บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ตาลโตนด (*Borassus flabellifer* Linn.) เป็นพืชดั้งเดิมที่มีความสำคัญต่อวิถีชีวิตและเศรษฐกิจของชุมชน เนื่องจากตาลโตนดเป็นพืชสารพัดประโยชน์และให้ผลผลิตสม่ำเสมอ จึงก่อให้เกิดความหลากหลายของอาชีพในชุมชนทั้งอาชีพหลักและอาชีพเสริมหลังว่างเว้นจากการเพาะปลูก เช่น การทำน้ำตาล การผลิตจาวตาล การปาดตาล ฯลฯ ส่งผลให้เกษตรกรมีรายได้สม่ำเสมอ แม้ในภาวะที่ประสบภัยธรรมชาติ จังหวัดสงขลาเป็นแหล่งผลิตตาลโตนดที่สำคัญ เกษตรกรมีรายได้จากการทำตาลโตนดเป็นอาชีพเสริม ปีละประมาณ 400,000,000 บาท(สำนักงานเกษตรจังหวัดสงขลา, 2544) ตาลโตนดมีบทบาทสำคัญในการช่วยรักษาสมดุลของระบบนิเวศ โดยเป็นที่อยู่อาศัยของศัตรูธรรมชาติจึงเป็นการลดการใช้สารเคมีในนาข้าว การที่มีรากลึกจะช่วยหมุนเวียนธาตุอาหารให้แก่ดิน ช่วยยึดเกาะดิน ลดมลภาวะ และปรับปรุงสภาพแวดล้อม (สุรพล, 2545) การใช้ประโยชน์จากตาลโตนดจึงเป็นการประยุกต์ใช้ทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ในท้องถิ่น โดยลดการพึ่งพาจากภายนอกสนับสนุนเศรษฐกิจพอเพียง ปัจจุบันตาลโตนดที่มีอยู่ในธรรมชาติเริ่มมีจำนวนลดน้อยลง จึงมีการส่งเสริมให้ปลูกตาลโตนดเพิ่มเติมทดแทนต้นที่เสื่อมโทรมในพื้นที่ที่เป็นแหล่งผลิต เพื่ออนุรักษ์และส่งเสริมให้เกษตรกรเห็นคุณค่าของการพึ่งพาทรัพยากรในท้องถิ่น (ปลายปีก, 2543) ตาลโตนดที่มีอยู่ทั่วไปเป็นพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกโดยธรรมชาติ การคัดเลือกโดยมนุษย์มีน้อยมากด้วยข้อจำกัดหลายๆ ประการ จึงไม่มีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ได้ผลผลิตสูง เพราะต้องรอผลผลิตเป็นระยะเวลากว่าสิบปี โดยเฉพาะการคัดเลือกต้นเพศผู้และต้นเพศเมีย ซึ่งแยกกันอยู่คนละต้นและให้ผลผลิตแตกต่างกัน โดยพบว่าต้นเพศเมียจะให้ผลผลิตน้ำตาลสูงกว่าต้นเพศผู้ (Morton, 1988) นอกจากนี้ต้นเพศเมียยังสามารถให้ผลผลิตที่นิยมบริโภคสดและทำขนมหวาน รวมทั้งการบรรจุกระป๋องเพื่อส่งขายยังต่างประเทศ ดังนั้นเกษตรกรจึงมีความต้องการตาลโตนดที่เป็นต้นตัวเมียมากกว่าต้นเพศผู้ แต่การจำแนกความแตกต่างทำได้ยากต้องคอยให้เริ่มติดผลจึงสามารถแยกได้ ซึ่งต้องใช้เวลาประมาณ 12 - 15 ปี เนื่องจากข้อมูลพื้นฐานโดยเฉพาะทางด้านพันธุกรรมของพืชชนิดนี้แทบจะไม่มีผู้ศึกษามาก่อน ดังนั้นการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรตาลโตนดโดยใช้เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) และเทคนิค ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) จึงเป็นการศึกษาพันธุกรรมเบื้องต้นและความรู้ที่ได้

จากการศึกษาครั้งนี้ จะนำไปสู่การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีนที่ควบคุมเพศ ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการแยกเพศต้นตาลโตนดในระยะต้นกล้า

ตรวจเอกสาร

ตาลโตนด (Palmyra Palm หรือ Lontar หรือ Fan palm) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Borassus flabellifer* Linn. เป็นพืชตระกูลปาล์ม (Palmae) (เต็ม, 2544) เช่นเดียวกับปาล์มน้ำมัน มะพร้าว จาก สละ ระกำ และอินทผลัม มีชุดโครโมโซม 2n=36 (Venkatasubban, 1946 อ้างโดย Kovoor, 1983)

Borassus flabellifer Linn.

Division Tracheophyta

Class Angiosperm

Order Palmales

Family Palmae

Genus Borassus

Species *Borassus Flabellifer*

ตาลโตนดมีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกา (Watt, 1908 : Chevalier, 1949 : Theivendirarajah, 1983 อ้างโดย Kovoor, 1983) ต่อมาได้แพร่พันธุ์เข้าไปในอินเดีย ศรีลังกา และกลุ่มประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น กัมพูชา มาเลเซีย และอินโดนีเซีย ปัจจุบันมีมากแถบอินเดีย ศรีลังกา พม่า กัมพูชา มาเลเซีย อินโดนีเซีย และไทย (สุรพล, 2545) สำหรับประเทศไทยการเข้ามาของตาลโตนด ไม่มีหลักฐานยืนยันที่แน่นอน อาจมีการปลูกมาก่อนสมัยสุโขทัย โดยการนำเข้าของพ่อค้าชาวอินเดียหรือคณะธรรมทูตที่เข้ามาเผยแพร่พระพุทธศาสนา (สัมฤทธิ์, 2543) ส่วนใหญ่พบมากในเขตภาคกลางแถบจังหวัดเพชรบุรี นครปฐม และภาคใต้แถบคาบสมุทรสทิงพระ จังหวัดสงขลา ซึ่งประกอบด้วย อำเภอระโนด อำเภอกระแสสินธุ์ อำเภอสทิงพระ และอำเภอสิงหนคร (สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8, 2544) เนื่องจากปัจจุบันพื้นที่ปลูกตาลโตนดมีจำนวนลดลงอย่างมาก จากการสำรวจทางสถิติโดยสำนักงานเกษตรจังหวัดสงขลาเมื่อปี 2540 พบว่า จังหวัดสงขลามีต้นตาลโตนดเหลืออยู่ประมาณ 2,900,000 ต้น (สำนักงานเกษตรจังหวัดสงขลา, 2544) กรมส่งเสริมการเกษตรจึงได้มีการส่งเสริมให้มีการปลูกตาลโตนดเพิ่ม

เติมเพื่อทดแทนต้นที่เสื่อมโทรมจำนวน 200,000 ต้น ในพื้นที่ที่เป็นแหล่งผลิตเดิมคือ จังหวัดสงขลา 100,000 ต้น เพชรบุรี 50,000 ต้น บุรีรัมย์ 30,000 ต้น และชัยนาท 20,000 ต้น (สุพล, 2543 อ้างโดย ปลายปีก, 2543)

ตาลโตนดเป็นพืชที่มีลำต้นเดี่ยว (single stem) โดยลำต้นมีลักษณะตรงกลม สีดำเกรียม เป็นเส้นแข็ง เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5 ฟุต มีความสูงปกติ 18 - 25 เมตร ใบมีลักษณะยาวใหญ่เป็นรูปพัด (flobellate หรือ fan leaf หรือ palmate leaf) มีใบย่อย (segment) แตกออกจากจุด ๆ เดียวกันที่ปลายก้านใบ ตามขอบทางใบมีหนามทู่สีดำ เป็นพืชที่มีดอกแบบไม่สมบูรณ์เพศ ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียอยู่แยกคนละต้น (dioecious plant) (สุรพล, 2545) ช่อดอกเพศผู้มีขนาดใหญ่ยาวประมาณ 2 เมตร ประกอบด้วยช่อดอก 3 - 9 ช่อ แตกแขนงออกเป็น 2 - 4 ช่อย่อย ยาว 30 - 45 เซนติเมตร ดอกเรียงตัวเป็นกระจุก ๆ ละ 30 ดอก กลีบดอกมี 3 กลีบ พร้อมด้วยก้านละอองเกสร 6 ก้าน ช่อดอกเพศเมียมีขนาดใหญ่ อวบเนื้อและหนากว่าช่อดอกเพศผู้ กลีบหุ้มดอกมีขนาดใหญ่ ดอกแรก ๆ จะกลวง ดอกต่อไปจะมีดอกเดียว และดอกกลวงอยู่ถัดไป ดอกมีขนาดใหญ่กว่าดอกเพศผู้ มีรังไข่ 3 พู ผลมีลักษณะกลมถึงกลมรี เส้นผ่านศูนย์กลาง 15 - 20 เซนติเมตร น้ำหนัก 1.5 - 2.5 กิโลกรัม

นักวิจัยเชื่อว่าตาลโตนดเริ่มให้ดอกเป็นครั้งแรกเมื่ออายุ 15 - 20 ปี แต่ชาวบ้านเชื่อว่าตาลโตนดให้ผลครั้งแรกอายุ 12 ปี สามารถปาดบริเวณงวงตาลหรือช่อดอกเพื่อรองรับน้ำหวานมาบริโภคเป็นน้ำตาลโตนดสด หรือแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น น้ำตาลโตนด น้ำตาลปึก น้ำส้มสายชู น้ำตาลเมา (กีย์, 2526) โดยทั้งต้นเพศผู้และเพศตัวเมียจะทยอยออกช่อดอก แม้มีจำนวนน้อยแต่ก็สามารถรองเก็บน้ำตาลได้ตลอดปีทุกปีจนกระทั่งตาลโตนดมีอายุประมาณ 80 ปี โดยดอกเพศเมียจะชุ่มน้ำหวานมากกว่าดอกเพศผู้ ประกอบกับน้ำตาลจากดอกเพศเมียจะมีคุณภาพดีกว่าเนื่องจากเกสรตัวผู้มักจะตกลงในกระบอกรองรับน้ำตาลสดทำให้เกิดสิ่งปนเปื้อนได้มากกว่า (สัมฤทธิ์, 2543) เนื่องจากผลจากต้นเพศเมียสามารถนำมาใช้ประโยชน์ต่าง ๆ เช่น ผลอ่อนใช้ทำอาหารคาว ผลแก่ใช้บริโภคสด เชื่อม บรรจุกระป๋อง ส่วนเนื้อผลที่มีสีเหลืองสดและมีกลิ่นหอมใช้ปรุงเป็นขนมหวาน และเมล็ดใช้เพาะจาวตาล หรือใช้เป็นอาหารสัตว์ และตากแห้งสำหรับทำเชื้อเพลิง (สุรพล, 2545) ทำให้ต้นเพศเมียให้ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจสูงกว่าต้นเพศผู้ มีรายงานการศึกษาผลตอบแทนทางเศรษฐกิจที่ได้จากตาลโตนดในปี 2537 จากสำนักงานเกษตรอำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี อ้างโดย ปลายปีก (2543) พบว่าต้นเพศผู้ให้ผลผลิตจากการผลิตน้ำตาลต่อปีเป็นเงิน 2,700 - 3,000 บาทต่อต้น ส่วนต้นเพศเมียให้ผลตอบแทนจากการผลิตน้ำตาลและผลตาลคิดเป็นเงินต่อปี 3,000 - 5,500 บาทต่อต้น สำหรับพันธุ์แม้ว่าตาลโตนดจะเป็นพืชที่มีมาแต่ดึกดำบรรพ์ มีหลักฐานจากศิลาจารึกว่าเป็นไม้ที่มีความสำคัญในประวัติศาสตร์ของไทยมาแต่โบราณกาล อย่าง

ไรก็ตามพันธุ์ที่มีอยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่มักเป็นพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกโดยธรรมชาติ เนื่องจากการคัดเลือกโดยมนุษย์ยังมีน้อยมาก และจากการจำแนกตาลโตนดที่มีอยู่โดยทั่วไปสามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 พันธุ์คือ พันธุ์กาซึ่งมีลักษณะผลเป็นสีดำ และพันธุ์ข้าวซึ่งมีผลสีแดง โดยมีการศึกษาพบว่าตาลโตนดพันธุ์ข้าวจะมีคุณค่าทางอาหารและผลผลิตสูงกว่าพันธุ์กาเล็กน้อย ส่วนลักษณะทางสรีรวิทยาอื่น ๆ พบว่าทั้งสองพันธุ์มีลักษณะใกล้เคียงกัน (สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 8, 2544)

การใช้สัณฐานวิทยาหรือลักษณะทางฟีโนไทป์ไม่อาจแยกความแตกต่างระหว่างเพศของตาลโตนดได้จนกว่าตาลโตนดจะเริ่มออกดอก และไม่สามารถจำแนกพันธุ์ได้จนกว่าจะเริ่มติดผลซึ่งอาศัยระยะเวลานานประมาณ 12 - 15 ปี ประกอบกับปัจจุบันข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมของตาลโตนดยังมีจำกัด ดังนั้นการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของกลุ่มประชากรตาลโตนดโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล จึงเป็นการศึกษาเบื้องต้นที่จะนำไปสู่การค้นหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีนที่ควบคุมเพศ เพื่อสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการแยกเพศต้นตาลโตนดในระยะต้นกล้า และเป็นฐานข้อมูลทางพันธุกรรมเบื้องต้นในการใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ จากข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่น การเก็บรวบรวมพันธุกรรมเพื่อจัดทำแหล่งเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ การคัดเลือกประชากรในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ (Moretzsohn *et al*., 2002)

เครื่องหมาย RAPD

มีการใช้เทคนิค RAPD ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเป็นการตรวจสอบความแตกต่างของพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยไม่ขึ้นกับระยะการเจริญเติบโต สภาพแวดล้อม และชิ้นส่วนอวัยวะที่ทำการตรวจสอบเหมือนวิธีการตรวจสอบโปรตีน เช่น ไอโซไซม์หรือการตรวจสอบด้วยโปรตีนที่จำเพาะ (สุรินทร์, 2536) เครื่องหมาย RAPD มีข้อได้เปรียบกว่าการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอชนิดอื่นคือ เป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ค่าใช้จ่ายไม่สูง ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสที่แน่นอนในการทำ PCR (polymerase chain reaction) ตรวจสอบผลการวิเคราะห์ได้ง่ายและรวดเร็ว โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสแบบสุ่มขนาด 8 - 10 นิวคลีโอไทด์ เพิ่มปริมาณส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยปฏิกิริยา PCR ซึ่งถ้าตำแหน่งของจีโนมที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะอยู่บริเวณที่ห่างกันในระยะหนึ่ง และมีทิศทางตรงข้ามกัน จะทำให้เกิดผลผลิตดีเอ็นเอขึ้นหลังจากทำ PCR โดยตรวจสอบความหลากหลาย (polymorphism) จากชิ้น ดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ ด้วยการแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอโดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วตรวจ

สอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตหลังย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Williams *et al*., 1990) ความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ เป็นผลมาจากความแตกต่างของลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะ (Waugh and Powell, 1992 อ้างโดย วินิตชาญ, 2540) ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นนี้สามารถนำมาวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อคาดคะเนหาค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ทำให้ทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพืชที่อยู่ในชนิดเดียวกันจากการรวบรวมพันธุ์ เทคนิค RAPD สามารถนำมาใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ ดังนี้

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช มีการใช้เทคนิค RAPD เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชอย่างแพร่หลาย โดยแต่ละการทดลองมีการเลือกใช้ไพรเมอร์แตกต่างกันออกไป ขึ้นกับการเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างของไพรเมอร์นั้นๆ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชแต่ละชนิด Prakash และคณะ (2002) รวบรวมฝรั่งจำนวน 41 จีโนไทป์และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับวางแผนงานในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างจำนวน 93 แถบ จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 8 ไพรเมอร์ และผลการคำนวณค่า genetic dissimilarity matrix แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ฝรั่งที่ทำการศึกษามีความแปรปรวนอยู่ในระดับต่ำถึงปานกลาง และสามารถแบ่งกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่มหลักจากเดนโดรแกรม ซึ่งมีความสัมพันธ์กับภูมิประเทศของแหล่งพันธุกรรม Song และคณะ (2000) ใช้เทคนิค RAPD ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและแยกความแตกต่างของพืชสกุลลางสาด (*Lansium domesticum*) จำนวน 85 ตัวอย่าง และผลจากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งสิ้น 113 แถบ เป็นแถบที่ให้ความแตกต่างจำนวน 107 แถบ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.25 - 1.00 เมื่อพิจารณาจากเดนโดรแกรมสามารถจำแนกประชากรได้เป็น 3 กลุ่มหลัก ซึ่งมีความสัมพันธ์กับลักษณะความหนาของเปลือกผล Anthony และคณะ (2001) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกาแฟ (*Coffea arabica* L.) จำนวน 119 พันธุ์ ได้แถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 29 แถบ สามารถจำแนกได้เป็น 4 กลุ่มตามแหล่งพันธุกรรมที่เก็บมาจากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศเอธิโอเปีย โดยพบว่ากลุ่มที่มีแหล่งพันธุกรรมอยู่ทางตะวันตกเฉียงใต้และทางใต้มีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ในระดับสูง จึงคาดคะเนได้ว่ามีการนำพันธุ์กาแฟจากบริเวณตะวันตกเฉียงใต้เข้ามาปลูกในบริเวณทางใต้ Belaj และคณะ (2003) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะกอก Albanian จำนวน 19 พันธุ์และพันธุ์ป่าจำนวน 2 พันธุ์ จากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 16 ไพรเมอร์ ได้แถบดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ทั้งสิ้น 107 แถบ โดยมีแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 76 แถบ เฉลี่ย 4.8 แถบต่อไพรเมอร์ และจากการจำแนกกลุ่มด้วย Jaccard's index สามารถแยกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มาจากทางใต้ของแอลบาเนีย กลุ่มที่มาจากทางตอนกลางและตอนกลางถึงตอน

เหนือของแอลบาเนีย และกลุ่มที่มาจากทางตอนกลางและทางตะวันตกถึงทางเหนือของแอลบาเนีย สำหรับพืชในกลุ่ม Palmae มีการใช้เครื่องหมาย RAPD ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบันอย่างกว้างขวางเช่นกัน Shah และคณะ (1994) รายงานผลการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) พันธุ์ต่างๆ ที่เก็บรวบรวมจากแหล่งพันธุกรรมในประเทศแถบแอฟริกา พบว่าปาล์มน้ำมันมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง โดยผลจากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 20 ไพรเมอร์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอพบว่า มี 9 ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน ขนาดของแถบ ดีเอ็นเออยู่ในช่วงประมาณ 2.0 - 2.3 กิโลเบส โดยประชากรปาล์มน้ำมันจากประเทศแซร์มีความแปรปรวนสูงสุด Moretzsohn และคณะ (2002) ใช้ RAPD ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันบราซิล (caicue : *Elaeis oleifera* H.B.K.) จากแหล่งพันธุกรรมในป่าอเมซอนเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพิจารณาปริมาณตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาพันธุกรรม และการคัดเลือกประชากรสำหรับโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ พบว่ามีระดับความแปรปรวนทางพันธุกรรมอยู่ในระดับปานกลางเมื่อเทียบกับพันธุ์ปาล์มน้ำมันโดยทั่วไป จากการทดสอบด้วยไพรเมอร์จำนวน 96 ไพรเมอร์ พบว่าให้แถบดีเอ็นเอ 12 แถบที่จำเพาะเจาะจงกับปาล์มน้ำมันบราซิล และพบว่าในกลุ่มประชากรของปาล์มน้ำมันบราซิล มีการกระจายตัวทางพันธุกรรมสัมพันธ์กับทิศทางของกระแสน้ำ หรืออาจกล่าวได้ว่ากระแสน้ำของแม่น้ำอเมซอนเป็นตัวกลางในการกระจายพันธุ์ Ashburner และคณะ (1997) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรมะพร้าวในประเทศแถบตอนใต้ของมหาสมุทรแปซิฟิก เพื่อใช้เป็นข้อมูลการประเมินจำนวนประชากรสำหรับสร้างแหล่งเก็บรักษาพันธุกรรมมะพร้าว พบว่ามะพร้าวในแถบตอนใต้ของมหาสมุทรแปซิฟิกมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมอยู่ในระดับปานกลาง Sedra และคณะ (1998) ศึกษาความแปรปรวนของประชากรอินทผลัมจากแหล่งพันธุกรรมในประเทศโมรอคโค จำนวน 43 พันธุ์ พบว่ามี 19 ไพรเมอร์ ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอแล้วให้แถบ ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน

2. การจำแนกพันธุ์พืช นอกจากการใช้ประโยชน์จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจัดจำแนกกลุ่มแล้ว สามารถใช้แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยเทคนิค RAPD ที่มีความจำเพาะกับพันธุ์หรือลักษณะใดลักษณะหนึ่งเป็นตัวตรวจสอบลักษณะนั้น ๆ ในประชากรพืช จากการศึกษาการจำแนกและตรวจหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมของพันธุ์หญ้าแฝกในประเทศไทยด้วยเทคนิค RAPD โดย วินิตชาญ (2540) พบว่าแถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ด้วยไพรเมอร์ OPJ-4 และ OPS-16 ขนาด 0.6 และ 0.55 กับ 0.5 กิโลเบส สามารถใช้ตรวจสอบหญ้าแฝกหอมและหญ้าแฝกดอนได้ โดยมีการยืนยันผลด้วยการนำดีเอ็นเอจากแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมาเป็นโพรบ (probe) ในการทำ southern blot hybridization กับดีเอ็นเอของหญ้า

แฝกหอมและหญ้าแฝกดอนอีกครั้ง ธีรชัย และ นฤมล (2543) พบไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีลักษณะจำเพาะกับพริกแต่ละพันธุ์จำนวน 14 พันธุ์ ซึ่งสามารถนำไพรเมอร์ดังกล่าวไปใช้จำแนกพันธุกรรมของพริกจำนวน 14 พันธุ์นั้นได้

3. ใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกลักษณะสำคัญ (marker-assisted selection) Moretzsohn และคณะ (2000) พบเครื่องหมาย RAPD ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับลักษณะความหนาของกะลา โดยการใช้ไพรเมอร์ OPR-11 และ OPT-19 คือ OPR-11 ขนาด 1,282 คู่เบส และ OPT-19 ขนาด 1,046 คู่เบส ซึ่งสามารถแยกพันธุกรรมของปาล์มน้ำมันพันธุ์เทเนอราออกจากพันธุ์พิสิเฟอราได้ Jun และคณะ (2002) จำแนกพันธุ์ท้อโดยใช้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,300, 1,050 และ 1,400 คู่เบส จากการใช้ไพรเมอร์ OPB-05, OPI-07 และ UBC439 ตามลำดับ ซึ่งมีความใกล้ชิดกับยีนที่ควบคุมความหนาของเนื้อ และสามารถใช้ประโยชน์สำหรับการช่วยคัดเลือกในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ Morales และคณะ (2002) พบเครื่องหมาย RAPD ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อไวรัส MNSV ในพืชตระกูลแตง McClendon และคณะ (2002) พบเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถจำแนกยีนที่ควบคุมลักษณะต้านทานต่อโรคเหี่ยวในถั่ว (pea)

4. ใช้เป็นเครื่องหมายในการจำแนกเพศของพืช การศึกษาของ Mandolino และคณะ (2002) พบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่คาดว่าใกล้ชิดกับยีนที่ควบคุมเพศผู้ ซึ่งสามารถใช้ในการจำแนกป่านต้นเพศผู้และต้นเพศเมียได้ในระยะกล้า ซึ่งลักษณะของต้นเพศผู้และต้นเพศเมียนั้นไม่สามารถแยกความแตกต่างจากลักษณะสัณฐานได้จนกว่าจะถึงระยะสร้างดอก เช่นเดียวกับการค้นพบเครื่องหมายโมเลกุล SCAR T1, T12 และ W11 ที่ใกล้ชิดกับยีน *Sex*1 ของมะละกอ จากการใช้เทคนิค RAPD (Deputy *et al*., 2002) Urasaki และคณะ (2002) พบแถบดีเอ็นเอขนาด 450 คู่เบส จากการใช้เทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์ IBRC-RP07 ซึ่งมีความใกล้ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะเพศผู้บนโครโมโซมของมะละกอ และมีประสิทธิภาพในการจำแนกมะละกอต้นเพศผู้และต้นกะเทยออกจากกลุ่มมะละกอต้นเพศเมียในระยะต้นกล้า ในมะกอกพบเครื่องหมาย RAPD ขนาด 569 คู่เบส จากการใช้ไพรเมอร์ OPF-08 ที่สามารถแยกกลุ่มต้นเพศเมียออกจากต้นเพศผู้ได้ (Xu *et al*., 2004) นอกจากนี้มีรายงานการค้นพบเครื่องหมาย RAPD ที่มีความจำเพาะต่อการแสดงเพศของพืชอีกหลายชนิด เช่น หน่อไม้ฝรั่ง (Chunxiao and Kenneth, 1997) *Actinidia deliciosa* (Gill *et al*., 1998)

เครื่องหมาย ISSR

เครื่องหมาย ISSR เป็นเครื่องหมายโมเลกุล ที่อาศัยพื้นฐานของการทำ PCR ประยุกต์จากเทคนิค RAPD และไมโครแซทเทลไลท์ คือ ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR เหมือน RAPD แต่ออกแบบไพรเมอร์ให้มีลำดับเบสบางส่วนเป็นลำดับเบสไมโครแซทเทลไลท์และบางส่วนเป็นลำดับเบสแบบสุ่ม ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จะอยู่ระหว่าง ไมโครแซทเทลไลท์สองตำแหน่งที่อยู่ใกล้กัน ลักษณะความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์เกิดจากความแตกต่างของการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอ (Zietkiewicz *et al*., 1994) การศึกษาความแตกต่างบริเวณไมโครแซทเทลไลท์ ส่งผลให้เทคนิคนี้ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันสูง เนื่องจากบริเวณตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ ดีเอ็นเอมีการเรียงตัวซ้ำๆ ของเบสในช่วงสั้นๆ ประมาณ 1 - 6 คู่เบส กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม มีความแตกต่างกันของจำนวนซ้ำในแต่ละหน่วยซ้ำสูง สามารถใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกัน หรือสามารถแยกความแตกต่างภายในสปีชีส์เดียวกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Godwin *et al*., 1997) เมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่นที่ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มเหมือนกัน เช่น RAPD เครื่องหมาย ISSR จะให้แถบดีเอ็นเอมากกว่า และแถบดีเอ็นเอที่ได้ก็จะมีโพลีมอร์ฟิซึมสูงกว่า นอกจากนี้ยังสามารถทำได้ง่าย ใช้ระยะเวลาไม่นาน ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบส และมีต้นทุนต่ำกว่าการทำ SSR ดังนั้นจึงเป็นอีกเทคนิคที่มีการใช้ประโยชน์ทางพันธุศาสตร์เช่นเดียวกันตัวอย่างเช่น มีการนำเครื่องหมาย ISSR มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะการศึกษาข้อมูลเพื่อการเก็บรวบรวมพันธุกรรมพืชในธนาคารเชื้อพันธุ์ Manimekalai และ Nagarajan (2006) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างมะพร้าวที่เก็บรวบรวมจากทั่วโลกในธนาคารเชื้อพันธุ์พืชของประเทศอินเดีย จำนวน 33 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 30 ชนิด ผลการศึกษาได้แถบดีเอ็นเอจำนวนทั้งสิ้น 199 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 154 แถบ ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของแต่ละตัวอย่างมีค่าอยู่ระหว่าง 0.526 - 0.855 โดยมะพร้าวต้นเตี้ยมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกับมะพร้าวต้นสูงมากที่สุด นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งกลุ่มได้ตามความแตกต่างของแหล่งพันธุกรรมที่มาของตัวอย่าง

Fang และ Roose (1997) ใช้เครื่องหมาย ISSR แยกความแตกต่างของส้มจำนวน 6 กลุ่ม 68 พันธุ์ ซึ่งแต่ละกลุ่มมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก และการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่นไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ ผลจากการใช้ไพรเมอร์ จำนวน 22 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าสามารถแยกความแตกต่างของส้มในกลุ่มต่าง ๆ ได้ดังนี้ ในกลุ่ม sweet orange สามารถแยกต้นส้ม 14 ต้น ออกจากต้นส้มทั้งหมด 33 ต้น กลุ่ม grape fruit แยกต้นส้ม 1

ต้น ออกจากต้นส้มในกลุ่ม 7 ต้น กลุ่ม lemon แยกต้นส้ม 5 ต้น ออกจากกลุ่ม 6 ต้น กลุ่ม citrange แยกต้นส้ม 4 ต้น ออกจากกลุ่ม 5 ต้น นอกจากนี้ยังสามารถคัดเลือกเครื่องหมาย ISSR ที่มีความจำเพาะกับลักษณะต้านทานต่อไส้เดือนฝอยของต้นส้มได้อีกด้วย Hamana และคณะ (2006) พัฒนาเครื่องหมาย ISSR เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และตรวจสอบความแปรปรวนของต้นอินทผลัมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงผ่านกระบวนการ somatic embryogenesis ผลที่ได้จากการตรวจสอบพบว่า แต่ละพันธุ์มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง Bornet และ Branchard (2004) พบว่าเครื่องหมาย ISSR ทั้งชนิดที่เป็น non-anchored และ anchored มีประสิทธิภาพในการจำแนกและศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชตระกูลกะหล่ำที่เป็น diploid และ amphidiploid โดยพบว่า *Arabidopsis thaliana* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับสปีชีส์อื่นๆ น้อยที่สุด ในพืชตระกูลกะหล่ำที่ทำการศึกษา

นอกจากนี้ยังมีการใช้ทั้งเทคนิค RAPD และ ISSR ร่วมกันในการศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมพืช เช่น Pharmawati และคณะ (2004) ประยุกต์ใช้เครื่องหมาย RAPD และ ISSR เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสปีชีส์ของ Grevillea พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองให้ระดับโพลีมอร์ฟิซึมสูง สามารถใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการจำแนกกลุ่มของ Grevillea เพื่อเปรียบเทียบกับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดย RAPD ให้เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันสูงถึง 99.39 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เครื่องหมาย ISSR ให้เปอร์เซ็นต์สูงถึง 99.51 เปอร์เซ็นต์ และผลจากการนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ร่วมกันโดยใช้เครื่องหมาย RAPD จำนวน 401 แถบ และ ISSR จำนวน 280 แถบ โดยวิธีการของ Jaccard พบว่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์มีค่าอยู่ระหว่าง 0.104 - 0.595 สามารถจัดกลุ่ม Grevillea 16 จีโนไทป์ ได้ 3 กลุ่ม Raina และคณะ (2001) ใช้เครื่องหมาย RAPD และ ISSR วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกสายพันธุ์ถั่วลิสงพันธุ์ปลูก (*Arachis hypogaea*) และพันธุ์พื้นเมืองในกลุ่ม *Arachis* โดยใช้ไพรเมอร์ RAPD จำนวน 21 ชนิด และ ISSR จำนวน 29 ชนิด ให้ค่าดัชนีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 0.1 - 0.5 ผลการวิเคราะห์เดนโดรแกรมที่ได้จาก RAPD และ ISSR โดยภาพรวมไม่แตกต่างกัน สามารถจัดกลุ่มถั่วลิสงจำนวน 13 ตัวอย่าง ตามลำดับความสัมพันธ์ได้ 4 กลุ่ม โดยพบว่า *Arachis monticola* และ *Arachis hypogaea* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง ในขณะที่การศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของ ถั่วเขียวผิวดำ (*Vigna mungo*) โดย Ajibade และคณะ (2001) พบว่าการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ISSR มีประสิทธิภาพกว่าการใช้เทคนิค RAPD โดยเครื่องหมาย ISSR ให้เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 57.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ RAPD ให้เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างเพียง 42.7 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่ได้จากการศึกษาระหว่างสองเทคนิคมีค่าสหสัมพันธ์ต่ำ (r=0.32) สอดคล้องกับการศึกษาในพืชชนิดอื่นอีก

หลายชนิด Souframanien และ Gopalakrishna (2004) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเขียว 18 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับเทคนิค RAPD จำนวน 25 ไพรเมอร์ และไพรเมอร์สำหรับเทคนิค ISSR จำนวน 16 ไพรเมอร์ พบว่า RAPD ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 104 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 44 แถบ หรือ 1.8 แถบต่อไพรเมอร์ ในขณะที่ ISSR ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 101 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 55 แถบ หรือ 6.3 แถบต่อไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์สำหรับเทคนิค ISSR ที่มี 3'-enchored polyGA และ 3'-enchored polyAG ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันสูงสุด คือ 54.98 เปอร์เซ็นต์ และ 58.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากการใช้ร่วมกับ RAPD แล้ว ยังมีการนำเครื่องหมาย ISSR ประยุกต์ใช้ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลชนิดอื่นในการใช้ประโยชน์ เช่น Dipak และคณะ (2000) ใช้เครื่องหมาย ISSR ร่วมกับ RAPD และไอโซไซม์ ในการวิเคราะห์ QTL (quantitative trait loci) เพื่อจัดทำแผนที่ยีนที่ต้านทานต่อโรค ascochyta blight ใน chick pea เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรตาลโตนด จากแหล่งพันธุกรรมต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค RAPD และเทคนิค ISSR