

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้ของประเทศไทยโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

Genetic Diversity of Genus *Diospyros* in Southern Thailand Using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Technique

แพรวพรรณ เกษมุล^{1/ 2/} และ จรัสศรี นวลศรี^{1/}
Praewphan Ketsamul^{1/ 2/} and Charassri Naulsri^{1/}

Abstract: The 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. In observation of leaf morphology, the differences of leaf venation were found. 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 0.404-0.994 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. areolata* and *D. philippensis* while the most distance was between *D. diepenhorstii* and *D. wallichii*. The 2 unknown were found to be closer to *D. decandra* than other species.

Keywords: *Diospyros* spp., RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), genetic diversity

^{1/} ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

^{1/} Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Songkhla University, Songkhla 90112, Thailand

^{2/} ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

^{2/} Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

บทคัดย่อ: การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้ของประเทศไทย โดยเก็บรวบรวมพืชสกุล *Diospyros* จากจังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี ตรัง พัทลุง และสงขลา จำนวน 16 ชนิด (species) 94 ต้น และไม่ทราบชนิดอีก 2 ต้น รวมทั้งสิ้น 96 ต้น ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้น ร่วมกับการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา พบความแตกต่างของลักษณะใบ ที่สามารถแยกความแตกต่างได้ค่อนข้างชัดเจน จากนั้นทำการทดสอบด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี เบื้องต้นใช้ไพรเมอร์จำนวน 60 ไพรเมอร์ คัดเลือกเพียง 8 ไพรเมอร์ เพื่อศึกษาความแปรปรวนของตัวอย่างพืชที่เก็บมาทั้งหมด พบแถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 168 แถบ เป็นแถบที่ให้ความแตกต่างจำนวน 167 แถบ (99.40%) เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ และความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้วิธี UPGMA จากโปรแกรม NTSYS (Version 2.1) ทั้ง 96 ตัวอย่างมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.404-0.994 เฉลี่ยเท่ากับ 0.580 สามารถแบ่งกลุ่มพืชที่ศึกษาได้เป็น 4 กลุ่ม แยกตามชนิดค่อนข้างชัดเจน และพบว่าใน 16 ชนิดของพืชสกุล *Diospyros* ที่ศึกษาครั้งนี้ *D. areolata* และ *D. philippensis* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด ในขณะที่ *D. diepenhorstii* และ *D. wallichii* มีความห่างไกลทางพันธุกรรมสูงที่สุด ตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิดอีก 2 ต้น (unknown) มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ *D. decandra* มากกว่าชนิดอื่น เมื่อพิจารณาภายในกลุ่มพืชชนิดเดียวกัน

คำสำคัญ: พืชสกุล *Diospyros* เทคนิคอาร์เอพีดี ความหลากหลายทางพันธุกรรม

คำนำ

ภาคใต้ของประเทศไทยเป็นถิ่นกำเนิด และแหล่งพันธุกรรมของพืชเขตร้อนที่สำคัญแห่งหนึ่งในภูมิภาคตะวันออกเฉียงใต้ มีพืชหลากหลายประเภททั้งที่เป็นพันธุ์ปลูก และพันธุ์ป่าหลายชนิด พืชเหล่านี้มีบทบาทต่อความเป็นอยู่ และวิถีชีวิตของคนในพื้นที่มาช้านาน แต่ในขณะเดียวกันก็มีภัยคุกคามต่อพรรณพืชเหล่านั้นทั้งที่เกิดจากฝีมือของมนุษย์ สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง และภัยธรรมชาติ ทำให้พืชพันธุ์หลายชนิดลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว และบางชนิดใกล้สูญพันธุ์ พืชสกุล *Diospyros* เป็นพืชอีกสกุลหนึ่งที่อยู่ในภาวะถูกคุกคาม และใกล้สูญพันธุ์ เนื่องจากเกษตรกรรมต้องการพื้นที่สำหรับปลูกพืชเศรษฐกิจ ได้แก่ ยางพารา ปาล์มน้ำมัน ทำให้พื้นที่ป่าถูกทำลาย ส่งผลกระทบต่อจำนวนต้นพืชสกุล *Diospyros* และพรรณไม้อื่น ๆ ดังนั้นการรักษาความหลากหลายของพืชจึงมีความสำคัญเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการสูญหายเป็นประโยชน์ในการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช และการใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ต่อไป

พืชสกุล *Diospyros* จัดอยู่ในวงศ์ Ebenaceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศจีน พืชในวงศ์นี้มีทั้งหมด 6 สกุล ประมาณ 500 ชนิดทั่วโลก Utsunomiya et al. (1998) รายงานว่า ในประเทศไทยพบพืชสกุล *Diospyros*

ประมาณ 60 ชนิด พืชสกุลนี้ส่วนใหญ่ใช้ประโยชน์จากไม้มีบางชนิดที่ใช้ประโยชน์จากผล เช่น พลับ (*Diospyros kaki* L.) นับว่าเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งที่กำลังนิยมในปัจจุบันโดยมีการนำเข้าจากประเทศจีน มาทดลองปลูกเป็นครั้งแรกที่สถานีทดลองอ่างขาง และสถานีทดลองดอยบุย จังหวัดเชียงใหม่ (เฉลิมพล, 2539) สำหรับภาคใต้ของประเทศไทย *Diospyros* ชนิดที่พบ ได้แก่ มะพลับ (*Diospyros areolata* King.), มะพลับดง (*D. bejardii* Lecomte.), ส้มท่า (*D. buxifolia* Hiem.), เท้าเสนปม (*D. cauliflora* Blume.), จันอิน (*D. decandra* Lour.), เนียน (*D. diepenhorstii* Miq.), ลำปัด (*D. ferrea* Bakh.), ลำปัดดง (*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 คำตะโก (*D. wallichii* King.) เป็นต้น ประพิมพักตร์ (2552) รายงานว่าผลของ *D. mollis* มีสารสำคัญ คือ สารไดไฮดรอกซีไดกลูโคไซด์ (Diospyrol-diglucoside) ซึ่ง เป็น สาร ใน กลุ่ม naphthalene ซึ่งมีคุณสมบัติใช้เป็นยาถ่ายพยาธิปากขอ พยาธิตัวตืด พยาธิเส้นด้าย และพยาธิตัวกลม แต่จะให้ผลดีที่สุดกับพยาธิปากขอ นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นยา

ธาตุ แก่ท้องเดิน รักษาโรคความดันโลหิตได้อีกด้วย สารตั้งต้นที่เกิดขึ้นในผลอ่อนของพืชสกุลนี้เป็นสารกลูโคไซด์โมโนเมอร์ (5 หรือ 2) แล้วจึงถูกเปลี่ยนเป็นไดไฮดรอกซีโกลูโคไซด์สารนี้ถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายเมื่อถูกความร้อนหรือด่าง เช่น น้ำปูนใส หรือถูกแสงแดดนาน ๆ จะเปลี่ยนเป็นสารสีดำ และหมดฤทธิ์ในการฆ่าพยาธิ

การศึกษาพันธุกรรมพืชและจำแนกชนิดพืชทำได้หลายวิธี เช่น การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นเครื่องหมายดั้งเดิมที่ใช้ในอดีต อย่างไรก็ตามลักษณะสัณฐานวิทยามีข้อจำกัดหลายประการ พืชบางพันธุ์มีลักษณะต่าง ๆ ใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้โดยสายตา ผู้ประเมินต้องมีความเชี่ยวชาญหรือในกรณีของไม้ยืนต้นหากใช้ดอกหรือผลเป็นเครื่องหมาย ระยะเวลาจนถึงช่วงออกดอก และติดผลอาจต้องใช้เวลานานมาก จึงจะทำการตรวจสอบได้ จากข้อจำกัดเหล่านี้ และเพื่อให้ทราบผลชัดเจนจึงนำเครื่องหมายโมเลกุล คือ อาร์เอพีดี (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA) มาใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้ของประเทศไทย

เทคนิคอาร์เอพีดี เป็นเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่ใช้วิเคราะห์ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์แบบสุ่มขนาดสั้นเพียงชนิดเดียว (Williams *et al.* 1990) ในส่วนของพืชสกุล *Diospyros* มีรายงานการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลมาใช้และประสบความสำเร็จ เช่น เฉลิมพล (2539) ได้จำแนกพลับ (*D. kaki*) สายพันธุ์ Fuyu ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศทดลองปลูกในภาคเหนือของประเทศไทย จำนวน 29 ตัวอย่าง เพื่อต้องการที่จะทราบว่าเป็นพันธุ์เดียวกันหรือไม่ จึงใช้เทคนิคอาร์เอพีดีตรวจสอบ พบว่า พลับพันธุ์ Fuyu ทั้ง 29 ตัวอย่าง มีความเหมือนกัน 85 เปอร์เซ็นต์ เกรียงศักดิ์ (2545) ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพลับจำนวน 38 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 16 ไพรเมอร์ พบว่ามี 10 ไพรเมอร์ที่จำแนกความสัมพันธ์ของสายพันธุ์พลับได้ชัดเจนโดยสามารถแบ่งกลุ่มของสายพันธุ์พลับได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม Yamagishi *et al.* (2005) ได้จำแนกสาย

พันธุ์และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชสกุล *Diospyros* ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีพบว่า มี 25 ไพรเมอร์ จาก 35 ไพรเมอร์ สามารถจำแนกพืชสกุล *Diospyros* ได้เป็น 6 กลุ่ม

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีร่วมกับลักษณะสัณฐาน เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการเก็บรวบรวมพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ และใช้ประโยชน์ด้านอื่น ๆ ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สุ่มเก็บตัวอย่างใบ ดอก ผล และบันทึกลักษณะลำต้นพืชสกุล *Diospyros* ที่พบในภาคใต้ของประเทศไทยในพื้นที่จังหวัดสงขลา พัทลุง ตรัง สุราษฎร์ธานี และชุมพร จำนวน 96 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1)

ทำการบันทึกรายละเอียด และบันทึกภาพของลักษณะสำคัญของส่วนต่าง ๆ ของพืชตัวอย่าง โดยบันทึกลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ ลำต้น ใบ ดอก และผล จำแนกพืชสกุล *Diospyros* แต่ละตัวอย่างออกเป็นกลุ่มตามชื่อวิทยาศาสตร์โดยยึดตามหลักสากลในฐานข้อมูล The International Plant Names Index (IPNI) (2009) และจำแนกชนิดพืชโดยอาศัยลักษณะโครงสร้างภายนอกตามข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยาขององค์การสวนพฤกษศาสตร์ (2542)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้ โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

เก็บตัวอย่างใบอ่อนของพืชสกุล *Diospyros* ที่พบในภาคใต้ของประเทศไทย จำนวน 96 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) โดยเก็บตัวอย่างใบที่อายุประมาณ 7-10 วัน หลังจากการแตกใบอ่อน 1-2 ใบต่อด้าน ใส่ถุงพลาสติกเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยประยุกต์จากวิธีของ Doyle and Doyle (1990) นำใบอ่อนของพืชตัวอย่างประมาณ

Table 1 List of *Diospyros* ssp. used in this study with place of collection and no. of samples

Scientific name	place of collection	no. of samples
<i>D. areolata</i> King.	Songkhla, Trang, Surathani, Chumphon	7, 2, 1, 3
<i>D. bejaudii</i> Lecomte.	Trang	4
<i>D. buxifolia</i> Hiern.	Songkhla	2
<i>D. cauliflora</i> Blume.	Trang	3
<i>D. decandra</i> Lour.	Songkhla, Trang	1, 1
<i>D. diepenhorstii</i> Miq.	Songkhla, Trang, Phatthalung, Chumphon	8, 7, 8, 4
<i>D. ferrea</i> Bakh.	Trang	3
<i>D. filipendula</i> Pierre.	Trang	2
<i>D. malabarica</i> Kostel.	Trang, Surathani, Chumphon	6, 3, 1
<i>D. mollis</i> Griff.	Songkhla, Trang, Surathani, Chumphon	3, 4, 4, 1
<i>D. montana</i> Roxb.	Songkhla, Surathani	2, 1
<i>D. philippensis</i> Gurke.	Songkhla, Trang	3, 1
<i>D. rhodocalyx</i> Kurz.	Songkhla, Trang, Surathani, Chumphon	3, 1, 1, 2
<i>D. rubra</i> Lecomte.	Trang	2
<i>D. transitoria</i> Bakh.	Trang	3
<i>D. wallichii</i> King.	Surathani	3
unknown	Trang	2
Total		96

200 มิลลิกรัม นำหนักสด บดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว จากนั้นเติม extraction buffer (PVP-40, NaCl 100 mM, EDTA 0.5 M, CTAB 2 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับ β -mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดเอฟเพนดอร์ฟ เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมนิโตรเจนเหลว 300 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 60 นาที ปั่นเหวี่ยงใช้ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟใหม่ เติมนิโตรเจนเหลว 700 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ เป็นเวลา 20 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายส่วนใสใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟใหม่ จากนั้นเติมไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ หรือวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอ

จำนวน 2-3 ครั้ง ด้วยเอทานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร ที่ผ่านการแช่เย็นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย buffer [Tris-HCl (pH 7.5)] 10 มิลลิโมลาร์ และ Na_2EDTA (pH 7.0) 1 มิลลิโมลาร์] 20 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้อง เก็บรักษาดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส หาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมดาดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรส เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ ด้วยแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE buffer ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต 260 นาโนเมตร แล้วเปรียบเทียบกับปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน

การคัดเลือกไพรเมอร์

คัดเลือกดีเอ็นเอของพืชสกุล *Diospyros* 17 ตัวอย่าง ตามชนิด คือ *Diospyros areolata* King., *D.*

bejaudii Lecomte., *D. buxifolia* Hiern., *D. cauliflora* Blume., *D. decandra* Lour., *D. diepenhorstii* Miq., *D. ferrea* Bakh., *D. filipendula* Pierre., *D. malabarica* Kostel., *D. mollis* Griff., *D. montana* Roxb., *D. philippensis* Gurke., *D. rubra* Lecomte., *D. rhodocalyx* Kurz., *D. transitoria* Bakh., *D. wallichii* King. และ unknown เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการตรวจสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างของพืชสกุล *Diospyros* ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 60 ชนิด คือ OP469, OP470-72, OP474-76, OP478-79, OP482, OP484, OP485-87, OP489, OP494-99, OP501-03, OP506, OPA01-03, OPA08, OPA15, OPA18-19, OPB01-16, OPJ05, OPM05-06, OPY15, OPC01, OPC03, OPC07, OPT04 และ OPR03-06 (เกรียงศักดิ์, 2545; เฉลิมพล, 2539; Yamagishi *et al.* 2005) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ซึ่งใช้ความเข้มข้นของสารละลายที่เป็นองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้ น้ำกลั่น 16.2 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์เข้มข้น 10 เท่าของที่ใช้จริง (10x buffer) 2 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ 2.5 ไมโครลิตร ดีออกซีนิวคลีโอไทด์เข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ 1.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์เข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ 1.5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส 1.5 ยูนิต 0.3 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอเพิ่มพิมพ์เข้มข้น 60 นาโนกรัม/ไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตั้งอุณหภูมิเป็น 3 ระดับคือ อุณหภูมิเริ่มต้นใช้ 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 นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตร มาตรวจสอบผลโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยวุ้น LE อะกาโรส ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ในสารละลาย TBE จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างน้ำ 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Gel

documentation คัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของพืชสกุล *Diospyros* ได้ชัดเจนมาทำการศึกษาต่อไป

การวิเคราะห์ผล

การวิเคราะห์ผลทำโดยการให้คะแนนการเกิดแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่าง โดยคิดเฉพาะแถบที่ชัดเจนให้คะแนน "1" เมื่อมีแถบดีเอ็นเอ และ "0" เมื่อไม่มีแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเดียวกัน หลังจากนั้นเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ 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)

ผลการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลจากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอย่างพืชสกุล *Diospyros* ที่ทำการเก็บรวบรวมในบางพื้นที่ทางภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี ตรัง พัทลุง และสงขลา โดยพิจารณา ลักษณะโครงสร้างภายนอกของต้น ประกอบด้วยลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ ลำต้น ใบ ดอก และผล พบว่าลักษณะลำต้น รูปร่างใบ ปลายใบ และฐานใบ สามารถจำแนกความแตกต่างของชนิดพืชที่ทำการศึกษาได้ค่อนข้างชัดเจนกว่า ลักษณะสัณฐานวิทยาอื่น ๆ ดังนี้ ลักษณะลำต้น สามารถจำแนกความแตกต่างได้ 2 ลักษณะคือ ลักษณะลำต้นแบบเปลือกเรียบ (smooth bark) พบในกลุ่มตัวอย่างของ *D. cauliflora*, *D. decandra*, *D. diepenhorstii*, *D. ferrea*, *D. filipendula*, *D. montana*, *D. philippensis*, *D. rubra*, *D. transitoria*. และ *D. wallichii* ลักษณะลำต้นแบบเปลือกแตก (fissured bark) พบในกลุ่มตัวอย่างของ *D. areolata*, *D. bejaudii*, *D. buxifolia*, *D. mollis*, *D. malabarica*, *D. rhodocalyx*

และ unknown (ภาพที่ 1) ลักษณะรูปร่างใบสามารถจำแนกความแตกต่างได้ 3 ลักษณะ คือ รูปร่างใบเป็นรูปขอบขนาน (oblong) พบในกลุ่มตัวอย่างของ *D. areolata*, *D. beaudii*, *D. buxifolia*, *D. cauliflora*, *D. decandra*, *D. diepenhorstii*, *D. ferrea*, *D. filipendula*, *D. malabarica*, *D. mollis*, *D. montana*, *D. philippensis*, *D. rubra*, *D. transitoria* และ unknown รูปร่างใบเป็นไข่กลับ (obovate) พบในตัวอย่างของ *D. rhodocalyx* เพียงชนิดเดียว และรูปร่างใบเป็นรูปรี (elliptic) พบในตัวอย่างของ *D. wallichii* เพียงชนิดเดียว (ภาพที่ 2) ลักษณะปลายใบสามารถจำแนกความแตกต่างได้ 3 ลักษณะ คือ ปลายใบเรียวแหลม (acuminate) พบในกลุ่มตัวอย่างของ *D. decandra*, *D. mollis*, *D. montana* และ unknown

ปลายใบแหลม (acute) พบในกลุ่มตัวอย่างของ *D. cauliflora*, *D. diepenhorstii*, *D. ferrea*, *D. filipendula*, *D. philippensis*, *D. rhodocalyx*, *D. rubra*, *D. transitoria* และ *D. wallichii* ปลายใบมน (obtuse) พบในกลุ่มตัวอย่าง *D. areolata*, *D. beaudii*, *D. buxifolia* และ *D. malabarica* (ภาพที่ 3) ลักษณะฐานใบสามารถจำแนกความแตกต่างได้ 3 ลักษณะคือ ฐานใบแหลม (cuneate) พบในกลุ่มตัวอย่างของ *D. areolata*, *D. buxifolia*, *D. cauliflora*, *D. decandra*, *D. diepenhorstii*, *D. ferrea*, *D. filipendula*, *D. malabarica*, *D. mollis*, *D. philippensis*, *D. rhodocalyx*, *D. rubra*, *D. transitoria*, *D. wallichii* และ unknown ฐานใบมน (obtuse) พบเพียงชนิดเดียวคือ *D. beaudii* และฐานใบเป็นรูปหัวใจ (cordate) พบเพียงชนิดเดียวคือ *D. montana* (ภาพที่ 4)



Figure 1 Stem or trunk of *Diospyros* spp.

(A) smooth bark: *D. transitoria*

(B) fissured bark: *D. rhodocalyx*

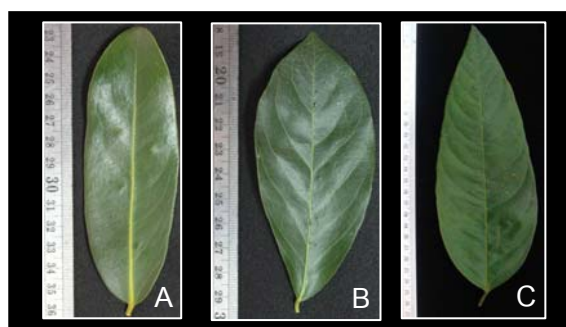


Figure 2 Leaf shape of *Diospyros* spp

(A) oblong: *D. areolata*

(B) obovate: *D. rhodocalyx*

(C) elliptic: *D. wallichii*

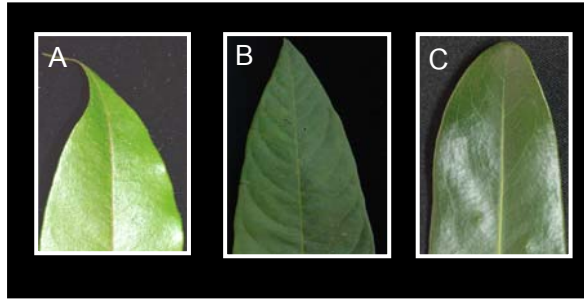


Figure 3 Leaf apex of *Diospyros* spp

(A) acuminate: *D. mollis*

(B) acute: *D. wallichii*

(C) obtuse: *D. areolata*

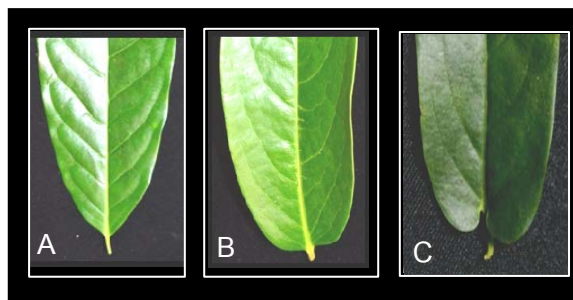


Figure 4 Leaf base of *Diospyros* spp

(A) cuneate: *D. cauliflora*

(B) obtuse: *D. bejaudii*

(C) cordate: *D. montana*

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในภาคใต้โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

จากการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มทั้งหมด 60 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 15 ไพรเมอร์ และ 45 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจน จากจำนวนไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เบื้องต้น จำนวน 15 ไพรเมอร์ นำมาทดสอบรอบที่สองเพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่ให้ผล ของแถบดีเอ็นเอชัดเจนที่สุด พบว่าคัดเลือกได้ 8 ไพรเมอร์ คือ OPB-05, OPB-10, OPB-11, OPB-12, OPJ-05, OPM-05, OPM-06 และ OPY-15 จึงนำมาทดสอบเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของพืชสกุล *Diospyros* ทั้งหมดที่สุ่มเก็บจำนวนทั้ง 96 ต้น ทราบชนิด 94 ต้น และไม่ทราบชนิดอีก 2 ต้น จากการทดสอบ พบว่า

ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 168 แถบ เฉลี่ย 11.60 แถบต่อไพรเมอร์ ขนาดของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง < 200 ถึง 2000 คู่เบส ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 167 แถบคิดเป็น 99.40 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) โดยที่ไพรเมอร์ OPB-05, OPB-10, OPB-11, OPB-12, OPM-05, OPM-06 และ OPJ-05 ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะแตกต่างกันทั้งหมด โดยที่ไพรเมอร์ OPB-12 ให้แถบดีเอ็นเอสูงที่สุด คือ 27 แถบ (ภาพที่ 5A) ไพรเมอร์ OPJ-05 ให้แถบดีเอ็นเอ 21 แถบ ทั้ง 21 แถบให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทั้งหมด และให้แถบดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจงกับตะโกสวน โดยมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 220 คู่เบส (ภาพที่ 5B) ไพรเมอร์ OPY-05 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 19 แถบ ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะแตกต่างกัน 18 แถบ อีก 1 แถบ ให้แถบดีเอ็นเอ

Table 2 Primers producing polymorphic DNA bands in RAPD patterns

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

ที่มีลักษณะไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 5C) เหตุผลที่ยกตัวอย่างแถบดีเอ็นเอเพียง 32 แถบ จาก 96 แถบ เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่ยกตัวอย่างเป็นตัวแทนของแถบดีเอ็นเอของพืชตัวอย่างแต่ละชนิด และแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบแตกต่างกันชัดเจน

เมื่อศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ทั้ง 96 ตัวอย่าง โดยพิจารณาจากค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี 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) พบว่า จากตัวอย่างทั้งหมด 96 ตัวอย่าง มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.404-0.994 คือ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.580 โดยที่ *D. areolata* และ

D. philippensis มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.887 ในขณะที่ *D. diepenhorstii* และ *D. wallichii* มีความห่างไกลทางพันธุกรรมมากที่สุด คือมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.409 สำหรับพืชสกุล *Diospyros* อีก 2 ตัวอย่าง ที่ไม่ทราบชนิดพบว่า มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ *D. decandra*, *D. buxifolia* และ *D. ferrea* ซึ่งมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.660, 0.619 และ 0.561 ตามลำดับ และผลจากเดนไดรแกรมสามารถแบ่งกลุ่มพืชที่ศึกษาได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *D. areolata*, *D. bejaudii*, *D. diepenhorstii*, และ *D. philippensis* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *D. buxifolia*, *D. decandra*, *D. ferrea*, *D. malabarica*, *D. mollis*, *D. montana*, *D. rhodocalyx*, *D. transitoria*, *D. wallichii*, และ unknown กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *D. cauliflora* และ *D. rubra* กลุ่มที่ 4 คือ *D. filipendula* (ภาพที่ 6)

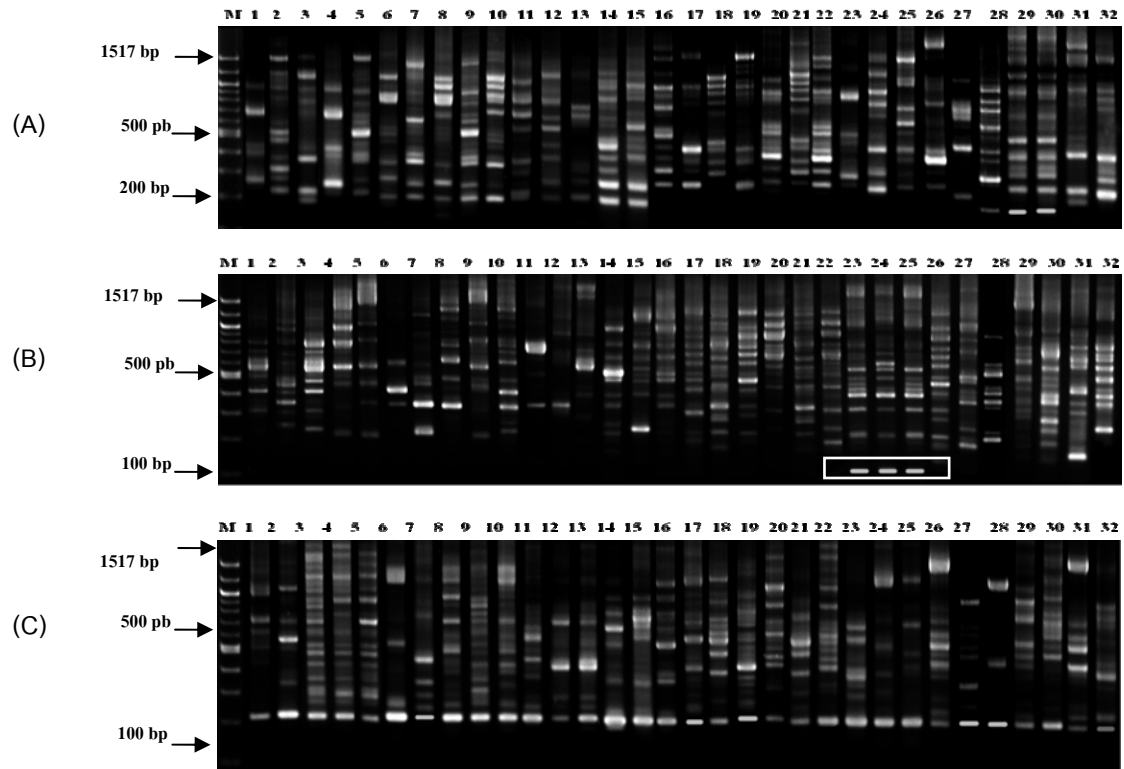


Figure 5 RAPD markers selected from primer OPB-12 (A), OPJ-05 (B) and OPY-05 (C) of 16 *Diospyros* spp. and 1 Unknown Lane 1-5: *D. diepenhorstii* Miq., 6-10: *D. areolata* King., 11: *D. bejaudii* Lecomte., 12-13: *D. philippensis* Gurke., 14-16: *D. mollis* Griff., 17: *D. transitoria* Bakh., 18: *D. montana* Roxb., 19: *D. wallichii* King & Gamble ex King., 20-22: *D. rhodocalyx* Kurz., 23-25: *D. malabarica* Kostel. 26: *D. ferrea* Bakh., 27: *D. filipendula* Pierre ex Lecomte., 28: *D. decandra* Lour., 29: *D. cauliflora* Blume., 30: *D. rubra* Lecomte., 31: *D. buxifolia* (Blume) Hiern. And 32: unknown, M: DNA Ladder.

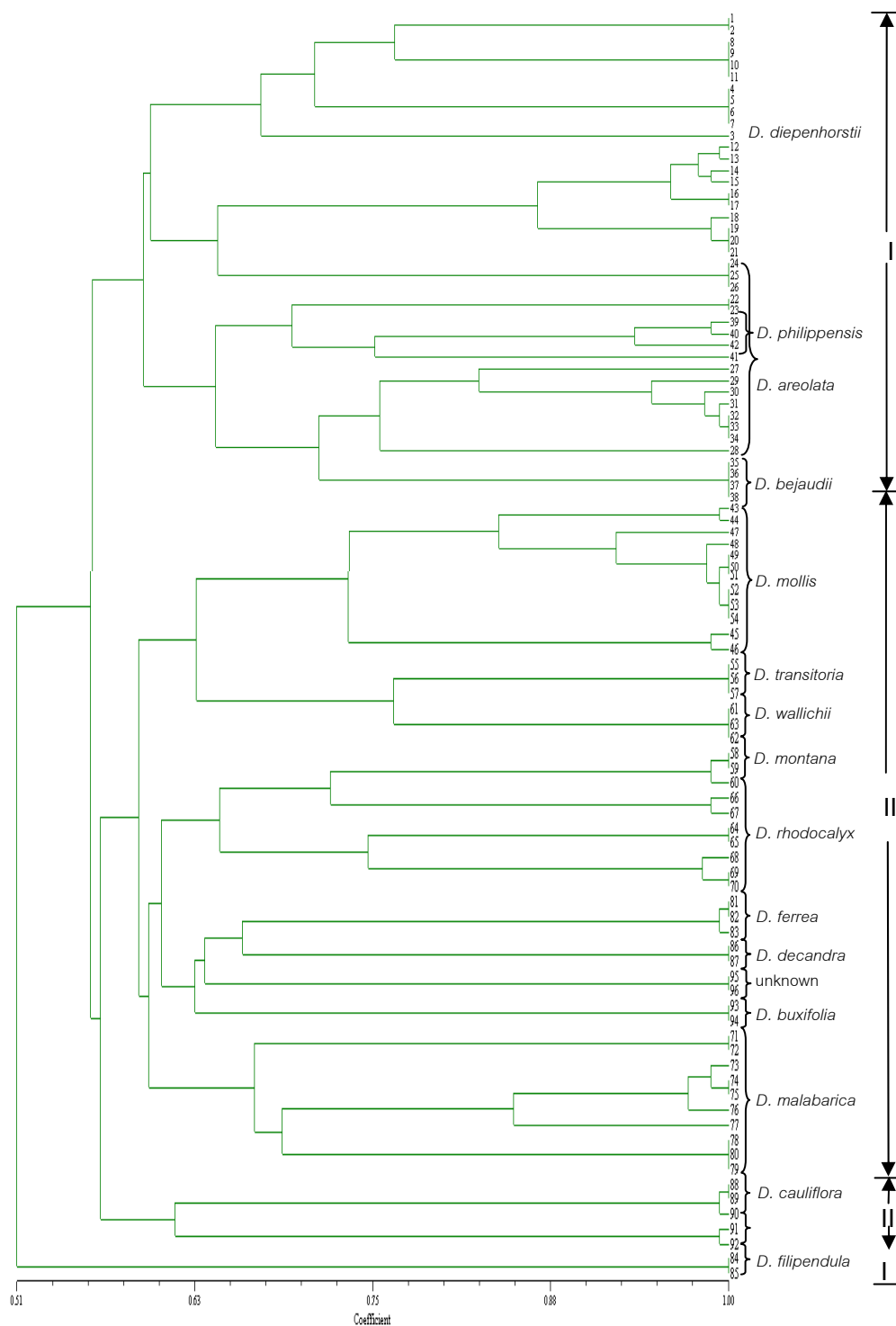


Figure 6 Dendrogram based on similarity coefficient for 96 samples of *Diospyros* ssp. by cluster analysis of RAPD markers.

วิจารณ์

พืชในกลุ่ม *Diospyros* ที่พบเห็นได้ทั่วไปในภาคใต้คือ *D. areolata*, *D. diepenhorstii*, *D. mollis* และ *D. rhodocalyx* ส่วนชนิดอื่น ๆ พบในบางพื้นที่ ขณะเดียวกันบางชนิดมีลักษณะคล้ายกันมาก และแต่ละพื้นที่มีชื่อเรียกแตกต่างกัน ส่งผลทำให้เกิดความไม่ชัดเจนในการจำแนกชนิดพืชด้วยลักษณะสัณฐานวิทยาจึงมีความจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลเข้ามาช่วย แต่ในเบื้องต้นมีความจำเป็นต้องอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาซึ่งลักษณะสัณฐานวิทยาที่นำมาใช้ในการประเมินตัวอย่างพืชสกุล *Diospyros* ทั้ง 96 ตัวอย่าง ได้แก่ ลักษณะลำต้น ใบ ดอก และผล พบว่าลักษณะที่สามารถจำแนกตัวอย่างพืชได้คือ ลักษณะลำต้น รูปร่างใบ ปลายใบ ฐานใบ ดอก และผล แต่การศึกษาครั้งนี้พืชบางชนิดไม่สามารถใช้ลักษณะดอกและผลได้ เนื่องจากช่วงที่ไปเก็บพืชตัวอย่างเป็นฤดูออกดอก และให้ผล แต่พืชตัวอย่างไม่ออกดอก และผล ทำให้เก็บตัวอย่างดอกและผลไม่ได้ ซึ่งอาจเกิดจากความแปรปรวนของสภาพอากาศ

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ซึ่งใช้ไพรเมอร์ 8 ชนิด ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มกับดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากตัวอย่างพืชสกุล *Diospyros* ที่ศึกษาครั้งนี้ จำนวนทั้งสิ้น 96 ต้น ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 168 แถบ เฉลี่ย 11.60 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 167 แถบ (99.40 เปอร์เซ็นต์) และอีก 1 แถบ (4.14 เปอร์เซ็นต์) เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกัน ไพรเมอร์ OPB-12 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด จำนวน 27 แถบ ไพรเมอร์ OPB-05 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด จำนวน 16 แถบ และเมื่อพิจารณาความหลากหลายในกลุ่มพืชสกุล *Diospyros* โดยวิเคราะห์จากค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมพบว่า จากตัวอย่างทั้งหมดมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.404-0.994 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.580 เมื่อพิจารณาถึงกลุ่มตัวอย่างพืชชนิดเดียวกันที่เก็บจากสถานที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่จะให้แถบดีเอ็นเอแตกต่างกัน แสดงว่าพื้นที่มีผลต่อความผันแปรทางพันธุกรรม เมื่อพิจารณาความผันแปรที่เกิดขึ้นในพืชชนิดเดียวกัน ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นจาก

กลุ่มประชากรที่อยู่ในกลุ่มพื้นที่เดียวกัน มีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพพื้นที่ ทำให้พืชชนิดเดียวกันที่อยู่ในสภาพพื้นที่แตกต่างกันมีพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ในขณะที่พืชต่างชนิดกันแต่อยู่ในพื้นที่เดียวกันมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมเดียวกัน ทำให้มีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน เช่น *D. diepenhorstii* จำนวน 21 ตัวอย่าง จากหลายพื้นที่ เมื่อพิจารณาลักษณะภายนอก พบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน แต่จากผลวิเคราะห์ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมพบว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 0.697-1.000 และเนื่องจากพืชสกุล *Diospyros* เป็นพืชผสมข้าม และสามารถผสมข้าม species ได้ ส่งผลให้พืชคนละชนิดกันที่อยู่ในพื้นที่เดียวกัน มีพันธุกรรมใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Wen-bin et al. (2006) ที่พบว่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้น *Chrysanthemum* ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน และพบว่า *D. areolata* กับ *D. philippensis* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.887 ซึ่งหากดูลักษณะสัณฐานวิทยาพบว่า ทั้งสองชนิดมีลักษณะใกล้เคียงกัน ในขณะที่ *D. diepenhorstii* กับ *D. wallichii* มีความห่างไกลทางพันธุกรรมมากที่สุด มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.409 ซึ่งทั้งสองชนิดมีลักษณะสัณฐานวิทยาแตกต่างกันมากกว่าชนิดอื่น สำหรับพืชสกุล *Diospyros* อีก 2 ตัวอย่าง ที่ไม่ทราบชนิดพบว่า มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ *D. decandra*, *D. buxifolia* และ *D. ferrea* ซึ่งมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.660, 0.619 และ 0.561 ตามลำดับ สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานวิทยาคือมีลักษณะใบใกล้เคียงกัน (ลักษณะรูปร่างใบเป็นรูปขอบขนาน ปลายใบเรียวแหลม และฐานใบแหลม) และผลจากเดนโดรแกรมสามารถแบ่งกลุ่มพืชที่ศึกษาได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย *D. areolata*, *D. beaudii*, *D. diepenhorstii*, และ *D. philippensis* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *D. buxifolia*, *D. decandra*, *D. ferrea*, *D. malabarica*, *D. mollis*, *D. montana*, *D. rhodocalyx*, *D. transitoria*, *D. wallichii*, และ unknown กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย *D. cauliflora* และ *D. rubra* กลุ่มที่ 4 คือ *D. filipendula* ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานทดลองของ Duangjai et al. (2006) ที่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของพืชสกุล *Diospyros* โดยใช้ gene atpB,

matK, ndhF, trnK intron, trnL intron และ trnL-trnF สรุปว่า *D. filipendula*, *D. diepenhorstii*, *D. montana* และ *D. rhodocalyx* อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งการทดลองครั้งนี้ *D. filipendula* อยู่คนละกลุ่มกับพืชอื่นที่เหลือ และถูกแยกออกไปอยู่ลำพังเพียงชนิดเดียว

สรุป

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* ในเบื้องต้นโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อจำแนกความแตกต่าง เช่น ลักษณะลำต้น ใบ ดอก และผล การครั้งนี้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สามารถจำแนกชนิดพืชสกุล *Diospyros* ได้ชัดเจนคือ ลักษณะใบ แต่พืชบางชนิดมีลักษณะคล้ายกันมากจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ จึงใช้เทคนิคอาร์เอฟดีเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Diospyros* โดยใช้ไพรเมอร์ 8 ชนิดพบว่า ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 168 แถบ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.60 แถบต่อไพรเมอร์ เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน 167 แถบ (99.40 เปอร์เซ็นต์) และอีก 1 แถบ (4.14 เปอร์เซ็นต์) เป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกัน ไพรเมอร์ OPB-12 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอสูงสุด จำนวน 27 แถบ ไพรเมอร์ OPB-05 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด จำนวน 16 แถบ ผลจากเดนโดแกรมสามารถแบ่งกลุ่มพืชที่ศึกษา 96 ตัวอย่างได้เป็น 4 กลุ่ม แยกตามชนิดค่อนข้างชัดเจน โดยมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.404-0.994 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.580 โดยที่ *D. areolata* กับ *D. philipensis* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด มีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.887 ในขณะที่ *D. diepenhorstii* กับ *D. wallichii* มีความห่างไกลทางพันธุกรรมมากที่สุด คือมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.409 สำหรับพืชสกุล *Diospyros* อีก 2 ตัวอย่างที่ไม่ทราบชนิดพบว่ามีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับ *D. decandra*, *D. buxifolia* และ *D. ferrea* ซึ่งมีค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.660, 0.619 และ 0.561 ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการ การศึกษาพันธุกรรมของผักพื้นบ้านและไม้ผลพื้นเมืองในภาคใต้ โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และได้รับทุนสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

- เกรียงศักดิ์ ไทยพงศ์. 2545. การประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพลับในประเทศไทยด้วยเครื่องหมาย RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). ปัญหาพิเศษปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 45 หน้า.
- เฉลิมพล ภูมิไชย์. 2539. การจำแนกสายพันธุ์พลับในประเทศไทยโดยอาศัยเทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). ปัญหาพิเศษปริญญาตรี ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 85 หน้า.
- ประพิมพ์พัทธ์. 2552. การวิจัยทางโภชนาการที่มีประโยชน์ในผลของพืชสกุลพลับ. วารสารแก่นเกษตร ปีที่ 37 ฉบับที่ 4 (15 กันยายน 2552) หน้า 281-292.
- องค์การสวนพฤกษศาสตร์. 2542. ไม้ต้นในสวน Tree in the Garden. กรุงเทพฯ : องค์การสวนพฤกษศาสตร์.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- Duangjai, S., Wallnofer, B., Samulel, R., Munzinger, J. and Chase, MW. 2006. Generic Delimitation and Relationships in Ebenaceae Sensu Lato: Evidence from six

- Plastid DNA Regions. American Journal of Botany 93(12): 1808-1827.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Societe Vaudoise des Science Naturelles 44: 223-270.
- 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. (November 6, 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. Nucl Acids. Res. 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.
-