



การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros*
ในภาคใต้โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

Genetic Diversity of *Diospyros* spp. in Southern Thailand Based on RAPD
(Random Amplified Polymorphic DNA) Technique

แพรวพรรณ เกษมุล

Praewphan Ketsamul

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for The Degree of
Master of Science in Plant Science
Prince of Songkla University

2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ใน
ภาคใต้ของประเทศไทยโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

ผู้เขียน นางสาวแพรวพรรณ เกษมุล

สาขาวิชา พืชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

คณะกรรมการสอบ

(รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)

.....ประธานกรรมการ

(ดร.กรกช นาคคนอง)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์มંગคณ แซ่หลิม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำหรับ
การศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มี
ส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวแพรวพรรณ เกษมุล)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการขออนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้การในยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวแพรวพรรณ เกษมุล)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล <i>Diospyros</i> ในภาคใต้โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี
ผู้เขียน	นางสาวแพรวพรรณ เกษมกุล
สาขาวิชา	พืชศาสตร์
ปีการศึกษา	2556

บทคัดย่อ

การศึกษาคครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้ของประเทศไทย โดยเก็บรวบรวมพืชสกุล *Diospyros* จากจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี ตรัง พัทลุง และสงขลา จำนวน 16 ชนิด (species) 94 ต้น และไม่ทราบชนิดอีก 2 ต้น รวมทั้งสิ้น 96 ต้น ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ร่วมกับการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการประเมินความผันแปรและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างชนิดพืช การทดสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีใช้ไพรเมอร์จำนวน 60 ไพรเมอร์ คัดเลือกเหลือเลือกเพียง 8 ไพรเมอร์ เพื่อศึกษาคความแปรปรวนของตัวอย่างพืชที่เก็บมาทั้งหมด จากพืชสกุล *Diospyros* 16 ชนิด และไม่ทราบชนิดอีก 1 ตัวอย่าง ให้แถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 168 แถบ เป็นแถบที่ให้ความแตกต่างจำนวน 167 แถบ (99.40 %) เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี UPGMA จากโปรแกรม NTSYS (Version 2.1) ทั้ง 94 ตัวอย่างมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.409 – 1.000 เฉลี่ยเท่ากับ 0.580 สามารถแบ่งกลุ่มพืชที่ศึกษาได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ส่วนในกลุ่มย่อยสามารถแยกตามชนิดค่อนข้างชัดเจน และพบว่าพืชสกุล *Diospyros* ที่ศึกษาคครั้งนี้ มะพลับ (*D. areolata*) และมะริด (*D. philippensis*) มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด ในขณะที่เนียน (*D. diepenhorstii*) และดำตะโก (*D. wallichii*) มีความห่างไกลทางพันธุกรรมสูงที่สุด ตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิดอีก 2 ต้น (unknown) มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับอินจัน (*D. decandra*) มากกว่าชนิดอื่น เมื่อพิจารณาภายในกลุ่มพืชชนิดเดียวกัน พบว่าเนียน (*D. diepenhorstii*) มีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงกว่ากลุ่มอื่น (ค่าดัชนีใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่าง 0.565 - 1.000)

Thesis Title	Genetic Diversity of <i>Diospyros</i> spp. in Southern Thailand Based on RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Technique
Author	Miss Praewphan Ketsamul
Major Program	Plant Science
Academic Year	2013

ABSTRACT

The purpose of this study is to assess genetic diversity among 96 samples of *Diospyros* collected from southern Thailand (Chumphon, Surathani, Thang, Phatthalung and Songkhla province). Total 96 samples of 16 species and 2 unknown were first identified by morphological characteristics. RAPD markers (Random Amplified Polymorphic DNA) were then used to assess the genetic variation of the populations. Total of sixty 10 – base oligonucleotide primers for RAPD were first screened, and 8 primers were chosen to assess genetic variation among samples. From total 168 fragments generated by those primers, 167 were polymorphism (99.40%). Genetic similarities and relationships among 96 samples were estimated and a cluster analysis was performed using NTSYS program (Version 2.1). We found that genetic similarity among samples ranged from 0.409 – 1.000 with an average 0.580. The dendrogram showed that the 96 individuals were classified into four groups that clearly separated each species. From 16 species studied, the most similarity was found between *D. diepenhorstii* and *D. wallichii* while the most distance was between *D. diepenhorstii* and *D. philippensis*. The two unknowns were found to be closer to *D. decandra* than other species.

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.จรัสศรี นวลศรี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูง ที่กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัย และแก้ไขปัญหาต่างๆ รวมทั้งอบรมสั่งสอนแนวทางการวิจัย ตรวจสอบแก้ไข และการเขียนวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ดร.กรกช นาคคณอง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์มงคล แซ่หลิม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการ การศึกษาพันธุกรรมของผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองในภาคใต้ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบพระคุณทบวงมหาวิทยาลัย บัณฑิตวิทยาลัย ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนเงินทุนส่วนหนึ่งในการทำวิทยานิพนธ์ และอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการ ตลอดจนวัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ

ขอขอบคุณ สวนพฤกษศาสตร์วรรณคดีภาคใต้ (ทุ่งค่าย) อำเภอย่านตาขาว จังหวัดตรัง สวนพฤกษศาสตร์ภาคใต้ (เขาช่อง) อำเภอนาโยง จังหวัดตรัง สวนพฤกษศาสตร์สากลภาคใต้ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา สวนรุกขชาติเขาพุทธทอง อำเภอไชยา จังหวัดสุราษฎร์ธานี ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร สวนเกษตรกร และผู้ให้ความอนุเคราะห์เอื้อเฟื้อตัวอย่างพืชสกุล *Diospyros* ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ชาย พี่จอย พี่ใหญ่ พี่น้ำ พี่ช ออย บ๊อค เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่สุนีย์ เกษมุล ที่ให้การสนับสนุนและคอยเป็นกำลังใจที่สำคัญให้ผู้เขียนมาโดยตลอดจนสำเร็จการศึกษา

แพรวพรรณ เกษมุล

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(10)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	14
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	15
วัสดุ และอุปกรณ์	15
วิธีการ	20
3. ผล	25
4. วิจารณ์	49
5. สรุป	54
เอกสารอ้างอิง	55
ภาคผนวก	60
ประวัติผู้เขียน	76

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า	
1	ชื่อวิทยาศาสตร์ และชื่อไทยของพืชสกุล <i>Diospyros</i> ที่พบในประเทศไทย	4
2	ชนิด (species) จำนวนตัวอย่าง และสถานที่เก็บตัวอย่างพืชสกุล <i>Diospyros</i> ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี	15
3	ชนิดไพรเมอร์ ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันและจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในพืชสกุล <i>Diospyros</i> จำนวนทั้งหมด 96 ต้น	36
4	ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุล <i>Diospyros</i> แต่ละชนิด	38
ตารางภาคผนวกที่		หน้า
1	ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบ ลำดับเบสของไพรเมอร์ และผลที่ได้จากการทดสอบอาร์เอพีดี – พีซีอาร์ กับดีเอ็นเอของพืชสกุล <i>Diospyros</i> 96 ตัวอย่าง	63

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะเปลือกลำต้นของพืชสกุล <i>Diospyros</i> ที่สุ่มเก็บในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย	25
2	การกระจายตัวของลักษณะเปลือกลำต้นในกลุ่มประชากรพืชสกุล <i>Diospyros</i> ที่สุ่มเก็บในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย	26
3	ลักษณะรูปร่างใบของพืชสกุล <i>Diospyros</i> ที่สุ่มเก็บในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย	27
4	การกระจายตัวของลักษณะรูปร่างใบในกลุ่มประชากรพืชสกุล <i>Diospyros</i> ที่สุ่มเก็บในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย	29
5	ลักษณะปลายใบของพืชสกุล <i>Diospyros</i> ที่สุ่มเก็บในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย	33
6	การกระจายตัวของลักษณะปลายใบในกลุ่มประชากรพืชสกุล <i>Diospyros</i> ที่สุ่มเก็บในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย	29
7	ลักษณะขอบใบของพืชสกุล <i>Diospyros</i> ที่สุ่มเก็บในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย	30
8	การกระจายตัวของลักษณะขอบใบในกลุ่มประชากรพืชสกุล <i>Diospyros</i> ที่สุ่มเก็บในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย	30
9	ลักษณะฐานใบของพืชสกุล <i>Diospyros</i> ที่สุ่มเก็บในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย	31
10	การกระจายตัวของลักษณะฐานใบในกลุ่มประชากรพืชสกุล <i>Diospyros</i> ที่สุ่มเก็บในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย	32
11	ลักษณะดอกและช่อดอกของพืชสกุล <i>Diospyros</i> ที่สุ่มเก็บในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย	33
12	ลักษณะผลของพืชสกุล <i>Diospyros</i> ที่สุ่มเก็บในภาคใต้ตอนล่างของประเทศไทย	33
13	แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล <i>Diospyros</i> จำนวน 16 ชนิดกับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPB-05	39
14	แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล <i>Diospyros</i> จำนวน 16 ชนิดกับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPB-10	40

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล <i>Diospyros</i> จำนวน 16 ชนิดกับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPB-11	41
16	แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล <i>Diospyros</i> จำนวน 16 ชนิดกับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPB-12	42
17	แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล <i>Diospyros</i> จำนวน 16 ชนิดกับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPJ-05	43
18	แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล <i>Diospyros</i> จำนวน 16 ชนิดกับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPM-05	44
19	แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล <i>Diospyros</i> จำนวน 16 ชนิดกับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPM-06	45
20	แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล <i>Diospyros</i> จำนวน 16 ชนิดกับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPY-15	46
21	เดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพืชสกุล <i>Diospyros</i> จำนวน 16 ชนิดกับอีก 2 unknown จำนวน 96 ตัวอย่าง จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ 8 ไพรเมอร์	48
ภาพผนวกที่		หน้า
1	ลักษณะลำต้นแบบเปลือกแตกของพืชสกุลพืชสกุล <i>Diospyros</i>	66
2	ลักษณะลำต้นแบบเปลือกเรียบของพืชสกุลพืชสกุล <i>Diospyros</i>	67
3	ลักษณะรูปร่างใบแบบขอบขนานของพืชสกุลพืชสกุล <i>Diospyros</i>	68
4	ลักษณะรูปร่างใบแบบรูปไข่ของพืชสกุลพืชสกุล <i>Diospyros</i>	69
5	ลักษณะรูปร่างใบแบบรูปไข่กลับ รูปหัวใจ และรูปรีของพืชสกุลพืชสกุล <i>Diospyros</i>	70
6	ลักษณะปลายใบมนของพืชสกุลพืชสกุล <i>Diospyros</i>	70
7	ลักษณะปลายใบแหลมของพืชสกุลพืชสกุล <i>Diospyros</i>	71
8	ลักษณะปลายใบเรียวแหลมของพืชสกุลพืชสกุล <i>Diospyros</i>	72
9	ลักษณะฐานใบมน และฐานใบรูปของพืชสกุลพืชสกุล <i>Diospyros</i>	72
10	ลักษณะฐานใบแหลมของพืชสกุลพืชสกุล <i>Diospyros</i>	73

รายการภาพ (ต่อ)ข

ภาพผนวกที่	หน้า
11 ลักษณะดอกและช่อดอกของพืชสกุลพืชสกุล <i>Diospyros</i>	74
12 ลักษณะผลของพืชสกุลพืชสกุล <i>Diospyros</i>	75

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

ภาคใต้ของประเทศไทยเป็นถิ่นกำเนิด ของแหล่งพันธุกรรมพืชเขตร้อนที่สำคัญ แห่งหนึ่งในภูมิภาคตะวันออกเฉียงใต้ มีพืชหลากหลายประเภททั้งที่เป็นพันธุ์ปลูก และพันธุ์ป่า หลายชนิด พืชเหล่านี้มีบทบาทต่อความเป็นอยู่ และวิถีชีวิตของคนในพื้นที่มายาวนาน แต่ใน ขณะเดียวกันก็มีภัยคุกคามต่อพันธุ์พืชเหล่านั้น ทั้งที่เกิดจากฝีมือมนุษย์ สภาพแวดล้อมที่ เปลี่ยนแปลง และภัยธรรมชาติ ทำให้พืชพรรณหลายชนิดลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว และบางชนิด ใกล้สูญพันธุ์ พืชสกุล *Diospyros* หรือพืชในวงศ์มะเกลือเป็นพืชอีกสกุลหนึ่งที่อยู่ในภาวะถูก คุกคามและใกล้สูญพันธุ์ เนื่องจากเกษตรกรต้องการพื้นที่สำหรับปลูกพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ ยางพารา ปาล์มน้ำมัน ทำให้พื้นที่ป่าถูกทำลายส่งผลกระทบต่อจำนวนต้นพืชสกุล *Diospyros* และพรรณไม้อื่น ๆ พืชสกุลนี้ที่พบในภาคใต้มีหลายชนิดด้วยกัน เช่น มะพลับ เนียน ตะโกสวน ตะโกนา เป็นต้น ดังนั้นการรักษาความหลากหลายของพืชเหล่านี้จึงมีความสำคัญ เพื่อป้องกัน ไม่ให้เกิดการสูญหาย เป็นประโยชน์ในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช และการใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ต่อไป

คณะทรัพยากรธรรมชาติได้ตระหนักถึงปัญหาดังกล่าวจึงได้จัดทำโครงการ อนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระรัตนราชสุตาฯ สยามบรมราชกุมารี พืชสกุล *Diospyros* เป็นพืชอีกสกุลหนึ่งที่อยู่ในโครงการ การศึกษาพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* และศึกษาความสัมพันธ์ของกลุ่มพืชที่อยู่ในสกุลเดียวกัน จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

การศึกษาพันธุกรรมพืช และจำแนกชนิดพืชสามารถศึกษาได้หลายวิธี เช่น การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นเครื่องหมายดั้งเดิมที่ใช้ในอดีต อย่างไรก็ตามลักษณะ สัณฐานมีข้อจำกัดหลายประการ พืชบางพันธุ์มีลักษณะต่าง ๆ ใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถแยก ความแตกต่างได้โดยสายตา ผู้ประเมินต้องมีความเชี่ยวชาญ หรือในกรณีของไม้ยืนต้นหากใช้ดอก หรือผลเป็นเครื่องหมาย ระยะเวลาจนถึงช่วงออกดอกและติดผลอาจต้องใช้เวลาอันนับปีถึงหลาย ปี จึงทำการตรวจสอบได้ จากข้อจำกัดเหล่านี้จึงมีความจำเป็นต้องนำเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพ

มาใช้ในการศึกษา ซึ่งการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง และเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการศึกษาจำแนกพันธุ์และศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรม เทคนิคทางด้านโมเลกุลมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น อาร์เอฟแอลพี (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) เอเอฟแอลพี (AFLP: Amplification Fragment Length Polymorphism) อาร์เอพีดี (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA) ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellite) เป็นต้น การศึกษาโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี ทำได้ง่าย ไม่ยาก และไม่ซับซ้อน ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก มีการนำเครื่องหมายนี้มาใช้อย่างกว้างขวาง เช่น การจำแนกพันธุ์พืช (Koller *et al.*, 1993) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและตรวจสอบความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Nugyen *et al.*, 1993) ดังนั้นการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาควบคู่กับการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ทำให้การผลการประเมินความผันแปรของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

2. ตรวจสอบเอกสาร

พืชสกุล *Diospyros* จัดอยู่ในวงศ์ Ebenaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศจีน พืชในวงศ์นี้มีทั้งหมด 6 สกุล ประมาณ 500 ชนิดทั่วโลก ในประเทศไทยมีรายงานว่าพบพืชในวงศ์นี้เพียงสกุลเดียวคือ *Diospyros* ประมาณ 60 ชนิด (Utsunomiya *et al.*, 1998) พืชสกุลนี้ส่วนใหญ่ใช้ประโยชน์จากไม้ มีบางชนิดที่ใช้ประโยชน์จากผล เช่น พลับ (*Diospyros kaki* L.) นับว่าเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งที่กำลังนิยมในปัจจุบัน โดยมีการนำเข้าจากประเทศจีน มาทดลองปลูกเป็นครั้งแรกที่สถานีทดลองอ่างขาง และสถานีทดลองดอยปุย จังหวัดเชียงใหม่ (เฉลิมพล, 2539) สำหรับภาคใต้ของประเทศไทยพืชสกุล *Diospyros* ชนิดที่พบได้แก่ มะพลับ (*Diospyros areolata* King.), มะพลับดง (*D. bejaudii* Lecomte.), สั้ทำ (*D. buxifolia* Hiern.), เท้าแสนปม (*D. cauliflora* Blume.), จันอิน (*D. decandra* Lour.), เนียน (*D. diepenhorstii* Miq.), ลำบิด (*D. ferrea* Bakh.), ลำบิดดง (*D. filipendula* Pierre.), ตะโกสวน (*D. malabarica* Kostel.), มะเกลือ (*D. mollis* Griff.), ตาลดำ (*D. montana* Roxb.), มะริด (*D. philippensis* Gurke.), พญารากดำ (*D. rubra* Lecomte.), ตะโกนา (*D. rhodocalyx* Kurz.), ม่าย (*D. transitoria* Bakh.) และ ดำตะโก (*D. wallichii* King.) เป็นต้น พืชสกุลนี้หลายชนิดมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางบางชนิดสามารถรับประทานผลสดได้ตัวอย่าง เช่น เนียน (*D. diepenhorstii*) มะพลับ (*D. areolata*) มะริด (*D. philippensis*) เป็นต้น และบางชนิด ใบเปลือก และผลสามารถนำมาตากแห้งเพื่อใช้ประโยชน์ในแง่ของสมุนไพร (Utsunomiya *et al.*, 1988) สำหรับใช้รักษาโรคที่รู้จักกันมานานคือ ผลของมะเกลือ (*D. mollis*) มีสารสำคัญ คือ สารได

โอสปีโรลไดกลูโคไซด์ (Diospyrol-diglucoside) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม naphthalene มีคุณสมบัติใช้เป็นยาถ่ายพยาธิต่าง ๆ โดยเฉพาะพยาธิปากขอ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นยาธาตุ แก่ท้องเดิน รักษาโรคความดันโลหิตได้อีกด้วย (ประพิมพ์พัคตร์, 2549)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพืชสกุล *Diospyros* คือพลับขอดำมีสารกลุ่มสติลปินอยด์ 2 ชนิด คือ diptoindonesin D และ diptoindonesin G ซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย *plasmodium falciparum* และแสดงฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปอดและมะเร็งเต้านมของมนุษย์ (บันชิตา, 2554) และรากลำบิดตง (*D. filipendula*) มีสาร stigmastuol taraxerol (อารี, 2553) นอกจากนี้ใช้ประโยชน์ในแง่ของสมุนไพร พืชบางชนิดในสกุล *Diospyros* ยังใช้เป็นสีย้อมแหหรืออวนได้อีกด้วย เช่น *D. cauliflora*, *D. rhodocalyx*, *D. areolata*, *D. gruelis* และ *D. eastanea* (Utsunomiya *et al.*, 1988) พืชสกุล *Diospyros* ที่พบเห็นได้ในประเทศไทยดังแสดงในตารางที่ 1 Utsunomiya และคณะ (1988) แบ่งกลุ่มชนิดของ *Diospyros* ในประเทศไทยได้ดังนี้

1. แบ่งกลุ่มชนิดของ *Diospyros* ตามนิเวศวิทยาของพืชได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

1.1 ชนิดที่ขึ้นในสภาพพื้นที่ชุ่มชื้น (Wet) ได้แก่ *D. confertiflora*, *D. toposia*, *D. sumatrana*, *D. cauliflora*, *D. wallichii*, *D. transitoria* และ *D. areolata*

1.2 ชนิดที่ขึ้นในสภาพพื้นที่ชุ่มชื้นและแห้งแล้ง (Wet and dry) ได้แก่ *D. castanea*, *D. montana*, *D. mollis*, *D. rubura*, *D. ehretioides*, *D. rhodocalyx*, *D. gracilis* และ *D. variegata*

1.3 ชนิดที่ขึ้นในสภาพชุ่มชื้นแต่อากาศหนาวเย็น (Cool and wet) ได้แก่ *D. glandulosa* เพียงชนิดเดียว

1.4 ชนิดที่ขึ้นได้ในสภาพทั่วไป ยกเว้นในสภาพที่อากาศหนาวเย็น (Whole country except for cool area) ได้แก่ *D. decandra* และ *D. malabarica*

2. แบ่งกลุ่มชนิดของ *Diospyros* ตามปริมาณของสาร tannin ที่เป็นองค์ประกอบในเซลล์ผลได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

2.1 ชนิดที่ไม่มีปริมาณสาร tannin เป็นองค์ประกอบในเซลล์ผลได้แก่ *D. rhombifolia*, *D. montana*, *D. wallichii* และ *D. mollis*

2.2 ชนิดที่มีปริมาณสาร tannin ในเซลล์ผลอยู่ในช่วง 10 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ แก่ *D. ehretioides* เพียงชนิดเดียว

ตารางที่ 1 ชื่อวิทยาศาสตร์ และชื่อไทยของพืชสกุล *Diospyros* ที่พบในประเทศไทย

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อไทย
<i>Diospyros kaki</i> L.	พลับจีน, พลับญี่ปุ่น
<i>D. areolata</i> King & Gamble	มะพลับ
<i>D. bejardii</i> Lecomte.	พลับดง
<i>D. decandra</i> Lour.	จันทน์หอม, จันอิน อิน (ภาคกลาง)
<i>D. pubicalyx</i>	ดำดง
<i>D. rhodocalyx</i> Kurz.	ตะโกนา
<i>D. malabarica</i> kostel	ตะโกสวน
<i>D. mollis</i> Griff.	มะเกลือ
<i>D. philippensis</i> Gurke.	มะริด
<i>D. transitoria</i> Bakh.	ม่าย
<i>D. montana</i> Roxb.	ตาลดำ
<i>D. wallichii</i> King & Gamble ex King.	ดำตะโก
<i>D. ferrea</i> Bakh.	ลำบิด
<i>D. filipendula</i> Pierre ex Lecomte.	ลำบิดดง
<i>D. cauliflora</i> Blume.	เท้าแสนปม
<i>D. rubra</i> Lecomte.	พญาธำมรงค์
<i>D. buxifolia</i> (Blume) Hiern.	สั่งทำ
<i>D. latisepala</i> Ridl.	เทพพนม
<i>D. curranii</i> Merr.	นั่งจ้อย, รักดำ
<i>D. diepenhorstii</i> Miq	เนี่ยน
<i>D. ehretoides</i> Wall.	ต้นตับเต่า
<i>D. venosa</i> Wall.	จันดำ
<i>D. dasyphylla</i> Kurz.	จันดง, จันเขา
<i>D. glandulosa</i> Lace	กล้วยฤาษี
<i>D. dasyphylla</i> Kurz.	จันดง, จันเขา

ที่มา : เต็ม (2544)

2.3 ชนิดที่มีปริมาณสาร tannin ในเซลล์ผลอยู่ในช่วง 30 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *D. gracilis*, *D. oleifera*, *D. areolata*, *D. kaki*, *D. glandulosa*, *D. cauliflora* และ *D. virginiana*

2.4 ชนิดที่มีปริมาณสาร tannin ในเซลล์ผลอยู่ในช่วงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ *D. decandra*, *D. lotus*, *D. rhodocalyx* และ *D. malabarica*

ลักษณะสัณฐานวิทยาทั่วไปของพืชสกุล *Diospyros* จัดเป็นไม้พุ่มถึงไม้ขนาดใหญ่ มีความหลากหลาย ลักษณะใบจะเรียงสลับระนาบเดียวกัน (alternate) ดอกแยกเป็นเพศผู้ และเพศเมียอยู่ต่างต้น หรืออาจอยู่บนต้นเดียว ดอกออกเป็นช่อกระจุกสั้น ๆ หรืออาจออกเป็นดอกเดี่ยวตามซอกใบ กิ่ง และลำต้น กลีบดอกเชื่อมติดกัน เกสรเพศผู้มีตั้งแต่ 4 อันหรือมากกว่านั้น ยอดเกสรเพศเมียแยกเป็น 2 แฉก (วิทย์, 2531) ลักษณะผล ขนาด และรูปร่างค่อนข้างแตกต่างกันมากในแต่ละชนิด ชนิดที่มีผลขนาดใหญ่คือ *D. decandra* บางชนิดมีผลขนาดเล็ก เช่น *D. conferflora* บางชนิดผลมีขนขึ้นปกคลุมขณะที่ผลยังอ่อนอยู่และค่อย ๆ หายไปเมื่อผลสุก แต่ผลของ *D. wallichii* และ *D. areolata* จะยังมีขนหนาแน่นแม้ว่าผลจะสุกแล้วก็ตาม (Utsunomiya et al., 1988) เนื่องจากพืชสกุลนี้ค่อนข้างมีความหลากหลายในลักษณะสัณฐาน ดังนั้นจึงขอ ยกตัวอย่าง บางชนิดที่เป็นที่รู้จัก และมีการนำมาใช้ประโยชน์แล้ว ดังต่อไปนี้

1. พลับหรือพลับญี่ปุ่น (*D. kaki* L.) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ผลัดใบ กิ่งก้านมีขน สีน้ำตาล ใบ มีลักษณะเป็นรูปไข่กลม แผ่นใบด้านบนจะมัน ส่วนด้านล่างจะมีขน ดอก มีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่คนละดอกมีสีนวล ผล มีขนาดใหญ่ กลมแป้น เมื่อสุกผิวผลจะมีสีเหลืองอมส้ม มีความนิ่ม ภายในมีเนื้อนุ่มๆ และมีเมล็ดแบน สีน้ำตาลฝังอยู่มากกว่าหนึ่งเมล็ด ซึ่งมีพันธุ์ที่ สำคัญได้แก่ พันธุ์ Fuyu เป็นพลับหวาน มีผลขนาดใหญ่, พันธุ์ P1 เป็นพลับฝาด มีผลขนาดใหญ่ พันธุ์ชื่อใจ หรือชิวู (Xichu) P2 เป็นพลับฝาด และเป็นพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้ามากที่สุดในประเทศไทย โดยเฉพาะพื้นที่ในเขตส่งเสริมของมูลนิธิโครงการหลวง, พันธุ์อั้งไธ (Ang-sai) หรือ P3 เป็นพลับฝาดผลค่อนข้างเล็ก, พันธุ์นูชิน (Niu scin) หรือ P4 เป็นพลับฝาดมีผลขนาดใหญ่, พันธุ์ Hyakume เป็นพลับไม่ฝาดมีผลค่อนข้างใหญ่, พันธุ์ฮาชิยา (Hachiya) เป็นพลับมีรสหวาน พันธุ์ไนติงเกล (Nightingale) เป็นพลับฝาด เมื่อสุกเต็มที่จะมีรสหวาน, พันธุ์อิราทาเนนาชิ (Hiratanenashi) เป็นพลับฝาดมีขนาดปานกลางถึงใหญ่ และพันธุ์จิโร (Jiro) เป็นพลับหวาน เป็นต้น พบทางภาคเหนือของประเทศไทย การใช้ประโยชน์ ผลสุก ใช้รับประทานเป็นผลไม้ นำมาเชื่อม ทำลูกพลับแห้ง ทำน้ำผลไม้ คุณค่าทางโภชนาการ สรรพคุณ ผลสุก เป็นยาธาตุ แก้ท้องเดิน ก้าน

ผล กลีบเลี้ยง ใช้แก้อาการสะอึก และแก้ไอ น้ำจากผลดิบ ใช้รักษาโรคความดันโลหิต (เฉลิมพล, 2539; วีระศักดิ์ และคณะ, 2542; เกียรติศักดิ์, 2545)

2. มะพลับ (*D. areolata* King & Gamble) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูงถึง 15 เมตร เปลือกลำต้นแตกเป็นสะเก็ดเล็กๆ ตามยาว สีน้ำตาล ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับกัน ตัวใบรูปขอบขนาน โคนใบแหลม ขอบใบเรียบ ปลายใบมน เนื้อใบหนา ผิวเกลี้ยงทั้งสองด้าน หรือมีขนประปรายบ้างตามเส้นกลางใบด้านล่าง เส้นใบมี 6-12 คู่ ก้านใบยาว 1.0-1.5 เซนติเมตร ดอกเพศผู้ออกเป็นช่อสั้นๆ ตามง่ามใบ ก้านดอกยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ดอกเพศเมียมีกอกอกเดี่ยว ๆ ตามกิ่งเล็ก ๆ ก้านดอกยาว 5-10 มิลลิเมตร ผล กลมหรือค่อนข้างกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5-3.5 เซนติเมตร ผลแก่ค่อนข้างนุ่ม ผิวมีสีน้ำตาลแดงคลุม กลีบจุกลีบแต่ละกลีบเกือบไม่ติดกัน พบได้ทางภาคใต้ของประเทศไทย สรรพคุณ เปลือกลำต้นและเนื้อไม่มีรสฝาดมีสรรพคุณ บำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้ท้องร่วง ขับผายลม แก้กามตายด้าน บำรุงความกำหนัด ยางของลูกมะพลับนำมาละลายน้ำใช้ย้อมแหและอวน เพื่อให้ทนทานเช่นเดียวกับตะโก แต่ยางของลูกมะพลับใช้ได้ดีกว่ามาก เพราะไม่ทำให้เส้นด้ายแข็งกรอบเหมือนผลตะโก (ก่องกานดา, 2540; วีระศักดิ์ และคณะ, 2542)

3. มะพลับดง (*D. bejaudii* Lecomte.) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูง 15-20 เมตร ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับกัน รูปร่างใบเป็นขอบขนาน โคนใบมน ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม เนื้อใบหนา ผิวเกลี้ยงทั้งสองด้าน หรือมีขนประปรายบ้างตามเส้นกลางใบด้านล่าง เส้นใบมี 6-12 คู่ ก้านใบยาว 1.0-1.5 เซนติเมตร ดอกเพศผู้ออกเป็นช่อสั้นๆ ตามง่ามใบ ก้านดอกยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ดอกเพศเมียมีกอกอกเดี่ยว ตามกิ่ง ก้านดอกยาว 5-10 มิลลิเมตร ผลกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5-3.5 เซนติเมตร ผลแก่ค่อนข้างนุ่ม ผิวมีสีเหลือง กลีบจุกลีบแต่ละกลีบเกือบไม่ติดกัน พบได้ทางภาคใต้ของประเทศไทย สรรพคุณ เนื้อไม่มีรสฝาดมีสรรพคุณ บำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้ท้องร่วง (วีระศักดิ์ และคณะ, 2542)

4. ส้มท่า (*D. buxifolia* Hiern.) ไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูง 8-15 เมตร เปลือกเรียบสีดำ ใบมีรูปร่างเป็นรูปไข่ เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ ปลายใบและโคนใบแหลม ขอบใบเรียบ ก้านใบยาว 5-10 เซนติเมตร ดอกสีขาว ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียแยกกันอยู่คนละดอก ภายในต้นเดียวกัน โดยที่ดอกเพศผู้ออกดอกรวมเป็นช่อสั้นๆ ตามซอกใบ กลีบเลี้ยง 4 กลีบ กลีบดอกโคนเชื่อมติดกันเป็นรูปเหยือกน้ำปลายแยก 4 กลีบ โค้งไปข้างหลัง ดอกเพศเมียออกเป็นดอกเดี่ยวคล้ายดอกเพศผู้แต่มีขนาดใหญ่กว่า ก้านดอกยาว 1-3 มิลลิเมตร ก้านเกสรตัวเมีย 4 แฉก รังไข่มีขน ผลสด รูปทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร ผิวเรียบเกลี้ยง ผลมีกลีบเลี้ยง

4 กลีบ ติดที่ขั้วของผล ผลดิบสีเขียว ผลสุกสีเหลืองอมดำ มีเมล็ด 2-3 เมล็ด ชั้นกลีบเลี้ยงขนาด 5 มิลลิเมตร พบได้ทางภาคใต้ของประเทศไทย สรรพคุณ ผลดิบมีสรรพคุณเป็นยาขับพยาธิปากขอ พยาธิตัวตืด พยาธิเส้นด้าย (ปวิณ และคณะ, 2538)

5. หัวแสมปม (*D. cauliflora* Blume.) ไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูง 8-15 เมตร เปลือกเรียบสีเขียวถึงดำ ใบมีรูปร่างเป็นรูปไข่ เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ ปลายใบและโคนใบแหลม ขอบใบมีลักษณะเป็นคลื่น ก้านใบยาว 5-10 เซนติเมตร ดอกสีขาว ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียแยกกันอยู่คนละดอกภายในต้นเดียวกัน โดยที่ทั้งดอกเพศผู้และเพศเมียออกดอกเป็นดอกเดี่ยวแต่ดอกเพศเมียแต่มีขนาดใหญ่กว่า ก้านดอกยาว 1-3 มิลลิเมตร ก้านเกสรตัวเมีย 4 แฉก รั้งไข่ม้วน ผลรูปทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร ผิวเรียบเกลี้ยง ผลมีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ ติดที่ขั้วของผล ผลดิบสีเขียว ผลสุกสีเหลืองอมดำ มีเมล็ด 2-3 เมล็ด ชั้นกลีบเลี้ยงขนาด 5 มิลลิเมตร พบได้ทางภาคใต้ของประเทศไทย สรรพคุณ ผลมีสรรพคุณเป็นยาบำรุงโลหิต (ปวิณ และคณะ, 2538)

6. ลูกจันทน์หอมหรืออินจัน (*D. decandra* Lour.) เป็นไม้ยืนต้น สูง 10-15 เมตร เปลือกลำต้นเรียบ สีน้ำตาล กิ่งก้านเหนียว ใบเดี่ยวเป็นรูปไข่ โคนใบมน ปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ แผ่นใบเรียบเป็นมันลื่น สีเขียวเข้ม ดอกแยกเพศอยู่ต้นเดียวกัน ดอกเพศผู้ออกเป็นช่อ ส่วนดอกเพศเมียออกดอกเดี่ยว ดอกสีขาวนวล กลีบดอกเชื่อมติดกันสั้นๆ ผล รูปกลมแป้นเรียกว่า ลูกจัน ผลกลม เรียกว่า อิน มีเมล็ด ผิวเรียบ ผลอ่อนสีเขียว ผลสุกสีเหลือง มีกลิ่นหอม รับประทานได้ที่ขั้วผลมีกลีบเลี้ยงติดแน่น พบได้ทางภาคใต้ของประเทศไทย สรรพคุณ เนื้อไม้ มีรสขม หวาน บำรุงประสาท บำรุงผิวหนังให้สดชื่น แก้ไข้ แก้ปวดตับพิการ แก้อ่อนในกระหายน้ำ ขับพยาธิ (กองกานดา, 2540; ปวิณ และคณะ, 2538)

7. เนียน (*D. diepenhorstii* Mip.) เป็นไม้ยืนต้นสูง 15-20 เมตร เปลือกลำต้นเรียบสีน้ำตาล กิ่งก้านเหนียว ใบมีรูปร่างเป็นขอบขนาน โคนใบแหลมขอบใบเรียบ ปลายใบแหลม เนื้อใบหนา ผิวเกลี้ยงทั้งสองด้าน เส้นใบมี 6-12 คู่ ก้านใบยาว 1.0-1.5 เซนติเมตร ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียออกเป็นช่อสั้นๆ ตามง่ามใบ ก้านดอกยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ผลกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5-3.5 เซนติเมตร ผลแก่ค่อนข้างแข็งมีขนปกคลุมหนาแน่น ผิวมีสีน้ำตาลอ่อนถึงแก่ กลีบจุกลผลแต่ละกลีบเชื่อมติดกัน พบได้ทางภาคใต้ของประเทศไทย สรรพคุณ ผลมีสรรพคุณบำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้ท้องร่วง (วีระศักดิ์ และคณะ, 2542)

8. ลำบิด (*D. ferrea* Blume.) เป็นไม้ยืนต้นสูง 10-15 เมตร เปลือกลำต้นแตกเป็นร่องมีสีน้ำตาลถึงดำ ใบมีรูปร่างเป็นรูปไข่ โคนใบและปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ เนื้อใบค่อนข้าง

บาง ผิวเกลี้ยงทั้งสองด้าน เส้นใบมี 6-12 คู่ ก้านใบยาว 1.0-1.5 เซนติเมตร ดอกสีขาวอมเหลือง ดอกเพศผู้และดอกเพศเมียแยกกันอยู่คนละดอกภายในต้นเดียวกัน โดยที่ดอกเพศผู้ออกดอกรวมเป็นช่อสั้นๆ ตามซอกใบ ก้านดอกยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ดอกเพศเมียออกเป็นดอกเดี่ยวคล้ายดอกเพศผู้แต่มีขนาดใหญ่กว่า ก้านดอกยาว 1-3 มิลลิเมตร ก้านเกสรตัวเมีย 4 แฉก รังไข่มีขน ผลกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5-3.5 เซนติเมตร ผลแก่อ่อนนุ่ม ผิวเกลี้ยงมีสีแดงอมส้ม กลีบจุกผลแต่ละกลีบเกือบไม่ติดกัน พบได้ทางภาคใต้ของประเทศไทย สรรพคุณ เปลือกลำต้นและเนื้อไม้มีรสฝาดมีสรรพคุณ บำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้ท้องร่วง ขับผายลม (ก่องกานดา, 2540; วีระศักดิ์ และคณะ, 2542)

9. ลำบิดคง (*D. filipendura* Lecomte.) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูง 15-20 เมตร เปลือกลำต้นเรียบสีน้ำตาลถึงดำ ใบเป็นใบเดี่ยวรูปขอบขนาน เรียงสลับกัน โคนใบและปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ เนื้อใบหนา ผิวเกลี้ยงทั้งสองด้าน เส้นใบมี 6-12 คู่ ก้านใบยาว 1.0-1.5 เซนติเมตร ดอกเพศผู้ออกเป็นช่อสั้นๆ ตามง่ามใบ ก้านดอกยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ดอกเพศเมียมักออกเดี่ยว ตามกิ่ง ก้านดอกยาว 5-10 มิลลิเมตร ผลกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5-3.5 เซนติเมตร ผลแก่ค่อนข้างนุ่ม ผิวมีสีส้มอมเหลือง กลีบจุกผลแต่ละกลีบเกือบไม่ติดกัน พบได้ทางภาคใต้ของประเทศไทย สรรพคุณ เนื้อไม้มีรสฝาดมีสรรพคุณ บำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้ท้องร่วง (วีระศักดิ์ และคณะ, 2542)

10. ตะโกสวน (*D. malabarica* kostel) เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก สูง 1-7 เมตร ใบเดี่ยวเรียงสลับ ใบ เป็นแบบขอบขนาน ปลายใบและโคนใบแหลม ขอบใบเรียบ ดอกช่อหรือดอกเดี่ยวออกตามซอกใบ ดอกแยกเพศ เพศผู้ออกเป็นช่อสั้นๆ กลีบเลี้ยง 3 กลีบ ดอกเพศเมียออกเป็นดอกเดี่ยว ผลเป็นรูปป้อมหรือกลม ผิวเปลือกหนา แข็ง นิเวศวิทยา และสรรพคุณไม่มีการรายงานชัดเจน (ปวิณ และคณะ, 2538)

11. มะเกลือ (*D. mollis* Griff.) ไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูง 8-15 เมตร เปลือกสีดำ แตกเป็นสะเก็ดเล็กๆ ตามยาว แก่นสีดำสนิท เนื้อละเอียดมันสวยงาม ทุกส่วนของมะเกลือเมื่อแห้งจะเปลี่ยนเป็นสีดำ ใบ เป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ ปลายใบและโคนใบแหลม ขอบใบเรียบ ก้านใบยาว 5-10 เซนติเมตร ใบเรียบมัน ดอกสีขาวหรือเหลืองอ่อน แยกเพศอยู่ต่างต้นกัน ดอกเพศผู้ออกรวมเป็นช่อสั้นๆ ตามซอกใบ กลีบเลี้ยง 4 กลีบ กลีบดอกโคนเชื่อมติดกันเป็นรูปเหยือกน้ำปลายแยก 4 กลีบโค้งไปข้างหลัง ดอกเพศเมียออกเป็นดอกเดี่ยวคล้ายดอกเพศผู้แต่มีขนาดใหญ่กว่า ก้านดอกยาว 1-3 มิลลิเมตร ก้านเกสรตัวเมีย 4 แฉก รังไข่มีขน ผลสด รูปทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร ผิวเรียบเกลี้ยง ผลมีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ ติดที่ขั้วของผล ผล

ดิบสีเขียว ผลสุกสีเหลืองอมดำ มีเมล็ด 2-3 เมล็ด ชั้นกลีบเลี้ยงขนาด 5 มิลลิเมตร พบได้ทางภาคใต้ของประเทศไทย สรรพคุณ ผล มะเกลือดิบมีสรรพคุณเป็นยาขับพยาธิปากขอ พยาธิตัวโต พยาธิเส้นด้าย ปัจจุบันมีการสกัดสารที่มีฤทธิ์ขับพยาธิจากผลมะเกลือแล้วผลิตเป็นยาเม็ดสำเร็จรูป รับประทาน (ปวิณ และคณะ, 2538)

12. ตาลดำ (*D. montana* Roxb.) ไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูง 8-15 เมตร เปลือกสีน้ำตาลเรียบ แก่นสีน้ำตาล โใบ เป็นใบเดี่ยวเป็นรูปหัวใจ โดยเรียงสลับ ใบเรียบมัน ปลายใบแหลม โคนใบเป็นรูปหัวใจ ขอบใบเรียบ ก้านใบยาว 5-10 เซนติเมตร ดอกสีขาวหรือเหลืองอ่อน แยกเพศอยู่ต่างต้นกัน ดอกเพศผู้ออกรวมเป็นช่อสั้นๆ ตามซอกใบ กลีบเลี้ยง 4 กลีบ กลีบดอกโคนเชื่อมติดกันเป็นรูปเหยือกน้ำปลายแยก 4 กลีบ โคนไปข้างหลัง ดอกเพศเมียออกเป็นดอกเดี่ยวคล้ายดอกเพศผู้แต่มีขนาดใหญ่กว่า ก้านดอกยาว 1-3 มิลลิเมตร ก้านเกสรตัวเมีย 4 แฉก รังไข่มีขน ผลสด รูปทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เซนติเมตร ผิวเรียบเกลี้ยง ผลมีกลีบเลี้ยง 4 กลีบ ติดที่ขั้วของผล ผลดิบสีเขียว ผลสุกสีเหลืองอมดำ มีเมล็ด 2-3 เมล็ด ชั้นกลีบเลี้ยงขนาด 5 มิลลิเมตร พบได้ทางภาคใต้ของประเทศไทย สรรพคุณเปลือกลำต้น และแก่น บำรุงธาตุ บำรุงกำลัง ผลแก้ท้องร่วง คลื่นไส้ ท้องเสีย แก้อาการบวม ขับพยาธิ แก้กษัย แก้ฝีเน่า เปลือกผล เฝ้าเป็นถ่าน ขับปัสสาวะ เมล็ด รสฝาดเฝื่อน แก้บิด แก้ท้องร่วง (กองกานดา, 2540)

13. มะริด (*D. philippensis* Gurke.) เป็นไม้ยืนต้นสูงได้ถึง 10-15 เมตร เป็นไม้เนื้อแข็ง ลำต้นมีเปลือกสีน้ำตาล ผิวเรียบ แก่นกลางเนื้อไม่มีสีขาว ใบเป็นใบเดี่ยวรูปไข่เรียงสลับ ปลายใบและโคนใบแหลม ใบมีสีเขียวเข้ม ดอกสีขาวหรือเหลืองอ่อน ดอกเพศผู้และดอกเพศเมีย แยกกันอยู่คนละดอกภายในต้นเดียวกัน ดอกจะออกดอกเป็นดอกรวมเป็นช่อสั้นๆ ตามซอกใบ ก้านดอกยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ดอกเพศเมียมีขนาดใหญ่กว่า ก้านดอกยาว 1-3 มิลลิเมตร ก้านเกสรตัวเมีย 4 แฉก รังไข่มีขน ผลกลมแบนมีขนปกคลุม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-7 เซนติเมตร ผลแก่ค่อนข้างนุ่มสีเหลือง กลิ่นหอม กลีบจุกผลแต่ละกลีบเกือบไม่ติดกัน พบได้ทางภาคใต้ของประเทศไทย สรรพคุณ เปลือกลำต้นและเนื้อไม้มีรสฝาดมีสรรพคุณ บำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้ท้องร่วง ขับผายลม ผลรับประทานสด ขับถ่ายพยาธิได้ดี (กองกานดา, 2540; วีระศักดิ์ และคณะ, 2542)

14. ตะโกนา (*D. rhodocalyx* Kurz.) เป็นไม้ยืนต้นสูงได้ถึง 15 เมตร เป็นไม้เนื้อแข็งและเหนียวอายุยืนยาว ลำต้นมีเปลือกหุ้มสีน้ำตาลแตกเป็นสะเก็ดหนาๆ ใบเดี่ยวเรียงสลับกันรูปไข่ กลีบ โดยที่ปลายใบและโคนใบแหลม ดอกออกตามง่ามใบ ก้านดอกยาว 1-3 มิลลิเมตร ดอกเพศผู้จะออกเป็นช่อๆ ดอกเพศเมียออกดอกเดี่ยวๆ ผลกลมเมื่ออ่อนมีขนสีน้ำตาลแดง โคนและปลาย

ผลมักนุ่ม มียางมาก พบได้ทางภาคใต้ของประเทศไทย สรรพคุณ เปลือกลำต้น และแก่น บำรุงธาตุ บำรุงกำลัง ผลแก้ท้องร่วง คลื่นไส้ ท้องเสีย แก้อาการบวม ขับพยาธิ แก้กษัย แก้ฝีเน่า เปลือกผล เฝายเป็นถ่าน ขับปัสสาวะ เมล็ด รสฝาดเผื่อน แก้บิด แก้ท้องร่วง (กองกานดา, 2540)

15. พญารากดำ (*D. rubra* Lecomte.) ต้นเป็นพรรณไม้ขนาดกลาง เปลือกเป็นสีเทา มีความสูงประมาณ 12 - 20 เมตร ส่วนที่ยังอ่อนมีขนเป็นสีน้ำตาลและกิ่งที่แก่จะมีผิวเกลี้ยง ลักษณะใบจะเป็นรูปไข่ ก้านใบมีขน ยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ใบมีความยาวประมาณ 6.5-15 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 2.5-5 เซนติเมตร ดอกจะออกจากที่เดียวกันประมาณ 1-3 ดอก ก้านดอกมีความยาวประมาณ 2.5-3 เซนติเมตร กลีบรองดอกจะบางมีอยู่ 3 กลีบ มีลักษณะเป็นรูปไข่ ปลายแหลม ด้านนอกจะมีขน ส่วนด้านในนั้นเกลี้ยง กลีบดอกมี 6 กลีบ เป็นสีเขียวอมเหลือง มีขนเล็กน้อย เกสรตัวผู้และรังไข่ จะมีเป็นจำนวนมาก อยู่บนฐานสั้น ๆ ผลจะมีลักษณะเป็นรูปกลมรี เป็นสีเขียว ผลโตประมาณ 0.5-0.8 ซม. และยาวประมาณ 0.7-1 ซม. อยู่รวมเป็นกระจุก บนแท่นรองผล สรรพคุณเปลือก ฆ่ายาพิษเมืองบางซวด ราก ช่วยเจริญอาหาร บำรุงกำลัง แก้อ่อนเพลีย รักษาโรคมะเร็ง เปลือก รักษาโรคมะเร็ง เนื้อไม้ รักษาวัณโรค พอกฝี ยาง แก้ปัสสาวะพิการ แก้กระษัยไตพิการ แก้ปวดเมื่อยตามร่างกาย ใบ พอกฝี แก้ปวดรอก ช่วยเจริญอาหาร บำรุงกำลัง แก้อ่อนเพลีย รักษาโรคมะเร็ง เปลือก รักษาโรคมะเร็ง (วีระศักดิ์ และคณะ, 2542)

16. ม่าย (*D. transitoria* Bakh.) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูงถึง 15 เมตร เปลือกลำต้นเรียบสีน้ำตาล ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับกัน ตัวใบรูปขอบขนาน โคนใบแหลม ขอบใบเรียบ ปลายใบแหลมเนื้อใบหนา ผิวเกลี้ยงทั้งสองด้าน หรือมีขนประปรายตามเส้นกลาง เส้นใบมี 6-12 คู่ ก้านใบยาว 1.0-1.5 เซนติเมตร ดอกเพศผู้ออกเป็นช่อสั้นๆ ตามง่ามใบ ก้านดอกยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ดอกเพศเมียมักออกเดี่ยว ๆ ตามกิ่งเล็ก ๆ ก้านดอกยาว 5-10 มิลลิเมตร ผล กลมหรือค่อนข้างกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5-3.5 เซนติเมตร ผลแก่ค่อนข้างนุ่ม ผิวมีสีน้ำตาลแดงคลุม กลีบจุกลผลแต่ละกลีบเกือบไม่ติดกัน พบได้ทางภาคใต้ของประเทศไทย สรรพคุณ เปลือกลำต้น และเนื้อไม้มีรสฝาดมีสรรพคุณ บำรุงธาตุ เจริญอาหาร แก้ท้องร่วง (วีระศักดิ์ และคณะ, 2542)

17. ดำตะโก (*D. wallichii* King.) ต้นเป็นไม้ยืนต้นสูงประมาณ 15 เมตร เปลือกต้นขรุขระสีน้ำตาลเข้มเกือบดำกิ่งอ่อนสีน้ำตาล ใบเป็นใบเดี่ยว รูปรีผิวเรียบกว้าง 2-7 เซนติเมตร ยาว 5-12 เซนติเมตร โคนใบและปลายใบแหลม เรียงสลับ ดอกมีสีขาว แยกเพศ โดยที่ดอกเพศผู้ ออกเป็นช่อ กลีบดอก 4 กลีบ ยาว 8-12 เซนติเมตร เชื่อมติดกัน ดอกเพศเมียเป็นดอกเดี่ยว กลีบดอก 4 กลีบ คล้ายดอกเพศผู้เทียม 8-10 อัน มีขนาดใหญ่กว่าดอกตัวผู้ ผลสดทรงกลมมีกลีบเลี้ยง

4 กลีบ ติดอยู่ผิวมีขนละเอียด มีขนาด 2- 3 เซนติเมตร เมื่อสุกสีส้มแดง (ก่องกานดา, 2540; วีระศักดิ์ และคณะ, 2542)

การศึกษาพันธุกรรมและการจำแนกพันธุ์พืช

การศึกษาพันธุกรรมพืชและการจำแนกกลุ่มพืช สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การศึกษาโดยอาศัยความแตกต่างของสัณฐานวิทยาที่ปรากฏ อย่างไรก็ตามการศึกษาลักษณะดังกล่าวมีข้อจำกัดหลายประการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าพืชเหล่านั้นมีลักษณะใกล้เคียงกัน ส่งผลให้การจำแนกความแตกต่างระหว่างกลุ่มพืชทำได้ยาก การนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยจะทำให้การศึกษาความสัมพันธ์ดังกล่าวมีความชัดเจน และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เครื่องหมายอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคหนึ่งในหลายเทคนิคที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็ว ไม่ซับซ้อน มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายได้ทางพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

การใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาและลักษณะอื่น ๆ ในการจำแนกพันธุ์พืช

การบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถใช้วิธีเปรียบเทียบกับลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะใบ ดอก สีใบ สีดอก รูปร่างและขนาดของผล เป็นต้น วิธีการนี้ใช้กันมานาน และยังคงใช้ได้ผลดีในกรณีของสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน แต่ลักษณะสัณฐานวิทยามักแปรผันไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป อาจทำให้การตรวจสอบผิดพลาดได้ บางครั้งต้องอาศัยความชำนาญเป็นพิเศษ และต้องมีวิธีที่จะบอกจีโนไทป์ที่ถูกต้องจากฟีโนไทป์ที่ตรวจสอบได้ ในกรณีของไม้ยืนต้น เช่น ไม้ผลหรือไม้ป่า ซึ่งระยะเวลาตั้งแต่เริ่มปลูกต้นกล้าจนถึงออกดอกออกผลค่อนข้างยาวนาน ต้องอาศัยระยะเวลาในการตรวจสอบ อย่างไรก็ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นต้องทำเป็นอันดับแรก แล้วจึงใช้วิธีการตรวจสอบวิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น หรือแก้ปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการตรวจสอบเพียงอย่างเดียวได้ Noda และคณะ (2002) ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *D. kaki* L. โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ความกว้าง เส้นผ่านศูนย์กลางของผล น้ำหนักผล รูปร่างผล รูปร่างใบ จำนวนเมล็ดต่อผล คุณสมบัติทางเคมี ร่วมกับการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการตรวจสอบหาความสัมพันธ์ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอช่วยยืนยันผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้เป็นอย่างดีสำหรับการศึกษาในพืชสกุล *Diospyros*

การศึกษาพันธุกรรมพืชโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมายโมเลกุล (molecular Markers) มี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน และระดับดีเอ็นเอ ระดับโปรตีนเป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่าง ๆ คือ เทคนิคไอโซไซม์ (Isozyme) พบว่ามีข้อจำกัดอยู่มาก เช่น อิทธิพลจากสภาพแวดล้อม ระยะการเจริญเติบโตของพืช เข้ามาเกี่ยวข้องทำให้แยกความแตกต่างได้น้อย (Claros *et al.*, 2000) ส่วนระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบระดับโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรมากกว่าจึงสามารถเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ โดยตรวจสอบความแตกต่างระดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ได้มีการพัฒนาเทคนิคขึ้นมาหลายเทคนิค คือ เทคนิคอาร์เอฟแอลพี อาศัยหลักการของความแตกต่างในลำดับเบสที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction Enzyme) ความแตกต่างของลำดับเบสนี้เป็นคุณสมบัติทั่วไปที่พบในสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมไทป์ต่างกัน อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ยังมีข้อเสีย คือ ต้องใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจำนวนมาก และต้องมีคุณภาพดี อีกทั้งยังมีขั้นตอนยุ่งยาก และค่าใช้จ่ายสูง (Kaundun *et al.*, 2000) ต่อมาได้พัฒนาวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR : Polymerase Chain Reaction) ซึ่งง่ายและรวดเร็ว สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ปริมาณมากในระยะเวลาสั้น ตัวอย่างเช่น เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP, Amplification Fragment Length Polymorphism) อาร์เอฟพีดี (RAPD : Random Amplified Polymorphic) และไมโครแซเทลไลท์ (microsatellite) เป็นต้น มีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ประโยชน์ในหลายด้านเช่น ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช การปรับปรุงพันธุ์ แยกสายพันธุ์ ตรวจสอบการทำงานของยีน รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์พืช เป็นต้น

อาร์เอฟพีดีเป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการทำพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้น ๆ ประมาณ 10 เบส เพียงชนิดเดียว มีลำดับเบสแบบสุ่ม (Random Primer) เป้าหมายการเกาะของไพรเมอร์ คือ บริเวณที่มีลำดับเบสแบบสุ่มคู่สมกันโดยไม่คำนึงถึงทิศทางของไพรเมอร์ที่เกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ และไม่จำเพาะกับยีนใด นำมาแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ การเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นผลมาจากไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้หลายบริเวณ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะ 2 บริเวณที่อยู่ใกล้กันมาก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางเข้าหากัน จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงนั้นได้ แต่ถ้าไพรเมอร์เกาะดีเอ็นเอสายเดียวกันในทิศทางเดียวกัน หรือเกาะกับดีเอ็นเอคนละสาย แต่ทิศทางแยกออกจากกัน หรือเกาะได้ทั้งสองสายห่างกันมาก แม้ทิศทางเดียวกันก็ไม่สามารถเกิดผลผลิตได้ (สุรินทร์, 2545)

ตัวอย่างการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการศึกษาพืชสกุล *Diospyros* เช่น Ikeda และคณะ (1985) ได้ศึกษาพันธุกรรมของลักษณะความฝาดของผลพืชสกุล *Diospyros* โดยอาศัยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า *D. kaki* L., *D. lotus* L. และ *D. glandulosa* Lace. ซึ่งมีความฝาดของผลเหมือนกัน แต่เมื่อศึกษาโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีและหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าพืชทั้ง 3 ชนิดนี้มีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก แสดงว่าการใช้ลักษณะความฝาดของผลเพื่อจัดกลุ่มความใกล้ชิดตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมไม่สามารถทำได้ เฉลิมพล (2539) ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการจำแนกมะพลับ (*D. kaki*) สายพันธุ์ Fuyu จำนวน 29 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศและทดลองปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย เพื่อต้องการที่จะทราบว่าเป็นพันธุ์เดียวกันหรือไม่ พบว่าพลับทั้ง 29 ตัวอย่าง มีความเหมือนกัน 85 เปอร์เซ็นต์ เกรียงศักดิ์ (2545) ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพลับจำนวน 38 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคเดียวกัน ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 16 ไพรเมอร์ และคัดเลือกเพียง 10 ไพรเมอร์ เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสายพันธุ์ พลับพบว่า สามารถแบ่งกลุ่มของสายพันธุ์พลับได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเช่นกัน Luo และคณะ (1999) สรุปว่า พลับจากประเทศจีนและพลับจากประเทศญี่ปุ่นมีแหล่งกำเนิดจากแหล่งที่ต่างกัน Yamagishi และคณะ (2005) จำแนกสายพันธุ์และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชสกุล *Diospyros* ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีกับไพรเมอร์ขนาด 15-25 เบส (ปกติไพรเมอร์ที่ใช้กับเทคนิคอาร์เอพีดีจะเป็นไพรเมอร์สายสั้น ๆ ประมาณ 10 เบส) จาก 25 ไพรเมอร์ ที่ศึกษาในพืชสกุล *Diospyros* 6 กลุ่ม คือ *D. taitoensis*, *D. lotus glabba*, *D. lotus*, *D. kaki* Fuyu, *D. oleifera* และ *D. rhombifolia* พบว่า *D. taitoensis* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ *D. lotus glabba* มากที่สุด และ *D. kaki* Fuyu ก็มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ *D. lotus glabba* มากกว่าชนิดอื่น สอดคล้องกับงานทดลองของ Hu และ Luo (2006) ที่ศึกษากับดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ (cpDNA)

นอกเหนือจากพืชสกุล *Diospyros* แล้วพืชชนิดอื่นที่มีการนำเครื่องหมายอาร์เอพีดีมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์ และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่น ธีระชัย และนฤมล (2542) ศึกษาในส้มโอ 18 สายพันธุ์ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ กุลยา (2550) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของสะตอ (*Parkia speciosa* Hassk.) และความสัมพันธ์ของพืชสกุล *Parkia* โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ตรวจสอบไพรเมอร์จำนวน 180 ไพรเมอร์ คัดเลือกได้ 8 ไพรเมอร์ คือ OPB-04, OPB17-18, OPC-02, OPR-01, OPR-02, OPT-01 และ OPAB-03 เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรทั้งหมด 103 ต้น พบว่าให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 125 แถบ เป็นแถบที่ให้ความแตกต่างกัน จำนวน 101 แถบ

(80.80 เปอร์เซ็นต์) สามารถแบ่งกลุ่มประชากรพืชสกุล *Parkia* ได้ 5 กลุ่ม Ahmad และคณะ (2008) ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะม่วง โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี พบว่าเครื่องหมายอาร์เอพีดีสามารถใช้ในการประเมินสายพันธุ์เอ็นเอของมะม่วงพันธุ์ปลูก 25 พันธุ์ ในประเทศปากีสถาน โดยใช้ไพรเมอร์ในการตรวจสอบ 44 ไพรเมอร์ แต่ไม่มีไพรเมอร์ใดที่ให้แถบจำเพาะต่อพันธุ์ บัณฑิตา (2552) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชสกุลส้ม (*Citrus* spp.) ในภาคใต้ของประเทศไทย คัดเลือกไพรเมอร์ได้ 7 ไพรเมอร์ สามารถจัดกลุ่มพืชได้ 5 กลุ่ม โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี เป็นต้น

3. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้โดยอาศัยเครื่องหมายอาร์เอพีดี
3. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* สำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ และประโยชน์ด้านอื่น ๆ ในอนาคต

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 วัสดุพืช

ทำการเก็บรวบรวมพืชสกุล *Diospyros* ที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย ในพื้นที่ จังหวัดสงขลา พัทลุง ตรัง สุราษฎร์ธานี และชุมพร (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ชนิด (species) จำนวนตัวอย่าง และสถานที่เก็บตัวอย่างพืชสกุล *Diospyros* ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

ชนิด/สถานที่	จำนวน (ต้น)
มะพลับ (<i>D. areolata</i> King.)	
สวนพฤกษศาสตร์วรรณคดีภาคใต้ (ทุ่งค่าย) อ. ยานตาขาว จ. ตรัง	2
สวนรุกขชาติเขาพุทธทอง อ. ไชยา จ. สุราษฎร์ธานี	3
ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อ. สวี จ. ชุมพร	1
ต. คอหงส์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา	1
ต. ท่าบอน อ. ระโนด จ. สงขลา	2
ต. ม่วงงาม อ. สิงหนคร จ. สงขลา	3
วัดโคกนาว อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา	1
มะพลับดง (<i>D. bejaudii</i> Lecomte.)	
สวนพฤกษศาสตร์ภาคใต้ (เขาช่อง) อ. นาโยง จ. ตรัง	2
ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ต. ไม้ฝาด อ. สีเกา จ. ตรัง	2
สั่งทำ (<i>D. buxifolia</i> Hiern.)	
สวนพฤกษศาสตร์ภาคใต้ (เขาช่อง) อ. นาโยง จ. ตรัง	2
เท้าแสนปม (<i>D. cauliflora</i> Blume.)	
สวนพฤกษศาสตร์ภาคใต้ (เขาช่อง) อ. นาโยง จ. ตรัง	3

ตารางที่ 2 (ต่อ) ชนิด (species) จำนวนตัวอย่าง และสถานที่เก็บตัวอย่างพืชสกุล *Diospyros* ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

ชนิด/สถานที่	จำนวน (ต้น)
อินจัน, จันท์หอม (<i>D. decandra</i> Lour.)	
ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ต.ไม้ฝาด อ.สิเกา จ.ตรัง	1
น้ำน้อย อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	1
เนียน (<i>D. diepenhorstii</i> Miq.)	
คณะทรัพยากรธรรมชาติ ม. สงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา	1
สวนพฤกษศาสตร์วรรณคดีภาคใต้ (ทุ่งค่าย) อ. ย่านตาขาว จ. ตรัง	2
สวนพฤกษศาสตร์ภาคใต้ (เขาช่อง) อ. นาโยง จ. ตรัง	2
ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ต.ไม้ฝาด อ.สิเกา จ.ตรัง	3
ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อ.สวี จ.ชุมพร	4
ต.ป่าชิง อ.จะนะ จ.สงขลา	1
ต.ขุนตืดหวาย อ.จะนะ จ.สงขลา	2
ต.ท่าบอน อ.ระโนด จ.สงขลา	1
ต.ม่วงงาม อ.สิงหนคร จ.สงขลา	1
ต.ปาดังเบซาร์ อ.สะเดา จ.สงขลา	1
ต.ควนมะพร้าว อ.เมือง จ.พัทลุง	2
สวนพฤกษศาสตร์สากลภาคใต้ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	1
ลำปัด (<i>D. ferrea</i> Bakh.)	
สวนพฤกษศาสตร์วรรณคดีภาคใต้ (ทุ่งค่าย) อ. ย่านตาขาว จ. ตรัง	3
ลำปัดแดง (<i>D. filipendula</i> Lecomte.)	
สวนพฤกษศาสตร์วรรณคดีภาคใต้ (ทุ่งค่าย) อ. ย่านตาขาว จ. ตรัง	2
ตะโกสวน (<i>D. malabarica</i> Kostel.)	
สวนพฤกษศาสตร์วรรณคดีภาคใต้ (ทุ่งค่าย) อ. ย่านตาขาว จ. ตรัง	2
สวนพฤกษศาสตร์ภาคใต้ (เขาช่อง) อ. นาโยง จ. ตรัง	2
ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ต.ไม้ฝาด อ.สิเกา จ.ตรัง	2
ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อ.สวี จ.ชุมพร	1
สวนรุกขชาติเขาพุทธทอง อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี	3

ตารางที่ 2 (ต่อ) ชนิด (species) จำนวนตัวอย่าง และสถานที่เก็บตัวอย่างพืชสกุล *Diospyros* ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

ชนิด/สถานที่	จำนวน (ต้น)
มะเกลือ (<i>D. mollis</i> Griff.)	
สวนรุกขชาติเขาพุทธทอง อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี	4
สวนพฤกษศาสตร์สากลภาคใต้ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	3
สวนพฤกษศาสตร์วรรณคดีภาคใต้ (ทุ่งค่าย) อ. ย่านตาขาว จ. ตรัง	4
ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อ.สวี จ.ชุมพร	1
ตาลดำ (<i>D. montana</i> Roxb.)	
สวนพฤกษศาสตร์สากลภาคใต้ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	2
สวนรุกขชาติเขาพุทธทอง อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี	1
มะริด (<i>D. philippensis</i> Gurke.)	
สวนพฤกษศาสตร์วรรณคดีภาคใต้ (ทุ่งค่าย) อ. ย่านตาขาว จ. ตรัง	2
ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ต.ไม้ฝาด อ.สิเกา จ.ตรัง	1
สวนพฤกษศาสตร์สากลภาคใต้ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	1
ตะโกนา (<i>D. rhodocalyx</i> Kurz.)	
คณะเภสัชศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา	3
ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อ.สวี จ.ชุมพร	1
สวนรุกขชาติเขาพุทธทอง อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี	2
ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ต.ไม้ฝาด อ.สิเกา จ.ตรัง	1
พญารากดำ (<i>D. rubra</i> Lecomte.)	
สวนพฤกษศาสตร์ภาคใต้ (เขาช่อง) อ. นาโยง จ. ตรัง	2
ม่าย (<i>D. transitoria</i> Bakh.)	
สวนพฤกษศาสตร์วรรณคดีภาคใต้ (ทุ่งค่าย) อ. ย่านตาขาว จ. ตรัง	1
ศูนย์วิจัยพืชสวนตรัง ต.ไม้ฝาด อ.สิเกา จ.ตรัง	2
ดำตะโก (<i>D. wallichii</i> King.)	
สวนรุกขชาติเขาพุทธทอง อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี	3
unknown	
สวนพฤกษศาสตร์สากลภาคใต้ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	2
รวม	96

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- CTAB
- β -mercaptoethanol
- Polyvinyl pyrrolidone (PVP-40)
- Sodium chloride (NaCl)
- Potassium acetate (KAc)
- Disodium ethylene diaminetetraacetate (Na₂EDTA)
- Tris-HCl pH 7.5
- Chloroform
- Isopropanol
- TE buffer
- Ethanol

1.2.2 สารเคมีสำหรับใช้ทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

- Agarose gel electrophoresis
- LE agarose (FMC Bioproduct, USA)
- Seakem agarose (FMC Bioproduct, USA)
- Glacial acetic acid
- Boric acid
- Tris-base
- Ethidium bromide
- Loading buffer
- Lamda DNA (DNA)
- 100 bp และ 500 bp DNA Ladder (Operron,USA)

1.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

- dNTP (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) (Promega, USA)
- 10X *Taq* buffer (Promega, USA)
- *Taq* DNA Polymerase B (Promega, USA)

- ไพรเมอร์จำนวน 52 ไพรเมอร์ ได้แก่ OP469, OP470, OP471, OP472, OP474, OP475, OP476, OP478, OP479, OP482, OP484, OP485, OP486, OP487, OP489, OP494, OP495, OP496, OP497, OP498, OP499, OP501, OP502, OP503, OP506, OPA01, OPA02, OPA03, OPA08, OPA15, OPA18, OPA19, OPB01-16, OPJ05, OPM05, OPM06 และ OPY15 (Operon, USA)

1.3 อุปกรณ์

1.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างพืช

- ถุงพลาสติก
- กรรไกร
- กล่องโฟม
- ปากกาเขียนเครื่องแก้ว

1.3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส และ

การทำพีซีอาร์

- ตู้เย็นและตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส
- เครื่องไมโครเซนตริฟิวจ์
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง
- เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ
- แท่งแม่เหล็ก
- ปิเปตปรับปริมาตร
- เครื่องเขย่า
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส
- เครื่องพีซีอาร์
- โกร่งบดตัวอย่าง

- หลอดเอฟเฟนดอร์ฟ
- ตู้อิมโครเวฟ
- ตู้อูคควัน
- UV transilluminator
- Tip
- Gel Documentation
- น้ำแข็ง และกระติกน้ำแข็ง
- เครื่องแก้ว กระจกตวง และขวดต่าง ๆ

2. วิธีการ

2.1 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2.1.1 การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างใบแก่ ดอก และผลของพืชสกุล *Diospyros* จากบางพื้นที่ของจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี ตรัง พัทลุง และจังหวัดสงขลา (ตารางที่ 2) โดยสุ่มเก็บตามทิศตะวันออก ตะวันตก ทิศเหนือ และทิศใต้ ซึ่งเก็บทิศละประมาณ 5-10 ตัวอย่าง นำมาบันทึกลักษณะสัณฐาน

2.1.2 การบันทึกลักษณะสัณฐาน

ทำการบันทึกรายละเอียด และบันทึกภาพของลักษณะสำคัญของส่วนต่าง ๆ ของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้ที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาประกอบด้วยลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ ลำต้น ใบ ดอก และผล จำแนกพืชสกุล *Diospyros* แต่ละตัวอย่างออกเป็นกลุ่ม ๆ ตามชื่อวิทยาศาสตร์โดยยึดหลักในการจำแนกชื่อไทยตามการรายงานของ เต็ม (2542) เขียนชื่อวิทยาศาสตร์ยึดตามหลักสากลในฐานข้อมูล The International Plant Names Index (IPNI) (2009) และจำแนกชนิดพืชโดยอาศัยลักษณะโครงสร้างภายนอกตามข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาขององค์การสวนพฤกษศาสตร์ (2542) ดังนี้

- ลักษณะลำต้น (stem trunk) โดยลำต้น คือ ส่วนที่ตั้งตรงแข็งแรง ทำหน้าที่ชูกิ่งก้านและใบ พิจารณาจากเปลือกนอก (outer bark) อยู่นอกสุดของลำต้น ส่วนใหญ่มีลักษณะแข็ง หากเปลือกนอกมีลักษณะไม่แตก จะจัดอยู่ในลำต้นที่มีลักษณะเปลือกเรียบ (smooth bark)

หากเปลือกนอกมีลักษณะแตกตามยาวของลำต้น และเป็นร่องลึก จะจัดอยู่ในลำต้นที่มีลักษณะเปลือกแตก (fissured bark)

- ลักษณะใบ

- รูปร่างใบ (leaf shape) โดยพิจารณาตำแหน่งของส่วนที่กว้างที่สุดของแผ่นใบว่าอยู่ที่ตำแหน่งใด หากส่วนที่กว้างที่สุดของแผ่นใบอยู่ต่ำกว่ากลางใบ อัตราส่วนของความยาวต่อความกว้างเท่ากับ 3:2 รูปร่างใบจะจัดเป็นรูปไข่ (ovate) แต่ถ้าส่วนที่กว้างที่สุดอยู่บริเวณปลายใบ ฐานใบเรียวเล็กกว่าปลายใบ รูปร่างใบจะจัดเป็นรูปไข่กลับ (obovate) หากส่วนที่กว้างที่สุดอยู่ตรงกลาง ส่วนปลายและส่วนฐานเรียว รูปร่างใบจะจัดเป็นรูปรี (elliptic) และหากขอบใบขนานกันสองข้าง ความยาวเป็นสองเท่าของความกว้าง รูปร่างใบจะจัดเป็นรูปขอบขนาน (oblong)

- ขอบใบ (leaf margin) พิจารณาจากขอบใบเรียบ (entire) และขอบใบเป็นคลื่น (undulate)

- ปลายใบ (leaf apices) ขอบใบที่มาบรรจบตรงปลายยอดมักตรงหรือโค้งมน ทำมุมน้อยกว่า 90 องศา จัดอยู่ในลักษณะปลายใบแบบแหลม (acute) แต่หากมีลักษณะคล้ายปลายแหลมแต่ขอบใบโค้งเว้าสอดเข้ามามาตรงปลายยอดจัดเป็นปลายใบเรียวแหลม (acuminate) ปลายใบโค้งมนแต่สอดแคบกว่าใบที่มีลักษณะรูปกลมจัดอยู่ในลักษณะปลายใบแบบมน (obtuse)

- ฐานใบ (leaf base) ฐานที่เกิดจากขอบใบสองข้างชนกันที่ฐานใบเป็นมุมน้อยกว่า 90 องศา จัดอยู่ในลักษณะฐานใบแหลม (cuneate) ปลายโคนใบโค้งมนแต่สอดแคบกว่าใบที่มีลักษณะรูปกลม จัดอยู่ในลักษณะฐานใบมน (obtuse) ปลายโคนใบที่มีลักษณะเป็นรูปหัวใจ จัดอยู่ในลักษณะฐานใบรูปหัวใจ (cordate)

- ลักษณะช่อดอกและดอก ช่อดอกแบบแยกแขนง (panicle) ดอกเพศเมียออกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่กว่าดอกเพศผู้ โดยที่ดอกเพศผู้จะออกดอกเป็นช่อกระจุกสั้นๆ ขึ้นตามช่อใบ โดยดอกเกสรตัวผู้และดอกเกสรตัวเมียแยกกันอยู่คนละช่อภายในต้นเดียวกัน หรือแยกต้น มีกลีบเลี้ยง และกลีบดอก 4-6 กลีบ

- ลักษณะผล พิจารณาจากรูปร่างผล และผิวเปลือกผลเกลี้ยง หรือผลมีขนปกคลุม

2.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

2.2.1 การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างใบจากต้นพืชสกุล *Diospyros* จากบางพื้นที่ของจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี ตรัง พัทลุง และจังหวัดสงขลา จำนวนทั้งหมด 96 ต้น (ตารางที่ 2) โดยเลือกเก็บตัวอย่างใบระยะเฟสลาดประมาณ 5-10 ใบต่อต้น ใส่ถุงพลาสติกเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ

2.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบของพืช โดยประยุกต์จากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) นำใบอ่อนของพืชสกุล *Diospyros* (อายุประมาณ 7-10 วันหลังจากการแตกใบอ่อน) จำนวน 200 มิลลิกรัมของน้ำหนักสด บดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติม extraction buffer (PVP-40, NaCl, EDTA 0.5 M, CTAB 2 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับ β -mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในโกร่งให้ละเอียด จากนั้นใส่ในหลอดเอฟเฟนดอร์ฟ เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมโพแทสเซียมอะซิเตต 300 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 60 นาที ปั่นเหวี่ยงใช้ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้สารละลายที่แยกชั้นใส ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดเอฟเฟนดอร์ฟใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ เป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้สารละลายที่แยกชั้นใส ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดเอฟเฟนดอร์ฟใหม่ เติมไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ หรือวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร ที่ผ่านการแช่เย็น จำนวน 2-3 ครั้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer [Tris-HCl (pH 7.5) 10 มิลลิโมลาร์ และ Na₂EDTA (pH 7.0) 1 มิลลิโมลาร์] 20 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2.2.3 การตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมดาดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรส (LE Agarose, Promega, USA) เข้มข้น

0.75 % แรงแคลี่ไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE บัฟเฟอร์ (tris base, glacial acetic acid, EDTA 0.5 โมลาร์, pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง gel documentation

2.2.4 เทคนิคอาร์เอพีดี

ทำการทดสอบไพรเมอร์ขนาดความยาว 10 เบส จากที่เคยมีผู้ศึกษามาก่อน จำนวนทั้งสิ้น 52 ไพรเมอร์ ได้แก่ OP469 OP470-72 OP474-76 OP478-79 OP482 OP484 OP485-87 OP489 OP494-99 OP501-03 OP506 (Yamagishi *et al.*, 2005) OPA01-03 OPA08 OPA15 OPA18-19 (เฉลิมพล, 2539) OPB01-16 OPJ05 OPM05-06 OPY15 (เกรียงศักดิ์, 2545) คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มได้ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ และทำการแยกความแตกต่างระหว่างตัวแทนของกลุ่มประชากรต่าง ๆ ของพืชสกุล *Diospyros* เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ซึ่งใช้ความเข้มข้นของสารละลายที่เป็นองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้ น้ำกลั่น 16.2 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ (10x) 2 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ 2.5 ไมโครลิตร ดีออกซินิวคลีโอไทด์ เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ 1.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ เข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ 1.5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส 1.5 ยูนิต 0.3 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ เข้มข้น 60 นาโนกรัม/ไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ตั้งอุณหภูมิเป็น 3 ระดับ คือ อุณหภูมิที่เริ่มต้นใช้ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วย 30 รอบ ด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 53 องศาเซลเซียส 3 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที และรอบสุดท้ายตามด้วย 72 องศาเซลเซียส อีก 5 นาที หลังทำพีซีอาร์นำสารละลายดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วจำนวน 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโทรโฟเรซิสบนแผ่นวุ้น LE อะกาโรส ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน TBE บัฟเฟอร์ (tris base boric acid Na₂EDTA 0.5 โมลาร์ ; pH 8.0) ใช้แรงแคลี่ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างน้ำ 10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง gel documentation คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณและให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง (polymorphism) ระหว่างตัวแทนประชากรแต่ละต้น

2.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำไพรเมอร์ที่คัดเลือกได้ มาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของประชากรทั้งหมด คัดเลือกไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างประชากร ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่

ได้หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์ผล แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชสกุล *Diospyros* แต่ละต้น

2.2.6 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros*

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชสกุล *Diospyros* ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้ โดยแปลงข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นแบบ binary คือให้ตำแหน่งที่มีแถบดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 1 และตำแหน่งที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ค่าเท่ากับ 0 เปรียบเทียบ ณ บริเวณเดียวกัน โดยคิดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจน และเพิ่มปริมาณได้สม่ำเสมอเมื่อมีการทำพีซีอาร์ซ้ำ วิเคราะห์ความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยการวิเคราะห์ UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average) cluster analysis หาค่า Similarity coefficient ตามวิธีของ Jaccard (1908) ด้วยโปรแกรม Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version-2.1 (NTSYS Version-2.1) (Rohlf, 2002)

บทที่ 3

ผล

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลจากการบันทึกลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอย่างพืชสกุล *Diospyros* ที่ทำการเก็บรวบรวมในบางพื้นที่ของภาคใต้ในประเทศไทย โดยพิจารณาลักษณะโครงสร้างภายนอกของต้น ประกอบด้วยลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ ลำต้น ใบ ดอก และผล มีรายละเอียดดังนี้

1.1 ลักษณะลำต้น

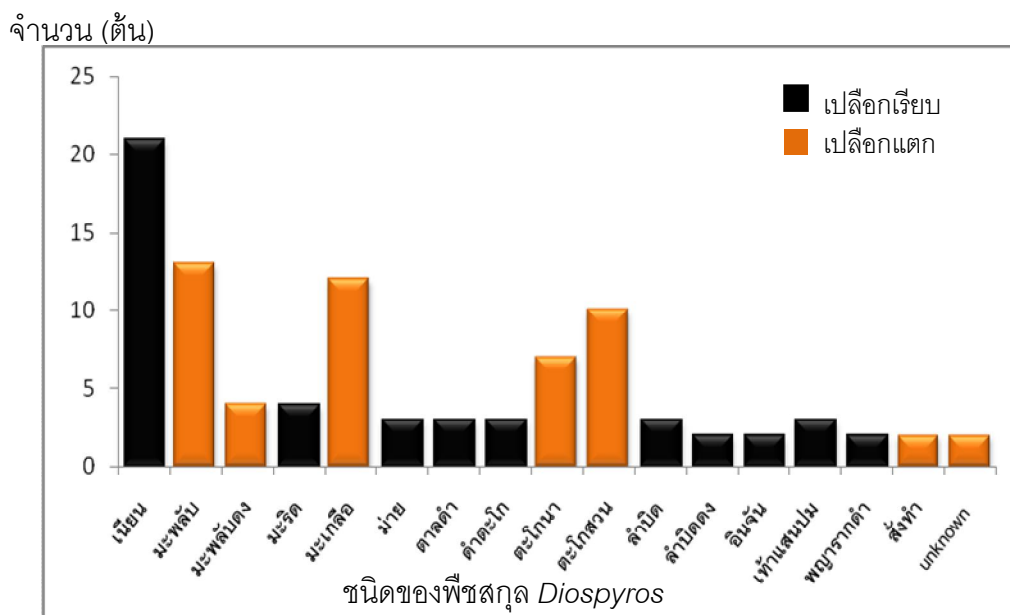
ลักษณะลำต้น พบความแตกต่างที่เปลือกต้นชั้นนอก เมื่อพืชมีการเจริญหรือแก่เต็มที่ที่สามารถแยกได้ 2 แบบ คือ เปลือกแตก (ภาพที่ 1ก) และเปลือกเรียบ (ภาพที่ 1ข) เมื่อพิจารณาถึงการกระจายตัวของพืชสกุล *Diospyros* ที่ทำการศึกษารังนี้พบกลุ่มตัวอย่างที่มีลักษณะลำต้นแบบเปลือกแตกจำนวน 7 กลุ่มตัวอย่างด้วยกันคือ ตะโกนา (*D. rhodocalyx*), ตะโกสวน (*D. malabarica*), มะพลับ (*D. areolata*), มะพลับดง (*D. bejaudii*) มะเกลือ (*D. mollis*), ส้มท่า (*D. buxifolia*) และ unknown ส่วนลักษณะเปลือกเรียบจำนวน 10 กลุ่มตัวอย่างคือ ลำบิด (*D. ferrea*), ลำบิดดง (*D. filipendula*), อินจัน (*D. decandra*), ตาลดำ (*D. montana*), ต่าตะโก (*D. wallichii*), พญารากดำ (*D. rubra*), เนียน (*D. diepenhorstii*), มะริด (*D. philippensis*), ม่าย (*D. transitoria*) และเท้าแสนปม (*D. cauliflora*) (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 ลักษณะเปลือกลำต้นของพืชสกุล *Diospyros* ที่สุ่มเก็บตัวอย่างทางภาคใต้ของประเทศไทย

(ก) ลักษณะลำต้นแบบเปลือกแตก

(ข) ลักษณะลำต้นแบบเปลือกเรียบ



ภาพที่ 2 การกระจายตัวของลักษณะเปลือกลำต้นในกลุ่มประชากรพืชสกุล *Diospyros* ที่สุ่มเก็บตัวอย่างทางภาคใต้ของประเทศไทย

1.2 ลักษณะใบ

ลักษณะสัณฐานวิทยาของใบที่พบในพืชสกุล *Diospyros* 16 ชนิด และ unknown อีก 1 ชนิด รวมทั้งสิ้น 96 ต้น โดยทำการบันทึกมี 5 ลักษณะ ได้แก่ รูปร่างใบ ปลายใบ ขอบใบ ฐานใบ และเส้นใบดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

1.2.1 รูปร่างใบ

รูปร่างใบของพืชสกุล *Diospyros* พบว่า สามารถแยกความแตกต่างได้ 5 รูปแบบคือ

แบบที่ 1 รูปร่างใบเป็นรูปขอบขนาน (oblong) ขอบใบขนานกันทั้งสอง ความยาวเป็น 2 เท่าของความกว้าง (ภาพที่ 3ก) เมื่อพิจารณาถึงการกระจายตัวของพืชสกุล *Diospyros* ที่ทำการศึกษาค้นคว้า พบว่า มีจำนวน 8 กลุ่มตัวอย่างที่มีลักษณะรูปร่างใบแบบขอบขนานคือ กลุ่มตัวอย่างของเนียน (*D. diepenhorstii*) ลำปัดดง (*D. filipendula*) มะพลับ (*D. areolata*) มะพลับดง (*D. bejaudii*) มะเกลือ (*D. mollis*) ม่าย (*D. transitoria*) ดำตะโก (*D. wallichii*) และ พญารากดำ (*D. rubra*)

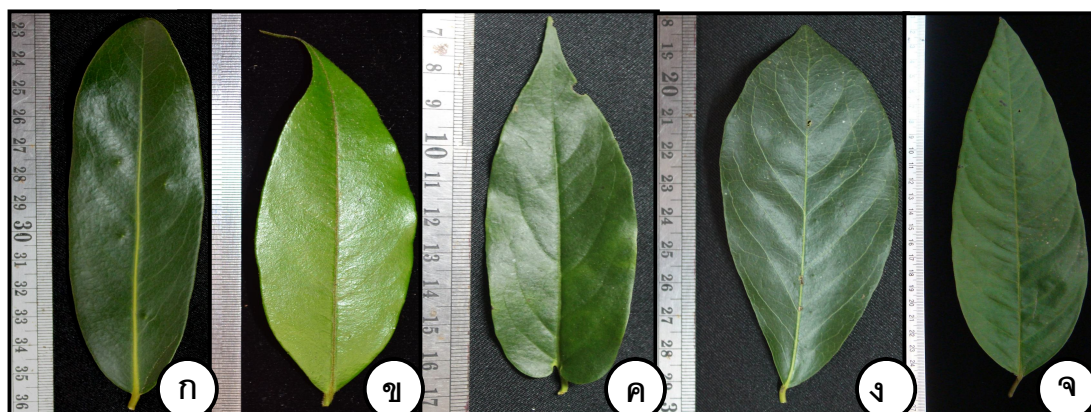
แบบที่ 2 รูปร่างใบเป็นรูปไข่ (ovate) แผ่นใบคล้ายรูปไข่ ซึ่งมีส่วนกว้างที่สุดของแผ่นใบค่อนข้างมาทางฐานใบแล้วค่อย ๆ เรียวไปทางปลายใบ (ภาพที่ 3ข) เมื่อพิจารณาถึงการ

กระจายตัวของพืชสกุล *Diospyros* ที่ทำการศึกษาคั้งนี้พบว่า มีจำนวน 7 กลุ่มตัวอย่างที่มีลักษณะรูปร่างใบแบบรูปไข่คือ อินจัน (*D. decandra*) ตะโกสวน (*D. malabarica*) เท้าแสนปม (*D. cauliflora*) สั่งท่า (*D. buxifolia*) มะริด (*D. philippensis*) ลำบีด (*D. ferrea*) และ unknown

แบบที่ 3 รูปร่างใบเป็นรูปหัวใจ (cordate) แผ่นใบมีส่วนกว้างใกล้ฐานใบแล้วค่อยเรียวแหลมไปทางปลายใบ ก้านใบติดตรงฐานใบที่ไว้เข้าไป (ภาพที่ 3ค) เมื่อพิจารณาถึงการกระจายตัวของพืชสกุล *Diospyros* ที่ทำการศึกษาคั้งนี้พบว่ามีเพียง 1 กลุ่มตัวอย่างที่มีลักษณะรูปร่างใบแบบรูปหัวใจคือ กลุ่มตัวอย่างของตาลดำ (*D. montana*)

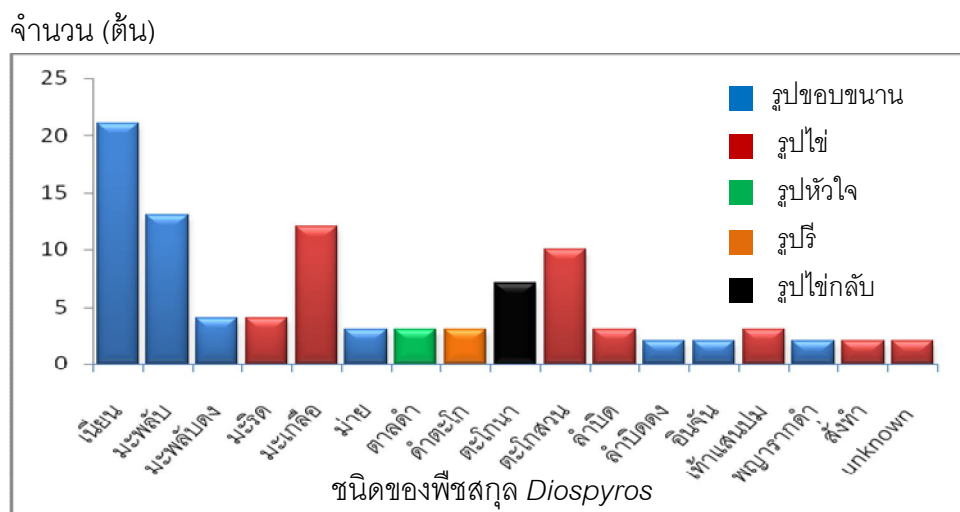
แบบที่ 4 รูปร่างใบเป็นไข่กลับ (obovate) ฐานใบเรียวเล็กกว่าปลายใบ (ภาพที่ 3ง) เมื่อพิจารณาถึงการกระจายตัวของพืชสกุล *Diospyros* ที่ทำการศึกษาคั้งนี้พบว่ามีเพียง 1 กลุ่มตัวอย่างที่มีลักษณะรูปร่างใบแบบรูปหัวใจคือ กลุ่มตัวอย่างของตะโกนา (*D. rhodocalyx*)

แบบที่ 5 รูปร่างใบเป็นรูปรี (elliptic) ส่วนกว้างที่สุดอยู่ตรงกลาง ปลายใบและโคนใบเรียว (ภาพที่ 3จ) เมื่อพิจารณาถึงการกระจายตัวของพืชสกุล *Diospyros* ที่ทำการศึกษาคั้งนี้พบว่ามีเพียง 1 กลุ่มตัวอย่างที่มีลักษณะรูปร่างใบแบบรูปหัวใจคือ กลุ่มตัวอย่างของดำตะโก (*D. wallichii*) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 รูปร่างใบของพืชสกุล *Diospyros* ที่สุ่มเก็บตัวอย่างทางภาคใต้ของประเทศไทย

- (ก) รูปร่างใบเป็นรูปขอบขนาน (oblong) (ข) รูปร่างใบเป็นรูปไข่ (ovate)
 (ค) รูปร่างใบเป็นรูปหัวใจ (cordate) (ง) รูปร่างใบเป็นไข่กลับ (obovate)
 (จ) รูปร่างใบเป็นรูปรี (elliptic)



ภาพที่ 4 การกระจายตัวของลักษณะรูปร่างใบในกลุ่มประชากรพืชสกุล *Diospyros* ที่สุ่มเก็บตัวอย่างทางภาคใต้ของประเทศไทย

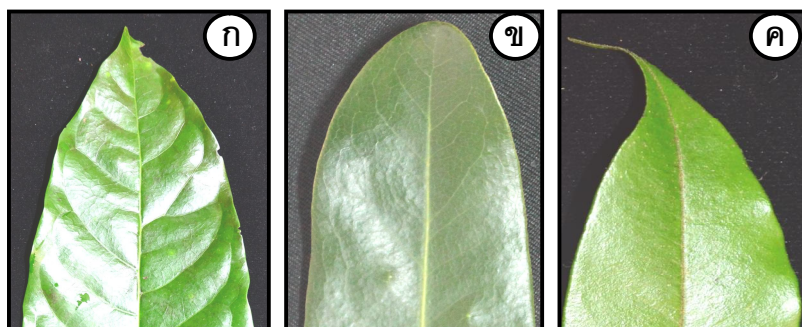
1.2.2 ปลายใบ

ลักษณะปลายใบของพืชสกุล *Diospyros* ที่ศึกษาครั้งนี้สามารถแยกความแตกต่างได้เป็น 3 แบบดังนี้

แบบที่ 1 ปลายแหลม (acute) เกิดจากขอบใบสองข้างชนกันที่ปลายเป็นมุม (ภาพที่ 5ก) เมื่อพิจารณาถึงการกระจายตัวของพืชสกุล *Diospyros* ที่ทำการศึกษาค้นคว้ามีจำนวน 8 กลุ่มตัวอย่างคือกลุ่มตัวอย่างของเนียน (*D. diepenhorstii*), มะริด (*D. philippensis*), ลำปัด (*D. ferrea*), ลำปัดดง (*D. filipendula*), พญารากดำ (*D. rubra*), ม่าย (*D. transitoria*), หัวแสนปม (*D. cauliflora*) และตะโกนา (*D. rhodocalyx*) (ภาพที่ 6)

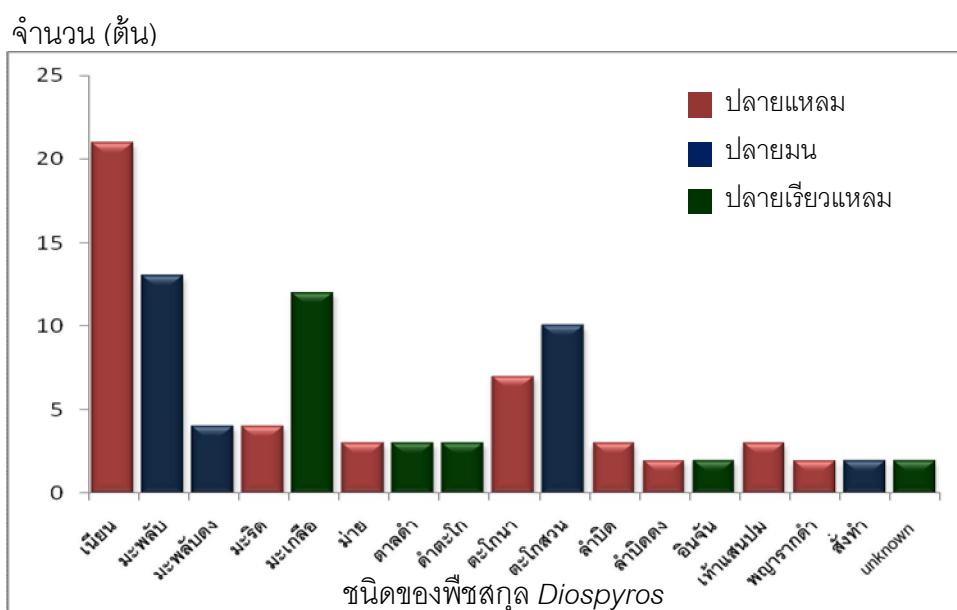
แบบที่ 2 ปลายเรียวแหลม (acuminate) เกิดจากปลายแหลม แต่คอดเว้าเล็กน้อย (ภาพที่ 5ข) เมื่อพิจารณาถึงการกระจายตัวของพืชสกุล *Diospyros* ที่ทำการศึกษาค้นคว้ามีจำนวน 5 กลุ่มตัวอย่างคือกลุ่มตัวอย่างของมะเกลือ (*D. mollis*) ตาลดำ (*D. montana*), ดำตะโก (*D. wallichii*), อินจัน (*D. decandra*) และ unknown (ภาพที่ 6)

แบบที่ 3 ปลายใบมน (obtuse) ปลายใบโค้งมนแต่สอบแคบกว่าใบที่มีลักษณะรูปกลม (ภาพที่ 5ค) เมื่อพิจารณาถึงการกระจายตัวของพืชสกุล *Diospyros* ที่ทำการศึกษาค้นคว้ามีจำนวน 4 กลุ่มตัวอย่างคือ กลุ่มตัวอย่างของมะพลับ (*D. areolata*), มะพลับดง (*D. bejaudii*), ตะโกสวน (*D. malabarica*) และส้มท่า (*D. buxifolia*) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 ลักษณะปลายใบของพืชสกุล *Diospyros* ที่สุ่มเก็บตัวอย่างทางภาคใต้ของประเทศไทย

- (ก) ปลายแหลม (acute)
- (ข) ปลายเรียวแหลม (acuminate)
- (ค) ปลายใบมน (obtuse)

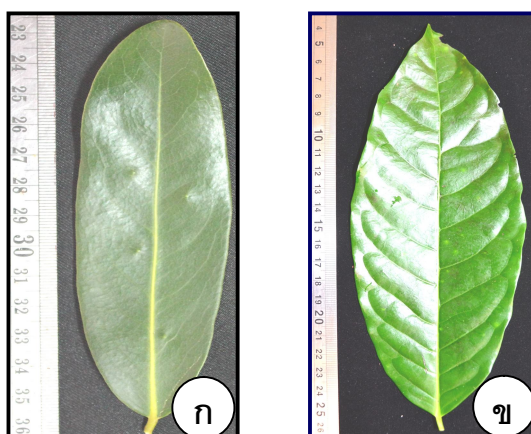


ภาพที่ 6 การกระจายตัวของลักษณะปลายใบในกลุ่มประชากรพืชสกุล *Diospyros* ที่สุ่มเก็บตัวอย่างทางภาคใต้ของประเทศไทย

1.2.3 ขอบใบ

พืชสกุล *Diospyros* ที่ทำการศึกษานี้สามารถจำแนกลักษณะของขอบใบได้เป็น 2 ลักษณะคือขอบใบเรียบ (entire) ขอบใบเรียบ (entire) (ภาพที่ 7ก) และขอบใบแบบคลื่น (undulate) (ภาพที่ 7ข) เมื่อพิจารณาถึงการกระจายตัวของพืชสกุลนี้พบว่า ส่วนใหญ่มีลักษณะ

ขอบใบแบบเรียบซึ่งมีจำนวน 16 กลุ่มตัวอย่างคือ กลุ่มตัวอย่างของตะโกนา (*D. rhodocalyx*) ตะโกสวน (*D. malabarica*) มะพลับ (*D. areolata*) มะพลับดง (*D. bejaudii*) มะเกลือ (*D. mollis*) สั่งท่า (*D. buxifolia*) ลำปัด (*D. ferrea*) ลำปัดดง (*D. filipendula*) อินจัน (*D. decandra*) ตาลดำ (*D. montana*) ดำตะโก (*D. wallichii*) พญารากดำ (*D. rubra*) เนียน (*D. diepenhorstii*) มะริด (*D. philippensis*) ม่าย (*D. transitoria*) และ unknown ยกเว้น เต้าแสนปม (*D. cauliflora*) ซึ่งมีลักษณะขอบใบเป็นคลื่น (undulate) (ภาพที่ 8)

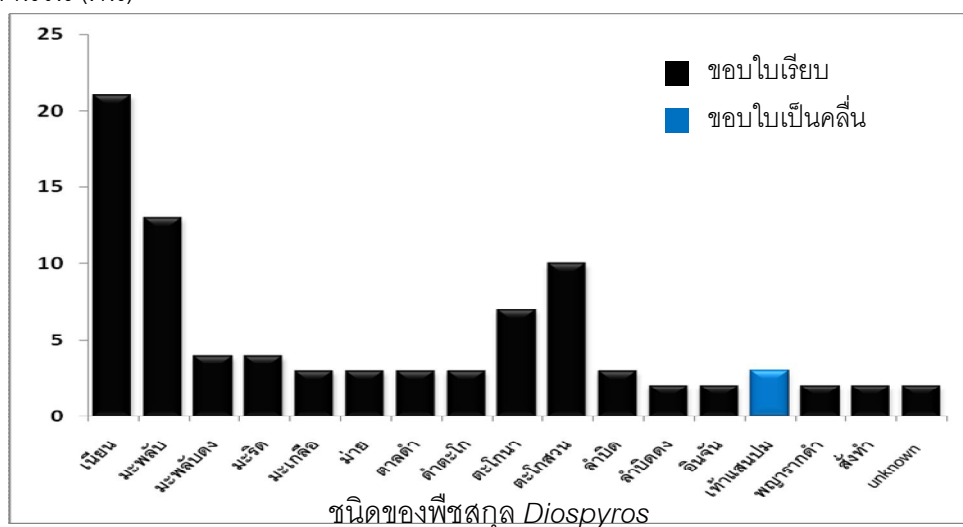


ภาพที่ 7 ลักษณะขอบใบของพืชสกุล *Diospyros* ที่สุ่มเก็บตัวอย่างทางภาคใต้ของประเทศไทย

(ก) ขอบใบเรียบ (entire)

(ข) ขอบใบเป็นคลื่น (undulate)

จำนวน (ต้น)



ภาพที่ 8 การกระจายตัวของลักษณะขอบใบในกลุ่มประชากรพืชสกุล *Diospyros* ที่สุ่มเก็บตัวอย่างทางภาคใต้ของประเทศไทย

1.2.4 ฐานใบ

ลักษณะฐานใบของพืชสกุล *Diospyros* ที่ศึกษาครั้งนี้สามารถแยกความแตกต่างได้เป็น 3 แบบดังนี้

แบบที่ 1 ฐานใบแหลม (cuneate) เกิดจากขอบใบสองข้างชนกันที่ฐานใบเป็นมุม พบในกลุ่ม (ภาพที่ 9ก) เมื่อพิจารณาถึงการกระจายตัวพบว่ากลุ่มพืชที่ศึกษามีลักษณะฐานใบแบบแหลมมีจำนวน 15 กลุ่มตัวอย่างคือ กลุ่มตัวอย่างของตะโกนา (*D. rhodocalyx*), ตะโกสวน (*D. malabarica*), มะพลับ (*D. areolata*), มะเกลือ (*D. mollis*), ส้มท่า (*D. buxifolia*), ลำบิด (*D. ferrea*), ลำบิดดง (*D. filipendula*), อินจัน (*D. decandra*), ดำตะโก (*D. wallichii*), พญารากดำ (*D. rubra*), เนียน (*D. diepenhorstii*), มะริด (*D. philippensis*), เห่าแสนปม (*D. cauliflora*), ม่าย (*D. transitoria*) และ unknown

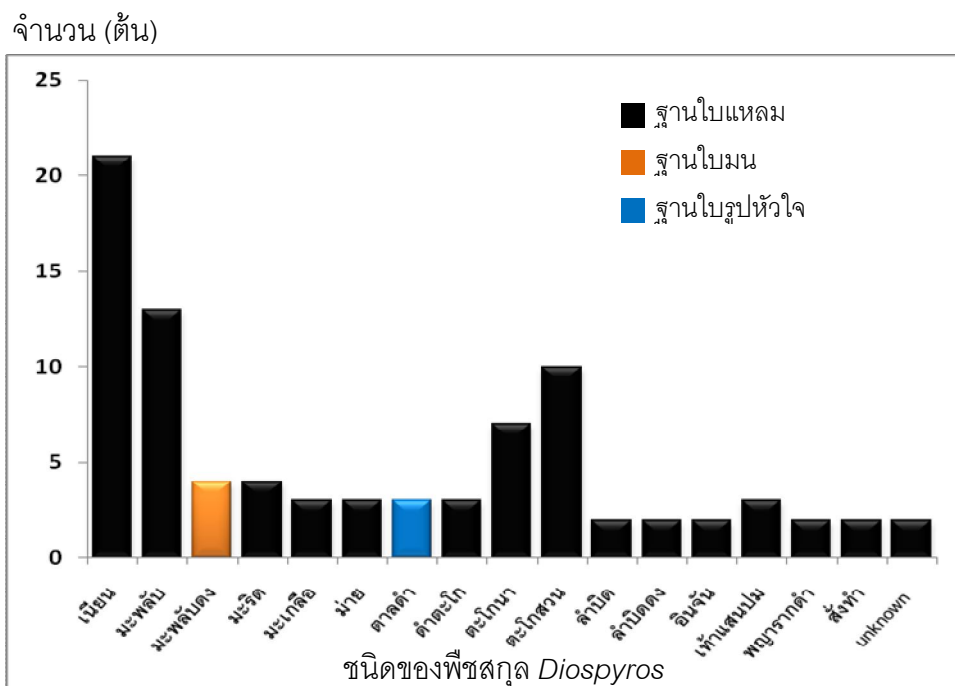
แบบที่ 2 ฐานใบมน (obtuse) ปลายโคนใบโค้งมนแต่สอบแคบกว่าใบที่มีลักษณะรูปกลมพบในกลุ่มตัวอย่างของมะพลับดง (*D. bejaudii*) เพียงชนิดเดียว (ภาพที่ 9ข)

แบบที่ 3 ฐานใบเป็นรูปหัวใจ (cordate) พบในกลุ่มตัวอย่างของตาลดำ (*D. montana*) เพียงชนิดเดียว (ภาพที่ 9ค) (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 9 ลักษณะฐานใบของพืชสกุล *Diospyros* ที่สุ่มเก็บตัวอย่างทางภาคใต้ของประเทศไทย

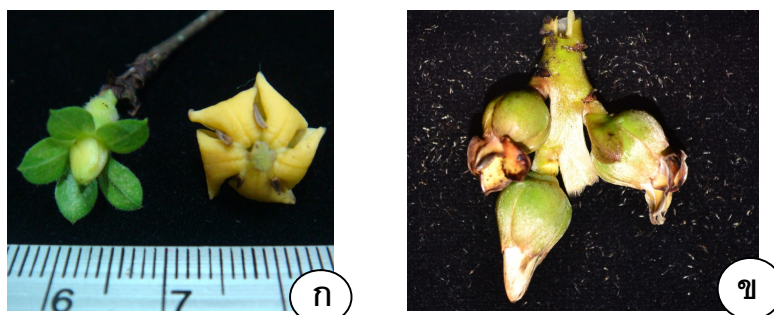
- (ก) ฐานใบแหลม (cuneate)
- (ข) ฐานใบมน (obtuse)
- (ค) ฐานใบเป็นรูปหัวใจ (cordate)



ภาพที่ 10 การกระจายตัวของลักษณะสฐานใบในกลุ่มประชากรพืชสกุล *Diospyros* ที่สุ่มเก็บตัวอย่างทางภาคใต้ของประเทศไทย

1.3 ลักษณะดอกและช่อดอกของพืชสกุล *Diospyros*

ดอกแยกเพศต่างต้น บางครั้งแยกเพศร่วมต้น ดอกมีลักษณะคล้ายระฆังคว่ำ ซึ่งดอกจะออกเป็นช่อกระจุกสั้นๆ หรือออกเดี่ยว ตามชอกใบหรือตามกิ่งและลำต้น กลีบเลี้ยงมีประมาณ 4-6 กลีบ ติดทนขยายในผล กลีบดอกเชื่อมติดกัน เกสรเพศผู้มี 4 อัน ยอดเกสรเพศเมียแยกเป็น 2 แฉก โดยที่เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียแยกกันอยู่ ซึ่งอาจจะอยู่ภายในต้นเดียวกันหรือแยกต้นแล้วแต่ชนิดของพืช ช่อดอกเป็นแบบแยกแขนง (panicle) การศึกษาครั้งนี้จำแนกลักษณะดอกของพืชสกุล *Diospyros* ซึ่งเก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 4 ชนิดคือ มะเกลือ (*D. mollis*) มะริด (*D. philippensis*) ตาลดำ (*D. montana*) และ unknown ซึ่งสามารถจำแนกลักษณะดอกออกเป็น 2 ลักษณะคือ ดอกที่ออกเป็นดอกเดี่ยวตามชอกใบ พบในกลุ่มตัวอย่างของมะเกลือ (*D. mollis*) (ภาพที่ 6ก) และดอกที่ออกเป็นช่อกระจุกสั้น ๆ ตามชอกใบ พบในกลุ่มตัวอย่างของมะริด (*D. philippensis*) ตาลดำ (*D. montana*) และ unknown (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ตัวอย่างลักษณะดอกและช่อดอกของพืชสกุล *Diospyros* ที่สุ่มเก็บตัวอย่างทางภาคใต้ของประเทศไทย

(ก) ดอกเดี่ยว เช่น ดอกมะเกลือ

(ข) ดอกช่อ เช่น มะริด

1.4 ลักษณะผลของพืชสกุล *Diospyros*

ผล มีลักษณะค่อนข้างกลม กลีบเลี้ยงติดแน่น มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.5-5 เซนติเมตร ก้านผลยาวประมาณ 2-10 มิลลิเมตร เนื้อของผลจะมีสีเหลืองนวลหรือสีขาวตามชนิดของพืชสกุลนี้ เมล็ดสีน้ำตาลดำทรงรีแป้น ขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร แต่ละผลมีเมล็ดประมาณ 4-8 เมล็ด บางชนิดไม่มีเมล็ด การศึกษาครั้งนี้จำแนกลักษณะผลของพืชสกุล *Diospyros* ที่เก็บตัวอย่างได้ทั้งหมด 7 ชนิด คือ มะริด (*D. philippensis*) มะพลับ (*D. areolata*) ลำบิตดง (*D. filipendula*) ตะโกสวน (*D. malabraica*) ตาลดำ (*D. montana*) เนียน (*D. diepenhorstii*) และม่าย (*D. transitoria*) ซึ่งสามารถจำแนกลักษณะผลออกเป็น 2 ลักษณะคือ ลักษณะผิวเปลือกผลเกลี้ยงพบในกลุ่มตัวอย่างของ มะพลับ (*D. areolata*) ลำบิตดง (*D. filipendula*) ตะโกสวน (*D. malabraica*) ตาลดำ (*D. montana*) (ภาพที่ 7ก) และลักษณะผิวเปลือกผลมีขนปกคลุมพบในกลุ่มตัวอย่างของมะริด (*D. philippensis*) เนียน (*D. diepenhorstii*) และม่าย (*D. transitoria*) (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 ตัวอย่างผลของพืชสกุล *Diospyros* ที่สุ่มเก็บตัวอย่างทางภาคใต้ของประเทศไทย

(ก) ผิวเปลือกผลเกลี้ยง เช่นผลมะพลับ

(ข) ผิวเปลือกผลมีขนปกคลุม เช่นผลเนียน

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

2.1 การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

จากการสกัดดีเอ็นเอของใบพืชสกุล *Diospyros* โดยบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ร่วมกับ CTAB พบว่า สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ครั้งละประมาณ 10-60 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำไปเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

2.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิคอาร์เอพีดี

2.2.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างตัวแทนประชากรของพืชสกุล *Diospyros* โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์

ทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างตัวแทนพืชสกุล *Diospyros* แต่ละชนิด โดยใช้ตัวอย่างพืชสกุล *Diospyros* ทั้ง 17 ชนิด ที่ทำการศึกษาคือ เนียน มะพลับ มะพลับดง มะริด มะเกลือ ม่าย ตะโกสวน ตะโกนา สังก้า พญารากดำ เท้าแสนปม จันอิน ลำบิด ลำบิดดง ดำตะโก ตาลดำ และ unknown นำมาทดสอบกับไพรเมอร์ 10 เบส จากไพรเมอร์ที่เคยมีผู้ศึกษามาก่อนในพืชสกุล *Diospyros* จำนวน 52 ไพรเมอร์ และคัดเลือกไพรเมอร์เพิ่มเติมอีก 8 ไพรเมอร์ รวมทั้งหมด 60 ไพรเมอร์ จากผลการทดลอง พบว่ามีไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจำนวนชัดเจน 15 ไพรเมอร์ และ 45 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน จากจำนวนไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเบื้องต้น จำนวน 15 ไพรเมอร์ นำมาทดสอบรอบที่สอง เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลของแถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด ปรากฏว่าคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผลดีที่สุด จำนวน 8 ไพรเมอร์ คือ OPB-05, OPB-10, OPB-11, OPB-12, OPJ-05, OPM-05, OPM-06 และ OPY-15 นำมาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุล *Diospyros* ทั้งหมดที่สุ่มเพื่อนำมาศึกษาในครั้งนี้ทั้งสิ้น 96 ตัวอย่าง จากการทดสอบ พบว่า ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 168 แถบ เฉลี่ย 11.60 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 167 แถบ (99.40%) และอีก 1 แถบ (4.14%) เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกัน โดยที่ไพรเมอร์ OPB-12 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด จำนวน 27 แถบ ไพรเมอร์ OPB-05 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด จำนวน 16 แถบ และไพรเมอร์ OPM-05 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 19 แถบ ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะแตกต่างกัน 18 แถบ อีก 1 แถบ เป็นดีเอ็นเอที่มีลักษณะไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 3)

รูปแบบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอาร์เอพีดี – พีซีอาร์ แต่ละไพรเมอร์มีความแตกต่างกันในพืชสกุล *Diospyros* โดยไพรเมอร์ OPB-05 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด

16 แถบ ทั้ง 16 แถบเป็นแถบที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด (ภาพที่ 13) ไพรเมอร์ OPB-10 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 21 แถบ ทั้ง 21 แถบเป็นแถบที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด (ภาพที่ 14) ไพรเมอร์ OPB-11 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 23 แถบ ทั้ง 23 แถบ เป็นแถบที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด (ภาพที่ 15) ไพรเมอร์ OPB-12 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 27 แถบ ทั้ง 27 แถบเป็นแถบที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด (ภาพที่ 16) ไพรเมอร์ OPJ-05 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 21 แถบ เป็นทั้ง 21 แถบเป็นแถบที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด (ภาพที่ 17) ไพรเมอร์ OPM-05 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 19 แถบ ทั้ง 19 แถบเป็นแถบที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด (ภาพที่ 18) ไพรเมอร์ OPM-06 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 22 แถบ ทั้ง 22 แถบเป็นแถบที่ให้ความแตกต่างทั้งหมด (ภาพที่ 19) และไพรเมอร์ OPY-15 ให้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 19 แถบ เป็นแถบที่ให้ความแตกต่างจำนวน 18 แถบ ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน 1 แถบ (ภาพที่ 20)

2.2.2 การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำอาร์เอพีดี – พีซีอาร์ ในพืชสกุล *Diospyros*

จากแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการใช้ไพรเมอร์ 8 ไพรเมอร์ ผลการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างจำนวน 167 แถบ แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะไม่แตกต่างกันเพียง 1 แถบ และพบแถบดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจงกับตะโกสวน (*D. malabarica*) คือ แถบดีเอ็นเอขนาด 220 คู่เบส จากไพรเมอร์ OPJ-05 (ภาพที่ 17) และทั้ง 8 ไพรเมอร์ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้พบว่า พืชในกลุ่มตัวอย่างของเนียน (*D. diepenhorstii*) ทั้ง 21 ตัวอย่างให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างค่อนข้างสูงกว่าพืชกลุ่มอื่น ในขณะที่พืชในกลุ่มตัวอย่างของมะพลับดง (*D. bejaudii*) ม่าย (*D. transitoria*) ตาลดำ (*D. montana*) ดำตะโก (*D. wallichii*) ลำบิด (*D. ferrea*) ลำบิดดง (*D. filipendula*) อินจัน (*D. decandra*) หัวแสนปม (*D. cauliflora*) พญารากดำ (*D. rubra*) สังก้า (*D. buxifolia*) และ unknown ให้แถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน แสดงว่าพืชในกลุ่มเนียน (*D. diepenhorstii*) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าพืชในกลุ่มอื่น ๆ ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้

ตารางที่ 3 ชนิดไพรเมอร์ ลำดับเบส จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน และจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน จากการใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในพืชสกุล *Diospyros* จำนวนทั้งหมด 96 ตัวอย่าง

Primer	Sequence (5' → 3')	Amplified fragments	Monomorphic fragments	Polymorphic fragments
OPB-05	TGC GCC CTT C	16	0	16
OPB-10	CTG CTG GGA C	21	0	21
OPB-11	GTA GAC CCG T	23	0	23
OPB-12	CCT TGA CGC A	27	0	27
OPJ-05	CTC CAT GGG G	21	0	21
OPM-05	GGG AAC GTG T	19	0	19
OPM-06	CTG GGC AAC T	22	0	22
OPY-15	AGT CGC CCT T	19	1	18
Total		168	1	167
Polymorphic (%)		-	-	99.40

2.2.3 การศึกษาความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros*

จากตัวอย่างพืชสกุล *Diospyros* ทั้ง 96 ตัวอย่าง วิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีซึ่งให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 168 แถบ จึงนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ UPGMA cluster analysis (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Avericage) หาค่า Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version-2.1 (NTSYS Version-2.1) (Rohlf, 2002) พบว่า มีดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมในพืชแต่ละชนิด จะมีค่าอยู่ระหว่าง 0.409 – 1.000 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.580 โดยที่มะพลับ (*D. areolata*) กับมะริด (*D. philipensis*) มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูงที่สุดซึ่งมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.887 ในขณะที่เนียน (*D. diepenhorstii*) กับตำตะโก (*D. wallichii*) มีความห่างไกลทางพันธุกรรมมากที่สุด มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.409 สำหรับ unknown พบว่า มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับอินจัน (*D. decandra*), ส้มท่า (*D. buxifolia*) และลำปัด (*D. ferrea*) มากกว่าพืชชนิดอื่นซึ่งมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม

เท่ากับ 0.660, 0.619 และ 0.561 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมของแต่ละชนิดพบดังนี้ เนียน (*D. diepenhorstii*) จำนวน 21 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.565 – 1.00 มะพลับ (*D. areolata*) จำนวน 13 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.642-1.00 มะริด (*D. philippensis*) จำนวน 4 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.750 - 1.00 มะเกลือ (*D. mollis*) จำนวน 12 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.714 - 1.00 ตะโกนา (*D. rhodocalyx*) จำนวน 7 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.726 - 1.00 ตะโกสวน (*D. malabarica*) จำนวน 10 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.642 - 1.00 ลำปัด (*D. ferrea*) จำนวน 3 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.994 - 1.00 หัวแสนปม (*D. cauliflora*) จำนวน 3 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.994 - 1.00 พญารากดำ (*D. rubra*) จำนวน 2 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.994 - 1.00 สำหรับชนิดที่ไม่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอได้แก่ มะพลับดง (*D. bejaudii*) ม่าย (*D. transitoria*) ตาลดำ (*D. montana*) ดำตะโก (*D. wallichii*) ลำปัดดง (*D. filipendula*) อินจัน (*D. decandra*) สั่งทำ (*D. buxifolia*) และ unknown มีค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมเท่ากับ 1.00 และผลจากเดนโดรแกรมสามารถแบ่งกลุ่มพืชที่ศึกษาได้เป็น 4 กลุ่ม (ภาพที่ 21) แยกตามชนิดค่อนข้างชัดเจนดังนี้

กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย เนียน (*D. diepenhorstii*) มะพลับ (*D. areolata*) มะพลับดง (*D. bejaudii*) และมะริด (*D. philippensis*)

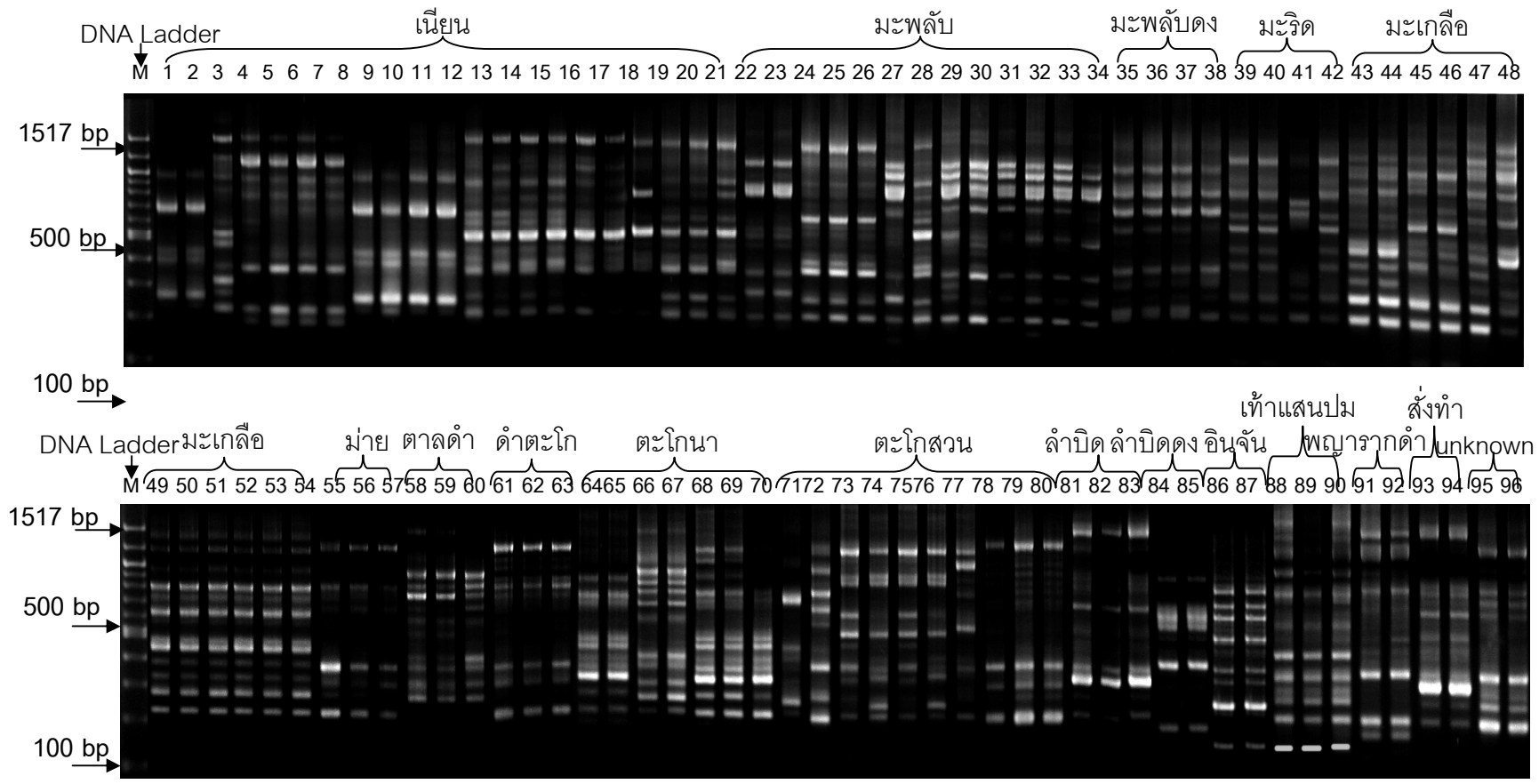
กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย ม่าย (*D. transitoria*) ตาลดำ (*D. montana*) ดำตะโก (*D. wallichii*) ลำปัด (*D. ferrea*) อินจัน (*D. decandra*) สั่งทำ (*D. buxifolia*) มะเกลือ (*D. mollis*) ตะโกนา (*D. rhodocalyx*) ตะโกสวน (*D. malabarica*) และ unknown

กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย หัวแสนปม (*D. cauliflora*) และพญารากดำ (*D. rubra*)

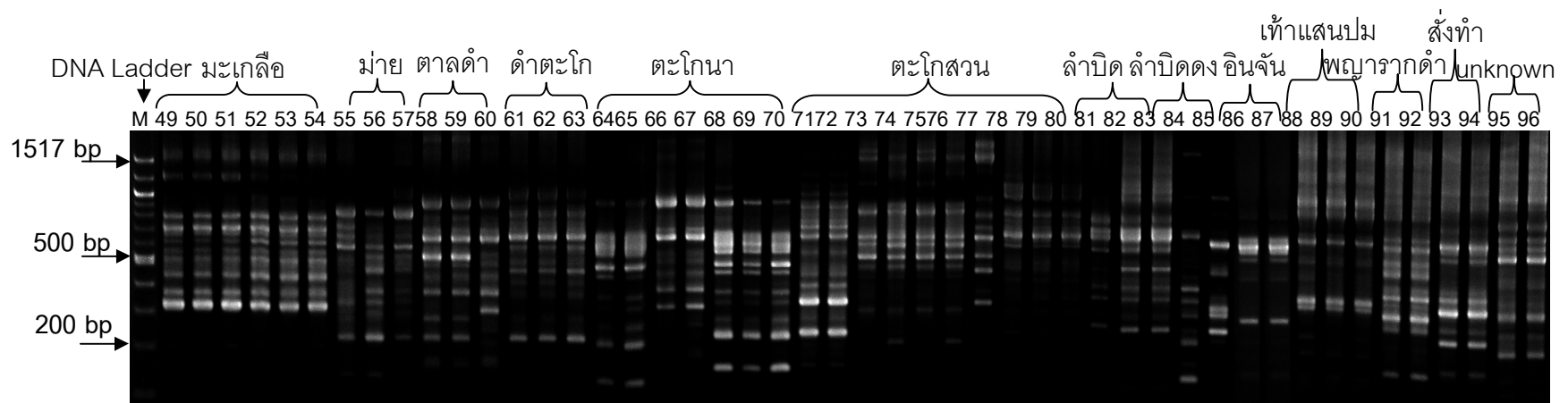
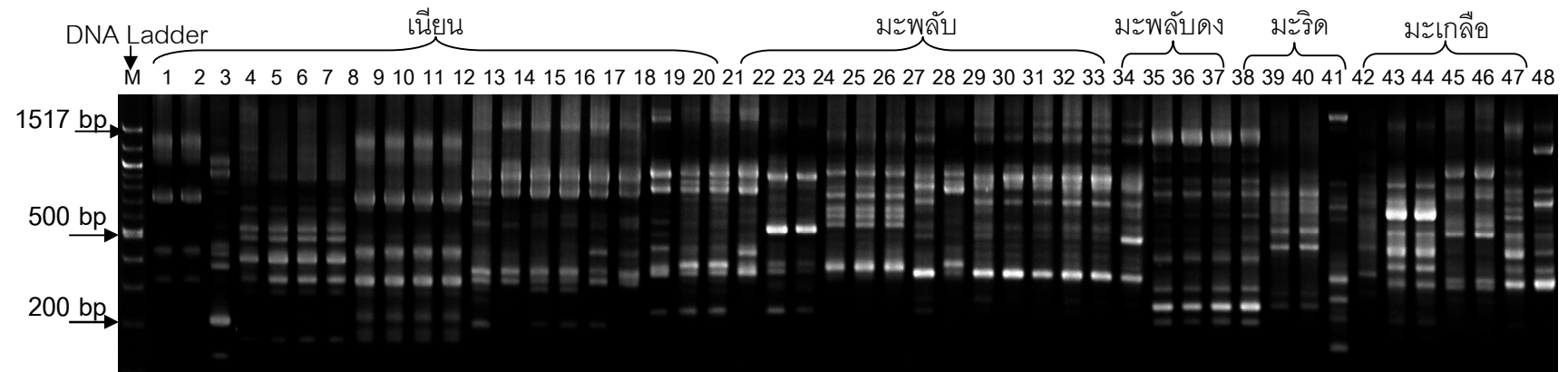
กลุ่มที่ 4 คือ ลำปัดดง (*D. filipendula*) เพียงชนิดเดียว

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* แต่ละชนิด

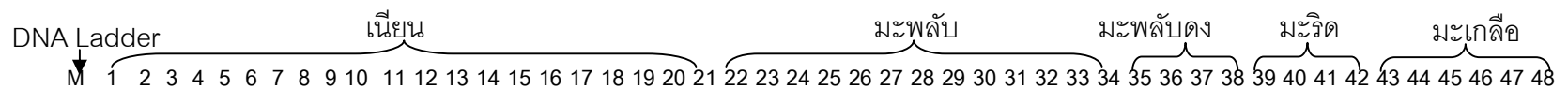
<i>D. diepenhorstii</i>																
<i>D. diepenhorstii</i>																
	<i>D. areolata</i>															
<i>D. areolata</i>	0.691															
		<i>D. bejaudii</i>														
<i>D. bejaudii</i>	0.552	0.678														
			<i>D. philippensis</i>													
<i>D. philippensis</i>	0.622	0.887	0.692													
				<i>D. mollis</i>												
<i>D. mollis</i>	0.554	0.592	0.586	0.736												
					<i>D. transitoria</i>											
<i>D. transitoria</i>	0.546	0.586	0.589	0.586	0.535											
						<i>D. montana</i>										
<i>D. montana</i>	0.519	0.558	0.607	0.624	0.611	0.601										
							<i>D. wallichii</i>									
<i>D. wallichii</i>	0.409	0.550	0.535	0.580	0.622	0.767	0.603									
								<i>D. rhodocalyx</i>								
<i>D. rhodocalyx</i>	0.563	0.560	0.589	0.671	0.589	0.590	0.632	0.608								
									<i>D. malabarica</i>							
<i>D. malabarica</i>	0.526	0.517	0.535	0.570	0.568	0.611	0.582	0.630	0.610							
										<i>D. ferrea</i>						
<i>D. ferrea</i>	0.579	0.587	0.621	0.641	0.606	0.650	0.621	0.628	0.658	0.623						
											<i>D. filipendula</i>					
<i>D. filipendula</i>	0.458	0.434	0.500	0.544	0.520	0.553	0.488	0.488	0.489	0.566	0.502					
												<i>D. decandra</i>				
<i>D. decandra</i>	0.493	0.565	0.601	0.633	0.593	0.595	0.577	0.641	0.607	0.591	0.662	0.636				
													<i>D. cauliflora</i>			
<i>D. cauliflora</i>	0.536	0.565	0.708	0.543	0.580	0.569	0.555	0.492	0.589	0.553	0.577	0.503	0.597			
														<i>D. rubra</i>		
<i>D. rubra</i>	0.553	0.562	0.485	0.523	0.526	0.604	0.556	0.550	0.567	0.540	0.554	0.538	0.526	0.617		
															<i>D. buxifolia</i>	
<i>D. buxifolia</i>	0.541	0.536	0.630	0.592	0.578	0.577	0.547	0.523	0.597	0.546	0.640	0.547	0.625	0.611	0.562	unknown
unknown	0.561	0.587	0.571	0.574	0.575	0.577	0.571	0.599	0.567	0.572	0.561	0.571	0.660	0.563	0.568	0.619

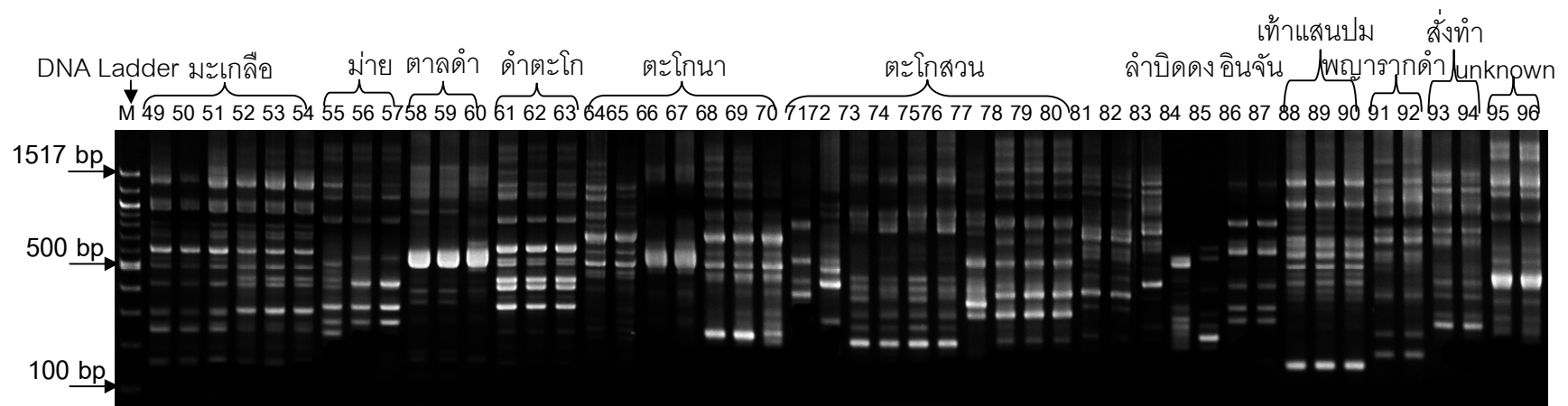
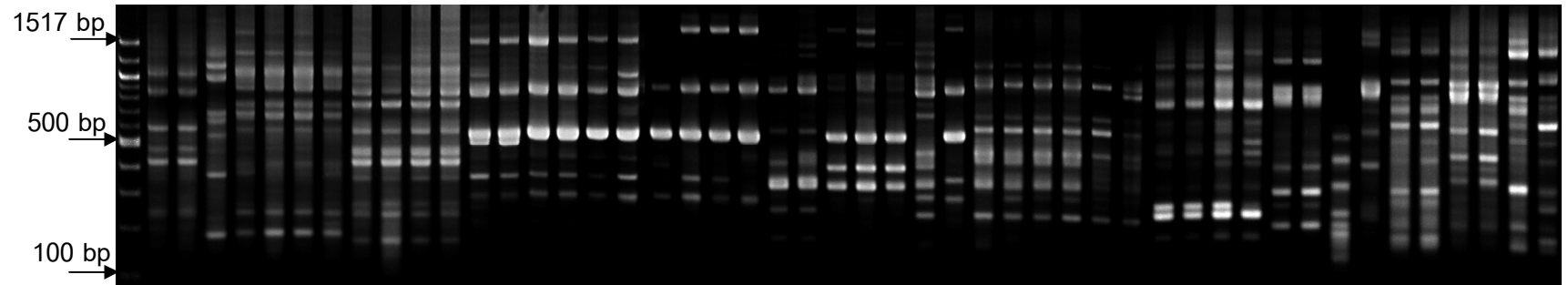


ภาพที่ 13 แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล *Diospyros* จำนวน 16 ชนิด กับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPB-05

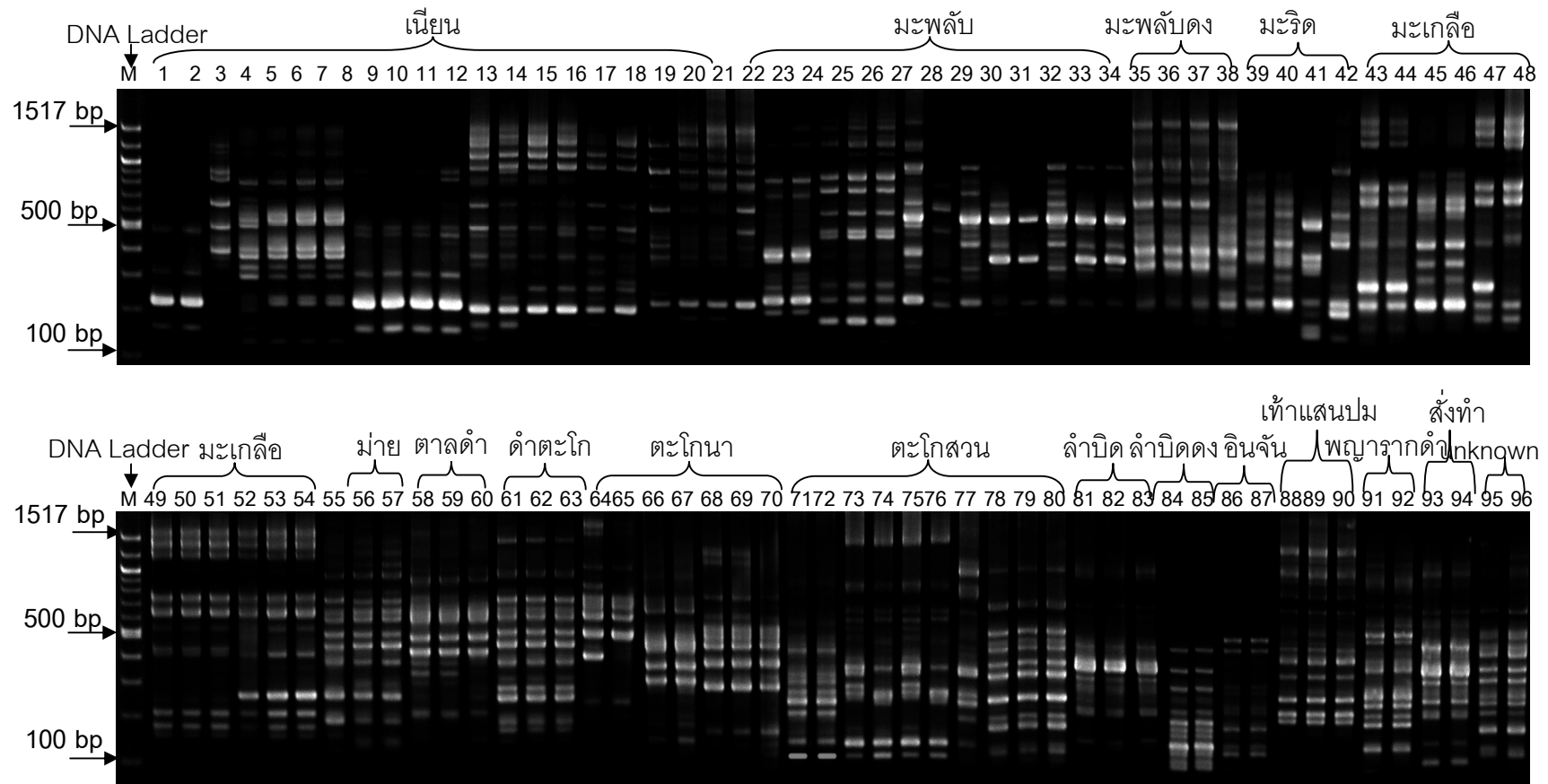


ภาพที่ 14 แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล *Diospyros* จำนวน 16 ชนิด กับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPB-10

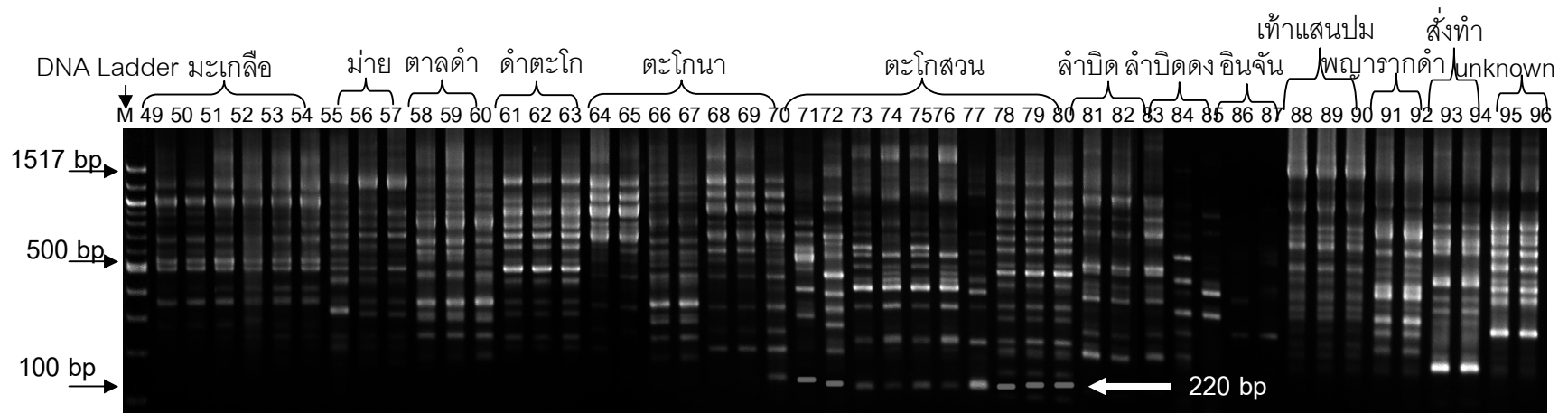
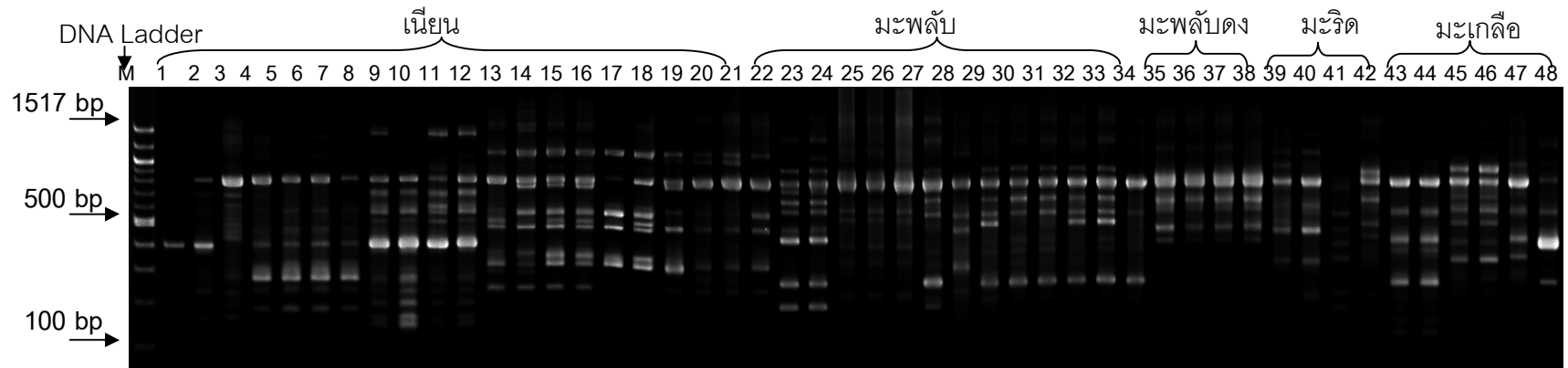




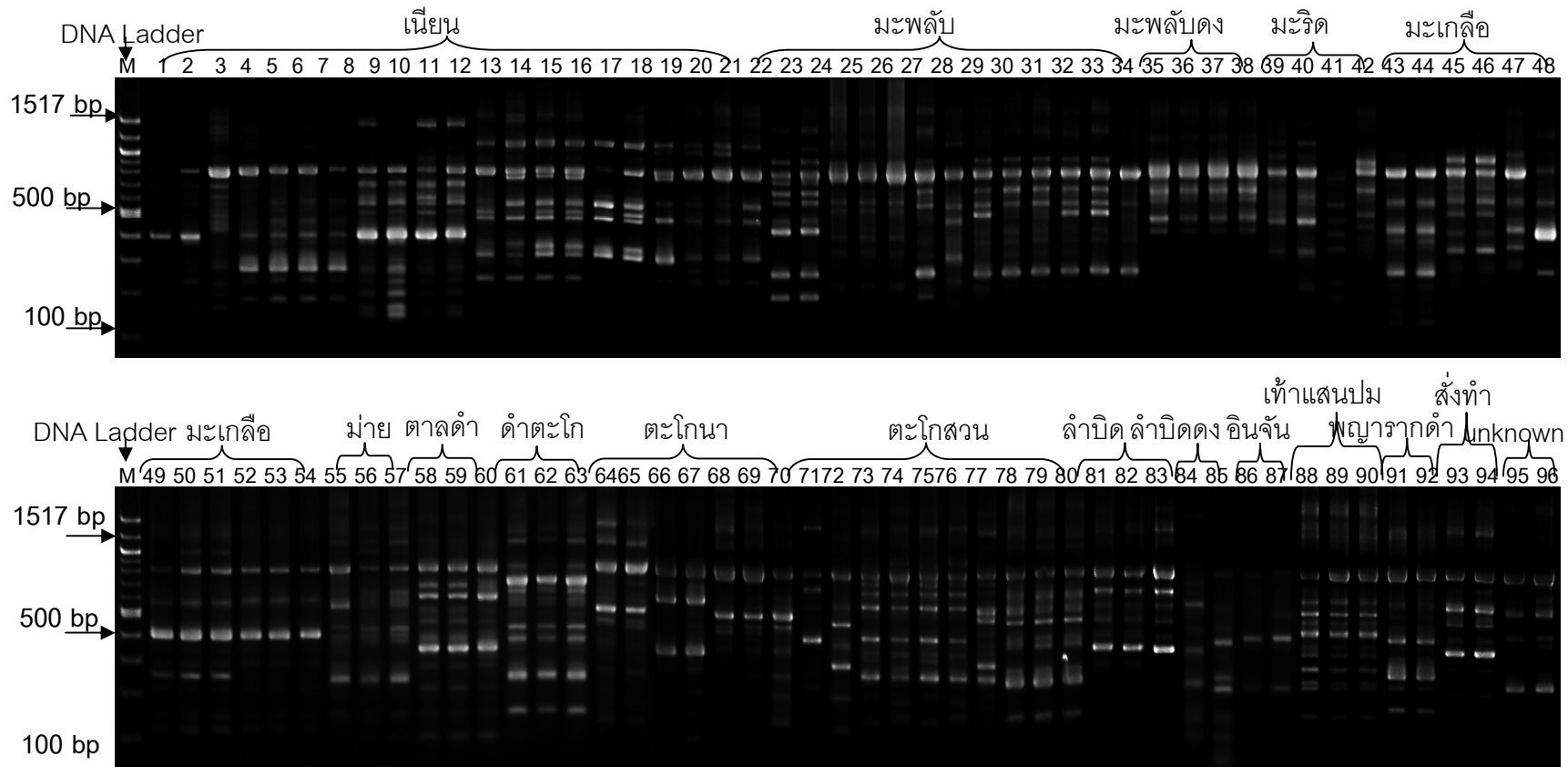
ภาพที่ 15 แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล *Diospyros* จำนวน 16 ชนิด กับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPB-11



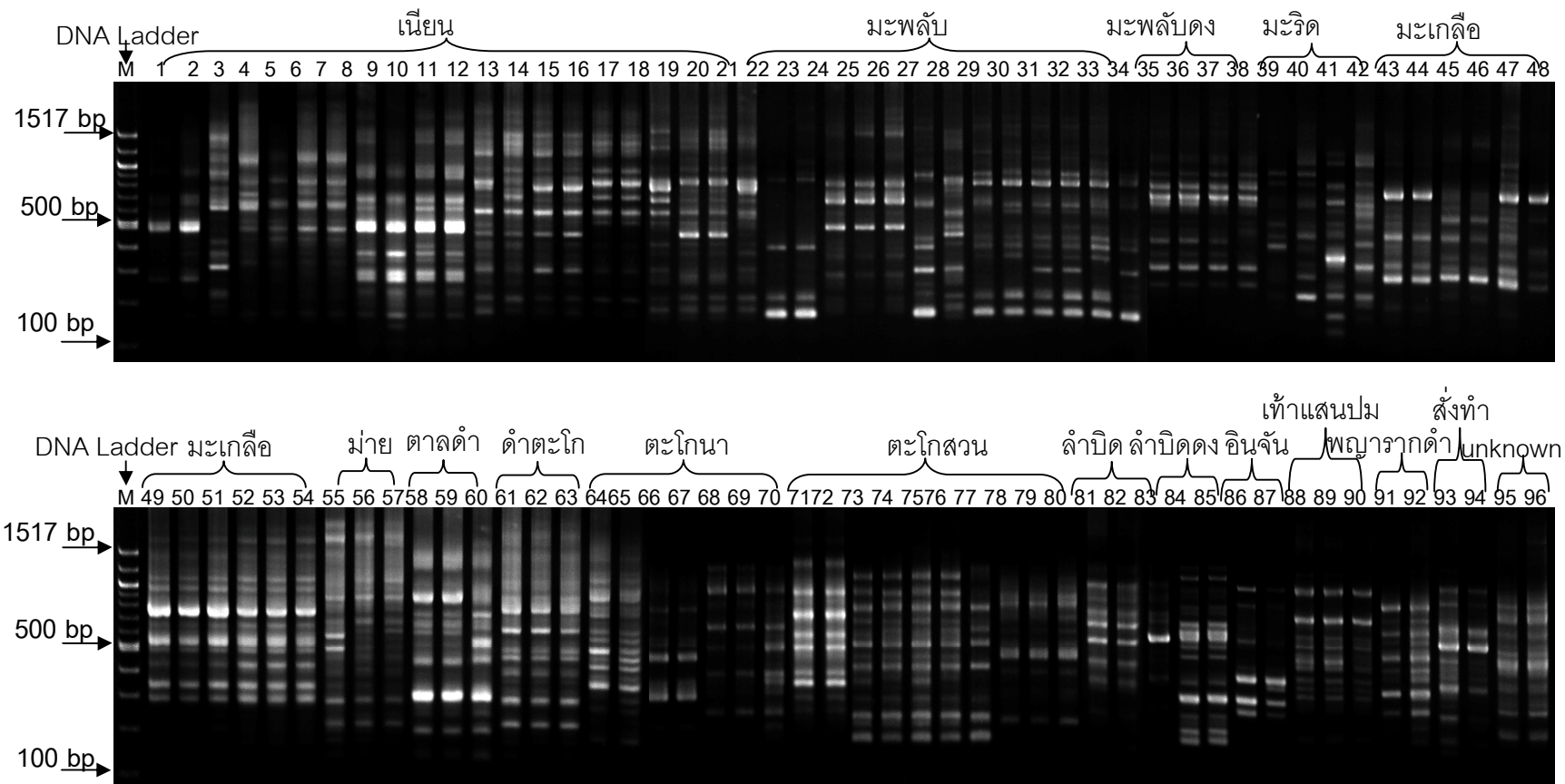
ภาพที่ 16 แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล *Diospyros* จำนวน 16 ชนิด กับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPB-12



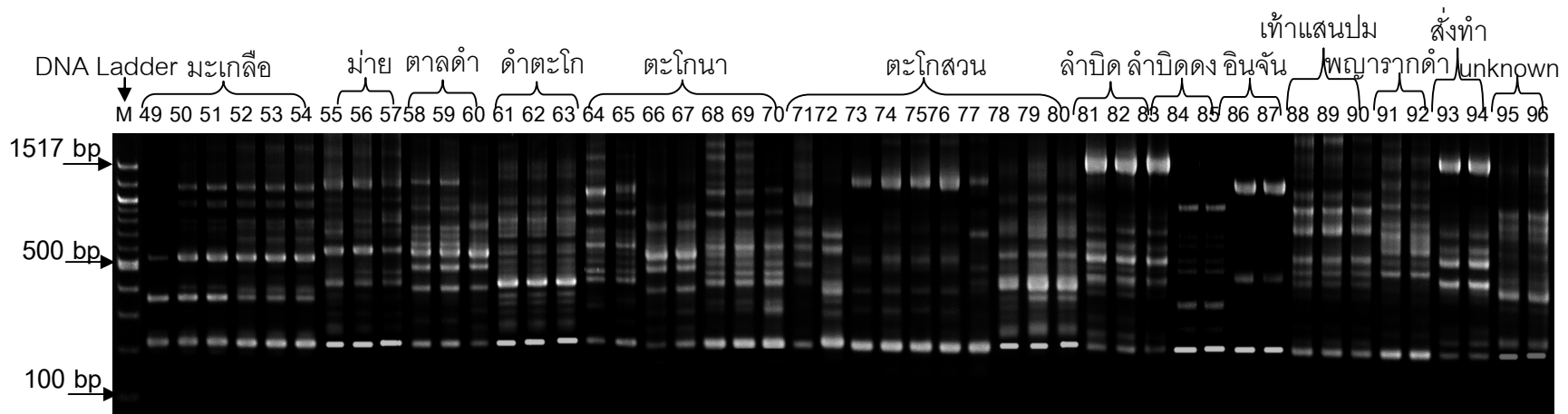
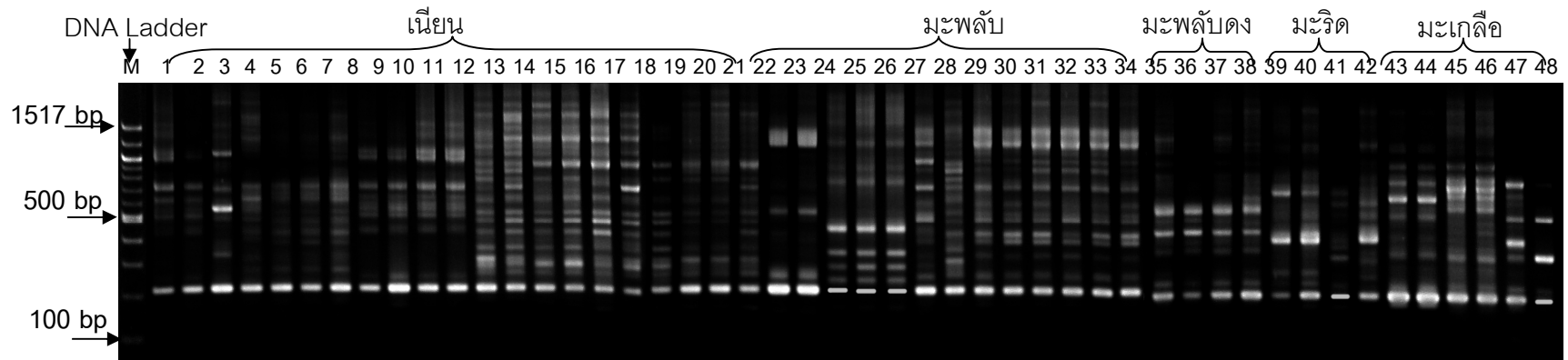
ภาพที่ 17 แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล *Diospyros* จำนวน 16 ชนิด กับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPJ-05



ภาพที่ 18 แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล *Diospyros* จำนวน 16 ชนิด กับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPM-05



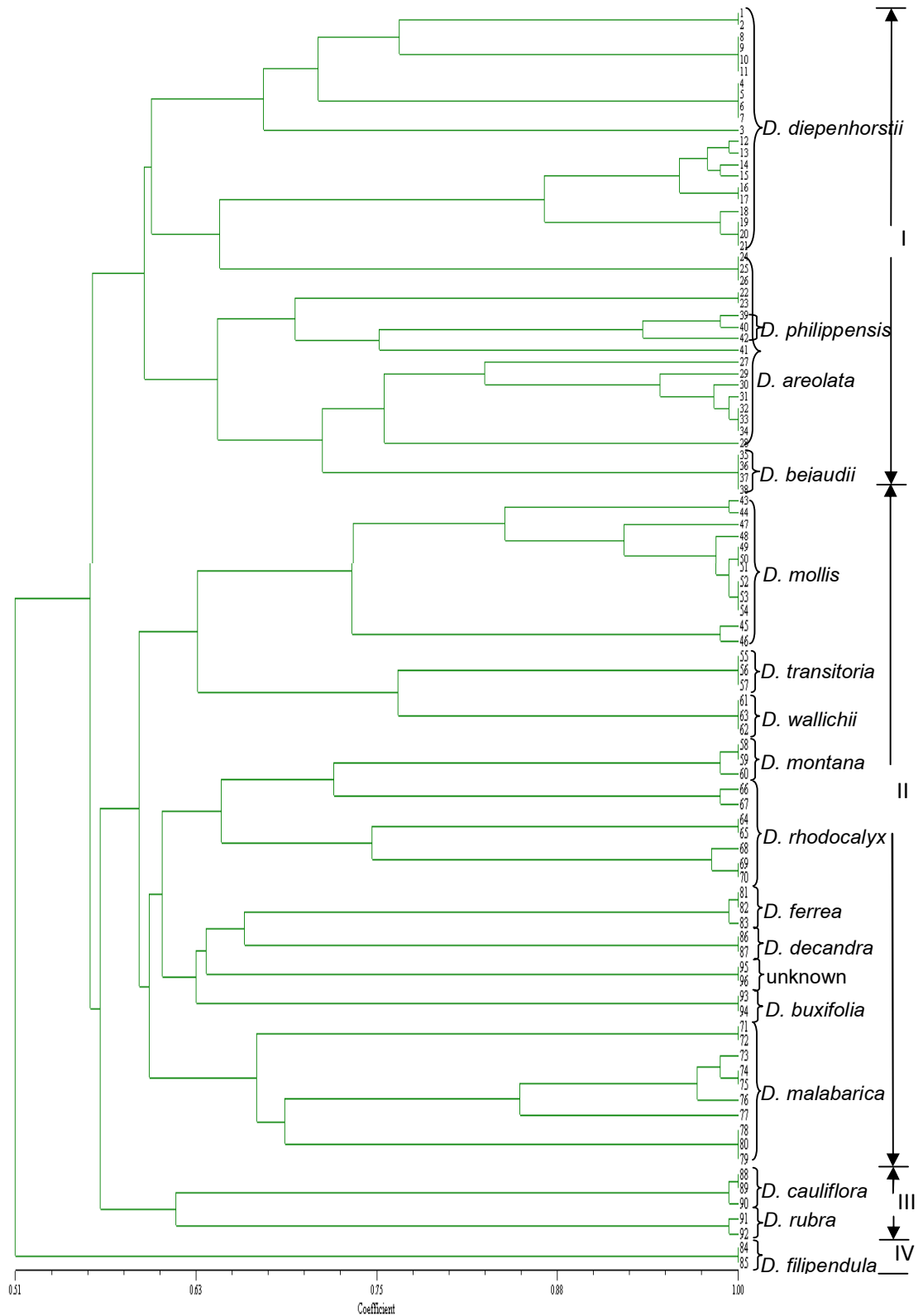
ภาพที่ 19 แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล *Diospyros* จำนวน 16 ชนิด กับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPM-06



ภาพที่ 20 แถบดีเอ็นเอของพืชสกุล *Diospyros* จำนวน 16 ชนิด กับอีก 2 unknown ในการศึกษาครั้งนี้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ OPY-15

หมายเหตุ: จากภาพที่ 13-20 กำหนดให้

- lane 1-21: เนียน (*D. diepenhorstii* Miq.)
 - lane 22-34: มะพลับ (*D. areolata* King & Gamble.)
 - lane 35-38: มะพลับดง (*D. bejaudii* Lecomte.)
 - lane 39-42: มะริด (*D. philippensis* Gurke.)
 - lane 43-54: มะเกลือ (*D. mollis* Griff.)
 - lane 55-57: ม่าย (*D. transitoria* Bakh.)
 - lane 58-60: ตาลดำ (*D. montana* Roxb.)
 - lane 61-63: ดำตะโก (*D. wallichii* King.)
 - lane 64-70: ตะโกนา (*D. rhodocalyx* Kurz.)
 - lane 71-80: ตะโกสวน (*D. malabarica* Kostel.)
 - lane 81-83: ลำบิด (*D. ferrea* Bakh.)
 - lane 84-85: ลำบิดดง (*D. filipendula* Lecomte.)
 - lane 86-87: อินจัน (*D. decandra* Lour.)
 - lane 88-90: เต้าแสนปม (*D. cauliflora* Blume.)
 - lane 91-92: พญารากดำ (*D. rubra* Lecomte.)
 - lane 93-94: ส้มท่า (*D. buxifolia* (Blume) Hiern.)
 - lane 95-96: unknown
- M คือ DNA Ladder ขนาด 100 คู่เบส



ภาพที่ 21 เดนไดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ระหว่างพืชสกุล *Diospyros* จำนวน 16 ชนิด กับอีก 2 unknown จากการวิเคราะห์เทคนิคอาร์เอพีดี ด้วยโปรแกรม 8 โปรแกรม

บทที่ 4

วิจารณ์

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Utsunomiya และคณะ (1998) รายงานว่า ในประเทศไทยพบพืชสกุล *Diospyros* เพียงสกุลเดียว ประมาณ 60 ชนิด จาก 6 สกุล 500 ชนิดทั่วโลก มีกระจายทั่วไปในป่าดิบชื้น ซึ่งพื้นที่ป่าไม้ส่วนใหญ่ในภาคใต้เป็นป่าดิบชื้นตามเทือกเขา พืชในสกุล *Diospyros* ที่พบเห็นได้ทั่วไปในภาคใต้คือเนียน (*D. diepenhorstii*) มะพลับ (*D. areolata*) มะพลับดง (*D. bejaudii*) มะริด (*D. philipensis*) ม่าย (*D. transitoria*) ตาลดำ (*D. montana*) ดำตะโก (*D. wallichii*) ลำบิตดง (*D. filipendula*) ลำบิต (*D. ferrea*) อินจัน (*D. decandra*) สังก้า (*D. buxifolia*) มะเกลือ (*D. mollis*) ตะโกนา (*D. rhodocalyx*) ตะโกสวน (*D. malabarica*) ทำแสนปม (*D. cauliflora*) และพญารากดำ (*D. rubra*) ขณะเดียวกันบางชนิดมีลักษณะคล้ายกันมาก และแต่ละพื้นที่มีชื่อเรียกแตกต่างกัน ส่งผลทำให้เกิดความไม่ชัดเจนในการจำแนกชนิดพืชด้วยลักษณะสัณฐานวิทยา จึงมีความจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเข้ามาช่วย ในเบื้องต้นต้องอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นอันดับแรก ซึ่งลักษณะสัณฐานวิทยาที่นำมาใช้ในการประเมินตัวอย่างพืชสกุล *Diospyros* ทั้ง 96 ตัวอย่าง ได้แก่ ลักษณะลำต้น ใบ ดอก และผล พบว่าลำต้นของพืชสกุล *Diospyros* แบ่งได้เป็น 2 แบบคือ ลักษณะลำต้นแบบเปลือกแตกและลักษณะลำต้นแบบเปลือกเรียบ โดยมี 7 ชนิดที่มีลักษณะลำต้นแบบเปลือกแตก และมี 10 ชนิดที่มีลักษณะลำต้นแบบเปลือกเรียบ ลักษณะใบสามารถนำมาจำแนกชนิดได้ในระดับหนึ่ง ส่วนลักษณะดอกและผล พบว่าในการศึกษาพืชที่ทำการศึกษาคั้งนี้ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เพราะบางต้นที่เก็บตัวอย่าง ไม่ออกดอกและติดผลในช่วงที่ทำการศึกษา ทั้งนี้เนื่องจากสภาพอากาศที่ผันแปรมีผลกระทบโดยตรงต่อการพัฒนาของดอกและผลมีเพียง 4 ชนิดคือ มะเกลือ มะริด ตาลดำ และ unknown ที่สามารถเก็บตัวอย่างดอกมาบันทึกได้ และมีเพียง 7 ชนิดคือ ลำบิต มะพลับ ตะโกสวน มะริด ม่าย เนียน และตาลดำที่สามารถเก็บตัวอย่างผลมาบันทึกได้ ซึ่งลักษณะของดอกและผลน่าจะเป็นลักษณะสัณฐานที่มีความแตกต่างกัน และจำแนกชนิดได้ชัดเจน แต่เนื่องจากต้นที่ศึกษาไม่สามารถติดดอกและผลได้ ทำให้ยากต่อการจำแนก

ด้วยข้อจำกัดทางลักษณะสัณฐานวิทยาหรือช่วงระยะเวลาไม่เหมาะสม ดังนั้นการใช้เครื่องหมายชีวโมเลกุลจึงเป็นสิ่งที่ยืนยันความแตกต่างของชนิดพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ

(Ahmad *et al.*, 2008; Badenes *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2011) จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 8 ชนิด ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มกับดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากตัวอย่างพืชสกุล *Diospyros* ที่ศึกษาครั้งนี้ จำนวนทั้งสิ้น 96 ต้น ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 168 แถบ เฉลี่ย 11.60 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 167 แถบ (99.40%) และอีก 1 แถบ (4.14%) เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกัน ไพรเมอร์ OPB-12 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด จำนวน 27 แถบ ไพรเมอร์ OPB-05 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด จำนวน 16 แถบ แสดงให้เห็นถึงความผันแปรของพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* เมื่อวิเคราะห์จากค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม พบว่าจากตัวอย่างทั้งหมดมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.409 – 1.000 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.580 เมื่อพิจารณาถึงกลุ่มตัวอย่างพืชชนิดเดียวกันที่เก็บจากสถานที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่จะให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน แสดงว่าพื้นที่ที่มีผลต่อความผันแปรทางพันธุกรรม เนื่องจากพืชสกุลนี้เป็นพืชผสมข้าม และการขยายพันธุ์ส่วนใหญ่ใช้เมล็ดเป็นส่วนใหญ่ ต้นใหม่ที่ได้จึงได้มาจากการผสมข้ามต่างต้นที่อยู่บริเวณใกล้เคียง พันธุกรรมของพืชจึงใกล้ชิดกันมากกว่าตัวอย่างพืชจากแหล่งต่างกัน พบว่าพืชในกลุ่มเนียน (*D. diepenhorstii*) จำนวน 21 ตัวอย่าง จากหลายพื้นที่ เมื่อคุณลักษณะพื้นฐานเช่น ลำต้นและใบ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อใช้เทคนิคอาร์เอพีดีพบว่าให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.565 – 1.00 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wen-bin และคณะ (2006) ที่พบว่า ความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้น *Chrysanthemum* ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของตัวอย่างแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจำนวนตัวอย่างของพืชที่ศึกษาครั้งนี้ ในบางชนิดมีจำนวนน้อยเช่น พญาราดำ สังกะสี เต้าแสนปม และอินจัน เป็นต้น หากเพิ่มจำนวนตัวอย่างมากขึ้นอาจพบความหลากหลายมากกว่าที่ได้ แต่พืชกลุ่มดังกล่าวข้างต้นมีจำนวนน้อยและหายาก เนื่องจากปัจจุบันพืชเหล่านี้ถูกทำลายเพื่อใช้พื้นที่ในการปลูกพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น จนใกล้สูญพันธุ์

การขยายพันธุ์ของพืชสกุล *Diospyros* สามารถทำได้หลายวิธี โดยเฉพาะชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเช่น พลับ (*D. kaki*) นอกจากการเพาะเมล็ดแล้วยังสามารถขยายพันธุ์โดยการใช้หน่อที่งอกมาราก การติดตา ต่อกิ่ง เป็นต้น ในกรณีของการต่อกิ่งพืชที่ใช้เป็นต้นตอ เช่น ตะโกนา ตะโกสวน จันเข่า และมะพลับดง เป็นต้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2541) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าผลของพืชสกุล *Diospyros* บางชนิดไม่ติดเมล็ดเช่น *D. decandra*, *D. malabarica* และ *D. areolata* ซึ่งอาจเป็นผลที่เกิดแบบ parthenocarpic (Utsunomiya *et al.*, 1998) ดังนั้นจึงต้องขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ โดย *D. decandra* ต้นที่ไม่ติดเมล็ดคนไทยตะ

เรียกว่าจัน ส่วนต้นที่ติดเมล็ดจะเรียกว่าอิน ซึ่งเมื่อพิจารณาจากเทคนิคอาร์เอพีดีพบว่าตัวอย่างอินจัน 2 ต้นที่ใช้ศึกษาครั้งนี้มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมด อาจเป็นไปได้ว่าต้นตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็น *D. decandra* จันซึ่งมีการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศเนื่องจากไม่ติดเมล็ด

เมื่อพิจารณาระหว่างชนิดของพืชสกุลนี้พบว่ามะพลับ (*D. areolata*) กับมะริด (*D. philippensis*) มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมมากที่สุด มีค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.887 ซึ่งหากดูลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่า พืชทั้งสองชนิดมีลักษณะใกล้เคียงกัน โดยเฉพาะลักษณะและรูปร่างใบมีลักษณะปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ และฐานใบแหลม ในขณะที่ เนียน (*D. diepenhorstii*) กับดำตะโก (*D. wallichii*) มีความห่างไกลทางพันธุกรรมมากที่สุด มีค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.409 พืชทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกันคือ เนียนมีลักษณะรูปร่างใบแบบขนาน ปลายใบแหลม ส่วนดำตะโกมีลักษณะรูปร่างใบแบบรี ปลายใบแบบเรียวแหลม สำหรับ unknown พบว่า มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับอินจัน (*D. decandra*), สั้่งท่า (*D. buxifolia*) และลำบิด (*D. ferrea*) มากกว่าพืชชนิดอื่น โดยมีค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.660, 0.619 และ 0.561 ตามลำดับ สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาซึ่งมีลักษณะใบใกล้เคียงกันคือ ลักษณะรูปร่างใบเป็นรูปไข่ ปลายใบเรียวแหลม และฐานใบแหลม และผลจากเดนไดรแกรมสามารถแบ่งกลุ่มพืชที่ศึกษาได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้ โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยกลุ่มตัวอย่างของ เนียน (*D. diepenhorstii*) มะพลับ (*D. areolata*) มะพลับดง (*D. bejaudii*) และ มะริด (*D. philippensis*) ลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชในกลุ่มนี้บางชนิดแตกต่างกัน โดยที่เนียน (*D. diepenhorstii*) กับมะริด (*D. philippensis*) มีลักษณะลำต้นเป็นแบบเปลือกเรียบ ลักษณะปลายใบแหลม ขอบใบเรียบ และฐานใบแหลม มีลักษณะรูปร่างใบที่แตกต่างกันคือเนียน (*D. diepenhorstii*) มีรูปร่างใบแบบขอบขนาน และมะริด (*D. philippensis*) มีลักษณะรูปร่างใบรูปไข่ ส่วนมะพลับ (*D. areolata*) กับมะพลับดง (*D. bejaudii*) จะมีลักษณะลำต้นเป็นแบบเปลือกแตก ลักษณะรูปร่างใบแบบขอบขนาน ปลายใบมน ขอบใบเรียบ แต่มีลักษณะฐานใบต่างกันคือ มะพลับ (*D. areolata*) มีฐานใบแหลม และมะพลับดง (*D. bejaudii*) มีฐานใบมน กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย มะเกลือ (*D. mollis*) ม่าย (*D. transitoria*) ตาลดำ (*D. montana*) ดำตะโก (*D. wallichii*) ลำบิด (*D. ferrea*) อินจัน (*D. decandra*) สั้่งท่า (*D. buxifolia*) ตะโกนา (*D. rhodocalyx*) ตะโกสวน (*D. malabarica*) และ unknown ลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชในกลุ่มนี้บางชนิดแตกต่างกัน โดยที่ตะโกนา (*D. rhodocalyx*) ตะโกสวน (*D. malabarica*) มะเกลือ (*D. mollis*) และ unknown มีลักษณะลำต้นแบบเปลือกแตก ตาลดำ (*D. montana*) ดำตะโก (*D. wallichii*) ลำบิด (*D. ferrea*) อินจัน (*D. decandra*) และสั้่งท่า

(*D. buxifolia*) มีลักษณะลำต้นแบบเปลือกเรียบ ลักษณะรูปร่างใบของตะโกสวน (*D. malabarica*) อินจัน (*D. decandra*) ม่าย (*D. transitoria*) และตาลดำ (*D. montana*) มีลักษณะรูปร่างใบเป็นแบบขอบขนาน มะเกลือ (*D. mollis*) สั่งทำ (*D. buxifolia*) ลำบิต (*D. ferrea*) และ unknown มีลักษณะรูปร่างใบเป็นรูปไข่ ตะโกนา (*D. rhodocalyx*) มีลักษณะรูปร่างใบเป็นแบบไข่กลับ ตาลดำ (*D. montana*) มีลักษณะรูปร่างใบรูปหัวใจ และดำตะโก (*D. wallichii*) มีลักษณะรูปร่างใบเป็นแบบรี ลักษณะปลายใบของม่าย (*D. transitoria*) ลำบิต (*D. ferrea*) สั่งทำ (*D. buxifolia*) และตะโกนา (*D. rhodocalyx*) มีลักษณะปลายใบแบบแหลม มะเกลือ (*D. mollis*) อินจัน (*D. decandra*) ตาลดำ (*D. montana*) ดำตะโก (*D. wallichii*) และ unknown มีลักษณะปลายใบแบบเรียวแหลม และตะโกสวน (*D. malabarica*) มีลักษณะปลายใบแบบมน ลักษณะขอบใบของพืชในกลุ่มนี้ไม่แตกต่างกันคือมีลักษณะขอบใบเป็นขอบเรียบ ลักษณะฐานใบของพืชในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีลักษณะฐานใบแบบแหลม ยกเว้นตาลดำ (*D. montana*) มีลักษณะฐานใบเป็นรูปหัวใจ กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย เต้าแสนปม (*D. cauliflora*) และพญารากดำ (*D. rubra*) ลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชในกลุ่มนี้แตกต่างกันคือลักษณะของรูปร่างใบและลักษณะของขอบใบ ซึ่งเต้าแสนปม (*D. cauliflora*) มีลักษณะรูปร่างใบรูปไข่ มีขอบใบเป็นแบบคลื่น ส่วนพญารากดำ (*D. rubra*) มีลักษณะรูปร่างใบเป็นแบบขอบขนาน มีขอบใบเป็นแบบเรียบ กลุ่มที่ 4 คือ ลำบิตดง (*D. filipendula*) ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานทดลองของ Duangjai และคณะ (2006) ที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของพืชสกุล *Diospyros* โดยใช้ gene *atpB*, *matK*, *ndhF*, *trnK* intron, *trnL* intron และ *trnL-trnF* สรุปว่า ลำบิตดง (*D. filipendula*) เนียน (*D. diepenhorstii*) ตาลดำ (*D. montana*) และตะโกนา (*D. rhodocalyx*) อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งการทดลองครั้งนี้เนียน (*D. diepenhorstii*) อยู่คนละกลุ่มกับพืชที่เหลือ ลำบิตดง (*D. filipendula*) ถูกแยกออกไปอยู่ลำพังเพียงชนิดเดียว มีตาลดำ (*D. montana*) และตะโกนา (*D. rhodocalyx*) ที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก (ค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.632) และยังไม่สอดคล้องกับงานทดลองของ Utsunomiya และคณะ (1998) ได้จำแนกชนิดของพืชสกุล *Diospyros* โดยใช้ปริมาณของสาร tannin บริเวณเซลล์ของผล สรุปว่า มะพลับ (*D. areolata*) และเต้าแสนปม (*D. cauliflora*) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งมีปริมาณสาร tannin ประมาณ 30 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบในเซลล์ผล แต่การศึกษาครั้งนี้พบว่า มะพลับ (*D. areolata*) และเต้าแสนปม (*D. cauliflora*) แยกกันอยู่คนละกลุ่ม ซึ่งมีค่าดัชนีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.565 จะเห็นได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลนี้ค่อนข้างสูงซึ่งให้ผลสอดคล้องกับงานทดลองของ Guo และคณะ (2011) ที่ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล

Diospyros ด้วยเครื่องหมาย SSR จากการใช้ตัวอย่างในการทดลองทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง สรุปว่า สายพันธุ์ของพืชสกุล *Diospyros* ที่ทำการศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง โดย มีค่าดัชนีใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับหรือสูงกว่า 0.66 และยังมีการทดลองของ Martinez-Calvo และคณะ (2013) ซึ่งได้ศึกษาถึงลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชสกุล *Diospyros* จากการรวบรวม เชื้อพันธุกรรมพืชมาวิเคราะห์โดยใช้หลัก multivariate สรุปว่า พืชสกุล *Diospyros* มีจำนวนชุด โครโมโซมตั้งแต่ 30 ถึง 135 ($2n=2x=30$ ถึง $2n=9x=135$) จัดเป็นพืชที่เป็นโพลีพลอย สำหรับ มะพลับญี่ปุ่น (*D. kaki*) มีจำนวนชุดโครโมโซม 90 ($2n=6x=90$) จากจำนวนชุดโครโมโซมของพืช สกุล *Diospyros* ที่มีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าพืช สกุล *Diospyros* ทั้ง 16 ชนิดและอีก 2 ตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิดมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทาง พันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.409 – 1.000

การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการศึกษาพันธุกรรม และจำแนกพันธุ์พืชสามารถทำได้ อย่างมีประสิทธิภาพในพืชหลายชนิด อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้มีข้อจำกัด เช่นเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบ dominant และอาจมีผลต่าง หากมีการทำซ้ำ ถ้าไม่สามารถควบคุมปัจจัยที่เกี่ยวข้องได้ จึง ต้องระมัดระวังในเรื่องเหล่านี้ อย่างไรก็ตามมีผู้พยายามแก้ไขข้อจำกัดของเทคนิคอาร์เอพีดี โดย การใช้ไพรเมอร์ที่ยาวขึ้นจากเดิม 10 เบส เป็น 15-25 เบส และเพิ่มอุณหภูมิของการจับระหว่างไพรเมอร์กับเส้นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ จาก 37 องศาเซลเซียส เป็น 53 องศาเซลเซียส ซึ่งจะให้ผลดีและ สามารถทำซ้ำได้ (Yamagishi *et al.*, 2005) มีผลทำให้เทคนิคอาร์เอพีดีมีประสิทธิภาพมากขึ้น

บทที่ 5

สรุป

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้โดยใช้เทคนิค อาร์เอพีดี

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* จำนวน 16 ชนิดและอีก 2 ตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิด ในเบื้องต้นโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อจำแนกความแตกต่าง เช่น ลักษณะลำต้น ใบ ดอก และผล การครั้งนี้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถจำแนกชนิดพืชสกุล *Diospyros* ได้ในระดับหนึ่งคือ ลักษณะลำต้น และลักษณะใบ ส่วนการจำแนกดอกและผลน่าจะเป็นลักษณะที่มีความแตกต่างค่อนข้างชัดเจนกว่า ไม่สามารถทำการบันทึกได้เนื่องจาก พืชที่ศึกษาได้สร้างดอกและผลในช่วงที่ทำการบันทึก ลักษณะสัณฐานยังไม่มี ความเที่ยงตรงพอ โดยเฉพาะต้นที่ไม่มีการออกดอกและติดผล จึงใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* โดยใช้ไพรเมอร์ 8 ชนิด พบว่า ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 168 แถบ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.60 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 167 แถบ (99.40%) และอีก 1 แถบ (4.14%) เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกัน ไพรเมอร์ OPB-12 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด จำนวน 27 แถบ ไพรเมอร์ OPB-05 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอต่ำสุด จำนวน 16 แถบ ผลจากเดนโดรแกรมสามารถแบ่งกลุ่มพืชที่ศึกษา 96 ตัวอย่างได้เป็น 4 กลุ่ม แยกตามชนิดค่อนข้างชัดเจน โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.409 – 1.000 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.580 โดยที่ มะพลับ (*D. areolata*) กับมะริด (*D. philipensis*) มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.887 ในขณะที่เนียน (*D. diepenhorstii*) กับดำตะโก (*D. wallichii*) มีความห่างไกลทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.409 สำหรับพืชสกุล *Diospyros* อีก 2 ตัวอย่าง ที่ไม่ทราบชนิดพบว่า มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ *D. decandra* มากกว่าพืชชนิดอื่น พืชในกลุ่มเนียน (*D. diepenhorstii*) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดอื่น

เอกสารอ้างอิง

- ก่องกานดา ชยามฤต. 2540. สมุนไพร ตอนที่ 6. กรุงเทพฯ : พฤษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กุลยา สุวรรณรัตน์. 2550. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสะตอ (*Parkia speciosa* Hassk.) และความสัมพันธ์ของพืชสกุล *Parkia* โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA). สงขลา: วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่.
- เกรียงศักดิ์ ไทยพงส์. 2545. การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพลับในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). ปัญหาพิเศษปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เฉลิมพล ภูมิไชย์. 2539. การจำแนกสายพันธุ์พลับในประเทศไทยโดยอาศัยเทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชุมพล คุณวารี. 2551. สันฐานวิทยาเบื้องต้นในการระบุชื่อวงศ์พืชดอกสามัญ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เต็ม สมิตินันท์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ : ส่วนพฤษศาสตร์ป่าไม้ สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. 2542. เทคนิคอาร์เอพีดีกับการจำแนกพันธุ์ส้มโอ. รายงานการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 11 ณ มหาวิทยาลัยสุรนารี 6-8 ตุลาคม 2542 หน้า 215-219.

ประพิมพ์พัทตร์. 2552. การวิจัยทางโภชนาการที่มีประโยชน์ในผลของพืชสกุลพลับ. ว. เกษตร
ปีที่ 37 ฉบับที่ 4 (15 กันยายน 2552) หน้า 281-292.

ปวิณ ปุณศรี, โอฟาร์ ตัณฑวิรุฬห์, ธีระ จารุจินดา, นุชนารถ จงเลขา, จิตติ ปิ่นทอง, พูนสุข ธีัญญา
ภา, สมโภชน์ ป้านสุวรรณ และอรรษา วาสิกานนท์. 2538. เครื่องมือการปลูกไม้ผลที่สำคัญ
5 ชนิด: บัวย ท้อ พลัม สาลี่ พลับ. กองพัฒนาเกษตรที่สูง สำนักงานปลัดกระทรวงเกษตร
และสหกรณ์, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 85 น.

บัณฑิตา คงพันธุ์. 2552. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุลส้ม (*Citrus spp.*)
ในภาคใต้โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี และไมโครแซเทลไลท์. สงขลา : วิทยานิพนธ์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขต
หาดใหญ่.

บัณฑิตา บำรุง. 2554. การศึกษาทางพฤกษเคมีของลำต้นพลับยอดดำ (*Diospyros collinsae*).
กรุงเทพฯ : วิทยานิพนธ์เภสัชศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเภสัชพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัย
จุฬาลงกรณ์.

วิทย์ เทียงบุญธรรม. 2531. พจนานุกรมสมุนไพรไทย. กรุงเทพฯ: ไอเอสพรีนติ้งเฮาส์ หน้า 594-
596.

วีระศักดิ์ อุดมโชค, พูลศิริ ชูชีพ, นवलปรานค์ ไชยตะขบ, วรวิทย์ ยี่สวัสดิ์ และพงศกร จิวาภรณ์คุปต์.
2542. การเจริญเติบโตทางลำต้นของพลับ (*Diospyros kaki L.*) บนพื้นที่สูงของจังหวัด
เชียงใหม่. ปัญหาพิเศษปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอล
พี. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

องค์การสวนพฤกษศาสตร์. 2542. ไม้ต้นในสวน Tree in the Garden. กรุงเทพฯ : องค์การสวน
พฤกษศาสตร์.

- อารี เนื่องจํานงค์. 2553. องค์ประกอบทางเคมีของลำบีดอง และเท้าแสนปม. รายงานวิจัย
ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยบูรพา.
- Ahmad, I., Tabbasam, M., Malik, A. U., Malik, S. A., RaHman, M. and Zafar, Y. 2008.
Assessment of genetic diversity among mango (*Mangifera indica* L.) genotypes
using RAPD markers. Scientia Horticulturae 117 : 297-301.
- Badenes, M., Garces, A., Romero, Can., Romero, M., Clave, J., Rovira, M. and Llacer,
G. 2003. Genetic diversity of introduced and local Spanish persimmon cultivars
revealed by RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution 50: 579–585.
- Chomchalow, N. 1984. Vernacular names of *Citrus* in Southeast Asia. IBPGR Regional
Committee for Southeast Asia Newsletter 8: 3-5.
- Claros, M. G., Crespillo, P. M., Aguilar, L. and Canovas, F. M. 2000. DNA fingerprinting
and classification of geographically related genotypes of olive – tree (*Olea
europaea* L.). Euphytica 116 : 131-142.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-
15.
- Duangjai S., Wallnofer B., Samuel R., Munzinger J. and Chase M.V.V. 2006. Generic
delimitation and relationships in Ebenaceae sensu lato: evidence from six plastid
DNA regions. Scientia Horticulturae 93: 1808-1833.
- Guo D.L. and Luo Z.R. 2011. Genetic relationships of the Japanese persimmon
Diospyros kaki (Ebenaceae) and related species revealed by SSR analysis.
Genetics and Molecular Research 10(2): 1060-1068.

- Hu D. and Luo Z. 2006. Polymorphisms of amplified mitochondrial DNA non-coding regions in *Diospyros* spp. *Scientia Horticulturae* 109 : 275–281.
- Ikeda, I., Yamada, M. and Nishida, T. 1985. Inheritance of asyringency in Japanese persimmon. *Japanese Society for Horticultural Science* 54: 39-45.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Societe Vaudoise des Science Naturelles* 44: 223-270.
- Kaundun, S. S., Zhyvoloup, A. and Park, Y. G. 2000. Evaluation of genetic diversity among elite tea (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) accessions using RAPD markers. *Euphytica* 155 : 7-16.
- Martinez-Calvo J., Naval M., Zuriaga E., Llacer G. and Badenes M.L. 2013. Morphological characterization of the IVIA persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) germplasm collection by multivariate analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60: 233-241.
- Noda, E., Aoki, T. and Minato, K. 2002. Physical and chemical characteristics of the blackened portion of Japanese persimmon (*Diospyros kaki*). *Japan Wood Research Society* 48: 245-249.
- Rohlf, F. J. 2002. NISYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version-2.1. New York: Applied Biostatistics.
- The International Plant Names Index (IPNI). 2009. The International Plant Names Index Plant Name Query. [Online] Available: <http://www.ipni.org/ipni/plantname-searchpage.do>. (Accessed on 6 November 2009).

- Utsunomiya, N., Subhadrabandhu, S., Yonemori, K., Oshida, M., Kanzaki, S., Nakatsubo, F. and Sugiura, A. R. 1998. *Dispyroa* species in Thailand: Their distribution, fruit morphology and uses. *Economic Botany* 52: 343-351.
- Wen-bin, X., Qiao-sheng, G. and Chang-lin, W. 2006. RAPD analysis for genetic diversity of *Chrysanthemum morifolium*. *China Journal of Chinese Material Medica* (Abstract).
- Williams, J.G.K., Kubelik, R.A., Livak, J.K., Rafalski, A.J. and Tingry, V.S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Yamagishi, M., Matsumoto, S., Nakatsuka, A. and Itamura, H. 2005. Identification of persimmon (*Diospyros kaki*) cultivars and genetic relationships between *Diospyros* species by more effective RAPD analysis. *Scientia Horticulturae* 105: 283–290.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ และสารละลายอื่น ๆ

1. CTAB บัฟเฟอร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

PVP	1.00	กรัม
NaCl ₂	8.12	กรัม
0.5 M Na ₂ EDTA (pH 8.0)	4.00	มิลลิลิตร
0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)	10.00	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นจึงเติม CTAB ปริมาตร 2 กรัม และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซียส จนกว่าสารละลายได้หมด ไปนึ่งฆ่าเชื้อ เติมสาร β -mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

2. TE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

0.1 M Tris-HCl (pH 7.5)	500	ไมโครลิตร
0.25 M Na ₂ EDTA (pH 7.0)	200	ไมโครลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้

3. TAE บัฟเฟอร์ เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	121.1	กรัม
Acetic acid	28.5	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปใช้

4. TBE บัฟเฟอร์ เข้มข้น 5 เท่า

Tris Base	126.0	กรัม
Boric acid	110.0	กรัม
0.5 M Na ₂ EDTA (pH 8.0)	80.0	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 4 ลิตร เจือจางความเข้มข้นเป็น 1 เท่า และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำไปใช้

5. DNA sample บัฟเฟอร์

Bromophenol blue	125.0	มิลลิกรัม
------------------	-------	-----------

Xylene cyanol	125.0	มิลลิกรัม
---------------	-------	-----------

Glycerol	15.0	มิลลิลิตร
----------	------	-----------

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปหนึ่งชั่วโมงก่อนนำไปใช้

6. Ethidium bromide 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Ethidium bromide	1.0	กรัม
------------------	-----	------

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตารางภาคผนวกที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบ ลำดับเบสของไพรเมอร์ และผลที่ได้จากการทดสอบ
อาร์เอพีดี – พีซีอาร์ กับดีเอ็นเอของพืชสกุล *Diospyros* 96 ตัวอย่าง

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5→3)	รูปแบบ
OPA-01	CAGGCCCTTC	polymorphism
OPA-02	TGCCGAGCTG	polymorphism
OPA-03	AGTCAGCCAC	non-amplified
OPA-08	GTGACGTAGG	polymorphism
OPA-15	TTCCGAACCC	non-amplified
OPA-18	AGGTGACCGT	non-amplified
OPA-19	CAAACGTCGG	polymorphism
OPB-01	GTTTCGCTCC	polymorphism
OPB-02	TGATCCCTGG	non-amplified
OPB-03	CATCCCCCTG	polymorphism
OPB-04	GGACTGGAGT	non-amplified
OPB-05	TGCGCCCTTC	polymorphism
OPB-06	TGCTCTGCCC	non-amplified
OPB-07	GGTGACGCAG	non-amplified
OPB-08	GTCCACACGG	non-amplified
OPB-09	TGGGGGACGC	non-amplified
OPB-10	CTGCTGGGAC	polymorphism
OPB-11	GTAGACCCGT	polymorphism
OPB-12	CCTTGACGCA	polymorphism
OPB-13	TTCCCCGCT	non-amplified
OPB-14	TCCGCTCTGG	non-amplified
OPB-15	GGAGGGTGTT	non-amplified
OPB-16	TTTGCCCGGA	non-amplified
OPJ-05	CTCCATGGGG	polymorphism
OPM-05	GGGAACGTGT	polymorphism

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5→3)	รูปแบบ
OPM-06	CTGGGCAACT	polymorphism
OPM-08	CCTGACTTCG	non-amplified
OPM-10	GGTCTACACG	non-amplified
OPR-02	AGGACTGCCA	non-amplified
OPR-04	TGAGGCTGAG	non-amplified
OPY-06	CCTACGGGGC	non-amplified
OPY-07	ACGTTACGAG	non-amplified
OPY-11	CACAGACAGG	non-amplified
OPY-12	AAGCACCTGC	non-amplified
OPY-13	CCTCCGACTG	non-amplified
OPY-14	GGACGCTTAC	non-amplified
OPY-15	AGTCGCCCTT	polymorphism
OP4-69	GGACCTCTTG	non-amplified
OP4-70	GGAACCCACA	non-amplified
OP4-71	CATGGCAGTT	non-amplified
OP4-72	AGGACTGCTC	non-amplified
OP4-74	CTCAGTCGCA	non-amplified
OP4-75	ACCCGACCTG	non-amplified
OP4-76	TTAGCGCCCC	non-amplified
OP4-78	TCCCCATCAC	non-amplified
OP4-79	AGGTTTCGCA	non-amplified
OP4-82	GAGCCCGACT	non-amplified
OP4-84	TGGTCCAGCC	non-amplified
OP4-85	TGAGGCGTGT	non-amplified
OP4-86	TTGCCTTCGC	non-amplified
OP4-87	CCGTCCGGTAG	non-amplified

ตารางภาคผนวกที่ 1 (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5→3)	รูปแบบ
OP4-89	GGAAACCCCT	non-amplified
OP4-94	TGGCGCACAC	non-amplified
OP4-95	GGCACGCGTT	non-amplified
OP4-96	CCCGTCGGTA	non-amplified
OP4-97	CTTCTCGGAC	non-amplified
OP4-98	CCTCCTTCTC	non-amplified
OP4-99	GTGCGCAATG	non-amplified
OP5-01	CCCGAAACGA	non-amplified
OP5-02	ACGGCATATC	non-amplified
OP5-03	GGAGCCATAC	non-amplified
OP5-06	ATCCGCGTTC	non-amplified



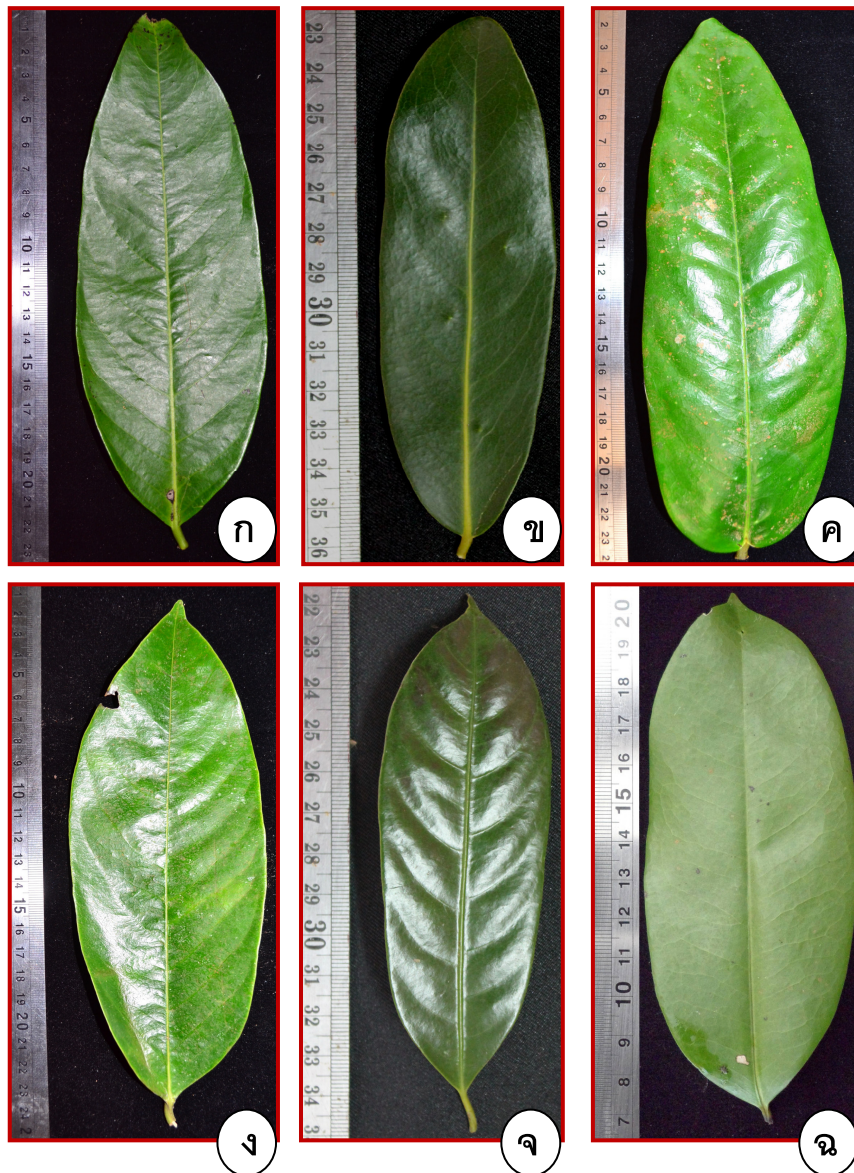
ภาพผนวกที่ 1 ลักษณะลำต้นแบบเปลือกแตกของพืชสกุลพืชสกุล *Diospyros*

- (ก) มะเกลือ (*D. mollis*)
- (ข) มะพลับ (*D. areolata*)
- (ค) มะพลับดง (*D. bejaudii*)
- (ง) ตะโกนา (*D. rhodocalyx*)
- (จ) ตะโกสวน (*D. malabarica*)
- (ฉ) ลำปัด (*D. ferrea*)
- (ช) unknown



ภาพผนวกที่ 2 ลักษณะลำต้นแบบเปลือกเรียบของพืชสกุลพืชสกุล *Diospyros*

- (ก) อินจัน (*D. decandra*)
- (ข) ม่าย (*D. transitoria*)
- (ค) ตาลดำ (*D. montana*)
- (ง) มะริด (*D. philippensis*)
- (จ) พญารากดำ (*D. rubra*)
- (ฉ) เห่าแสนปม (*D. cauliflora*)
- (ช) ลำบิดตง (*D. filipendula*)
- (ซ) เนียน (*D. diepenhorstii*)
- (ฅ) ดำตะโก (*D. wallichii*)
- (ญ) สั่งทำ (*D. buxifolia*)



ภาพผนวกที่ 3 ลักษณะรูปร่างใบแบบขอบขนานของพืชสกุลพืชสกุล *Diospyros*

(ก) เนียน (*D. diepenhorstii*)

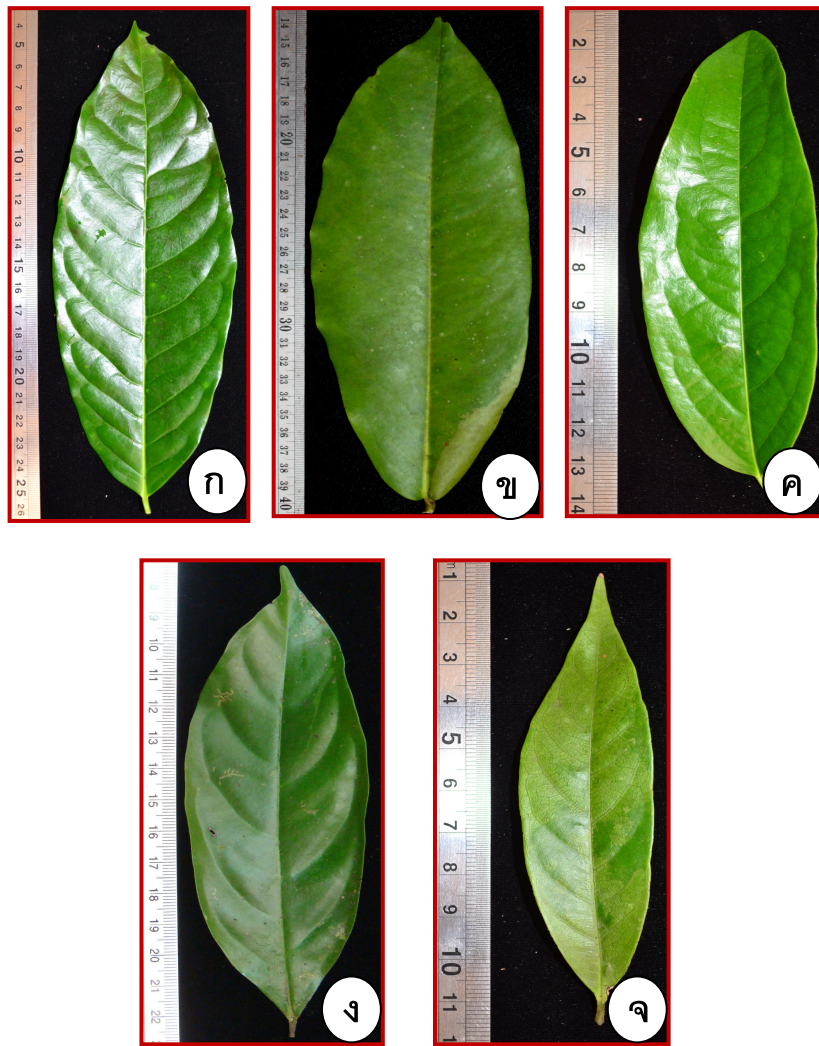
(ข) มะพลับ (*D. areolata*)

(ค) มะพลับดง (*D. bejaudii*)

(ง) ม่าย (*D. transitoria*)

(จ) ลำปัดดง (*D. filipendula*)

(ฉ) พญารากดำ (*D. rubra*)



ภาพผนวกที่ 4 ลักษณะรูปร่างใบแบบรูปไข่ของพืชสกุลพืชสกุล *Diospyros*

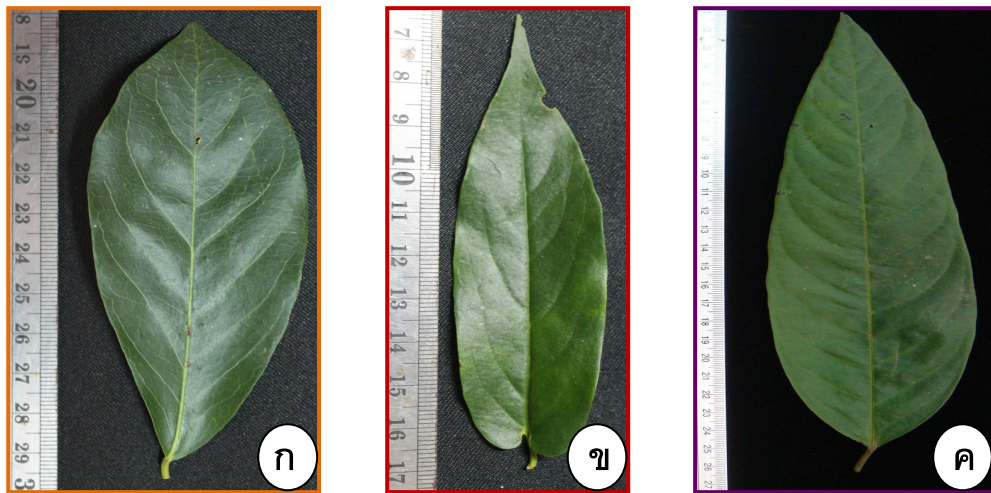
(ก) เต้าแสนปม (*D. cauliflora*)

(ข) มะริด (*D. philippensis*)

(ค) ตะโกสวน (*D. malabarica*)

(ง) ลำบีด (*D. ferrea*)

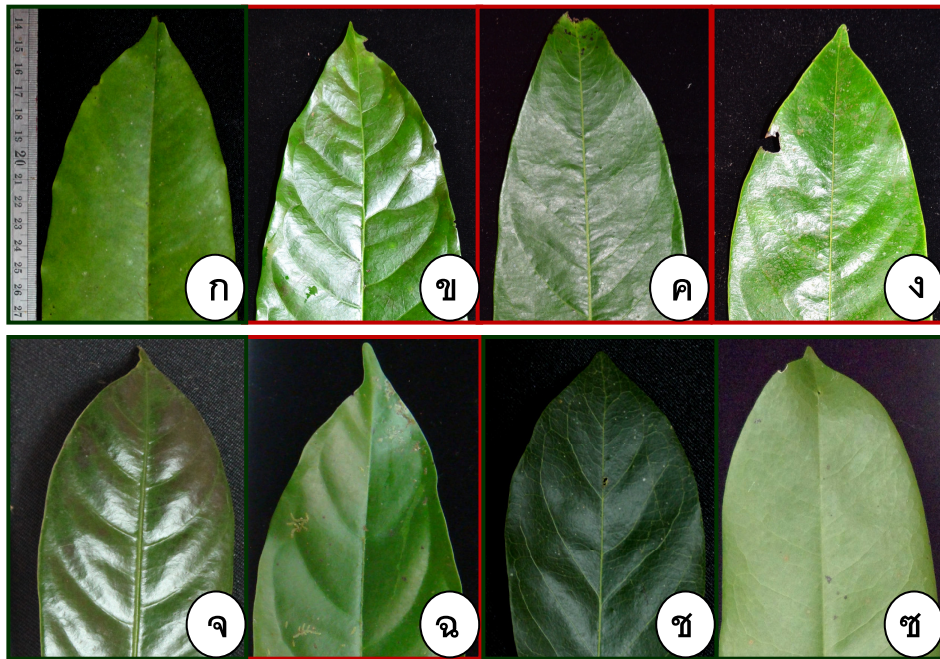
(จ) อีนจัน (*D. decandra*)



ภาพผนวกที่ 5 ลักษณะรูปร่างใบแบบรูปไข่กลับ (ภาพที่ 5ก) รูปหัวใจ (ภาพที่ 5ข) และรูปรี (ภาพที่ 5ค) ของพืชสกุลพืชสกุล *Diospyros*
 (ก) ตะโกนา (*D. rhodocalyx*)
 (ข) ตาลดำ (*D. montana*)
 (ค) ดำตะโก (*D. wallichii*)

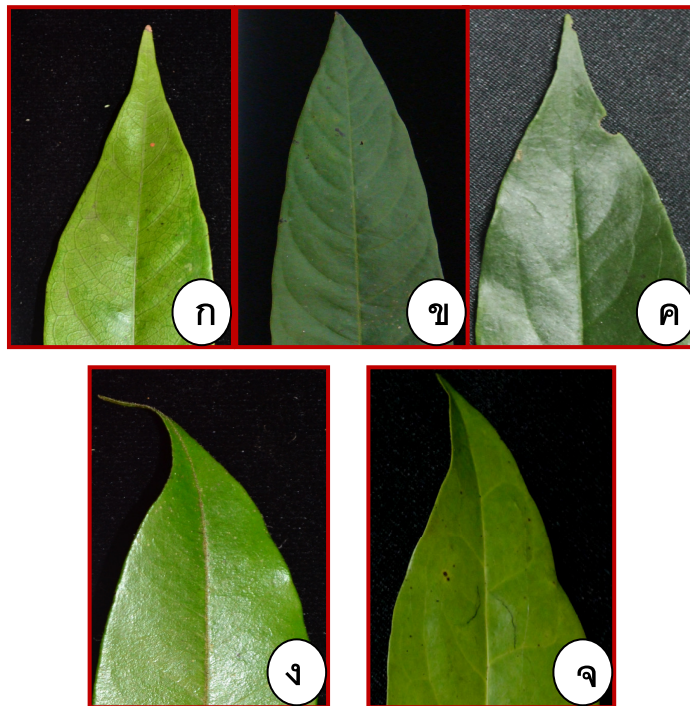


ภาพผนวกที่ 6 ลักษณะปลายใบมนของพืชสกุลพืชสกุล *Diospyros*
 (ก) มะพลับ (*D. areolata*)
 (ข) มะพลับดง (*D. bejaudii*)
 (ค) ตะโกสวน (*D. malabarica*)
 (ง) ส้มตำ (*D. buxifolia*)



ภาพผนวกที่ 7 ลักษณะปลายใบแหลมของพืชสกุลพืชสกุล *Diospyros*

- (ก) มะริด (*D. philippensis*)
- (ข) ไม้แสดปม (*D. cauliflora*)
- (ค) เนียน (*D. diepenhorstii*)
- (ง) ม่าย (*D. transitoria*)
- (จ) ลำบิดตง (*D. filipendula*)
- (ฉ) ลำบิด (*D. ferrea*)
- (ช) ตะโกนา (*D. rhodocalyx*)
- (ซ) พญารากดำ (*D. rubra*)



ภาพผนวกที่ 8 ลักษณะปลายใบเรียวแหลมของพืชสกุลพืชสกุล *Diospyros*

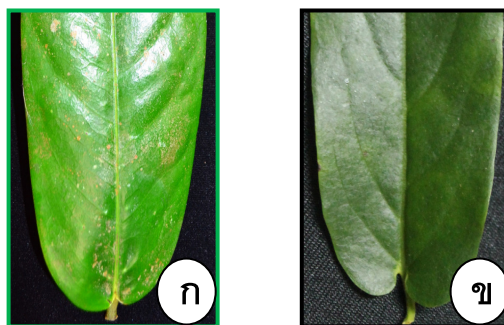
(ก) อินจัน *D. decandra*

(ข) ดำตะโก (*D. wallichii*)

(ค) ตาลดำ (*D. montana*)

(ง) มะเกลือ (*D. mollis*)

(จ) unknown



ภาพผนวกที่ 9 ลักษณะฐานใบมน (ก) และฐานใบรูปหัวใจ (ข) ของพืชสกุลพืชสกุล *Diospyros*

(ก) มะพลับดง (*D. bejaudii*)

(ข) ตาลดำ (*D. montana*)



ภาพผนวกที่ 10 ลักษณะฐานใบแหลมของพืชสกุลพืชสกุล *Diospyros*

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| (ก) อินจัน (<i>D. decandra</i>) | (ข) ดำตะโก (<i>D. wallichii</i>) |
| (ค) พญารากดำ (<i>D. rubra</i>) | (ง) ตะโกนา (<i>D. rhodocalyx</i>) |
| (จ) ทำแสนปม (<i>D. cauliflora</i>) | (ฉ) สั่งท่า (<i>D. buxifolia</i>) |
| (ช) ลำปัด (<i>D. ferrea</i>) | (ซ) เนียน (<i>D. dipehorstii</i>) |
| (ฅ) มะเกลือ (<i>D. mollis</i>) | (ญ) ลำปัดตง (<i>D. filipendula</i>) |
| (ฎ) มะพลับ (<i>D. areolata</i>) | (ฏ) ม่าย (<i>D. transitoria</i>) |
| (ฐ) unknown | (ฑ) ตะโกสวน (<i>D. malabarica</i>) |
| (ฒ) มะวีด (<i>D. philippensis</i>) | |

ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: f'~

STACK:

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวแพรวพรรณ เกษมุล		
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5310620033		
วุฒิการศึกษา	วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการการศึกษา)

ทุนสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

แพรวพรรณ เกษมุล. 2556. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้ของประเทศไทยโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี. ว. วิชาการของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. ปีที่ 29 ฉบับที่ 3 (ตุลาคม-ธันวาคม 2556) หน้า 207-220.