

การระบุพันธุ์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะพร้าว จากการใช้เทคนิคอาร์เอฟดี

Varietal Identification and Genetic Relationship in Coconut (*Cocos nucifera* L.) Using RAPD Technique

ทิพวัลย์ บุญแก้ว และสุรินทร์ ปิยะโชคนากุล

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

ลักษมน นราทอง

สาขาพันธุ์วิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

จรีรัตน์ มงคลศิริวัฒนา*

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาเขตกำแพงแสน ถนนมาลัยแมน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

Tippawan Boonkaew and Surin Peyachoknagul

Department of Genetics, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkhen Campus,

Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

Lucksamon Narathong

Interdisciplinary Graduate Program in Genetic Engineering, Graduate School,

Kasetsart University, Bangkhen Campus, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

Chareerat Mongkolsirawatana*

Division of Genetics, Department of Science, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart

University, Kamphaeng Saen Campus, Malaiman Road, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

บทคัดย่อ

การตรวจสอบพันธุ์มะพร้าวต้นสูงและต้นเตี้ย 23 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายอาร์เอฟดี โดยใช้ไพรเมอร์ 7
ไพรเมอร์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 98 แถบ ประกอบด้วยแถบที่มีความแตกต่างกัน
(polymorphic band) จำนวน 76 แถบ คิดเป็น 77.55 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใช้แยกพันธุ์มะพร้าวทั้ง 23 พันธุ์ได้ โดย
ไพรเมอร์ A04 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,900 คู่เบส ที่พบเฉพาะในมะพร้าวต้นเตี้ย สามารถใช้แยก
ความแตกต่างระหว่างมะพร้าวต้นสูงกับต้นเตี้ยได้ เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่ามีค่าดัชนีความเหมือน
ทางพันธุกรรม (similarity index) ระหว่าง 0.495 ถึง 0.949 โดยกลุ่มมะพร้าวต้นสูงมีค่าดัชนีความเหมือนทาง

พันธุกรรมเฉลี่ยสูงกว่าต้นเตี้ย แสดงว่ามะพร้าวต้นเตี้ยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่ามะพร้าวต้นสูง เมื่อนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.1 ใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ที่ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.78 สามารถแบ่งกลุ่มของมะพร้าวที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เป็น 4 กลุ่ม โดยมะพร้าวต้นสูงทุกพันธุ์ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนมะพร้าวต้นเตี้ยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม แสดงว่ากลุ่มมะพร้าวต้นสูงและต้นเตี้ยมีพันธุกรรมที่ค่อนข้างแตกต่างกัน โดยกลุ่มต้นเตี้ยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่า

คำสำคัญ : มะพร้าว; เครื่องหมายดีเอ็นเอ; อาร์เอฟดี; ค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรม

Abstract

Twenty three varieties of tall and dwarf types coconut were investigated using RAPD technique. The total of 98 bands was generated from 7 RAPD primers in which 76 bands (77.55 %) were polymorphic. Each variety was successfully identified and a dwarf type-specific band of about 1,900 bp was amplified from A04 primer. This fragment could be used to differentiate dwarf from tall type coconut. Genetic similarity index calculated from RAPD fingerprints ranged from 0.495 to 0.949. The average similarity index of the tall type was higher than the dwarf type, indicating that the dwarf type coconut was genetically more diverse than another. The dendrogram was constructed by the NTSYS-pc program using UPGMA method. Coconut samples were separated into 4 groups at the similarity index of 0.78. The tall type was clustered in one group while the dwarf type was distributed in other three groups. Thus, genetic background of the tall and the dwarf types of coconuts were quite different and the dwarf type had more genetic diversity.

Keywords: coconut; DNA marker; RAPD (random amplified polymorphic DNA); similarity index

1. คำนำ

มะพร้าว (*Cocos nucifera* L.) เป็นพืชที่มีการเจริญแพร่กระจายอยู่ในประเทศเขตร้อนหลายประเทศรวมถึงประเทศไทยด้วย ส่วนต่าง ๆ ของต้นและผลมะพร้าวสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น ใช้เป็นอาหาร เครื่องสำอาง เป็นพลังงานเชื้อเพลิง เครื่องใช้ในบ้านและวัสดุปลูกจากรายงานสรุปยุทธศาสตร์วิจัยและพัฒนาของกรมวิชาการเกษตร ในช่วงปี พ.ศ. 2554-2558 ระบุว่ามะพร้าวเป็นพืชที่มีอนาคตและสามารถพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจต่อไปได้ (กรมวิชาการเกษตร, 2554) แต่การศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับมะพร้าวซึ่งเป็นพืชที่

จะพัฒนาเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยนั้น ยังมีการศึกษาน้อย

การแบ่งกลุ่มของมะพร้าวสามารถแบ่งตามลักษณะทั่วไปได้เป็น 2 กลุ่มหลัก คือ มะพร้าวต้นสูง และมะพร้าวต้นเตี้ย ซึ่งมะพร้าวต้นสูงจะเจริญเติบโตเต็มที่ในช่วงอายุ 7-10 ปี ในขณะที่มะพร้าวต้นเตี้ยใช้เวลาในการเจริญเติบโตเต็มที่ 5-6 ปี ก็สามารถให้ผลผลิตได้ มะพร้าวต้นสูงในประเทศไทยสามารถสูงได้ถึง 18 เมตร ในขณะที่มะพร้าวต้นเตี้ยมีความสูงเต็มที่เพียง 12 เมตร ประโยชน์ของมะพร้าวต้นเตี้ยที่ดีกว่ามะพร้าวต้นสูง คือใช้เวลาในการเจริญให้ผลผลิตเร็วกว่าและสามารถเก็บเกี่ยวผล

ผลิตได้ง่าย

ประเทศไทยมีการปลูกมะพร้าวเป็นจำนวนมากใน 5 จังหวัด ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และปัตตานี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) พบว่าประชากรไทย 1 คน จะบริโภคเนื้อมะพร้าวประมาณปีละ 8,273.2 กรัม หรือประมาณ 18 ผล/คน/ปี ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยมีการใช้ผลมะพร้าวประมาณ 65 % ของผลผลิตทั้งหมด ส่วนที่เหลือประมาณ 35 % ของผลผลิตทั้งหมด ใช้น้ำของอุตสาหกรรมหรือส่งออกไป (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) การเลือกพันธุ์มะพร้าวสำหรับนำมาปลูกยังคงเป็นปัญหาอยู่ เนื่องจากไม่สามารถระบุพันธุ์ของมะพร้าวได้จากลักษณะภายนอกของต้นอ่อน ดังนั้นการหาวิธีในการคัดเลือกพันธุ์มะพร้าวที่แม่นยำได้ จึงเป็นวิธีที่สำคัญสำหรับเกษตรกรที่จะนำมะพร้าวไปปลูก

ปัจจุบันมีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หลายชนิดเข้ามาช่วยในการระบุเอกลักษณ์ ศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของมะพร้าวจากแหล่งปลูกที่แตกต่างกัน เช่น เครื่องหมาย restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Lebrun *et al.*, 1998) random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Ashburner *et al.*, 1997) amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Perera *et al.*, 1998) และ simple sequence repeat (SSR) (Perera *et al.*, 1999) ถึงแม้ว่าเครื่องหมายเอเอฟแอลพีและเอสเอสอาร์จะเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้รับความนิยมเนื่องจากให้ผลที่แม่นยำ แต่เครื่องหมายอาร์เอฟดีก็มีข้อดีหลายประการ คือ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สะดวก รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับดีเอ็นเอ ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย และประหยัดค่าใช้จ่ายกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น (สุรินทร์, 2552) จึงทำให้มีการนำ

เครื่องหมายอาร์เอฟดีมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชหลายชนิดในประเทศไทย ได้แก่ มันสำปะหลัง (นฤมล และคณะ, 2555) ผักกาด (จาตุรงค์ และคณะ, 2557) และขมิ้น (วริศรา และคณะ, 2557) เป็นต้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำเครื่องหมายอาร์เอฟดีมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะพร้าว คัดแยกพันธุ์และแยกกลุ่มระหว่างมะพร้าวต้นสูงและต้นเตี้ยที่ปลูกในประเทศไทย

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตัวอย่างมะพร้าว

มะพร้าวที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร จำนวน 23 พันธุ์ แบ่งออกเป็นมะพร้าวต้นสูง จำนวน 12 พันธุ์ ได้แก่ ไทยชุมพร เวสต์แอฟริกันต้นสูง ปากจกสัน เกลินฟิลิปปีนส์ สวีลูกผสม 1 ชุมพรวลูกผสม 60 ปากจกยาว ทะลายร้อย มะพร้าว กะโหลก นาฬิกา และมะพร้าวไฟ และมะพร้าวต้นเตี้ย จำนวน 11 พันธุ์ ได้แก่ ปะทิว น้ำหวาน น้ำหอม หมูสีส้ม หมูสีแดง หอมเหลือง พวงร้อย ไทยสีน้ำตาล คามารูน นิกินี และศรีลังกา

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนของมะพร้าวทั้ง 23 พันธุ์ มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ประยุกต์จาก Agrawal และคณะ (1992) ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) และ 280 นาโนเมตร (OD_{280}) แล้วหาค่า OD_{260}/OD_{280} และวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมายอาร์เอฟดี

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะพร้าวทั้ง 23 พันธุ์ ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR, polymerase

chain reaction) โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 22 ไพรเมอร์ (ShineGene Molecular Biotech, Inc., China) (ตารางที่ 1) โดยในการทำปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ (50 ng/μl) ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร, 10x buffer 2.0 ไมโครลิตร, MgCl₂ (25 mM) 2.0 ไมโครลิตร, dNTP mix (2 mM) 2.0 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (5 μM) 4.0 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase (5U/μL) (Invitrogen, USA) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นที่มีความบริสุทธิ์สูงจนได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาด้วยเทคนิค RAPD

ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'→3')
1	A01	CAGGCCCTTC
2	A03	AGTCAGCCAC
3	A04	AATCGGGCTG
4	A09	GGGTAACGCC
5	B01	GTTTCGCTCC
6	B08	GTCCACACGG
7	B09	TGGGGGACTC

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยตั้งอุณหภูมิและเวลา 3 ขั้นตอน ดังนี้ ขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที (สำหรับ denature) อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 120 วินาที (สำหรับ annealing) อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที (สำหรับ primer extension) ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ และขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส (สุรินทร์, 2545) จากนั้นตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5

เปอร์เซ็นต์

2.4 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะพร้าวทุกตัวอย่างที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเครื่องหมายอาร์เอฟดี โดยเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด แล้ววิเคราะห์ค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.1 (numerical taxonomy and multivariate analysis system) คำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) โดยวิธีของ Jaccard (1901) และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) โดยวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมะพร้าว 23 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายอาร์เอฟดีโดยใช้ไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทั้งหมด 22 ไพรเมอร์ พบว่ามี 7 ไพรเมอร์ ได้แก่ A01, A03, A04, A09, B01, B08 และ B09 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ชัดเจนและให้แถบที่มีความแตกต่างกัน โดยที่ไพรเมอร์ทั้ง 7 ไพรเมอร์นี้ เมื่อใช้ร่วมกันสามารถแยกมะพร้าวแต่ละพันธุ์ออกจากกันได้ เนื่องจากให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันทุกตัวอย่าง ซึ่งดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมดมี 98 แถบ ประกอบด้วยแถบที่มีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์มะพร้าว (polymorphic band) จำนวน 76 แถบ และมีแถบที่เหมือนกันทุกตัวอย่าง (monomorphic band) จำนวน 22 แถบ ซึ่งเมื่อคำนวณ % polymorphism ของแถบดีเอ็นเอ พบว่ามีค่าเฉลี่ย 77.55 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ ไพรเมอร์ B01 มี 20 แถบ (รูปที่ 1) รองลงมา คือ ไพรเมอร์ A04 ให้แถบดีเอ็นเอ 19

แถบ (รูปที่ 2) เมื่อใช้ไพรเมอร์ A04 เพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,900 คู่เบส ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้เฉพาะในมะพร้าว ต้นเดี่ยว ซึ่งใช้แยกความแตกต่างระหว่างมะพร้าวต้น

สูงและมะพร้าวต้นเดี่ยวได้ ดังนั้นไพรเมอร์ A04 จึงเหมาะที่จะนำมาใช้แยกกลุ่มพันธุ์มะพร้าวในเบื้องต้น

ตารางที่ 2 จำนวนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเครื่องหมายอาร์เอฟดี

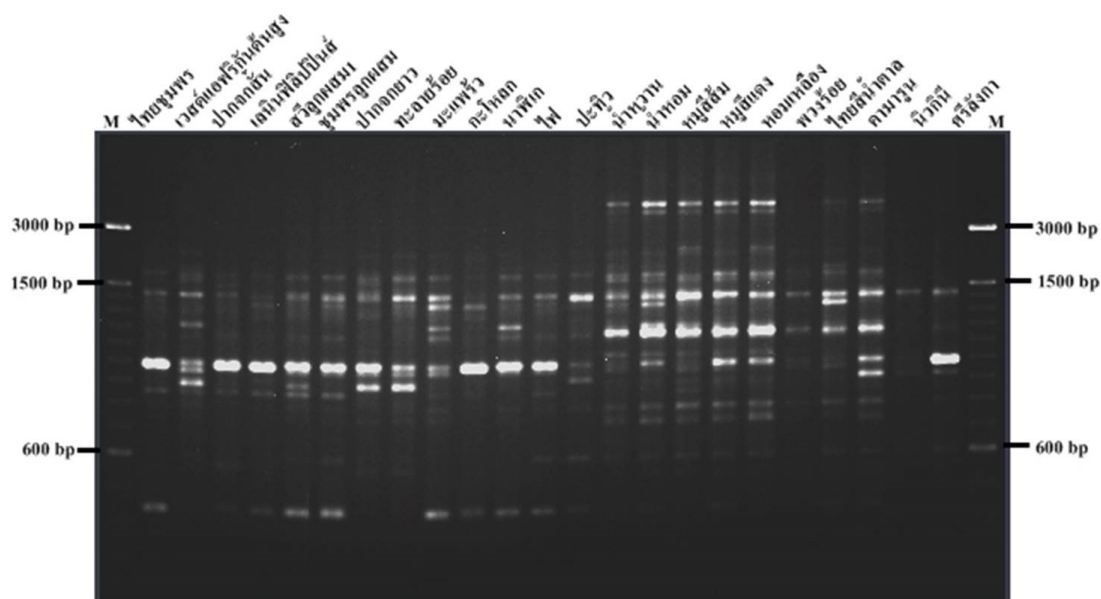
ชื่อไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			% polymorphism
	ทั้งหมด	ที่เป็น polymorphic	ที่เป็น monomorphic	
A01	17	16	1	94.12
A03	10	6	4	60.00
A04	19	9	10	47.37
A09	13	9	4	69.23
B01	20	20	0	100.00
B08	8	6	2	75.00
B09	11	10	1	90.91
รวม	98	76	22	77.55

เมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมะพร้าว ต้นสูงและต้นเดี่ยวทั้ง 23 พันธุ์ ที่เพิ่มปริมาณด้วย เครื่องหมายอาร์เอฟดีทั้ง 7 ไพรเมอร์ แล้วนำมา วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.1 และ เลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA เพื่อสร้างแผนภูมิ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตัวอย่างมะพร้าว ทั้ง 23 พันธุ์ ซึ่งพบว่าที่ค่าดัชนีความเหมือนทาง พันธุกรรม (similarity index) 0.78 สามารถแยก กลุ่มของมะพร้าวออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม I, II, III และ IV โดยที่มะพร้าวต้นสูงถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันทั้งหมดคืออยู่ในกลุ่ม I ส่วนมะพร้าวต้นเดี่ยวแบ่ง ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม II, III, และ IV (รูปที่ 3) พบว่าตัวอย่างมะพร้าวทั้ง 23 พันธุ์ นี้ มีค่าดัชนี ความเหมือนทางพันธุกรรม อยู่ระหว่าง 0.495 ถึง 0.949 ซึ่งมะพร้าวที่มีค่าดัชนีความเหมือนทาง พันธุกรรมมากที่สุด 0.949 คือ มะพร้าวต้นสูงพันธุ์ ไทยชุมพร (T1) กับพันธุ์เลนินฟิลิปปินส์ (T4) และ

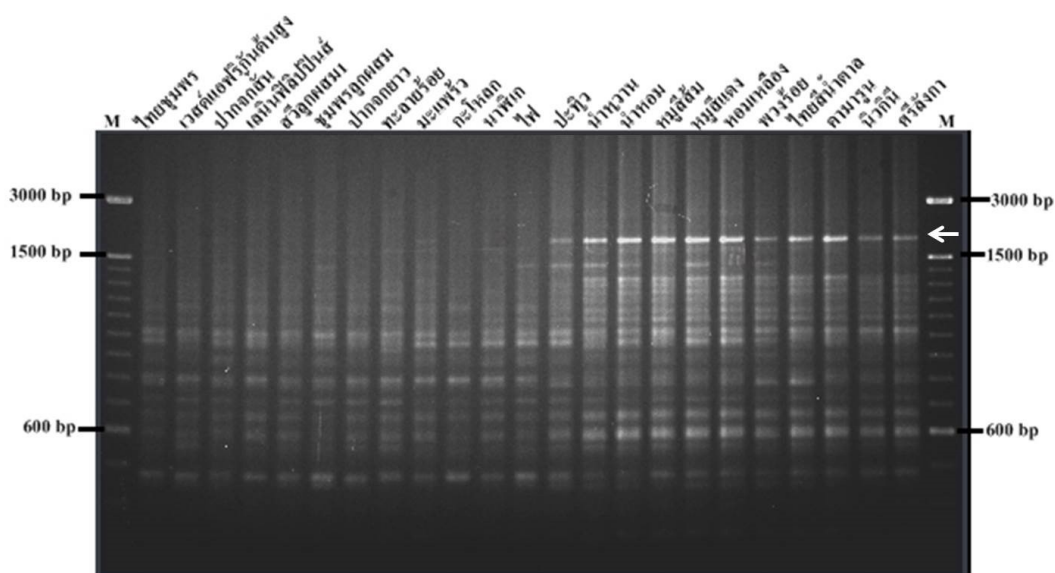
มะพร้าวที่มีค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมต่ำ ที่สุด 0.495 หรือมีความแตกต่างกันมากที่สุดคือ มะพร้าวต้นสูงพันธุ์ทะเลทรายร้อย (T8) กับมะพร้าวต้น เดี่ยวพันธุ์น้ำหวาน (D2) (ตารางที่ 3) จากการที่ พบว่ามะพร้าวพันธุ์ไทยชุมพรกับพันธุ์เลนิน ฟิลิปปินส์มีความเหมือนกันมากที่สุด จึงคาดว่า มะพร้าวทั้ง 2 พันธุ์ นี้มีต้นกำเนิดจากที่เดียวกัน แล้วมีการนำพันธุ์มาปลูกยังอีกประเทศหนึ่ง แต่ ประเทศใดจะเป็นต้นกำเนิดนั้นต้องมีการพิสูจน์หรือ สืบค้นข้อมูลเพิ่มเติม เมื่อพิจารณาแยกกลุ่มมะพร้าว กลุ่มต้นสูงมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.697 ถึง 0.949 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.830 ในขณะที่กลุ่มต้น เดี่ยวมีค่าอยู่ระหว่าง 0.546 ถึง 0.919 มีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.739 ซึ่งสรุปได้ว่ากลุ่มมะพร้าวต้นเดี่ยวมี ความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าต้นสูง ดังนั้นเมื่อนำไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมจึงทำให้แบ่งกลุ่มมะพร้าวต้นเดี่ยวแยก

ออกเป็นหลายกลุ่ม สาเหตุที่มะพร้าวต้นเดี่ยวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่า อาจเกิดจากในปัจจุบันเกษตรกรมีความนิยมปลูกมะพร้าวต้นเดี่ยว

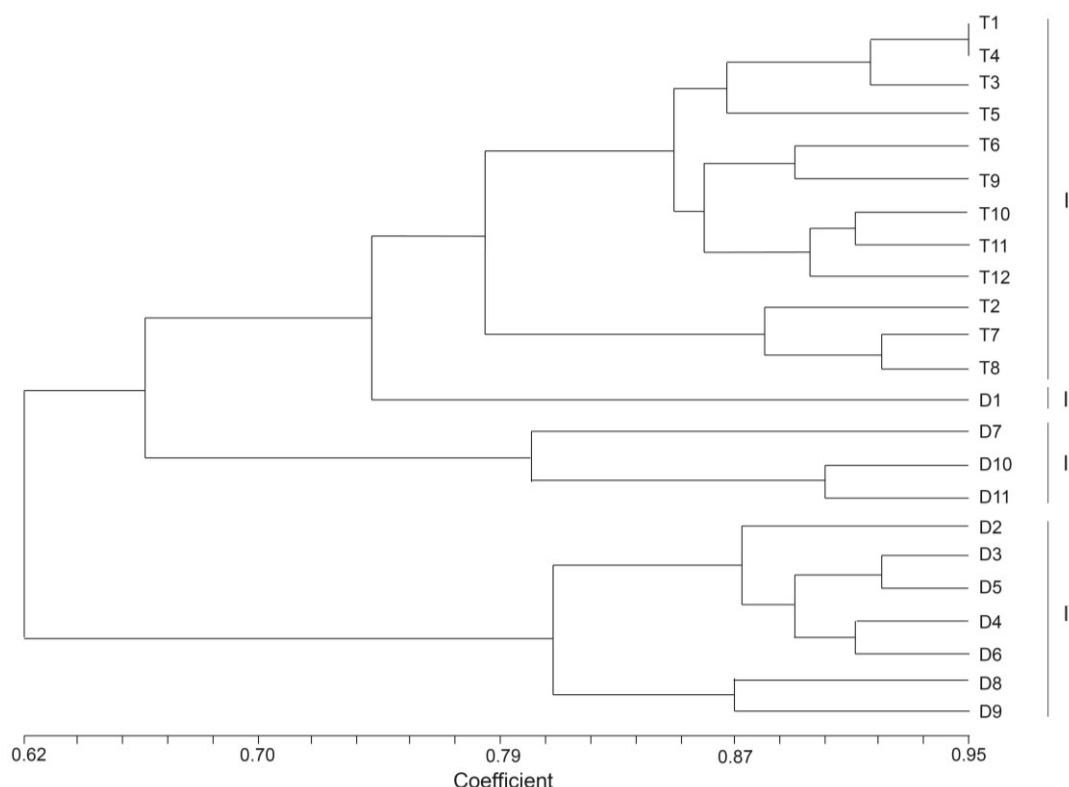
มากกว่าต้นสูงเพราะให้ผลผลิตเร็ว และง่ายต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิต จึงมีการปลูกคัดเลือกและพัฒนาพันธุ์มะพร้าวต้นเดี่ยวมากขึ้น



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ B01



รูปที่ 2 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ A04 [ลูกศรชี้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,900 คู่เบส ที่แยกความแตกต่างระหว่างมะพร้าวต้นสูงกับต้นเดี่ยวได้]



รูปที่ 3 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะพร้าวทั้ง 23 พันธุ์ ที่ได้จากเครื่องหมายอาร์เอพีดี [T1-T12 คือ มะพร้าวต้นสูง พันธุ์ไทยชุมพร เวสต์แอฟริกันต้นสูง ปากจกสัน เลนินฟิลิปินส์ สวีลูกผสม 1 ชุมพรลูกผสม 60 ปากจกยาว ทะลายร้อย มะพร้าว กะโหลก นาฬิกา ไฟ ตามลำดับ และ D1-D11 คือ มะพร้าวต้นเตี้ย พันธุ์ปะทิว น้ำหวาน น้ำหอม หมูสีส้ม หมูสีแดง หอมเหลือง พวงร้อย ไทยสีน้ำตาล คามารูน นิวกินี และศรีลังกา ตามลำดับ]

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะพร้าวต้นสูงและต้นเตี้ยทั้ง 23 พันธุ์ ด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี สามารถแยกมะพร้าวแต่ละพันธุ์ และแยกมะพร้าวต้นเตี้ยออกจากมะพร้าวต้นสูงได้อย่างชัดเจน ถึงแม้ว่ามะพร้าวต้นเตี้ยจะเกิดจากการกลายมาจากมะพร้าวต้นสูง (Santos *et al.*, 1996) แต่พันธุกรรมของมะพร้าวทั้ง 2 กลุ่มแตกต่างและแยกกันอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นว่าการกลายของมะพร้าวต้นสูงเป็นต้นเตี้ยนั้นเกิดขึ้นเป็นเวลานานแล้ว เมื่อเวลาผ่านไปแต่ละกลุ่มจึงเกิดความแปรผันภายในอย่างอิสระต่อกัน และเนื่องจาก

มะพร้าวต้นเตี้ยมีความต้องการมากกว่าจึงมีการพัฒนาพันธุ์ทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่ามะพร้าวต้นสูง จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้พิสูจน์ให้เห็นว่าอาร์เอพีดีเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพในการคัดแยกพันธุ์ของพืชได้ ดังจะเห็นได้ในมันสำปะหลัง (นฤมล และคณะ, 2555) ผักกาด (จาตุรงค์ และคณะ, 2557) และขมิ้น (วรสิรา และคณะ, 2557) เช่นเดียวกับผลที่ได้ในการแยกพันธุ์มะพร้าวครั้งนี้ นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Ashburner (1997) ได้นำเครื่องหมายอาร์เอพีดีมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและ

ต้นกำเนิดของมะพร้าว และสามารถระบุต้นกำเนิดและวิวัฒนาการของมะพร้าวในประเทศแถบมหาสมุทรแปซิฟิกได้ การนำเครื่องหมายอาร์เอฟีดมาใช้แยกพันธุ์และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ

มะพร้าวในประเทศไทยครั้งนี้ จะสามารถนำเครื่องหมายที่ได้ไปใช้ในการคัดเลือกพันธุ์จากต้นอ่อนของมะพร้าวตามความต้องการของเกษตรกรต่อไปได้

ตารางที่ 3 ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของตัวอย่างมะพร้าวทั้ง 23 พันธุ์ ที่ได้จากเครื่องหมายอาร์เอฟีด [ตัวหนา คือ ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่มีค่าสูงสุดและต่ำสุด]

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11
T1	1.000																						
T2	0.828	1.000																					
T3	0.929	0.838	1.000																				
T4	0.949	0.798	0.899	1.000																			
T5	0.879	0.828	0.848	0.869	1.000																		
T6	0.899	0.788	0.848	0.889	0.879	1.000																	
T7	0.798	0.909	0.828	0.808	0.818	0.798	1.000																
T8	0.758	0.848	0.788	0.788	0.818	0.778	0.919	1.000															
T9	0.828	0.798	0.818	0.838	0.808	0.889	0.788	0.788	1.000														
T10	0.909	0.758	0.879	0.919	0.828	0.889	0.768	0.747	0.879	1.000													
T11	0.838	0.747	0.808	0.889	0.798	0.838	0.758	0.758	0.849	0.909	1.000												
T12	0.838	0.727	0.788	0.828	0.798	0.859	0.717	0.697	0.828	0.889	0.899	1.000											
D1	0.758	0.687	0.707	0.747	0.818	0.778	0.697	0.717	0.707	0.727	0.758	0.798	1.000										
D2	0.596	0.525	0.545	0.566	0.556	0.616	0.515	0.495	0.646	0.606	0.596	0.657	0.596	1.000									
D3	0.606	0.576	0.596	0.576	0.566	0.606	0.545	0.525	0.677	0.616	0.626	0.687	0.606	0.889	1.000								
D4	0.586	0.556	0.596	0.596	0.586	0.626	0.566	0.545	0.677	0.636	0.606	0.646	0.546	0.849	0.879	1.000							
D5	0.566	0.576	0.576	0.535	0.566	0.586	0.545	0.505	0.636	0.576	0.606	0.687	0.606	0.889	0.919	0.879	1.000						
D6	0.616	0.586	0.646	0.606	0.576	0.596	0.596	0.556	0.646	0.626	0.616	0.637	0.576	0.859	0.889	0.909	0.909	1.000					
D7	0.657	0.586	0.667	0.646	0.677	0.677	0.636	0.657	0.626	0.626	0.616	0.637	0.697	0.677	0.606	0.647	0.647	0.657	1.000				
D8	0.687	0.616	0.677	0.677	0.667	0.707	0.646	0.667	0.667	0.677	0.687	0.687	0.687	0.748	0.758	0.798	0.798	0.828	0.788	1.000			
D9	0.657	0.606	0.667	0.667	0.657	0.677	0.616	0.576	0.576	0.707	0.698	0.717	0.636	0.758	0.808	0.869	0.828	0.859	0.697	0.869	1.000		
D10	0.697	0.606	0.687	0.687	0.717	0.677	0.657	0.677	0.626	0.687	0.657	0.657	0.737	0.596	0.586	0.647	0.586	0.636	0.798	0.727	0.717	1.000	
D11	0.677	0.606	0.667	0.667	0.717	0.697	0.636	0.657	0.646	0.687	0.677	0.677	0.737	0.616	0.606	0.667	0.626	0.677	0.798	0.768	0.758	0.899	1.000

หมายเหตุ T1-T12 คือ มะพร้าวต้นสูง พันธุ์ไทยชุมพร เวสต์แอฟริกันต้นสูง ปากจกสัน เลนนีลิปินส์ สวีลูกผสม 1 ชุมพรลูกผสม 60 ปากจกยาว ทะลายร้อย มะพร้าวกะโหลก นาฬิกา ไฟ ตามลำดับ และ D1-D11 คือ มะพร้าวต้นเตี้ย พันธุ์ปะทิว น้ำหวาน น้ำหอม หมูสีส้ม หมูสีแดง หอมเหลือง พวงร้อย ไทยสีน้ำตาล คามารูน นิกินี และศรีลังกา ตามลำดับ

4. สรุป

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะพร้าว 23 ชนิด ด้วยเครื่องหมายอาร์เอฟีด โดยใช้ไพรเมอร์ 7 ไพรเมอร์ พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีความแตกต่างกันทุกพันธุ์ ดังนั้นจึงสามารถใช้ไพรเมอร์ทั้ง 7 ไพรเมอร์ สำหรับการจำแนกพันธุ์มะพร้าวแต่ละพันธุ์ได้ นอกจากนี้ไพรเมอร์ A04 ยังให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ

1,900 คู่เบส ที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่างมะพร้าวต้นสูงกับต้นเตี้ยได้ เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.1 และหาค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมพบว่ามีความค่า 0.495 ถึง 0.949 โดยในมะพร้าวต้นเตี้ยมีค่าเฉลี่ยของค่าดัชนีความเหมือนทางพันธุกรรมต่ำกว่าต้นสูง แสดงว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าต้นสูง

สอดคล้องกับแผนภูมิทางพันธุกรรมที่แยกกลุ่มมะพร้าวต้นเดี่ยวออกเป็น 3 กลุ่ม เนื่องจากมีความต้องการมะพร้าวต้นเดี่ยวมากกว่า จึงมีการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ทำให้พันธุกรรมของมะพร้าวต้นเดี่ยวมีความหลากหลายมากกว่า

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างมะพร้าวขอขอบคุณหน่วยวิจัยเทคโนโลยีพันธุศาสตร์และการประยุกต์ สมาชิกในห้องปฏิบัติการ สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหา วิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความช่วยเหลือและเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้

6. รายการอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2554, ยุทธศาสตร์วิจัยและพัฒนา, แหล่งที่มา : http://www.doa.go.th/th/index.php?option=com_content&view=article&id=63:strategy&catid=45:strategy&Itemid=68, 6 กุมภาพันธ์ 2556.

จาตุรงค์ สัมฤทธิ์, เปรมณัช ขุนปักษี, ชีระชัย ธนानันต์ และนฤมล ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกผักกาดด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Tech. 3: 23-28.

นฤมล ธนานันต์, เมธิณี เจริญไชย และชีระชัย ธนานันต์, 2555, การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังด้วยเทคนิคอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Tech. 1: 127-133.

วริสรา แทนสง่า, ชีระชัย ธนานันต์, บุญหงษ์ จงคิด และนฤมล ธนานันต์, 2557, การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและการจำแนก

ขมื่นด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอฟดี, Thai J. Sci. Tech. 3: 29-35.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 269 น.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545, จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 116 น.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2555, ศูนย์ข้อมูลผลไม้ : มะพร้าว, แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th/fruits/index.php>, 22 มิถุนายน 2559.

Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P., 1992, Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves, Biotech. Biodiv. Lett. 2: 19-24.

Ashburner, G.R., Thompson, W.K. and Halloran, G.M., 1997, RAPD analysis of South Pacific coconut palm populations, Crop Sci. 37: 992-997.

Jaccard, P., 1901, Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura, Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat. 37: 547-579.

Lebrun, P., N'Cho, Y.P., Seguin, M., Grivet, L. and Baudouin, L., 1998, Genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) revealed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers, Euphytica 101: 103-108.

Perera, L., Russell, J.R., Provan, J., McNicol, J.W. and Powell, W., 1998, Evaluating genetic relationship between indigenous coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions from Sri Lanka by means of AFLP profiling,

- Theor. Appl. Genet. 96: 545-550.
- Perera, L., Russell, J.R., Provan, J. and Powell, W., 1999, Identification and characterisation of microsatellites in coconut (*Cocos nucifera* L.) and the analysis of coconut population in Sri Lanka, Mol. Ecol. 8: 344-346.
- Rohlf, F.J., 2002, NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Inc., New York.
- Santos, G.A., Batugal, P.A., Othman, A., Baudouin, L. and Labouisse, J.P., 1996, Manual on Standardized Research Techniques in Coconut Breeding, International Coconut Genetic Resources Network, 46 p.