องหมาย MSAP จำนวน 720 เครื่องหมาย นำแถบดีเอ็นเอที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการเติมหมู่เมธิล พบว่าปรังที่นำมาศึกษามีเปอร์เซ็นต์ของการเติมหมู่เมธิลอยู่ระหว่าง 36.95 - 57.44 เปอร์เซ็นต์ นำลายพิมพ์ ดีเอ็นเอจากเทคนิค MSAP ไปใช้สร้างแผนภาพทางพันธุกรรมและวิเคราะห์ principal component analysis (PCA) โดยอาศัยความแตกต่างในระดับของนิวคลีโอไทด์และความแตกต่างของการเติมหมู่เมธิล ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมคำนวณจากความแตกต่างในระดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 0.86 - 0.92 ในขณะที่ความเหมือนทางพันธุกรรมของข้อมูลความแตกต่างของการเติมหมู่เมธิล เมื่อคำนวณจากชุดข้อมูล *EcoRI-MspI* และ *EcoRI-HpaII* มีค่าเท่ากับ 0.78 - 0.94 และ 0.79 - 0.95 ตามลำดับ ผลการจัดกลุ่มโดยอาศัยความแตกต่างในระดับของนิวคลีโอไทด์ และระดับของการเติมหมู่เมธิลพบความแตกต่างของการจัดกลุ่มในปรังบางชนิด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ภาวะพหุสัณฐานของปรังในประเทศไทยไม่ได้มาจากความแตกต่างในระดับของนิวคลีโอไทด์เพียงอย่างเดียว แต่ยังมี ความแตกต่างของรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลด้วย โดยเปอร์เซ็นต์และรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอ รวมทั้งความแตกต่างในระดับนิวคลีโอไทด์อาจมีส่วนสำคัญในการเกิดความผันแปรทางพันธุกรรมและลักษณะปรังสกุล *Cycas* เครื่องหมาย MSAP จำนวน 720 เครื่องหมายข้างต้นยังได้นำมาใช้ศึกษาเปรียบเทียบการเติมหมู่เมธิลในปรังทั้งสองเพศ เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอ พบว่าไม่แตกต่างกันในปรังทั้งสองเพศ เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในปรังทั้งสองเพศโดยการคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมพบมีค่าประมาณ 60 - 70 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ารูปแบบของการเติมหมู่เมธิลประมาณ 30 - 40 เปอร์เซ็นต์มีความแตกต่างกันในปรังทั้งสองเพศ เมื่อตัดแถบดีเอ็นเอที่แสดงรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลที่มีความจำเพาะกับเพศจากลายพิมพ์ MSAP จำนวน 19 แถบ ไปโคลนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่ไม่มีความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูล แต่พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนแสดง ความเหมือนกับยีนซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของส่วนสืบพันธุ์ ผลการศึกษาครั้งนี้พบความแตกต่างของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในปรังทั้งสองเพศ ซึ่งอาจมีผลต่อการกำหนดเพศในปรัง อย่างไรก็ตามยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้เข้าใจกลไกดังกล่าวและนำไปสู่ข้อสรุปที่ชัดเจนมากขึ้น

Choladda Sae-Eung 2012: Analysis of DNA Methylation Pattern Involving Sex Determination Mechanism of *Cycas* in Thailand using Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP) Technique. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics.
Thesis Advisor: Assistant Professor Vipa Hongtrakul, Ph.D. 99 pages.

DNA methylation profiles of ten *Cycas* species and one subspecies localized in Thailand were studied using the methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP) technique. Eleven MSAP primer combinations were used and 720 MSAP bands were generated. The percentages of DNA methylation estimated from MSAP fingerprints were in the range of 36.95% to 57.44%. MSAP fingerprints were also used for phenogram construction and principal component analysis, based on nucleotide polymorphism and methylation polymorphism. Genetic similarity estimated from nucleotide polymorphism among these cycads ranged from 0.86 to 0.92, whereas genetic similarities of methylation polymorphism estimated from *EcoRI-MspI* and *EcoRI-HpaII* data set ranged from 0.78 to 0.94 and 0.79 to 0.95, respectively. Cluster analysis using nucleotide polymorphism and methylation polymorphism resulted in different groupings for some cycads. The results showed that polymorphism of *Cycas* in Thailand were not only limited in the nucleotide level, but also in the pattern of DNA methylation. It was proposed that the percentage and pattern of DNA methylation as well as nucleotide polymorphism were sources of variation in these cycad species. The total of 720 methylation markers was also used in methylation analysis between sexes. The results showed that percentage of DNA methylation were not statistically significant between male and female cycads. DNA methylation pattern in male and female cycads were compared based on genetic similarity from MSAP bands. The results revealed similarity around 60 to 70% between male and female in all cycads, indicating methylation patterns around 30 to 40% were different between sexes. Nineteen sex-specific MSAP bands were cloned and sequenced. Similarity search of majority of polymorphic bands using NCBI BLAST resulted in unknown sequences, while some sequences did match the known genes, reported to be involved in reproductive development. The present study showed the differences of DNA methylation between male and female *Cycas*. The possible role of DNA methylation in sex determination of *Cycas* was discussed. However, the further intensive study should be applied.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. วิภา หงษ์ตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ
รศ. ดร. นิตยศรี แสงเดือน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการ
ทำงานวิจัย รวมทั้ง ได้กรุณาให้คำแนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ และขอกราบขอบพระคุณ
รศ. ดร. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล ประธานการสอบ และ ดร. ชีรยุทธ ตูจันดา ผู้ทรงคุณวุฒิจาก
ภายนอก ที่ให้คำแนะนำในการตรวจแก้ไขและเพิ่มเติมเนื้อหาวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณกัมพล ต้นสังจา ผู้จัดการสวนนงนุช และเจ้าหน้าที่สวนนงนุช คุณ Anders
J. Lindstrom ซึ่งอำนวยความสะดวกและให้ข้อมูลในการเก็บตัวอย่างปรังในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณฉัฐติ กาญจนเกตุ ที่ให้คำแนะนำและเป็นที่ปรึกษาในการทำงานวิจัยตลอดจน
ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูลตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัยที่ผ่านมา

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และ บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา คุณย่า และญาติทุกคน ที่ให้การสนับสนุนใน
การศึกษา และอบรม ตลอดจน พี่ น้อง เพื่อนๆ และทุกๆ คน ที่เป็นกำลังใจและมีส่วนช่วยให้การ
สนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ช่อลัดดา แซ่อึ้ง
กุมภาพันธ์ 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	22
อุปกรณ์	22
วิธีการ	23
ผลและวิจารณ์	37
สรุปและข้อเสนอแนะ	75
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	77
ภาคผนวก	88
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	99

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความสามารถของเอนไซม์ <i>Hpa</i> II และ <i>Msp</i> I ในการตัดดีเอ็นเอที่ทำให้เกิดรูปแบบการเติมหมู่เมธิลของลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-CCGG-3'	21
2	ตัวอย่างปรังสกุล <i>Cycas</i> ที่ศึกษา	22
3	ลำดับเบสของ adapters และไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค MSAP	25
4	องค์ประกอบและปริมาตรสารที่ใช้ในปฏิบัติการการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และการเชื่อมต่อกับ adapter	26
5	องค์ประกอบและปริมาตรสารที่ใช้ในปฏิบัติการ preselective amplification	27
6	องค์ประกอบและปริมาตรสารที่ใช้ในปฏิบัติการ selective amplification	28
7	ตัวอย่างการแปลงข้อมูลจาก 0-1 ไปเป็นข้อมูลสำหรับใช้วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิล	31
8	ตัวอย่างรูปแบบการแปลงข้อมูลจากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค MSAP ไปเป็นข้อมูลของ Nucleotide Polymorphism	32
9	คู่ไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยเทคนิค MSAP	38
10	แสดงจำนวน monomorphic bands, polymorphic bands และเปอร์เซ็นต์ polymorphism ของปรังสกุล <i>Cycas</i>	43
11	ค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอแต่ละรูปแบบ และเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอของปรังทั้ง 11 ชนิด	45
12	ค่าเฉลี่ยจำนวนแถบดีเอ็นเอของปรังแต่ละชนิดและเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอระหว่างเพศของปรังทั้ง 10 ชนิด	53
13	ค่าเฉลี่ยของค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของรูปแบบการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอระหว่างเพศผู้และเพศเมียของปรัง 10 ชนิด	54
14	จำนวนของรูปแบบการเติมหมู่เมธิลที่จำเพาะต่อลักษณะเพศของปรังที่ศึกษา	55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
15	68
<p>รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ และรูปแบบการเติมหมู่เมธิลที่แตกต่างระหว่างเพศ ของปรองทั้ง 10 ชนิด และผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI</p>	
<p>ตารางผนวกที่</p>	
1	89
<p>ลักษณะทั่วไปและแหล่งการกระจายพันธุ์ของปรองที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทย ทั้ง 12 ชนิด</p>	
2	95
<p>สภาวะการณ์การกลับเพศของปรอง</p>	

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	6
2	10
3	10
4	14
5	39
6	40
7	41
8	44
9	48
10	48
11	50
12	54
13	56
14	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ <i>C. nongnoochiae</i> , <i>C. pectinata</i> และ <i>C. pranburiensis</i> จากเทคนิค MSAP โดยใช้ไพรเมอร์ E3/HM3	58
16	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ <i>C. pranburiensis</i> , <i>C. siamensis</i> และ <i>C. simplicipinna</i> จากเทคนิค MSAP โดยใช้ไพรเมอร์ E3/HM3	59
17	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ <i>C. tansachana</i> จากเทคนิค MSAP โดยใช้ไพรเมอร์ E3/HM3 (ก) และ E5/HM2 (ข)	60

การวิเคราะห์รูปแบบการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอต่อลักษณะเพศของปรง
สกุล *Cycas* ในประเทศไทยโดยเทคนิค Methylation-Sensitive Amplification
Polymorphism (MSAP)

Analysis of DNA Methylation Pattern Involving Sex Determination Mechanism of
Cycas in Thailand using Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism
(MSAP) Technique

คำนำ

ปรงในสกุล (genus) *Cycas* จัดอยู่ในวงศ์ (family) Cycadaceae เป็นพืชโบราณชนิดหนึ่งซึ่งนำมาใช้ศึกษาด้านวิวัฒนาการ เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับพืชดอก (angiosperm) และพืชไม่มีเมล็ด (seedless plant) โดยปรงจัดอยู่ในกลุ่มพืชเมล็ดเปลือย (naked seeds) ที่เรียกว่า gymnosperm การศึกษาวิวัฒนาการของพืชโบราณสามารถทำให้เข้าใจการกำเนิดและการแพร่กระจายของพืชที่มีเมล็ด และพืชดอก พืชในอันดับ Cycadales ปัจจุบันพบประมาณ 305 ชนิดรวม 11-12 สกุล (Stevenson, 1992) กระจายอยู่ในบริเวณเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน ปรงถูกนำมาใช้ในด้านต่างๆ เช่น ในบางพื้นที่ใช้บริโภค ใช้เป็นยารักษาโรค สำหรับในประเทศไทยพบปรงสกุล *Cycas* ประมาณ 12 ชนิด ซึ่งนิยมนำปรงมาใช้ในการประดับตกแต่งสวนเนื่องจากมีลักษณะที่สวยงามและหลากหลายตามลักษณะประจำพันธุ์ ทำให้บางพันธุ์มีราคาค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังมีการปลูกเพื่อส่งจำหน่ายต่างประเทศด้วย จึงถือว่าปรงเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในระดับหนึ่ง

ปรงเป็นพืชที่มีส่วนสืบพันธุ์แยกเพศต่างต้น (dioecious) กล่าวคือมีต้นเพศผู้และต้นเพศเมียแยกกัน แต่ลักษณะภายนอกของปรงทั้งสองเพศมีความคล้ายคลึงกันมาก การระบุเพศของปรงจะสังเกตจากโครงสร้างที่เรียกว่าโคน (cone) ซึ่งจะขึ้นอยู่บริเวณยอดต้นปรง โคนของแต่ละเพศจะมีรูปร่างแตกต่างกันและโคนของปรงต่างสกุลก็จะมีลักษณะแตกต่างกันด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตาม โครงสร้างโคนไม่ได้มีการสร้างตลอดปี และการสร้างโคนของปรงจะสร้างเมื่อเจริญเต็มวัย เนื่องจากปรงเป็นพืชที่เจริญเติบโตช้าและยังมีปัจจัยเกี่ยวข้องกับความอุดมสมบูรณ์ของพื้นที่ ทำให้

อาจใช้เวลา 10 – 20 ปี กว่าที่จะพบโครงสร้างโคสน ซึ่งระยะเวลาที่ยาวนานนี้เป็นอุปสรรคในการทำงานด้านการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์เป็นอย่างมาก ทำให้สิ้นเปลืองเวลาแรงงาน และค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษามาก นอกจากนี้การเตรียมจำนวนพืชแต่ละเพศในการผสมเกสรไม่เหมาะสมอาจทำให้ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร โดยธรรมชาติแล้วปรังเพศผู้จะสร้างเรณูจำนวนมากทำให้สามารถผสมกับปรังเพศเมียได้จำนวนมาก กล่าวคือในการผสมพันธุ์ปรังจะต้องการปรังเพศเมียจำนวนมากกว่าปรังเพศผู้ ดังนั้นหากมีวิธีทราบเพศของปรังตั้งแต่ระยะเป็นต้นอ่อนก็จะทำให้งานด้านการปรับปรุงพันธุ์มีโอกาสประสบความสำเร็จยิ่งขึ้น จึงมีผู้ศึกษาการจำแนกเพศปรังโดยวิธีต่างๆ เช่น การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการ และวิธีทางเซลล์พันธุศาสตร์ พบว่าสามารถแยกเพศของปรังบางชนิดได้ แต่ปรังบางชนิดยังไม่พบความแตกต่างในระดับโครโมโซมที่ศึกษา นอกจากนี้การศึกษาโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) และ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ก็สามารถระบุเพศของปรังได้เพียงบางชนิดเท่านั้น อย่างไรก็ตามยังมีรายงานที่บ่งชี้ว่าการกำหนดเพศของปรังน่าจะมีปัจจัยอื่นนอกเหนือจากปัจจัยทางพันธุกรรม เนื่องจากมีรายงานการกลับเพศของปรังเมื่ออยู่ในสภาวะกดดันต่างๆ และมีรูปแบบของการกลับเพศสอดคล้องกันในหลายเหตุการณ์ เช่น การย้ายที่ปลูก สภาพอากาศที่หนาวเย็น และสภาวะที่แห้งแล้งรุนแรง เป็นต้น จากการที่ปรังสามารถเกิดการกลับเพศได้เนื่องจากปัจจัยของสิ่งแวดล้อมนั้นทำให้บ่งชี้ว่ากระบวนการทาง epigenetics ส่งผลต่อการกำหนดเพศของปรังในทางใดทางหนึ่ง

การเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอ (DNA methylation) เป็นกลไกทาง epigenetics รูปแบบหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยบริเวณที่มีการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอของยีนหรือส่วนควบคุมจะไม่มี การถอดรหัส (transcription) ทำให้ยีนนั้นไม่แสดงออก ดังนั้นการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอจึงเป็นกลไกหนึ่งที่ควบคุมการแสดงออกของยีน โดยระดับของการเติมหมู่เมทิลที่แตกต่างกันจะทำให้ยีนมีการแสดงออกที่ต่างกันออกไป ทำให้เกิดความหลากหลายในระดับ transcription ซึ่งมีผลต่อการกำหนดลักษณะต่างๆ มีข้อมูลจำนวนมากที่บ่งชี้ว่าการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาของพืช เช่น การสร้างรูปร่างของดอก (Kalisz and Purugganan, 2004) การเกิดสารสี (pigmentation) ในบริเวณต่างๆ (Hoekenga *et al.*, 2000) ลักษณะการต้านทานโรคบางโรค (Sha *et al.*, 2005) และการเกิด vernalization ของพืชดอก (Finnegan *et al.*, 1998a) การเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอยังเป็นส่วนสำคัญของการเกิด imprinting ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่ระดับการแสดงออกของยีนจะขึ้นอยู่กับว่ายีนนั้นถ่ายทอดมาจากพ่อหรือแม่ (Gehring and Henikoff, 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าการเติมหมู่เมทิล

ให้ดีเอ็นเอมีผลต่อเพศของพืชและสัตว์บางชนิด (Mohan and Chandra, 2005; Zemach and Zilberman, 2010) ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถตรวจสอบรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอที่เรียกว่า methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) ซึ่งเป็นวิธีการที่ประยุกต์มาจากเทคนิค AFLP แต่ใช้เอนไซม์ที่ไวต่อการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในการศึกษาว่าการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอมีความแตกต่างกันทั้งรูปแบบและปริมาณในปรังทั้งสองเพศหรือไม่ และบริเวณใดที่มีการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอแตกต่างกันในปรังทั้งสองเพศ ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นหนึ่งในข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญของการศึกษากลไกการกำหนดเพศของพืช ซึ่งปัจจุบันยังไม่มีข้อสรุปของการกำหนดเพศที่ชัดเจน และผลของการศึกษาครั้งนี้จะนำไปสู่คำอธิบายปรากฏการณ์การกลับเพศของปรังบางชนิดได้ นอกจากนี้ยังได้นำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค MSAP วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปรังในประเทศไทยในรูปแบบของการศึกษาภาวะพหุสัณฐานเนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ และภาวะพหุสัณฐานเนื่องจากความแตกต่างในการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอด้วย

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลที่มีผลต่อการกำหนดเพศของปรงสกุล *Cycas* ที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทย และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเติมหมู่เมธิล แตกต่างกันในปรงทั้งสองเพศ



การตรวจเอกสาร

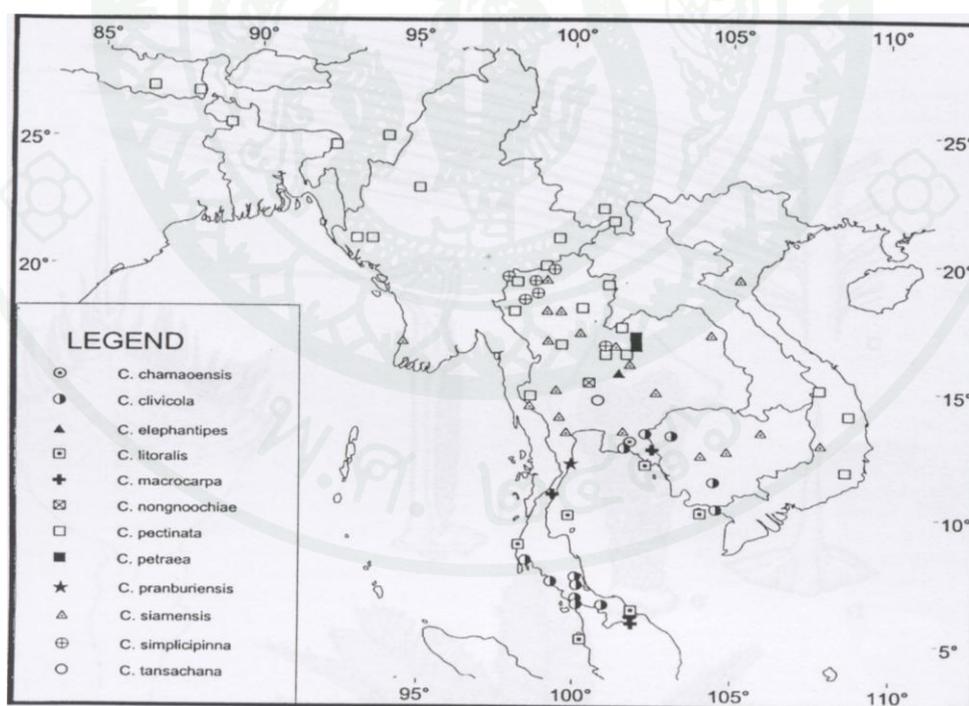
กำเนิดและการกระจายพันธุ์

พืชในกลุ่ม cycad หรือมีชื่อเรียกในภาษาไทยว่า ปรัง เป็นพืชมีเมล็ด (seed plants) จัดอยู่ในกลุ่ม gymnosperm ซึ่งคำว่า gymnosperm มีที่มาจากเมล็ดที่ยังไม่ได้รับการผสมพันธุ์ (รังไข่) ไม่มีผนังรังไข่ห่อหุ้ม (naked seeded) สามารถสัมผัสกับอากาศได้โดยตรง ลักษณะเช่นนี้การผสมพันธุ์จึงเกิดได้โดยตรงเมื่อมีละอองเรณูตกบนรังไข่ ซึ่งต่างจากในพืชดอก พืชในกลุ่ม gymnosperm จัดเป็นพืชรอยต่อทางวิวัฒนาการระหว่างพืชที่มีดอกและไม่มีดอก จากการศึกษาซากดึกดำบรรพ์นั้นพบว่า cycad เป็นกลุ่มของพืชมีเมล็ดที่มีต้นกำเนิดเก่าแก่ที่สุด มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเฟิร์นที่มีเมล็ด (seed fern) ซึ่งสูญพันธุ์ไปแล้ว ปรังกำเนิดขึ้นในยุค Late Paleozoic โดยอยู่ในยุค Permian จากการค้นพบซากดึกดำบรรพ์ที่มีอายุประมาณ 280 ล้านปี (Zhifeng and Thomas, 1989) และเป็นไปได้ว่าอาจกำเนิดมาตั้งแต่ยุค Late Carboniferous หรือเมื่อ 250-300 ล้านปีก่อน (Norstog and Nicholls, 1997)

พืชในอันดับ Cycadales นั้นประกอบด้วยปรัง 3 วงศ์ ได้แก่ 1) Stangeriaceae ปัจจุบันเหลืออยู่เพียง 3 ชนิดเท่านั้น จากหลักฐานซากดึกดำบรรพ์ที่พบอยู่ในประเทศอาร์เจนตินา ปรังวงศ์นี้กำเนิดอยู่บนแผ่นเปลือกโลก Gondwanan ตั้งแต่ยุค Lower Cretaceous (70 -135 ล้านปี) 2) วงศ์ Zamiaceae พบซากดึกดำบรรพ์กระจายตัวอยู่มากที่สุดในยุค Middle of Triassic-Eocene (54-200 ล้านปี) ในทวีปอเมริกาเหนือและอเมริกาใต้ ยุโรป ออสเตรเลีย และแอนตาร์กติกา 3) วงศ์ Cycadaceae นั้นกำเนิดขึ้นหลังสุดคือประมาณ 38-54 ล้านปีที่ผ่านมา กำเนิดในยุค Eocene บนเปลือกโลก Laurasia บริเวณประเทศญี่ปุ่นและจีน

พืชในกลุ่ม cycad กระจายตัวในเขตร้อน และกึ่งร้อนที่มีสภาพอากาศอบอุ่น บริเวณที่พบพืชในกลุ่ม cycad ได้แก่ทวีป แอฟริกา ออสเตรเลีย และอเมริกาใต้ โดยแหล่งที่มีความหลากหลายของ cycad มากที่สุดคือ อเมริกากลาง ปรังในสกุล *Cycas* เป็นปรังที่มีการกระจายตัวมากที่สุด โดยกระจายตัวตั้งแต่มหาสมุทรแปซิฟิก ลงมาถึงเกาะต่างๆ ในแถบมหาสมุทรแปซิฟิก ประเทศจีน ประเทศอินเดีย และประเทศมาดากัสการ์ รวมทั้งชายฝั่งตะวันออกของ ทวีปแอฟริกา (Jones, 1998) ทั่วโลกพบพืชสกุล *Cycas* ประมาณ 99 ชนิด ในทวีปเอเชียพบประมาณ 63 ชนิด ส่วนประเทศไทยนั้นพบว่าเป็นศูนย์รวมของปรังจำนวน 12 ชนิดซึ่งกระจายตัวอยู่ตามภูมิภาคต่างๆ

ของประเทศ (ภาพที่ 1, ตารางผนวกที่ 1) ได้แก่ *C. chamaoensis* K.D. Hill, *C. clivicola* subsp. *clivicola* K.D. Hill, *C. clivicola* subsp. *lutea* K.D. Hill, *C. elephantipes* A. Lind str. & K.D. Hill, *C. edentata* K.D. Hill, *C. macrocarpa* subsp. *macrocarpa* Griffith, *C. macrocarpa* subsp. *brevidens* K.D. Hill, *C. nongnoochiae*, *C. pectinata* Buch.-Ham., *C. pranburiensis* S.L. Yang, K.D. Hill, W. Tang & P. Vatcharakorn, *C. petrea* H.D. Hill, *C. siamensis* Miquel, *C. simplicipinna* Smitinand, K.D. Hill และ *C. tansachana* K.D. Hill & S.L. Yang (พูนศักดิ์, 2548; Donalson, 2003) ถิ่นที่อยู่ของปรังแต่ละชนิดมีทั้งชนิดที่อยู่ตามหน้าผาบนภูเขาหินปูน ในป่าผลัดใบที่มีแสงมาก หรือที่อยู่ในป่าดิบชื้น ป่าไผ่ รวมทั้งมีปรังบางชนิดที่พบตามป่าชายหาด เนื่องจากมีการแพร่พันธุ์โดยการพัดพาเมล็ดไปกับน้ำทะเล เช่น *C. edentata* (พูนศักดิ์, 2548) ส่วนปรังชนิดอื่นๆ ก็มีค้างคาวหรือสัตว์ที่กินพืชชนิดอื่นๆ เป็นตัวช่วยพาเมล็ดไปกระจายพันธุ์ยังสถานที่ใกล้เคียง ในปัจจุบันปรังส่วนใหญ่ที่เหลืออยู่ตามธรรมชาติมีปริมาณลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีการบุกรุกพื้นที่ป่าเพื่อใช้เป็นที่เพาะปลูก รวมทั้งการลักลอบนำปรังจากป่าไปขายยังตลาดต้นไม้ จึงทำให้ปรังเกือบทั้งหมดอยู่ในสถานะถูกคุกคามและหลายชนิดเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์



ภาพที่ 1 แหล่งการกระจายพันธุ์ของปรังสกุล *Cycas* ในประเทศไทย

ที่มา: Lindstrom and Hill (2002)

ลำดับอนุกรมวิธาน

การศึกษาด้านอนุกรมวิธานในพืชสกุล *Cycas* ครั้งแรกรายงานโดย Linnaeus โดยได้จัดพืชกลุ่มนี้อยู่ในวงศ์เดียวกับปาล์มในปี 1737 โดยชื่อ *Cycas* มาจากคำว่า *Koikas* ในภาษากรีก ซึ่งแปลว่ามีลักษณะคล้ายต้นปาล์ม และต่อมาปรังได้ถูกจัดจำแนกออกมาอยู่ในวงศ์ใหม่คือ Cycadaceae โดย Lindley ในปี 1831 และ Endlicher ในปี 1836-1840 ปัจจุบันจัดปรังอยู่ในกลุ่ม gymnosperm โดย Tichem ในปี 1898 และเมื่อจัดปรังทั้ง 11 สกุลตามลำดับอนุกรมวิธานสามารถจัดได้ดังนี้ (Nostog and Nicholls, 1997)

Order Cycadales

Suborder Cycadineae

Family Cycadaceae

Genus *Cycas*

Suborder Zamiineae

Family Stangeriaceae

Subfamily Stangerioideae

Genus *Stangeria*

Subfamily Bowenioideae

Genus *Bowenia*

Family Zamiaceae

Subfamily Encephalartoideae

Tribe Diooeae

Genus *Dioon*

Tribe Encephalarteae

Subtribe Encephalartinae

Genus *Encephalartos*

Subtribe Macrozamiinae

Genus *Macrozamia*

Genus *Lepidozamia*

Subfamily Zamiadeae

Tribe Ceratozamiace

Genus *Ceratozamia*

Subtribe Microcycadinae

Genus *Microcycas*

Subtribe Zamiinae

Genus *Zamia*Genus *Chigua***ลักษณะทั่วไปของปรงในสกุล *Cycas***

โครงสร้างทางด้านสัณฐานวิทยาของปรงในสกุล *Cycas* มีลักษณะคล้ายปาล์ม (ภาพที่ 2) ส่วนใหญ่จะมีลำต้นอยู่เหนือดิน (aerial stem) บางชนิดมีลักษณะลำต้นทอดนอน (procumbent) เช่น *C. tansachana* บางชนิดมีทั้งลำต้นเหนือดินและลำต้นใต้ดิน (subterranean stem) ได้แก่ *C. siamensis* และมีเพียงชนิดเดียวที่มีลำต้นอยู่ใต้ดินเท่านั้น คือ *C. simplicipinna* ลำต้นของปรงในสกุลนี้ค่อนข้างเรียบและมีสีแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ เช่น สีเหลือง สีเทา สีดำ ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก (pinnately compound leaf) กระจุกอยู่บริเวณส่วนบนสุดของลำต้น ก้านใบมักมีหนาม บางชนิดฐานใบติดทนนานบริเวณใกล้ๆ เรือนยอด ฐานใบมีลักษณะเหมือนใบเกล็ด (scale like leaf) เรียกว่า cataphyll ความยาวของใบและจำนวนใบที่กระจุกอยู่บริเวณยอดมีปริมาณแตกต่างกันในปรงแต่ละชนิดเช่น *C. simplicipinna* มีใบที่ยอดเพียง 2-5 ใบ ในขณะที่ *C. clivicola* subsp. *clivicola* มีใบกระจุกอยู่หนาแน่นประมาณ 40- 100 ใบ ที่เรือนยอด โดยปกติแล้วใบอ่อนของปรงจะม้วน และปกคลุมด้วยขน (hair or trichome) เมื่อใบเจริญเต็มที่ขนมักจะหลุดหายไปใบจึงมีลักษณะเรียบและมัน มีสีเขียวเข้ม แต่ก็มีบางชนิดที่ยังมีขนติดอยู่ใต้ใบจนทำให้เห็นหลังใบเป็นสีขาว ได้แก่ *C. siamensis* ระบบรากมีทั้งที่เป็นรากแก้ว หรืออาจถูกแทนที่ด้วยรากแขนงก็ได้ รวมทั้งมีรากพิเศษที่เรียกว่า coralloid root (ภาพที่ 3) ซึ่งแตกแขนงแบบ dichotomous อยู่รวมกันเป็นกลุ่มรูปแท่งมักมี cyanobacterium อาศัยอยู่โดยทำหน้าที่ตรึงไนโตรเจนในบริเวณนั้น และผลิตสารพิษชนิด neurotoxin ที่เรียกว่า β -methylamino-L- alanine (BMAA)

พืชสกุล *Cycas* ทั้งหมดเป็นพวก dioecious plant ซึ่งจะสร้างส่วนสืบพันธุ์แยกเพศและแยกต้นกัน ดังนั้นในแต่ละต้นจะมีเพศเดียวเท่านั้น ส่วนสืบพันธุ์เพศผู้เรียกว่า male cone ซึ่งประกอบไปด้วย microsporophyll เรียงตัวอัดแน่นเป็นรูปไข่ (ovoid) บนแผ่น microsporophyll เป็นที่อยู่ของ

ละอองเรณู ส่วนเพศเมียจะมี megasporophyll เรียงตัวค่อนข้างหลวม อยู่เป็นกลุ่มเรียกว่า female cone ซึ่งต่างจากปรังในสกุลอื่นๆ ที่ megasporophyll เรียงตัวค่อนข้างแน่น (Norstog and Nicholls, 1997) บนแต่ละ megasporophyll ของพืชสกุลนี้จะมีจำนวน ovule 2-4 อัน ผิวเรียบ การเคลื่อนย้ายของละอองเรณูเกิดได้หลายวิธีจาก ลม แมลง รวมทั้งมนุษย์ แมลงที่ช่วยผสมพันธุ์ ได้แก่ ค้างคาว และแมลงเต่าทอง

ปรังเป็นพืชที่มีประโยชน์หลากหลาย โดยส่วนใหญ่นิยมนำมาเป็นไม้ประดับ แต่นอกจากความสวยงามแล้ว ปรังยังใช้เป็นยารักษาโรคได้ด้วย เนื่องจากเมล็ดเมื่อนำมาบดแล้วทำให้มีลักษณะเหมือนกาวหรือแป้งเปียก ผสมกับน้ำมันมะพร้าว นำมาพอกบริเวณที่เป็นแผลใช้บรรเทาอาการอักเสบ พุพอง หรือแผลที่เกิดจากน้ำร้อนลวกได้ ลำต้นเมื่อเปรียบเทียบกับพืชชั้นสูงแล้ว พบว่ามีเนื้อเยื่อลำเลียงในปริมาณน้อย โครงสร้างภายในส่วนใหญ่จะมีเซลล์ชนิด parenchyma เป็นส่วนมาก ทำหน้าที่สะสมแป้ง ลักษณะนี้เองจึงทำให้พืชบางชนิดในสกุลนี้ได้ชื่อว่า sago palm ซึ่งใช้เป็นแหล่งอาหารประเภทแป้ง สามารถนำมาบริโภคได้แต่ต้องผ่านการกำจัดสารพิษที่มีอยู่ก่อน ส่วนสาหร่ายที่มีขายในท้องตลาดนั้นไม่ได้มาจากปรังชนิดนี้ แต่มาจากปาล์มสกุล *Metroxylon* การที่ไม่นิยมนำพืชพวก cycad มาทำแป้งในเชิงอุตสาหกรรมนั้นเนื่องมาจากเจริญเติบโตค่อนข้างช้า และที่สำคัญกว่านั้นคือหลายๆ ส่วนของปรัง มักจะมีสารที่เป็นพิษต่อร่างกาย จำพวก neurotoxic และสารก่อมะเร็ง สารพิษที่พบในปรังประกอบไปด้วย 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) methylazoxymethanal (MAM) glycosides เช่น cycasin, macrozamin และ neocycasins 2) amino acids เช่น β -methylamino-L-alanine (BMAA) และ β -N-oxalylamino-L-alanine (BOAA) 3) steryl glucoside สารเหล่านี้ถูกสร้างขึ้นจาก cyanobacteria ที่อาศัยในรากของปรัง และส่งไปสะสมยังเนื้อเยื่อต่างๆ โดยเนื้อเยื่อส่วนที่พบสารเหล่านี้มากที่สุดคือ เมล็ด รวมทั้งพบในลำต้นด้วยเช่นกัน การค้นพบสารเหล่านี้มีจุดเริ่มต้นมาจากการพบผู้ป่วยโรคพาร์กินสันเป็นจำนวนมากผิดปกติของทหารที่ไปอยู่ที่เกาะ Guam ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 โดยบริโภคแป้งที่ผลิตจากพืชท้องถิ่น *C. micronesica* K. D. Hill. (Osborne *et al.*, 1994) อีกทั้งการบริโภคสัตว์ปีก และสัตว์ที่บริโภคผลปรังเป็นอาหาร อย่างเช่นค้างคาว ก็ทำให้เกิดการสะสมของสารพิษได้ เนื่องจากสัตว์เหล่านี้จะค่อยๆ สะสมสารพิษเอาไว้ในร่างกายเช่นกัน



ภาพที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของปรงสกุล *Cycas* ก. ปรงเพศผู้สร้าง cone เพศผู้รูปทรงไข่แคบ ข. ปรงเพศเมียสร้างโคนเพศเมียรูปทรงกลม ค. Cone เพศเมียจะมีไมโครสปอร์โรฟิลห่อหุ้มเมล็ดไว้อย่างหลวมๆ เป็นกลุ่ม บริเวณเรื่อนยอด ง. เมล็ดของปรงที่ติดอยู่บนไมโครสปอร์โรฟิล



ภาพที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ coralloid root ซึ่งเป็นรากแขนงของปรง แตกแขนงแบบ dichotomous ที่ปลายลูกศร แสดงบริเวณที่มี cyanobacteria อาศัยอยู่ มีลักษณะเป็นวงสีเขียวที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า อาศัยอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อ cortex ชั้นใน และชั้นนอก (C=coralloid), (PC=precoralloid) ที่มา: Medeiros and Stevenson (1998)

ระบบการกำหนดเพศของพืช

สิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปมี 2 เพศ การกำหนดเพศอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยทางพันธุกรรม รวมทั้งปริมาณของฮอร์โมน และสภาพแวดล้อม ในส่วนของความแตกต่างทางพันธุกรรม เช่นมีแอลลีลหรือยีนที่ทำหน้าที่กำหนดเพศผู้หรือเพศเมียที่ต่างกัน ในสัตว์การเกิดเพศต่างกันมักมาจากการมีโครโมโซมเพศที่ต่างกัน (XY system) อัตราส่วนของโครโมโซมเพศต่อโครโมโซมร่างกาย (X:A system) ในบางกรณีเพศก็ต่างกันเนื่องจากผลของสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน เช่น อุณหภูมิในขณะพัก ไข่ ขนาด และอายุของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ในพืชมีข้อมูลของระบบการกำหนดเพศค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับสัตว์ การกำหนดเพศส่วนใหญ่จะกล่าวถึงพืชที่มีการสร้างส่วนสืบพันธุ์แยกเพศต่างต้น (dioecious plant) แต่พืชบกส่วนใหญ่เป็น monoecious มีเพียง 9-10% เท่านั้นที่เป็น dioecious ในทำนองเดียวกัน พืชดอกส่วนใหญ่จึงเป็น monoecious คือมีการสร้างดอกเพศผู้และเพศเมียบนต้นเดียวกัน หรือบนดอกเดียวกัน (hermaphrodite) พืชดอกที่เป็น dioecious มีประมาณ 6% เท่านั้น (ประมาณ 14,600 ชนิด จาก 960 สกุล จากพืชดอก 200 วงศ์) (Renner and Ricklefs, 1995) โดยการกำหนดเพศในพืชมีหลายระบบได้แก่

1. โครโมโซมเพศเป็นตัวกำหนดเพศ

1.1 ระบบ XY System ประกอบด้วย 1) heterogametic male ระบบนี้ เพศเมียจะมีโครโมโซมเป็น XX ส่วนเพศผู้มีโครโมโซม XY ระบบการกำหนดเพศนี้พบมากที่สุดในพื้นที่เขตร้อน เช่น กลุ่มพืชชั้นต่ำ (Bryophyta) จำพวก มอส (moss) ลิเวอร์เวิร์ด (liverwort) กลุ่มพืชเมล็ดเปลือย (Gymnosperm) บางชนิด เช่น *Cycas circinalis* และ *C. revoluta* และกลุ่มของพืชดอก (Angiosperm) เช่น *Silene latifolia*, *S. dioica* ก็อกซีเนีย (*Coccinia grandis*) มะละกอ (*Carica papaya*) หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) และพืชในสกุล *Trichosanthes* จำพวกแตงต่างๆ และอื่นๆ อีกหลายชนิด 2) heterogametic female ระบบนี้เพศเมียจะมีโครโมโซมต่างกัน (ZW) ส่วนเพศผู้จะมีโครโมโซมเหมือนกัน (ZZ) ได้แก่ แปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) สตรอเบอร์รี่ (*Fragaria virginiana*) และ *Populus trichocarpa* เป็นต้น

1.2 ระบบ X:A ratio เป็นระบบที่กำหนดเพศโดยใช้อัตราส่วนระหว่างจำนวนโครโมโซม X ต่อโครโมโซมร่างกาย พบในพืชสกุล *Humulus* ได้แก่ *H. lupulus*, *H. japonicas*

ถึงแม้ว่าจะพบโครโมโซม Y ปรากฏในเพศผู้ด้วยเช่นกัน แต่โครโมโซม Y จะมีความสำคัญต่อกระบวนการพัฒนาและการเจริญเติบโตโดยไม่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศ

2. สภาพแวดล้อมและฮอร์โมนเป็นตัวกำหนดเพศ

การกำหนดเพศถูกควบคุมด้วยยีน แต่สามารถชักนำให้เกิดเพศใดเพศหนึ่งได้โดยการใช้ฮอร์โมนและสภาพแวดล้อม พบได้ในพืชกลุ่มแตง เช่น แตงกวา (*Cucumis sativa*) แคนตาลูป (*C. melo*) ปกติที่บริเวณตาดอกจะมีจุดกำเนิดของการสร้างโครงสร้างดอกทั้งเพศผู้และเพศเมีย แต่เมื่อให้ฮอร์โมนเอทิลีน (ethylene) จะทำให้สร้างแต่ดอกเพศเมีย แต่ถ้าให้สารที่ยับยั้งการสร้างเอทิลีนก็จะส่งผลให้สร้างดอกชนิดสมบูรณ์เพศขึ้น (Byers *et al.*, 1972)

3. ระยะเวลาเจริญเติบโต

การกำหนดเพศโดยขึ้นอยู่กับระยะของการเจริญเติบโต พบใน *Arisaema triphyllum* โดยในระยะแรกของการเจริญเติบโต จะสร้างดอกเพศผู้ จากนั้นเมื่อโตขึ้นจะสร้างทั้งดอกเพศผู้และดอกเพศเมีย และเมื่ออายุมากขึ้นอีกระยะหนึ่งก็จะสร้างแต่ดอกเพศเมีย (Ewing and Klein, 1982)

การศึกษาที่ผ่านมาเชื่อว่าโครโมโซมเพศในระบบ XY system มีวิวัฒนาการมาจากโครโมโซมร่างกาย (Charlesworth *et al.*, 2005) โดยการเกิดโครโมโซมเพศนั้นมีจุดเริ่มต้นจากการกลายของยีนบางตำแหน่ง โดยเกิดจากการสะสมของ Junk DNA จากการเกิด Insertion ของ ดีเอ็นเอที่เป็นลำดับเบสแบบซ้ำ (Matsunaga, 2009) ซึ่งต่อมาส่งผลต่อการยับยั้งการเกิดรีคอมบิเนชันระหว่างโครโมโซมเพศ โดยการเกิดโครโมโซมเพศประกอบไปด้วย 6 ระยะดังภาพที่ 4 และมีระยะต่างๆ ดังต่อไปนี้ (Ming *et al.*, 2011)

ระยะที่ 1 เริ่มจากการกลายในตำแหน่งที่ไม่ส่งผลร้าย (deleterious mutation) ต่อการดำรงชีวิต และยับยั้งการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย ทำให้เกิด female sterility จึงทำให้เกิด Y-linked allele ที่เด่นขึ้นมา (ในกรณีของระบบ ZW เหตุการณ์นี้จะตรงข้ามกัน) กรณีนี้ทำให้เกิด Proto X และ Proto Y โครโมโซม ตัวอย่างของพืชที่พบว่ามีโครโมโซมในระยะนี้ ได้แก่ สตรอเบอร์รี่ *Fragaria virginiana*

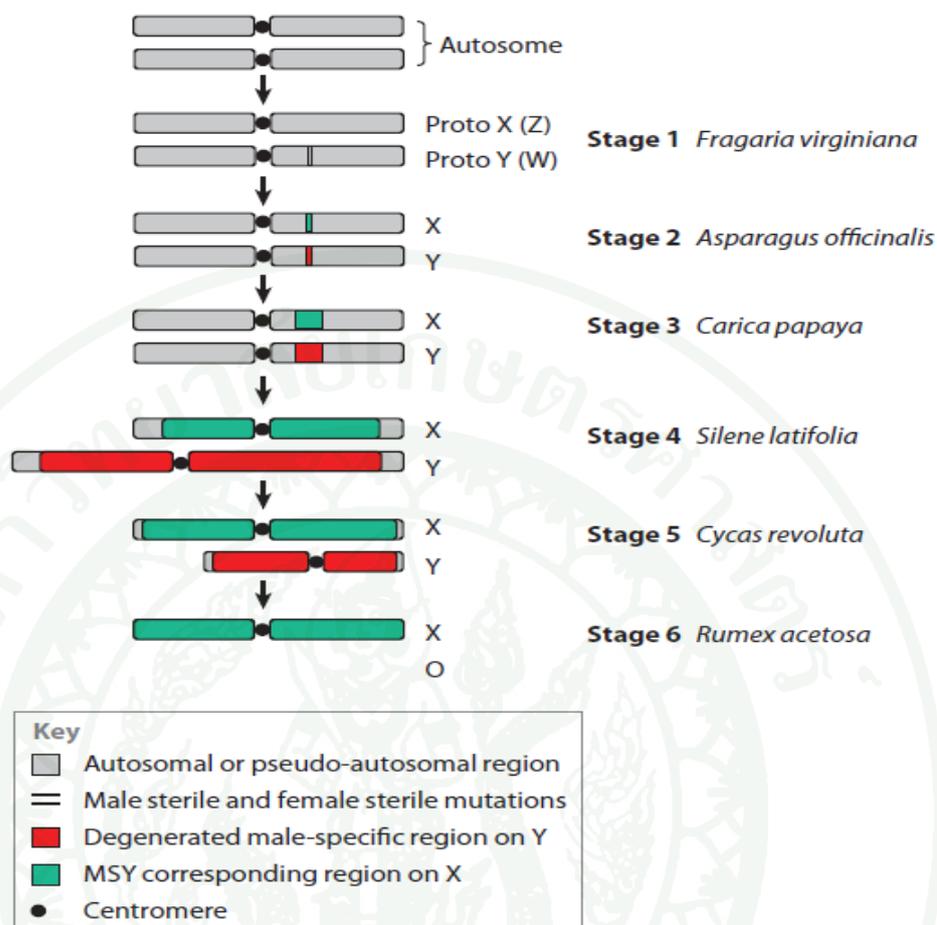
ระยะที่ 2 เริ่มมี male specific region เกิดขึ้นบน โครโมโซม Y ที่เกิดใหม่ เนื่องจากเกิดการยับยั้งการเกิดรีคอมบิเนชัน (suppression of recombination) ณ ตำแหน่งที่ใช้ในการกำหนดเพศ (sex determining loci) ของทั้งสองเพศรวมทั้งบริเวณใกล้เคียง ทำให้เริ่มเกิด male-specific region ขนาดเล็ก ในกรณีนี้พบว่าต้นที่มีโครโมโซมเพศเป็น YY ยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ ตัวอย่างพืชที่พบคือหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*)

ระยะที่ 3 เกิดการยับยั้งการเกิดรีคอมบิเนชัน ณ ตำแหน่งที่ใช้ในการกำหนดเพศและบริเวณรอบข้างขยายออกกว้างขึ้น ส่งผลให้มีจำนวนของ Y-linked gene เพิ่มมากขึ้นและบริเวณ male-specific region ที่ขยายออกก็มีการสะสมของ retrotransposon รวมทั้งชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดจาก translocation และ duplication ร่วมด้วย ในระยะนี้ขนาดของโครโมโซมในทั้งสองเพศยังคงมีขนาดไม่แตกต่างในทางเซลล์พันธุศาสตร์ แต่มีความแตกต่างในระดับโมเลกุลซึ่งส่งผลให้ต้นที่มีจีโนไทป์ YY ไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ ตัวอย่างของพืชในระยะนี้ได้แก่ มะละกอ (*Carica papaya*)

ระยะที่ 4 บริเวณ male-specific region ขยายขนาดออกเกือบเต็มโครโมโซม Y โดยการสะสมของ transposable element และเกิด duplication ขึ้นในบริเวณของ male-specific region ทำให้การขยายขนาดและปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ male-specific region ขยายออกอย่างมาก ระยะนี้โครโมโซม X และ Y จะมีขนาดแตกต่างกัน และโครโมโซม Y มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม X ตัวอย่างของพืชในระยะนี้ได้แก่ White campion (*Silene latifolia*)

ระยะที่ 5 โครโมโซม Y มีการสะสมของดีเอ็นเอที่ก่อให้เกิดผลเสียมากขึ้นเรื่อยๆ จนทำให้ยีนส่วนใหญ่บนโครโมโซม Y สูญเสียน้ำที่ไป และทำให้โครโมโซม Y ลดขนาดลง มีเพียงส่วนเล็กๆ ของโครโมโซม เท่านั้นที่ยังคงเข้ากับโครโมโซม X ได้ พบได้ใน *Cycas revoluta*

ระยะที่ 6 การยับยั้งการเกิดรีคอมบิเนชันเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ ทำให้โครโมโซม Y ลดขนาดลงและสูญเสียโครโมโซม Y ไปในที่สุด เกิดเป็น pseudoautosome ขึ้น ส่งผลให้เกิดวิวัฒนาการของระบบการกำหนดเพศแบบ X- to- autosome ratio ตัวอย่างพืชที่พบคือ *Rumex acetosa*



ภาพที่ 4 วิวัฒนาการของการเกิดโครโมโซมเพศ 6 ระยะ

ที่มา: Ming *et al.* (2011)

เทคนิคการจำแนกเพศของพืช

การจำแนกเพศของพืชเบื้องต้นสามารถจำแนกได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เมื่อพืช
 นั้นๆ สร้างส่วนสืบพันธุ์แล้ว ในกรณีของพืชดอก ดอกเพศผู้จะสร้างส่วนสืบพันธุ์เพศผู้ได้แก่
 อับเรณู ละเอียดของเรณู ส่วนเพศเมียจะสร้างรังไข่ หรืออาจสร้างทั้งสองอย่างในดอกเดียวกันในกรณีที่เป็น
 ดอกสมบูรณ์เพศ (hermaphrodite) ในพืชเมล็ดเปลือยจะสร้างส่วนสืบพันธุ์ที่เรียกว่าโคน (cone)
 ในพืชไม่มีเมล็ดก็เช่นเดียวกัน การจำแนกเพศจะสังเกตจากส่วนของต้นแกมีโทไฟต์เพศผู้และเพศ
 เมีย เช่นในเฟิร์นจะสังเกตจากกลุ่มสปอร์ที่อยู่ใต้ใบ แต่การจำแนกเพศของพืชในระยะที่ยังไม่สร้าง
 ส่วนสืบพันธุ์นั้นก็ได้รับความสนใจและมีการศึกษามาอย่างต่อเนื่อง ทั้งในพืชกลุ่ม dioecious และ

trioecious โดยเทคนิคที่นำมาใช้ในการตรวจสอบก็คือ การตรวจสอบโดยเทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์ และการใช้เทคนิคทางโมเลกุล

การตรวจสอบเพศโดยศึกษาลักษณะของโครโมโซมเพศนั้นมีการศึกษาในพืชหลายชนิดในกลุ่ม dioecious เช่น สกุล *Melandium*, *Silene*, *Carica*, *Marchantia* รวมทั้งใน *Cycas* ด้วย แต่การตรวจสอบเพศโดยวิธีนี้ไม่สามารถตรวจสอบในพืชกลุ่ม dioecious ได้ทุกชนิด เนื่องจากความแตกต่างของโครโมโซมเพศนั้นอาจสังเกตได้ยาก ทำให้ไม่พบความแตกต่างในระดับโครโมโซม อีกทั้งต้องใช้เวลาค่อนข้างนานในการตรวจสอบ ซึ่งไม่สะดวกหากต้องตรวจสอบตัวอย่างพืชในปริมาณมาก

การตรวจสอบเพศโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลนั้นได้มีการนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบเพศในพืชหลายชนิด เช่น Alstrom-Rapaport *et al.* (1998) พบเครื่องหมาย RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), UBC3455₅₆₀ ที่เชื่อมโยงกับ sex determining locus, (SDL-II) ของต้น *Salix viminalis* และในปี ค.ศ. 2003 Gunter *et al.* ได้พัฒนาเครื่องหมาย SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความจำเพาะกับเพศเมีย (SDL-II) ของ *Salix viminalis* ซึ่งเครื่องหมายที่ได้นี้มีความเชื่อมโยงกับเพศเมียประมาณ 96 % ส่วน Samantaray (2010) ใช้เครื่องหมาย RAPD ในการจำแนกเพศของต้น *Commiphora wightii* ซึ่งเป็นพืชในกลุ่ม dioecious พบว่าไพรเมอร์ OPN06 สามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1280 คู่เบส เฉพาะในตัวอย่างต้นเพศเมียและในปี ค.ศ. 2011 Hosseini *et al.* ได้นำเครื่องหมาย RAPD มาใช้ในการตรวจสอบเพศของ *Jojoba (Simmondsia chinensis cv. Arizona)* อีกด้วย นอกจากเทคนิค RAPD แล้วเทคนิคอื่นๆ เช่น เทคนิค differential display และ ISSR (Inter simple sequence repeat) ก็มีรายงานการใช้สร้างเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะต่อเพศเช่นกัน โดยเทคนิค differential display นำมาใช้ตรวจสอบเพศของ *Piper longum. L* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งในกลุ่ม dioecious ซึ่งไม่สามารถบอกความแตกต่างของเพศได้ด้วยการตรวจสอบลักษณะทางเซลล์พันธุศาสตร์ (Manoj *et al.*, 2008) รวมทั้งมีรายงานการใช้เครื่องหมาย ISSR ในการตรวจสอบเพศของมะละกออีกด้วย (Gangopodhyay *et al.*, 2007)

การจำแนกเพศของปรง

ปรงเป็นพืชที่มีส่วนสืบพันธุ์แยกเพศแยกต้น การจะทราบเพศของปรงนั้นสังเกตได้จาก อวัยวะสืบพันธุ์ (male or female cone) เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตาม Sanchez-Tinoco *et al.* (1993) ได้รายงานว่า สามารถจำแนกเพศของ *Ceratozamia maxicana* ได้โดยดูจากความหนาแน่นของหนาม (prickle) ที่อยู่บนก้านใบ (petiole) ซึ่งในเพศผู้จะยาวและหนาแน่นมากกว่าเพศเมีย การจำแนกเพศของปรงโดยศึกษาความต่างของโครโมโซมได้มีรายงานการค้นพบใน *Cycas revoluta* และ *Cycas circinalis* โดย Shetty and Subramanyam (1962) และมีรายงานของ Abraham and Mathew (1962) พบ satellite body ที่โครโมโซมคู่ที่ 3 ของเพศผู้และเพศเมียของ *Cycas circinalis* โดยเพศเมียมี satellite body ทั้ง 2 แห่ง ส่วนเพศผู้พบ satellite body เพียง 1 แห่ง ต่อมา เมธานี (2546) ได้ศึกษาโครโมโซมของปรงสกุล *Cycas* 5 ชนิดและ สกุล *Zamia* 6 ชนิด พบว่าปรงสกุล *Cycas* ทั้ง 5 ชนิดที่ศึกษามีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ $2n = 2x = 22$ ส่วนปรงสกุล *Zamia* มีจำนวนโครโมโซมหลากหลายตั้งแต่ $2n = 2x = 16$ จนถึง $2n = 2x = 24$ เมื่อพิจารณา satellite บนโครโมโซม พบว่ามีความแตกต่างของจำนวน satellite ระหว่างเพศในปรงสกุล *Cycas* ทั้ง 5 ชนิดคือ *Cycas clivicola*, *C. edentata*, *C. pectinata*, *C. siamensis* และ *C. tansachana* รวมถึงปรงสกุล *Zamia* อีก 1 ชนิดคือ *Zamia pumila* ในขณะที่ *Zamia muricata* พบจำนวนโครโมโซมในเพศผู้และเพศเมียไม่เท่ากัน ในเพศผู้พบว่ามี $2n = 2x = 23$ แต่เพศเมียมี $2n = 2x = 24$ *Zamia pygmaea* และ *Zamia vazquezii* ทั้งสองเพศมีจำนวน satellite บนโครโมโซมเท่ากัน ส่วน *Zamia herrerae*, *Zamia integrifolia* และ *Zamia monticola* ไม่ปรากฏ satellite บนโครโมโซมและไม่พบความแตกต่างใดๆ ในแคโรไทป์ของทั้ง 2 เพศ ได้มีผู้ศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชกลุ่ม cycads พบว่าสกุล *Bowenia*, *Chigua*, *Dioon*, *Encephalartos*, *Lepidozamia*, *Macrozamia*, *Strangeria* และ *Zamia* มีจำนวนโครโมโซม $2n = 18$ หรือ $2n = 16$ (*Cerotozamia*, *Strangeria*, *Zamia*) ส่วนสกุล *Cycas* มีจำนวนโครโมโซม $2n = 22$ และสกุล *Microcycas* มีจำนวนโครโมโซม $2n = 26$ (Norstog, 1980; 1981; Moretti, 1990; Moretti *et al.*, 1991; Vovide and Olivares, 1996) นอกจากการศึกษาโครโมโซมแล้วยังมีการศึกษาการจำแนกเพศของปรงโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล และยีนชนิดต่างๆ เช่น Zhang *et al.* (2002) ค้นพบยีน Fortune-1 ซึ่งแสดงออกใน male cone และไม่แสดงออกใน ovule รวมทั้งใน megasporophyll แต่การตรวจสอบยีนนี้ทำได้ยาก เนื่องจากยีนนี้แสดงออกใน ราก ใบ และลำต้นได้น้อย สจี้ (2547) ได้ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism: AFLP) ตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่บ่งชี้ลักษณะเพศในปรงสกุล *Cycas* 6 พันธุ์ และสกุล *Zamia* 8 พันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนเหมาะสม และพบ

แถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับปรังแต่ละสกุล และยังพบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับเพศเมียเพศผู้ของปรังบางชนิด จูติ (2549) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD และ MSAP ร่วมกับการประยุกต์ใช้เทคนิค bulked segregant analysis ในการตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่บ่งชี้ลักษณะเพศของปรังสกุล *Cycas* 6 ชนิด และ *Zamia* 6 ชนิด พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศในปรังบางชนิดและจำเพาะต่อปรังแต่ละสกุล แต่ยังไม่พบแถบดีเอ็นเอแถบใดที่จำเพาะต่อเพศของปรังทุกชนิด Gangopodhyay *et al.* (2007) ได้ใช้เครื่องหมาย RAPD ในการตรวจสอบเพศของ *Cycas circinalis* พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะกับต้นเพศผู้ ซึ่งอาจจะนำมาใช้ในการตรวจสอบเพศของ *Cycas circinalis* ได้ เช่นเดียวกับ Sangin (2010) ได้ใช้ไพรเมอร์ RAPD และ ISSR ในการหาแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเพศของปรังสกุล *Cycas* จากการทดสอบไพรเมอร์ RAPD 80 ชนิด พบว่ามีเพียง 2 ชนิดเท่านั้นคือ OPB18 ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างเพศของ *C. chamaoensis* (M, F), *C. elephantipes* (F, M), *C. siamensis* (M), *C. pectinata* (M) และ *C. nongnoochiae* (F) โดยในเพศผู้มีขนาดประมาณ 500 คู่เบส เพศเมียมีขนาดประมาณ 400 คู่เบส ส่วนไพรเมอร์ UBC 485 พบแถบดีเอ็นเอขนาด 427 คู่เบส เฉพาะในเพศผู้ของ *C. clivicola* เท่านั้น โดยเมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเพศไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่า แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเพศเป็นบริเวณที่มี AT rich และมีลำดับเบสที่เป็น ไมโครแซเทลไลต์แทรกอยู่ในเพศเมียมีลำดับเบสซ้ำแบบ (TA)₂ 6 ซ้ำ ส่วนในเพศผู้มีลำดับเบสแบบ (TG)₂ 6 ซ้ำ และพบไพรเมอร์ ISSR ที่มีความจำเพาะกับเพศของปรังอีก 3 ชนิด แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปพัฒนาเป็นเครื่องหมาย SCAR พบว่าเครื่องหมาย SCAR ที่พัฒนาขึ้น ไม่สามารถระบุเพศของปรังได้อย่างชัดเจน

นอกจากนี้การกำหนดเพศของปรังยังอาจเกิดจากปัจจัยอื่นๆ ได้อีก เนื่องจากมีรายงานการกลับเพศของปรังเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องกว่า 70 ปี โดยในปี ค.ศ. 2002 Osborne and Gorelick ได้รวบรวมเหตุการณ์การกลับเพศของปรังสกุลต่างๆ ไว้ 30 เหตุการณ์ ซึ่งสันนิษฐานว่าการกลับเพศของปรังนั้นเกิดขึ้นหลังจากเกิดภาวะกดดัน (stress) จากหลายสาเหตุ เช่น เกิดการเปลี่ยนเพศหลังจากมีการย้ายที่ปลูก เกิดจากสภาพอากาศที่หนาวเย็น และสภาวะแห้งแล้ง ดังแสดงในตารางผนวกที่ 2 จากเหตุการณ์ดังกล่าวสามารถกล่าวได้ว่า สภาวะกดดันเนื่องจากการย้ายปลูกสามารถทำให้เกิดการกลับเพศในปรังได้ สภาพอากาศที่หนาวเย็นและการย้ายปรังไปปลูกในที่ร่มสามารถชักนำให้เกิดการกลับเพศจากเพศผู้เป็นเพศเมียได้ การอยู่ในสภาวะที่แห้งแล้งมากก็มีแนวโน้มที่จะเกิดการกลับเพศจากเพศเมียไปเป็นเพศผู้เช่นกัน

การเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอ

การเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาของสิ่งมีชีวิต การเติมหมู่เมธิลนั้นมีความหมายรวมถึงการเติมหมู่เมธิลที่ตำแหน่งที่ 5 ของเบสไซโทซีน หรือเติมที่ไนโตรเจนซึ่งเป็นตำแหน่งที่ 6 ของเบสอะดีนีน การดัดแปลงดีเอ็นเอชนิดนี้สามารถถ่ายทอดผ่านกระบวนการแบ่งเซลล์ได้ ปกติหมู่เมธิลจะถูกเคลื่อนย้ายออกในขณะที่มีการสร้างไซโกต และจะถูกนำกลับมาเติมใหม่ทันทีหลังจากมีการแบ่งเซลล์ (Iqbal *et al.*, 2011)

กระบวนการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอในพืชนั้นได้มีการศึกษามากในพืชต้นแบบเช่น *Arabidopsis thaliana* จากการศึกษพบว่า การเติมหมู่เมธิลมีความแตกต่างจากในสัตว์ การเติมหมู่เมธิลในสัตว์มักจะเติมที่เบสไซโทซีนที่ตำแหน่ง CpG แต่ในพืชสามารถพบได้ทั้งตำแหน่ง CpG, CpHpG และ CpHpH (H หมายถึงนิวคลีโอไทด์ C T A ยกเว้น G) เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายและสร้างพันธะระหว่างดีเอ็นเอกับหมู่เมธิล ได้แก่ เอนไซม์ DNA methyltransferase (DNMT) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ประกอบไปด้วย DRM2 (Domains rearranged methyltransferase 2), MET1 (Methyltransferase 1) และ CMT3 (Chromomethylase 3) ทั้ง DRM2 และ MET1 นั้นมีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์เมธิลทรานเฟอร์เรส DNMT1 และ DNMT3 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่พบว่ามีเพียง CMT3 เท่านั้นที่มีความจำเพาะในพืช เอนไซม์ในกลุ่มนี้แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ 1) *de novo* class หรือ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเติมหมู่เมธิล ขึ้นมา ณ ตำแหน่งใหม่บนดีเอ็นเอ เอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ DRM2 2) กลุ่ม maintenance class คือกลุ่มที่จดจำตำแหน่งเดิมของดีเอ็นเอ ที่เคยเติมหมู่เมธิล และทำหน้าที่เติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเดิมอีกครั้งหลังจากแบ่งเซลล์ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้คือ MET1 และ CMT3 (Cao and Jacobsen, 2002; Finnegan *et al.*, 1998b; Finnegan *et al.*, 2000)

การเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอ นั้นนับว่าเป็นกระบวนการพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต ที่สำคัญต่อกระบวนการพัฒนา และการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมทำงานของยีน การเปิด หรือปิดยีน ในช่วงเวลาที่เหมาะสมกับระยะการเจริญเติบโต กระบวนการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอ นั้นมีส่วนสำคัญในการปรับตัวของพืชซึ่งตอบสนองต่อสภาวะต่างๆ ที่กดดันได้ไวและเป็นระบบทั้งที่เกิดจากสิ่งมีชีวิต (biotic stress) และไม่มีชีวิต (abiotic stress) ในส่วนของ biotic stress เช่น กระบวนการเติมหมู่เมธิลช่วยยับยั้งการรุกรานหรือการแสดงออกของยีนจากไวรัสหรือสิ่งมีชีวิตแปลกปลอมที่เข้ามายังเซลล์เจ้าบ้านได้

(Jaenisch and Bird, 2003) เนื่องจากหลังจากการแบ่งเซลล์แล้วกระบวนการเติมหมู่ให้กับดีเอ็นเอที่เพิ่งถูกจำลองขึ้นมาใหม่จะเกิดขึ้นทันทีโดยที่การเติมหมู่เมธิลขึ้นมาใหม่จะเหมือนกับในเซลล์ต้นแบบเพื่อหลีกเลี่ยงการตัดดีเอ็นเอของเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส ซึ่งตำแหน่งจดจำของการเติมหมู่เมธิลในพืชและในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ จะต่างกันออกไป ในส่วนของ abiotic stress เช่น การศึกษาผลของการเติมหมู่เมธิลต่อสภาพอากาศเย็นของข้าวโพดในระยะต้นกล้าพบว่า อากาศเย็นส่งผลให้มีการเติมหมู่เมธิลที่รากลดลง การดึงหมู่เมธิลออกจะเกิดขึ้นบริเวณ Ac/Ds transposon แต่ไม่เกิดที่ยีนอื่นๆ และพบว่าบริเวณยอคงมีการเติมหมู่เมธิลเท่าเดิม (Steward *et al.*, 2002) รวมทั้งสภาวะอื่นๆ เช่น หนูแฮมสเตอร์พันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เมธิลทรานเฟอเรสสูงกว่าหนูพันธุ์ปกติสามารถทนต่อโลหะหนักได้มากกว่า รวมทั้งในพืช (Lee *et al.*, 1998; Aina *et al.*, 2004) ส่วนการขาดน้ำหรืออยู่ในสภาวะกดดันจากความเค็มก็ทำให้ปริมาณการเติมหมู่เมธิลมากขึ้นด้วยความหนาแน่นของการปลูกก็ส่งผลต่อปริมาณการเติมหมู่เมธิล โดยลดการเติมหมู่เมธิลลง ส่งผลให้ยีนแสดงออกมากขึ้นนำไปสู่การสร้างผลผลิตที่มากขึ้น (Peng and Zhang, 2009) นอกจากนี้การเจริญเติบโตแล้วการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอยังส่งผลต่อการสร้างดอกในพืชต้นแบบ เช่น *A. thaliana* อีกด้วย โดยกระบวนการทาง epigenetics จะป้องกันการออกดอกในช่วงฤดูใบไม้ร่วงและให้ออกดอกในฤดูใบไม้ผลิ โดยปกติยีนที่มีการเติมหมู่เมธิลในปริมาณมากหรือเกิด hypermethylation จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้นๆ (gene silencing) ในทางกลับกันมีรายงานการทดลองว่าเมื่อทำให้เกิด demethylation ใน *A. thaliana* ส่งผลให้การพัฒนาของใบผิดปกติ รวมทั้งระยะเวลาในการออกดอก และการพัฒนารูปร่าง และส่วนประกอบของดอกที่ผิดปกติ (Kalisz and Purugganan, 2004) แสดงให้เห็นว่ากระบวนการเติมหมู่เมธิลส่งผลโดยตรงต่อการพัฒนาของดอก การเติมหมู่เมธิลสามารถถ่ายทอดผ่านการแบ่งเซลล์ได้ การเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอจึงเป็นอีกกลไกหนึ่งที่นักปรับปรุงพันธุ์สังเกตเห็นถึงความสำคัญและการนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคต

เทคนิค MSAP: Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism

MSAP เป็นการประยุกต์เทคนิค AFLP เพื่อตรวจสอบรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลในลำดับนิวคลีโอไทด์ เทคนิค MSAP จะต่างจาก AFLP ที่เอนไซม์ที่เป็น frequent cutter โดยจะเปลี่ยนจากเอนไซม์ *MseI* เป็นเอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีตำแหน่งจดจำเดียวกันแต่มีความไวต่อการเติมหมู่เมธิลในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างรูปแบบกัน เอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* เป็นเอนไซม์ที่เป็น isochizomer กัน กล่าวคือมีตำแหน่งจดจำเดียวกัน (5'-CCGG-3') แต่มีความสามารถ

ในการตัดดีเอ็นเอที่เติมหมู่เมธิลในลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกัน เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด สามารถตัดดีเอ็นเอที่ไม่มีการเติมหมู่เมธิลได้ แต่จะไม่สามารถตัดดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมธิลที่เบสไซโทซีนทั้ง 2 เบส ของทั้ง 2 สาย ของตำแหน่งจดจำ (full methylation of both cytosine; ${}^m\text{C}^m\text{CGG}/\text{GGC}^m\text{C}^m$) ได้ เอนไซม์ *MspI* จะสามารถตัดดีเอ็นเอที่มีการเติมหมู่เมธิลเฉพาะเบสไซโทซีนที่อยู่ด้านในทั้ง 2 สาย (full methylation of the internal cytosine; $\text{C}^m\text{CGG}/\text{GGC}^m\text{C}$) ส่วนเอนไซม์ *HpaII* จะตัด DNA ที่มีการเติมหมู่เมธิลที่เบสไซโทซีนที่อยู่ด้านนอกเพียงสายเดียว (hemi-methylation at the external cytosine; ${}^m\text{CCGG}/\text{GGCC}$) ซึ่งความแตกต่างของความสามารถในการตัดดีเอ็นเอนี้สามารถนำมาตรวจสอบหารูปแบบของการเติมหมู่เมธิลที่แตกต่างกันได้ (Portis *et al.*, 2004) ภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) ของเทคนิค MSAP จะเกิดจากรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลในลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกัน หากตัวอย่างดีเอ็นเอที่นำมาศึกษามีการเติมหมู่เมธิลในตำแหน่ง 5'-CCGG-3'ต่างกัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MSAP โดยใช้เอนไซม์ *HpaII* และ *MspI* ก็จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยรูปแบบนิวคลีโอไทด์และความสามารถในการตัดดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งจดจำเป็น CCGG ที่เติมและไม่เติมหมู่เมธิลที่เบสไซโทซีนของเอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* สรุปดังตารางที่ 1

เทคนิค MSAP ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาหาปริมาณการเติมหมู่เมธิลในพืชหลายชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น การศึกษาปริมาณการเติมหมู่เมธิลในระยะของการเจริญเติบโตต่างๆ และผลการเติมหมู่เมธิลต่อการต้านทานต่อโรคแมลงในข้าว (Xiong *et al.*, 1999; Sha *et al.*, 2005) ศึกษาปริมาณการเติมหมู่เมธิลในกล้วย (Baurens *et al.*, 2003; Peraza-Echeverria *et al.*, 2001) ปาล์ม (Jaligot *et al.*, 2004) รวมทั้งใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชที่มีฐานพันธุกรรมแคบเช่น แดงโม (Nimmakayala *et al.*, 2011) และใช้ในการศึกษารูปแบบของการเติมหมู่เมธิลในสภาวะกดดันจากความเค็มในต้นฝ้าย (Xue-Lin *et al.*, 2009) รวมทั้งการถ่ายทอดรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลในฝ้ายลูกผสม (Zhao *et al.*, 2008)

ตารางที่ 1 ความสามารถของเอนไซม์ *HpaII* และ *MspI* ในการตัดดีเอ็นเอที่ทำให้เกิดรูปแบบ
รูปแบบการเติมหมู่เมธิลของลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-CCGG-3'

รูปแบบนิวคลีโอไทด์	รูปแบบการเติมหมู่เมธิล	เอนไซม์ที่สามารถตัดดีเอ็นเอ
C ^m CGG GGC ^m C	Full methylation of the internal cytosine	<i>MspI</i>
^{hm} CCGG GGCC	Hemi-methylation at the external cytosine	<i>HpaII</i>
^m C ^m CGG GGC ^m C ^m	Full methylation of both cytosine	X
^m CCGG GGCC ^m	Full methylation of the external cytosine	X
CCGG GGCC	No methylation	Both <i>MspI</i> and <i>HpaII</i>

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

ตัวอย่างปรังที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างปรังที่ใช้ศึกษาประกอบด้วย *Cycas chamaoensis*, *Cycas clivicola* subsp. *clivicola*, *Cycas clivicola* subsp. *lutea*, *Cycas elephantipes*, *Cycas edentata*, *Cycas nongnoochiae*, *Cycas pectinata*, *Cycas pranburiensis*, *Cycas siamensis*, *Cycas simplicipinna* และ *Cycas tansachana* โดยเก็บตัวอย่างเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 3 ต้น รวม 6 ตัวอย่างต่อปรัง 1 ชนิด ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างปรังสกุล *Cycas* ที่ศึกษา

ตัวอย่างที่	ชนิดปรัง	เพศ	ตัวอย่างที่	ชนิดปรัง	เพศ
1-3	<i>C. chamaoensis</i>	M	34-36	<i>C. nongnoochiae</i>	F
4-6	<i>C. chamaoensis</i>	F	37-39	<i>C. pectinata</i>	M
7-9	<i>C. clivicola</i> subsp. <i>clivicola</i>	M	40-42	<i>C. pectinata</i>	F
10-12	<i>C. clivicola</i> subsp. <i>clivicola</i>	F	43-45	<i>C. pranburiensis</i>	M
13-15	<i>C. edentata</i> *	M	46-48	<i>C. pranburiensis</i>	F
16-18	<i>C. edentata</i>	F	49-51	<i>C. siamensis</i>	M
19-21	<i>C. elephantipes</i>	M	52-54	<i>C. siamensis</i>	F
22-24	<i>C. elephantipes</i>	F	55-57	<i>C. simplicipinna</i>	M
25-27	<i>C. clivicola</i> subsp. <i>lutea</i>	M	58-60	<i>C. simplicipinna</i>	F
28-30	<i>C. clivicola</i> subsp. <i>lutea</i>	F	61-63	<i>C. tansachana</i>	M
31-33	<i>C. nongnoochiae</i>	M	64-66	<i>C. tansachana</i>	F

หมายเหตุ * *Cycas littoralis* หรือปรังทะเล โดยทั่วไปมักพบในประเทศไทย ในขณะที่ *C. edentata* จะเป็นปรังที่พบในประเทศฟิลิปปินส์ แต่ปัจจุบันผู้เชี่ยวชาญได้มีการระบุชื่อปรังทะเลในประเทศไทยใหม่เป็น *C. edentata* แล้ว

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างปรง

เก็บใบของปรงจากสวนนงนุช จังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นแหล่งเก็บรวบรวมพันธุ์ปรง หลากหลายชนิดใส่ถุงพลาสติกชนิดมิซิปล็อก แล้วนำตัวอย่างใส่ในกล่องที่บรรจุน้ำแข็ง เมื่อถึงห้องปฏิบัติการ นำใบปรงมาล้างให้สะอาดแล้วแช่ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำไปเก็บที่ตู้แช่ อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้งาน หากต้องการเก็บไว้นานนำไปเก็บที่ตู้แช่อุณหภูมิ -80°C

2. การสกัดดีเอ็นเอจากใบปรง

การสกัดดีเอ็นเอจะสกัดจากใบปรงแต่ละตัวอย่างโดยใช้วิธีประยุกต์จาก Molecular Biology Laboratory Protocols (2002) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

เตรียมสารละลาย 3X CTAB ใส่หลอดขนาด 15 ml ปริมาตร 5 ml เติม β -mercaptoethanol 5 μl เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) นาน 45 นาที จากนั้นบดตัวอย่างใบปรงในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลว จนตัวอย่างมีลักษณะเหมือนผงแป้ง ตักตัวอย่างประมาณ 2 กรัมใส่หลอด เขย่าให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว แบ่งสารละลายใส่หลอดขนาด 1.5 ml หลอดละ 750 μl แล้วบ่มที่ 65°C นาน 1 ชั่วโมง ตั้งหลอดไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงเติมสารละลาย Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1) หลอดละ 750 μl กลับหลอดไปมาเบาๆ ให้เข้ากัน นาน 20 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายใสตอนบนใส่หลอด 1.5 ml หลอดใหม่ หลอดละ 500 μl เติมสารละลาย 10% CTAB ปริมาตร 50 μl ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) หลอดละ 500 μl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาทีจะได้สารละลายสองส่วนแยกกันให้ดูดสารละลายใสตอนบนหลอดละ 300 μl ใส่หลอดใหม่รวมให้ได้หลอดละ 600 μl จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 600 μl กลับหลอดไปมาเบาๆ ถ้าตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาก เกี่ยวดีเอ็นเอด้วยแท่งแก้วปลายงอ แต่ถ้าตะกอนดีเอ็นเอที่ได้น้อย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีล้างตะกอนด้วย 70% และ 90% ethanol ตามลำดับ ปล่อยให้ตะกอนแห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10: 0.1) 100 μl และเติมเอนไซม์ RNase A (10 mg/ml) หลอดละ 2 μl บ่มไว้ที่ 37°C ข้ามคืน และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20°C เพื่อรอใช้งานต่อไป

3. การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ 0.8% agarose gel และ โดยวัดการดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ต (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 วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอจากการดูดกลืนคลื่นแสงอัลตราไวโอเล็ตของกรดนิวคลีอิกในช่วงความยาวคลื่นที่ 260 นาโนเมตร โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตรจะมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เท่ากับ 20 หน่วย (A_{260}) ดังนั้นสามารถคำนวณปริมาณของกรดนิวคลีอิกได้จาก

$$\text{ปริมาณกรดนิวคลีอิก (mg /ml)} = A_{260} \times 1/20$$

$$\text{ปริมาณกรดนิวคลีอิก (ng / } \mu\text{l)} = A_{260} \times 1/20 \times 1000$$

$$= A_{260} \times 50$$

กรณีที่ใช้สารละลายดีเอ็นเอเจือจาง 100 เท่า (ดีเอ็นเอ 3 μl ต่อน้ำกลั่น 297 μl) ในการตรวจสอบด้วยเครื่อง spectrophotometer สามารถคำนวณปริมาณกรดนิวคลีอิกในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตรได้ดังนี้

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

4. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค MSAP

การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค MSAP มีหลักการที่คล้ายคลึงกับเทคนิค AFLP แต่จะแตกต่างกันที่เอนไซม์ที่ใช้ในการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอ โดยเอนไซม์ที่เป็น rare cutter ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบสยังคงใช้เอนไซม์ *EcoRI* (G/AATTC) แต่เอนไซม์ที่เป็น frequent cutter ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบสจะใช้เอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* แทน เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีตำแหน่งจดจำเหมือนกันคือ C/CGG แต่การตัดหรือไม่ตัดดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งจดจำขึ้นกับรูปแบบของการเติมหมู่เมทิล (methylation) วิธีการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค MSAP ใช้วิธีการประยุกต์จาก Portis *et al.* (2004) โดยจะ

เริ่มจากการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอหลังการตัดด้วย adapter (ตารางที่ 3) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยสารดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของ adapters และไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค MSAP

ชนิดของ adapter และ ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5'-3'
<i>Eco</i> RI adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I adapter	5'-GATCATGAGTCCTGCT-3' 3'-AGTACTCAGGACGAGC-5'
<i>Eco</i> RI primer (E+A)	5'-GACTGCGTACCAATTC <u>A</u> -3'
HM primer (HM+T)	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGT <u>T</u> -3'
E+AAC (E1)	5'-GACTGCGTACCAATTC <u>AAC</u> -3'
E+ACG (E2)	5'-GACTGCGTACCAATTC <u>ACG</u> -3'
E+ACT (E3)	5'-GACTGCGTACCAATTC <u>ACT</u> -3'
E+AGT (E4)	5'-GACTGCGTACCAATTC <u>AGT</u> -3'
E+AAG (E5)	5'-GACTGCGTACCAATTC <u>AAG</u> -3'
E+ACC (E6)	5'-GACTGCGTACCAATTC <u>ACC</u> -3'
E+AGC (E7)	5'-GACTGCGTACCAATTC <u>AGC</u> -3'
E+AGG (E8)	5'-GACTGCGTACCAATTC <u>AGG</u> -3'
HM+TAA (HM1)	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGT <u>TAA</u> -3'
HM+TCC (HM2)	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGT <u>TCC</u> -3'
HM+TTC (HM3)	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGT <u>TTC</u> -3'
HM+TTG (HM4)	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGT <u>TTG</u> -3'
HM+TGA (HM5)	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGT <u>TGA</u> -3'
HM+TGC (HM6)	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGT <u>TGC</u> -3'
HM+TAC (HM7)	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGT <u>TAC</u> -3'
HM+TAG (HM8)	5'-ATCATGAGTCCTGCTCGGT <u>TAG</u> -3'

ตารางที่ 4 องค์ประกอบและปริมาณสารที่ใช้ในปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และการเชื่อมต่อกับ adapter

องค์ประกอบ	ปริมาณ (μl)
100 ng/μl gDNA	2.50
<i>EcoRI</i> (10U/μl)	0.25
<i>MspI</i> (10U/μl) หรือ <i>HpaII</i> (10U/μl)	0.50
10x buffer Y ⁺ (สำหรับ <i>MspI</i>) หรือ 10x buffer TANGO (สำหรับ <i>HpaII</i>)	2.50
<i>EcoRI</i> adapter (5 pmol)	1.0
<i>HpaII/MspI</i> adapter (25 pmol)	2.0
T ₄ DNA ligase (5U/μl)	0.2
10X T ₄ ligase buffer	5.0
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	36.05
ปริมาตรรวม	50.00

การวิเคราะห์จะแบ่งปฏิกิริยาเป็น 2 ชุด คือตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MspI* ชุดหนึ่ง และแทนที่ *MspI* ด้วย *HpaII* อีกชุดหนึ่ง หลังจากผสมสารต่างๆ เข้าด้วยกันเพื่อเชื่อมต่อชิ้นส่วนของดีเอ็นเอกับ adapter แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65° C นาน 10 นาที นำไปเจือจาง 10 เท่าด้วย TE buffer เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเออีก 2 ขั้นตอนดังนี้

1. preselective amplification ขั้นตอนนี้จะเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นคู่สมกับส่วนของ adapter และบริเวณจดจำของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 นิวคลีโอไทด์ที่ปลายด้าน 3' (primer+1) คือไพรเมอร์ E+A และ HM+T (ตารางที่ 3) โดยสารที่เป็นองค์ประกอบในปฏิกิริยาดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 องค์ประกอบและปริมาตรสารที่ใช้ในปฏิกิริยา preselective amplification

องค์ประกอบ	ปริมาตร(μl)
ดีเอ็นเอจากการเชื่อมต่อ (เจือจาง 10 เท่า)	2.0
<i>Eco</i> RI primer+A (5 pmol)	1.0
<i>Hpa</i> II/ <i>Msp</i> I primer+T (5 pmol)	1.0
dNTP (2mM)	2.5
10x PCR buffer	2.5
MgCl ₂ (50mM)	0.75
<i>Taq</i> DNA polymerase (5U/μl)	0.1
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	15.15
ปริมาตรรวม	25.0

ผสมสารต่างๆ เข้าด้วยกัน นำเข้าเครื่อง PCR โดยใช้อุณหภูมิและเวลาดังนี้

ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94° C 60 วินาที	} 25 รอบ
ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94° C 30 วินาที	
อุณหภูมิ 55° C 30 วินาที	
อุณหภูมิ 72° C 60 วินาที	
ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72° C 10 นาที	

หลังครบปฏิกิริยาแล้ว แบ่งผลผลิต PCR มาตรวจสอบโดย agarose gel electrophoresis ใน 1% agarose gel จากนั้นเจือจาง 30 เท่าด้วย TE buffer (10:1) เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาขั้นที่ 2 (selective amplification)

2. selective amplification ในขั้นตอนนี้จะเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็นคู่สมกับส่วนของ adapter และบริเวณจดจำของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 นิวคลีโอไทด์ที่ปลายด้าน 3' (primer+3) (ตารางที่ 3) รวมทั้งหมดมี 14 คู่ไพรเมอร์ประกอบด้วย คู่ไพรเมอร์ E1/HM1, E2/HM3, E2/HM4, E3/HM3, E3/HM4, E5/HM2, E5/HM3, E5/HM5,

E5/HM8, E6/HM4, E7/HM3, E7/HM4, E8HM1 และ E8HM8 โดยสารที่เป็นองค์ประกอบในปฏิกิริยาดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 องค์ประกอบและปริมาตรสารที่ใช้ในปฏิกิริยา selective amplification

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

ผสมสารต่างๆ เข้าด้วยกัน นำเข้าเครื่อง PCR โดยใช้อุณหภูมิและเวลาดังนี้

ขั้นที่ 1 (denaturation step) อุณหภูมิ 94° C 30 วินาที

ขั้นที่ 2 (annealing step) อุณหภูมิ 65° C 30 วินาที

ขั้นที่ 3 (extension step) อุณหภูมิ 72° C 60 วินาที

ลดอุณหภูมิในขั้นที่ 2 ลงรอบละ 0.7° C จำนวน 12 รอบ และต่อด้วย

ขั้นที่ 4 อุณหภูมิ 94° C 30 วินาที	} 23 รอบ
อุณหภูมิ 56° C 30 วินาที	
อุณหภูมิ 72° C 60 วินาที	

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

5. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

เตรียมแผ่นกระจก 2 แผ่นสำหรับเทเจล โดยล้างกระจกทั้ง 2 แผ่นให้สะอาด เช็ดด้วยเอทานอล เข้มข้น 95% จากนั้นเช็ดกระจกแผ่นตรงด้วย bind silane (bind silane 1 μ l, glacial acetic acid 2.5 μ l และ 95% ethanol 500 μ l) เพื่อให้เจลติดกับกระจกแผ่นนี้และเช็ดกระจกแผ่นหูกระต่ายด้วย repel silane เพื่อไม่ให้เจลติดกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที แล้วประกอบกระจกทั้ง 2 แผ่นเข้าด้วยกัน โดยให้ด้านที่ทา bind silane และ repel silane หันเข้าหากัน และวางแผ่น spacer ไว้ด้านข้างทั้งสองเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจก ใช้คลิปหนีบยึดให้อยู่คงที่ ใช้กระดาษทาบปิดด้านล่างระหว่างกระจกเพื่อให้เจลที่จะเทใส่ช่องว่างระหว่างกระจกจากทางด้านที่มีหูกระต่ายด้านบนไม่ให้ไหลออกทางด้านล่าง จากนั้นเตรียม 6 % polyacrylamide gel โดยมีส่วนประกอบดังนี้ ยูเรีย 13.50 กรัม, 10x TBE 3 ml, 10% APS 300 μ l, TEMED 15 μ l, 30% acrylamide (29% acrylamide และ 1% methylene bisacrylamide) 6 ml และน้ำกลั่น 10.5 ml ผสมให้เข้ากันแล้วเทเจลลงในช่องว่างระหว่างกระจกจนเต็ม ใส่หวีลงด้านบนของกระจก ปล่อยให้เจล แข็งตัวประมาณ 2-3 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ล้างกระจกด้านบนออกให้สะอาดด้วยน้ำเปล่า คึงหวีออก แล้วประกอบเข้ากับชุด อิเล็กโทรโฟรีซิสแนวตั้ง เติม 1X TBE buffer ด้านล่างของแผ่นเจล และด้านบนของเครื่อง ต่อสายไฟเพื่อทำ pre-run ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 300 โวลต์ (V) เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงปิดเครื่อง ในระหว่างที่ทำ pre-run เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอที่ผสม AFLP loading dye (ดีเอ็นเอ 10 μ l ต่อ loading dye 5 μ l) ให้พร้อมใช้งานโดยนำไปทำให้แยกเป็นสายเดี่ยวโดยบ่มที่อุณหภูมิ 94°C นาน 10 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ออกมาวางในกล่องน้ำแข็งเพื่อป้องกันการกลับมาจับกันใหม่ของดีเอ็นเอสายเดี่ยว ในขั้นตอนการหยอดดีเอ็นเอ หยอดดีเอ็นเอที่ได้ 13 μ l ลงในแต่ละช่อง โดยก่อนหยอดให้ใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์ล้างผิวหน้าเจลบริเวณช่องใส่ตัวอย่างเพื่อไล่ยูเรียที่อยู่กันหลุมออกก่อน เมื่อหยอดจนครบแล้ว ต่อสายไฟเพื่อเดินเครื่อง (run) ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ปิดเครื่องนำกระจกออกจากเครื่อง แยกแผ่นกระจกทั้ง 2 ออกจากกัน เจลจะติดอยู่กับกระจกแผ่นตรง นำไปย้อมด้วยซิลเวอร์ในเตรตตามวิธีดัดแปลงจาก Benbouza *et al.* (2006) โดย นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่แช่ในสารละลาย fixative (10% ethanol, 0.5% acetic acid) นาน 7-10 นาที เขย่าเบาๆ จากนั้นนำแผ่นกระจกที่มีเจลแช่ใน

สารละลายซิลเวอร์ไนเตรด (AgNO_3 1.5 g/l, 37% formaldehyde 1.5 ml/l) เขย่าเรื่อยๆ นาน 6-7 นาที แล้วจึงล้างเจลดต่อโดยแช่แผ่นกระจกที่มีเจลในน้ำกลั่น 5-10 วินาที จากนั้นข้อมแผ่นกระจกที่มีเจลด้วย developer (15g NaOH, 37% formaldehyde 2 ml/l) ขึ้นตอนสุดท้ายหยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นกระจกที่มีเจลแช่ใน stop solution (10% ethanol, 0.5% acetic acid) นาน 2 นาที แล้วนำแผ่นกระจกที่มีเจลแช่ในน้ำกลั่น 2-3 นาที แล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ

6. การบันทึกผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ จำนวนเบส ไซโทซีนที่เติมหมู่เมทิล และสร้างแผนภาพความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจากตัวอย่างดีเอ็นเอของปรังทุกตัวอย่างโดยเริ่มต้นจากการบันทึกแถบดีเอ็นเอทุกแถบโดยบันทึกเป็น “1” เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอและบันทึกเป็น “0” เมื่อไม่พบแถบดีเอ็นเอแยกกันในชุดของการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-HpaII* และ *EcoRI-MspI* จากนั้นแยกการวิเคราะห์ออกเป็นสองแบบ

6.1 การวิเคราะห์ผลแบบ methylation polymorphism หลังจากทีบันทึกแถบดีเอ็นเอจากชุดของการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-HpaII* และ *EcoRI-MspI* เป็น 0 – 1 แยกกันแล้ว จะนำไปใช้ในการวิเคราะห์เกี่ยวกับความผันแปรของการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอในปรังแต่ละชนิด โดยจะแปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่บันทึกไว้เบื้องต้นตามรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งของชนิดปรังนั้นๆ โดยจะบันทึกข้อมูลเป็น “1” เมื่อพบแถบดีเอ็นเอปรากฏในช่องที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-HpaII* และ *EcoRI-MspI* (ไม่มีการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง CCGG) รูปแบบที่ 2 ให้บันทึกเป็น “2” เมื่อพบแถบดีเอ็นเอปรากฏเฉพาะที่ช่องที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-HpaII* (มีการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง $^m\text{CCGG}$ เพียงสายเดียว) รูปแบบที่ 3 ให้บันทึกเป็น “3” เมื่อพบแถบดีเอ็นเอปรากฏเฉพาะที่ช่องที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-MspI* (มีการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง C^mCCGG ทั้งสองสาย) และให้บันทึกข้อมูลเป็น “4” เมื่อไม่ปรากฏทั้งแถวที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-HpaII* และ *EcoRI-MspI* ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 7 การคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการเติมหมู่เมทิลจะคำนวณจากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากรูปแบบที่ 1, 2 และ 3 เท่านั้น โดยวิเคราะห์ตามวิธีการของ Xue-Lin *et al.* (2009) โดยตัดรูปแบบที่ 4 ออกเนื่องจากการไม่พบแถบดีเอ็นเอทั้งในช่องที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-HpaII* และ *EcoRI-MspI* อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น มีการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโทซีนทั้งสองตัว $^m\text{C}^m\text{CCGG}$ หรือที่เบสไซโทซีนตัวนอกสุดของดีเอ็นเอทั้งสองสาย $^m\text{CCGG}$ หรือลำดับ

นิวคลีโอไทด์บริเวณนั้นเปลี่ยนไปทำให้เอนไซม์ *HpaII* และ *MspI* ตัดไม่ได้ การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลจึงไม่นำรูปแบบที่ 4 มาวิเคราะห์ร่วมด้วย

การวิเคราะห์จำนวนเบสไซโทซีนที่เติมหมู่เมธิล คำนวณจากจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ร่วมกับเอนไซม์ *HpaII* และ *MspI* รูปแบบที่ 1, 2 และ 3 โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้จากรูปแบบที่ 1 เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีการเติมหมู่เมธิลที่เบสไซโทซีน (CCGG/GGCC) ทั้ง 4 นิวคลีโอไทด์ แถบดีเอ็นเอที่ได้จากรูปแบบที่ 2 เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีการเติมหมู่เมธิลที่เบสไซโทซีนจำนวน 3 นิวคลีโอไทด์ และเติมหมู่เมธิล 1 นิวคลีโอไทด์ (^mCCGG/GGCC) ส่วนรูปแบบที่ 3 เป็นแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีการเติมหมู่เมธิลที่เบสไซโทซีนจำนวน 2 นิวคลีโอไทด์ และเติมหมู่เมธิล 2 นิวคลีโอไทด์ (C^mCCGG/GGC^mC)

ตารางที่ 7 ตัวอย่างการแปลงข้อมูลจาก 0 - 1 ไปเป็นข้อมูลสำหรับใช้วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิล

Marker ที่	ตัวอย่างที่ 1		ตัวอย่างที่ 2		ผลการแปลงข้อมูล	
	<i>EcoRI</i> - <i>HpaII</i>	<i>EcoRI</i> - <i>MspI</i>	<i>EcoRI</i> - <i>HpaII</i>	<i>EcoRI</i> - <i>MspI</i>	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2
	1	1	1	0	0	1
2	1	0	1	1	2	1
3	0	1	0	1	3	3
4	0	0	1	1	4	1

จากตาราง marker ที่ 1 ในตัวอย่างที่ 1 มีแถบดีเอ็นเอในช่องที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-HpaII* และที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-MspI* จึงแปลงค่าเป็น “1” marker ที่ 2 ในตัวอย่างที่ 1 มีแถบดีเอ็นเอในช่องที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-HpaII* แต่ไม่มีแถบดีเอ็นเอในช่องที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-MspI* จึงแปลงค่าเป็น “2” เป็นต้น

6.2 การวิเคราะห์ผลแบบ nucleotide polymorphisms โดยจะนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอของปรังแต่ละชนิดจาก 6 ตัวอย่างแปลงเป็นภาวะพหุคูณฐานจากลำดับนิวคลีโอไทด์โดยพิจารณาลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเช่น ในชนิดปรังหนึ่งๆ ถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงช่องใดช่องหนึ่งของทั้ง 6 ตัวอย่างแสดงว่าตำแหน่งนั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ ให้บันทึกรวมเป็น “1” และถ้าทั้ง 6 ตัวอย่างไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอจึงอนุมานได้ว่า ไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ ตำแหน่งนั้น จึงบันทึกเป็น “0” ดังตัวอย่างในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ตัวอย่างรูปแบบการแปลงข้อมูลจากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค MSAP ไปเป็นข้อมูลของ nucleotide polymorphism

Marker ที่	ปรังชนิดที่ 1												ผลการแปลงข้อมูล เป็น Nucleotide Polymorphism ชนิดที่ 1	
	<i>EcoRI-HpaII</i>						<i>EcoRI-MspI</i>							
	ตัวอย่างที่						ตัวอย่างที่							
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

จากตัวอย่างการแปลงข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเทคนิค MSAP ไปเป็นข้อมูลของ nucleotide polymorphism นั้น การให้ผลการแปลงค่าเป็น “1” นั้นเกิดได้เมื่อพบแถบดีเอ็นเออย่างน้อย 1 แถบจากตัวอย่างทั้งหมด 6 ตัวอย่าง ทั้งที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-HpaII* หรือ *EcoRI-MspI* และจะแปลงข้อมูลเป็น “0” ในกรณีที่ทุกช่องหรือทุกๆ ตัวอย่างที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-HpaII* และ *EcoRI-MspI* ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเลย

7. การวิเคราะห์ข้อมูลจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของปรัง

เมื่อบันทึกแถบดีเอ็นเอจากเทคนิค MSAP ตามวิธีการในข้อ 6 แล้ว หลังจากนั้นแบ่งการวิเคราะห์ออกเป็น 2 ชุดข้อมูล ดังนี้

7.1 การวิเคราะห์ความแตกต่างในระดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide polymorphism) โดยนำข้อมูลจากข้อ 6.2 วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc. Version 2.2k (Exeter software, New York, USA) คำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมโดยวิธีการของ Lynch (1990) และสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี UPGMA คำนวณความน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่ม (copheneic value) โดยทดสอบ Mantle's test ซึ่งจะบ่งชี้ความน่าเชื่อถือในการจัดกลุ่มโดยมีช่วงของค่า fit ของการจัดกลุ่มดังต่อไปนี้

$r \geq 0.9$	ดีมาก
$0.8 \leq r < 0.9$	ดี
$0.7 \leq r < 0.8$	ปานกลาง
$r < 0.7$	แย่มาก

วิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยวิธี principal component analysis (PCA) และคำนวณค่า PIC (polymorphic information content) โดยใช้ $PIC = 1 - \sum P_i^2$

7.2 การวิเคราะห์ความแตกต่างในระดับของการเติมหมู่เมทิล (Methylation polymorphism) โดยทำคล้ายกับข้อ 7.1 คือคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมโดยวิธีการของ Lynch (1990) และสร้าง phylogenetic tree โดยวิธี UPGMA คำนวณความน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่ม (copheneic value) โดยทดสอบ Mantle's test ซึ่งจะบ่งชี้ความน่าเชื่อถือในการจัดกลุ่ม วิเคราะห์การจัดกลุ่มโดยวิธี principal component analysis (PCA) และคำนวณค่า PIC แต่จะใช้ชุดข้อมูลที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-HpaII* และ *EcoRI-MspI* วิเคราะห์แยกชุดข้อมูลแล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกัน

8. การโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีนดีเอ็นเอ

นำแถบดีเอ็นเอที่ให้ความต่างระหว่างเพศนำไปโคลนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล โดยแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

8.1 ตัดแถบดีเอ็นเอจาก polyacrylamide gel ละลายใน TE buffer (10: 0.1) 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65° C 1 ชั่วโมง ดีเอ็นเอจะละลายออกมาในบัฟเฟอร์ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นตัวดีเอ็นเอ ต้นแบบในการเพิ่มปริมาณ โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้

8.2 ทำ re-amplification โดยใช้ไพรเมอร์ (primer +3) ที่ให้ลายพิมพ์ MSAP ที่ให้แถบ ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างเพศ โดยใช้โปรแกรมดังนี้

อุณหภูมิ 94 °C เวลา 60 วินาที	} 35 รอบ
อุณหภูมิ 94 °C เวลา 30 วินาที	
อุณหภูมิ 55 °C เวลา 30 วินาที	
อุณหภูมิ 72 °C เวลา 60 วินาที	
อุณหภูมิ 72 °C เวลา 10 นาที	

นำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) มาทำให้บริสุทธิ์โดยกำจัดไพรเมอร์ส่วนที่เหลือ บัฟเฟอร์ และเกลือต่างๆ ซึ่งจะมีผลต่อการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (ligation) ออก โดยใช้ชุด Hi Yield Gel PCR DNA Fragment Extraction kit (RBC, Taiwan) เมื่อได้ผลผลิตพีซีอาร์ ที่บริสุทธิ์แล้ว ทำปฏิกิริยา เชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ pGEM-T easy vector (Promega) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 2X ligation buffer 10 µl, ผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์ 7 µl pGEM-T easy 1.5 µl และ T₄ ligase (5U/µl) 1.5 µl บ่มที่ 4° C ข้ามคืน จะได้ดีเอ็นเอสายผสมที่พร้อมจะทำ transformation

8.3 เตรียม competent cell โดยนำ *E. coli* XL-1 Blue มา streak ให้เป็นโคโลนีเดี่ยว บน LB agar ข้ามคืน แล้วจึงเลือกมา 1 โคโลนี เลี้ยงในอาหาร LB broth 3 ml ที่ 37° C ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ข้ามคืน จากนั้นทำให้เจือจาง 1:100 ด้วยอาหาร LB เลี้ยงที่ 37° C ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จนวัดค่า OD₆₀₀ ได้ประมาณ 0.4 - 0.6 โดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 2 - 3 ชั่วโมง นำมา 50 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอด Centrifuge แชน้ำแข็ง 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4° C ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วล้างด้วยอาหาร LB 2 ครั้ง เทอาหารทิ้ง เติม transformation and storage solution (TSS) ประมาณ 0.5 - 1 มิลลิลิตร ผสมด้วยปิเปตเบาๆ แบ่งสารละลายใส่หลอด หลอดละ 100 µl เก็บ competent cell ที่ได้ที่ -80° C

8.4 ทำ transformation เริ่มจากผสม competent cell 100 μ l กับ inserted vector 2 μ l แล้ววางไว้บนน้ำแข็งนาน 15 นาที แล้วนำมาทำ heat shock ที่อุณหภูมิ 42° C นาน 1.30 นาที จากนั้นวางไว้บนน้ำแข็งอีก 5 นาที แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB จำนวน 1,000 μ l นำไปบ่มที่ 37° C นาน 45 นาที จึงนำมา spread ลงบน LB agar ที่เติม Ampicillin, IPTG, X-gal แล้วนำไปบ่มต่อโดยใช้อุณหภูมิ 37° C นาน 18 - 24 ชั่วโมง

8.5 ตรวจสอบ recombinant clone ใช้ไม้จิ้มฟันจิ้มโคลนีสีขาวจุ่มลงในน้ำกลั่น 30 μ l นำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ กับไพรเมอร์คู่ที่ให้ลายพิมพ์ MSAP ที่แตกต่างกันระหว่างเพศ โดยใช้โปรแกรมดังนี้

อุณหภูมิ 94° C เวลา 5 นาที	} 35 รอบ
อุณหภูมิ 94° C เวลา 30 วินาที	
อุณหภูมิ 55° C เวลา 30 วินาที	
อุณหภูมิ 72° C เวลา 60 วินาที	
อุณหภูมิ 72° C เวลา 10 นาที	

ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ใน 1 % agarose gel คัดเลือกโคลนที่มี insert นำมาเลี้ยงในอาหาร LB ที่ 37° C ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีข้ามคืน

8.6 สกัดพลาสมิดโดยใช้ชุด High-speed Plasmid mini kit (Geneaid, Taiwan) ตรวจสอบ insert ในพลาสมิดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีตำแหน่งจดจำบน vector ตรวจสอบผลใน 1% agarose gel

8.7 หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตบางเขน เริ่มทำการวิจัย เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2550 สิ้นสุดเดือนมีนาคม พ.ศ. 2553

แหล่งทุนสนับสนุน

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ปีงบประมาณ 2551 และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นแบบแผนของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในปรองที่มี
แหล่งกำเนิดในประเทศไทยทั้ง 10 ชนิด
2. ได้รูปแบบลายพิมพ์ MSAP ที่บ่งชี้ว่าในปรองแต่ละเพศมีระดับและรูปแบบของการเติม
หมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอที่ต่างกัน
3. ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอที่
ต่างกันในแต่ละเพศเพื่อเป็นแนวทางนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบเพศของปรองได้
ตั้งแต่เป็นต้นอ่อน
4. ได้ข้อมูลพื้นฐานที่สนับสนุนว่าการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอมีผลต่อการกำหนดเพศของ
สิ่งมีชีวิตซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาระบบการกำหนดเพศของสิ่งมีชีวิตต่อไป

ผลและวิจารณ์

1. ตัวอย่างปรังที่ใช้ศึกษา

การเก็บตัวอย่างปรังจากสวนนงนุช จังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นแหล่งรวบรวมพันธุ์ปรังหลากหลายชนิด ตามแผนการวิจัยปรังที่นำมาใช้ในการศึกษารั้งนี้ เป็นปรังสกุล *Cycas* ที่พบแหล่งกำเนิดในประเทศไทยจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ *Cycas chamaoensis* (ปรังเขาชะเมา), *C. clivicola* subsp. *lutea* (ปรังเขาตะวันออก) *C. clivicola* subsp. *clivicola* (ปรังเขาไต้), *C. elephantipes* (ปรังชัยภูมิ), *C. edentata* (ปรังทะเล), *C. macrocarpa* (ปรังป่า), *C. nongnoochiae* (ปรังตากฟ้า), *C. pectinata* (ปรังเขา), *C. petraea* (ปรังเขาภูกระดึง), *C. pranburiensis* (ปรังเขาสามร้อยยอด), *C. siamensis* (ปรังแก้วสีเงิน), *C. simplicipinna* (มะพร้าวเต่า) และ *C. tansachana* (ปรังสระบุรี) โดยการเก็บตัวอย่างจะเก็บทั้งปรังเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 3 ต้น รวม 6 ตัวอย่างต่อปรัง 1 ชนิด แต่ในการปฏิบัติจริงสามารถเก็บตัวอย่างปรังได้เพียง 10 ชนิด โดยปรัง *C. macrocarpa* และ *C. petraea* ยังไม่มีต้นที่ให้โคนจึงยังไม่ทราบเพศของปรัง ทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างมาศึกษาได้ อย่างไรก็ตามในการเก็บตัวอย่างครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างปรังรวมทั้งสิ้น 10 ชนิด และ 1 ชนิดย่อย โดยเป็นเพศผู้อย่างละ 3 ต้น และ เพศเมียอย่างละ 3 ต้น รวมทั้งหมด 66 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 2

2. ผลการสกัดดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอปรังทั้ง 10 ชนิด และ 1 ชนิดย่อย โดยวิธีการของ molecular laboratory protocol ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพค่อนข้างดี บางชนิดมีโปรตีนและมีการแตกหักของดีเอ็นเอเล็กน้อย ส่วน *C. siamensis* และ *C. simplicipinna* นั้นค่อนข้างมีปัญหาในการสกัดทำให้ได้ดีเอ็นเอน้อย และผลการตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer ได้ค่าอัตราส่วนของ A260/ A280 ในช่วง 1.7 - 1.9

3. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค MSAP

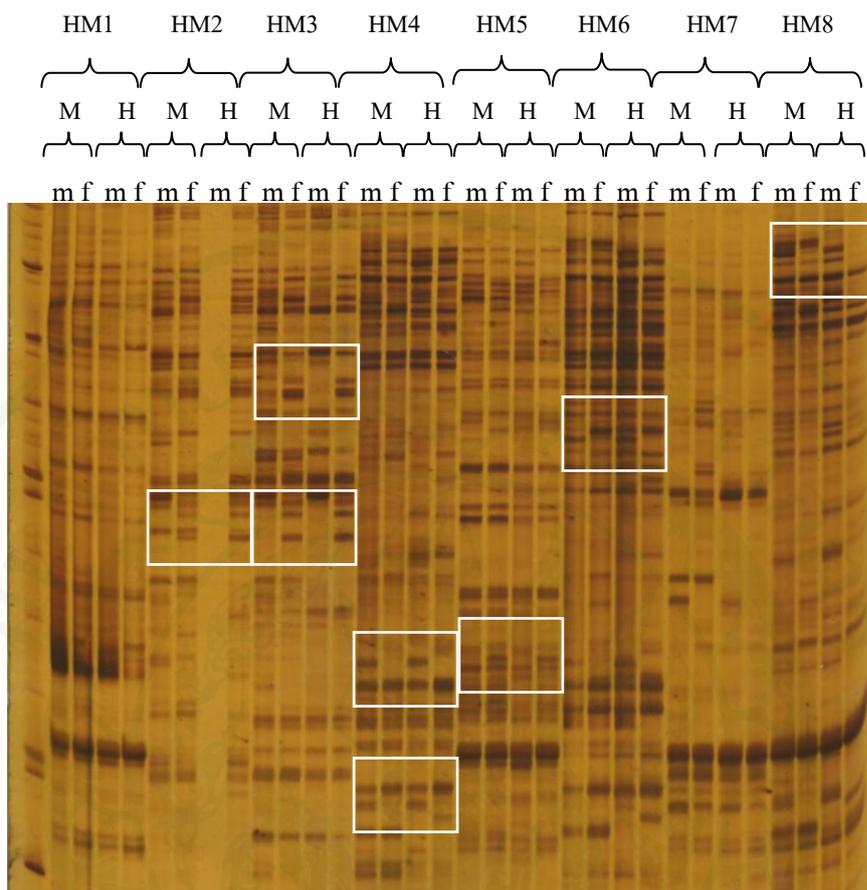
3.1 การทดสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมเพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค MSAP

คัดเลือกดีเอ็นเอของปรอง *C. chamaoensis* เพศผู้และเพศเมียอย่างละ 1 ตัวอย่าง นำมาตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-MspI* และ *EcoRI-HpaII* รวม 2 ชุด แต่ละชุดเชื่อมต่อกันส่วนของดีเอ็นเอด้วย *EcoRI* adapter และ *HpaII-MspI* adapter จากนั้นทำ preselective amplification ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ adapter และตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะและนิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม 1 นิวคลีโอไทด์ (primer + 1) ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ทำ selective amplification อีกครั้งด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณ adapter และตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะและนิวคลีโอไทด์แบบสุ่ม 3 นิวคลีโอไทด์ (primer + 3) รวม 64 คู่ (ตารางที่ 3) จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ใน 6% denaturing polyacrylamide gel พบว่าไพรเมอร์ 42 คู่ (ตารางที่ 9) ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและมีแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างเพศ ดังตัวอย่างภาพที่ 5 - 7 จากนั้นเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอชัดเจนที่สุดสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับปรองในตัวอย่างอื่นๆ ต่อไป

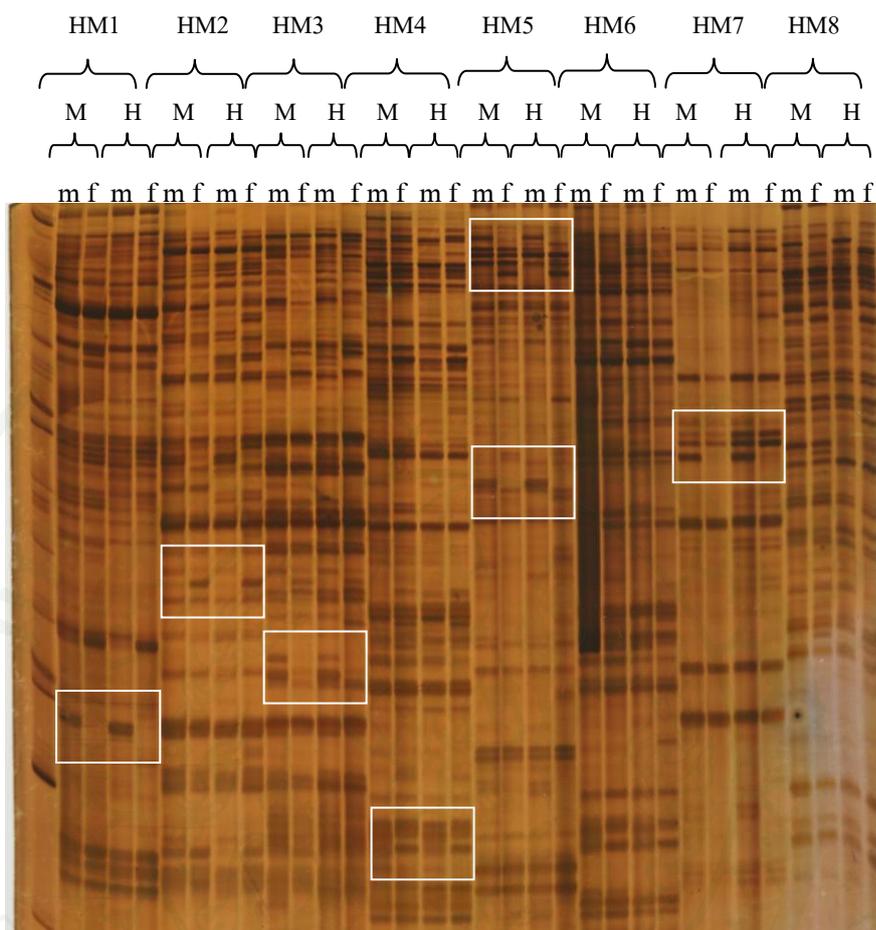
ตารางที่ 9 คู่ไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยเทคนิค MSAP โดยใช้ดีเอ็นเอจาก *C. chamaoensis* เพศผู้และเพศเมียในการทดสอบหาคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม สำหรับสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

คู่ไพรเมอร์	E+AAC	E+ACG	E+ACTE	E+AGT	E+AAG	E+ACC	E+AGC	E+AGG
	(E1)	(E2)	(E3)	(E4)	(E5)	(E6)	(E7)	(E8)
HM+TAA (HM1)	✓	✓			✓	✓	✓	✓
HM+TCC (HM2)	✓	✓			✓		✓	✓
HM+TTC (HM3)	✓	✓	✓		✓		✓	✓
HM+TTG (HM4)	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
HM+TGA (HM5)		✓			✓			
HM+TGC (HM6)	✓	✓	✓			✓	✓	✓
HM+TAC (HM7)	✓		✓		✓			✓
HM+TAG (HM8)		✓	✓		✓	✓	✓	✓

✓ เป็นคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างภายในเพศผู้และเพศเมียของ *C. chamaoensis*



ภาพที่ 6 ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของ *C. chamaoensis* เพศผู้ (m) และเพศเมีย (f) ที่ตัดด้วย เอนไซม์ *EcoRI* ร่วมกับ *MspI* (M) และ *HpaII* (H) จากการใช้ไพรเมอร์ E3/HM1 ถึง E3/HM8 (กรอบสี่เหลี่ยมแสดงบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างเพศ)



ภาพที่ 7 ตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ของ *C. chamaoensis* เพศผู้ (m) และเพศเมีย (f) ที่ตัดด้วย เอนไซม์ *EcoRI* ร่วมกับ *MspI* (M) และ *HpaII* (H) จากการใช้ไพรเมอร์ E5/HM1 ถึง E5/HM8 (กรอบสี่เหลี่ยมแสดงบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างเพศ)

3.2 การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค MSAP

การวิเคราะห์ข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอได้จากการเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 11 คู่ จาก 14 คู่ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนประกอบด้วย ไพรเมอร์ E1/HM1, E2/HM3, E2/HM4, E3/HM3, E3/HM4, E5/HM2, E5/HM3, E5/HM8, E6/HM4, E7/HM3 และ E8HM1 โดยมีจำนวนแถบดีเอ็นเอเท่ากับ 79, 64, 65, 58, 71, 63, 60, 66, 65, 73 และ 66 แถบตามลำดับ รวม 720 แถบ (markers)

เมื่อแยกคิดจำนวนแถบดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI - MspI* และ *EcoRI - HpaII* จะได้แถบดีเอ็นเอรวม 1440 แถบ ซึ่งพบว่ามีจำนวน monomorphic band เท่ากับ 66 แถบ ซึ่งคิดเป็น 4.58 เปอร์เซ็นต์ และมี polymorphic band จำนวน 1374 แถบ คิดเป็น 95.42 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10) แสดงให้เห็นว่าการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรังในสกุล *Cycas* โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล MSAP พบว่าปรังที่ศึกษาน่าจะมีความผันแปรของการเติมหมู่เมธิลที่บริเวณ CCGG ก่อนข้างสูง ทั้งนี้การทดลองใช้เทคนิค AFLP วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของตัวอย่างปรังเหล่านี้ไม่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอมากนัก (ข้อมูลจากการทดลองที่ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ซึ่งเป็นข้อยืนยันได้ว่าปรังที่ศึกษามีความผันแปรของการเติมหมู่เมธิลที่บริเวณ CCGG ก่อนข้างสูงจริง

3.3 การวิเคราะห์รูปแบบแถบดีเอ็นเอและปริมาณการเติมหมู่เมธิลระหว่างปรังแต่ละชนิด

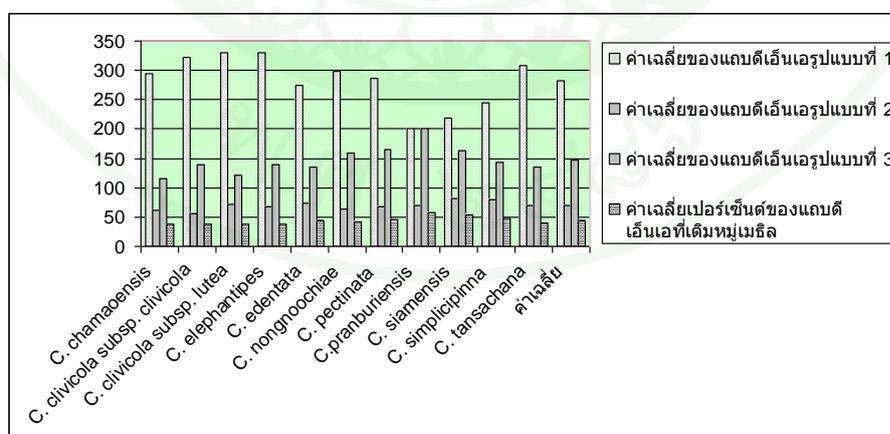
การศึกษาลายพิมพ์ MSAP สามารถจำแนกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *EcoRI - MspI* และ *EcoRI - HpaII* ได้ 4 รูปแบบคือ รูปแบบที่ 1 มีแถบดีเอ็นเอปรากฏจากทั้งการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI - MspI* และ *EcoRI - HpaII* ซึ่งแถบดีเอ็นเอรูปแบบนี้ไม่มีการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอ รูปแบบที่สอง มีแถบดีเอ็นเอปรากฏจากการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI - MspI* เพียงอย่างเดียว แสดงว่าบริเวณดังกล่าวมีการเติมหมู่เมธิลที่เบสไซโทซีนตัวในของตำแหน่งจดจำ CCGG แบบ full methylation บนดีเอ็นเอทั้งสองสาย รูปแบบที่ 3 แถบดีเอ็นเอปรากฏจากการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI - HpaII* เพียงอย่างเดียว แสดงว่าบริเวณดังกล่าวมีการเติมหมู่เมธิลที่เบสไซโทซีนแบบ hemi methylation บนดีเอ็นเอเพียงสายเดียว และรูปแบบที่ 4 ไม่พบแถบดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองชุด ซึ่งเกิดจากบริเวณดังกล่าวมีการเติมหมู่เมธิลแบบ full methylation ที่เบสไซโทซีนทั้งสองตัวของตำแหน่งจดจำ แบบที่ไม่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *MspI* และ *HpaII* แต่สามารถระบุได้ถึงการเติมหมู่เมธิลในระดับที่สูงกว่ารูปแบบที่ 2 และ 3

ตารางที่ 10 จำนวน monomorphic bands, polymorphic bands และเปอร์เซ็นต์ polymorphism ของ
 ปรังสกุล *Cycas*

ไพรมอร์	จำนวนแถบ ดีเอ็นเอ*	จำนวน monomorphic bands	จำนวน polymorphic bands	เปอร์เซ็นต์ polymorphism
E1/HM1	158	1	157	99.37
E2/HM3	128	2	126	98.44
E2/HM4	130	19	111	85.38
E3/HM3	116	1	115	99.14
E3/HM4	142	5	137	96.48
E5/HM2	126	9	117	92.86
E5/HM3	120	5	115	95.83
E5/HM8	132	10	122	92.42
E6/HM4	130	7	123	94.62
E7/HM3	146	5	141	96.58
E8/HM1	112	2	110	98.21
รวม	1440	66	1374	เฉลี่ย 95.42

หมายเหตุ * จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้เกิดจากการนับแถบดีเอ็นเอรวมจากการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* -
MspI 720 แถบ และ *EcoRI* - *HpaII* 720 แถบ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ปรังจำนวน 6 ตัวอย่างเป็นตัวแทนของปรังแต่ละชนิด เมื่อนับจำนวนแถบซีเอ็นเอแต่ละรูปแบบแล้วจะนำมาหาค่าเฉลี่ยของรูปแบบแต่ละรูปแบบในปรังแต่ละชนิด โดยแถบซีเอ็นเอของรูปแบบที่ 1 เป็นแบบที่พบมากที่สุดทุกชนิด แถบซีเอ็นเอของรูปแบบที่ 2 และ 3 พบในปริมาณน้อยกว่า โดยรูปแบบที่ 2 นั้นจะพบได้น้อยที่สุด ซึ่งรูปแบบแถบซีเอ็นเอที่ได้แสดงให้เห็นว่าบริเวณ CCGG ส่วนใหญ่จะไม่มี การเติมหมู่เมธิล และการเติมหมู่เมธิลแบบ hemimethylation (m CCGG) เกิดได้น้อยกว่าการเติมหมู่เมธิลแบบ full methylation of the internal cytosine (C^m CCGG) แถบซีเอ็นเอเฉลี่ยของรูปแบบที่ 1, 2, 3 และ จำนวนแถบซีเอ็นเอรวมของปรังทั้ง 11 ชนิดเป็น 282.39, 69.29, 147.14 และ 498.81 แถบตามลำดับ ค่าเฉลี่ยจำนวนรวมของแถบซีเอ็นเอที่บ่งชี้การเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอของปรังแต่ละชนิดอยู่ในช่วง 178.65 - 269.65 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลของปรังที่ศึกษาอยู่ในช่วงตั้งแต่ 36.95 - 57.44 เปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ยจำนวนเบสไซโทซีนที่มีการเติมหมู่เมธิล คำนวณจากรูปแบบแถบซีเอ็นเอ รูปแบบที่ 1, 2 และ 3 เท่ากับ 22.28 เปอร์เซ็นต์ จากค่าที่ได้สามารถแบ่งปรังออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือ ปรังที่มีเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลน้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *C. chamaoensis*, *C. clivicola* subsp. *clivicola*, *C. elephantipes* และ *C. clivicola* subsp. *lutea* กลุ่มที่ 2 คือกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลอยู่ระหว่าง 40 - 50% ประกอบด้วย *C. edentata*, *C. nongnoochiae*, *C. pectinata*, *C. simplicipinna* และ *C. tansachana* กลุ่มสุดท้ายคือกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลมากกว่า 50% ประกอบด้วย *C. siamensis* และ *C. pranburiensis* โดยปรังที่พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลมากที่สุดคือ *C. pranburiensis* (57.44%) ดังตารางที่ 11 และภาพที่ 8



ภาพที่ 8 กราฟแสดงจำนวนแถบซีเอ็นเอรูปแบบที่ 1, 2, 3 และ ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ของจำนวนแถบซีเอ็นเอที่ถูกเติมหมู่เมธิล

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอแต่ละรูปแบบ และเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอของปรังทั้ง 10 ชนิด

ชนิดปรัง	ค่าเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอที่ได้				ค่าเฉลี่ยของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ถูกเติมหมู่เมทิล		ค่าเฉลี่ยของจำนวนเบสไซโทซีนที่เติมหมู่เมทิล	ค่าเฉลี่ยของจำนวนเบสไซโทซีนที่ไม่ถูกเติมหมู่เมทิล	% ค่าเฉลี่ยของจำนวนเบสไซโทซีนที่ถูกเติมหมู่เมทิล
	รูปแบบที่ 1	รูปแบบที่ 2	รูปแบบที่ 3	รวม	จำนวน	เปอร์เซ็นต์			
<i>C. chamaoensis</i>	293.35	62.5	116.20	472.00	178.65	37.86	294.9	1593.3	18.50876
<i>C. clivicola</i> subsp. <i>clivicola</i>	322.30	55.85	138.85	517.00	194.65	37.64	333.55	1734.45	19.23088
<i>C. clivicola</i> subsp. <i>lutea</i>	329.20	72.00	120.80	522.00	192.85	36.95	313.6	1774.4	17.67358
<i>C. elephantipes</i>	330.65	66.65	139.35	536.65	206.00	38.40	345.35	1801.25	19.1728
<i>C. edentata</i>	273.50	74.20	135.15	482.85	209.35	43.35	344.5	1586.9	21.70899
<i>C. nongnoochiae</i>	298.85	63.20	159.50	521.50	222.65	42.70	382.2	1704	22.42958
<i>C. pectinata</i>	285.65	66.85	166.00	518.50	232.85	44.91	398.85	1675.15	23.80981
<i>C. praburiensis</i>	200.80	68.65	201.00	470.50	269.65	57.45	470.65	1411.15	33.35223
<i>C. siamensis</i>	218.00	82.00	163.00	463.00	245.00	52.90	408	1444	28.25485
<i>C. simplicipinna</i>	245.00	80.00	144.00	469.00	224.00	47.77	368	1508	24.40318
<i>C. tansachana</i>	309.00	70.35	134.70	514.00	205.00	39.88	339.75	1716.45	19.79376
ค่าเฉลี่ย	282.39	69.29	147.14	498.81	216.42	43.61	363.57	1631.71	22.28153

จากการศึกษาปริมาณการเติมหมู่เมธิลในพืชชนิดอื่นๆ พบว่าการเติมหมู่เมธิลของพืชที่เบสไซโทซีนโดยปกติแล้วอยู่ระหว่าง 20 - 40 เปอร์เซ็นต์ (Gruenbaum *et al.*, 1981) แต่พบว่าจากการศึกษาการเติมหมู่เมธิลของปรังทั้ง 10 ชนิดนี้มีปริมาณมากกว่าพืชทั่วไปประมาณ 10 - 20 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะ *C. edentata*, *C. nongnoochiae*, *C. pectinata*, *C. pranburiensis*, *C. simplicipinna* และ *C. tansachana* ที่มีปริมาณการเติมหมู่เมธิลเกินกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่าปรังที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้จะเก็บมาจากแหล่งเดียวกัน การเติมหมู่เมธิลที่มากกว่าปกตินี้เป็นไปได้หลายสาเหตุ และเป็นที่น่าทึ่งที่ทราบว่าปรังเป็นพืชโบราณที่มีอายุยาวนานกว่า 250 ล้านปี และเป็นพืชที่มีอายุยืนกว่าร้อยปี คาดว่าการเติมหมู่เมธิลเกิดขึ้นได้จากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และการถ่ายทอดทางพันธุกรรมผ่านการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส การสะสมของปริมาณการเติมหมู่เมธิลในปรังจึงเกิดขึ้นอย่างยาวนานและต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งปรังเป็นพืชที่มักแพร่กระจายอยู่บริเวณเขตอบอุ่น มีถิ่นกำเนิดอยู่ตามภูเขาหินปูนหรือหน้าผา และบริเวณที่มีสภาพอากาศแห้งแล้ง ซึ่งเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ทำให้เกิดการสะสมของการเติมหมู่เมธิลที่แตกต่างกัน ทำให้ปรังแต่ละชนิดมีความผันแปรของการเติมหมู่เมธิลควบคู่ไปกับการเกิดวิวัฒนาการ ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้ปรังอยู่รอดมาจนถึงปัจจุบันโดยที่มีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาไปจากเมื่อหลายร้อยล้านปีก่อนอย่างมากเมื่อเทียบกับพืชอื่นๆ

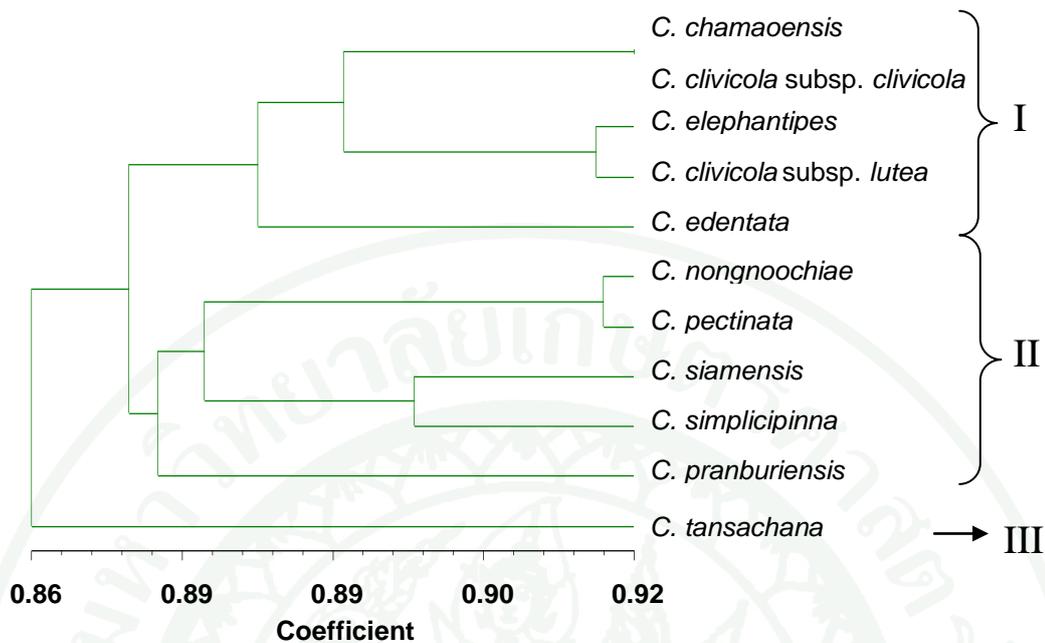
4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ และความหลากหลายทางพันธุกรรมของปรัง

4.1 การวิเคราะห์ข้อมูลจาก nucleotide polymorphism (พหุสัณฐานจากลำดับนิวคลีโอไทด์)

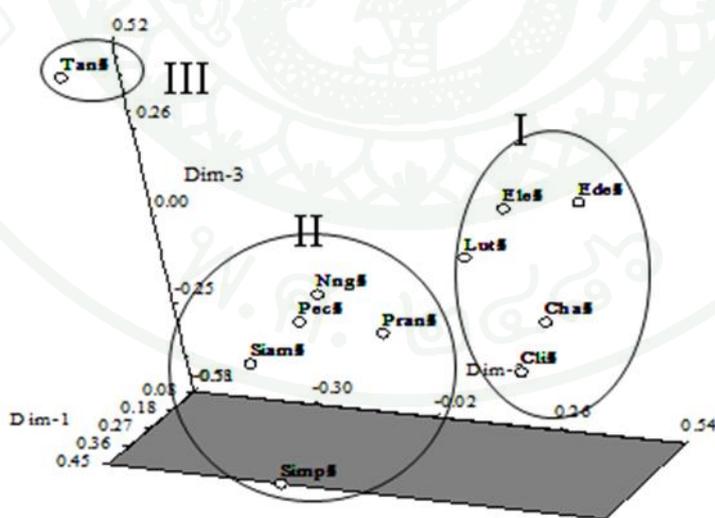
จากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอปรังด้วยเทคนิค MSAP จำนวน 11 ไพรเมอร์ ได้จำนวน markers ทั้งหมด 720 markers ซึ่งนำมาใช้หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างปรังแต่ละชนิด ผลการคำนวณค่า polymorphic information contents (PICs) ของแถบดีเอ็นเอจำนวน 720 แถบ พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0 - 0.5 ค่าเฉลี่ยของ PIC เท่ากับ 0.15 และค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) คำนวณตามวิธีการของ Lynch (1990) อยู่ในช่วง 0.86 ถึง 0.94 เมื่อนำมาจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA ซึ่งสามารถจัดจำแนกปรังที่ศึกษาออกเป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 9) ที่ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.867 กลุ่มแรกประกอบด้วยปรัง 5 ชนิด คือ *C. chamaoensis*, *C. clivicola* subsp. *clivicola*, *C. elephantipes*, *C. clivicola* subsp. *lutea* และ *C. edentata* เป็นที่น่าสนใจว่าปรัง 4 ใน 5 ชนิดนี้ เป็นปรังที่มีเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลใกล้เคียงกันคือน้อยกว่า 40

เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นเพียง *C. edentata* ที่มีเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลเกิน 40 เปอร์เซ็นต์คือ 44.48 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานว่า *C. clivicola* subsp. *lutea* กับ *C. clivicola* subsp. *clivicola* มีความเหมือนกันมากเพียงแต่ *C. clivicola* subsp. *lutea* มีขนาดของ male sporophyll ใหญ่กว่า กล่าวคือ male sporophyll จะมีขนาดยาวและกว้างกว่าของ *C. clivicola* subsp. *clivicola* รวมทั้งลำต้นของ *C. clivicola* subsp. *lutea* จะมีสีเหลืองและค่อนข้างเรียบ ต่างจาก *C. clivicola* subsp. *clivicola* ซึ่งมีลำต้นสีเทา (Hill, 1999) และพบว่าปรังทั้ง 2 subspecies ถูกแยกออกจากกันทางภูมิศาสตร์อย่างชัดเจน โดย *C. clivicola* subsp. *lutea* จะพบตามภูเขาหินปูนแถบภาคตะวันออกของประเทศไทย ในขณะที่ *C. clivicola* subsp. *clivicola* จะพบตามภูเขาหินปูนแถบทางภาคใต้ชายแดนไทยและมาเลเซีย จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าปรังทั้งสองชนิดนี้มีความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.89 ส่วน *C. chamaoensis* ซึ่งเป็นปรังที่มักถูกเข้าใจผิดว่าเป็นชนิดเดียวกันกับ *C. clivicola* subsp. *lutea* เนื่องจากลักษณะที่คล้ายคลึงกันและพบในแหล่งใกล้ๆ กันนั้น มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.88 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยปรัง 5 ชนิด คือ *C. nongnoochiae*, *C. pectinata*, *C. siamensis*, *C. simplicipinna* และ *C. pranburiensis* กลุ่มที่ 3 มีเพียงชนิดเดียว คือ *C. tansachana* ซึ่งปรังชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างจากปรังทุกชนิดที่พบในประเทศไทยอย่างชัดเจน เช่น เปลือกต้นค่อนข้างหนาและมีกลิ่นของไม้ บริเวณเรือนยอดที่มีการแตกใบใหม่ จะมีขนสีส้มปกคลุม จากการทดสอบความเหมาะสมในการจัดกลุ่มทางพันธุกรรม (cophenetic correlation coefficient หรือ Mantel test) ผลการทดสอบพบว่าได้ค่า $r = 0.964$ ซึ่งถือว่าการจัดกลุ่มที่ได้อยู่ในระดับที่ดีมาก (very good of fitness) และการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA ให้ผลที่สอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (principal component analysis) ค่า principal component ที่ 1, 2 และ 3 ครอบคลุมความแปรปรวน 58.62, 7.03 และ 6.03 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนทั้งหมดตามลำดับ (ภาพที่ 10)

ณัฐราพิชชามณษ์ (2551) จัดกลุ่มปรังสกุล *cycas* จำนวน 22 ชนิด โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของคลอโรพลาสต์ บริเวณ psbM-trn^{DGUCR} intergenic spacer โดยใช้วิธี Maximum parsimony (MP) แบ่งปรังออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่โดยกลุ่ม A มีถิ่นกำเนิดในทวีปเอเชีย และกลุ่มที่สองมีถิ่นกำเนิดในทวีปออสเตรเลีย ในกลุ่ม A *C. pectinata*, *C. chamaoensis*, *C. simplicipinna* และ *C. pranburiensis* จัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกันและ *C. clivicola* subsp. *clivicola* และ *C. clivicola* subsp. *lutea* แยกไปอยู่อีกกลุ่มย่อยหนึ่งซึ่งสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยการใช้นิวคลีโอไทด์ polymorphism จากการทดลองนี้ ซึ่ง *C. pectinata*, *C. simplicipinna* และ *C. pranburiensis* จัดอยู่ใน



ภาพที่ 9 Phylogenetic tree ของปรังทั้ง 10 ชนิด เมื่อใช้การวิเคราะห์ข้อมูลจาก nucleotide polymorphism



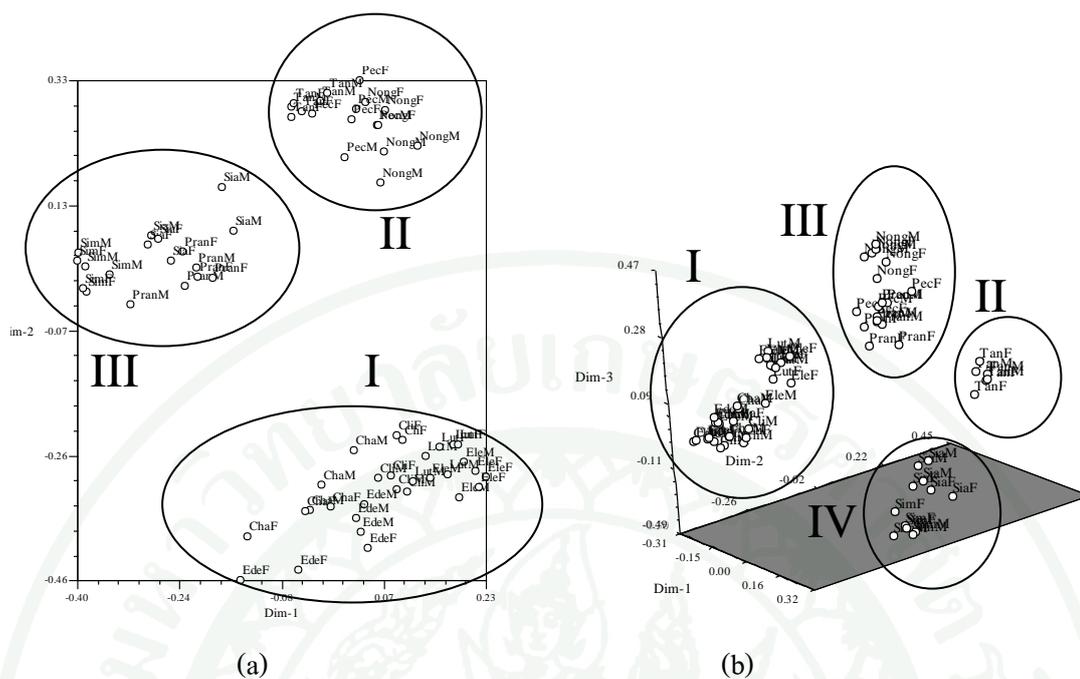
ภาพที่ 10 Principal component analysis ของปรังทั้ง 10 ชนิด เมื่อใช้การวิเคราะห์ข้อมูลจาก nucleotide polymorphism PCA 1= 58.62, PCA 2 = 7.03 และ PCA3 = 6.03

กลุ่มย่อยเดียวกัน ยกเว้น *C. chamaoensis* ที่ให้ผลการจัดต่างกัน ในขณะที่ *C. clivicola* subsp. *clivicola* และ *C. clivicola* subsp. *lutea* แยกไปอยู่อีกกลุ่ม ข้อมูลที่ได้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Mekanawakul (2003) ที่ใช้เทคนิค AFLP ในการจัดจำแนกปรงสกุล *Cycas* พบว่า *C. pectinata*, *C. chamaoensis*, *C. simplicipinna* และ *C. pranburiensis* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วน *C. nongnoochiae* และ *C. siamensis* ถูกจัดอยู่อีกกลุ่มหนึ่ง รวมทั้ง *C. tansachana* ที่มีความเหมือนกับปรงชนิดอื่นๆ น้อยที่สุดและแยกไปอยู่ในกลุ่มเดี่ยวๆ ยกเว้น *C. chamaoensis* ที่ให้ผลการจัดกลุ่มไม่สอดคล้อง อย่างไรก็ตามพบว่า *C. pectinata*, *C. simplicipinna* และ *C. pranburiensis* มักจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเสมอ

4.2 การศึกษาความแปรปรวนของการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอโดยใช้ชุดข้อมูล *EcoRI-MspI* และ *EcoRI-HpaII* เพื่อศึกษาความแตกต่างของรูปแบบการเติมหมู่เมทิลในปรงแต่ละชนิด

การวิเคราะห์ epigenetic diversity โดยอาศัยข้อมูลของตำแหน่งที่มีการเติมหมู่เมทิลจะใช้ชุดข้อมูล *EcoRI-MspI* และ *EcoRI-HpaII* เพื่อสร้าง phylogenetic tree โดยใช้วิธี UPGMA และการวิเคราะห์ PCA เปรียบเทียบผลระหว่างการจัดกลุ่มโดยอาศัยความแตกต่างของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ กับชุดข้อมูลที่เกิดจากความแตกต่างของการเติมหมู่เมทิลทั้งสองชุด

การจัดจำแนกโดยใช้ชุดข้อมูล *EcoRI-MspI* มีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่าง 0.78-0.94 และค่า principal component ที่ 1, 2 และ 3 มีค่าเท่ากับ 10.96, 8.33 และ 5.46 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 11 a) ดังนี้ กลุ่มแรกประกอบไปด้วย *C. chamaoensis*, *C. clivicola* subsp. *clivicola*, *C. clivicola* subsp. *lutea*, *C. elephantipes* และ *C. edentata* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *C. nongnoochiae*, *C. pectinata* และ *C. tansachana* กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *C. simplicipinna*, *C. siamensis* และ *C. pranburiensis* ในขณะที่การจัดกลุ่มโดยใช้ชุดข้อมูลของ *EcoRI-HpaII* พบว่ามีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่าง 0.79-0.95 และค่า principal component ที่ 1, 2 และ 3 มีค่าเท่ากับ 11.59, 7.84 และ 6.47 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 4 กลุ่ม (ภาพที่ 11 b) ดังนี้ กลุ่มแรกประกอบไปด้วย *C. chamaoensis*, *C. clivicola* subsp. *clivicola*, *C. clivicola* subsp. *lutea*, *C. elephantipes* และ *C. edentata* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *C. tansachana* เพียงชนิดเดียว กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *C. nongnoochiae*, *C. pectinata* และ *C. pranburiensis* กลุ่มสุดท้ายประกอบด้วย *C. simplicipinna* และ *C. siamensis*



ภาพที่ 11 การจัดกลุ่มปรังทั้ง 66 ตัวอย่างโดยวิธี PCA โดยใช้ข้อมูล *EcoRI-MspI* (a) และ *EcoRI-HpaII* (b)

เมื่อนำผลการจัดกลุ่มจากทั้งสองส่วนของ nucleotide polymorphism และ methylation polymorphism มาเปรียบเทียบกับพบว่า ทั้ง *C. chamaoensis*, *C. clivicola* subsp. *clivicola*, *C. clivicola* subsp. *lutea*, *C. elephantipes* และ *C. edentata* ยังคงอยู่ในกลุ่มเดียวกันสอดคล้องกับการศึกษาของฐิติ (2549) ที่จัด *C. chamaoensis*, *C. clivicola* subsp. *clivicola*, *C. clivicola* subsp. *lutea* และ *C. elephantipes* ไว้ในกลุ่มเดียวกัน ยกเว้น *C. edentata* ที่จัดอยู่อีกกลุ่มหนึ่ง เช่นเดียวกับกับการศึกษาของ สจ (2547) และที่เป็นที่น่าสังเกตว่าในการศึกษาคั้งนี้ แม้ *C. edentata* จะจัดอยู่ในกลุ่มนี้ แต่ก็กระจายตัวอยู่ห่างจากปรังชนิดอื่นๆ ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบลักษณะที่แตกต่างและสังเกตได้ชัดเจนของ *C. edentata* กับปรังชนิดอื่นๆ พบว่า *C. edentata* นั้นเป็นปรังทะเล มีถิ่นที่อยู่ตามแนวชายฝั่ง ส่วนปรังชนิดอื่นๆ ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้ล้วนอาศัยอยู่ตามภูเขาที่ใช้ น้ำจืดในการเจริญเติบโต

อย่างไรก็ตามมีการจัดกลุ่มบางส่วนที่เกิดจากความแตกต่างของการเติมหมู่เมธิล ที่แตกต่างกันออกไปจากการจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลภาวะพหุสัณฐานของลำดับนิวคลีโอไทด์เช่น *C. tansachana* ถูกจัดกลุ่มร่วมกับ *C. pectinata* และ *C. nongnoochiae* ในการจัดกลุ่มโดยใช้ชุดข้อมูล *EcoRI-MspI* ในขณะที่การจัดกลุ่มโดยใช้ชุดข้อมูลของ *EcoRI-HpaII* และการจัดกลุ่มโดย

ชุดข้อมูล nucleotide polymorphism นั้นให้ผลเหมือนกันคือ *C. tansachana* แยกออกมาเพียงชนิดเดียวเป็นกลุ่มเดียว ในขณะที่การจัดกลุ่มโดยใช้ชุดข้อมูล nucleotide polymorphism นั้น

C. pranburiensis, *C. pectinata*, *C. nongnoochiae*, *C. siamensis* และ *C. simplicipinna* ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน แต่เมื่อวิเคราะห์ผลร่วมกับการใช้ชุดข้อมูล *EcoRI-MspI* และชุดข้อมูลของ *EcoRI-HpaII* ในการจัดกลุ่มพบว่าสามารถแยกกลุ่มย่อยลงไปอีกระดับหนึ่งโดยที่ *C. siamensis*, *C. simplicipinna* ยังคงถูกจัดอยู่ด้วยกัน และ *C. pectinata* และ *C. nongnoochiae* ก็แยกออกเป็นอีกกลุ่มหนึ่ง ยกเว้น *C. pranburiensis* ที่ไปรวมกลุ่มกับ *C. siamensis* และ *C. simplicipinna* เมื่อใช้ชุดข้อมูล *EcoRI-MspI* แต่กลับมารวมอยู่กับ กลุ่มของ *C. pectinata* และ *C. nongnoochiae* เมื่อใช้ชุดข้อมูลของ *EcoRI-HpaII* ผลจากการศึกษาบ่งชี้ว่าปรังแต่ละชนิดมีรูปแบบการเติมหมู่เมธิลที่จำเพาะโดยเมื่อเปรียบเทียบผลการจัดกลุ่มโดยใช้ methylation sensitive polymorphism พบว่าการจัดกลุ่มมีความแตกต่างจากการใช้ข้อมูลสองชุด เมื่อพิจารณาผลการจัดกลุ่ม โดยใช้ชุดข้อมูล nucleotide polymorphism และ methylation polymorphism พบว่าปรังส่วนใหญ่จะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันในการจัดกลุ่มทุกรูปแบบ แต่ในปรังบางชนิดมีความแตกต่างในการจัดกลุ่ม ผลการทดลองบ่งชี้ว่ารูปแบบของการเติมหมู่เมธิล อาจมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่เป็นอิสระกับการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งอาจมีส่วนร่วมในกระบวนการเกิดวิวัฒนาการของปรัง

5. การวิเคราะห์รูปแบบแถบดีเอ็นเอและปริมาณการเติมหมู่เมธิลระหว่างเพศของปรังแต่ละชนิด

ระดับของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในปรังที่ศึกษาโดยคำนวณจากเครื่องหมาย MSAP จำนวน 720 เครื่องหมาย จะอยู่ในช่วง 36 – 58 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในปรังเพศผู้และเพศเมียเท่ากับ 43.48 และ 43.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปรังที่มีเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในเพศผู้มากกว่าเพศเมียประกอบด้วย *C. chamaoensis*, *C. edentata*, *C. elephantipes*, *C. clivicola* subsp. *lutea*, *C. pectinata*, *C. siamensis* ในขณะที่ปรังที่มีเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในเพศผู้น้อยกว่าเพศเมียประกอบด้วย *C. clivicola* subsp. *clivicola*, *C. nongnoochiae*, *C. pranburiensis*, *C. simplicipinna* and *C. tansachana* อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ของการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอ ระหว่างปรังเพศผู้และเพศเมียภายในชนิดเดียวกัน (ตารางที่ 12 และ ภาพที่ 12) ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า P-value = 0.05 ซึ่งหมายความว่าเปอร์เซ็นต์ของการเติมหมู่เมธิลนั้น ไม่ใช่ปัจจัยที่สำคัญต่อการกำหนดเพศของปรัง ซึ่งเปอร์เซ็นต์ดังกล่าวมีผลต่อการกำหนดเพศของสิ่งมีชีวิตบางชนิดเช่น mealy bug (Mohan and Chandra, 2005) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kunachowicz *et al.* (2001) ที่พบว่าใน

Chara tomentosa เพศเมียจะมีการเติมหมู่เมทิลที่เบสไซโทซีนประมาณ 5.9 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ต้นเพศผู้จะมีมากกว่าโดยสูงถึง 9.1 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำข้อมูลของรูปแบบการเติมหมู่เมทิลไปคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างเพศของปรังแต่ละชนิดตามวิธีของ Sneath and Sokal (1973) เพื่อตรวจสอบว่ารูปแบบของการเติมหมู่เมทิลในปรังทั้งสองเพศมีความเหมือนกันหรือไม่ ผลจากการศึกษาพบว่าปรังทั้งสองเพศในทุกชนิดมีรูปแบบของการเติมหมู่เมทิลให้ดีเอ็นเอเหมือนกันอยู่ในช่วงประมาณ 55.3 ถึง 72.8 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ารูปแบบของการเติมหมู่เมทิลประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันในปรังทั้งสองเพศ (ตารางที่ 13)

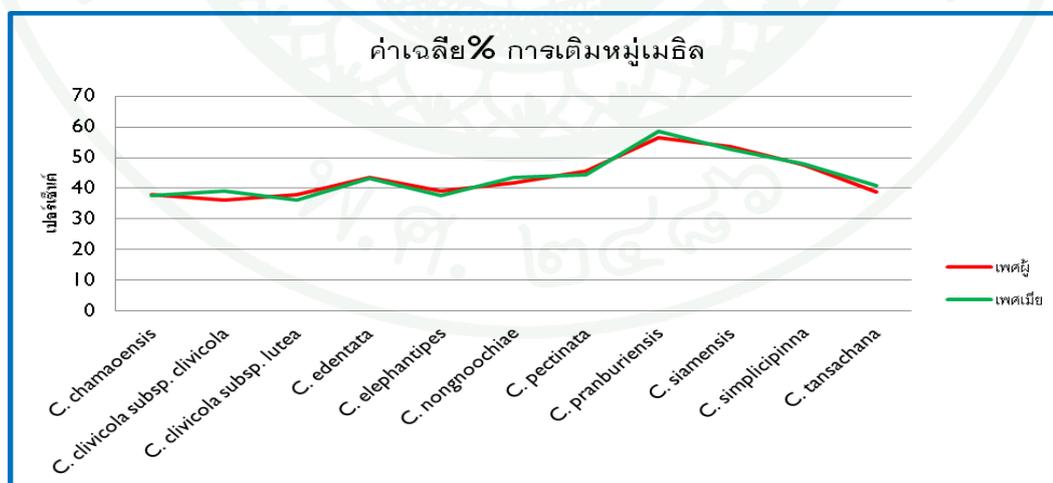
โดยปกติแล้วในจีโนมของพืชจะมีการเติมหมู่เมทิลให้กับเบสไซโทซีน ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่าการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอ นั้นมีบทบาทต่อกระบวนการทำงานของพืชอย่างเป็นระบบ เช่น เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเคลื่อนที่ของ transposon ควบคุมการทำงานของยีน และกระบวนการเกิด genomic imprinting (Gehring and Henikoff, 2007) การเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอยังเป็นปัจจัยสำคัญในการพัฒนาของพืชทั้งในส่วนของ การสร้างเซลล์สืบพันธุ์และการพัฒนาของเอ็มบริโอ (Xiao *et al.*, 2006; Takeda and Paszkowski, 2006; Viejo *et al.*, 2010) ความแตกต่างของรูปแบบของการเติมหมู่เมทิลระหว่างปรังทั้งสองเพศอาจพบในส่วนของยีนและโครโมโซม จากการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ของเซลล์เกี่ยวกับรูปแบบการเติมหมู่เมทิลของ *Melandrium album* ในเซลล์ของเพศผู้พบว่ามีสัญญาณของ 5-mC บนแขนข้างสั้นของโครโมโซม X ในขณะที่ไม่พบสัญญาณการเติมหมู่เมทิลบนโครโมโซม Y ในระดับที่มากนัก (บ่งชี้ว่ามีความเป็น euchromatin มากกว่า) ส่วนในเซลล์ของต้นเพศเมียพบรูปแบบของการเติมหมู่เมทิลแบบจำเพาะในโครโมโซม X เพียง 1 โครโมโซม ในขณะที่โครโมโซม X อีก 1 โครโมโซม สามารถตรวจพบ 5-mC ที่ติดฉลากโดยรวมอยู่ในระดับสูง (Siroky *et al.*, 1998)

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยจำนวนแถบดีเอ็นเอของปรังแต่ละชนิด และเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอระหว่างเพศของปรังทั้ง 10 ชนิด

ชนิดปรัง	จำนวนแถบดีเอ็นเอ								เปอร์เซ็นต์		เปอร์เซ็นต์		รวมเปอร์เซ็นต์การ	
	รูปแบบที่ 1		รูปแบบที่ 2		รูปแบบที่ 3		รวม		hemi-methylation (% รูปแบบที่ 2)		full-methylation (%รูปแบบที่ 3)		เติมหมู่เมทิล (% รูปแบบที่ 2+3)	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
<i>C. chamaoensis</i>	295.7	291.0	53.7	71.3	127.7	104.7	477.0	467.0	11.26	15.28	26.76	22.41	38.02	37.69
<i>C. clivicola</i> subsp.														
<i>clivicola</i>	326.3	318.3	60.7	51.0	124.7	153.0	511.7	522.3	11.86	9.77	24.36	29.29	36.22	39.06
<i>C. edentata</i>	287.3	259.7	78.7	69.7	142.0	128.3	508.0	457.7	15.49	15.22	27.95	28.04	43.44	43.26
<i>C. elephantipes</i>	322.3	339.0	69.0	64.3	138.7	140.0	530.0	543.3	13.02	11.84	26.16	25.77	39.18	37.61
<i>C. clivicola</i> subsp.														
<i>lutea</i>	321.7	336.7	70.7	73.3	125.3	116.3	517.7	526.3	13.65	13.94	24.21	22.10	37.86	36.04
<i>C. nongnoochiae</i>	303.0	294.7	61.7	64.7	155.3	163.7	520.0	523.0	11.86	12.37	29.87	31.29	41.73	43.66
<i>C. pectinata</i>	281.3	290.0	64.7	69.0	170.0	162.0	516.0	521.0	12.53	13.25	32.95	31.09	45.48	44.34
<i>C. praburiensis</i>	204.3	197.3	80.0	57.3	184.0	218.0	468.3	472.7	17.08	12.4	39.29	46.12	56.37	58.52
<i>C. siamensis</i>	221.0	215.0	77.0	87.0	177.0	149.0	475.0	451.0	16.21	19.29	37.26	33.04	53.47	52.33
<i>C. simplicipinna</i>	248.7	241.3	79.0	81.0	147.7	140.3	475.3	462.7	16.62	17.51	31.07	30.33	47.69	47.84
<i>C. tansachana</i>	312.0	306.0	61.0	79.7	137.7	131.7	510.7	517.3	11.94	15.4	26.96	25.45	38.90	40.85

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ยของค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของรูปแบบการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอ ระหว่างเพศผู้และเพศเมียของปรังทั้ง 10 ชนิด

ชนิดปรัง	ค่าเฉลี่ยความเหมือนของ รูปแบบการเติมหมู่เมธิล (%)	ค่าเฉลี่ยความแตกต่าง ของรูปแบบการเติมหมู่ เมธิล (%)
1. <i>C. chamaoensis</i>	62.9	37.1
2. <i>C. clivicola</i> subsp. <i>clivicola</i>	66.2	33.8
3. <i>C. edentata</i>	67.3	32.7
4. <i>C. elephantipes</i>	70.5	29.5
5. <i>C. clivicola</i> subsp. <i>lutea</i>	70.6	29.4
6. <i>C. nongnoochiae</i>	69.7	30.3
7. <i>C. pectinata</i>	63.5	36.5
8. <i>C. pranburiensis</i>	65.1	34.9
9. <i>C. siamensis</i>	55.3	44.6
10. <i>C. simplicipinna</i>	63.4	36.6
11. <i>C. tansachana</i>	72.8	27.2



ภาพที่ 12 กราฟเส้นเปรียบเทียบการเติมหมู่เมธิลระหว่างเพศของปรัง 10 ชนิด

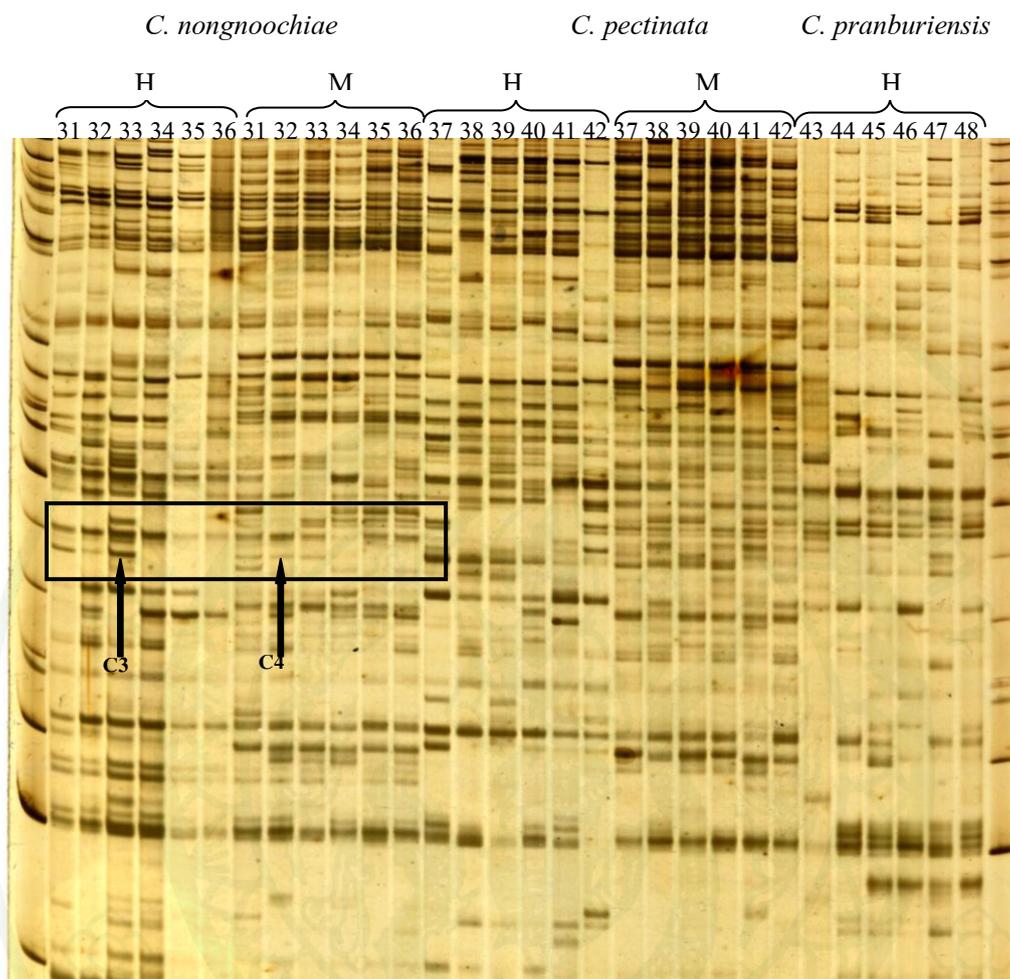
6. การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับเพศ

จากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค MSAP กับปรังทั้ง 11 ชนิด โดยเลือกคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 14 คู่ไพรเมอร์ ดังนี้ E1/HM1, E2/HM3, E2/HM4, E3/HM3, E3/HM4, E5/HM2, E5/HM3, E5/HM5, E5/HM8, E6/HM4, E7/HM3, E7/HM4, E8HM1 และ E8HM8 คัดเลือกรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่น่าจะมีผลต่อเพศในปรัง โดยจะคัดเลือกจากแถบดีเอ็นเอที่พบเฉพาะเพศใดเพศหนึ่ง ทั้ง 3 แถบ และไม่พบในอีกเพศหนึ่ง หรือเป็นแถบดีเอ็นเอที่มักพบในเพศใดเพศหนึ่งมากกว่า ซึ่งจากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรัง โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 14 คู่นี้ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างเพศในปรังทั้งหมด 8 ชนิดจาก 10 ชนิด และมีเพียง 5 คู่ไพรเมอร์เท่านั้นที่พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างเพศ ดังแสดงในภาพที่ 13-17 โดยแถบดีเอ็นเอที่พบความต่างระหว่างเพศนั้นจะพิจารณาจากรูปแบบที่พบเฉพาะในเพศใดเพศหนึ่ง หรือที่มีรูปแบบใกล้เคียง โดยรูปแบบที่น่าจะเกี่ยวข้องกับเพศทั้งหมด 6 รูปแบบ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่เพศผู้เติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอมากกว่าเพศเมีย จำนวน 25 ตำแหน่ง และกลุ่มที่เพศเมียเติมหมู่เมธิลมากกว่าเพศผู้ 34 ตำแหน่ง รวม 59 ตำแหน่ง ดังตารางที่ 14 จากนั้นเลือกตัดแถบดีเอ็นเอเพื่อนำไปโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์

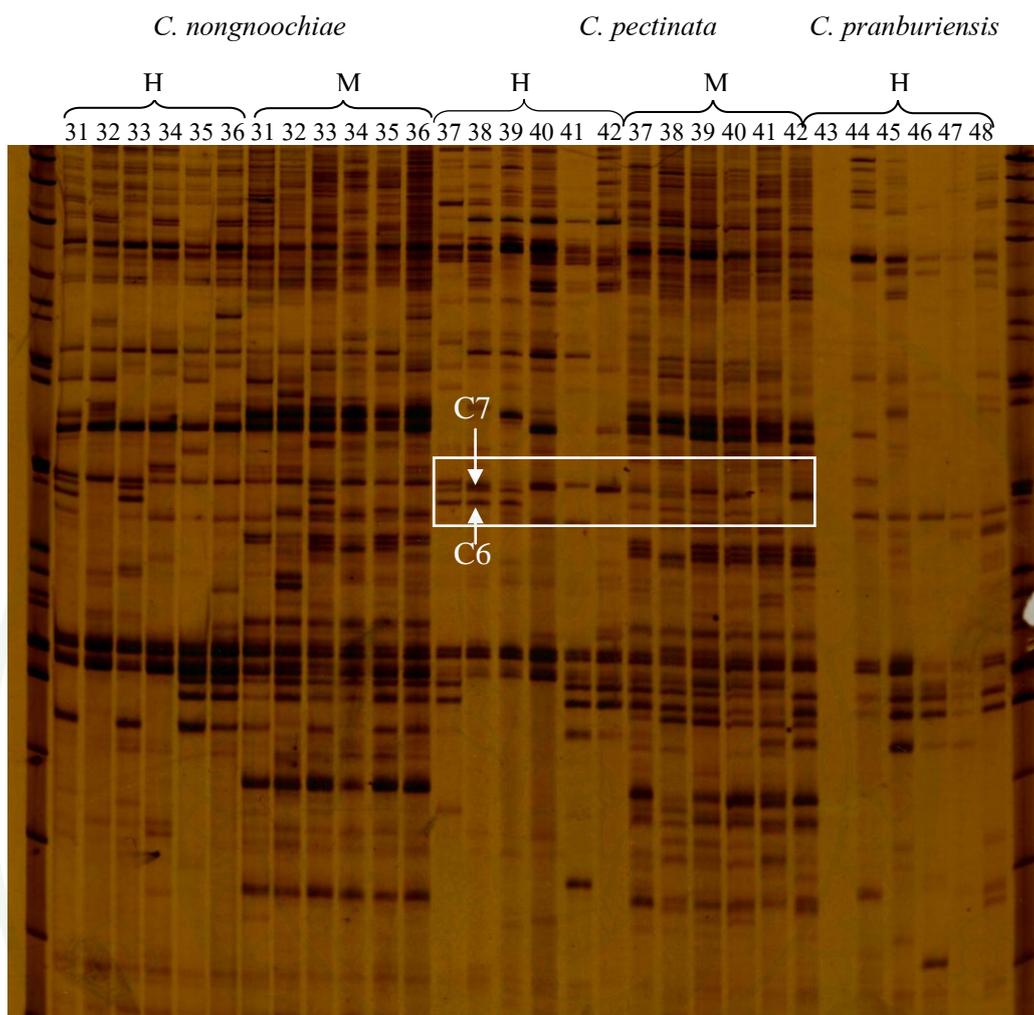
ตารางที่ 14 จำนวนรูปแบบการเติมหมู่เมธิลที่จำเพาะต่อลักษณะของปรังที่ศึกษา

รูปแบบการเติมหมู่เมธิล												ลักษณะของการเติมหมู่เมธิล		จำนวน	
<i>EcoRI/HpaII</i>						<i>EcoRI/MspI</i>						เพศผู้	เพศเมีย		
M1	M2	M3	F1	F2	F3	M1	M2	M3	F1	F2	F3				
1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	no	hyper	1	
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	hemi	hyper	11	
0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	full	hyper	22	
0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	hyper	no	3	
0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	hyper	hemi	5	
0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	hyper	full	17	
Total															59

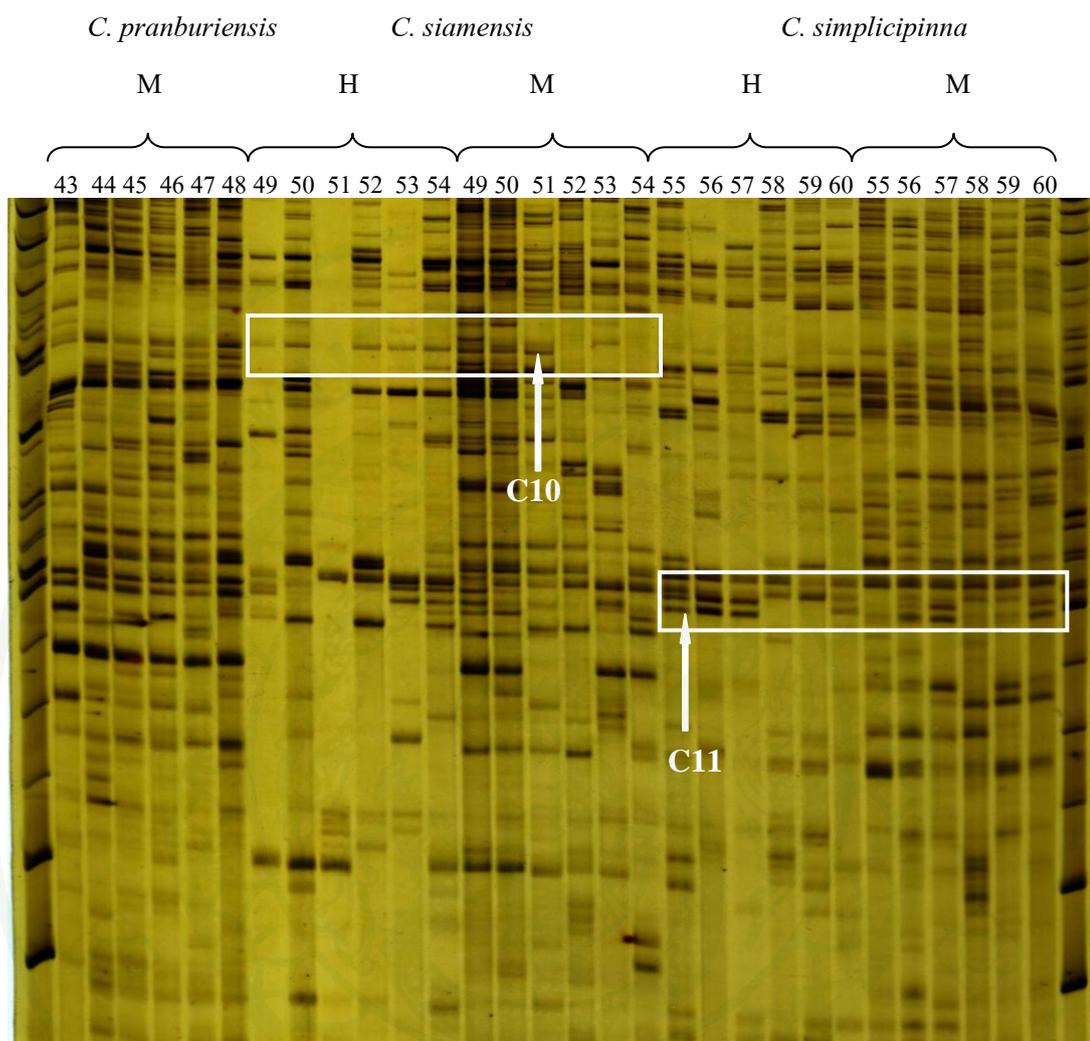
หมายเหตุ รูปแบบของแถบดีเอ็นเอประกอบไปด้วยเลข 12 ตัวแบ่งเป็น 4 ชุด ชุดละ 3 ตัว ตัวเลข 1 และ 0 ในช่อง *EcoRI-HpaII* และ *EcoRI-MspI* หมายถึงปรากฏแถบดีเอ็นเอ (1) และไม่ปรากฏแถบ ดีเอ็นเอ (0)



ภาพที่ 14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *C. nongnoochiae*, *C. pectinata* และ *C. pranburiensis* จากเทคนิค MSAP โดยใช้ไพรเมอร์ E1/HM1 (กรอบสี่เหลี่ยมแสดงแถบดีเอ็นเอที่ให้ความต่างระหว่างเพศของ *C. nongnoochiae* (C3, C4) มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอ 111 000 111 000)



ภาพที่ 15 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *C. nongnoochiae*, *C. pectinata* และ *C. pranburiensis* จากเทคนิค MSAP โดยใช้ ไพรมเมอร์ E3/HM3 (กรอบสี่เหลี่ยมแสดงแถบดีเอ็นเอที่ให้ความต่างระหว่างเพศของ *C. pectinata* มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอ 111 000 111 100 (C6), มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอ 111 000 000 000 (C7)



ภาพที่ 16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *C. pranburiensis*, *C. siamensis* และ *C. simplicipinna* จากเทคนิค MSAP โดยใช้ไพรเมอร์ E3/HM3 (กรอบสี่เหลี่ยมแสดงแถบดีเอ็นเอที่ให้ความต่างระหว่างเพศของ *C. siamensis* (C10) มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอ 111 111 111 000 และ *C. simplicipinna* (C11) มีรูปแบบแถบดีเอ็นเอ 111 000 111 000)

นำแถบดีเอ็นเอที่พบความแตกต่างระหว่างเพศของปรังที่ได้คัดเลือกไว้ทั้งหมด 16 แถบ ประกอบด้วย *Cycas clivicola* subsp. *clivicola* จำนวน 1 แถบ *C. clivicola* subsp. *lutea* จำนวน 1 แถบ *C. elephantipes* จำนวน 1 แถบ *C. nongnoochiae* จำนวน 2 แถบ *C. pectinata* จำนวน 3 แถบ *C. pranburiensis* จำนวน 1 แถบ *C. siamensis* จำนวน 1 แถบ *C. simplicipinna* จำนวน 4 แถบ และ *C. tansachana* จำนวน 5 แถบ มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แถบละ 2-3 โคลน รวมทั้งหมด 40 โคลน ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 19 แบบ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์จากปลาย 5'-3' ดังต่อไปนี้

>C1

TAATTCGCAAGAGAATAAATTTTCATGGCAAGTGACGCCCTTCCAATCGTTCGGCGCA
CGTGATAGACTTACGTAACGACGACGTCATGCTCTCCACGTCACGCGGGGTTGCCAC
GTCCGCTATAAAACAATTGCATAGAATGCGGATCTGGACGGGTGGTAAAAATTAATT
AATTAATTCATTAAGCCAGCCTGGGCATCACCGCGATTTGCCGCGGATTCCGCG

>C2

TGACTGCGTACCAATTCACTATTCTAAGGGTGACTTTGATTCTCTTCAACAATGATTG
CAACAAATTGATCAAACCTCAAGGACTGTTATCTGCCGTCAGACTAAGTAAGAGAATG
GAGAATAATTACCGCAAAGCACAGCACAAATCCTAACATGAAGAATGGATCTTCAGCC
TTGTGTTCTGGAAGTGAAGACTCAATGCTTTGGAACAATGGAAATTCTTTTAAAATG
CTCAATAAAATTGCAAATTTTAGGTCAAATTTCTTCGCTGGATAGATGTACGCCCCAT
CCTGAGTTCTTCCTTTTCTTTTCCAACTATATTATGGTCGAATAGCCATTGTATC
CATCAAATTCACCAAGGACTAGCTGCCAAGTCGCCCCGTCAGTAGTGGTAAAGGAAA
GAATAATCCCAAAGCTGGAATTGTATCGGACCCAATAACGTAAATTATGGGAACCGA
GCAGGACTCATGAT

>C3

CTATCGTCTTCAACATCACAATTTTTATATCTCAAATATTCCACGTGGCACCGAGACC
ATCGTGGGATGTCCCTGGCAGACACCGTTGGCTCGTATTAGATTTTAGTGCTAGAGT
CATAAAAATAGAATTAATAAAGAATGAGGCGGCTCTCGGTGTACGAAAGACATT
GAATTAATGTGTGCTGGATAAGGCCTTC

>C4

GACCTGGCAAAAAGAGCGCTAACTCTTCGTAATCTCCAAAGGCGGAGCATATTATGA
 AAACCAAATACTTGACTTTTGGCTTCGTTTCCCTGAAATTATTAATAGATAAGCTCGG
 ACGGCATTGTTGATGCCACATCTAATATGAACGATCTGGAAACGTACCTGCAACATC
 AAATATGGCAAATGAGTAAGACTCAGG

>C5

CTCATCGAGTTAAAAGGACAAAAATTTAAAAGGTATTGAAACTGCAATAATAAAGTG
 CTGAAAAGTGATAACGTAAATAATAAATGCCAAATTAACAATGACGGAAAGCACG
 CCAATGATAATCAAAGGCTGCAATAAATCGCAAATACATAGAGAGACACAAATCCA
 ATACGGAATGCAATAAATGATAGACGCAGATCGCAAATATATAATGACGTGCACAA
 AGCCGTAATAAAGAGAATGCAGAACGGCATAATCAAATGAATATATAGAAACGCA
 TAGATAATCAAGAGCAGCAGATTAGAATGAATCAAAGTGATCAAATACATGAAGGA
 CTGA

>C6

CTCATCGAGTTAAAAGGACAAAAATTTAAAAGGTATTGAAACTGCAATAATAAAGTG
 CTGAAAAGTGATAACGTAAATAATAAATGCCAAATAACAATGACGGAAAGCACG
 CCAATGATAATCAAAGGCTGCAATAAATCGCAAATACATAGAGAGACACAAATCTA
 ATACGGAATACAATAAATGATAGACGCAGATCGCAAATATATAATGACGGGCACAA
 AGCCGTAATAAAGAGAATGCAGAACTGCATAATCAAATGAATATATAGAAACGCAT
 AGATAATCAAGAGCAGCAGATTAGAATGAATCAAAGTGATCAAATACATGAAGGAC
 T

>C7

CTGGAAATGCGGACGTACATTGACACCTGCAACGAAGATTCGCCTCGGACAAGTTTT
 ATTTCCATTTATGAGAAGGGATGTGCATCAATTCTGCGCCTCACCTACCTTCTTAAA
 TACCCACCTCATCCGCATCTTTAAATTTGGTTCGATGGAAGGCTGCCTTAAATCCAAG
 TCAGCCAGGATACGTTTGTAAAGAGCTTTAGAGCACGGTCACATGGAGGAAACATTA
 ATTTTCTATCAGTTTGACAATTATTACATTTGTTTCTGTTACCCTTCTGTTACGTGAC

AGGAGGGCAATGCACTCGTAAGAATTAATATATTTCAAAAAATGTGAGTTTACATTT
GGA

>C8

CCTATCCGCGAGCGACAGTCGTCCATCACGAGCACAAACGGCATCCTCGAGCTCAATA
AATCGTCCCAGCATCACCAACATGTCTTCTACCTCGAGTGTTACGACCTCAATCGTC
GTCCATCATTAGCCAATTCGTTGGACGCAAAATCGCGGCTCAACCCCATGACGCCGT
CCATGTCTAGTCAAAGGCCAGAGACGACTCTCTGACTCCCACCGTGAGTGCGACTA
CTGCCTCTACCAGCGGCAGAAGGCCTAGCGACGCGGCACTGGCAGCTGCAATCACTC
CAGAAAGTATGACGACGAAGCCCAAGTCGAACAGACGCAGCTT

>C9

GAATGCCAAAGGGGGTTCGTCAGTAACGGCGTGATTGATCGTCAATCCGATGCCA
ATCCCGTCTCTCATCTTCGTCGCCTGCACAGCCAGCAACGGAAGGAAGTGCCGTCA
TAATTGACAGCGCCGTCCAGTGCGAACAGCTGGCGAATGACGGCTGCCATGTCTTCC
GTTTCAATTTCTGCTAGACAGACGTCTTCACTAGCGGAAGCTTCAATGAAATCCACTC
CTACATCGTTGCAGTCCACATATAACAACGCCATCTTCTTCCGAAGTAATCAGC

>C10

TATGTTTAGATATAATGGAGATGCTTTACACATTCCTCTCTAATGTAGTAGCATGTGA
TGATTCTAGTATCAATCTTGTTGATTGTTTTGATCATTATAGACATTGTGTAATTTT
GTTTCATTTTCATTTCTGTTTGGGGTTTATTCATTTTGGTTTAATAATGTAGTTTATAA
TGGTATTGCAAACATTTGGTCACCATTTAAATTGTTCAAGATAAGTTAGTTAAATGAA
CTTCATAGGCGCTTTATTGTTTTAAACTATGAGAATGCATAATATAACAACGTTGGTC
TTTCTTTGTTGCTATAGATAGTGTTTCATTTTTTAAGCACTTGTGTGCAATTATGTTGAA
TTTTGTTGTATTATAGGGAGATATTCTTGAAGACCCAGCTAATGAACCACAAAAGGA
TATGTATGTGATGACTGTGGATCCAGAGGATGCACCAAAT

>C11

TGACTGCGTACCAATTCACCTACCTACAAAAGCTAATTGACCGCTGGAGTCCAATGT
 CATGCATGATATCTAAAGTCCCTGATGAAGAGGACAGTTCAAACCAACAAGACAGAT
 GGCATAGCCAATCCCGAGGTAGAAACAACCTCCAGAAACAATAGATTTTCAATGCAA
 AAGAGGGCCTCACCATCACCACAAAAACAGCCACCAGTCCAGAGAGTGAAAAAGCA
 CAAAAACCAGAGACCACACAGAATCATGTCCCAGTCATTGTGGAACCGAGCAGGAC
 TCATGATA

>C12

CTCATTGAGTTAAAAGGACAAAAATTTAAAAGGTATTGAAACTGCAATAATAAAGTG
 CTGAAAAGTGATAACGTAAATAATAAATGCCAAATAAAACAATGACGGAAAGCACG
 CCAATGATAATCAAAGCTGCAATAAATCGCAAATACATAGAGAGACACAAATCCA
 ATACGGAATGCAATAAATGATAGACGCAGATCGCAAATATATAATGACGTGCACAA
 AGCCGTAATAAAGAGAATGCAGAACGGCATAATCAAATGAATATATAGAAACGCAT
 AGATAATCAAGAGCAGCAGATTAGTATGAATCAAAGTGATCAAATACATGAAGGAC
 TGA

>C13

CTGAAATGCGGACGTACATTGACACCTGCAACGAAGATTGCGCTCAGACAAGTTTT
 ATTTCCCATTTATGAGAAGGGATGTGCATCAATTCTGCGCCTCAGCTACCTTCTTAA
 TACCCACCTCATCCGCATCTTTAAATTTGGTTTGATGGAAGGCTGCCTTAAATCCAAG
 TCAGCCAGGATACGTTTGTAAGAGCTTTAGAGCACGGTCACATGGAGGAAACATTAA
 ATTTTCTATCAGTTTGACAATTATTACATTTGTTTCTGTTACGTGACAGGAGGGCAAT
 GCACTCGTAAGAATTAATATATTTCAAAAAATGTGAGTTTACATTTGGA

>C14

ACAAAGTTTCGCAGAAGGGTATCCGCCTACGTAGTGGACTGGAAAGATTCGAAAAAT
 CTAGGCTCCCAGGATCGAACTCCGGCCTCGACAATAAGGCGGTTAAGCCACGGGGAT
 GGGAGAAGAGGTTCTGTGAAGTGAATGACACTGCACTGCAACACTTCACTAAGATGG

TTTTCTCTGTGAAGAACGGGAAAGAAAGGGACTACAGAATGCAGTGGCAATGACAC
AGGGATGTGGCCAAG

>C15

CTCCCGTATACCCCACAATAAAATGCAATTGCTGAAAGAAAGAATCGTACCATGATG
GAGATGGCAAGGTGCATTCTAAAACTTGCAACTGATGTTTTAGGCAGAAGTTGTGG
CAACTACTGTTTATATTTTGAATTGGGCACCCACCCAGGTAGTTCGTAGTATGACCCC
CGAAGTCAAAT

>C16

CACAGCAGCAGCAACAATGGCAAGCACAGACACAATCAAGGAGAATGCTAAGTGAT
AGAGGTGGCAGTTCATATCAAAGTGGAGAAGGTGGACAGAACCATGGTAAAATGGG
ATTGGGAAGGAGTGGACATGGGCAGGGTATGAGTGGTAGAGGACAAGTGGGGCAAG
GAAGAGGTGCGAGCAGGCATGGGTGGAAAAACATGGGAGGAGTTGGAGGAGGTTCT
TATGGGCAAGGGT

>C17

CCAAACCCTTTTCCTTACATAAGGATGTCAAAGATCCACAACAAGGTAAAAGGTCA
AGGAGATGTGAATTAGAGTCTCATAATATAAAAGGTGGGAGGCAGTTGGTATTATT
GAGACTTTGGGCGAGTCACTTGGTATTGGTATTAACGAGAGTCTCCATTGTTGAACCC
CAAAGATGTTGATCTTGTAGTCAACCAATATCAAGAGAATAGAGCGGTTGGAATTG
GCGGGGCATATATTTATAATGAAGTAATATTTTATAGTAAAGCGGCGCCATGGGA
T

>C18

AGGGATTTCTGGCCATAATTTCTGCAGAGTTTAATTGATTACCTTCATAAAGATTGCG
TCTGCTGAGGGTATACGCTCGAACATGTTGCCGCCACATGCTCCACTCCTGAAATAT
ATTGGGAGCCGCGGAATTAGTTTGGATTATATATTGATACTGAGAAGAAGGGGAATT
ATATACAGAGACGG

>C19

```
AGCTTACACAATGATCCTTCTTATTTACAGAACAAATCGAGCGCGCTTCTGAGTA
CTGTAGTTCAAGGCGACTTCCGAGATTGAAGAAAGATTACAAACGCCCTTCTCATCC
TGCCTCACTCCATTGAAGCTGCAGGATGCATACGCAACAATCAGATGCAGATGAAAT
GTGAGCGCACTGTATGG
```

ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 19 แบบนี้สามารถจัดจำแนกได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ตามรูปแบบของปริมาณการเติมหมู่เมทิลได้แก่ รูปแบบแถบดีเอ็นเอที่เพศผู้มีปริมาณการเติมหมู่เมทิลน้อยกว่าเพศเมีย (female hypermethylation) และกลุ่มที่สองคือกลุ่มที่รูปแบบแถบดีเอ็นเอของเพศผู้มีปริมาณการเติมหมู่เมทิลมากกว่าเพศเมีย (male hypermethylation) ซึ่งดีเอ็นเอของกลุ่มที่เพศผู้มีปริมาณการเติมหมู่เมทิลมากกว่าเพศเมียประกอบด้วย C1, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C11, C12, C13, C14, C16, และ C17 ส่วนดีเอ็นเอของกลุ่มที่เพศผู้มีปริมาณการเติมหมู่เมทิลน้อยกว่าเพศเมียประกอบด้วย C2, C9, C10, C15, C18 และ C19 เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI เลือกรูปแบบ BLAST (basic local alignment search tools) ได้ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลดังตารางที่ 15

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI พบว่าส่วนใหญ่ไม่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลซึ่งอาจจะมาจากสาเหตุสำคัญ 4 ประการคือ 1) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของปรองสกุ *Cycas* ยังมีอยู่ไม่มากนักจึงทำให้ยากต่อการระบุความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ 2) ดีเอ็นเอที่ได้มาจากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค MSAP มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก AFLP คือดีเอ็นเอที่ได้จึงมีขนาดค่อนข้างสั้น ทำให้อาจค้นหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ยาก โดยเฉพาะในสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่ต้นแบบ (non-model organisms) 3) การเติมหมู่เมทิลในดีเอ็นเอนั้นมักเกิดบริเวณที่ไม่ใช่ยีน หรือบริเวณหน้ายีนซึ่งเป็นส่วนควบคุมการแสดงออกของยีน ซึ่งเป็นบริเวณที่มักจะไม่มีพบในฐานข้อมูล และ 4) ดีเอ็นเอที่ถูกเติมหมู่เมทิลนั้นอาจอยู่ในบริเวณที่เป็น heterochromatin ซึ่งจะไม่มีพบในฐานข้อมูล Zhang *et al.* (2008) สันนิษฐานว่าการเติมหมู่เมทิลให้กับดีเอ็นเอและการเกิดเฮเทอโรโครมาตินนั้นมีบทบาทสำคัญต่อวิวัฒนาการของการเกิดโครโมโซมเพศในระยะแรก

อย่างไรก็ตามแถบดีเอ็นเอหลายชิ้นมีความเหมือนกับยีนในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเช่น C4 และ C8 ที่เป็นบริเวณที่เพศผู้ไม่ถูกเติมหมู่เมทิลแต่เพศเมียเติมหมู่เมทิลแบบ hypermethylated

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ C4 มีความเหมือนกับ mRNA ของ *Vicia faba* ที่เกี่ยวข้องกับ potassium channel ส่วน C8 นั้นมีความเหมือนกับยีน SLFL1-Sf (S locus F-box gene with low allelic sequence Polymorphism) ของ *Prunus mume* และมีรายงานว่ายีน SLFL1 นั้นน่าจะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มประสิทธิภาพการทำหน้าที่ของการเกิดละอองเรณู หรือเป็น third molecule ในระบบ gametophytic self incompatibility (GSI) (Matsumoto *et al.*, 2008) มีความเป็นไปได้ว่าเมื่อไม่มีการเติมหมู่เมธิลที่ยีนนี้ส่งผลให้ยีนมีการแสดงออกและนำไปสู่การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ในขณะที่เพศเมียจะมีการเติมหมู่เมธิลที่ยีนนี้ ซึ่งอาจจะมีส่วนให้ยีนนี้ไม่แสดงออกในเพศเมีย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า potassium channel มีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของหลอดละอองเรณู (Mouline *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2011)

นอกจากนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ C10 ซึ่งไม่มีการเติมหมู่เมธิลในเพศผู้แต่เติมหมู่เมธิลในเพศเมียแบบ full methylation นั้น ตรงกับ cDNA library ที่มาจากแกมีโทไฟต์ เพศเมียของ *Zamia vazquezii* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ arginosuccinate ส่วน C15 นั้นตรงกับ cDNA library ที่มาจากแกมีโทไฟต์ เพศเมียของ *Zamia vazquezii* ส่วน C18 และ C19 ซึ่งไม่มีการเติมหมู่เมธิลในเพศเมียแต่เติมหมู่เมธิลในเพศผู้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับ mRNA ของ ยีน caffeic acid O-methyltransferase ของ *Picea sitchensis* และ cDNA 3' mRNA ที่ได้จาก ovule ของ *Cycas rumphii* ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า การเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอ นั้น อาจส่งผลหรือมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนระหว่างเพศผู้และเพศเมียที่ต่างกัน

ตารางที่ 15 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ และรูปแบบการเติมหมู่เมธิลที่แตกต่างระหว่างเพศของปรังทั้ง 11 ชนิด และผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI

ลำดับโคลนที่	ชนิดปรัง	ไพรเมอร์	ขนาด (bp.)	รูปแบบแถบดีเอ็นเอ	รูปแบบการเติมหมู่เมธิล		ผลการ BLAST
					เพศผู้	เพศเมีย	
C-1	<i>C. clivicola</i> subsp. <i>clivicola</i>	E5-HM5	225	111000 000000	hemi	hyper	Unknown match
C-2	<i>C. clivicola</i> subsp. <i>lutea</i>	E3-HM3	475	000111 111111	full	no	Unknown match
C-3	<i>C. nongnoochiae</i>	E1-HM1	200	111000 111000	no	hyper	Unknown match
C-4	<i>C. nongnoochiae</i>	E1-HM1	199	111000 111000	no	hyper	<i>Vicia faba</i> mRNA for potassium channel; E- value = 0.052
C-5	<i>C. pectinata</i>	E3-HM3	241	111000 111000	no	hyper	Unknown match
C-6	<i>C. pectinata</i>	E3-HM3	336	111000 111000	no	hyper	Unknown match
C-7	<i>C. pectinata</i>	E3-HM3	345	111000 111000	no	hyper	Unknown match
C-8	<i>C. pectinata</i>	E2-HM3	329	111000 111000	no	hyper	<i>Prunus mume</i> SLFL1-Sf gene for S locus F-box protein; E- value = 1.4

ตารางที่ 15 (ต่อ)

ลำดับ โคลนที่	ชนิดปรง	ไพรเมอร์	ขนาด (bp.)	รูปแบบแถบดีเอ็นเอ	รูปแบบการเติมหมู่เมธิล		ผลการ BLAST
					เพศผู้	เพศเมีย	
C-9	<i>C. pranburiensis</i>	E2-HM4	282	000000 000111	hyper	full	<i>Ricinus communis</i> Anthocyanin 5 – aromatic acyl transferase; E- value = 0.008
C-10	<i>C. siamensis</i>	E3-HM3	449	111111 111000	no	full	<i>Zamia vazquezii</i> ; cDNA library derived from female gametophytes; E-value = 3e-22
C-11	<i>C. simplicipinna</i>	E3-HM3	290	111000 111000	no	hyper	Unknown match
C-12	<i>C. tansachana</i>	E3-HM3	340	111000 111000	no	hyper	Unknown match
C-13	<i>C. tansachana</i>	E3-HM3	343	111000 111000	no	hyper	Unknown match
C-14	<i>C. simplicipinna</i>	E5-HM2	243	111000 000000	hemi	hyper	Unknown match

ตารางที่ 15 (ต่อ)

ลำดับ โคลนที่	ชนิดปรง	ไพรเมอร์	ขนาด (bp.)	รูปแบบแถบดีเอ็นเอ	รูปแบบการเติมหมู่เมทิล		ผลการ BLAST
					เพศผู้	เพศเมีย	
C-15	<i>C. simplicipinna</i>	E5-HM2	183	000000 111000	full	hyper	<i>Zamia vazquezii</i> : cDNA library derived from female gametophytes; E-value = 3e-17
C-16	<i>C. simplicipinna</i>	E5-HM2	237	111000 000000	hemi	hyper	Unknown match
C-17	<i>C. tansachana</i>	E5-HM2	287	111000 111000	no	hyper	Unknown match
C-18	<i>C. tansachana</i>	E5-HM2	187	000111 000111	hyper	no	<i>Picea sitchensis</i> caffeic acid O-methyltransferase mRNA; E-value = 7e-12
C-19	<i>C. tansachana</i>	E5-HM2	189	000111 000111	hyper	no	<i>Cycas rumphii</i> cDNA 3', mRNA sequence from <i>Cycas</i> ovule (NYBG); E-value = 8e-04

การศึกษาการจำแนกเพศในปรังได้มีการดำเนินการมาอย่างยาวนาน ทั้งวิธีการทางเซลล์ พันธุศาสตร์ และวิธีการทางโมเลกุล แต่ยังไม่สามารถหาข้อสรุปในการจำแนกเพศของปรังได้อย่างชัดเจนนัก (เมธานี, 2546; สจี, 2547; ฐิติ, 2549; Sangduen *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามผลการศึกษาของ Kanchanaketu *et al.* (2007) ได้แสดงให้เห็นว่าการเติมหมู่เมธิลในปรังเพศผู้ต่างกับปรังเพศเมีย และ Gorelick (2003) ยังเสนอข้อคิดเห็นเกี่ยวกับการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอว่า การเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอนั้น อาจเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้การเกิดรีคอมบิเนชันระหว่างโครโมโซมถูกขัดขวางหรือถูกยับยั้ง และนำไปสู่การเกิดโครโมโซมเพศในที่สุด นอกจากนี้ Ma *et al.* (2004) พบว่าบริเวณรอบๆ ตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศของมะละกอ มักจะเป็นบริเวณที่มีการยับยั้งการเกิดรีคอมบิเนชันมากกว่าปกติ

การศึกษาในครั้งนี้ถึงแม้ว่าเปอร์เซ็นต์ของการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอไม่แตกต่างกันแต่แสดงให้เห็นว่ารูปแบบของการเติมหมู่เมธิลระหว่างเพศผู้และเพศเมียแตกต่างกันประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณที่มีการเติมหมู่เมธิลแตกต่างกันในปรังทั้งสองเพศพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI นั้น ไม่ตรงกับข้อมูลในฐานข้อมูล อย่างไรก็ตามลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนก็มีความคล้ายกับยีนซึ่งน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ ถึงแม้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ อาจไม่ช่วยสนับสนุนสมมติฐานในการทดลองเท่าไรนัก เนื่องจากการทดลองครั้งนี้เป็นตรวจสอบการเติมหมู่เมธิลในปรังแต่ละพันธุ์เพียง 720 ตำแหน่งเท่านั้น ซึ่งอาจยังไม่มากพอที่จะสรุปได้ว่าการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอจะไม่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศในปรัง เนื่องจากระบบการเติมหมู่เมธิลในพืชนั้นสามารถพบทั้งที่เบสไซโทซีนแบบ CpG, CpHpG และ CpHpH โดยในการศึกษาครั้งนี้ตรวจสอบเพียงการเติมหมู่เมธิลที่มีลำดับเบสแบบ CCGG เท่านั้น แต่ผลจากการทดลองครั้งนี้ก็สามารถแสดงให้เห็นว่ามีความแตกต่างของการเติมหมู่เมธิลในปรังทั้งสองเพศ ซึ่งสอดคล้องกับแนวความคิดของ Osborne and Gorelick (2007) ที่เสนอว่าการกลับเพศของปรังนั้นเกี่ยวข้องกับการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอ และเป็นที่ยอมรับกันดีว่าสภาพแวดล้อมมีผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงการเติมหมู่เมธิล จากรายงานการกลับเพศของปรังในหลายๆ สถานการณ์เช่น การต้องอยู่ในสภาพที่มีแสงน้อย มีความกดดันจากสภาพอากาศที่หนาวเย็น และอยู่ในสถานะแห้งแล้งรุนแรง ทำให้ปรังเพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ได้ (Osborne and Gorelick, 2002) ในการทดลองของ Wang *et al.* (2011) พบว่าความกดดันจากสถานะแห้งแล้งชักนำให้การเติมหมู่เมธิลในจีโนมของข้าวเปลี่ยนไปจากเดิมถึง 12.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอีกมากมายที่แสดงให้เห็นว่า ความเครียดเนื่องจากความหนาวเย็น หรือการให้สารที่เป็น DNA demethylating agent อย่างเช่น 5-

azacytidine สามารถชักนำให้เกิดการสร้างดอก หรือเข้าสู่ภาวะเจริญพันธุ์เร็วขึ้น (Kondo *et al.*, 2007; Horvath *et al.*, 2002)

Osborne and Gorelick (2007) กล่าวถึงสภาพแวดล้อมมีผลต่อการแสดงออกของเพศของ
 ปรัง ความกดดันจากสภาพอากาศที่หนาวเย็นทำให้ปริมาณการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอลดลง
 สามารถทำให้ปรังเพศผู้สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียได้ ในขณะที่เมื่อปรังได้รับความกดดันเนื่องจาก
 สภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งจะกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มปริมาณการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอส่งผลให้
 ปรังเพศเมียสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ากระบวนการเติมหมู่เมธิลที่
 เบสไซโทซีนมีความเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณกระตุ้นให้เกิดการสร้างฮอร์โมนเพศในพืช (Grant,
 1999) ในปี ค.ศ. 2007 Moneger ได้ศึกษาเกี่ยวกับการกำหนดเพศใน *Silene latifolia* ซึ่งเป็นพืช
 ต้นแบบที่ใช้ในการศึกษากันมากในปัจจุบัน โดยทำให้เกิดการขาดหายของโครโมโซม (deletion) ที่
 โครโมโซม Y ผลการศึกษาพบว่าที่โครโมโซม Y มีบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศ 2 บริเวณ
 บริเวณแรกทำหน้าที่ยับยั้งการพัฒนาไปเป็นอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (suppression of female sex
 organ development) ได้แก่ capel และบริเวณที่สองเกี่ยวข้องกับการพัฒนาไปเป็นอวัยวะสืบพันธุ์
 เพศผู้ ได้แก่ stamen โดยที่เนื้อเยื่อเจริญบริเวณตาดอกนั้นเริ่มแรกจะพบจุดกำเนิดของทั้งสองเพศ
 แต่เมื่อเริ่มพัฒนาเป็นอวัยวะ ในดอกเพศผู้มีเนื้อเยื่อเจริญที่จะพัฒนาเป็นดอกเพศเมียเล็กกว่าอย่าง
 เห็นได้ชัดและจากนั้น filament ก็ถูกพัฒนาขึ้นมาแทนที่บริเวณของจุดกำเนิดอวัยวะเพศเมีย ใน
 ทำนองเดียวกันกับตาดอกของเพศเมียพบว่าช่วงแรกยังคงมีการเจริญของ stamen แต่จะสลายไป
 อย่างรวดเร็วแล้วแทนที่ด้วยการสร้าง carpel แทน แสดงให้เห็นว่า การพัฒนาเป็นดอกเพศใดเพศ
 หนึ่งนั้นขึ้นอยู่กับการทำงานของยีนที่อยู่บนโครโมโซม Y ว่าจะยับยั้งการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์เพศ
 เมียหรือไม่

งานวิจัยนี้ช่วยสนับสนุนความคิดเกี่ยวกับการกำหนดเพศโดยมีกระบวนการทาง
 epigenetics เข้ามาเกี่ยวข้องนั่นก็คือ การเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอ น่าจะมีผลต่อการแสดงออกของ
 ยีน จากการศึกษาของ Janousak *et al.*, 1996 ที่กล่าวว่าสามารถกระตุ้นให้ต้น *Silene latifolia* เพศ
 ผู้สร้างอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมียได้เมื่อชักนำด้วยสารประเภท demethylating agent เช่น 5-
 azacytidine แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดการกลับเพศจากเพศเมียไปเป็นเพศผู้ได้ด้วยวิธีนี้ กรณีนี้ช่วย
 ยืนยันได้ว่าต้นเพศผู้มียีนที่ควบคุมการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมียซึ่งอยู่บนโครโมโซม Y แต่
 ในเพศเมียไม่มียีนสำหรับสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ อีกนัยหนึ่งคือในต้นเพศผู้มียีนที่ทำหน้าที่
 ยับยั้งการสร้างส่วนประกอบของดอกเพศเมียโดยการเติมหมู่เมธิลให้กับยีนสำหรับการพัฒนา

ส่วนประกอบของดอกเพศเมียไว้ และเมื่อมีการดึงหมู่เมธิลออก การพัฒนาของดอกเพศเมียจึงเกิดขึ้น จากข้อมูลดังกล่าวช่วยอธิบายการกลับเพศของปรังโดยใช้กลไกการเติมหมู่เมธิลได้คล้ายๆ กับที่เกิดขึ้นใน *Silene latifolia* แต่ต่างกันตรงที่กรณีการกลับเพศของปรังนั้นสามารถกลับไปมา ระหว่างเพศผู้และเพศเมียได้ หรือกล่าวได้ว่า ปรังน่าจะมี sex determining region อยู่แต่อาจจะไม่ได้อยู่บนโครโมโซม Y เนื่องจากพบว่าใน *Cycas cercinalis* เท่านั้นที่มีรายงานพบว่าโครโมโซม Y นอกจากนั้นปรังชนิดอื่นๆ ยังไม่สามารถบ่งชี้การกำหนดเพศโดยระบบ XY ที่เห็นได้ชัดเจน มีเพียงส่วนของ satellite บนโครโมโซมเท่านั้นที่มีความแตกต่างกัน (เมธานี, 2546) ส่วนกลไกที่อธิบายการกลับเพศในปรังนั้นบ่งชี้ว่าบริเวณที่กำหนดเพศของปรังทั้งการกำหนดให้เป็นเพศผู้หรือเมียนั้นอยู่ในต้นเดียวกันแต่การแสดงออกนั้นต่างกันขึ้นอยู่กับสถานะของต้นปรังในขณะนั้น และกระบวนการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอก็เป็นกลไกหนึ่งที่ใช้ในการกำหนดเพศ โดยที่การเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอของเพศผู้จะมากกว่าในเพศเมียและเมื่อเคลื่อนย้ายหมู่เมธิลในเพศผู้จะทำให้เกิดการกลับเพศของปรังจากเพศผู้ไปเป็นเพศเมียได้ หรือกล่าวได้ว่าบริเวณที่กำหนดให้เกิดเพศของปรังนั้นในปรังเพศผู้จะมีการยับยั้งการแสดงออกของเพศเมียโดยการเติมหมู่เมธิลไว้ ดังนั้นการเติมหรือการดึงหมู่เมธิลออกจึงทำให้เกิดการกลับเพศได้ จากการศึกษาในครั้งนี้ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในกลุ่มที่เพศผู้มีการเติมหมู่เมธิลมากกว่าในเพศเมียได้แก่ C2, C9, C15, C18 และ C19 ซึ่งทั้ง 5 ตำแหน่งนี้มีความเป็นไปได้ที่จะเป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศในปรัง สกุล *Cycas* อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ได้พบบริเวณที่เพศเมียมีการเติมหมู่เมธิลมากกว่าในเพศผู้ด้วยเช่นกัน

ผลการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดจากแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างเพศไปพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะกับเพศของปรัง พบว่าเมื่อนำไพรเมอร์มาทดสอบกับปรังทั้งสองเพศ ผลการทดสอบไม่พบความแตกต่างของการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอระหว่างเพศ แสดงว่าแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างเพศที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ เกิดจากรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลที่แตกต่างกัน คือเกิดจากการเติมหมู่เมธิลที่เบสไซโทซีนตัวนอกทั้ง 2 สาย หรือ เติมหมู่เมธิลที่เบสไซโทซีนทั้ง 2 ตัว ทั้ง 2 สาย ดังนั้นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างเพศที่พบนั้นจึงไม่ได้เกิดจากความแตกต่างในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่เกิดจากรูปแบบการเติมหมู่เมธิล

อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บ่งชี้ความแตกต่างของการเติมหมู่เมธิลในปรังเพียงบางส่วนเท่านั้นที่มีความคล้ายกับยีน เพื่อทดสอบแนวคิดดังกล่าวจำเป็นต้องมีการตรวจสอบ ค้นหาบริเวณของจีโนม หรือยีนที่เป็น candidate ของ sex determining factor ในปรัง

เพิ่มเติม ทั้งนี้บริเวณที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศ และกลไกการพัฒนาของส่วนสืบพันธุ์ในปรองยัง
เป็นเรื่องที่ต้องมีการศึกษาต่อไป



สรุปและข้อเสนอแนะ

1. เก็บตัวอย่างปรงสกุล *Cycas* ที่พบแหล่งกำเนิดในประเทศไทยจากสวนนงนุช จังหวัดชลบุรี 10 ชนิด กับ 1 ชนิดย่อย ได้แก่ *Cycas chamaoensis*, *C. clivicola* subsp. *clivicola*, *C. edentata*, *C. elephantipes*, *C. clivicola* subsp. *lutea*, *C. nongnoochiae*, *C. pectinata*, *C. praburiensis*, *C. siamensis*, *C. simplicipinna* และ *C. tansachana* โดยเก็บตัวอย่างทั้งปรงเพศผู้และเพศเมียชนิดละ 3 ต้น รวม 6 ตัวอย่าง ต่อปรง 1 ชนิด รวมตัวอย่างทั้งหมด 66 ตัวอย่าง การสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการประยุกต์จาก Molecular Laboratory Protocol ได้ผลค่อนข้างดี แต่ยังมีปัญหาในการสกัดดีเอ็นเอจากปรงบางชนิด ในการศึกษาต่อไปอาจจำเป็นต้องปรับปรุงวิธีการสกัดดีเอ็นเอเพื่อให้ได้ผลที่ดียิ่งขึ้น

2. การทดสอบไพโรมอร์ MSAP จำนวน 64 คู่ กับดีเอ็นเอของปรง *C. chamaoensis* เพศผู้และเพศเมีย พบว่าไพโรมอร์จำนวน 40 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างเพศ ได้คัดเลือกไพโรมอร์จำนวน 11 คู่ นำมาวิเคราะห์กับปรงทั้ง 66 ตัวอย่าง ได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 720 แถบจากแต่ละชุดของการตัด นำแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการเติมหมู่เมธิล พบว่าปรงที่นำมาศึกษามีเปอร์เซ็นต์ของการเติมหมู่เมธิลอยู่ระหว่าง 36.95-57.44 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลให้กับเบสไซโทซีนคำนวณจากรูปแบบการเติมหมู่เมธิลรูปแบบที่ 1, 2 และ 3 เฉลี่ย 22.28 เปอร์เซ็นต์

3. เมื่อจัดกลุ่มปรงที่ศึกษาโดยใช้ข้อมูลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับการจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเนื่องจากการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอ พบว่าโดยภาพรวมการจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลทั้งสองชุดให้ผลการจัดกลุ่มที่คล้ายคลึงกัน อย่างไรก็ตามการจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลความแตกต่างของการเติมหมู่เมธิลให้กับดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI-MspI* และ *EcoRI-HpaII* ให้รูปแบบของการจัดกลุ่มที่แตกต่างในปรงบางชนิด บ่งชี้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอมีความจำเพาะในปรงแต่ละชนิด รูปแบบและปริมาณของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอ น่าจะมีผลต่อกระบวนการวิวัฒนาการของปรงเช่นเดียวกับลำดับของนิวคลีโอไทด์

4. การศึกษาผลของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศของปรงโดยคำนวณเปอร์เซ็นต์ของการเติมหมู่เมธิลจากลายพิมพ์ MSAP พบว่าไม่มีความแตกต่าง

ทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอปรองในทั้งสองเพศ แต่เมื่อวิเคราะห์ความเหมือนของรูปแบบของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอพบว่า ในปรองที่ศึกษาทั้งเพศผู้และเพศเมียมีรูปแบบเหมือนกันประมาณ 55.3 ถึง 72.8 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ารูปแบบของการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเออีกประมาณ 30 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์มีความแตกต่างในปรองทั้งสองเพศ

5. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างระหว่างเพศของปรองที่ได้จากการใช้เทคนิค MSAP ผลการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนใหญ่ที่ศึกษาไม่คล้ายกับยีนในฐานข้อมูล NCBI แต่บางลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความคล้ายกับยีนเช่น ยีนเกี่ยวข้องกับ potassium channel และ ยีน SLFL1-Sf บริเวณ S locus ของ F-box protein ซึ่งมีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในพืช ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนมีความคล้ายคลึงกับยีนซึ่งยังไม่ทราบความเกี่ยวข้องกับเพศ ซึ่งยังต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป อย่างไรก็ตามผลการทดลองในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของรูปแบบการเติมหมู่เมธิลให้ดีเอ็นเอในปรองทั้งสองเพศ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ฐิติ กาญจนเกตุ. 2549. การตรวจหาเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้บ่งชี้ลักษณะเพศของ *Cycas* และ *Zamia* บางชนิดโดยใช้เทคนิค RAPD และ MSAP กับการประยุกต์ใช้ Bulked segregant analysis. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ณัฐฐาพิชชามณษ์ อุคมโกชน. 2551. ความสัมพันธ์ของปรองสกุล *Cycas* โดยใช้ดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์เปรียบเทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการกระจายพันธุ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พูนศักดิ์ วัชรกร. 2548. ปาล์มและปรองในป่าไทย. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพมหานคร. 271 หน้า
- เมธานี เตาะสกุล. 2546. การศึกษาเปรียบเทียบทางพันธุศาสตร์ของเซลล์ระหว่างเพศผู้และเพศเมียของ *Cycas* และ *Zamia*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สัจ อิ่มแดง. 2547. การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้บ่งชี้ลักษณะเพศและความหลากหลายทางชีวภาพของปรองสกุล *Cycas* และ *Zamia* โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Abraham, A. and P.M. Mathew. 1962. Cytological studies in the Cycads: Sex chromosome in *Cycas*. **Ann. Bot.** 26: 261-167.
- Aina, R., S. Sgorbati, A. Santagostino, A. Santagostino, M. Labra, A. Ghiani and S. Citterio. 2004. Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp. **Physiol. Plant.** 121: 472-480.

- Alstrom-Rapaport, C., M. Lascoux, Y.C. Wang, G. Roberts and G.A. Tuskan. 1998. Identification of RAPD marker linked to sex determination in the basket willow (*Salix viminalis* L.) **J. Hered.** 89: 44-49.
- Benbouza, H., J.M. Jacquemin, J.P. Baudoin and G. Mergeai. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** 10: 77-81.
- Baurens, F.C., F. Bonnot, D. Bienvenu, S. Causse and T. Legavre. 2003. Using SD-AFLP and MSAP to assess CCGG methylation in the banana genome. **Plant Mol. Biol. Rep.** 21: 339-348.
- Byers, R.E., L.R. Baker, H. M. sell, R.C. Herner and D.K. Dilley. 1972. Ethylene: a natural regulator of sex expression in cucumber. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 69: 717-720.
- Cao, X. and S.E. Jacobsen. 2002. Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99: 16491-16498.
- Charlesworth, D., B. Charlesworth and G. Marais. 2005. Step in the evolution of heteromorphic sex chromosome. **Heredity** 95: 118-128.
- Donaldson, J.S. 2003. **Cycads: Status survey and Conservation Action Plan**. IUCN/SSC Cycad Specialist Group, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge.
- Ewing, J.W. and R.M. Klein. 1982. Sex expression in Jack- in the pulpit. **Bull. Torrey Bot. Club** 109: 47-50.

- Finnegan, E.J., R.K. Genger, K. Kovac, W.J. Peacock and E.S. Dennis. 1998a. DNA Methylation and the promotion of flowering by vernalization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 95: 5824-5829.
- _____, R.K.Genger, W.J. Peacock and E.S. Dennis. 1998b. DNA methylation in plants. **Annu. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol.** 49: 223-47.
- _____, W.J. Peacock and E.S. Dennis. 2000. DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 10: 217-223.
- Gangopadhyay, G., S.K. Roy, K. Ghose , R. Poddar, T. Bandyopadhyay, D. Basu and K.K. Mukherjee. 2007. Sex detection of *Carica papaya* and *Cycas circinalis* in pre-flowering stage by ISSR and RAPD. **Curr. Sci.** 92: 524–526.
- Gehring, M. and S. Henikoff . 2007. DNA methylation dynamics in plant genomes. **Biochem. Biophys. Acta** 1769: 276 -286.
- Gibney, E.K. and C.M. Nolan. 2010. Epigenetics and gene expression. **Heredity** 105: 4-13.
- Gorelick, R. 2003. Evolution of dioecy and sex chromosome via methylation driving Muller's ratchet. **Biol. J. Linn. Soc.** 80: 353-368.
- Grant, S.R. 1999. Genetics of gender dimorphism in higher plants. pp. 247–274. *In* ., eds M.A. Geber, T.E. Dawson and L.F. Delph, **Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants**. Springer-Verlag, Berlin.
- Grunbaum, Y., T. Naveh-Many, H. Cedar and A. Razin. 1981. Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. **Nature** 292: 860-862.

- Gunter, L.E., G.T. Roberts, K. Lee, F.W. Larimer and G.A. Tuskan. 2003. The development of two flanking SCAR marker linked to sex determination locus in *Salix viminalis* L. **J. Hered.** 94: 185-189.
- Hill, K.D. 1999. *Cycas clivicola*. Aviable Source: Plantnet. rbg syl. new. gov. au/ cgi-bin/cycad pg? taxname=cycas+clivicola, May 10, 2011.
- Hoekenga, O.A., M.G. Muszynski and K.C. Cone. 2000. Developmental patterns of chromatin structure and DNA methylation responsible for epigenetic expression of maize regulatory gene. **Genetics** 115: 1889-1902.
- Horvath, E., G. Szalia, T. Janda, E. Paldi, I. Racz and D. Lasztity. 2002. Effect of vernalisation and azacytidine on the DNA methylation level in wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Mv 15). **Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology** 46: 35-36.
- Hosseini, F.S., H.S. Hosseini, M.J. Arvin, A. Baghizadeh and G. Mohammadi-Nejad. 2011. Sex determination of jojoba (*Simmondsia chinensis* cv. Arizona) by random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular markers. **Afr. J. Biotechnol.** 10: 470-474.
- Iqbal, K., S.G. Jin, G. P. Pfeifer and P. E. Szabo. 2011. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 108: 3642–3647.
- Jaenisch, R. and A. Bird. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat. Genet.** 33: 245-254.
- 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 New Holland, Sydney. 312p.
- Kalisz, S. and M.D. Puruggannan. 2004. Epialleles via DNA methylation: consequences for plant evolution. **Trens Eco. Evol.** 19: 301-314.
- Kanchanaketu, T., V. Hongtrakul and N. Sangduen. 2007. Analysis of sex determination in some Cycads using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). **Kasetsart J.** 41: 641-650.
- Kondo, H., T. Miura, K.C. Wada and K. Takeno. 2007. Induction of flowering by 5-azacytidine in some plant species: relationship between the stability of photoperiodically induced flowering and flower-inducing effect of DNA methylation. **Physiol. Plant.** 131: 462-469.
- Kunachowicz, A., P. Luchniak, M. Olszewska and T. Sakowicz. 2001. Comparative karyology, DNA methylation and restriction pattern analysis of male and female plants of the dioecious alga *Chara tomentosa* (Charophyceae). **Eur. J. Phycol.** 36: 29-34
- Lamprecht, S.A. and M. Lipkin. 2003. Chemoprevention of colon cancer by calcium, vitamin D and folate: molecular mechanisms. **Nat. Rev. Cancer** 3: 601-614.
- Lee, Y.W., L. Broday and M.E. Costa. 1998. Effects of nicked on DNA methyltransferase activity and genomic DNA methylation levels. **Mutat. Res.** 415: 213-218.
- Lindstrom, A. J. and K. D. Hill. 2002. New species and a new record of *Cycas* (Cycadaceae) from Thailand. **Brittonia** 54: 298-304.

- Lynch, M. 1990. The similarity index in DNA fingerprinting. **Mol. Biol. Evol.** 7: 478–484.
- Ma, H., P. H. Moore, Z. Liu, M. S. Kim, Q. Yu, M. M. M. Fitch, T. Sekioka, A. H. Paterson and R. Ming. 2004. High-density linkage mapping revealed suppression of recombination at the sex determination locus in papaya. **Genetics** 166: 419–436
- Manoj, P., N.S. Banerjee and P. Ravichdran. 2008. Development of sex specific molecular markers in dioecious *Piper longum*. L plants by differential display. **J. Theo. App. Information Technology** 4: 459-465.
- Matsunaga, S. 2009. Junk DNA promote sex chromosome evolution. **Heredity** 102: 525-526.
- Matsumoto, D., H. Yamane and R. Tao. 2008. Characterization of SLFL1, a pollen-expressed F-box gene located in the *Prunus* S locus. **Sex Plant Reprod.** 21: 113–121.
- Medeiros, J. and D. Stevenson. 1998. **Coralloid roots and nitrogen fixation**. Available Source: <http://plantnet.rbgsyd.nsw.gov.au/PlantNet/cycad/nitrogen/nfixintro.html>, May 10, 2010
- Mekanawakul, M. 2003. **Species Diversity and Molecular Systematic of *Cycas* in Thailand**. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.
- Ming, R., A. Bendahmane and S.S. Renner. 2011. Sex chromosomes in land plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** 62: 485–514.
- Mohan, K.N. and H.S. Chandra. 2005. Isolation and analysis of sequences showing sex-specific cytosine methylation in the mealy bug *Planococcus lilacin*. **Mol. Genet. Genomics** 274: 557–568.
- Moneger, F. 2007. Sex determination in plants. **Plant Signal Behav.** 2: 178-179.

- Moretti, A. 1990. Karyotype data on north and central American Zamiaceae (Cycadales) and their phylogenetic implications. **Am. J. Bot.** 77: 1016-1029.
- _____, P. Caputo, L. Gaudio and D.W. Stevenson. 1991. Intraspecific chromosome variation in *Zamia* (Zamiaceae, Cycadales). **Caryologia** 44: 1-10.
- Mouline K., A.Very, F. Gaymard, J. Boucherez, G. Pilot, M. Devic, D. Bouchez, J. Thibaud and H. Sentenac. 2002. Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a shaker K⁺ channel in *Arabidopsis*. **Genes Dev.** 16: 339-350
- Nimmakayala, P., G. Vajja, R.A. Gist, Y.R. Tomason, A. Levi and U.K. Reddy. 2011. Effect of DNA methylation on molecular diversity of watermelon heirlooms and stability of methylation specific polymorphisms across the genealogies. **Euphytica** 177: 79-89.
- Norstog, K. 1980. Chromosome numbers in *Zamia*. **Caryologia** 33:419-428.
- _____, 1981. Karyotypes of *Zamia chigua* (Cycadales). **Caryologia** 34: 255-260.
- _____, K.J. and T.J. Nicholls. 1997. **The Biology of the Cycads**. Cornell University Press, New York. 363p.
- Osborne, R. 1994. Further reports of cycad sex changes. **Encephalartos** 49: 20-21.
- _____, and R. Gorelick. 2002. Sex change in cycads. **Palms & Cycads** 76:10-15.
- _____, _____. 2007. Sex changes in cycads- cases, caused and chemistry. **Mem. NY Bot. Garden** 97: 335-345.

- Peng, H. and J. Zhang. 2009. Plant genomic DNA methylation in response to stress: potential applications and challenges in plant breeding. **Prog. Nat. Sci.** 19: 1037-1045.
- Peraza-Echeverria, S., V.A. Herrera-Valencia and A. James-Kay. 2001. Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). **Plant Sci.** 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 Sci.** 166: 169-178.
- Renner, S.S. and R.E. Ricklefs. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plant. **Am. J. Bot.** 596-606.
- Samantaray, S., K.A. Geetha, K.P. Hidayath and S. Maiti. 2010. Identification of RAPD markers linked to sex determination in guggal [*Commiphora wightii* (Arnott.) Bhandari]. **Plant Biotechnol. Rep.** 4: 95-99.
- 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. pp. 131-139. In D.W. Stevenson and K.J. Nostog, eds. **Proceedings of the Second International Conference on Cycad Biology**, Palm & Cycad Societies of Australia, Milton, Queensland.
- Sangduen, N., M. Toahsakul and V. Hongtrakul. 2007. Karyomorphological study of some selected cycads. **AU J.T.** 11: 1- 6.
- Sangin, P. 2010. **Phylogenetic Analysis of Cycad and Sex Identification in *Cycas* using Molecular Markers**. Ph.D. Thesis, Kasetsart University.

- 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. Genet. Genomics** 273: 484-490.
- Shetty, B.V. and K. Subramanyan. 1962. Cytology of *Cycas*. **Proceedings of the Indian Science Congress 3** (abstract): 259.
- Siroky, J., M. R. Castiglione and B. Vyskot. 1998. DNA methylation patterns of *Melandrium album* chromosomes. **Chromosome Res.** 6: 441-446.
- Steward, N., M. Ito, Y. Yamaguchi, N. Koizudmi and H. Sano. 2002. Periodic DNA methylation in maize nucleosomes and demethylation by environmental stress. **J. Biol. Chem.** 277: 377-416.
- Stevenson, D. 1992. A formal classification of the extant cycads. **Brittonia** 44: 220-223.
- Takeda, S. and J. Paszkowski. 2006. DNA methylation and epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Chromosoma* 115: 27-35.
- Tang, W., S. Yang, and P.Vacharakorn. 1998. **Cycads of Thailand. Nong Nooch tropical Garden.** 35 pp.
- The International Potato Center (CIP). 1999. **Molecular Biology Laboratory Protocols.**
Available Source: <http://www.cipotato.org/training/Materials/Molecular/Molecular.htm>,
April, 2004.
- Viejo, M., R. Rodrí'guez, L. Valledor, M. Pe'rez, M. J. Can~al and R. Hasbu'n. 2010. DNA methylation during sexual embryogenesis and implications on the induction of somatic embryogenesis in *Castanea sativa* Miller. **Sex Plant Reprod.** 23: 315-323.

- 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. **Nucl. Acids. Res.** 23: 4407-4414.
- Vovides, A.P. and M. Olivares. 1996. Karyotype polymorphism in the cycad *Zamia loddigesii* (Zamiaceae) of the Yucatan Peninsula, Mexico. **Bot. J. Linn. Soc.** 120: 77-83.
- Wang, W.S., Y. Pan, X. Zhao, D. Dwivedi, L. Zhu, J. Ali, B. Fu and Z. Li. 2011. Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **J. Exp. Bot.** 62: 1951-1960.
- Wojdacz, T.K. and L.L. Hansen. 2006. Techniques used in studies of age-related DNA methylation changes. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1067: 479-487.
- Wu J.Y., H.Y. Qu, Z.L. Shang, S.T. Tao, G.H. Xu, J. Wu, H.Q. Wu and S.L. Zhang. 2011. Reciprocal regulation of Ca²⁺-activated outward K⁺ channels of *Pyrus pyrifolia* pollen by heme and carbon monoxide. **New Phytol.** 189: 1060-1068.
- Xiao, W., K. D. Custard, R. C. Brown, B. E. Lemmon, J. J. Harada, R. B. Goldberg and R. L. Fischera. 2006. DNA Methylation Is Critical for Arabidopsis Embryogenesis and Seed Viability. **The Plant Cell** 18: 805-814.
- 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.

- Xue-Lin, L., L. Zhong-Xu, N. Yi-Chun, G. Xiao-Ping and Z. Xian-Long. 2009. Methylation-sensitive amplification polymorphism of epigenetic changes in cotton under salt stress. **Acta Agron. Sin.** 35: 588-596.
- Zemach, A. and D. Zilberman. 2010. Evolution of eukaryotic DNA Methylation and the pursuit of safer sex. **Curr. Biol.** 20: 780 -785
- Zhang, P., K. Pwee, T.W. Tan and P.P. Kumar. 2002. Cloning and characterization of Fortune-1, a novel gene with enhanced expression in male reproductive organs of *Cycas edentata*. **Mech. Develop.** 114: 149 -152.
- Zhang, W., X. Wang, G. Yu, R. Ming and J. Jiang. 2008. DNA methylation and heterochromatinization in the male specific region of the primitive Y chromosome of papaya. **Genome Res.** 18: 1938 -1943.
- Zhao, Y., S. Yu, C. Xing, S. Fan and M. Song. 2008. Analysis of DNA methylation in cotton hybrids and their parents. **J. Biol. Mol.** 42: 169 -178.
- Zhifeng, G. and B. A. Thomas. 1989. A review of fossil cycad megasporophylls with new evidence of *Crossozamia* Pomel and its associated leaves from the lower Permian of Taiyuan, China. **Rev. Palaeobot. Palyno.** 60: 205-223.



ตารางผนวกที่ 1 ลักษณะทั่วไป และแหล่งการกระจายตัวของปรังทั้ง 12 ชนิดที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทย

ลำดับ ที่	ชนิดปรัง	แหล่งการ กระจายตัวใน ประเทศไทย	สภาพแวดล้อม / ถิ่นที่อยู่	ลำต้น	ใบ	โคนเพศผู้	โคนเพศเมีย	เมล็ด
1	<i>C. chamaoensis</i> K.D. Hill (ปรังเขา ชะเมา)	เขาชะเมา	ป่าแล้ง ที่มีแสง มาก พบตาม หน้าผาที่ลาด ชัน หรือบน หินแกรนิต	ลำต้นเหนือดิน ตั้งตรง หรือ โค้งห้อยลง สูง ได้ถึง 10 m บาง ต้นก็แตกกิ่ง	ใบประกอบขน นก ยาว 1.2- 2.5 m ขอบใบ โค้ง	รูปไข่แคบ หรือรูปลูกข้าง สีส้ม ยาว 35-51 cm กว้าง 12-15 cm	รูปร่างกลม เป็น ใบสร้าง เมกะสปอร์ ยาว 13-18 cm	รูปไข่แบน กว้าง 30-40 mm ยาว 35-40 mm
2	<i>C. clivicola</i> subsp. <i>clivicola</i> K.D. Hill (ปรังเขาใต้)	ภาคใต้	ป่าดิบเขา พบ ตามหน้าผาบน ภูเขาหินปูน ตามชายฝั่งและ หมู่เกาะต่างๆ	ลำต้นเหนือดิน สีเทา ตั้งตรง หรือ โค้งห้อย สูงได้ถึง 8 m	ใบประกอบขน นก ยาว 0.7- 1.9 m ขอบใบ เรียบ-โค้ง	รูปไข่แคบ สี เหลือง น้ำตาล ยาว 25-63 cm กว้าง 8-15 cm	รูปร่างกลม เป็น ใบสร้าง เมกะสปอร์ ยาว 12-22 cm มีขนสีเหลือง	รูปไข่แบน กว้าง 23-35 mm ยาว 35-45 mm

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ชนิดปรง	แหล่งการ กระจายตัวใน ประเทศไทย	สภาพแวดล้อม / ถิ่นที่อยู่	ลำต้น	ใบ	โคนเพศผู้	โคนเพศเมีย	เมล็ด
3	<i>C. clivicola</i> subsp. <i>lutea</i> K.D. Hill (ปรงเขา ตะวันออก)	ภาคตะวันออก เชียงใหม่	ป่าเขตร้อนชื้น พบตามหน้าผา บนภูเขาหินปูน	ลำต้นเหนือดิน สีเหลือง ตั้งตรง หรือ โค้งห้อย สูงได้ถึง 6 m	ใบประกอบขน นก ยาว 0.9- 1.6 m ขอบใบ เรียบ	รูปไข่แคบ สีเหลือง น้ำตาล ยาว 20 cm กว้าง 8 cm	คล้ายกับปรง เขาใต้	รูปไข่แบน กว้าง 33 mm ยาว 30 mm
	<i>C. elephantipes</i> A. Lind str. & K.D. Hill (ปรงชัยภูมิ, ปรงไอ้ ตีนโต)	จังหวัดชัยภูมิ ภาคตะวันออก เชียงใหม่	ป่าโปร่ง ที่ราบ บนเขา ป่าแล้ง ป่าผลัดใบ	ลำต้นเหนือดิน ตั้งตรง สูง 1-3 m	ใบประกอบ แบบขนนก ขนาด 0.3 x 1.5-2 m	รูปไข่ สีน้ำตาล กว้าง 20 cm ยาว 30 cm	รูปร่างกลม เป็น ใบสร้าง เมกะสปอร์ สี น้ำตาล เทา	กลมแบน ขนาด 3.5 cm
4	<i>C. edentata</i> (ปรงทะเล)	ภาคใต้ และภาค ตะวันออก	พบตามป่า ชายหาด ตามโขดหินริม ภูเขา ทั้งสอง ชายฝั่งของไทย	ลำต้นเหนือดิน ตั้งตรง สูง 5- 10 m บางครั้ง พบต้นที่แตกกิ่ง หรือแตกหน่อ	ใบประกอบ แบบขนนก ยาว 1-2.5 m ขอบใบโค้ง	รูปไข่ สีเหลือง กว้าง 9-17 cm ยาว 16-59 cm	รูปกรวยแคบ ใบสร้างเมกะ สปอร์ปกคลุม ด้วยขนสีขาว เหลือง ยาว 18-32 cm	รูปไข่ กว้าง 30-43 mm ยาว 45-55 mm

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ชนิดปรง	แหล่งการ กระจายตัวใน ประเทศไทย	สภาพแวดล้อม / ถิ่นที่อยู่	ลำต้น	ใบ	โคนเพศผู้	โคนเพศเมีย	เมล็ด
5	<i>C. macrocarpa</i> subsp. <i>Macrocarpa</i> Griffith (ปรงป่า, ผักกูดสะ ยี่)	ภาคใต้	ป่าดิบชื้น	ลำต้นเหนือดิน ตั้งตรง สูง 12 m เป็นต้นเดี่ยวไม่ แตกหน่อ	ใบประกอบ แบบขนนก ยาว 2.5-3.2 m ขอบใบหยัก	รูปไข่ สีส้ม กว้าง 9-12 cm ยาว 16-22 cm	รูปกรวย ใบสร้าง ไมโครสปอร์ กว้าง 1.4-2 cm	รูปรี กว้าง 35-42 mm ยาว 45-53 mm
	<i>C. macrocarpa</i> subsp. <i>Brevidens</i> K.D. Hill	ภาคตะวันตก เฉียงใต้ ติดต่อกับ ชายแดน ประเทศพม่า	ป่าดิบชื้น	ลำต้นเหนือดิน ตั้งตรง สูงได้ถึง 6 m เป็นต้น เดี่ยวไม่แตก หน่อ	ใบประกอบ แบบขนนก ขอบใบหยัก	ยาว 5-6 cm กว้าง 2.5 cm	ยังไม่มีข้อมูล	ยาว 45 mm กว้าง 30 mm

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ชนิดปรง	แหล่งการ กระจายตัวใน ประเทศไทย	สภาพแวดล้อม / ถิ่นที่อยู่	ลำต้น	ใบ	โคนเพศผู้	โคนเพศเมีย	เมล็ด
6	<i>C. nongnoochiae</i> K.D. Hill (ปรงตากฟ้า)	ภาคกลาง บริเวณจังหวัด นครสวรรค์	ป่าแล้ง ป่าผลัด ใบขึ้นบนภูเขา หินปูน	ลำต้นเหนือดิน ตั้งตรง สูง 1-2 m	ใบประกอบ แบบขนนก ขนาด 0.8x1.4 m ขอบใบเรียบ- โค้ง	รูปไข่แคบ สีเหลืองอ่อน หรือเขียว ยาว 15-23 cm กว้าง 7-10 cm	รูปกลมแป้น ใบสร้างเมกะ สปอร์ปกคลุม ด้วยขนสีขาว เหลือง ยาว 16-19 cm	รูปไข่แบน ยาว 35 mm กว้าง 28-35 mm
7	<i>C. pectinata</i> Buch.-Ham. (ปรงเขา)	ภาคตะวันตก และภาคเหนือ	ป่าดิบเขา และ ป่าไผ่	ลำต้นเหนือดิน ตั้งตรง สูง 10 m มักแตกกิ่งแบบ dichotomous	ใบประกอบขน นก ขนาด 1.5x2.4 m ขอบใบเรียบ	รูปไข่ สี เหลืองหรือ เขียว ขนาด 30-69x 16-28 cm	รูปร่างกลม แบนกว้าง ใบ สร้างเมกะ สปอร์ ยาว 21-30 cm	ทรงกลมถึงรูป ไข่ ขนาด 33-45 x 42-45 mm

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ชนิดปรง	แหล่งการ กระจายตัวใน ประเทศไทย	สภาพแวดล้อม / ถิ่นที่อยู่	ลำต้น	ใบ	โคนเพศผู้	โคนเพศเมีย	เมล็ด
8	<i>C. pranburiensis</i> S.L. Yang, K.D. Hill, W. Tang & P. Vacharakorn (ปรงเขาสามร้อย ยอด)	พบรอบๆ เขา สามร้อยยอด จังหวัด ประจวบ คีรีขันธ์	พบบนภูเขา หินปูนและหน้า ผา ทั้งที่รกทึบ และที่มีแสง มาก	ลำต้นเหนือดิน สูงได้ถึง 3 m	ใบประกอบ แบบขนนก ขนาด 1.5 x 2.4 m ขอบใบโค้ง	รูปไข่ สีส้ม ขนาด 5-10 x 9-28 cm	รูปกรวยแคบ ใบสร้างเมกะ สปอร์ ยาว 21- 30 cm ปก คลุมด้วยขนสี เทา	รูปไข่ ขนาด 21-32 x 25-40 mm
9	<i>C. petrea</i> H.D. Hill (ปรงเขาภูกระดึง)	ภาคตะวันออก เชิงเหนือ	ภูเขาหินปูน	ลำต้นเหนือดิน สูงได้ถึง 10 m	ใบประกอบ แบบขนนก ขนาด 0.25 x 1.70 m	คล้ายกับ ปรงเขา	คล้ายกับ ปรงเขา	กลมแบนขนาด ใหญ่ เส้นผ่าน ศูนย์กลาง 3 cm
10	<i>C. siamensis</i> Miquel (ปรงแก้วสีเงิน)	ภาคกลาง และ ภาคเหนือ ตอนล่าง	ป่าแล้ง ป่าผลัด ใบ	ลำต้นเหนือดิน สูง 1.5 m และ มีลำต้นใต้ดินที่ ขยายออก	ใบประกอบ แบบขนนก ยาว 0.6-1.2 m ขอบ ใบโค้ง ใบมีขน	รูปไข่แคบ สีเหลือง ขนาด 4-8.5 x 8-24 cm	ทรงดอก บัวตูม มีขน ปุยปกคลุม	ขนาด 22-30 x 27-29 mm

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ลำดับ ที่	ชนิดปรัง	แหล่งการ กระจายตัวใน ประเทศไทย	สภาพแวดล้อม / ถิ่นที่อยู่	ลำต้น	ใบ	โคนเพศผู้	โคนเพศเมีย	เมล็ด
11	<i>C. simplicipinna</i> (Smitinand) K.D. Hill (มะพร้าวเต่า)	ภาคเหนือ	ป่าดิบเขา และ ป่าไผ่	ไม่มีลำต้น เหนือดิน มีลำต้นใต้ดิน เป็นกระเปาะ กว้างถึง 10 m	ใบประกอบขน นก ยาว 0.9- 2.5 m ขอบใบ หยัก	รูปกระสวย สี่เหลี่ยม ขนาด 2.2-4 x 15-20 cm	ทรงกลม ใบ สร้างเมกะ สปอร์ ยาว 7-12 cm	รูปไข่ ขนาด 18-21 x 25-27 mm
12	<i>C. tansachana</i> K.D. Hill & S.L. Yang (ปรังสระบุรี)	พบที่จังหวัด สระบุรี	ป่าแล้ง ขึ้นบน ภูเขาหินปูน ตามหน้าผาที่มี ความชันมาก	ลำต้นยาว 2-5 m ลำต้นทอด นอน	ยาว 1-1.7 m ขอบใบโค้ง	รูปไข่แคบ ขนาด 11-13 x 25-34 cm	ทรงกลมแบน ใบสร้างเมกะ สปอร์ ยาว 20-22 cm	รูปไข่แบน ขนาด 35-40 x 45-50 mm

ที่มา พูนศักดิ์ (2548); Tang *et al.* (1997)

ตารางผนวกที่ 2 สภาวะการณ์การกลับเพศของปรง

ชนิดปรง	การกลับเพศ	สภาวะการณ์/ลักษณะการกลับเพศ	แหล่งข้อมูลอ้างอิง
<i>Ceratozamia matudae</i>	เพศผู้เปลี่ยนเป็นเพศเมีย (M to F)	เคลื่อนย้ายจากโรงเรือน ไปปลูกในสวน	Osborne & Gorelick, 2002
<i>Cycas cercinalis</i> [<i>C. rumphii</i> ?]	เพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ (F to M)	แตกหน่อจากต้นเพศเมีย	Chamberlain, 1935
<i>Cycas cercinalis</i> [<i>C. rumphii</i> ?]	เพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ (F to M)	เกิดบาดแผล	Menninger, 1967
<i>Cycas cercinalis</i> [<i>C. rumphii</i> ?]	เพศผู้เปลี่ยนเป็นเพศเมีย (M to F)	เผชิญกับสภาพอากาศหนาวอย่างรุนแรง	Menninger, 1967
<i>Cycas revoluta</i>	ไม่ทราบแน่ชัด	เกิดบาดแผล	Schuter, 1932
<i>Cycas revoluta</i>	เพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ (F to M)	ไม่ทราบแน่ชัด	Chamberian, 1935
<i>Cycas revoluta</i>	เพศผู้เปลี่ยนเป็นเพศเมีย (M to F)	เคลื่อนย้ายที่ปลูก	Kemp, 1985
<i>Cycas revoluta</i>	เพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ (F to M)	ไม่ทราบแน่ชัด	Osborne, 1994

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ชนิดปรง	การกลับเพศ	สภาวะการณ์/ลักษณะการกลับเพศ	แหล่งข้อมูลอ้างอิง
<i>Cycas revoluta</i>	เพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ (F to M)	เกิดขึ้นบนกิ่งแขนงของต้นเพศเมีย	Tomiyama, 1995
<i>Cycas taitungensis</i> (3 ต้น)	เพศผู้เปลี่ยนเป็นเพศเมีย (M to F)	ย้ายที่ปลูกไปยังที่ๆ มีแสงน้อย	Osborne, 1998
<i>Cycas thouarsii</i>	เพศผู้เปลี่ยนเป็นเพศเมีย (M to F)	เกิดบาดแผล	Osborne & Gorelick, 2002
<i>Encepharatos latifrons</i>	เพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ (F to M)	อยู่ในสภาวะแห้งแล้งอย่างรุนแรง	Osborne, 1988
<i>Encephalartos middelbergensis</i>	เพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ (F to M)	ไม่ทราบแน่ชัด	Osborne, 1991
<i>Encephalartos senticosus</i>	เพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ (F to M)	Suckers from female	S. J. Walkley, pers. Comm.
<i>Encephalartos senticosus</i> (2 ต้น)	เพศผู้เปลี่ยนเป็นเพศเมีย (M to F)	Suckers from male	Osborne, 1990
<i>Encephalartos senticosus</i>	เพศผู้เปลี่ยนเป็นเพศเมีย (M to F)	เคลื่อนย้ายที่ปลูก	Steenkamp, 1995
<i>Encephalartos umleluziensis</i>	เพศผู้เปลี่ยนเป็นเพศเมีย (M to F)	เผชิญกับสภาพอากาศหนาวอย่างรุนแรง	Osborne & Gorelick, 2002

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ชนิดปรง	การกลับเพศ	สภาวะการณ้/ลักษณะการกลับเพศ	แหล่งข้อมูลอ้างอิง
<i>Encephalartos villosus</i>	เพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ (F to M)	อยู่ในสภาวะแห้งแล้งอย่างรุนแรง	Van Wyk & Claassen, 1981
<i>Encephalartos villosus</i>	เพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ (F to M)	เคลื่อนย้ายที่ปลูก	Osborne, 1990
<i>Stangeria eriopus</i>	เพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ (F to M)	แตกกิ่งจากต้นเพศเมีย	Osborne, 1990
<i>Zamia fairchildiana</i>	เพศผู้เปลี่ยนเป็นเพศเมีย (M to F)	เปลี่ยนกระถาง และเพิ่มการให้น้ำ	D. Retzlaff, pers. comm.
<i>Zamia fischeri</i>	เพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ (F to M)	เปลี่ยนกระถางและ สภาพแวดล้อม	Anonymous, 1989
<i>Zamia vasquezii</i> (4ต้น)	เพศผู้เปลี่ยนเป็นเพศเมีย (M to F)	ย้ายที่ปลูกไปยังที่ร่ม	Osborne & Gorelick, 2002
<i>Zamia sp.</i>	เพศเมียเปลี่ยนเป็นเพศผู้ (F to M)	Side crown	Norstog & Nicholls, 1997
<i>Zamia fairchildiana</i>	เพศผู้เปลี่ยนเป็นเพศเมีย (M to F)	เปลี่ยนกระถาง และเพิ่มการให้น้ำ	D. W. Stevenson, pers. comm

ตารางผนวกที่ 2 (ต่อ)

ชนิดปรง	การกลับเพศ	สภาวะการณ์/ลักษณะการกลับเพศ	แหล่งข้อมูลอ้างอิง
<i>Zamia vasquezii</i> (4 ต้น)	เพศผู้เปลี่ยนเป็นเพศเมีย (M to F)	ย้ายที่ปลูกไปยังที่ๆ มีแสงน้อย	Osborne, 1994
<i>Zamia sp.</i>	เพศผู้เปลี่ยนเป็นเพศเมีย (M to F)	Side crown	Osborne, 1985

ที่มา: Osborne and Gorelick (2002)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ	นางสาวช่อลัดดา แซ่เอ็ง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	7 พฤษภาคม 2528
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. ชีววิทยา (พฤกษศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2550)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์	Sae-Eung, C., T. Kanchanaketu, N. Sangduen and V. Hongtrakul. 2012. DNA methylation and genetic diversity analysis of genus <i>Cycas</i> in Thailand. Afr. J. Biotechnol. 11: 743-751
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ เพื่อการตีพิมพ์ผลงานลงใน วารสารวิชาการระดับนานาชาติ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2552