บทที่ 4
วิจารณ์

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตาลโตนดโดยพิจารณาลักษณะสัณฐานวิทยา

การศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรตาลโตนด จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างประชากรตาลโตนดจาก 2 แหล่งที่สำคัญของประเทศไทย คือ บริเวณคาบสมุทรสทิงพระ ได้แก่ อำเภอสทิงพระ อำเภอสิงหนคร และอำเภอระโนดจังหวัดสงขลา และอำเภอบ้านลาดจังหวัดเพชรบุรี ผลจากการศึกษาลักษณะภายนอก พบว่าเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มประชากรต้นเพศผู้และต้นเพศเมียไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ จนกว่าต้นจะเริ่มออกดอกและติดผลเท่านั้น แม้มีรายงานว่าสามารถสังเกตการเรียงตัวของทางใบ ในการแยกความแตกต่างระหว่างต้นเพศผู้และต้นเพศเมีย คือการเรียงตัววนไปทางขวามือจากโคนไปสู่ยอดจะเป็นต้นตาลโตนดเพศเมีย แต่ถ้าการเวียนของทางใบวนไปทางซ้ายมือจะเป็นต้นเพศผู้ร้อยละ 80 (สำนักงานเกษตรจังหวัดเพชรบุรี, 2547) แต่ลักษณะดังกล่าวก็ไม่สามารถใช้ในการแยกเพศของตาลโตนดได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

สีผลในต้นเพศเมียน่าจะเป็นลักษณะภายนอกที่สามารถจำแนกกลุ่มประชากรตาลโตนดเพศเมียได้ชัดเจนที่สุด เมื่อเทียบกับลักษณะอื่น ๆ เช่น ลักษณะลำต้นและใบ ขนาดและรูปร่างของผล เมล็ด และช่อดอก เนื่องจากไม่มีอิทธิพลของระยะการเจริญเติบโตและสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องมากนัก จากลักษณะดังกล่าวสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มผลสีดำ กลุ่มผลสีเหลือง และกลุ่มผลสีดำปนเหลืองหรือสีน้ำตาล อย่างไรก็ตามแต่ละท้องถิ่นจะเรียกแตกต่างกันออกไป จังหวัดสงขลาจะเรียกกลุ่มที่มีผลสีดำว่า พันธุ์กา เรียกกลุ่มที่มีผลสีเหลืองว่า พันธุ์ขมิ้น และเรียกกลุ่มที่มีผลสีน้ำตาลว่า พันธุ์ข้าว ขณะที่จังหวัดเพชรบุรีจะใช้ชื่อว่าพันธุ์หม้อ พันธุ์ไข่แท้ และพันธุ์ไข่ผสม ตามลำดับ มีการจำแนกตาลโตนดเป็น 3 กลุ่ม คือ ตาลหม้อ ตาลพันธุ์ลูกผสม และตาลไข่เช่นเดียวกัน (สำนักงานเกษตรจังหวัดเพชรบุรี, 2547) นอกจากนี้ในกลุ่มพันธุ์ตาลไข่ยังแยกเป็นพันธุ์ไข่เล็กและไข่ใหญ่ตามขนาดของผลอีกด้วย ในขณะที่ สุรพล (2545) ใช้ลักษณะสีผลในการจำแนกตาลโตนดเป็น 2 กลุ่ม คือ พันธุ์กาซึ่งมีลักษณะผลเป็นสีดำ และพันธุ์ข้าวซึ่งมีผลสีแดง จากการลงพื้นที่และการสอบถามจากชาวบ้านในพื้นที่เพื่อศึกษาลักษณะพันธุ์ตาลโตนดนั้นโดยทั่วไปมักพบลักษณะผลสีดำแท้ และสีเหลืองแท้น้อย

ขนาด รูปร่างผล และลักษณะเมล็ด เป็นลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบความแตกต่าง แต่ไม่สามารถนำมาใช้เป็นเกณฑ์ในการจำแนกกลุ่มตาลโตนดที่ชัดเจนได้ เนื่องจากมีอิทธิพล

ของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น ความอุดมสมบูรณ์ของดิน เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดต่อผล เปอร์เซ็นต์การติดผลต่อทะลาย ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อขนาดและการเรียงตัวของผลบนทะลายที่จะส่งผลต่อรูปร่างของผล โดยพบว่าถ้า 1 ช่อดอกมี 1 ทะลาย จะได้ทะลายที่มีผลขนาดใหญ่ เนื้อผลมีขนาดใหญ่ด้วยเช่นกัน แต่ถ้า 1 ช่อดอกติดผลมากกว่า 1 ทะลายจะได้ผลขนาดเล็ก คุณภาพของผลไม่ดีเท่าที่ควร อย่างไรก็ตามเกษตรกรยังไม่เคยตัดแต่งให้เหลือแค่ 1 ทะลายต่อ 1 ช่อดอก แต่อย่างใด (สำนักงานเกษตรจังหวัดเพชรบุรี, 2547) สำหรับการใช้ลักษณะผลจำแนกสายพันธุ์ของพืชในพืชบางชนิดสามารถใช้จำแนกพันธุ์ได้ เช่น ในมะกอก พบว่า ลักษณะผลให้ความถูกต้องในการจำแนกสายพันธุ์ได้ถูกต้องถึง 87 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การใช้ลักษณะสีใบเป็นเกณฑ์ในการจำแนกพันธุ์ให้ความถูกต้องต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Barone *et al*., 1994)

สำหรับกลุ่มประชากรเพศผู้การแยกพันธุ์เป็นไปได้ยาก เนื่องจากไม่มีลักษณะใดๆ ที่พอจะบ่งชี้ได้ว่าเป็นพันธุ์ใด รวมถึงลักษณะช่อดอกในแต่ละต้น แม้จะพบว่าสีช่อดอกหรือที่ชาวบ้านเรียกว่างวงในต้นเพศผู้มีความแตกต่างกันบ้าง คือ งวงสีเขียวอ่อน และงวงสีเขียวดำ ซึ่งลักษณะดังกล่าวนั้นพบทั้งที่จังหวัดสงขลาและเพชรบุรี

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรตาลโตนดโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

การสกัดดีเอ็นเอจากใบตาลโตนดโดยใช้ CTAB บัฟเฟอร์ และการบดตัวอย่างด้วยเครื่องบดให้ปริมาณและคุณภาพดีเพียงพอสำหรับการทำ PCR เนื่องจากใบตาลโตนดมีลักษณะเหนียวและมีปริมาณเส้นใยสูงมาก จึงไม่สามารถบดใบด้วยไนโตรเจนเหลวเหมือนพืชชนิดอื่น เช่น ปาล์มน้ำมัน (สายชล, 2547) ระยะการเจริญเติบโตของใบที่นำมาใช้เป็นอีกปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ การเลือกใช้ใบที่อ่อนเกินไปหรือต้นอ่อนระยะที่ยังไม่แตกใบ พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จะมีสีน้ำตาล คุณภาพไม่เหมาะสมกับการทำ PCR ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณสาร phenolic compound สูง (Prakash *et al*., 2002) นอกจากนี้การเลือกใช้ใบที่แก่เกินไป ดีเอ็นเอที่ได้จะมีปริมาณน้อยลงเนื่องจากใบมีปริมาณเส้นใยสูง ดังนั้นการเลือกระยะพัฒนาการของใบที่ถูกต้องก็เป็นปัจจัยที่ทำให้การสกัดดีเอ็นเอเป็นไปได้ด้วยดี ทั้งปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

จากการใช้เทคนิค RAPD เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตาลโตนดในครั้งนี้ ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ทดสอบเบื้องต้นจำนวน 200 ชนิด คัดเลือกมาจาก 2 รูปแบบคือ คัดเลือกแบบสุ่มได้แก่ ไพรเมอร์ OPA-01-20, OPB-01-20, OPC-01-20, OPD-01-20, OPT-01-20,

OPR-01-20, OPAA-01-20, OPAB-01-20, OPZ-01-20 และคัดเลือกจากไพรเมอร์ที่มีรายงานว่า มีความจำเพาะเจาะจงกับการแสดงเพศของพืชชนิดต่างๆ คือ ไพรเมอร์ OPE-11 ซึ่งพบว่าสามารถให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 416 คู่เบส ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอต้นเพศเมียของจันทร์เทศ (Shibu *et al*., 2004) OPE-14, OPJ-16 (Mandolino *et al*., 2002) IBRC-RP07, No.8 และ No.11 (Sakamoto *et al*., 1995) ในป่าน OPJ-09 และ OPU-08 ใน hop (Polley *et al*., 2002), OPF08 ในมะกอก (Xu *et al*., 2004), OPK-02, OPQ-14, OPX-11, OPX-18 (Zhang *et al*., 1998) และ OPP-08 (Mulcahy *et al*., 1992) ใน *Silene latifolia*, OPO-08 ใน *Pistacia vera* (Hormaza *et al*., 1994), OPAI-21 และ OPAL-20 ใน *Actinidia chinensis* (Harvey *et al*., 1997), BC210 (Lemos *et al*., 2004) และ W-11 (Deputy *et al*., 2002) ในมะละกอ และ UBC35A (Alstrom - Rappaport *et al*., 1998) ใน *Salix viminalis* ซึ่งผลจากการคัดเลือก ได้ไพรเมอร์ที่ให้รูปแบบดีเอ็นเอแตกต่างกันและมีความคมชัดที่สุดจำนวน 8 ไพรเมอร์ คือ OPB-05, OPB-17, OPC-02, OPD-02, OPP-08, OPT-08, OPZ-03 และ BC210 ได้แถบดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ทั้งสิ้น 75 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง 33 แถบ หรือคิดเป็น 44 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละไพรเมอร์มีเปอร์เซ็นต์การให้แถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน 20 - 70 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 4 แถบต่อไพรเมอร์ ไพรเมอร์ OPC-02 ให้เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างสูงสุด 7 แถบ และ OPD-02 ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอต่ำสุดคือ 2 แถบ เท่านั้น ส่วนการใช้เทคนิค ISSR โดยทดสอบกับไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิด ซึ่งคัดเลือกจากไพรเมอร์ที่มีรายงานว่า ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างสูงในพืชชนิดต่างๆ คือ ไพรเมอร์ P1 $(AGG)_6$, P2 $(AG)_{10}G$, P3 $(CT)_{10}G$, P4 $(AG)_{10}T$ มีรายงานการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของอินทผลัม 12 แหล่งพันธุกรรม พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างสูงถึง 93 - 100 เปอร์เซ็นต์ (Zehdi *et al*., 1995) เช่นเดียวกับไพรเมอร์ P6 $(AC)_8CTT$ และ P8 $(GGGTG)_3$ ซึ่งมีการรายงานในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของมะพร้าว (Manimekalai *et al*., 2006) และพืชในตระกูล Triticeae (Carvalho *et al*., 2005) ตามลำดับ เมื่อใช้ไพรเมอร์ดังกล่าวในการศึกษานี้ ปรากฏเป็นปื้นดีเอ็นเอทำให้ยากแก่การศึกษา จึงทำการปรับสภาวะที่เหมาะสมในการทำ PCR ของแต่ละไพรเมอร์ โดยมีการปรับอุณหภูมิให้มีความจำเพาะ สำหรับการเข้าจับของไพรเมอร์ที่มีความแตกต่างกันในแต่ละไพรเมอร์ เนื่องจากมีจำนวนเบสแตกต่างกัน อุณหภูมิสำหรับขั้นตอนนี้นับว่าเป็นปัจจัยสำคัญยิ่งต่อการเกิดและคุณภาพของแถบดีเอ็นจากการทำ PCR รวมถึงความสม่ำเสมอของการเกิดแถบอีกด้วย การใช้อุณหภูมิสูงจะได้แถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับไพรเมอร์มากขึ้น (Bornet and Branchard, 2001) Charters และ Wilkinson (2000) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเข้าจับของไพรเมอร์ ควรมีค่าสูงกว่าค่า Tm (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ ประมาณ 2 - 5 องศา

เซลเซียส ผลจากการศึกษาไพรเมอร์ทั้ง 6 ชนิด มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเข้าจับของไพรเมอร์อยู่ระหว่าง 52 - 63 องศาเซลเซียส ให้แถบดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ทั้งสิ้น 97 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง 67 แถบ หรือคิดเป็น 69.07 เปอร์เซ็นต์ แต่ละไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างค่อนข้างสูงคือ 37.50 - 88.24 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ P4 ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสูงสุด คือ 15 แถบ และ ไพรเมอร์ P3 ให้ความแตกต่างต่ำสุดคือ 6 แถบ ทั้งนี้การที่ไพรเมอร์ ISSR สามารถให้แถบดีเอ็นเอมากกว่า และแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างกันสูงกว่า RAPD เนื่องจากไพรเมอร์ ISSR จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ ซึ่งมีการเรียงตัวซ้ำๆ ของเบสในช่วงสั้นๆ ประมาณ 1-6 คู่เบส เบสซ้ำเหล่านี้มีการกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม โดยจำนวนซ้ำในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก ดังนั้นเครื่องหมาย ISSR จึงให้ความแตกต่างสูง (Godwin *et al*., 1997)

จากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้ ไม่มีแถบใดเลยที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อกลุ่มใดกลุ่มหนึ่ง เป็นผลให้เมื่อนำแถบดีเอ็นเอทั้งหมดมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในกลุ่มประชากร จะสามารถแยกได้เป็น 11 กลุ่ม เมื่อใช้เทคนิค RAPD และ 15 กลุ่ม เมื่อใช้เทคนิค ISSR นั้น ซึ่งพบว่า จะมีสีผลต่าง ๆ ปะปนกันในทุกกลุ่ม การที่เครื่องหมาย ISSR สามารถแบ่งกลุ่มได้มากกว่าแสดงว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าเครื่องหมาย RAPD ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช เช่นเดียวกับรายงานของ Qian และ Hang (2001) ที่ศึกษาในข้าวป่า หรือ Parson และคณะ (1997) ที่ศึกษาในข้าวปลูกและรายงานว่าเครื่องหมาย ISSR จะให้ข้อมูลที่ละเอียดและเป็นประโยชน์มากกว่า RAPD อย่างไรก็ตาม Chen และคณะ (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Caldesia grandis* และรายงานว่าทั้งเทคนิค RAPD และ ISSR มีประสิทธิภาพที่จะใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาในพืชดังกล่าวใกล้เคียงกัน

การศึกษานี้พบดีเอ็นเอบางแถบที่อาจมีความจำเพาะเจาะจงกับบางกลุ่มประชากร เช่น แถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ OPC-02 ขนาด 620 คู่เบส [C02(0.62)] ที่พบในกลุ่มพันธุ์ขมิ้น (ผลสีเหลือง: YF) ประมาณ 88.89 เปอร์เซ็นต์ แต่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าวในพันธุ์กา (ผลสีดำ : BF) และพันธุ์ข้าว (ผลสีน้ำตาล : WF) 46.15 และ 35.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้แล้วแถบดีเอ็นเอ C02 (0.62) นี้ ก็ไม่ปรากฏในพันธุ์หม้อ (ผลสีดำ : PF) และพันธ์ไข่ (ผลสีน้ำตาล : EF) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า สามารถใช้แถบดีเอ็นเอขนาด 620 คู่เบส ของไพรเมอร์ OPC-02 แยกพันธุ์ขมิ้นออกจากพันธุ์อื่นๆ ด้วยความเชื่อมั่น 88.89 เปอร์เซ็นต์ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ไม่มีความสัมพันธ์ที่ชัดเจนระหว่างลักษณะสัณฐานบางลักษณะ เช่น สีผลของตาลโตนดกับเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RAPD หรือ ISSR ทั้งนี้มีรายงานการทดลองโดย Inoue และคณะ (2005) ในแพร์ญี่ปุ่น ซึ่งพบว่าเครื่องหมาย RAPD OPH-19_{425} มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีนที่ควบคุมผลสีเขียวในพืชดัง

กล่าว ด้วยความเชื่อมั่น 92 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามมีรายงานในพืชหลายชนิดที่พบว่า เมื่อแบ่งกลุ่มพืชโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาและเปรียบเทียบการใช้เครื่องหมาย RAPD พบว่าให้ผลที่แตกต่างกัน และสรุปว่าลักษณะสัณฐานวิทยาไม่มีความสัมพันธ์กับแถบดีเอ็นเอที่ศึกษา เช่น การศึกษาลักษณะผลที่แตกต่างกันของฟักทอง (Youn and Chueng, 1998) ถั่วเหลือง (Chowdhury *et al.,* 2001), มะกอก (Barone *et al.,* 1994), สตรอเบอร์รี่ (Ferriol *et al.,* 2003) และมะระ (Dey *et al.,* 2006) เป็นต้น นอกจากนี้แล้วในการศึกษาการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้รองเท้านารีหมวด Brachypetalum เพื่อหาเอกลักษณ์ของพืชชนิดนี้ โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าไม่สามารถทำได้ทั้งที่มีลักษณะสัณฐานแตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีการใช้ไพรเมอร์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น (ประเดิม, 2543) อย่างไรก็ตามการที่ไม่สามารถจำแนกพืชได้ชัดเจน หรือการที่ไม่สามารถเชื่อมโยงกันระหว่างลักษณะสัณฐานและเครื่องหมายดีเอ็นเอ น่าจะเป็นผลมาจากลักษณะสัณฐานที่ศึกษาเหล่านั้น ถูกควบคุมโดยยีนหลายตัวบนตำแหน่งที่แตกต่างกันของโครโมโซมเดียวกัน หรืออาจอยู่คนละโครโมโซมกัน รวมทั้งมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย

สำหรับการแยกเพศของตาลโตนดนั้น โดยในเบื้องต้นเมื่อใช้เทคนิค RAPD พบว่า มีจำนวน 3 ไพรเมอร์ 9 เครื่องหมาย ที่คาดว่าน่าจะมีความจำเพาะเจาะจงกับการแสดงเพศของตาลโตนด คือ ไพรเมอร์ OPP-08 ขนาด 1,000 คู่เบส ไพรเมอร์ BC210 ขนาด 550, 580 และ 600 คู่เบส และ ไพรเมอร์ OPT-08 ขนาด 480, 550, 600 และ 700 คู่เบส เครื่องหมายที่คัดเลือกได้นี้ ส่วนใหญ่มาจากไพรเมอร์ที่คัดเลือกมาจากการสุ่ม ยกเว้น OPP-08 ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับการแสดงเพศในตัวแทนกลุ่มประชากร *Silene latifolia* (Mulcahy *et al*., 1992) แสดงว่าพืชแต่ละชนิดอาจจะมีลำดับเบสของตำแหน่งที่ควบคุมลักษณะการแสดงเพศแตกต่างกัน ไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกเพศในพืชชนิดหนึ่งอาจไม่สามารถใช้ได้กับพืชอีกชนิดได้ นอกจากนี้การใช้เครื่องหมายโมเลกุลส่วนใหญ่จัดเป็น random marker ซึ่งไม่ใช่ตัวยีนที่ควบคุมแต่เป็นเครื่องหมายที่มีความใกล้ชิดกับตัวยีน ดังนั้นหากเครื่องหมายดังกล่าวยิ่งใกล้ชิดกับตำแหน่งของยีนมากเท่าใด โอกาสที่จะมีความแม่นยำก็เพิ่มขึ้น และประสิทธิภาพของเครื่องหมายจะลดลง หากระยะทางระหว่างยีนและเครื่องหมายเหล่านั้นไกลกัน ดังนั้นเมื่อทดสอบไพรเมอร์เหล่านี้กับตัวอย่างของตาลโตนดที่มากขึ้น พบว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอใดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับการแสดงเพศของประชากรอย่างแท้จริง ตามผลที่ทดสอบในเบื้องต้น

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างต้นที่เชื่อว่ามาจากต้นแม่เดียวกันพบว่า มีความหลากหลายภายในกลุ่มที่สามารถแยกได้เป็น 2 กลุ่ม สันนิษฐานได้ว่าต้นเหล่านั้นได้รับละอองเกสรจากต้นพ่อที่แตกต่างกัน ดังนั้นหากต้องการแยกเพศตาลโตนดโดยอาศัยเทคนิค Tagging gene ต้องหาต้นที่มีพันธุกรรมใกล้เคียงกันแต่แตกต่างกันเฉพาะเพศ หรืออาจทำได้โดยวิธี bulk

segregant analysis แต่วิธีนี้คงทำได้ยาก เพราะตาลโตนดมีช่วงอายุการออกดอกยาวนานมากคือประมาณ 12 - 15 ปี อย่างไรก็ตามการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของตาลโตนดเพื่อนำมาใช้ในการจำแนกกลุ่มประชากรอาจยังได้ผลไม่ชัดเจนนัก เนื่องจากตาลโตนดเป็นพืชผสมข้าม ต้นเพศผู้และต้นเพศเมียแยกอยู่คนละต้น ในสภาพธรรมชาติจึงมีการกระจายตัวทางพันธุกรรมสูงทำให้ยากต่อการจำแนก ส่งผลให้การจำแนกกลุ่มด้วยลักษณะสีผลภายนอกและการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอไม่สัมพันธ์กัน นอกจากนี้ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาส่วนใหญ่เป็นต้นที่เกษตรกรได้ปลูกขึ้น หรือผ่านการคัดเลือกเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ เช่น การเก็บผล หรือการทำน้ำตาล ดังนั้นอาจทำให้ตาลโตนดที่ทำการศึกษามีฐานพันธุกรรมแคบลง

ในการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากร ด้วยการคำนวณโดยวิธี UPGMA และสร้างเดนโดรแกรมจากค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม SPSS (version 11.0) ผลจากการตรวจสอบกับตัวแทนกลุ่มประชากร ในเบื้องต้นที่ศึกษากับตัวอย่างเพียง 6 ตัวอย่างที่เป็นตัวแทนกลุ่มพบว่า สามารถแยกกลุ่มตาลโตนดได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มต้นเพศผู้ และกลุ่มต้นเพศเมีย และในกลุ่มของต้นเพศเมียก็จะแยกเป็นกลุ่มย่อยที่สัมพันธ์กับการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะภายนอกคือ กลุ่มที่มีผลสีดำ หรือพันธุ์กามีความใกล้ชิดกันภายในกลุ่มมากกว่ากลุ่มที่มีผลสีน้ำตาล และผลสีเหลือง แต่เมื่อทดสอบกับจำนวนตัวอย่างที่มากขึ้นคือจำนวน 116 ต้นที่คละกัน ทั้งต้นเพศผู้และต้นเพศเมีย ปรากฏว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอแถบใดที่มีความจำเพาะเจาะจงกับลักษณะการแสดงเพศ เช่นเดียวกับการรายงานของ Soliman และคณะ (2003) ที่ได้ศึกษาเปรียบเทียบพันธุกรรมของอินทผลัมอียิปต์ (*Phoenix dactylifera* L.) ประกอบด้วย ต้นเพศเมีย 4 พันธุ์ และต้นเพศผู้ที่ไม่สามารถระบุพันธุ์ได้ 4 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค RAPD ทดสอบไพรเมอร์ 5 ชนิด พบว่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างต้นเพศผู้และต้นเพศเมียอยู่ระหว่าง 88.9 - 95.3 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าต้นเพศผู้และต้นเพศเมียมีพันธุกรรมใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้ยังไม่เพียงพอในการระบุพันธุ์ต้นเพศผู้ได้อย่างแน่นอน เกิดจากจำนวนประชากรค่อนข้างน้อยนั่นเอง

จากการศึกษาความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม ด้วยการทดสอบกับประชากรทั้งหมด 116 ต้น โดยเทคนิค RAPD พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.681 - 0.969 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.8241 ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่วิเคราะห์จากเทคนิค ISSR เล็กน้อย คือ 0.5401 - 0.9286 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.7378 เมื่อทำการวิเคราะห์รวมกันทั้งสองเครื่องหมายให้ค่าอยู่ระหว่าง 0.6604 - 0.9133 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.7751 แสดงให้เห็นว่า ตาลโตนดจัดเป็นพืชที่มีฐานพันธุกรรมค่อนข้างแคบ มีการศึกษาในพืชกลุ่มใกล้เคียงกันคือ อินทผลัม 13 พันธุ์ ในประเทศซาอุดิอาระเบีย พบว่าอินทผลัมที่ทำการศึกษามีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่า

50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีฐานพันธุกรรมค่อนข้างจำกัดเช่นกัน (Al-Khalifah and Askari, 2003) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของตัวอย่างพืชที่ทำการศึกษาร่วมกับการจัดกลุ่มจากเดนโดรแกรม มีแนวโน้มว่าประชากรที่เก็บมาจากแหล่งเดียวกัน มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่าที่เก็บจากแหล่งพันธุกรรมอื่น แสดงว่าที่มาของแหล่งตัวอย่างมีผลต่อความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเช่นกัน ซึ่งก็มีความเป็นไปได้เพราะเป็นผลมาจากการผสมข้ามระหว่างกลุ่มประชากร ที่ถูกจำกัดด้วยสภาพภูมิประเทศและระยะทาง และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมภายในแหล่งพันธุกรรมเดียวกัน พบว่าประชากรจากจังหวัดสงขลามีฐานพันธุกรรมค่อนข้างกว้างกว่าจังหวัดเพชรบุรี โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดอยู่ระหว่าง 0.4048 - 0.9250 ในขณะที่ประชากรตาลโตนดที่สุ่มเก็บจากจังหวัดเพชรบุรี มีค่าดัชนีความใกล้ชิดอยู่ระหว่าง 0.7152 - 0.8807 อย่างไรก็ตามการที่ประชากรจากจังหวัดเพชรบุรีมีความหลากหลายน้อยกว่า อาจเนื่องมาจากในการศึกษาครั้งนี้จำนวนตัวอย่างที่สุ่มเก็บมามีจำนวนแตกต่างกันค่อนข้างมาก โดยตัวอย่างจากจังหวัดสงขลามีจำนวนถึง 101 ต้น และมีการสุ่มเก็บจากหลายบริเวณ ในขณะที่จำนวนตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดเพชรบุรีมีเพียง 15 ต้น และเก็บจากบริเวณเดียวกัน

นอกจากนี้แล้วในการศึกษาความแตกต่างของประชากรที่มีความใกล้ชิดกันมาก เช่น ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มพืชสปีชีส์เดียวกันแต่อาจต่างพันธุ์กัน หรือภายในกลุ่มพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันมากๆ พันธุ์เดียวกันแต่อาจเรียกชื่อต่างกัน หรือพันธุ์เดียวกันที่มาจากหลายแหล่งในประเทศ อาจต้องใช้จำนวนไพรเมอร์ให้มากขึ้น เพื่อให้ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมากพอในการจำแนกความแตกต่าง เนื่องจากไพรเมอร์จำนวนมากย่อมช่วยให้การตรวจสอบแม่นยำขึ้น เช่นในงานวิจัยของ ดิเรก และ เสริมสกุล (2545) อ้างโดย เสริมสกุล และ ดิเรก (2545) ที่พบว่า การใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ 16 ไพรเมอร์ จากทั้งหมด 40 ไพรเมอร์ ให้ความสัมพันธ์ทั้งในแง่การจัดกลุ่มมะกอกน้ำมันตามประเทศแหล่งกำเนิด และการใช้ประโยชน์ได้ชัดเจนขึ้นกว่าการใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือกเพียง 8 ไพรเมอร์