



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นเพศผู้
และเพศเมียในปรง

โดยจตุพร กุลอึ้ง

มีนาคม 2560

สัญญาเลขที่ MRG5480233

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นเพศ

จตุพร กุลอึ้ง

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และ

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย

สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG5480233

ชื่อโครงการ: การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้นเพศ

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน: จตุพร กุลอึ้ง
ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อีเมลล์: fscictp@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ: 1 กรกฎาคม 2554-30 มิถุนายน 2556

บทคัดย่อ:

ปรังเป็นพืชที่มีต้นแยกเพศการจำแนกเพศของต้นคู่ได้จาก cone ที่เป็นอวัยวะสืบพันธุ์เท่านั้น ซึ่งต้องใช้เวลานานหลายปีกว่าที่ต้นจะสามารถสร้างโคนได้ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจะช่วยให้สามารถจำแนกเพศได้ตลอดเวลาแม้ก่อนที่ต้นจะเริ่มสร้าง cone ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างต้นเพศผู้และต้นเพศเมียในปรังสกุล *Cycas* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถตรวจสอบได้ครั้งละหลายตำแหน่ง และเพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะต่อเพศในปรังสี่สปีชีส์ (*C. chamaoensis*, *C. siamensis*, *C. clivicola* และ *C. edentata*) ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเพศผู้และเพศเมียทำโดยเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกลุ่มต้นตัวผู้และกลุ่มต้นตัวเมียของปรังแต่ละสปีชีส์ โดยใช้เทคนิค AFLP จำนวน 64 คู่ไพรเมอร์ พบว่า มี 3 คู่ไพรเมอร์ที่ไม่ให้แถบดีเอ็นเอ คือ T-CAC/E-AAC T-CAC/E-AAG และ T-CAC/E-ACA อีก 61 คู่ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 6 ถึง 58 แถบ เฉลี่ยประมาณ 30 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ ปรังทั้ง 4 สปีชีส์ให้แถบดีเอ็นเอในจำนวนใกล้เคียงกัน คือ 1893, 1850, 1882 และ 1864 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และกลุ่มต้นเพศเมีย 67, 67, 55 และ 113 แถบ หรือคิดเป็นร้อยละ 3.54, 3.62, 2.92 และ 6.06 ใน *C. chamaoensis*, *C. clivicola*, *C. edentata* และ *C. siamensis* ตามลำดับ เมื่อตัดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และเพศเมีย จำนวน 141 แถบจากทั้งหมด 302 แถบ นำไปโคลนและหาลำดับเบส ได้ลำดับเบสที่มีขนาดยาวกว่า 100 คู่เบส และไม่ซ้ำกัน จำนวน 57 สาย ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะจำนวน 54 คู่ นำไพรเมอร์ไปทดสอบกับดีเอ็นเอของต้นเพศผู้และเพศเมีย พบว่า มี 35 คู่ ที่สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอได้และให้แถบเพียงหนึ่งแถบ แต่ทั้ง 35 คู่ให้แถบในทั้งสองเพศ จึงไม่มีคู่ไพรเมอร์ใดในงานวิจัยนี้ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายสำหรับจำแนกเพศในปรังได้

คำหลัก : ปรัง, *Cycas*, การจำแนกเพศ, เครื่องหมายดีเอ็นเอ, AFLP

บทคัดย่อ

Project Code : MRG5480233

Project Title : Genetic difference of male and female cycads

Investigator : Chatuporn Kuleung
Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University

E-mail Address : fscictp@ku.ac.th

Project Period : 1 July 2011 - 30 June 2013

Abstract:

Cycads are dioecious that male and female plants can be identified only by their reproductive organs or cones. However, it takes several years for plants to grow before a cone is produced. To identify sex of cycads at early age, DNA markers are an efficient mean that facilitates the identification. Therefore, the objective of this research is to scan genomes of four *Cycas* species (*C. chamaoensis*, *C. siamensis*, *C. clivicola* and *C. edentata*) for a polymorphic region between male and female plants using multi-locus markers and later develop it into a specific marker. DNA fingerprints of male and female bulks of each species were compared using 64 combinations of AFLP primers. There are three primer pairs that do not yield any DNA bands. Sixty-one primer pairs gave 6 to 58 DNA bands with average of 30 bands per primer pair. 1893, 1850, 1882 and 1864 total bands and 3.5, 3.62, 2.92 and 6.06 % polymorphic bands were obtained from *C. chamaoensis*, *C. siamensis*, *C. clivicola* and *C. edentata*, respectively. Out of total 302 polymorphic bands, 141 bands were cloned and sequenced. Fifty seven non-redundant and >100 bp-long sequences were obtained and designed 54 specific primer pairs. The primers were then tested on male and female pooled and individual DNA. Thirty five primer pairs yielded a single amplified products for both sexes. Therefore, none of the primer pairs designed in this research can be used as a specific marker for sex identification in *Cycas* species.

Keywords : cycad, *Cycas*, sex identification, DNA marker, AFLP

ที่มาและความสำคัญของปัญหา-ทบทวนวรรณกรรม

ปรงเป็นพืชที่ถือว่าเป็นพืชโบราณและมีวิวัฒนาการยืนยาวมาจนถึงปัจจุบัน ปรงมีความสำคัญในด้านการศึกษาวิวัฒนาการของพืช และเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ใช้เป็นไม้ประดับ บางชนิดมีราคาสูงมาก และเมล็ดโคนสามารถนำมารับประทานได้

ปรงเป็นพืชที่มีอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียอยู่แยกต้นกัน (dioecious plant) ในปรงต้องใช้ระยะเวลายาวนาน เนื่องจากต้นเพศผู้และต้นเพศเมียมีลักษณะโดยทั่วไปเหมือนกัน ดังนั้นการแยกเพศของปรงต้องสังเกตจากอวัยวะสืบพันธุ์ที่เรียกว่าโคน (cone) เท่านั้น

การพัฒนาเป็นเพศผู้หรือเพศเมียของสิ่งมีชีวิตนั้น นอกเหนือจากการกำหนดโดยพันธุกรรมแล้วยังอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น ระดับฮอร์โมน สภาพแวดล้อม เป็นต้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมเหล่านี้อาจทำให้เปลี่ยนเพศได้ ในสัตว์ส่วนใหญ่ เพศกำหนดโดยโครโมโซมเพศมี 1 คู่ ในเพศเมียโครโมโซมเพศทั้งสองมีลักษณะเหมือนกัน แต่ในเพศผู้โครโมโซมเพศจะมีรูปร่างที่แตกต่างกัน (heteromorphic) ในขณะที่พืชส่วนใหญ่ โครโมโซมเพศในทั้งสองเพศจะไม่แตกต่างกัน (homomorphic) จากการศึกษาของ Sangduen และคณะ (2009) พบว่าแคโรไทป์ของต้นเพศผู้และเพศเมียของปรงบางชนิดในสกุล *Cycas* และ *Zamia* มีโครโมโซมบางแท่งที่มี satellite แตกต่างกัน เช่น *C. siamensis* Miq. พบ satellite บนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 1 4 5 และ 6 ในต้นเพศผู้ และบนแขนข้างยาวของโครโมโซมคู่ที่ 3 ในต้นเพศเมีย ซึ่งอาจนำมาใช้ในการจำแนกเพศของปรงได้ แต่การตรวจดูโครโมโซมต้องทำในระยะที่เซลล์กำลังมีการแบ่งตัว ซึ่งเทคนิคค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อน การนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้จะช่วยให้การจำแนกเพศทำได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น และทำได้ตั้งแต่ระยะต้นอ่อน ทำให้ประหยัดเวลา พื้นที่ และงบประมาณในการดูแลและจัดการได้มาก

ลักษณะทางเพศที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างกันที่ลำดับของเบสของดีเอ็นเอ หรือการมีระดับหมู่เมธิลในดีเอ็นเอที่ต่างกัน ทำให้ยีนที่มีลำดับเบสแบบเดียวกันแสดงออกแตกต่างกันไปได้ (epigenetic) การนำเทคนิคทางโมเลกุลจะช่วยให้การจำแนกเพศทำได้ง่ายขึ้น และทำได้ตั้งแต่ระยะแรกๆ ของการเจริญเติบโตของปรง ทำให้ไม่ต้องเสียเวลา พื้นที่ และงบประมาณในการปลูกไปก่อนเพื่อรอดูโคน

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อลักษณะที่สนใจสามารถพัฒนาได้โดยออกแบบไพรเมอร์จากลำดับเบสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมลักษณะนั้น ซึ่งจำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสก่อน ซึ่งเป็นข้อจำกัดสำหรับสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่มีข้อมูลลำดับเบสในฐานข้อมูลมากนัก เช่น ปรง อย่างไรก็ตาม การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะสามารถทำได้อีกทางหนึ่งโดยการพัฒนาจากเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสแบบสุ่ม ซึ่งสามารถตรวจสอบจีโนมได้ทีละหลายตำแหน่งพร้อมกัน (multilocus-marker) แถบดีเอ็นเอที่

แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่มีลักษณะต่างกัน (polymorphism) นั้นสามารถนำไปหาลำดับเบส และออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลักษณะที่ศึกษานั้นได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างต้นเพศผู้และต้นเพศเมียในปรงสกุล *Cycas* โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ
2. เพื่อพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะต่อเพศในปรง

วิธีทดลอง

1. เก็บตัวอย่างใบจากต้นเพศผู้และต้นเพศเมียของปรง จำนวน 4 สปีชีส์ (*Cycas chamaoensis*, *C. clivicola*, *C. edentata* และ *C. siamensis*) จาก Nong Nooch Tropical Botanical Garden อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยเก็บตัวอย่างใบจากต้นเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 3-5 ต้นต่อสปีชีส์ เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างเพศผู้และเพศเมียของปรงในแต่ละสปีชีส์ ยกเว้น *C. edentata* เพศผู้เก็บได้เพียง 2 ตัวอย่าง เนื่องจากมีจำนวนต้นอยู่น้อยและต้นที่ทราบเพศมีจำนวนจำกัด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างปรงแยกตามเพศ และสปีชีส์

สปีชีส์	เพศผู้ (ต้น)	เพศเมีย (ต้น)
<i>C. chamaoensis</i>	3	5
<i>C. edentata</i>	2	3
<i>C. siamensis</i>	3	3
<i>C. clivicola</i>	5	5

2. สกัดดีเอ็นเอจากใบของแต่ละตัวอย่างด้วยชุดสกัดและ Invisorb® Spin Plant Mini Kit (Invitex GmbH, Germany) ตามวิธีการของผู้ผลิต วัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง nanodrop และปรับความเข้มข้นของทุกตัวอย่างเป็น 50 ng/ul เตรียม pool DNA solution โดยนำ 50 ng/ul ดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างที่มีเพศเดียวกันมารวมกันในปริมาตรที่เท่ากัน เพื่อใช้เป็นสารละลายดีเอ็นเอเริ่มต้นในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (pool DNA)

3. สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ตามวิธีการของ Vos et al. (1995) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ EcoRI และ TruI และเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) จำนวน 2 ครั้ง โดย pre-selective amplification ใช้ไพรเมอร์ (E-A/T-C) และ selective amplification ใช้ไพรเมอร์จำนวน 64 คู่ไพรเมอร์ จาก 16 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ลำดับเบสของ adapter และ ไพรมเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอน pre-selective amplification และ selective amplification

Primer	sequence
<i>Eco</i> RI adapter-1	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
<i>Eco</i> RI adapter-2	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
<i>Tru</i> 1I adapter-1	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
<i>Tru</i> 1I adapter-2	5'-TACTCAGGACTCAT-3'
E-A	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
T-C	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
E-AAC	5'-GACTGCGTACCAATTCAAC-3'
E-ACC	5'-GACTGCGTACCAATTCACC-3'
E-AAG	5'-GACTGCGTACCAATTCAAG-3'
E-ACA	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'
E-AGC	5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3'
E-AGA	5'-GACTGCGTACCAATTCAGA-3'
E-AGT	5'-GACTGCGTACCAATTCAGT-3'
E-AGG	5'-GACTGCGTACCAATTCAGG-3'
T-CAA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
T-CAC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3'
T-CAG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3'
T-CAT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'
T-CGA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACGA-3'
T-CGC	5'-GATGAGTCCTGAGTAACGC-3'
T-CGG	5'-GATGAGTCCTGAGTAACGG-3'
T-CGT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACGT-3'

4. แยกขนาดดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 6 % denaturing polyacrylamide gel ด้วยกำลังไฟฟ้าคงที่ 70W เป็นเวลาประมาณ 3 ชม. แล้วย้อมเจลด้วยเทคนิค silver staining ตามวิธีการของ (Benbouza *et al.*, 2006)

5. ตรวจสอบแถบชั้นดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างต้นเพศผู้และต้นเพศเมีย

6. ตัดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างและสกัดชั้นดีเอ็นเอออกมาโดยนำไปบ่มใน TE buffer 60 μ l ที่ 65 °C เป็นเวลา 2 ชม. คัดสารละลายไปทำ PCR โดยใช้ไพรมเมอร์และวิธีการเช่นเดียวกับ pre-selective amplification เพื่อเพิ่มปริมาณชั้นดีเอ็นเอและตรวจสอบขนาดใน 1.5 % agarose gel เชื่อมต่อ PCR product กับพลาสมิดโดยใช้ pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, USA) และถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ competent *E. coli* ตามวิธีการของผู้ผลิต

7. คัดเลือกโคลนที่มีสีขาวและสามารถเพิ่มปริมาณชั้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตามที่คาดหวังได้ใน pool DNA ของสปีชีส์ที่พบแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างเพศด้วยคูไพรมเมอร์ที่พบแถบ

ดีเอ็นเอนั้น สกัดพลาสมิดจากโคลนด้วย FavorPrep™ Plasmid Extraction Mini Kit (Favorgen Biotech Corporation, Taiwan) และส่งหาลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอ (Macrogen, Korea)

8. ตรวจสอบคุณภาพของลำดับเบส โดยเลือกสายที่สามารถอ่านเบสได้ชัดเจน มีความยาวไม่น้อยกว่า 100 คู่เบส และไม่ซ้ำกัน นำลำดับเบสส่วนที่อยู่ระหว่างคู่ไพรเมอร์ของ AFLP มาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะโดยใช้โปรแกรม primer3 (v. 0.4.0) (Untergasser *et al.*, 2012 และ Koressaar and Remm, 2007) และสังเคราะห์ไพรเมอร์จากลำดับเบสที่ได้ (Macrogen, Korea)

9. ทดสอบความจำเพาะต่อเพศของไพรเมอร์กับตัวอย่างจากต้นเพศผู้และเพศเมียในแต่ละต้น

10. เปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับเบส (sequence identity) ด้วยโปรแกรม MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) ของ EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/> 23 ก.พ. 2560) โดยใช้ default algorithm parameter และเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับเบสที่มีรายงานก่อนหน้านี้ด้วย nucleotide blast (blastn) ของ NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) โดยใช้ database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences) และใช้ default algorithm parameter

ผลการทดลอง

ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และเพศเมีย

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของปรัง 4 สปีชีส์ (*C. chamaoensis*, *C. siamensis*, *C. clivicola* และ *C. edentata*) ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้เอนไซม์ *EcoRI* และ *Tru1I* แล้วเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จำนวน 64 คู่ไพรเมอร์ พบว่า มี 3 คู่ไพรเมอร์ที่ไม่ให้แถบดีเอ็นเอ คือ T-CAC/E-AAC T-CAC/E-AAG และ T-CAC/E-ACA อีก 61 คู่ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 6 ถึง 58 แถบ เฉลี่ยประมาณ 30 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ ปรังทั้ง 4 สปีชีส์ให้แถบดีเอ็นเอในจำนวนใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วง 1850 ถึง 1893 แถบ และมีรูปแบบของแถบส่วนใหญ่เหมือนกัน โดย *C. chamaoensis*, *C. siamensis* และ *C. clivicola* จะมีรูปแบบที่คล้ายกันมากกว่า *C. edentata* มีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และเพศเมีย รวม 302 แถบ เฉลี่ย 5 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ โดยสปีชีส์ที่มีความแตกต่างระหว่างเพศมากที่สุดคือ *C. edentata* (ร้อยละ 6) ในขณะที่ *C. chamaoensis*, *C. siamensis* และ *C. clivicola* มีความแตกต่างระหว่างเพศใกล้เคียงกันคือประมาณร้อยละ 3 (ตารางที่ 3)

ใน *C. chamaoensis* ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 1893 แถบ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 31.55 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ T-CAC/E-AGT (7 แถบ) และมากที่สุดคือ T-CAA/E-ACC (58 แถบ) แถบที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และเพศเมียมีจำนวน 67 แถบ คิดเป็นร้อยละ 3.54 ของแถบทั้งหมด ในจำนวนนี้เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะในเพศผู้และเฉพาะในเพศเมีย 17 และ 50 แถบ ตามลำดับ โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และเพศเมียมากที่สุด (4 แถบ) คือ T-CGA/E-AGT, T-CGC/E-AAC, T-CGC/E-ACC, T-CGC/E-AGG, T-CGG/E-AGG และ T-CGT/E-ACA (ตารางที่ 3)

ใน *C. siamensis* ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 1850 แถบ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 30.83 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ T-CAC/E-AGT (7 แถบ) และมากที่สุดคือ T-CGC/E-AAG (58 แถบ) แถบที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และเพศเมียมีจำนวน 67 แถบ คิดเป็นร้อยละ 3.62 ของแถบทั้งหมด ในจำนวนนี้เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะในเพศผู้และเฉพาะในเพศเมีย 33 และ 34 แถบ ตามลำดับ โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และเพศเมียมากที่สุด (4 แถบ) คือ T-CGC/E-AAC, T-CGC/E-AAG, T-CGC/E-AGT และ T-CGT/E-AGG (ตารางที่ 3)

ใน *C. clivicola* ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 1882 แถบ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 31.37 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ T-CAC/E-AGT T (6 แถบ) และมากที่สุดคือ T-CAA/E-ACC และ T-CGC/E-AAG (55 แถบ) แถบที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และเพศเมียมีจำนวน 55 แถบ คิดเป็นร้อยละ 2.92 ของแถบทั้งหมด ในจำนวนนี้เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะในเพศผู้และเฉพาะในเพศเมีย 22 และ 33 แถบ ตามลำดับ โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และเพศเมียมากที่สุด(10 แถบ) คือ T-CGC/E-AGG (ตารางที่ 3)

ใน *C. edentata* ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 1864 แถบ คิดเป็นค่าเฉลี่ย 31.07 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอน้อยที่สุดคือ T-CAA/E-AGT (7 แถบ) และมากที่สุดคือ T-CGC/E-AAG (55 แถบ) แถบที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และเพศเมีย จำนวน 113 แถบ คิดเป็นร้อยละ 6.06 ของแถบทั้งหมด ในจำนวนนี้เป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะในเพศผู้และเฉพาะในเพศเมีย 33 และ 80 แถบ ตามลำดับ โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และเพศเมียมากที่สุด (8 แถบ) คือ T-CAC/E-AGT (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏและจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างต้นเพศผู้และเพศเมีย

คูไพรเมอร์	<i>C. chamaoensis</i>		<i>C. siamensis</i>		<i>C. clivicola</i>		<i>C. edentata</i>	
	จำนวนแถบที่ปรากฏ	จำนวนแถบที่แตกต่าง	จำนวนแถบที่ปรากฏ	จำนวนแถบที่แตกต่าง	จำนวนแถบที่ปรากฏ	จำนวนแถบที่แตกต่าง	จำนวนแถบที่ปรากฏ	จำนวนแถบที่แตกต่าง
T-CAA / E-AAC	34	0	33	0	35	0	28	0
T-CAA / E-ACC	55	2	50	1	55	2	54	1
T-CAA / E-AAG	36	0	35	0	36	0	37	0
T-CAA / E-ACA	39	0	38	0	36	0	41	0
T-CAA / E-AGC	41	1	40	1	40	3	35	7
T-CAA / E-AGA	45	2	42	0	40	0	38	1
T-CAA / E-AGT	12	0	12	0	12	0	6	0
T-CAA / E-AGT	37	2	37	0	37	1	41	1
T-CAC / E-AAC	0	0	0	0	0	0	0	0
T-CAC / E-ACC	51	1	47	3	48	1	52	1
T-CAC / E-AAG	0	0	0	0	0	0	0	0
T-CAC / E-ACA	0	0	0	0	0	0	0	0
T-CAC / E-AGC	39	1	38	1	38	2	32	8
T-CAC / E-AGA	31	0	34	0	32	0	36	1
T-CAC / E-AGT	6	0	7	0	6	0	7	0
T-CAC / E-AGT	32	0	35	0	31	0	46	3
T-CAG / E-AAC	38	1	34	1	33	0	43	1
T-CAG / E-ACC	31	1	31	3	29	0	30	2
T-CAG / E-AAG	26	2	24	1	23	0	10	0
T-CAG / E-ACA	36	0	35	0	35	0	39	2
T-CAG / E-AGC	31	3	31	0	31	1	33	4
T-CAG / E-AGA	33	0	29	3	26	0	32	1
T-CAG / E-AGT	45	1	45	2	43	1	45	3
T-CAG / E-AGT	41	0	39	1	36	1	37	0
T-CAT / E-AAC	12	0	13	0	12	0	10	0
T-CAT / E-ACC	24	0	24	0	23	0	25	0
T-CAT / E-AAG	15	0	15	0	15	0	17	0
T-CAT / E-ACA	12	0	12	0	12	0	13	0
T-CAT / E-AGC	27	0	24	0	25	0	33	0
T-CAT / E-AGA	32	0	32	0	32	0	30	1
T-CAT / E-AGT	15	0	15	0	15	0	20	0
T-CAT / E-AGT	21	0	21	0	20	0	20	0
T-CGA / E-AAC	26	1	23	0	28	0	36	0
T-CGA / E-ACC	39	1	37	0	37	0	39	0
T-CGA / E-AAG	28	0	25	0	26	0	32	4
T-CGA / E-ACA	31	0	25	0	28	0	21	0
T-CGA / E-AGC	19	1	20	2	25	0	25	4
T-CGA / E-AGA	22	1	20	2	19	1	22	0

คูไพรเมอร์	<i>C. chamaensis</i>		<i>C. siamensis</i>		<i>C. clivicola</i>		<i>C. edentata</i>	
	จำนวนแถบ	จำนวนแถบ	จำนวนแถบ	จำนวนแถบ	จำนวนแถบ	จำนวนแถบ	จำนวนแถบ	จำนวนแถบ
	ที่ปรากฏ	ที่แตกต่าง	ที่ปรากฏ	ที่แตกต่าง	ที่ปรากฏ	ที่แตกต่าง	ที่ปรากฏ	ที่แตกต่าง
T-CGA / E-AGT	28	4	20	0	26	1	20	1
T-CGA / E-AGT	20	3	16	0	16	1	14	0
T-CGC / E-AAC	45	4	45	4	44	0	41	2
T-CGC / E-ACC	34	4	32	3	39	2	32	2
T-CGC / E-AAG	51	1	58	4	55	2	55	6
T-CGC / E-ACA	42	3	38	3	41	1	41	5
T-CGC / E-AGC	24	2	27	1	29	2	29	3
T-CGC / E-AGA	36	1	30	0	31	1	29	3
T-CGC / E-AGT	31	3	35	4	31	1	27	5
T-CGC / E-AGT	32	4	34	3	35	10	26	5
T-CGG / E-AAC	36	1	35	2	39	5	37	0
T-CGG / E-ACC	27	0	28	2	29	0	33	3
T-CGG / E-AAG	21	1	23	2	20	1	21	0
T-CGG / E-ACA	31	2	29	0	31	1	24	2
T-CGG / E-AGC	18	0	15	1	15	0	23	1
T-CGG / E-AGA	36	2	35	1	41	1	28	0
T-CGG / E-AGT	11	0	10	0	10	1	9	1
T-CGG / E-AGT	24	4	25	1	28	2	24	3
T-CGT / E-AAC	24	0	25	1	27	1	30	1
T-CGT / E-ACC	43	2	42	0	44	0	34	2
T-CGT / E-AAG	36	0	37	2	37	1	33	0
T-CGT / E-ACA	41	4	43	3	48	3	42	2
T-CGT / E-AGC	38	0	39	2	39	0	38	7
T-CGT / E-AGA	34	0	38	0	36	0	36	4
T-CGT / E-AGT	39	1	41	3	40	2	41	4
T-CGT / E-AGT	29	0	28	4	32	3	32	6
รวม	1893	67	1850	67	1882	55	1864	113

การพัฒนาเครื่องหมายที่จำเพาะต่อเพศ

เมื่อตัดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และเพศเมียบางส่วนนำไปโคลน (141 แถบ) ได้โคลนที่มีชั้นดีเอ็นเอที่คาดหวังแทรกอยู่ จำนวน 263 โคลน จาก 91 แถบ นำไปหาลำดับเบสพบว่า มีแถบดีเอ็นเอหลายแถบที่มีลำดับเบสเหมือนกัน ซึ่งมักจะเป็นแถบมีตำแหน่งติดกัน (doublet) เช่น คูไพรเมอร์ T-CAA/E-AGC แถบ A และ B ของ *C. edentata* หรือเป็นแถบที่มีตำแหน่งเดียวกันของปรongsสปีชีส์ เช่น คูไพรเมอร์ T-CAG/E-ACC ของ *C. siamensis* และ *C. edentate* มีลำดับเบสเหมือนกัน เป็นต้น (ภาพที่ 1 ก และ ข) เมื่อคัดเฉพาะสายดีเอ็นเอที่สามารถอ่านเบสได้ชัดเจน มีขนาดยาวกว่า 100 คู่เบส และไม่ซ้ำกัน ได้สายดีเอ็นเอจำนวน 57 สาย จากแถบดีเอ็นเอ 46 แถบ จำนวนนี้มี 11 แถบที่ดีเอ็นเอแถบเดียวกันมีลำดับเบส 2 รูปแบบ เช่น T-CAG/E-AAG 034_1 และ T-CAG/E-AAG 034_2,

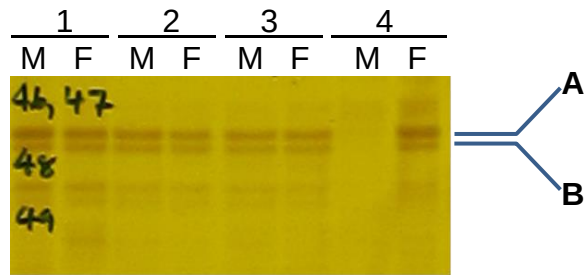
T-CAG/E-ACC 029_1 และ T-CAG/E-ACC 029_2, T-CAG/E-ACA 036_1 และ T-CAG/E-ACA 036_2 เป็นต้น (ภาคผนวก) การเปรียบเทียบดีเอ็นเอทั้ง 57 สาย โดยการทำ sequence alignment พบว่า ส่วนใหญ่มีความเหมือนของลำดับเบส (sequence identity) อยู่ในช่วงร้อยละ 13-60 ยกเว้น 2 คู่ คือ T-CGC/E-AGC 114_1 และ T-CGT/E-AGC 202_1 มีลำดับเบสเหมือนกันร้อยละ 98 และ T-CAG/E-AAG 034_2 และ T-CGA/E-AAG 056_1 มีลำดับเบสเหมือนกันร้อยละ 82 เมื่อนำลำดับเบสทั้ง 57 สาย ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI ไม่พบความคล้ายคลึงกับลำดับเบสใดเลย

จากลำดับเบสที่ได้นำมาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะจำนวน 54 คู่ (16, 11, 8 และ 19 คู่ใน *C. chamaoensis*, *C. siamensis*, *C. clivicola* และ *C. edentata* ตามลำดับ) เมื่อทดสอบไพรเมอร์กับ ดีเอ็นเอของกลุ่มต้นเพศผู้และกลุ่มต้นเพศเมียในสปีชีส์ที่ตัดแถบดีเอ็นเอมา พบว่า มี 35 คู่ ที่สามารถเพิ่ม ปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้และให้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว อย่างไรก็ตาม เมื่อนำคู่ไพรเมอร์เหล่านี้ไปทดสอบ ต่อกับดีเอ็นเอของแต่ละต้น ทุกคู่ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอในทั้งสองกลุ่ม (ตารางที่ 4)

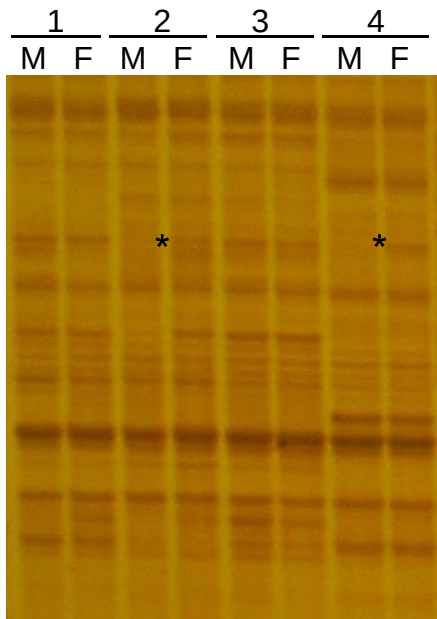
ตารางที่ 4 จำนวนแถบดีเอ็นเอที่นำไปโคลน จำนวนโคลนที่ส่งหาลำดับเบส ลำดับเบสที่มีคุณภาพดีและความยาวกว่า 100 คู่เบส จำนวนไพรเมอร์ที่ออกแบบ และนำมาทดสอบความแตกต่าง ระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และเพศเมีย

	<i>C. chamaoensis</i>		<i>C. siamensis</i>		<i>C. clivicola</i>		<i>C. edentata</i>		รวม
	ผู้	เมีย	ผู้	เมีย	ผู้	เมีย	ผู้	เมีย	
จำนวนแถบดีเอ็นเอที่โคลน (แถบ)	6	26	18	9	11	9	23	39	141
จำนวนโคลนที่ส่งหาลำดับเบส (โคลน)	10	49	33	18	17	14	30	92	263
จำนวนแถบที่ได้โคลน (แถบ)	3	18	14	7	6	5	12	26	91
ลำดับเบสที่ได้ทั้งหมด (สาย)	5	31	19	12	9	7	20	45	148
ลำดับเบสที่มีขนาดยาวกว่า 100 bp (สาย)	1	16	6	6	5	3	6	14	57
จำนวนคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบ	1	15	5	6	5	3	6	13	54
จำนวนคู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณได้	1	9	4	3	4	2	4	8	35

ก)



๑๒)



ภาพที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกลุ่มต้นเพศผู้ (M) และกลุ่มต้นเพศเมีย (F) ของปรอง 4 สปีชีส์ โดยใช้เทคนิค AFLP ใน 6 % denaturing polyacrylamide gel และย้อมด้วย silver nitrate
(1) *C. chamaoensis*, (2) *C. siamensis*, (3) *C. clivicola* และ (4) *C. edentata*

- ก) คู่ไพรเมอร์ T-CAAE-AGC แถบ A และ B ของ *C. edentata* มีลำดับเบสเหมือนกัน
- ข) คู่ไพรเมอร์ T-CAG/E-ACC * เป็นแถบของ *C. siamensis* และ *C. edentata* ที่มีตำแหน่งตรงกันและลำดับเบสเหมือนกัน

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP พบว่าปรังทั้ง 4 สปีชีส์มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกัน แสดงถึงความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมระหว่างปรังเหล่านี้ ยืนยันด้วยลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันของต่างสปีชีส์ที่มีลำดับเหมือนกัน ต้นเพศผู้และเพศเมียก็มีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมอย่างมาก ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างเพศ (polymorphic band) อยู่เพียงประมาณร้อยละ 3-6 ของแถบทั้งหมด โดยสปีชีส์ที่กลุ่มต้นเพศผู้และกลุ่มต้นเพศเมียมีความแตกต่างกันมากที่สุดคือ *C. edentata* ทั้งนี้ ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และกลุ่มต้นเพศเมียที่ตรวจสอบได้อาจน้อยกว่าความเป็นจริง จากการที่พบว่าแถบดีเอ็นเอบางแถบมีลำดับเบสได้มากกว่าหนึ่งรูปแบบ เนื่องด้วยข้อจำกัดของเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ใช้ตรวจสอบซึ่งจะแยกดีเอ็นเอตามขนาด ดังนั้น ดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันแม้ว่าจะมีองค์ประกอบของเบสต่างกันจึงสามารถเคลื่อนที่ผ่านเจลได้เร็วเท่ากัน

AFLP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบจีโนมได้พร้อมกันหลายๆ ตำแหน่งในคราวเดียว และให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และเพศเมียเป็นจำนวนมาก เช่นเดียวกับที่ได้มีรายงานการพัฒนาเครื่องหมายที่จำเพาะต่อเพศในหลายสปีชีส์ เช่น *Asparagus officinalis* (Spada et al., 1998) and *Rumex acetosa* (Rahman and Ainsworth, 2004) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ไพโรเมอร์ที่ได้ออกแบบจากลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอ AFLP ในการศึกษาครั้งนี้ กลับปรากฏว่าไม่มีคู่ไพโรเมอร์ใดเลยที่สามารถจำแนกต้นเพศผู้และเพศเมียออกจากกันได้ ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าโพลิมอร์ฟิซึมของแถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ AFLP เกิดจาก variation ในจีโนมที่ไม่เกี่ยวข้องกับเพศ หรืออาจเกิดจากลำดับเบสที่นำมาออกแบบไพโรเมอร์เป็นส่วนที่อยู่ภายในซันดีเอ็นเอเข้ามาจากตำแหน่งจดจำและ selective base ซึ่งเพศผู้และเพศเมียอาจมีเหมือนกันได้ ดังนั้น ไพโรเมอร์จึงสามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบและเพิ่มปริมาณได้ในทั้งสองเพศ หากภายในสายไม่ได้เกิด insertion/deletion แม้ว่าภายในสายดีเอ็นเอจะมีลำดับเบสอื่นแตกต่างกัน ซันดีเอ็นเอที่ได้ก็จะมีขนาดไม่แตกต่างกัน คู่ไพโรเมอร์นี้จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศได้

ในปรังตระกูล *Cycas* มีรายงานการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อระบุเพศใน *Cycas circinalis* โดย Gangopadhyay et al. (2007) ซึ่งได้ใช้เครื่องหมาย RAPD จำนวน 10 primer เปรียบเทียบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มต้นเพศผู้และเพศเมีย พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเพศผู้ 1 ตำแหน่ง และจำเพาะกับเพศเมีย 1 ตำแหน่ง ในสปีชีส์อื่นๆ พบรายงานความแตกต่างของจำนวน satellite chromosome เปรียบเทียบระหว่าง karyotype ของต้นเพศผู้และเพศเมียใน *C. pectinata*, *C. clivicola* subsp. *Lutea*, *C. edentata*, *C. elephantipes*, *C. siamensis* และ *C. tansachana* นอกจาก satellite ที่อยู่ส่วนปลายแขนของบางโครโมโซมแล้ว โครโมโซมของเพศผู้และเพศเมียไม่มีลักษณะอื่นใดที่แตกต่างกัน (Abraham and Mathew, 1962; Sangduen et al., 2009) จึงเป็นไปได้ว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของเพศผู้และเพศเมียของปรังอาจเป็นเพียงดีเอ็นเอช่วงสั้นๆ เช่น single nucleotide polymorphism (SNP) หรืออาจถูกควบคุมโดย epigenetics (Kanchanaketu et al., 2007; Osborne and Gorelick, 2007)

การเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอทั้ง 57 สาย กับฐานข้อมูลของ NCBI ไม่พบว่าคล้ายกับยีนหรือลำดับเบสที่มีในฐานข้อมูลเลย แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอเหล่านี้อาจเป็นส่วนของจีโนมที่ไม่ใช่ยีน (non-coding region) Gangopadhyay *et al.* (2007) ได้เปรียบเทียบลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมาย RAPD ของ *Cycas circinalis* โดยใช้ BLASTX พบว่าแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเพศผู้มีความคล้ายคลึงกับ reverse transcriptase ของ *Ginkgo biloba* มากที่สุด (score 69.3 bits) ขณะที่แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเพศเมียไม่พบว่าคล้ายกับลำดับเบสใดเลยในฐานข้อมูล

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อช่วยจำแนกเพศในปรงได้สะดวกรวดเร็วขึ้นอยู่กับความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศระหว่างต้นเพศผู้และต้นเพศเมีย ซึ่งในปรงอาจเป็นเพียงส่วนเล็กๆ ของดีเอ็นเอที่เทคนิคที่ใช้การเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอไม่สามารถจำแนกได้ ในปัจจุบันเทคโนโลยีการหาลำดับเบสจำนวนมาก (high throughput sequencing) ได้พัฒนาอย่างมากและมีค่าใช้จ่ายที่ถูกลงอย่างมาก การหาลำดับเบสทั้งจีโนม (whole genome sequencing) หรือใช้ร่วมกับเทคนิคการหาระดับ methylation ของจีโนม แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างต้นเพศผู้และเพศเมีย อาจทำให้พบยีนหรือส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเพศในปรงได้

references

- 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 (2): 77–81.
- Gangopadhyay, G., S. K. Roy, K. Ghose, R. Poddar, T. Bandyopadhyay, D. Basu and K. K. Mukherjee. 2007. Sex determination of *Carica papaya* and *Cycas circinalis* in pre-flowering stage by ISSR and RAPD. *Current Science* 92(4): 524-526.
- Kanchanaketu, T., V. Hongtrakul and N. Sangduen. 2007. Analysis of Sex Determination in Some Cycads Using Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP) *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 41 : 641 – 650.
- Koressaar, T. and M. Remm. (2007) Enhancements and modifications of primer design program Primer3 *Bioinformatics.* 23(10): 1289-91.
- Osborne, R. and R. Gorelick. 2007. Chapter 21 Reproductive biology sex change in cycads-cases, causes, and chemistry. *Mem. New York Bot. Gard.* 97: 335-345.

- Rahman, M. A. and C. C. Ainsworth. 2004. AFLP Analysis of Genome Difference between male and female in dioecious plant *Rumex acetosa*. J. of Biological Sciences 4(2): 160-169.
- Sangduen, N., M. Toahsakul and Vipha Hongtrakul. 2009. Comparative karyomorphological study between male and female plants of some *Cycas* and *Zamia* Species. Kasetsart J. (Nat. Sci.) 43 : 476 – 485.
- Spada, A., E. Caporali, G. Marziani, P. Portaluppi, F. M. Restivo, F. Tassi and A. Falavigna. 1998. A genetic map of *Asparagus officinalis* based on integrated RFLP, RAPD and AFLP molecular markers. Theor Appl Genet 97 : 1083—1089.
- Untergasser, A, I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm, S. G. Rozen. (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research 40(15): e115.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman and M Kuiper. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23(21): 4407–4414.

ภาคผนวก

ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ AFLP จำนวน 57 สาย ลำดับเบสนี้ได้ตัดส่วนของ AFLP ไพร์เมอร์ออกไปแล้ว และบริเวณที่ขีดเส้นใต้คือไพร์เมอร์ที่ได้ออกแบบให้จำเพาะลำดับเบสนั้นๆ

>T-CAAE-ACC 017_3

CCTCATCTAGGTCTAGCCTAGTCTCCAAATACCAAAGGACAAGTTTCTCACCTCAGTCTGCCACTTGATACACCTTAC
AGCCAATGGTTTCTTCTAATATCTGCAGAATTCATCTCTTCATCCATAGCTGCTTTCTACGTTTGT

>T-CAAE-AGC 019_2

GCCAAGCACGGGAACCCGCAGGACGGAATACAGAACGCACGGGAGTCGAACCCGGACGGGCGAGGTCGGGGCGAAA
CGCGGAGCAGTTCACGTGACGGGGCGT

>T-CAAE-AGC 022_2

GCTAGACTGGGACATTATGCATAATAGAAGTCGACTAGACTATAGAAAGAAATGCTACAAGTCCCACCCCATGAAAAC
ATGATTTGCTCTCAAAGCATGGGTAAATTGAGGT

>T-CAAE-AGG 024_1

GGTATATCAATGGTTATGGTAAAGGGATAGTTCCATTAGCGTTCCTATCACCAGATGGAGGGAGATCTTTAGGATCA
AAAGAGATGACAAGTTTACGACTTAGGGTGATACCCAAGACATGGACATACGT

>T-CAC/E-AGC 011_5

GCTTGAAATATAAGAAAGGAGTTATCAACAAAATATCCATTGACAAGCTACTCGCAAGACTCCCCTAGGAGAGTAATG
CCTCTGACAAGATCTTGGGAAATTGTGTCCTAGAGAAGATAACAAAGGGCATCGATTGTTAGCACATATGGGGATGGT

>T-CAC/E-AGC 013_2

GCACCAGATTCGAAGCCAATTATCAAATACAGTCAACCATTCCAAGTAGGATGGGGGGTGTATATATACTGTAACCTCT
CTTTATTGGAATCAAGAGCTAATGGAAAACATTCTGCTGGT

>T-CAG/E-AAG 034_1

AGGTTTCATCCATATGGAGGAGCCTAGAGTCCATGAGAAAAATGATAACGATGGGAGGCCCAATGGAGCTTGGGAGAT
GGAAAAGATACGGACTTTTGGGAGGACACTTGACATGGGCATAGACAATTGAACAAATGACCTACTTTCGCCTCCTTG
CAACCTGCCT

>T-CAG/E-AAG 034_2

TCAACTACTTTTGATGTAGCCCATCCATTTGAGAGAGGAATGAAATCCCTCTTATCACTCAAATAAGGTTACGATGAAAT
GAATCGTGATTTTGTAAGATGATTACATGACCTCCTTCGCTCTACTAAGGCCACGCTGCCCAAGGAGCTAAAGAGATA
CCTTTTC

>T-CAG/E-AAG 035_1

AGAGGAAGCTGGACCGAGTGGAGAGAGTAATAATGAGGAGTTGTCACCTGAAGAAATACCTACAGCACCAAGTCCTAT
ACCAATATGGAGAGGGAAGATAATAGAGTTTCCAGAGTGGCGGTGCAAACTTTTCTGATGACAAAAGAACCGAGAAG
CCAACATGTTAGTCAGACTTTGCT

>T-CAG/E-ACA 036_1

CAAACTGCATCTACTTCGCTTATGGGCATGGCAAACATACAAGTTGTGAACCTGTAATCATTGATCTAGAGAGTCAT
GTCTTTGCAGTATCCTCCACACAGCATTGTTCTCCATTGCT

>T-CAG/E-ACA 036_2

CATCAACAATAAACAACAAGAACAACAACCTCAACAACAAGGCAACATCAACATCAACAACAATGCAAAGAACGACCA
CCTGGGCAATGTGGTCAAGTTTCGAATGTAGTAGAAAAGTCACCT

>T-CAG/E-ACC 029_1

CCATCATTAGGTGCTCCTAAGCAATGAGGTTCTACTACTAAAGGGACAACATTTCTAGCTATAAAGAATGGTTAGGA
GTGGTACCTATTAGGTAAGTACATGTATACATCCTCACCTCTTGCCCTATTCACTTTGATGGCT

>T-CAG/E-ACC 029_2

CCATCTCCAGGCTCTAGTGGTGTGTCAAATAGCTTCCTTGTGAAATAGATCTCCCAAGATGCCACAAGACCTTCATCT
ACCTTCTCTTTGTTTTAGTCATGCTCTTTGAGCTATCCTTTGAAGTAAGATTTCCCGAACCCT

>T-CAG/E-ACC 030_1

CCCATACTGGTAGTCCATCTACCAGAACCTCCTCTCTCATCGCCAGGGATAGAGCCGAATTGAAATCTCCCGCCAAC
AGCCAAAGTTGTTGGTAGTCCCTATGAACCTCCAGTATCCTATCCAGAGTTTCTTCCTGGCCT

>T-CAG/E-ACC 031_1

CCAAATAATGAAGAATAGATTACCAACATTTGATTGATCCAAGATTAGCCCAAATCATGTTGAACTCAAGATCAAAGT
CAATGATGGTGACTTTTACTATAATAGTCTTGCCT

>T-CAG/E-ACC 031_2

CCATTATACCTTACAAGAACATTTGGATCCCTGCTTTTCTGGGTTTATAACTTATCATGTTATAGGACCACACCCTT
TCAACGGAGACAGTTGATCAATGAAGTCGTATCCT

>T-CAG/E-ACC 032_1

CCCAATTTTGCAAGGATAATGGTATCAAACGATAGGTTTTTGCCCTTACACACCTTAGCAAAATGGAATTGTTGAGA
GAATGAATTGGATCTTGGTTAGTAAAGGCAAAGCCATGCTTGCT

>T-CAG/E-ACC 032_2

CCAAGGCCTAGGTTACAAATCTTCAAACCAAGCATGCCCGCCCTTCCATTTCTAATGTCTATTTATCACATGCCCTTT
GCCATTCTTGATGGCCTTTAGCATTTACTTATCTGCT

>T-CAG/E-AGA 045_2

GAAGGGAAAACGACCTATAGGAACTATAGCAAGGAACAAGATGGCAAAGATGAAAAGAAACTACATTCATTGTTGC
ACTTACAGTAAGCCTTGAAGACGAGGAGGTGTGGTACATTGATTCCAGAGCATCAAGACATATGATTAGGCAAGAGGA
TTGGTCCAAATCCATAAAACACTACACCTCCAACAAGTCTGTTGAACTAGGGGACAAGCATCCT

>T-CAG/E-AGA 047_1

GACTCGAAGGCCACAATTGTGGTGTGAGTTGGTTTGTTGGATGTCATCTGAAGGCGATTGGCAATCTGTAATAGTGAT
TGAAGCCAATAGAGCACGTTCTGATGGTGATTCGATGCT

>T-CAG/E-AGC 041_1

GCTTTGTAAATCTGCACTGTGCTGCTAAATTTCACTGCTGTTATGAACTCAACTTTGTAAATCTACACTGTGCTGCTAA
ATTTCACTGTTGTTATGAACTCAGCTTTGTAAATCTGAACTGTGTTGCTAAATTTCACTGCTGTTATGAACTCAGCCTG
GTAATTCTGCCT

>T-CAG/E-AGC 041_2

GCAGGAATGGCAGATGATACCAGAAGACGACAAGAGACGCCAGTTAGTCCGTCACATAGAGTTGCAGAAATTCGTGA
CAGTGGGAGTGTTTGAAATGCAGAAAAATTCATGCAAAGAATACTCCGCTACTAGCTAAGTACCCGCAAATGGTAC
AAATAACTGAAGACCT

>T-CAG/E-AGT 049_2

GTAGCAGATTGGTTGGCAAATGGGCAGTGTCAAATAAAAGAACAAAAGTTAGAAAGAAGAATACCTAGAGGAGTTA
TTGAGACTGGTCAGGGTTGATGCACATATGAGGGAGGTAGTCTGACAAGAACGAGGGATCTAACCTTGGGCTAGACC
ATGGGCTTGTCACGGTTATCCTTGCTAAGCGTTTGGCCTTGATGTACAAGGTTTGGGGACCCT

>T-CAG/E-AGT 050_1

GTGATAACTGGATATGCAAGTTTGAATAGATTGTCTCAACAGATGGAGACTGAAGAGTTTGTGCCAACACAACTAA
CTACTATAGACTGGCATGCCAAATGTGAGAGCATAGAGGGTGCGTGCAAAGTGCTTGACAATATGCT

>T-CGA/E-AAC 055_1

ACGGTTTCATTCTATAAACGGGCGCATTTCTATAAACGGGCGCAGTTTCAGAAATTTCCAGGACTGGACTCACGTCAC
GGGATGTGAGTATAATCAAAGCACTCCACCAAAAAACATCTGTCCCTAATAAATCTAATATGATTAGAGCATTAGCAG
CAGCAAAAGGGGCCAGTCTTTATCTGAGAATACCTCTGCCTCGATCTAAATTATCAATTTTGAACATC

>T-CGA/E-AAG 056_1

TCAACTACTTCGATGTAGCTTGTCATTGAAAACGAAATAAAATCTCTTCTATCACTCAAACAAGGTTATGATGAAAT
GAATCATGACTTTGTGTGATGATTCCATGACCTTCTTCACTCCACTAAGGCCACATTGCCCAAGGAGTTGAAGAGAAA
CCTTTTT

>T-CGA/E-AAG 056_2

AGGTGTTTATACCAATTTTGTAGTATGTAGATATGTATTAGGTTAGTTTATTTCTCATCTTTTTTTTAGTGTGTGCTT
GGTTGATTTTATTCTATTGGTGATATATTGCGATCTTGCCCATCTCTTGCCACACGTC

>T-CGA/E-AAG 057_1

AGGGGTATGCACCATTTTTCAAATAGATATTTTTGCAGAATCCTCCACAGGGTGCTGTCTCCAGTTGGCAATTGAGA
CTTGAAGGTTTTCAACAGTTCCACCTTTATTCCTAGATTTTATGCTGTTGATTTGTC

>T-CGAVE-AAG 058_2

AGCAGAAAGAAGGAATTGACTAAAGACGTTTACACCAGTCTCTAGAATGACAACAGTCTGTTTACTCATTTCTTAGCA
ACTGCGTTAGATTAGGAGTTACACCAGATGGTC

>T-CGAVE-AGA 065_2

GAGGAGTCAGGTAAAGACCACGGGGAGTGATTGATTTTTCCCCATTTGGGTAGGAAGAGAGGACTTAGTTCTCTGGTT
CATGTCTTGTGACTTCCATGATAGAAGACATATAGAAAACACTCAAACATGACCCATATATGCAAAGCCCTTTATCCTT
TTAGAGTAACAGTTGAACCTCACCTATGGTGAACAACAATGTGGCTGGAATATCCTCCTTTAGTAACTGTGCCATCTA
CATCGATGTC

>T-CGAVE-AGC 060_1

GCACACATACATAGCAGAAATCAACCTGGCTCTGATACCATGTTAGAATGAGGGATATAAGCTAGCCTCACAACATAA
GTCACGTGCAAAAAAAGCAAGAGGTGATGATACGCCAATAAGACTAACTCTCTAATTCTCATTGAAAAAATTCTTG
ATGATACAAGTACATATTTATAAATTTGCATCATAGCTAAACATAGGGGTTGGTTTCAACGAACTCCAACCTCCCTTTA
TTTTGGTGTGCTCAAACTACCTC

>T-CGAVE-AGC 063_1

GCTTCACAATGCATAGGAAGAGCCAACATCAAAGGATCAAAAAGTAATGTCGCTATGAACACTTGGCTGCCACAAGCC
AGTTATACCTATGGTAACTTTTCTAACACGTCTAGCCTCAAATTCTGTAAATATAAAGGATTGATAGGCCATGCTTTCA
TGATTTGTATTCATACTGAAAATCAAATCAAATGAGCTTTTACCCTTTTGTCCACATGAGATTTCTGTTCTC

>T-CGAVE-AGG 074_1

GGCATAATTTAGAGACCATGATATGCCTTGAAAGAGCAATCTTATTGGCCGACATAACATGCCAATACTATTGGCCCGT
TATTCGGCAAGGAGCAAACTCGACAACATTATGCATTACATTTCAATTACAATATGGTACAACCTCATGATACATAGATA
CAAAGGGTACATTTACAAATAAGATGTC

>T-CGAVE-AGG 075_2

GGGATGAGTTGTGTAGGGTCCCAACCACGTAAGCACTACGGATATAAGCGCTGTAGAGTCATAGTCTATCGCGAATTT
TCCGAGGCAACGGAAATCACGTGGTAAATTTGAAGGCTATATACCCATCCTATCGCGACGCAAGTGGTTTCATCGGTC
ICCCAGTACCTGCGCGCCCATCCGATC

>T-CGAVE-AGG 076_1

GGTACAAAATCAAGTGCCTTCGAATAGACAATAGTGGGGAGTACACATCCAATGAATTTGAAGACTTTCTCTGCCACC
ATGGGATCAAACATTAGACTACCATCGTAGGTGCCCCGTAACAGAATGGAGTC

>T-CGA/E-AGT 071_1

GTCGGAAGGATGGCCTTGGTTCCATAAACCAACTGAAATGGTGTTTGTCCATTGATCTTTTATATGTCGTTCTGAAG
GTCCATAATACTGATAGTAGTTTCTCGGCCCAATCTGACCTTCCTACATCACAAATCTTCTGCAAGCAATTCTC

>T-CGA/E-AGT 072_1

GTCGGTGCCTGATGTTCTGCGCATCAAGGTACAAGATTTATGCTATGCTCAACATTGAGCATCTATATGGCCTTAGAAT
TTGTGAAAAGAATAATATTTTGTATTGGTTGTTACGGCTC

>T-CGC/E-AAC 078_1

ACAATCAAAAATACTAAAACCCACTAGTTCTGGGCTAAAAAGGTATCTTCAGCCTGGAAAAATTTTGAAGTTGCAATT
CTAGATGGCCCAGAATGATTTTTAGGCCCATGGAATGGGCACTTAGGAGCTCCAAAAACCCTAATGCCCCCAAATAAA
CCCATTAGCCATGACAATCAAAGGGCAATAAAAAATCTAATAAAAGGC

>T-CGC/E-AAC 079_2

ACCAATAAGCCATTGCCCAAGCTGGTCATTCATTGTGGAGCCACAAACACTTACTTATCACCTTGCCATGCCTATATG
CAACCGTAACCTATGTTGGATATTGTGACAACAATATTTTAGC

>T-CGC/E-AAC 080_1

ACAACTCGTATTGTTATAGCTTGGAAAATGCACCTGTATGGTGCATGAGAGAAATATGTATGCTTGTAACACGTTGCA
ATATAGCCGACACGTCACGAGCAATTAGTACTAGTTTTGC

>T-CGC/E-AAG 094_1

AGGGGGAAGAAGATAAAATATATAAACTCAAAAAGGAACTTTATGATTTGAAGCAAGACCTAGGGCCTACCATTCTTG
CATTACTCAGGACTCATCGTCAGGGAGCTCCATCTAGATATCGTCTAATAAAGGCTTATCTAACCTCACCAGGGGCACA
AATTCTGGC

>T-CGC/E-AAG 094_2

AGGCTATGCAAAAGGTGATAGCGATGGCAGATGAGGATGAATAGGAGAAAGTGATAGTAGAAGGAGACTCCTTGAAT
GTGATTAGGAGTATAAAGGGTGAGTTGGAGGTGGATTGGGGCAACTAGGATATGGTTAGGGATGCTTAGGATACATAT
AGGGATGTTCAAATCCAGTATACATATAGGGGAAGGAAATGCTACAGCAGATTGGCTTATAAATTGGGCTGC

>T-CGC/E-ACC 086_1

CCCATTGAATATCAATATGTAGTGATATAGTCACCCATTTTGATGAACCTACTACCTGTGCATCCATGATATATACTAG
GTTACCTAGCATATAATATTTGCAGTCGTCCACATCCAAGCTGTAAATGAAAAGTCACTAATTCACAAGTTACATTTG
TACGGTGTATTCTCTGCCCTGCTTGGGTAATAATGGC

>T-CGC/E-ACC 090_2

CCCCTCAACCTTTTAGAACTCCTAATAAGAACTACCCATAAGTTGAGGTATGTGATATAAATGTTAGAGAAATTTAGTG
AAGAACTATGGTATTTCATCCCAAAGAATACTAGC

>T-CGC/E-AGC 114_1

GCCCTACCACTGTGCCTATAGTTTGGACCTCAGTAATGTGCCAGAACCCAACGCATTCACACCCAAATAAGCCAGTGC
AGCAGAGATCTATAAGTAGAAAAGGCTCAATCAACATCCAAATGTAGCCAACCTTGTGATTGCTATAAGAACACA
GTAGGTAATGC

>T-CGG/E-AAC 148_1

ACAGTCTGATCTCTCCCTACATGCCTCCAAAGTTGGGTGGCACTCCACTGTGTAAGGGAATGGCTCTAGTTCCTCATG
AGAGCCAGTGAAAATGAATCCATTTTCTATTTGATTTCTTATATAGGCGAGGGCCCAATGGGCATTCTTCCATTTT
TGGCTCACGACAGCC

>T-CGG/E-AAC 150_1

ACATAATATATGATAGTATGGCCTAAAAGTGGAGTAGAGGAAGTTCATGCAAGGAAAAATCTAGCATCATATAATATG
AATGGGTTTACCCAAGGTTAGGGAGCAAGCAAGAGTTGGTAATGTTGAGAAGATAAGGTCCCAACC

>T-CGG/E-AAC 150_2

GGCATATATGCATCAGTCTGGTCAGGAGTAGTCTAGGCCAGGAACCTGTTCTCAGTCTTTCATTCATCTATAGGGATT
GATACAACAGGCAAGAATATGTGAGGCAGTGGCAAGACTCATGTTCAATATTTACAGTCGTGAATCAATCTCCTGATT
CATCTGTAGGT

>T-CGG/E-AAG 161_2

GAGGTCAGGTAATTAGTAGTCTGGTTTAGAAAGCTACTTCTTGATCCGACATTATCTCTAATGGGGATCCAAAACAA
GCAATTATCACCTCATAGAGGAATTTGGTTGTACTTCTCGGATCACATTGTCTCATTGGCTTGGCCTTTATCCATTTTG
TCATGAAATTCGTGGCC

>T-CGG/E-AGG 173_2

GGAAAAAAGGAAAACCTAACGGTAAGATTTCTGGAAATCTAGCACGGGCACCGCACCGCCGAACCTTCTGGGCTCGC
AGCGCCTGGGATCAGCCACGAGTAAAGTTCGATCGTATCTGACCAAGATGTCTTTGATCTCCTTCTGGACTGCTCGT
CGACGTATTTCTGGTAGAAAGCCACCAGACCTTAGCGATGCTCTGCCGTATGGCGTAAATCTGTGAGGTGTGGCCGC
CCCC

>T-CGG/E-AGG 176_1

GGGGTTGAAGAAACATTCCGAAGACTCAAAGAAGCAGTGGTTACTACACTAGTATTAGCCCTACTTGATTTTTCTGAA
CCTTTTATTTTAGAATGCGATACATCTAGACTCGAAATGGGAATGGTATTACTACAGAAAGAGCATCCAATAGTTTACG
AATGTTGTTTTCTACGATTTCCCC

>T-CGT/E-AAC 182_1

ACATGGACCTTGTAGTATGTAGGCATTTTATACTCTAGTGGTGAACATCATAGGATTTCTTAGTTGGATGGGATTGT
AGAGTTTCGCTACATAAGATGAAGGCCATGCCTAGAGTTGACAGTAAGGGTCAACTGTGTAGATTAGCTAACAC

>T-CGT/E-ACA 197_1

CACAAAGGGAAGGCATTGACTACACTAAAATCTTTACTACTATAACCAAGTGGCCTACAATCAGAACTCTTTTAGCCTT
GGTACTCAACAGGATTAGAAAATCTACTAACTCGAC

>T-CGT/E-ACA 197_2

CATGCCTTATTGTGATCATCACTCTCATCAACCCTAGCCCCCTTTGATAAACACCTTTTTCACATCACTCATTGGCAT
TCTTGATCATATCTATGCCACACTCTATACTAAGGAC

>T-CGT/E-AGC 202_1

GCCCTACCACTGTACCTATAGTTTGGACCTCAGTAATGTGCCAGAACCCAACGCATTACACCCCAAATAAGCCAGTGC
AGCATAGATCTATAAGTAGAAAAGGCTCAATCAACATCCAAAATGTAGCCAACCTTGTTGTATTGCTATAAGAACCCA
GTAGGTAATAC

>T-CGT/E-AGC 202_2

GCTTGCAATCTGGACTCAAAATGATCCTCTCTGTGCAGCCACATGAAATGTCAGACTTGGATGACTTTACGATAAATC
TGGTCTCTTCTACTCTTCTGGCAGACTCGGCTACTAGTACAGACAGCAGGACAAAATTGGGATCACCAAAAAACCTAC
TCTGATACCAC

>T-CGT/E-AGG 228_1

GGACAGGAGCTTGCGAGATTATCGGCGCATTTACAGAGGCTTGAGGTTTTTCACAGTTTCTCTGGGGTTGCAGTTC
CTGTTTGGTTTTACATTATTTGGCTTTAC

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)
 - เชิงนโยบาย (มีการกำหนดนโยบายอิงงานวิจัย/เกิดมาตรการใหม่/เปลี่ยนแปลงระเบียบข้อบังคับหรือวิธีทำงาน)
 - เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)

ผลงานในที่ประชุมวิชาการ Chatuporn Kuleung. Genetic difference of male and female cycads. Society for Molecular and Evolution (SMBE) 12-15 July 2015. Vienna, Austria. p. 332



ABSTRACT BOOK

634A

Genetic difference of male and female cycads using AFLP markers

Chatuporn Kuleung

Kasetsart University, Bangkok, Thailand

Cycads are dioecious that male and female plants can be identified only by their reproductive organs or cones; however, these organs take several years to develop. To identify sex of cycads at early age, DNA markers could be an effective tool for identifying gender of these plants. AFLP is a technique that can be applied to define many polymorphic regions in a whole genome at a single run. Another advantage of this technique is that it does not require a prior knowledge about the sequence of the organism of interest. These advantages make it an efficient tool for studying genetic variation of novel organisms. Therefore the objective of this research is to investigate genetic difference between male and female cycads using AFLP marker and to develop a specific marker that can be used to differentiate gender of plants in cycads.

Genetic difference of male and female cycads

Chatuporn Kuleung

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900

Abstract

Cycads are dioecious that male and female plants can be identified only by their reproductive organs or cones. However, it takes several years for plants to grow before a cone is produced. To identify sex of cycads at early age, DNA markers are an efficient mean that facilitates the identification. Therefore, the objective of this research is to scan genomes of four *Cycas* species (*C. chamaoensis*, *C. siamensis*, *C. clivicola* and *C. edentata*) for a polymorphic region between male and female plants using multi-locus markers and later develop it into a specific marker. DNA fingerprints of male and female bulks of each species were compared using 64 combinations of AFLP primers. There are three primer pairs that do not yield any DNA bands. Sixty-one primer pairs gave 6 to 58 DNA bands with average of 30 bands per primer pair. 1893, 1850, 1882 and 1864 total bands and 3.5, 3.62, 2.92 and 6.06 % polymorphic bands were obtained from *C. chamaoensis*, *C. siamensis*, *C. clivicola* and *C. edentata*, respectively. Out of total 302 polymorphic bands, 141 bands were cloned and sequenced. Fifty seven non-redundant and >100 bp-long sequences were obtained and designed 54 specific primer pairs. The primers were then tested on male and female pooled and individual DNA. Thirty five primer pairs yielded a single amplified products for both sexes. Therefore, none of the primer pairs designed in this research can be used as a specific marker for sex identification in *Cycas* species.

Introduction

Cycads are dioecious that male and female plants can be identified only by their reproductive organs or cones; however, these organs take several years to develop. To identify sex of cycads at early age, DNA markers could be an effective tool for identifying gender of these plants

The genus *Cycas* consists of eighty species (Schuster, 1932). It is considered to be the most primitive genus among the cycads (Stevenson, 1990) with a chromosome number of $2n = 2x = 22$ with similar karyotypes in all species. (Sax and Beal 1934; Kondo, et al. 1995). Karyotype of many *Cycas* species showed different number of satellite

chromosomes between male and female plants; for example *Cycas siamensis* Miq. has a satellite chromosome on the long arm of the 1st, 4th, 5th and 6th chromosome in male plants and only 2 satellite chromosomes on the long arm of 3rd chromosome were found in female plants. (Toahsakul and Sangduen, 2009). Other than the saltellites, chromosome size and shape of male and female are the same. Therefore, the genetic difference that determine sex may be only a sequence difference or a very short region. By using a molecular technique, these difference can be detect at any stage of development. However, genomic information of cycad is very limited. Therefore, using a technique that scan multiple regions of genome at them same time is suitable these species.

AFLP is a technique that does not require a prior knowledge about the sequence of the organism of interest, making it an efficient tool for studying genetic variation of novel organisms. Therefore the objectives of this research is to investigate genetic difference between male and female cycads using AFLP marker and to develop a specific marker that can be used to differentiate gender of plants in cycads.

Materials and methods

Leaf samples of 4 cycad species from Nong Nooch Tropical Botanical Garden, Chonburi, Thailand. (*Cycas chamaoensis*, *C. edentata*, *C. siamensis* and *C. clivicola*; $2n=2x=22$). Genomic DNA was extracted from both male and female leaves using Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitex, Germany) according to the manufacturer's instructions. Of each species, the DNA samples with the same sex were then pooled. The DNA bulks were digested with *Eco*RI and *Tru*1I and ligated to their adapters. Next the ligated DNA was pre-amplified with *Eco*RI and *Tru*1I primers with one selective base (E-A and T-C, respectively). The PCR products were used as the template for selective amplification using 64 primer combinations. The amplified products were then separated in 6% denaturing polyacrylamide gel and stained with silver nitrate. Polymorphic bands were cut, cloned with pGem-T easy vector and sequenced by MacroGen company.

Result and Discussion

DNA fingerprints generated by 64 combinations of AFLP primers showed high similarity between male and female plants (Table 1). The highest polymorphism was found in *C. edentata* (6.1%) and the lowest was found in *C. clivicola* (0.5%). A total of

302 polymorphic bands were observed in all species but only 141 bands were selected for further cloning and sequencing. Fifty seven non-redundant and larger than 100 bp sequences were obtained and 54 primer pairs were subsequently designed. The results of testing these primers on male and female pooled DNA showed that 35 primer pairs yielded a single amplified products but none of them gave a gender specific banding pattern (Figure 1). This result suggested that sex determination in cycads is possibly not related to genetic difference between male and female genomes but it might be associated to other regulatory systems like methylation (Kanchanaketu *et al.*, 2007). Therefore, other methods may be applied to differentiate male and female plants of *Cycas*.

References

- 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. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Kanchanaketu, T., V. Hongtrakul and N. Sangduen. 2007. Analysis of Sex Determination in Some Cycads Using Methylation- Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP). *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 41 : 641 – 650.
- Toahsakul and Sangduen, 2009
- Sax and Beal 1934; Kondo, et al. 1995

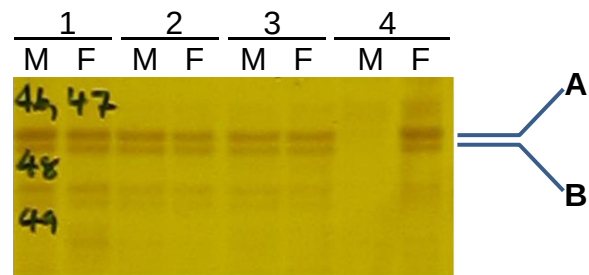
Acknowledgment

I would like to thanks Nong Nooch Tropical Botanical Garden, Chonburi, Thailand for providing the cycad samples used in this research. This research is co-funded by the Thailand Research Fund, the Commission on Higher Education and Kasetsart University. In addition, the project is partly supported by Faculty of Science, Kasetsart University under the program Science,Research Fund.

Table 1 number of total and polymorphic bands generated by 64 AFLP primer combinations in each cycad species

species	total bands	polymorphic bands	Polymorphism (%)
<i>C. chamaoensis</i>	1893	67	3.5
<i>C. siamensis</i>	1850	67	3.62
<i>C. clivicola</i>	1882	55	2.92
<i>C. edentata</i>	1864	113	6.06

a)



b)

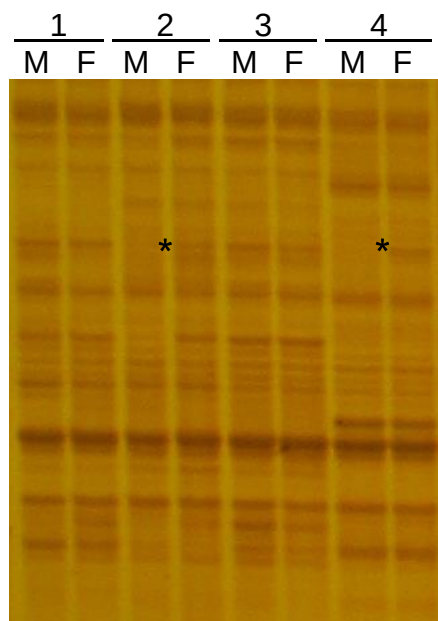


Figure 1 Amplification of AFLP primer tested on male and female bulks (1: *C. chamaoensis*, 2: *C. siamensis*, 3: *C. clivicola* 4: *C. edentata* M: male pooled DNA F: female pooled DNA

- a) Primers T-CAA/E-AGC shows A and B bands of *C. edentata* sharing the same sequences.
- b) Primers T-CAG/E-ACC AGC shows bands on the same position of *C. siamensis* and *C. edentata* sharing the same sequences.