อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างพืชสกุลลางสาดจากสถานที่ปลูกสำคัญในเขตจังหวัดภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดนราธิวาส ปัตตานี สงขลา นครศรีธรรมราช พัทลุง สุราษฎร์ธานี และบริเวณภาคใต้ตอนบน เช่น จังหวัดชุมพร พังงา กระบี่ และระนอง (ตารางที่ 1) บันทึกภาพผล ใบ และดอกเพื่อเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยา

2. การเก็บรวบรวมพันธุ์

จากต้นเดียวกันที่เก็บตัวอย่างใบในข้อ 1 ทำการตัดกิ่งพันธุ์ต้นละ 5 กิ่งเพื่อนำไปเสียบยอดกับต้นตอดูกูที่เตรียมไว้สำหรับใช้เป็นต้นที่จะทำการอนุรักษ์ นอกจากการตัดกิ่งสำหรับเสียบยอดในบางสถานที่ได้ทำการตอนกิ่งไว้ด้วยเพราะบางต้นการใช้วิธีเสียบยอด ต้นไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ โดยเฉพาะหน้าแล้ง ยอดมักแห้งตาย ต้นเหล่านี้จะถูกอนุบาลและดูแลภายใต้สภาพโรงเรือนในระยะแรกและจะนำไปปลูกในแปลงรวบรวมพันธุ์ต่อไป

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

จากตัวอย่างใบพืชที่ทำการเก็บจากสถานที่ต่างๆ นำไปทำตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างใบที่เก็บมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้บัฟเฟอร์ CTAB (Tris-HCl (pH 8.0 เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์, NaCl เข้มข้น 1.4 มิลลิโมลาร์, Na_2EDTA เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, PVP-40 เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์, CTAB เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์) ตามวิธีการที่ประยุกต์มาจาก Doyle และ Doyle (1990) ดังนี้ คือ ใช้ตัวอย่างใบสดปริมาณ 200 มิลลิกรัม บดด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วจึงเติมบัฟเฟอร์ CTAB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้ vortex เขย่าเพื่อให้ผสมกันอย่างดี นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ในระหว่างนี้เขย่าหรือกลับหลอดไปมาทุกๆ 15 นาที จากนั้นจึงเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาเฉพาะของเหลวใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 1- 2 เท่าของปริมาตรของเหลวที่ดูดได้ กลับหลอดไปมาเบาๆ เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน แต่ถ้าตะกอนดีเอ็นเอน้อยเกินไปให้วางหลอดไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำมาปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้งไป ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง วางตะกอนดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิห้องจนแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50–100 ไมโครลิตร ขึ้นอยู่กับขนาดตะกอนดีเอ็นเอ

หาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการทำอิเล็กโตรโฟริซีสด้วยวุ้น LE agarose เข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ TAE ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอบนทรานสลูมินิเตอร์ เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่ชัดแล้ว

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยการทำพีซีอาร์

ทำพีซีอาร์ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของสารเคมีต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบดังนี้

น้ำกลั่น	ปริมาตร	15.8	ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์เข้มข้น 10 เท่า	ปริมาตร	2.5	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์	ปริมาตร	2.5	ไมโครลิตร
นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟสเข้มข้นชนิดละ 5 มิลลิโมลาร์	ปริมาตร	1.5	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ เข้มข้น 50 นาโนโมล	ปริมาตร	1.5	ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	ปริมาตร	0.2	ไมโครลิตร
จีโนมิคดีเอ็นเอเข้มข้น 40 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร	ปริมาตร	1	ไมโครลิตร

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ครั้งนี้จำนวน 7 ไพรเมอร์ ซึ่งได้จากผลการทดลองของสุวิมล (2544) คือ OPA-10, POB-04, OPB-07, OPC04, OPC05, OPD03 และ OPT-01 โดยแต่ละไพรเมอร์มีลำดับเบสดังแสดงใน ตารางที่ 2

3.3 ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสโดยใช้ LE agarose เข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ แรงเคลื่อนไฟฟ้า 50 โวลท์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE เป็นเวลา 150 นาที ตรวจสอบและบันทึกผลที่ได้โดย Gel documentation

3.4 การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS กัลยา (2546) หาดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (similarity index) ตามวิธีการของ Jaccard (1908) และสร้างเดนโดรแกรมโดยใช้วิธี UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic) ให้คะแนนการเกิดแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างในตำแหน่งเดียวกันเป็น "1" และไม่มีแถบดีเอ็นเอเป็น "0" โดยคิดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนและเพิ่มปริมาณได้อย่างสม่ำเสมอเมื่อมีการทำพีซีอาร์ซ้ำ

ตารางที่ 1 พันธุ์และสถานที่เก็บรวบรวมพันธุ์พืชสกุลลางสาดในบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย

รหัส	พันธุ์	สถานที่เก็บรวบรวม
1	ลองกองไม้	ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี จ. สุราษฎร์ธานี
2	ลองกองกะแลแม	ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี จ. สุราษฎร์ธานี
3	ลองกองคันธุลี	ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี จ. สุราษฎร์ธานี
4	ลองกองเปลือกบาง	ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี จ. สุราษฎร์ธานี
5	ลองกองกาญจนดิษฐ์	ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี จ. สุราษฎร์ธานี
6	ลองกองน้ำ	อ. คีรีวง จ. นครศรีธรรมราช
7	ลองกองม้วร์	ม. 6 บ้านลูโป๊ะ ต. ผดุงมาศ อ. จะแนะ จ. นราธิวาส
8	ลองกองการค้า	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา
9	ลองกองการค้า	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา
10	ลองกองการค้า	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา
11	ลองกองการค้า	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา
12	ลองกองการค้า	อ. ยะรัง จ. ปัตตานี
13	ลองกองการค้า	อ. ยะรัง จ. ปัตตานี
14	ลองกองการค้า	อ. ยะรัง จ. ปัตตานี
15	ลองกองการค้า	อ. ยะรัง จ. ปัตตานี
16	ลองกองการค้า	อ. ระแงะ จ. นราธิวาส
17	ลองกองการค้า	อ. ระแงะ จ. นราธิวาส
18	ลองกองการค้า	อ. ระแงะ จ. นราธิวาส
19	ลองกองการค้า	อ. ระแงะ จ. นราธิวาส
20	ลองกอง	26 ม. 4 ต. บ้านควน อ. หลังสวน จ. ชุมพร
21	ลองกอง	20 ม. 18 ต. บ้านห้วยญวน อ. หลังสวน จ. ชุมพร
22	ลองกอง	119 ม. 5 ต. จปร. อ. กระบุรี จ. ระนอง
23	ลองกอง	5/1 ม 1 บ้านบางมัน กิ่ง อ. สำราญ จ. ระนอง
24	ดูกู	ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี จ. สุราษฎร์ธานี
25	ดูกูบือแลแม	ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี จ. สุราษฎร์ธานี
26	ดูกูเม็ด	ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี จ. สุราษฎร์ธานี
27	ดูกูจุก	ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี จ. สุราษฎร์ธานี
28	ดูกู	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา

รหัส	พันธุ์	สถานที่เก็บรวบรวม
29	ดูกู	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา
30	ดูกู	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา
31	ดูกูตัวผู้	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา
32	ดูกู	อ. ยะรัง จ. ปัตตานี
33	ดูกู	อ. ยะรัง จ. ปัตตานี
34	ดูกู	อ. ยะรัง จ. ปัตตานี
35	ดูกูน้ำ	อ. ยะรัง จ. ปัตตานี
36	ดูกู	อ. ระแงะ จ. นราธิวาส
37	ดูกู	อ. ระแงะ จ. นราธิวาส
38	ดูกู	อ. ระแงะ จ. นราธิวาส
39	ดูกู	อ. ระแงะ จ. นราธิวาส
40	ดูกู	65/8 ม. 2 ต. บางวัน อ. คุระบุรี จ. พังงา
41	มะละกะ	276 ถ. ราษฎร์บำรุง อ. ตะกั่วป่า จ. พังงา
42	มะละกะ	276 ถ. ราษฎร์บำรุง อ. ตะกั่วป่า จ. พังงา
43	มะละกะ	276 ถ. ราษฎร์บำรุง อ. ตะกั่วป่า จ. พังงา
44	มะละกะ	65/8 ม. 2 ต. บางวัน อ. คุระบุรี จ. พังงา
45	มะลูกู	276 ถ. ราษฎร์บำรุง อ. ตะกั่วป่า จ. พังงา
46	มะลูกู	23 ม. 2 ต. บางนายศรี อ. ตะกั่วป่า จ. พังงา
47	ลางสาดเขา	วัดถ้ำเสือ จ. กระบี่
48	ลางสาดเขา	อ. คีรีวง จ. นครศรีธรรมราช
49	ลางสาดเขา	อ. คีรีวง จ. นครศรีธรรมราช
50	ลางสาดเขา	อ. คีรีวง จ. นครศรีธรรมราช
51	ลางสาดเขา	อ. คีรีวง จ. นครศรีธรรมราช
52	ลางสาดเขา	อ. คีรีวง จ. นครศรีธรรมราช
53	ลางสาดเขา	อ. คีรีวง จ. นครศรีธรรมราช
54	ลางสุก	ม. 9 ต. สระแก้ว อ. ท่าศาลา จ. นครศรีธรรมราช
55	ลางสุก	55/2 ม. 9 ต. สระแก้ว อ. ท่าศาลา จ. นครศรีธรรมราช
56	ลางสุก	ม. 9 ต. สระแก้ว อ. ท่าศาลา จ. นครศรีธรรมราช
57	ลางสุก	1/2 ม. 9 ต. สระแก้ว อ. ท่าศาลา จ. นครศรีธรรมราช
58	ลางสุก	ม. 9 ต. สระแก้ว อ. ท่าศาลา จ. นครศรีธรรมราช
59	ลางสุก	ม. 9 ต. สระแก้ว อ. ท่าศาลา จ. นครศรีธรรมราช

รหัส	พันธุ์	สถานที่เก็บรวบรวม
60	ลางสุก	ม. 9 ต. สระแก้ว อ. ท่าศาลา จ. นครศรีธรรมราช
61	ลางสุก	ม. 9 ต. สระแก้ว อ. ท่าศาลา จ. นครศรีธรรมราช
62	ลางสุก	35/2 ม. 9 ต. สระแก้ว อ. ท่าศาลา จ. นครศรีธรรมราช
63	ลางสุก	ม. 9 ต. สระแก้ว อ. ท่าศาลา จ. นครศรีธรรมราช
64	ลางสาดสมุย	ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี จ. สุราษฎร์ธานี
65	ลางสาดสมุย	16/4 ม. 2 ต. อ่างทอง อ. เกาะสมุย จ. สุราษฎร์ธานี
66	ลางสาดสมุย	16/4 ม. 2 ต. อ่างทอง อ. เกาะสมุย จ. สุราษฎร์ธานี
67	ลางสาดสมุย	ม. 1 ต. ตลิ่งงาม อ. เกาะสมุย จ. สุราษฎร์ธานี
68	ลางสาดสมุย	ม. 1 ต. ตลิ่งงาม อ. เกาะสมุย จ. สุราษฎร์ธานี
69	ลางสาดสมุย	ม. 3 ต. ตลิ่งงาม อ. เกาะสมุย จ. สุราษฎร์ธานี
70	ลางสาดสมุย	ม. 1 บ้านหัวเวียง อ. เกาะสมุย จ. สุราษฎร์ธานี
71	ลางสาดสมุย	ม. 1 บ้านหัวเวียง อ. เกาะสมุย จ. สุราษฎร์ธานี
72	ลางสาดสมุย	ม. 1 บ้านหัวเวียง อ. เกาะสมุย จ. สุราษฎร์ธานี
73	ลางแสด	อ. คีรีวง จ. นครศรีธรรมราช
74	ลางแสด	ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี จ. สุราษฎร์ธานี
75	ลางสาดซาวอร์	ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี จ. สุราษฎร์ธานี
76	ลางสาดปาร์ดี	ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี จ. สุราษฎร์ธานี
77	ลางสาดดือแนลายอ	ศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี จ. สุราษฎร์ธานี
78	ลางสาดขาว	อ. คีรีวง จ. นครศรีธรรมราช
79	ลางสาด	อ. ลานสกา จ. นครศรีธรรมราช
80	ลางสาด	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา
81	ลางสาด	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา
82	ลางสาด	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา
83	ลางสาดข้าว	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา
84	ลางสาด	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา
85	ลางสาด	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา
86	ลางสาด	ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ. สงขลา

รหัส	พันธุ์	สถานที่เก็บรวบรวม
87	ลางสาดขม	อ. ยะรัง จ. ปัตตานี
88	ลางสาดตารง	อ. ยะรัง จ. ปัตตานี
89	ลางสาด	อ. ยะรัง จ. ปัตตานี
90	ลางสาดซาวอร์	อ. ยะรัง จ. ปัตตานี
91	ลางสาด	อ. รือเสาะ จ. นราธิวาส
92	ลางสาด	3 ม. 3 ต. ร่มเมือง จ. พัทลุง
93	ลางสาด	3 ม. 3 ต. ร่มเมือง จ. พัทลุง
94	ลางสาด	3 ม. 3 ต. ร่มเมือง จ. พัทลุง
95	ลางสาด	3 ม. 3 ต. ร่มเมือง จ. พัทลุง
96	ลางสาด	3 ม. 3 ต. ร่มเมือง จ. พัทลุง
97	ลางสาด	12 ม. 3 ต. วังใหม่ อ. เมือง จ. ชุมพร
98	ลางสาด	27/3 บ้านช้างคลิ้ง ต. ปากจั่น อ. ระบุรี จ. ระนอง
99	ลางสาดหอม	276 ถ. ราษฎร์บำรุง อ. ตะกั่วป่า จ. พังงา
100	ลางสาดหอม	23 ม. 2 ต. บางนายศรี อ. ตะกั่วป่า จ. พังงา
101	ลางสาดหวาน	206 ม. 3 บ้านบางน้ำ อ. เมือง จ. ระนอง

ตารางที่ 2 รายละเอียดไพรเมอร์และลำดับเบสของไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5' ---------- 3'
OPA10	GTGATCGCAG
OPB04	GGACTGGAGT
OPB07	GGTGACGCAG
OPC04	CCGCATCTAC
OPC05	GATGACCGCC
OPD03	GTCGCCGTCA
OPT01	GGGCCACTCA