การศึกษาพันธุกรรมของตาลโตนด (*Borassus flabellifer*) ในภาคกลางของประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายเอแอฟแอลพี

Genetic Study on Asian Palmyra Palm (*Borassus flabellifer*) in the Central Part of Thailand Based on AFLP Marker

ขวัญใจ พิพัฒน์เจริญวงศ์ และศุภชัย วุฒิพงศ์ชัยกิจ

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

อาภากร สกุลสถาพร[a] และสมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช[a]*

ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ตำบลกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

Kwanjai Pipatchartlearnwong and Supachai Vuttipongchikij

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

Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

Arpakorn Sakulsathaporn[a] and Somsak Apisitwanich[a]*

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus,

Kamphaengsaen, Nakhon Pathom 73140

บทคัดย่อ

ตาลโตนดเป็นพืชที่มีความสำคัญระดับท้องถิ่นของประเทศไทย สามารถเจริญได้ในทุกสภาพภูมิประเทศ ตาลโตนดเป็นพืชที่อายุยืนและให้ผลผลิตครั้งแรกเมื่ออายุ 12-15 ปี และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมากระหว่างต้นเพศผู้และเพศเมีย ดังนั้นจึงไม่สามารถแยกเพศด้วยวิธีทางสัณฐานวิทยาได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการแบ่งกลุ่มและประเมินความหลากหลายของสายพันธุ์ ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาความหลากหลายของตาลโตนดในประเทศไทยจากเครื่องหมายดีเอ็นเอเพียงแค่ 2 เครื่องหมาย ได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีการนำเครื่องหมายเอเอฟแอลพีมาศึกษาความหลากหลายของตาลโตนดจำนวน 150 ต้น ที่กระจายอยู่ใน 14 จังหวัด ภาคกลาง พบว่ามี 12 เครื่องหมาย ให้แถบดีเอ็นเอ จำนวน 66 แถบ ที่

[a]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** fscissa@ku.ac.th

แสดงความแตกต่างระหว่างตาลโตนดในภาคกลาง จากการประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายพบว่ามีค่าความหลากหลายที่ค่อนข้างต่ำ และเมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA และ PCA พบว่าตาลโตนดในภาคกลางมีฐานพันธุกรรมที่แคบ มีค่าดัชนีความเหมือนกันทางพันธุกรรมสูง (>0.8) สอดคล้องกับการวิจัยก่อนหน้านี้ในการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอศึกษาตาลโตนดจากจังหวัดสงขลาและเพชรบุรีที่พบว่ามีฐานพันธุกรรมที่แคบเช่นเดียวกัน

คำสำคัญ : ตาลโตนด; เครื่องหมายเอแอฟแอลพี; ความหลากหลาย; แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

Abstract

Asian Palmyra palm (*Borassus flabellifer*), an important plant for local economic, can be found throughout Thailand. It has a very long lifespan, and its reproduction starts at 12-15 years of age. Asian Palmyra palm is dioecious, in which male and female plant are undistinguishable by morphology. The molecular data of Asian Palmyra palm in Thailand are currently limited to only RAPD and ISSR. Thus, this research aimed to apply the AFLP marker for studying genetic diversity of Asian Palmyra palm in the central Thailand. Twelve markers showed 66 polymorphic loci in 150 accessions. Evaluation of these loci indicated lower genetic variation values. A dendrogram was constructed based on UPGMA method, and PCA analysis showed that Asian Palmyra palms from the central Thailand have a very narrow genetic distant, with high similarity coefficient values (>0.8). The data obtained from this work are consistent with the previous studies using samples from Song kha and Petchburi provinces that the Asian Palmyra palms have a very low genetic diversity.

Keywords: Asian Palmyra palm; AFLP; diversity; dendrogram

1. บทนำ

ตาลโตนด (*Borassus flabellifer*) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในวงศ์หมาก-มะพร้าว (Arecaceae) อยู่ในวงศ์ย่อย Coryphoideae พบได้ทั่วไปในเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ บังกลาเทศ อินเดีย ลาว พม่า และไทย [1] ลักษณะทั่วไปของตาลโตนดมีลำต้นเดี่ยวไม่แตกกิ่งก้านสาขา มีความสูงได้ถึง 30 เมตร เป็นต้นแยกเพศ คือ ต้นเพศผู้และเพศเมียอยู่คนละต้นกัน (dioecious plant) ประชาชนแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีการใช้ประโยชน์จากหลายส่วนของตาลโตนด เช่น ลำต้นใช้ในงานปลูกสร้าง ผลอ่อนและผลแก่ใช้ในการประกอบอาหารพื้นบ้าน นอกจากนี้ยังพบสาร flabelliferins ที่มีสมบัติเป็น soponin steroid ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยังจุลชีพในเอ็นโดสเปิร์มเหลวของผลอ่อน [2] และพบสาร tyrosol และ glucosyl-(6-1)-glycerol ในสารสกัดเอทิลอะซิเทต (ethyl acetate) ที่ได้จากผนังผลชั้นกลาง (mesocarp) มีฤทธิ์ยับยังการทำงานของเอนไซม์ α-glucosidase ส่งผลต่อการเมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรทที่ช้าลง จึงช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานได้ [1] น้ำเลี้ยงจากช่อดอกเพศผู้และเพศเมียถูกนำไปต้มเพื่อเป็นเครื่องดื่มหรือนำมาเคี่ยวทำน้ำตาล น้ำตาลที่ได้จากตาลโตนด มี

แร่ธาตุและสารอาหารหลายชนิด เช่น แคลเซียม โพแทสเซียม เหล็ก ฟอสฟอรัส ไทเอมีน ไรโบฟลาวิน วิตามินเอ ซี บี1 บี2 บี3 และบี6 ซึ่งสารอาหารเหล่านี้ไม่สามารถพบได้ในน้ำตาลทราย [3] นอกจากนี้น้ำตาลโตนดยังให้ค่าดัชนีน้ำตาลที่ต่ำ (glycemix index, GI) อยู่ที่ 35-42 ซึ่งน้อยกว่าน้ำตาลทรายที่มีค่าดัชนีน้ำตาลที่สูงอยู่ที่ 58-82 [4]

ปัจจุบันข้อมูลจีโนมของตาลโตนดมีอยู่น้อย มีรายงานการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพียงไม่กี่ชนิด โดยส่วนใหญ่มุ่งเน้นการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการระบุเพศของตาลโตนด เช่น การใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี โดยไพรเมอร์ OPBE-12 แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 คู่เบส และไพรเมอร์ OPA-06 แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 600 คู่เบส ในเพศผู้เท่านั้น ส่วนไพรเมอร์ OPBA-13 แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบสในเพศเมียเท่านั้น [2,5] นอกจากนี้ยังมีการใช้เครื่องหมายเอแอฟแอลพี ในการหาความแตกต่างระหว่างเพศของตาลโตนดแต่ไม่ประสบผลสำเร็จ [6] ส่วนในการศึกษาความหลากหลายในตาลโตนดนั้น มีรายงานการใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี หาความหลากหลายของตาลโตนดในรัฐทมิฬนาฑูทางตอนใต้ของอินเดีย โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 180 ไพรเมอร์ พบเพียง 10 ไพรเมอร์ ที่แสดงความแตกต่าง จากการวิเคราะห์ UPGMA ของตาลโตนด 96 ต้น สามารถแยกประชากรออกเป็นสองกลุ่ม และมีค่าดัชนีความเหมือนกันทางพันธุกรรม (similarity coefficient) อยู่ที่ 0.85 [7] มีการใช้เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 35 คู่ ในตาลโตนด 20 ตัวอย่าง ที่ประกอบไปด้วยตาลโตนดต้นสูงเพศผู้ ตาลโตนดต้นเพศตัวเมีย ตาลโตนดต้นเตี้ยเพศผู้ ตาลโตนดต้นเตี้ยเพศเมีย อย่างละ 4 ต้น ต้นเพศผู้และเพศเมียที่ให้ผลผลิตสูงอีกอย่างละ 2 ต้น จากการวิเคราะห์สามารถจัดกลุ่มออกได้เป็นสองกลุ่มตามลักษณะความสูงของต้นและมีค่าดัชนีความเหมือนกันทางพันธุกรรมอยู่ที่ 71.6-95.7 ส่วนในประเทศไทยมีการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในประชากรตาลโตนดในจังหวัดสงขลาและเพชรบุรี จำนวน 116 ต้น โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มตาลโตนดออกเป็น 11 กลุ่ม มีค่าดัชนีความเหมือนกันทางพันธุกรรมอยู่ที่ 0.68-0.97 ในขณะที่เครื่องหมายไอเอสเอสอาร์สามารถแบ่งกลุ่มตาลโตนดออกเป็น 15 กลุ่ม โดยมีค่าดัชนีความเหมือนกันทางพันธุกรรมอยู่ที่ 0.54-0.93 ซึ่งทั้งสองเครื่องหมายไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มประชากรหรือให้เอกลักษณะอย่างชัดเจน [8]

งานวิจัยก่อนหน้า พบว่าตาลโตนดเป็นพืชชนิดหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการดำรงชีวิตของประชากรในกลุ่มเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อีกทั้งการศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตาลโตนดจากเครื่องหมายดีเอ็นเอยังมีข้อมูลอยู่จำกัด โดยเฉพาะการใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี ซึ่งเป็นเทคนิคที่รวมเอาวิธีอาร์เอฟแอลพีและอาร์เอพีดีเข้าด้วยกัน ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ มีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใดก็ได้โดยไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับเบสของดีเอ็นเอนั้น นอกจากนี้ยังไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถทำได้รวดเร็วและทำซ้ำได้ผลคงเดิม [9] ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ให้เข้าใจความสัมพันธ์ของประชากรตาลโตนดในภาคกลางของประเทศไทย เพื่อใช้ในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ในการพัฒนาสายพันธุ์ให้ดีขึ้นต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ตาลโตนดที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างใบของตาลโตนด เก็บแบบสุ่มในจังหวัด

ในภาคกลาง จำนวน 150 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 1 ส่วนตัวแทนนอกกลุ่มประชากรใช้ปาล์มน้ำมันหนึ่งตัวอย่าง ที่เก็บจากพิพิธภัณฑ์ สัตววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน (13°50'46.9"N 100°34'17.1"E) โดยปาล์มน้ำมันถูกใช้เป็นตัวแทนนอกกลุ่มประชากร เนื่องจากปาล์มน้ำมันเป็นพืชทางเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ พบได้ง่ายในประเทศไทยและมีข้อมูลทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก

ตารางที่ 1 แหล่งที่เก็บและจำนวนตัวอย่างตาลโตนดในแต่ละจังหวัด

จังหวัด	ชื่อย่อ	จำนวน	ตำแหน่งที่ตั้ง
เพชรบุรี	PH	18	13°01'21.8"N 99°54'47.2"E
ฉะเชิงเทรา	CH	5	13°44'42.8"N 101°11'48.0"E
กรุงเทพมหานคร	BK	4	13°51'15.0"N 100°49'36.6"E
นครปฐม	NP	14	13°52'06.3"N 100°10'04.5"E
ปทุมธานี	PT	6	14°01'47.3"N 100°33'00.6"E
กาญจนบุรี	KA	19	14°03'02.7"N 99°37'50.0"E
ปราจีนบุรี	PC	18	14°06'14.8"N 101°31'44.2"E
สุพรรณบุรี	SB	6	14°31'09.7"N 100°05'16.4"E
อ่างทอง	AT	7	14°39'08.2"N 100°25'56.0"E
สิงห์บุรี	SI	7	14°48'01.8"N 100°20'12.5"E
ชัยนาท	CN	14	15°05'57.1"N 100°12'05.6"E
นครสวรรค์	NS	14	15°51'33.6"N 100°15'14.4"E
สุโขทัย	SU	8	16°54'09.6"N 99°45'37.8"E
พิษณุโลก	PL	10	16°59'45.3"N 100°17'50.6"E

2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบตาลโตนด

สกัดดีเอ็นเอจากใบตาลด้วยการประยุกต์วิธี CTAB [10] โดยเริ่มต้นจากใช้ตัวอย่างใบอ่อนประมาณ 0.5 กรัม บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วใส่ลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ซึ่งประกอบด้วย 1.3X CTAB, 6.6% polyvinylpyrrolidone (PVP) และ 2% β-mercaptoethanal แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง โดยเขย่าทุก ๆ 10 นาที จากนั้นนำสารละลายมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วเติม chloroform: isoamyalcohol (24 : 1 v/v) แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนย้ายลงหลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมไอโซโพรพานอลก่อนบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไปปั่นความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % EtOH แล้วตากตะกอนจนแห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วย RNase A buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 และ 15mM NaCl) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม RNase A ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งคืน แล้วสกัดดีเอ็นเออีกครั้งโดยเติม 1X ของ phenol: chloroform: isoamyalcohol (25 : 24 : 1 v/v) หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนแล้วเติม 1X ของ chloroform: isoamyalcohol (24 : 1) หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใสและตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 10 M LiCl ปริมาตรหนึ่งในสามของสารละลายใส บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำสารละลายดีเอ็นเอหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และการล้างตะกอนด้วย 2.5 M LiCl และ 70 % EtOH ตามลำดับ หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตากตะกอนดีเอ็นเอจนแห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย deionzine-H_2O ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอและเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอของตาลโตนดปริมาณ 250 นาโน

กรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I (Thermo Fisher Scientific, USA) จากนั้นนำมาเชื่อมต่อด้วยอะแดปเตอร์ของ EcoRI (5′-CTCGTAGACTGCGTACC-3′ และ 3′-CATCTGACGCATGGTTAA-5′) และ MseI (5′-GACGATGAGTCCTGAG-3′ และ 3′-TACTCAGGACTCAT-5′) และใช้เป็น template ในขั้นตอนการทำ pre-selective amplification โดยปฏิกิริยานี้ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร dNTPs ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 1.6 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ MseI adaptor + C และ EcoRI adaptor + A ที่ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 พิโคโมลาร์ 1x *Taq* buffer และ 0.2 ยูนิต ของเอนไซม์พอลิเมอเรส (Vivantis, Malaysia) ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์จะประกอบด้วย 20 รอบ ของ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และขั้นสุดท้ายของขั้นตอน elongation นาน 5 นาที จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 20 เท่าและนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอตั้งต้นในปฏิกิริยา selective amplification โดยในปริมาตร 25 ไมโครลิตร จะประกอบด้วย 5 ไมโครลิตร ของดีเอ็นเอที่เจือจาง 0.16 มิลลิโมลาร์ ของ dNTPs 1.6 มิลลิโมลาร์ ของ $MgCl_2$ 0.2 พิโคโมลาร์ ของไพรเมอร์ MseI + 3 และ 0.2 พิโคโมลาร์ของไพรเมอร์ EcoRI + 3 primers, 1x *Taq* buffer และ 0.2 ยูนิตของเอนไซม์พอลิเมอร์เรส (Vivantis, Malaysia) ด้วยปฏิกิริยา touch-down จำนวน 12 รอบ ของ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 65 องศาเซลเซียส (โดยลดอุณหภูมิ -0.7 องศาเซลเซียส ต่อรอบ) นาน 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อด้วย 23 รอบ โดยเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing เป็น 56 องศาเซลเซียส และทำปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายของ extension เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์มาตรวจสอบด้วย 6% พอลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสและย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท [11] โดยแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างจะถูกให้คะแนนแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบข่มสมบูรณ์ (มีแถบเครื่องหมาย/ไม่มีแถบเครื่องหมาย) โดยกำหนดช่วงขนาดของชิ้นดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 75-350 คู่เบส

2.4 การประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมายและการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของตาลโตนด

นำข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการให้คะแนนความแตกต่างมาประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมาย ได้แก่ effective number of alleles (ne) [12] ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Nei's gene diversity, h) [13] ค่าดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรม (shannon's information index, I) [14] ด้วยโปรแกรม POPGENE version 1.31 [15] และ polymorphism information content (PIC) [16]

สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (dendrogram) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.02j [17] โดยสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมด้วยวิธี unweighted pair group method (UPGMA) [18] คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงพันธุกรรม ด้วยวิธี simple matching [19] จากนั้นจึงจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี principal component analysis (PCA) [20]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมายเอเอฟ-แอลพี จำนวน 64 เครื่องหมาย พบว่ามีจำนวน 12 เครื่องหมาย ที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างของตาลโตนด ได้แก่ E-AAG/M-CTG, E-AGG/M-CAA, E-ACA/M-CTC, E-ACA/M-CAA, E-ACG/M-CAT, E-ACG/M-CTT, E-AAC/M-CAT, E-

AAC/M-CTT, E-AGC/M-CAG, E-ACC/M-CAG, E-ACT/M-CAG และ E-ACT/M-CTG โดยแสดงแถบ ดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้จำนวน 132 แถบ ในช่วง 75-350 bp แต่มีเพียงแถบดีเอ็นเอจำนวน 66 แถบ ที่แสดงความแตกต่างระหว่างตาลโตนดในภาคกลาง โดยเครื่องหมาย E-ACG/M-CAT ให้เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 89 % ในขณะที่เครื่องหมาย E-AAG/M-CTG ให้เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด (19 %) และเครื่องหมายเอเอฟแอลพีให้เปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยอยู่ที่ 50 % ให้จำนวน effective number of alleles อยู่ในช่วง 1.32-1.73 (เฉลี่ย 1.54) ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Nei's gene diversity) อยู่ในช่วง 0.23-0.41 (เฉลี่ย 0.32) ค่าดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรม (shannon's Information index) เฉลี่ยเท่ากับ 0.49 (0.37-0.6) และเครื่องหมาย E-ACG/M-CTT (0.3) และ E-AGG/M-CAA (0.05) เป็นเครื่องหมายที่มีค่า PIC มากและน้อยที่สุดตามลำดับ และมีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.18 ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อมูลการประเมินประสิทธิภาพเครื่องหมายเอเอฟแอลพี จำนวน 12 เครื่องหมาย ที่แสดงความแตกต่างในตัวอย่างตาลโตนดในภาคกลาง จำนวน 150 ตัวอย่าง

Primer Pair	Total Number of bands	Number of polymorphic bands	% Polymorphic	ne[a]	h[b]	I[c]	PIC
E-AAG/M-CTG	16	3	18.75	1.37	0.23	0.37	0.10
E-AGG/M-CAA	12	5	41.67	1.32	0.23	0.39	0.05
E-ACA/M-CTC	12	3	25.00	1.58	0.35	0.53	0.13
E-ACA/M-CAA	13	6	46.15	1.41	0.27	0.44	0.14
E-ACG/M-CAT	9	8	88.89	1.70	0.39	0.56	0.20
E-ACG/M-CTT	10	4	40.00	1.43	0.27	0.43	0.30
E-AAC/M-CAT	10	8	80.00	1.55	0.34	0.51	0.25
E-AAC/M-CTT	13	9	69.23	1.65	0.37	0.54	0.24
E-AGC/M-CAG	8	4	50.00	1.73	0.41	0.60	0.19
E-ACC/M-CAG	10	4	40.00	1.66	0.36	0.52	0.28
E-ACT/M-CAG	10	7	70.00	1.56	0.33	0.51	0.13
E-ACT/M-CTG	9	5	55.56	1.53	0.31	0.48	0.15
Total	132	66	50.00	1.54	0.32	0.49	0.18

[a]ne = effective number of alleles; [b]h = Nei's gene diversity; [c]I = Shannon's information index

โดยในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในตาลโตนดทั้งในประเทศไทยและในต่างประเทศ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เครื่องหมายเอแอฟแอลพีในพืชที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียง

กับตาลโตนด พบว่าตาลโตนดมีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยที่น้อยกว่าในอินทผาลัม (97.5 %) ปาล์มน้ำมัน (61 %) และมะพร้าว (60 %) [21-23] และเมื่อพิจารณาค่า PIC ในอินผาลัมพบว่าให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.77 [21] ในขณะที่จำนวน effective number of alleles ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (Nei's gene diversity) และค่าดัชนีความหลากหลายทางพันธุกรรม (shannon's information index) ยังไม่มีการรายงานการใช้เครื่องหมายเอแอฟแอลพีในตาลโตนดและพืชที่ใกล้เคียงกับตาลโตนด ดังนั้นจากผลของเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในพืชที่ใกล้เคียงกับตาลโตนดและค่า PIC ในอินทผาลัม อาจกล่าวได้ว่าพืชเหล่านั้น เช่น ปาล์มน้ำมัน อินผาลัมและมะพร้าว มีความหลากหลายที่สูงกว่าในตาลโตนด

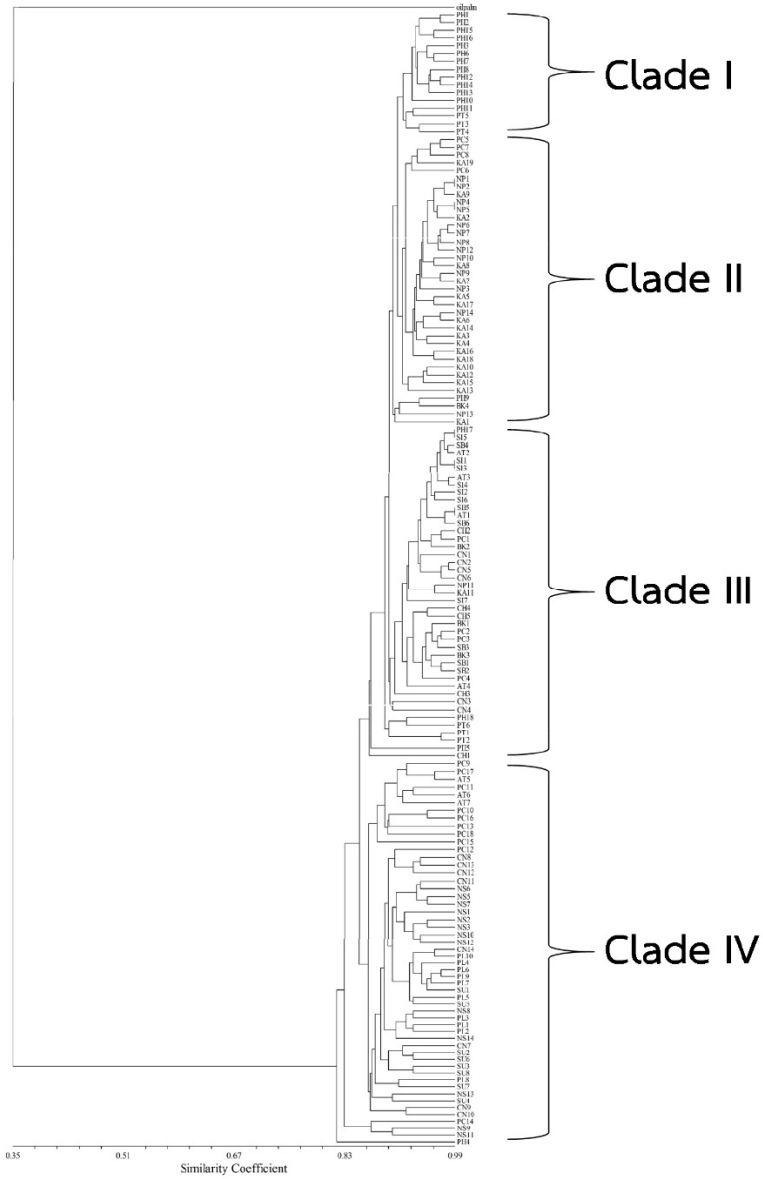
เมื่อนำแถบดีเอ็นเอทั้งหมด จำนวน 132 แถบ มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตาลโตนดในภาคกลาง พบว่าตัวอย่างปาล์มน้ำมันแยกออกจากกลุ่มของตาลโตนดอย่างชัดเจน ในขณะที่ตัวอย่างของตาลโตนดสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย โดยในแต่ละกลุ่มย่อยมีค่าดัชนีความเหมือนกันทางพันธุกรรมสูงอยู่ที่ประมาณ 0.93 โดย 4 กลุ่มย่อยไม่สัมพันธ์กับแหล่งที่เก็บ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากฐานพันธุกรรมของตาลโตนดในภาคกลางมีค่าดัชนีความเหมือนกันทางพันธุกรรมสูงมาก (มากกว่า 0.8) หรือมีฐานพันธุกรรมแคบ (รูปที่ 1) และเมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี PCA พบว่าตาลโตนดทั้งหมด 150 ตัวอย่าง นั้นไม่สามารถจัดกลุ่มออกจากกันได้ (รูปที่ 2) โดยก่อนหน้านี้มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาความหลากหลายของตาลโตนดในภาคใต้ (จังหวัดสงขลา) และภาคกลาง (จังหวัดเพชรบุรี) ของประเทศไทยโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีและไอเอสเอสอาร์ พบว่าไม่สามารถจัดจำแนกตาลโตนดจากทั้ง 2 แหล่งออกจากกัน [8] อีกทั้งยังมีการศึกษาความหลากหลายในประเทศอินเดียโดยการใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี พบว่าตาลโตนดมีฐานพันธุกรรมที่ค่อนข้างแคบเช่นเดียวกัน โดยมีค่าดัชนีความเหมือนกันทางพันธุกรรมอยู่ประมาณ 0.7-0.8 [7,24,25]

งานวิจัยนี้พบว่าเครื่องหมายเอแอฟแอลพีที่ได้จากการมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Mse*I ถึงแม้สามารถสร้างแถบดีเอ็นเอได้จำนวนมาก แต่มีเพียงแถบเครื่องหมายจำนวนไม่มากที่แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างแหล่งที่เก็บตัวอย่าง ดังนั้นหากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบความแตกต่างของตาลโตนดในภาคกลาง หรือต้องการวัดค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม อาจต้องอาศัยการเพิ่มเครื่องหมายเอแอฟแอลที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะคู่อื่น หรือเปลี่ยนไปใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดข่มร่วม เช่น ไมโครแซทเทลไลท์ ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าเครื่องหมายชนิดข่มสมบูรณ์ดังที่ทดสอบในงานวิจัยนี้ เพื่อเป็นการยืนยันว่าแท้จริงแล้วตาลโตนดในภาคกลางมีฐานพันธุกรรมที่แคบหรือไม่ และมีการจัดเป็นกลุ่มย่อยภายในภาคกลางหรือไม่ ดังนั้นเมื่อเพิ่มจำนวนหรือเปลี่ยนชนิดของเครื่องหมายดีเอ็นเอแล้วพบว่าตาลโตนดในภาคกลางมีฐานพันธุกรรมที่กว้าง อาจมีการคัดเลือกตาลโตนดที่มีความแตกต่างกันมาผสมพันธุ์กันเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ของตาลโตนด แต่ถ้าผลการทดลองบ่งชี้ว่าตาลโตนดในภาคกลางมีฐานพันธุกรรมที่แคบ อาจหาตาลโตนดจากแหล่งอื่นที่มีความแตกต่างกัน เพื่อใช้ในการเป็นพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์ตาลโตนดต่อไป

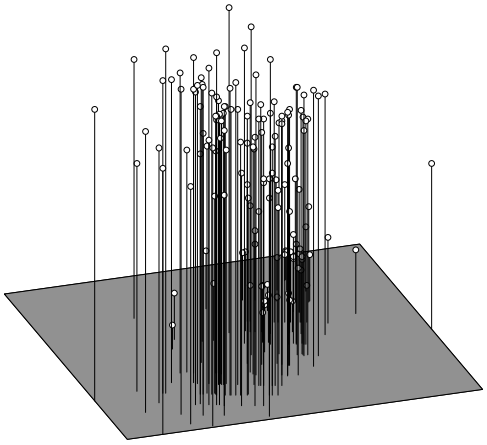
4. สรุปผลการทดลอง

การประเมินประสิทธิภาพของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี พบว่ามีเพียง 12 เครื่องหมาย ที่แสดงความแตกต่างในตาลโตนด 150 ตัวอย่าง โดยเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างนั้น มีค่า effective

number of alleles (ne), Nei's gene diversity (h) Shannon's information index (I) และ polymerphism information content (PIC) ที่ค่อนข้างต่ำ และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA และ PCA พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน คือ พันธุกรรมของตาลโตนดในภาคกลางของประเทศไทยมีค่าดัชนีความเหมือนกันทางพันธุกรรมสูงมาก (มากกว่า 0.8 ในตัวอย่างตาลโตนด 150 ตัวอย่าง) หรือมีฐานพันธุกรรมที่แคบมาก



รูปที่ 1 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตาลโตนด จำนวน 150 ตัวอย่าง และปาล์มน้ำมัน ด้วยวิธี UPGMA จากเครื่องหมายเอเอฟแอลพี จำนวน 12 เครื่องหมาย ที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในช่วง 75-350 bp จำนวน 132 ตำแหน่ง โดยชื่อย่อของตัวอย่างจัดตามแหล่งที่เก็บตามตารางที่ 1



รูปที่ 2 รูปแบบความสัมพันธ์ระหว่างตาลโตนดจำนวน 150 ตัวอย่าง จากเครื่องหมายเอแอฟแอลพี จำนวน 12 เครื่องหมาย ที่แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 66 ตำแหน่ง โดยการวิเคราะห์ PCA

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนโครงการจัดสรรทุนการศึกษาระดับปริญญาเอก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปี 2554 ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนา บัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2558

6. รายการอ้างอิง

[1] Dej- adisai, S. , Pitakbut, T. and Wattanapiromsakul, C. , 2017, Alpha-glucosidase inhibitory activity and phytochemical investigation of *Borassus flabellifer* Linn, Afr. J. Pharm. Pharmacol. 11: 45-52.

[2] George, J. and Karun, A., 2011, Marker assisted detection of seed sex ratio in palmyrah palm (*Borassus flabellifer* L.), Curr. Sci. (Bangalore) 100: 922-925.

[3] Morton, J.F., 1988; Notes on distribution, propagation, and products of Borassus Palms (Arecaceae), Econ. Bot. 42: 420-41.

[4] Saputro, A.D., van de Walle, D., Aidoo, R. P., Mensah, M.A., Delbaere, C., De Clercq, N, van Durme, J. and Dewettinck, K., 2017, Quality attributes of dark chocolates formulated with palm sap-based sugar as nutritious and natural alternative sweetener, Eur. Food Res. Technol. 243: 177-191.

[5] George, J., Karun, A., Manimekalai, R, Rajesh, M. and Remya, P., 2007, Identification of RAPD markers linked to sex determination in palmyrah (*Borassus flabellifer* L.), Curr. Sci. 93: 1075-1077.

[6] Ruttajorn, K., 2006, Sex Identifying in Palmyra Palm (*Borassus fiabellifer* L.) Using Botanical Characteristics and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Marker, M.S. Thesis, Thaksin University, Songkhla, 74 p.

[7] George, J., Venkataramana, K., Nainar, P., Rajesh, M. and Karun, A., 2016, Evaluation of molecular diversity of *ex situ* conserved germplasm of palmyrah (*Borassus flabellifer* L.) accessions using RAPD markers, J. Plant. Crops 44: 96-102.

[8] Promkaew, R., 2006, Study on Genetic

Relationship in Palmyra Palm (*Borassus flabellifer* Linn.) Populations by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and ISSR (Inter Simple Sequence), M.S. Thesis, Prince of Songkla University, Songkla, 95 p.

[9] Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, Tvd., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J. and Kuiper, M., 1995; AFLP: A new technique for DNA fingerprinting, Nucl. Acids Res. 23: 4407-4414.

[10] Gawel, N. L. A. and Jarnet, R. L., 1991, Modified CTAB DNA extraction procedure of *Musa* and *Lpomoea*, Plant Mol. Bio. Rep. 9: 262-266.

[11] Benbouza, H., Jacquemin, J. M., Baudoin, J.P. and Mergeai, G., 2006, Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels, Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10: 77-81.

[12] Kimura, M. and Crow, J. F., 1964, The number of alleles that can be maintained in a finite population, Genetics 49: 725-738.

[13] Nei, M., 1973, Analysis of gene diversity in subdivided populations, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70: 3321-3323.

[14] Stebbins, G. L. and Lewontin, R., 1972, Comparative evolution at the levels of molecules, organisms and populations, Proceedings of the Sixth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability, Berkeley and Los Angeles, 5: 23-42.

[15] Yeh, F.C., Yang, R.C. and Boyle, T., 1999, POPGENE version 1.32: Microsoft Windows – Based Freeware for Population Genetic Analysis, Quick User Guide, Center for International Forestry Research, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.

[16] Lynch, M. and Walsh, B., 1998, Genetics and Analysis of Quantitative Traits, Sinauer Associates Inc., Sunderland.

[17] Rohlf, J. F., 1998, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Exeter Software, Setauket, New York.

[18] Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R., 1973, Numerical Taxonomy, The Principles and Practice of Numerical Classification, W.H. Freeman, San Francisco.

[19] Staub, J.E., Box, J., Meglic, V., Horejsi, T.F. and McCreight, J.D., 1997, Comparison of isozyme and random amplified polymorphic DNA data for determining intraspecific variation in *Cucumis*, Genet. Res. Crop. Evol. 44: 257-269.

[20] Darroch, J.N. and Mosimann, J.E., 1985, Canonical and Principal Components of Shape, Biometrika, 241-252 p.

[21] Baraket, G., Chatti, K., Saddoud, O., Mars, M., Marrakchi, M., Trifi, M. and Salhi-Hannachi, A., 2009. Genetic analysis of Tunisian fig (*Ficus carica* L.) cultivars using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers, Sci. Hort. 120: 487-492.

[22] Perera, L., Russell, J.R., Provan, J., McNicol, J.W. and Powell, W., 1998, Evaluating genetic relationships between indigenous coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions from Sri Lanka by AFLP profiling, Theor. Appl. Genet. 96: 545-550.

[23] Purba, A.R., Noyer, J.L., Baudouin, L., Perrier, X., Hamon, S. and Lagoda, P.J.L., 2000, A new aspect of genetic diversity of Indonesian oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) revealed by isoenzyme and AFLP markers and its consequences for breeding, Theor. Appl. Genet. 101: 956-961.

[24] Ponnuswami, V., 2010, Genetic diversity in palmyrah genotypes using morphological and molecular markers, Elec. J. Plant Breed. 1: 556-567.

[25] Raju, D.C. and Reji, J.V., 2015, Genetic diversity analysis in palmyra palms using RAPD markers, Int. J. Pharm. Bio. Sci. 6: 244-250.