

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ภูมิหลัง

ตาลโตนด (*Borassus flabellifer* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญชนิดหนึ่งของจังหวัดสงขลา ชาวบ้านนำส่วนต่างๆ ของตาลโตนดมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น น้ำตาลสดจากช่อดอกเถียวเป็นน้ำตาลปีบ น้ำตาลแว่น น้ำตาลปึก น้ำตาลผง เครื่องดื่ม และหมักแปรรูปเป็นน้ำส้มสายชู น้ำตาลแอลกอฮอล์ ผลตาลนำมาเป็นอาหาร สกัดสารแคโรทีนอยด์สำหรับแต่งสีอาหาร เปลือกหุ้มเมล็ดลูกตาลใช้ทำเชื้อเพลิงทางอุตสาหกรรมและเป็นตัวปรับค่าความเป็นกรด – เบสของน้ำ เพื่อใช้ในการเลี้ยงสัตว์น้ำ ช่อดอกเป็นยาสมุนไพรรักษาโรคตาและไซนัส แก้พิษตานซาง แก้อาการร้อนในปากเป็นแผล และขับพยาธิ ตากแห้งเป็นฟืนหรือเชื้อเพลิงสำหรับหุงต้ม ลำต้นทำวัสดุสร้างบ้านและเฟอร์นิเจอร์ โคนต้นนำมาขูดเป็นเรืออีโปง ใบแก้ทำเครื่องจักสานต่างๆ เช่น ตะกร้า หมวก เสื้อ ก้านใบนำมาควั่นทำเชือกใช้ทำงานฝีมือ เช่น กระดาษ แปร และไม้กวาด รากนำมาต้มเป็นยาขับปัสสาวะ ขับเลือด ยาฆ่าล้าง เป็นต้น (ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์, 2537 : 21 - 24)

การศึกษาเกี่ยวกับตาลโตนดส่วนใหญ่ เป็นการศึกษาลักษณะทางสัณฐาน แต่ในการปรับปรุงพันธุ์ จำเป็นต้องใช้ข้อมูลด้านเซลล์พันธุศาสตร์ ขณะเดียวกันเกษตรกรต้องการตาลโตนดเพศเมียมากกว่าเพศผู้ เนื่องจากต้นเพศเมียนั้นที่ติดผล เกษตรกรต้องรอเวลาให้ตาลโตนดอายุ 10 – 15 ปี จึงจะทราบเพศ เนื่องจากการปลูกตาลโตนดในระยะแรกจะเจริญเติบโตช้า โดยเฉลี่ยในแต่ละปีจะมีใบเพิ่มขึ้น 1 ใบ เมื่ออายุ 5 ปี ลำต้นมีความสูงประมาณ 1 เมตร หลังจากนั้นความสูงจะเพิ่มขึ้นปีละประมาณ 30 เซนติเมตร และจะเริ่มออกดอกซึ่งบ่งบอกเพศของตาลโตนด เมื่ออายุประมาณ 10 – 15 ปี ลำต้นมีความสูงประมาณ 4 – 5 เมตร และให้ผลผลิตติดต่อกันเป็นเวลามากกว่า 80 ปี เกษตรกรมีวิธีการสังเกตเพศตาลโตนด โดยพิจารณาจากสัดส่วนของลำต้น คือ ถ้าลำต้นโค้งเว้าเป็นตาลโตนดเพศเมีย ส่วนลำต้นสูงตรงเป็นตาลโตนดเพศผู้ หรือพิจารณาจากการเวียนของใบตาล ถ้าเวียนซ้ายเป็นตาลโตนดเพศผู้ ถ้าเวียนขวาเป็นตาลโตนดเพศเมีย หรือพิจารณาจากลักษณะของเมล็ด คือ เมล็ดที่มีปมด้านในนูนแหลมน้อยกว่าจะเจริญเป็นตาลโตนดเพศเมีย ส่วนเมล็ดที่มีปมด้านในแหลมมากกว่าจะเจริญเป็นตาลโตนดเพศผู้ แต่ข้อมูลพื้นฐานด้านสัณฐานเหล่านี้ไม่สามารถใช้ยืนยันเพื่อระบุเพศอย่างถูกต้องได้ (พรรณิภา โสคติพันธุ์, สอาด สินไชย, ทวีช ปริสงส์, สมปอง ยอดมณี, ไพฑูรย์ ศิริรักษ์ และพรชัย ศรีไพบูลย์, 2547 : 110 - 111) จึงต้องใช้เทคนิคเครื่องหมายดีเอ็นเอยืนยันเพศในระยะต้นกล้า

เทคนิคเอสอาร์เอพี (Sequence – Related Amplified Polymorphism : SRAP) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบสุ่มพัฒนาขึ้นโดย Li และ Quiros ในปี ค.ศ. 2001 โดยการออกแบบไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ชนิด Forward มีขนาด 17 เบส ประกอบด้วยลำดับเบส เรียกว่า Filler ยาว 10 เบส ต่อด้วยเบส CCGG และชนิด Reverse มีขนาด 18 เบส Filler ยาว 11 เบสและแตกต่างจาก Filler ของ forward ต่อด้วยเบส AATT ที่ตำแหน่งปลาย 3' มีเบสคัดเลือก (Selective Base) จำนวน 3 เบสจากไพรเมอร์ที่ออกแบบ ทำให้ตำแหน่งที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในจีโนม มีแนวโน้มเป็นส่วนของยีนที่สนใจประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ (Li and Quiros. 2001 : 455 – 461) ซึ่งมากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบสุ่มชนิดอื่น ทำให้มีโอกาสพบความแตกต่างในลักษณะการเกิดและไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ข้อดีของเทคนิคเอสอาร์เอพี คือ สามารถทำได้อย่างรวดเร็ว มีความแม่นยำ มีแนวโน้มที่จะพบยีนที่สนใจค่อนข้างสูง และราคาค่อนข้างต่ำกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552 : 76 – 78) จึงมีแนวโน้มจะให้แถบดีเอ็นเอที่บ่งชี้เพศตาลโตนด เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกเพศตาลโตนด และช่วยคัดเลือกเพศที่ต้องการปลูกต่อไป ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาจำนวน ชนิดโครโมโซม จัดการีโอไทป์ตาลโตนด และนำเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีมาใช้ในการจำแนกเพศและสายพันธุ์ตาลโตนด

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 จัดการีโอไทป์ตาลโตนด เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางเซลล์พันธุศาสตร์
- 1.2.2 เพื่อบ่งชี้เพศตาลโตนดด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี
- 1.2.3 ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ของตาลโตนดด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

1.3 สมมติฐานงานวิจัย

เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพีสามารถบ่งชี้เพศ ความแตกต่างทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ของตาลโตนดได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

- 1.4.1 ได้ข้อมูลพื้นฐานด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของตาลโตนด
- 1.4.2 สามารถบ่งชี้เพศตาลโตนดด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอฟิได้
- 1.4.3 ทราบความแตกต่างทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ตาลโตนด ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอฟิได้
- 1.4.4 ได้ข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกเพศตาลโตนด เพื่อช่วยในการคัดเลือกเพศที่ต้องการ

1.5 ขอบเขตการวิจัย

- 1.5.1 ศึกษาตัวอย่างเมล็ดตาลโตนดที่เก็บมาจาก สวนตาลโตนด ในจังหวัดสงขลา เพื่อนับจำนวน ชนิดโครโมโซม และจัดการโอไทป์
- 1.5.2 ศึกษาความแตกต่างระหว่างเพศของตาลโตนด ด้วยเทคนิคเอสอาร์เอฟิจากตัวอย่าง ใบอ่อนตาลโตนดจำนวน 17 ตัวอย่าง
- 1.5.3 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ตาลโตนดด้วยโปรแกรม NTsys Version 2.1

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับตาลโตนด

ในประเทศไทยมีชื่อเรียกตาลโตนดที่แตกต่างกันออกไป เช่น ภาคกลางเรียกว่า ต้นตาลโตนด ภาคใต้เรียกว่าต้นโนนด ชาวจังหวัดยะลาและปัตตานีเรียกว่าปอเกาะตา จังหวัดเชียงใหม่เรียกว่าตาลนาหรือปลิดาล ตาลโตนดมีชื่อสามัญว่า Brab Palm, Butia Palm Fan Palm, Lontar Palm หรือ Palmyra Palm ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Borassus flabellifer* L. เป็นพืช วงศ์ปาล์ม (Arecaceae) วงศ์ย่อยคือ Coryphoideae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปแอฟริกาตะวันออก ต่อมา แพร่พันธุ์เข้าไปในกลุ่มประเทศแถบเอเชีย ได้แก่ ประเทศอินเดีย ศรีลังกา พม่า กัมพูชา มาเลเซีย อินโดนีเซียและไทย ในประเทศไทยพบตาลโตนดมากในพื้นที่ภาคกลาง คือ จังหวัดเพชรบุรี ส่วนพื้นที่ภาคใต้ คือ จังหวัดสงขลา ครอบคลุม 6 อำเภอ คือ อำเภอลี้หนคร สทิงพระ กระแสสินธุ์ ระโนด ควนเนียงและรัตภูมิ (พรรณิภา โสคติพันธุ์และคณะ. 2547 : 12)

ตาลโตนดในภาคกลางมี 3 สายพันธุ์ คือ 1. พันธุ์หม้อ (ภาพที่ 1ก) มีผลขนาดใหญ่ ผิวดำ เป็นมันเรียบไม่มีสีอื่นปน ผลแก่มีรอยขีดตามแนวยาวของผล เปลือกหนา มีเมล็ด 2 – 4 เมล็ด ใน 1 ทะลายมีผลประมาณ 10 – 20 ผล ส่วนใหญ่จะให้ผลเมื่ออายุ 10 ปีขึ้นไป ขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของดิน 2. พันธุ์ไข่ (ภาพที่ 1ข) มีผลขนาดเล็ก สีค่อนข้างเหลือง แบ่งออกเป็น 2 สายพันธุ์ คือพันธุ์ไข่เล็ก ผลค่อนข้างเล็ก ใน 1 ทะลาย มีผล 20 – 30 ผล เนื่องจากผลเล็กจึงทำให้เมล็ดมีขนาดเล็กด้วย พันธุ์ไข่ใหญ่ ผลมีขนาดใหญ่กว่าพันธุ์ไข่เล็ก ใน 1 ทะลายมีผล 10 – 20 ผล เมล็ดมีขนาดใหญ่กว่าพันธุ์ไข่เล็ก ใน 1 ผลมี 2 – 3 เมล็ด จะให้ผลเมื่ออายุ 10 ปีขึ้นไปและ 3. พันธุ์ลูกผสม (ภาพที่ 1ค) มีผลขนาดค่อนข้างใหญ่เกือบเท่าตาลโตนดพันธุ์หม้อ ผลมีสีค้ำผสมน้ำตาล (เหลืองดำ) ใน 1 ผลมี 2 – 3 เมล็ด ให้ผลประมาณ 15 – 20 ผลต่อทะลาย เป็นตาลโตนดที่มีจำนวนมากที่สุดในจังหวัดเพชรบุรี ส่วนใหญ่จะให้ผลเมื่ออายุ 15 ปีขึ้นไป (สำนักงานเกษตรจังหวัดเพชรบุรี. สืบค้นเมื่อ 18 สิงหาคม 2553, จาก <http://www.raisathon.com/otop/otop>)

ส่วนในจังหวัดสงขลาตาลโตนดมี 3 สายพันธุ์ คือ 1. พันธุ์กา (ภาพที่ 1ง) มีลักษณะผลรี มีสีดำทั้งผล และผิวแตกลายงาโดยรอบ มีผลขนาดใหญ่ พบมากที่สุดประมาณร้อยละ 85 ในพื้นที่ของจังหวัดสงขลา 2. พันธุ์ข้าว (ภาพที่ 1จ) ผลมีลักษณะกลมป้อม ผิวเรียบเป็นมัน สีน้ำตาลอมเหลือง เนื้อเมล็ดอ่อนมีลักษณะป้อมตามรูปทรงผล มีรสชาติหวานมันกว่าสายพันธุ์อื่น นิยมนำเนื้อมาทำขนม หัวลูกอ่อนมาทำอาหาร ประเภท ยำ แกง คั่ว และต้ม พันธุ์ข้าวค่อนข้างหายากพบประมาณร้อยละ 10 ในพื้นที่ของจังหวัดสงขลา และ 3. พันธุ์ขม้น (ภาพที่ 1ฉ) มีลักษณะผลกลม

ป้อมคล้ายพันธุ์ข้าว ผิวเปลือกนอกแตกลายงาโดยรอบคล้ายพันธุ์กา แต่น้อยกว่า ผิวสีเหลืองอมน้ำตาลเข้ม ส่วนก้นมีสีเหลืองเข้มคล้ายสีขมิ้นภายในขณะยังไม่สุกมีสีเหมือนสีเนื้อขมิ้น พันธุ์ขมิ้นพบน้อยมากประมาณร้อยละ 5 ในพื้นที่ของจังหวัดสงขลา (ไพฑูรย์ ศิริรักษ์. เก็บค้นเมื่อ 16 สิงหาคม 2553, จาก <http://www.gotoknow.org>)

ตาลโตนดชอบอากาศร้อนค่อนข้างแห้งแล้ง ชอบดินทรายหรือดินปนทราย และดินเหนียวที่เปียกแฉะ โดยเฉพาะดินทรายที่น้ำกร่อยท่วมถึง ตาลโตนดจะเจริญเติบโตเร็ว และมีน้ำหวานมาก ตาลโตนดมีวิธีการปลูกดังนี้ วิธีที่ 1 นำผลตาลโตนดสุกมาปอกเปลือกนอกออก ขยำเอาเส้นใยตาลโตนดออกจะได้เมล็ด จึงนำไปใส่ถุงปุ๋ยแช่น้ำทิ้งถุง 5 วัน นำขึ้นมากองไว้บนพื้นดิน ใช้ฟางข้าวมาคลุมทับประมาณ 15 วัน ตาลโตนดจะเริ่มงอก แล้วนำไปปลูกในหลุมขนาด 25 x 25 เซนติเมตร ใส่ปุ๋ยคอกไว้ที่ก้นหลุม วางเมล็ดที่เริ่มงอกลงไป อย่าให้ปลายรากหัก กลบดิน รดน้ำ ประมาณ 30 วัน ต้นอ่อนจะงอกพ้นดิน วิธีที่ 2 นำผลตาลโตนดทั้งผลไปแช่น้ำประมาณ 30 วัน ไม่ควรแช่เกิน 60 วัน อาจทำให้เมล็ดเน่าได้ นำขึ้นมawangกองไว้บนพื้น ใช้ฟางคลุมประมาณ 15 วัน เมล็ดจะเริ่มงอก และวิธีที่ 3 นำผลตาลโตนดสุกทั้งผลไปวางในตำแหน่งที่ต้องการปลูก ขุดหลุมฝังป้องกันสัตว์กัดแทะ วิธีนี้จะใช้เวลานานกว่า 2 วิธีแรก จึงจะได้ต้นตาลโตนดต้นใหม่ (ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. 2537 : 45)



ภาพที่ 1 ลักษณะผลตาลโตนด ก. พันธุ์หม้อ ข. พันธุ์ไข่

ค. พันธุ์ผสม ง. พันธุ์กา จ. พันธุ์ข้าว ฉ. พันธุ์ขมิ้น

(ที่มา : http://www.raisathon.com/otop/otop_detail.php?otop_id=00000000004

และ <http://www.gotoknow.org>)

2.2 ลักษณะพฤกษศาสตร์ของตาลโตนด

2.2.1 รากมีลักษณะเป็นเส้นกลมยาว เป็นกระจุกคล้ายมะพร้าว (ภาพที่ 2ก) แต่หยั่งลึกลงไปดิน ไม่แผ่ไปตามผิวดินเหมือนรากมะพร้าว ทำให้ยึดติดกับดินได้ดี โอกาสที่ต้นตาลจะโค่นล้มหรือถอนรากจึงเป็นไปได้ยาก (ภาพที่ 2ข) (พรรณทิพา โสคติพันธุ์และคณะ. 2547 : 12– 17)

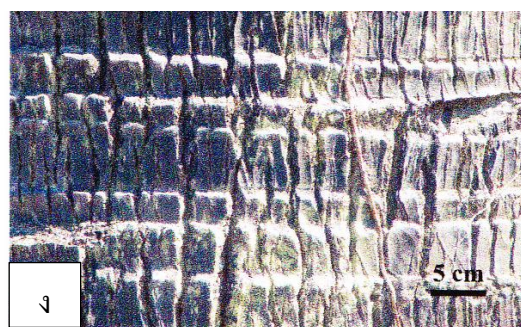
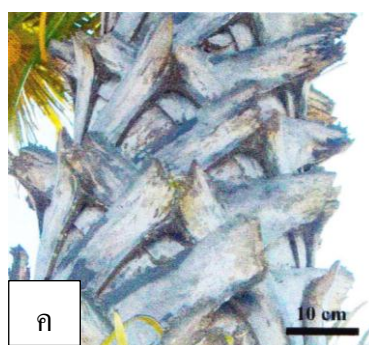
2.2.2 ลำต้นเป็นแบบลำต้นเดี่ยว (Single Stem) สูงประมาณ 25 – 27 เมตร ไม่มีหน่อ โคนต้นมีลักษณะอวบใหญ่ และเรียวเล็กลงเมื่อสูงเหนือจากระดับพื้นดินขึ้นไปประมาณ 4 เมตร (ภาพที่ 3ก) เปลือกลำต้นขรุขระเป็นวงซ้อนๆกัน เพราะใบที่หลุดออกไป มีเส้นสีดำ แข็งและเหนียวมาก (ภาพที่ 3ค และ 3ง) แต่ไส้กลางลำต้นอ่อน (ภาพที่ 3ข)

2.2.3 ใบเป็นใบประกอบสีเขียวเข้ม ลักษณะคล้ายฝ่ามือหรือรูปพัด (Palmate Leaf หรือ Fan Leaf) รัศมีประมาณ 4 เมตร ความกว้างขอบใบ 50 – 70 เซนติเมตร ขอบใบหยักคล้ายฟันเลื่อย ใบย่อยเรียกว่าเซกเมนต์ (Segment) (ภาพที่ 4ก และ 4ข) ซึ่งแตกออกจากจุดเดียวกันที่ปลายก้านใบ ยอดตาลโตนดมีใบประมาณ 25 – 40 ใบ ขึ้นอยู่กับอายุของตาลโตนด ถ้าใบแก่จะมีสีน้ำตาลอ่อน และห้อยแนวลำต้นคลุมบริเวณยอดตาล (ภาพที่ 4ค) แต่ละใบมีอายุไม่เกิน 3 ปี ตาลโตนดต้นหนึ่งๆ ให้ใบตาลได้ 12 – 15 ใบต่อปี ส่วนที่เป็นก้านใบหรือทางตาลโตนดยาวประมาณ 1 – 2 เมตร ก้านใบมีความแข็งแรง ทางตาลโตนดจะหนาโค้งตามความยาว และมีหนามแหลม ลักษณะเป็นฟันเลื่อย ขนาดไม่สม่ำเสมอทั้งสองด้าน



ภาพที่ 2 ลักษณะรากตาลโตนด

(ที่มา : <http://www.gotoknow.org/blog/palmseed/250420>)

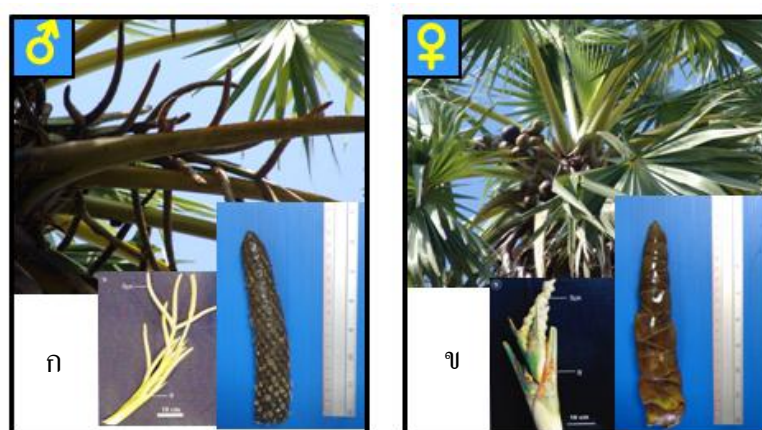


ภาพที่ 3 ลักษณะลำต้นตาลโตนด



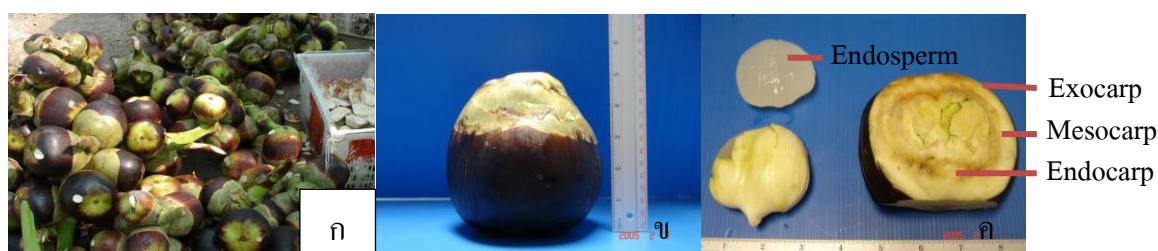
ภาพที่ 4 ลักษณะใบตาลโตนด

2.2.4 ดอก ตาลโตนดมีดอกแบบดอกช่อ โดยดอกเพศผู้และดอกเพศเมียแยกกัน คนละต้น ช่อดอกเพศผู้เรียกว่างวงตาล ยาวประมาณ 1.5 – 2 เมตร แดกแขนงออกเป็น 2 – 4 งวง ต่อท้ายช่อ (ภาพที่ 5ก) ส่วนช่อดอกเพศเมียเรียกว่าปลีตาล มีดอกย่อยประมาณ 10 – 15 ดอก ช่อดอกของต้นเพศเมียจะออกช่อดอกหลังต้นเพศผู้ แต่ช่อดอกต้นเพศเมียมีขนาดใหญ่ ชุ่มน้ำหวาน มากกว่าช่อดอกเพศผู้ และช่อดอกเพศเมียพัฒนาเป็นทะลายติดผล (ภาพที่ 5ข)



ภาพที่ 5 ลักษณะช่อดอกตาลโตนด ก. เพศผู้ ข. เพศเมีย

2.2.5 ผลและเมล็ด ตาลโตนดเป็นผลเดี่ยว ติดผลเป็นทะลาย ทะลายละ 10 – 15 ผล (ภาพที่ 6ก) ขณะที่เป็ผลอ่อนมีสีเขียว เมื่อเริ่มสุกมีสีม่วงและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีดำ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ (ภาพที่ 6ข) ส่วนประกอบที่สำคัญของผลมี 3 ส่วนคือ ชั้นนอกสุด เป็นเปลือกมีผิวเรียบเป็นมันเรียกว่า Exocarp ชั้นกลาง เป็นส่วนของเส้นใยสด ละเอียดเรียกว่า Mesocarp และชั้นใน เป็นเปลือกหรือกะลาแข็งหุ้มเมล็ดเรียกว่า Endocarp (ภาพที่ 6ค) ซึ่งเมล็ดจะมีขนาดและรูปร่างสัมพันธ์กับขนาดและรูปร่างของผล



ภาพที่ 6 ก.และ ข. ผล ค. เมล็ดตาลโตนด

2.3 การใช้ประโยชน์จากตาลโตนด

2.3.1 ประโยชน์ด้านอาหาร

ช่อดอกเพศผู้แตกแขนงออกเป็นวงตาล และช่อดอกเพศเมียเรียกว่าปลีตาล จะให้น้ำหวาน เรียกว่าน้ำตาลใสหรือน้ำตาลสด นำไปเคี่ยวไฟจนได้น้ำตาลเข้มข้นในรูปแบบต่างๆ เช่น น้ำผึ้ง น้ำตาลปี๊บ น้ำตาลปึก น้ำตาลแว่น และน้ำตาลผง หากนำน้ำตาลสดไปหมักแปรรูป จะได้ น้ำส้มสายชู ผลตาลอ่อนๆ เนื้อลูกตาลด้านติดขั้วเรียกว่าหัวตาล นำมาปอกเปลือกออกเอาเฉพาะเนื้อข้างใน ใช้ทำแกงหัวตาลและผักจิ้มน้ำพริก ในผลตาล มีเมล็ดเรียกว่าลูกตาลสด ใช้กินสดๆ หรือนำไปลอยแก้วเป็นของหวาน ส่วนเนื้อผลตาลมีสีเหลืองสด เมื่อเอาเส้นใยออก นำมาคั้นจะได้น้ำสีเหลือง มีกลิ่นหอม นิยมนำมาใช้แต่งสีขนมต่างๆ เช่น ขนมตาล ขนมเค้ก ขนมจีบ ไข่ทอด ไข่ต้ม เมล็ดตาล หากนำไปเพาะ เมื่อเริ่มงอก ส่วนใบเลี้ยงจะเริ่มพัฒนาเรียกว่าจาวตาล นำไปเชื่อมกับน้ำตาลทรายเป็นจาวตาลเชื่อม กินกับข้าวเหนียวมูล หรือนำมาชุบแป้งทอดเรียกว่าโตนดทอด เป็นของกินเล่นหรือนำไปแกงส้ม

2.3.2 ประโยชน์ด้านแพทย์แผนโบราณ

ช่อดอกต้มน้ำกินแก้โรคตานขโมยในเด็ก แก้พิษตานซาง แก้อาการร้อนใน ปากเป็นแผล และขับพยาธิ ช่อดอกเพศผู้ใช้เป็นยาขับปัสสาวะ เมื่อนำมาตากแห้ง แล้วคั้นกับส่วนผสมอื่นๆ จะได้ ยาบำรุงกำลัง รากนำมาต้มน้ำ เป็นยาขับปัสสาวะ ยาชูกำลัง ขับเลือด แก้พิษตานซาง ก้านใบหรือทางตาล นำมาขยำไฟและคั้นเอาน้ำ ใช้แก้อาการท้องร่วงและแก้ปวดเมื่อย ลูกตาลแก้กระหายน้ำ ช่วยลดอุณหภูมิความร้อนในร่างกาย แก้ไข้ตัวร้อน ละลายเสมหะ บรรเทาอาการไอเรื้อรัง

2.3.3 ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรมก่อสร้างและเฟอร์นิเจอร์

ใบแก่ ใช้มุงหลังคาบ้านได้ดี ลำต้น ก้านใบหรือทางตาล นำมาทำเก้าอี้ โต๊ะ ฝ้ายบ้าน เฟอร์นิเจอร์ เครื่องตกแต่งบ้าน ทำเชือก ดันตาลแก่ใช้ทำเสาบ้าน โคนต้นตาลใช้ทำเรืออีโปง ลูกตาลนำมาเผาจนได้เป็นถ่านผลไม้ดูดกลิ่น

2.3.4 ประโยชน์ด้านงานหัตถกรรม

ใบตาลอ่อนนำมาจักสานเป็นตะกร้า หมวก เสื่อ กระเป๋า พัด เส้นใยใช้ทำกระดาด ไม้กวาด เชือก มุงหลังคา ไม้ตาลใช้ทำของใช้ภายในบ้านและของชำร่วย เช่น กาน้ำ กำไลข้อมือ แก้วไวน์ พวงกุญแจ กรอบรูป ซ้อนส้อม ตะเกียบ ที่รองแก้ว ถ้วยกาแฟ กล่องตะเกียบ ตะหลิว ทัพพี ที่ปักรูปงาน ไม้เกาหลัง ไม้ตีพริก ใบตาลแก่ใช้ทำพัดขนาดใหญ่เรียกว่าตาลปัตร เพื่อบูชาพระภิกษุ

2.3.5 ประโยชน์ด้านการเกษตร

เมล็ดตาลหรือลูกตาลสดใช้เป็นอาหารเลี้ยงวัว เส้นใยโคนทางตาลใช้ทำเชือกมัดสัตว์เลี้ยง ก้านใบใช้ทำรั้วคอกสัตว์ ใบตาลและทุกส่วนของต้นตาลใช้ทำปุ๋ยพืชสด ลำต้นใช้ทำท่อระบายน้ำในพื้นที่การเกษตร ต้นตาลเผาเป็นถ่านเพิ่มธาตุอาหารให้แก่ดิน ใช้ทำเสาทำเทียบเรือหรือสะพานปลา เพราะลำต้นแข็งแรง เนื้อไม้แช่อยู่ในน้ำได้นาน ไม่ผุง่าย ทนแดด ทนฝนและลดการเสียดสีได้ดี (ไพฑูรย์ ศิริรักษ์, 2551 : 17 - 81) (ภาพที่ 7)



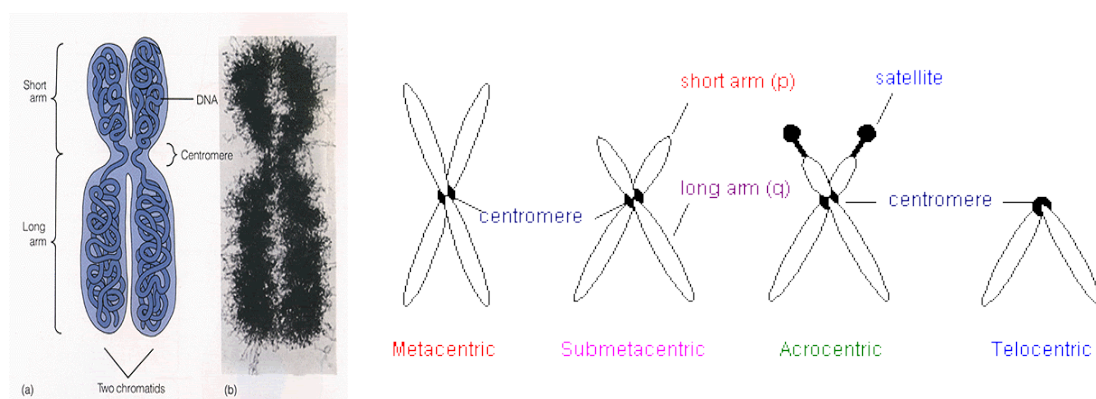
ภาพที่ 7 ผลิตภัณฑ์จากตาลโตนด ก. น้ำตาลสด ข. ขนมตาล ค. เครื่องจักสาน ง. รั้วคอกสัตว์
(ที่มา : <http://www.gotoknow.org/blog/kroothoon97/435145>)

2.4 โครโมโซมและคาร์ิโอไทป์

โครโมโซม (Chromosome) คือโครงสร้างที่อยู่ในนิวเคลียสของเซลล์ เป็นที่บรรจุของยีน มีนิวคลีโอโปรตีน (Nucleoprotein) ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษชนิดที่เป็นค่า สามารถตรวจเห็นได้ชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเซลล์อยู่ในระยะของการแบ่งเซลล์ โครโมโซมของสิ่งมีชีวิตในสปีชีส์เดียวกันจะมีลักษณะและจำนวนโครโมโซมเหมือนกัน และมีความแตกต่างกันระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างสปีชีส์

โครโมโซมสามารถจำแนกได้ 4 รูปแบบ (อมรา คัมภีรานนท์, 2546 : 34) โดยใช้ตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ (Centromere) เป็นเกณฑ์ในการจำแนก ดังนี้ (ภาพที่ 8)

1. โครโมโซมแบบเมทาเซนตริก (Metacentric Chromosome) คือ โครโมโซมระยะเมทาเฟส (Metaphase) มีตำแหน่งเซนโทรเมียร์อยู่กึ่งกลางของโครโมโซม ทำให้แขนสองข้างยาวเท่ากันและปรากฏรูปร่างเหมือนตัววี (V) ในขณะที่โครโมโซมอยู่ในระยะแอนาเฟส (Anaphase)
2. โครโมโซมแบบซับเมทาเซนตริก (Submetacentric Chromosome) คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโทรเมียร์ค่อนข้างไปด้านใดด้านหนึ่งของโครโมโซม มีผลทำให้แขนทั้ง 2 ข้างยาวไม่เท่ากัน จึงมีการกำหนดสัญลักษณ์ของแขนข้างสั้น คือ p และแขนข้างยาว คือ q โครโมโซมแบบนี้ในระยะแอนาเฟสมีรูปร่างเหมือนตัวเจ (J) หรือแอล (L)
3. โครโมโซมแบบอะโครเซนตริก (Acrocentric Chromosome) คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโทรเมียร์อยู่เกือบปลายสุดของโครโมโซม ทำให้แขนข้างยาวมีความยาวมากกว่าแขนข้างสั้นมาก
4. โครโมโซมแบบเทโลเซนตริก (Telocentric Chromosome) คือ โครโมโซมที่มีตำแหน่งเซนโทรเมียร์ อยู่ปลายสุดของโครโมโซม มีผลทำให้โครโมโซมมีแขนเพียงข้างเดียว

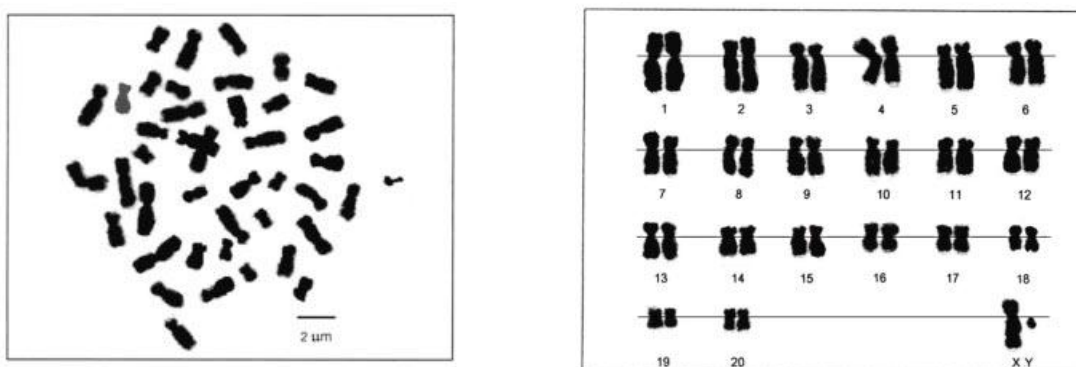


ภาพที่ 8 โครงสร้างและรูปแบบโครโมโซม

(ที่มา : Bloggang. Retrieved August18, 2010, from <http://www.bloggang.com>)

คาริโอไทป์ (Karyotype) หมายถึง การนำเอาโครโมโซมแต่ละแท่ง จากเซลล์ในระยะเมทาเฟสเพียงเซลล์เดียว มาจัดเรียงเป็นคู่ๆ ของโครโมโซมคู่เหมือน และเรียงลำดับตามขนาด จากคู่ที่มีขนาดใหญ่จนถึงคู่ที่มีขนาดเล็ก การวางโครโมโซมจะวางให้แขนข้างสั้นของโครโมโซมตั้งขึ้น และตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ตรงกัน ตัวอย่างเช่น การจัดคาริโอไทป์ของลิงกัง (อลองกลดแทนออมทอง, สัมภาษณ์ คุณสุข, วิวรรณ แก่นสาและเรืองวิทย์ บรรจงรัตน์. 2005 : 1 - 11 (ภาพที่ 9)) การศึกษาคาร์ิโอไทป์ต้องอาศัยเวลาและความอดทน แต่มีประโยชน์ ดังนี้

1. ช่วยจัดจำแนกชนิดของพืช เพราะปกติคาร์ิโอไทป์จะคงที่ในสปีชีส์เดียวกัน แต่อาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ระหว่างที่มีวิวัฒนาการ
2. ช่วยนักอนุกรมวิธานในการหาความสัมพันธ์ และความเป็นมาของสปีชีส์
3. ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช
4. ใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการของพืช (อมรา คัมภีรานนท์. 2546 : 258 - 259)



ภาพที่ 9 ตัวอย่างการจัดคาร์ิโอไทป์ของลิงกัง

(ที่มา : อลงกลด แทนอมทอง, สัมภาษณ์ คุณสุข, วิวรรธน แก่นสา

และเรืองวิทย์ บรรจงรัตน์. 2005 : 1 - 11)

อัจฉริยา รังษิรุจิ, ฐปวีตรา ผ่องแผ้ว และรัชชดอนสกุล (2549 : 49 – 61) ศึกษาโครโมโซมของพืชสกุล *Salacca* จำนวน 6 สายพันธุ์ โดยเตรียมโครโมโซมจากปลายราก แช่ใน PDB 9 – 12 ชั่วโมงและย้อมด้วยสีกิมซา 1–2 ชั่วโมง พบว่าพืชสกุลละกำกับ 6 สายพันธุ์ มีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 28$ โดยมีคาร์ิโอไทป์และจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (Fundamental Number : NF) แตกต่างกัน คือ ะกำ มีคาร์ิโอไทป์ประกอบด้วย $10m + 1sm + 1st + 2t$ คู่ จำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 52 ส่วนสละเนินวง, สละหม้อ, สละสายน้ำผึ้ง, สละพอนโด และสละบาหลี มีคาร์ิโอไทป์ประกอบด้วย $11m + 3sm$ คู่, $12m + 1sm + 1st$ คู่, $9m + 2sm + 3st$ คู่, $13m + 1sm$ คู่, $11m + 2sm + 1st$ คู่ ตามลำดับ จำนวนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากันทั้ง 5 สายพันธุ์ คือ 56 นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างระหว่างโครโมโซมของสละที่พบในประเทศไทยและประเทศอินโดนีเซีย คือโครโมโซมของสละพอนโด และสละบาหลี พบแซทเทลไลท์ที่ปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซม 1 คู่ ซึ่งไม่ปรากฏในระกำ สละเนินวง สละหม้อ และสละสายน้ำผึ้ง

Maria, Clyde and Cheah (1995 : 122 – 134) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis* L.) พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 32$ แบ่งโครโมโซมโดยใช้ขนาดเป็น

เกณฑ์ได้ 3 กลุ่ม คือกลุ่มโครโมโซมขนาดใหญ่ ได้แก่ คู่ที่ 1 กลุ่มโครโมโซมขนาดกลาง ได้แก่ คู่ที่ 2 – 9 และโครโมโซมขนาดเล็ก ได้แก่ คู่ที่ 10 – 16

Moro, Silver and Geraldo (1999 : 225 – 228) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชวงศ์ปาล์ม 5 ชนิด พบว่า *Aiphanes acanthophylla* มีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 30$, *A. aryotaefolia* มีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 30$, *Syagrus coronata* มีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 32$ *S. quinquifolia* มีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 32$ และ *Scheelea lauromuelleriana* มีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 32$ ซึ่งพบว่าพืชทั้ง 5 ชนิดมีจำนวนโครโมโซมใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง $2n = 2x = 30$ และ $2n = 2x = 32$

Roser (1994: 83 – 122) ศึกษาและเปรียบเทียบจำนวนโครโมโซมและคาริโอไทป์ของพืชวงศ์ปาล์ม (Arecaceae) จากพืช 56 ตัวอย่างใน 6 Subfamilies พบว่าใน Subfamily Coryphoideae มีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ $2n = 2x = 28$ ถึง $2n = 2x = 36$ Subfamily Calamoideae มีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ $2n = 2x = 26$ ถึง $2n = 2x = 36$ Subfamily Ceroxyloideae มีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ $2n = 2x = 26$ ถึง $2n = 2x = 34$ และใน Subfamily Arecoideae มีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ $2n = 2x = 28$ ถึง $2n = 2x = 36$

AbdAlla and Abd El-Kawy (2010 : 165 – 170) ศึกษาโครโมโซมของอินทผาลัม (*Phoenix dactylifera* L.) อยู่ใน Subfamily Coryphoideae ซึ่งเป็น Subfamily เดียวกับตาลโตนด อินทผาลัมมีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 36$ โดยมีโครโมโซม 3 แบบ คือ โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก ได้แก่ โครโมโซมที่ 2 – 6 โครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก ได้แก่ โครโมโซมคู่ที่ 11 – 17 และโครโมโซม Y ส่วนโครโมโซมที่ 1, 7 – 10 และโครโมโซม X เป็นโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก

2.5 การกำหนดเพศในพืชดอก

พืชดอกส่วนใหญ่ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นดอกสมบูรณ์เพศ (Perfect Flower หรือ Hermaphrodite) คือ ดอกที่มีทั้งโครงสร้างที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Staminate) และสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (Pistillate) อยู่ในดอกเดียวกัน อีกประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นพืชที่มีดอกแยกเพศ (Unisexual Flower) ซึ่งวิวัฒนาการเป็นพืช 2 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 เป็นพืชที่มีดอกแยกเพศอยู่บนต้นเดียวกัน (Monoecious) แบ่งเป็น 3 รูปแบบคือ

1. พืชที่มีดอกสมบูรณ์เพศ และดอกเพศเมียอยู่บนต้นเดียวกัน (Gynomonoecy) เช่น

Poa spp.

2. พืชที่มีดอกสมบูรณ์เพศและดอกเพศผู้อยู่บนต้นเดียวกัน (Andromonoecy) เช่น *Cucumis melo*
3. พืชที่มีดอกสมบูรณ์เพศ ดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่บนต้นเดียวกัน (Trimonoecy) เช่น *Dimorphotheca pluvialis*

กลุ่มที่ 2 เป็นพืชที่ดอกแยกเพศอยู่คนละต้น (Dioecious) แบ่งเป็น 3 รูปแบบคือ

1. พืชที่มีดอกสมบูรณ์เพศ และดอกเพศเมียอยู่แยกคนละต้น (Gynodioecy) เช่น *Plantago coronopus*
2. พืชที่มีดอกสมบูรณ์เพศ และดอกเพศผู้อยู่แยกคนละต้น (Androdioecy) เช่น *Datisca glomerata*
3. พืชที่มีดอกสมบูรณ์เพศ ดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่แยกคนละต้น (Trioecy หรือ Subdioecy) เช่น *Pachycereus pringlei* (Ainsworth, 2000 : 211 – 221)

ระบบกำหนดเพศในพืชมีหลายรูปแบบดังนี้

1. ระบบโครโมโซม

1.1 ระบบกำหนดเพศแบบ Male Heterogametic Sex หรือ Female Homogametic Sex คือ เพศผู้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ 2 ชนิด คือ เซลล์สืบพันธุ์ที่มีโครโมโซมเพศเป็น X และ Y ส่วนเพศเมียสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ 1 ชนิด คือ เซลล์สืบพันธุ์ที่มีโครโมโซมเพศเป็น X เช่น *Rumex angiocarpus*, *Silene dioica* (*Melandrium rubrum*), มะละกอ (*Carica papaya*) และหน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) (Ming, Wang, Moore and Paterson, 2007 : 141 - 150)

1.2 ระบบกำหนดเพศแบบ Female Heterogametic Sex หรือ Male Homogametic Sex คือ เพศผู้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ 1 ชนิด คือ เซลล์สืบพันธุ์ที่มีโครโมโซมเพศเป็น X ส่วนเพศเมียสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ 2 ชนิด คือ เซลล์สืบพันธุ์ที่มีโครโมโซมเพศเป็น X และ Y เช่น *Fragaria elatior* (Hardenack and Grant, 1997 : 130 – 136)

1.3 ระบบกำหนดเพศแบบอัตราส่วนระหว่างจำนวนโครโมโซม X และโครโมโซมร่างกาย (X – to – Autosome (A) Balance System) เช่น *Humulus lupulus*, *Humulus japonicas* และ *Cannabis sativa* (Ming et al. 2007 : 404 - 408)

1.4 ระบบกำหนดเพศโดยจำนวนโครโมโซม เช่น *Phoradendron flavescens* และ *Phoradendron villosum* เพศผู้มีจำนวนโครโมโซมมากกว่าเพศเมีย (Ainsworth, 2000 : 211 – 221), (Ming et al. 2007 : 404 - 408)

2. ระบบฮอร์โมน คือ ระดับของฮอร์โมนมีผลต่อการแสดงออกของเพศ เช่น ฮอร์โมนออกซินและไซโตไคนินมีผลต่อการแสดงออกของเพศในข้าวโพด (*Zea mays*), แตงกวา (*Cucumis sativa*) (Tanurdzic and Banks. 2004 : 561 – 571) ฮอร์โมนจิบเบอเรลลินชักนำให้เกิดการสร้างดอกเพศผู้ได้ในข้าวโพด (Parkinson, Gross and Hollick. 2007 : 462 – 473)
3. กำหนดเพศด้วยฟีโรโมน เช่น *Ceratopteris richardii* (Juarez and Banks. 1998 : 68 – 72)
4. การกำหนดเพศโดยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ความเข้มของแสง ช่วงเวลาระหว่างวัน อุณหภูมิและแร่ธาตุ เช่น ข้าวโพดและแตงกวา (Ming et al. 2007 : 404 - 408)
5. การกำหนดเพศด้วยยีน เช่น มะละกอกควบคุมโดยยีน 1 ตำแหน่งแบบมัลติเปิลอัลลีล (Multiple Allele) ซึ่งมี 3 อัลลีล คือ M1, M2 และ m โดย Hofmeyr หรือ M, M^h และ m โดย Storey M^h คือ อัลลีลที่ควบคุมลักษณะกะเทย (Hermaphrodite Allele) ส่วน M และ m คือ อัลลีลที่ควบคุมลักษณะเพศผู้ (Male Allele) และเพศเมีย (Female Allele) ดังนั้น มะละกอพศผู้มีจีโนไทป์เป็น Mm มะละกอพศเมียมีจีโนไทป์เป็น mm และมะละกอกะเทยมีจีโนไทป์เป็น M^hm ส่วนจีโนไทป์แบบ MM, M^hM^h หรือ M M^h มะละกอกะตาย (Ming, Yu and Moore. 2007 : 401 – 408) ซึ่งตำแหน่งของแอลลีลอยู่บนยีนเดียวกันคือ *SexI*

2.6 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมในนิวเคลียส (Nuclear DNA) หรือในออร์แกเนลล์ คือ ไมโทคอนเดรีย (Mitochondrial DNA) และคลอโรพลาสต์ (Chloroplast DNA) เครื่องหมายดีเอ็นเอเหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมได้ เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (Variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอหรือเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (Polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545 : 24)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ สามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆ ได้ 2 ประเภท คือ

1. Hybridization – Based Marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าสู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (Probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน (Hybridization) ตัวอย่างได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP Marker)

2. PCR – Based Marker เป็นเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวดีเอ็นเอ หรือเทคนิคพีซีอาร์ (PCR : Polymerase Chain Reaction Technique)

เทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคนิคการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ค้นพบโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ. 1980 เทคนิคนี้เป็นการจำลองดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงและสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการเป็นจำนวนมากภายในเวลาเพียง 2 – 3 ชั่วโมง เทคนิคพีซีอาร์มี 3 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการแยกดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยว (Denaturation) เป็นขั้นตอนที่ดีเอ็นเอต้นแบบถูกทำให้แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว 2 สาย เพื่อเปิดโอกาสให้ไพรเมอร์เข้าไปจับกับบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณบนสายดีเอ็นเอต้นแบบ ขั้นตอนการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (Annealing) เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวท่อนสั้นๆ จะเข้าจับกับบริเวณที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ และขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ (Extension) เป็นขั้นตอนที่เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสเติมนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิดเข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ โดยมีลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ตามเบสที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ สายดีเอ็นเอที่ได้จะยาวขึ้น ปฏิบัติทั้ง 3 ขั้นตอนจะดำเนินไปตามโปรแกรมจำนวนรอบของอุณหภูมิที่ตั้งค่าไว้ ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์ทำให้เกิดเทคนิคใหม่ๆ ทางพันธุศาสตร์โมเลกุล ในการวิเคราะห์จีโนม (ปรีชา ประเทพา. 2543 : 45 – 50) เช่น เทคนิคอาร์เอฟดี (RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA) เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism) เทคนิคเอ็มพี พีซีอาร์ (MP – PCR : Microsatellite – Primed PCR) เทคนิคไอเอสเอสอาร์ (ISSR : Inter Simple Sequence Repeat) เทคนิคเอสอาร์เอฟพี (SRAP : Sequence – Related Amplified Polymorphism) เทคนิคทีอาร์เอฟพี (TRAP : Target Region Amplification Polymorphism) เทคนิคเอสซีอาร์ (SCAR : Sequence Characterized Amplified Region) (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552 : 73 - 80)

เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถใช้จำแนกเพศพืชได้ เช่น เทคนิคอาร์เอฟดี ใช้จำแนกเพศของมะละกอ (Urasaki, Tokumoto, Tarora, Ban, Kayano, Tanaka, Oku, Chinen and Terauchi. 2002 : 281 – 285) พบเครื่องหมาย PSDM (Papaya Sex Determination Marker) ที่มีขนาด 450 คู่เบสในการระบุเพศของมะละกอ ซึ่งพบในมะละกอเพศผู้และกะเทยเท่านั้น เทคนิคอาร์เอฟดียังใช้ในการศึกษาพืชอื่นอีกหลายชนิด เช่น *Pistacia vera* (Hormaza, Dollo and Polito. 1994 : 349 – 358) *Cannabis sativa* L. (Mandolino, Carboni, Forapani, Faeti and Ranalli. 1999 : 86 – 92) ตาลโตนด (Karun, George, Manimekalai, Rajesh and Remya. 2007 : 1075 – 1077) *Simmondsia chinensis* (Agrawal, Sharma, Gupta, Kumar and Prasad. 2007 : 207 – 210)

Commiphora wightii (Samantaray, Geetha, Hidayath and Maiti. 2009 : 95 – 99) ส่วนเทคนิคเอเอฟแอลพี ใช้จำแนกเพศของ *Rumex acetosa* (Rahman and Ainsworth. 2004 : 160 – 169) หน่อไม้ฝรั่ง (Reamon – Buttner, Schondelmaier and Jung. 1998 : 91 – 98) *Cannabis sativa* L. (Peil, Flachowsky, Schumann and Weber. 2003 : 102 – 109) นักวิจัยหลายกลุ่มใช้เทคนิคไอเอสเอสอาร์ เพื่อจำแนกเพศของอินทผาลัม (*Phoenix dactylifera*) (Younis, Ismail and Soliman. 2008 : 278 – 284) *Simmondsia chinensis* (Sharma, Agrawal, Gupta, Kumar and Prasad. 2008 : 239 – 243) เทคนิคเอสซีเออาร์ มีการนำไปใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างเพศในพืชหลายชนิด เช่น มะละกอ Deputy, Ming, Ma, Liu, Fitch, Wang, Manshardt and Stiles (2002 : 107 – 111) พบว่าไพรเมอร์ SCAR T12 และ SCAR W11 สามารถแยกความแตกต่างของเพศมะละกอได้ โดยทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 800 คู่เบสในมะละกอเพศผู้ และกะเทย Lemos, Silva and Zaidan (2002 : 179 – 184) พบว่า PKBT-5 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 320 คู่เบสได้ในเพศผู้และเพศกะเทย และใช้เทคนิคนี้ในพืชอื่นๆอีก เช่น *Pistacia vera* L. (Yakubov, Barazani and Golan – Goldhirsh. 2005 : 473 – 478) *Salix viminalis* L. (Gunter, Roberts, Lee, Larimer and Tuskan. 2003 : 185 – 189) *Ginkgo biloba* L. (Liao, Liu, Dai, Li, Xie, Chen, Yin and Qiu. 2009 : 49 - 55)

2.7 เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบคู่ที่มีแนวโน้มนำเป็นส่วนที่ยีนมากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบคู่ชนิดอื่น โดยการออกแบบไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ชนิด Forward มีขนาด 17 เบส และ Reverse มีขนาด 18 เบสแต่ละไพรเมอร์ประกอบด้วยลำดับเบสแกน ซึ่งมีความแตกต่างกันระหว่าง Forward และ Reverse คือ Forward ประกอบด้วยลำดับเบสปกติ เรียกว่า Filler ยาว 10 เบส ต่อด้วยเบส CCGG เพื่อใช้จับกับส่วนเอกซอน (Exon) หรือ ORF (Open Reading Frame) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลำดับเบส GC สูง (GC Rich) ส่วน Reverse มี Filler ยาว 11 เบส และแตกต่างจาก Filler ของ Forward ต่อด้วยเบส AATT เพื่อให้จับได้กับดีเอ็นเอในจีโนมบริเวณที่มีลำดับเบส AT สูง (AT Rich) มักพบในส่วนของอินตรอน (Intron) และโปรโมเตอร์ (Promoter) ของยีน ที่ปลาย 3' ของลำดับเบสแกนมีเบสคัดลอก จำนวน 3 เบสที่เปลี่ยนแปลงได้ อาศัยหลักการเดียวกับการออกแบบไพรเมอร์ของเครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพี จากไพรเมอร์ที่ออกแบบ ทำให้ตำแหน่งที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในจีโนม

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้วิธี Step Up PCR คือใช้อุณหภูมิในขั้นตอนการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบที่อุณหภูมิระดับต่ำ คือ 35 องศาเซลเซียส จำนวน 5 รอบ เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับ

ดีเอ็นเอเป้าหมายได้ดี แล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นอยู่ที่ระดับ 50 องศาเซลเซียสอีก 30 – 35 รอบ เพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่มาจาก 5 รอบแรกเท่านั้น หลังจากนั้นตรวจสอบผล ด้วยเจลโพลีอะครีลาไมด์ (Denaturing Polyacrylamide Gel) และตรวจสอบผลในรูปของการมี หรือไม่มีแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ตรงกัน (สุรินทร์ ปิยะ โขฌกุล.2552 : 76 – 78)

เทคนิคเอสอาร์เอพี นำไปใช้ในการหาความแตกต่างทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิด เช่น มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*), ข้าว (*Oryza sativa*), ผักกาด (*Lactuca sativa*), กะหล่ำปลี (*Brassica rapa*), Rapeseed (*Brassica napus*), กระเทียม (*Allium sativum*), แอปเปิ้ล (*Malus x domestica*) และคื่นฉ่าย (*Apium graveolens*) (Li and Quiros. 2001 : 455 – 461) ทำให้ค้นพบยีนต่างๆ เช่น ยีนที่ทำให้กะหล่ำปลีเพศผู้เป็นหมันและยีนต้านทานไวรัสในคื่นฉ่าย คลรัชต์ สูดหล้า, ปรียา พวงสำลี หวังสมนึก, พิเชษฐศักดิ์ ศรีวงศ์, พินิจ หวังสมนึก, สนั่น จอกลอย และอาร์นัต พัฒโนทัย (2553 : 476 – 481) ศึกษาพันธุกรรมแก่นตะวัน จำนวน 47 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี พบว่ามี 9 คู่ไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 24.33 แถบ มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเฉลี่ย 21.11 แถบ โดยมีขนาด 95 – 2,000 คู่เบส ค่า Polymorphic Information Content (PIC) มีค่าเฉลี่ย 0.955 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถแบ่งแก่นตะวัน 47 พันธุ์ออกเป็น 7 กลุ่ม Zhao, Fang, Pan, Yang, Chung and Park. (2009 : 2604 – 2610) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมของ Mulberry โดยใช้ไพรเมอร์ 12 คู่ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 83 แถบ มีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 59 แถบ คิดเป็น 71.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่า PIC เท่ากับ 0.1353 มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.6905 – 0.9524 เฉลี่ย 0.8330 Uzun, Gulsen, Seday, Bircan and Yilmaz. (2010 : 5396 – 5404) วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Prunus armeniaca* L. โดยใช้ไพรเมอร์ 16 คู่ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 87 แถบ เป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 63 แถบ คิดเป็น 73 เปอร์เซ็นต์ มีค่าดัชนีความเหมือนระหว่าง 0.77 – 0.97

Wenshan, Xiaodong and Youling. (2008 : 688 – 691) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี จำแนกเพศ *Ficus pumila* L. เพื่อคัดเลือกเพศของพืชชนิดนี้ในระยะต้นกล้า ทำให้ไม่เสียเวลาในการจัดการปลูก เพราะ *Ficus pumila* L. เพศเมียจะให้ผล ซึ่งมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ แต่ต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 3 – 5 ปี จึงจะทราบเพศ จึงใช้เทคนิคเอสอาร์เอพี พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 153 คู่ไพรเมอร์ และใช้ไพรเมอร์แบบ 3 ไพรเมอร์ จำนวน 1,500 ชุด พบว่าไพรเมอร์ me1 / em2 / em14 ให้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเพศเมียขนาดประมาณ 230 คู่เบส จึงให้ชื่อว่า FPme1 – em2 – em14 230 นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคเอสอาร์เอพีในการจำแนกเพศของ *Buchloe dactyloides* Nutt. โดยใช้ตัวอย่างเพศผู้ 8 ตัวอย่าง เพศเมีย 8 ตัวอย่าง ทำเอสอาร์เอพี พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ 228 คู่ไพรเมอร์ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น 2,690 แถบ แถบดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 50 – 1500 คู่เบส

และพบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับเพศเมีย มีขนาดประมาณ 240 คู่เบส ซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ me9/em2 (5'-tgagtccaaaccggtag-3' และ 5'-gactgcgtacgaatttgc-3') (Zhou, Wang and Zhang. 2011 : 261 – 266) ดังนั้นเทคนิคเอสอาร์เอฟพี จึงน่าจะเป็นเทคนิคหนึ่งที่เหมาะสมสำหรับการจำแนกเพศ ตาลโตนด เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายจำเพาะในคัดเลือกเพศและสายพันธุ์ตาลโตนดที่ต้องการปลูก ทำให้เกษตรกรใช้ประโยชน์จากตาลโตนดได้อย่างคุ้มค่า

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

- 3.1.1 รากตาลโตนดจากการเพาะเมล็ด
- 3.1.2 ใบอ่อนของตาลโตนดเพศเมีย 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์กา, สายพันธุ์ขมิ้น และสายพันธุ์ข้าว สายพันธุ์ละ 3 ตัวอย่าง และใบอ่อนของตาลโตนดเพศผู้ 8 ตัวอย่าง

3.2 วัสดุ อุปกรณ์

- 3.2.1 ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis)
- 3.2.2 อุปกรณ์ชุดถ่ายภาพ (Gel Document)
- 3.2.3 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- 3.2.4 เครื่องเขย่า
- 3.2.5 โถรงบตัวอย่าง
- 3.2.6 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR Thermocycler)
- 3.2.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)
- 3.2.8 ไมโครเวฟ (Microwave)
- 3.2.9 หม้อนึ่งความดัน (Automatic Autoclave)
- 3.2.10 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 3.2.11 กล้องจุลทรรศน์ (Compound Light Microscope)
- 3.2.12 กล้องสเตอริโอ (Sterioscope)
- 3.2.13 แผ่นสไลด์ และกระจกปิดสไลด์
- 3.2.14 กรรไกร พู่กัน เข็มเย็บ
- 3.2.15 กระดาษทิชชู

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 Absolute Alcohol
- 3.3.2 Acetocarmine
- 3.3.3 Acrylamide
- 3.3.4 Agarose
- 3.3.5 Ammonium Persulfate
- 3.3.6 Bind Silane และ Repel Silane
- 3.3.7 Bisacrylamide
- 3.3.8 Boric Acid
- 3.3.9 Cetyl – Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB)
- 3.3.10 Chloroform
- 3.3.11 Deoxyribonucleotide Triphosphate (dNTPs)
- 3.3.12 Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA)
- 3.3.13 Ethidium Bromide
- 3.3.14 Fixative (Absolute Ethanol : Acetic Acid = 3:1)
- 3.3.15 Formaldehyde
- 3.3.16 Glacial Acetic Acid
- 3.3.17 Glycerol
- 3.3.18 Isoamyl Alcohol
- 3.3.19 Isopropyl Alcohol
- 3.3.20 N – Lauroylsarcosine
- 3.3.21 N,N,N',N' – Tetramethylethylene Diamine (TEMED)
- 3.3.22 Oil Immersion
- 3.3.23 Paradichlobenzene (PDB)
- 3.3.24 Primers (ตารางที่ 1)
- 3.3.25 Silver Nitrate
- 3.3.26 Sodium Carbonate
- 3.3.27 Sodium Chloride
- 3.3.28 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)
- 3.3.29 Sodium Thiosulfate

3.3.30 *Taq* DNA Polymerase

3.3.31 Tris Base

3.3.32 Urea

3.3.33 100 bp DNA Ladder

3.3.34 1 kb DNA Ladder

3.3.35 1N HCl

ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' ----> 3')
me1	TGAGTCCAAACCGGATA
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG
me7	TGAGTCCTTTCCGGTCC
em2	GACTGCGTACGAATTTGC
em5	GACTGCGTACGAATTCAA
em6	GACTGCGTACGAATTCCA
em8	GACTGCGTACGAATTAC
em9	GACTGCGTACGAATTACG
em14	GACTGCGTACGAATTCAG

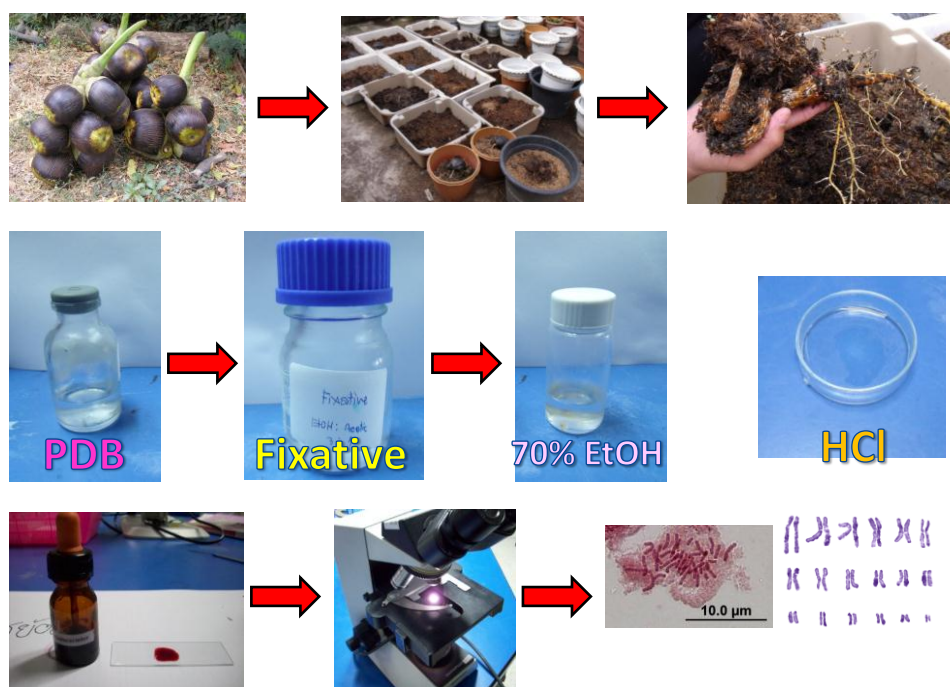
3.4 วิธีการ

3.4.1 การศึกษาการไอโทปตาลโตเนด

การเตรียมโครโมโซมจากปลายรากตาลโตเนด

เพาะเมล็ดตาลโตเนดประมาณ 4 เดือน และตัดปลายรากตาลโตเนดให้มีความยาวประมาณ 0.5 – 1.0 เซนติเมตร ในช่วงเวลา 9.00 – 10.00 นาฬิกา แخذตัวอย่างในสารละลายพาราไดคลอโรเบนซีนอิมตัว และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง เพื่อให้การแบ่งเซลล์หยุดอยู่ในระยะเมทาเฟส ใช้หลอดแก้วปลายแหลมดูดสารละลายพาราไดคลอโรเบนซีนออกให้หมด เติมน้ำยาคงสภาพคาร์นอย (Carnoy's Fixative) ให้ท่วมปลายรากแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วิชานิช. 2538 : 40 – 50) เปลี่ยนมาแช่ในเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นำตัวอย่างปลายรากตาลโตเนดที่ได้แช่ในสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์

ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างปลายรากตาลโตนดด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง นำมาวางบนสไลด์ ข้อมด้วยสีกะชิโตคาร์มีนประมาณ 10 นาที ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ ใช้ปลายเข็มเคาะเบาๆ เพื่อให้โครโมโซมกระจาย ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกภาพ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ขั้นตอนการศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของตาลโตนด

การวิเคราะห์โครโมโซมและการจัดการไอโทปี

คัดเลือกภาพเซลล์ในระยะเมทาเฟส จำนวน 10 เซลล์ เพื่อนับจำนวนโครโมโซมในแต่ละเซลล์ โดยความถี่ของจำนวนโครโมโซมที่นับได้สูงสุด คือจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ (2n)

การหาความยาวสัมพัทธ์ (RL : Relative Length) โดยการวัดความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง ทุกแท่งภายใน 1 เซลล์ แล้วคำนวณหาค่าความยาวสัมพัทธ์ จากสูตรด้านล่าง แล้วนำมาจำแนกขนาดโครโมโซมตามเกณฑ์ ดังตารางที่ 2

$$\text{ความยาวสัมพัทธ์} = \frac{\text{ความยาวโครโมโซมแต่ละแท่ง}}{\text{ความยาวโครโมโซมทั้งหมดในเซลล์นั้น}}$$

การหาขนาดโครโมโซม โดยการวัดความยาวโครโมโซมแต่ละแท่ง แล้วเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการคำนวณ โดยใช้สูตรดังนี้ (อลงกลด แทนอมทองและคณะ. 2005 : 1 – 11)

ค่าความยาวโครโมโซมจากการคำนวณ

$$= \frac{\text{ความยาวสัมพัทธ์ของโครโมโซมแท่งยาวที่สุด} + \text{ความยาวสัมพัทธ์ของโครโมโซมแท่งสั้นที่สุด}}{2}$$

ตารางที่ 2 เกณฑ์จัดจำแนกขนาดโครโมโซม

ขนาดโครโมโซม	เกณฑ์ในการพิจารณา
ขนาดใหญ่	ความยาวโครโมโซมที่วัดได้มากกว่าค่าที่ได้จากการคำนวณ
ขนาดกลาง	ความยาวโครโมโซมที่วัดได้น้อยกว่าค่าที่ได้จากการคำนวณ
ขนาดเล็ก	ความยาวโครโมโซมที่วัดได้น้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวโครโมโซมแท่งที่ยาวที่สุด

การจำแนกชนิดโครโมโซม โดยการหาค่าดัชนีเซนโทรเมียร์ (CI : Centromeric Index) จากสูตรด้านล่าง ซึ่งค่าดัชนีเซนโทรเมียร์ ที่ได้ จะใช้ในการจำแนกชนิดโครโมโซม (พวงผกา สุนทรชัย นาคแสง. 2548) ดังตารางที่ 3

$$\text{ดัชนีเซนโทรเมียร์} = \frac{\text{ความยาวของแขนข้างยาว}}{\text{ความยาวของโครโมโซมทั้งแท่ง}}$$

ตารางที่ 3 เกณฑ์การจำแนกชนิดโครโมโซม

ดัชนีเซนโทรเมียร์	ชนิดโครโมโซม	สัญลักษณ์
0.500 – 0.599	เมทาเซนตริก	m
0.600 – 0.699	ซับเมทาเซนตริก	sm
0.700 – 0.899	อะโครเซนตริก	ac
0.900 – 1.000	เทโลเซนตริก	t

การหาจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน จากการจำแนกชนิดโครโมโซม ซึ่งโครโมโซมแบบเมทาเซนตริก (m), ซับเมทาเซนตริก (sm) และอะโครเซนตริก (ac) มี 2 แขน ส่วนเทโลเซนตริก (t) มี 1 แขน ดังนั้น จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน จึงหาได้จากสูตร

จำนวนโครโมโซมพื้นฐาน = จำนวนโครโมโซมชนิด m, sm และ acx2 + จำนวนโครโมโซมชนิด tx1 (สุวนิดา อัญจิระเวโรจน์, อัจฉริยา รังษิรุจิและรัชช คอนสกุล. 2551 : 183 – 198)

3.4.2 การศึกษาพันธุกรรมของตาลโตนดโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอฟ

3.4.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากใบตาลโตนด

ซึ่งใบอ่อนตาลโตนด 1 กรัม ใส่ในโกร่งบดสาร เติมนิโตรเจนเหลวบดให้ละเอียด ปล่อยให้ในไนโตรเจนเหลวระเหยจนหมด เติม Extraction Buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส บ่มไว้เป็นเวลา 30 นาที โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้งทุกๆ 10 นาที แล้วเติม Chloroform : Isoamyl Alcohol (24:1) ปริมาตร 650 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นำหลอดไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 30 รอบต่อนาที นาน 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที เพื่อแยกชั้นน้ำ และคลอโรฟอร์มออกจากกัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ ปริมาตร 550 ไมโครลิตร แล้วเติม 10 เปอร์เซ็นต์ CTAB ปริมาตร 65 ไมโครลิตร ซึ่งมีคุณสมบัติในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีนและสารโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งสามารถช่วยในการกำจัดสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีปริมาณมากในพืชออกไปได้ (ชนากร วงษ์ศา, อภินันท์ ลิ้มมงคลและอนุพันธ์ กองบังเกิด. 2008 : 165 – 175) และ Chloroform : Isoamyl Alcohol (24:1) ปริมาตร 650 ไมโครลิตร นำหลอดไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 30 รอบต่อนาที นาน 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที ดูดสารละลายดีเอ็นเอส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่แล้วเติม Isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ จนเห็นสายดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอ ล้างดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วเทออก ปล่อยให้ดีเอ็นเอแห้ง ที่อุณหภูมิห้อง ละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย TE Buffer ปริมาตร 20 – 50 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้งานต่อไป

3.4.2.2 การคำนวณหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

เจือจางสารละลายดีเอ็นเอด้วย 1X TE Buffer (pH 8) ในอัตราส่วน 1 : 200 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) และ 280 นาโนเมตร (OD_{280}) ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอดังนี้

ปริมาณของดีเอ็นเอ = $50 \times OD_{260} \times$ จำนวนเท่าที่เจือจาง (ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร)

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ = OD_{260}/OD_{280}

ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่า $OD_{260}/OD_{280} = 1.8$ ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน ถ้าค่าต่ำกว่าแสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อน

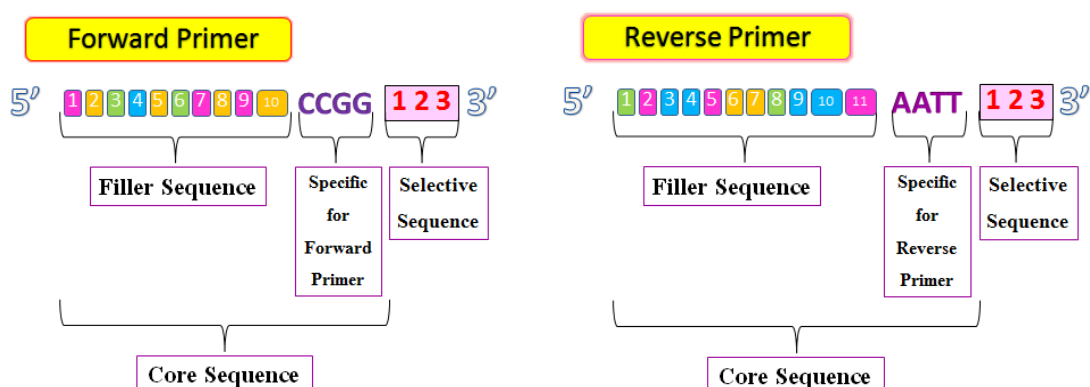
ตรวจสอบสภาพสมบูรณ์ของดีเอ็นเอด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างละ 0.5 ไมโครกรัม ไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรสเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ย้อมเจลด้วย Ethidium Bromide เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร

3.4.2.3 การออกแบบไพรเมอร์เอสอาร์เอฟ

3.4.2.3.1 ออกแบบไพรเมอร์สาย Forward ซึ่งมีความยาว 17 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์แกน 14 นิวคลีโอไทด์ แบ่งเป็น Filler Sequence 10 นิวคลีโอไทด์ ลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะ คือ CCGG และลำดับนิวคลีโอไทด์คัดเลือก 3 นิวคลีโอไทด์

3.4.2.3.2 ออกแบบไพรเมอร์สาย Reverse ซึ่งมีความยาว 18 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์แกน 15 นิวคลีโอไทด์ แบ่งเป็น Filler Sequence 11 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก Filler Sequence ของไพรเมอร์สาย Forward ลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะ คือ AATT และลำดับนิวคลีโอไทด์คัดเลือก 3 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ลักษณะของไพรเมอร์ Forward และ Reverse ที่ใช้ในเทคนิคเอสอาร์เอฟ

3.4.2.4 การทดสอบไพรเมอร์เอสอาร์เอพี

ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบโดยการรวมดีเอ็นเอแต่ละเพศ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1xPCR Buffer, dNTP 0.2 มิลลิโมลาร์, $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์, *Taq* DNA Polymerase เข้มข้น 0.04 ยูนิต/ไมโครลิตร ไพรเมอร์เข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ ประมาณ 50 ไมโครกรัมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้ไพรเมอร์ 20 ชุดไพรเมอร์ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ โดยตั้งโปรแกรมพีซีอาร์ (คลรัชต์ สุกหทัยและคณะ, 2553 : 476 – 481) ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 โปรแกรมจำนวนรอบของอุณหภูมิในการทำเอสอาร์เอพี พีซีอาร์

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Predenaturation	94	3	
Denaturation	94	1	5
Annealing	35	1	
Extension	72	1	
Denaturation	94	1	35
Annealing	50	1	
Extension	72	1	
Final Extension	72	5	

แล้วนำไปตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้เจลโพลีอะครีลาไมด์เข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีวิธีการดังนี้

3.4.2.4.1 เตรียมกระจกสำหรับเทเจล นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เช็ดกระจกแผ่นยาวด้วย Bind Silane (Bind Silane 4 ไมโครลิตร Glacial Acetic Acid 1 ไมโครลิตร และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 995 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลติดกระจก เช็ดกระจกแผ่นสั้นด้วย Repel Silane เพื่อไม่ให้เจลติดกระจก ปลอ่ยให้แห้ง ประมาณ 5 – 10 นาที แล้วนำกระจกทั้งสองแผ่นประกอบเข้าชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.4.2.4.2 เตรียมเจลโพลีอะครีลาไมด์เข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของเจลโพลีอะครีลาไมด์

องค์ประกอบ	ปริมาตร
1. 40% Polyacrylamide (19:1)	5.25 มิลลิลิตร
2. 10X TBE Buffer	3.50 มิลลิลิตร
3. Urea	15.75 กรัม
4. Sterile Distilled Water	10.15 มิลลิลิตร
5. 10% Ammonium Persulfate*	350.00 ไมโครลิตร
6. TEMED*	17.50 ไมโครลิตร
รวม	35.00 มิลลิลิตร

หมายเหตุ * เติวก่อนเทเจล

3.4.2.4.3 เทเจลโพลีอะครีลาไมด์ลงในช่องว่างระหว่างกระจกที่เตรียมไว้ เสียบหัวลงในช่องว่างระหว่างกระจก ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 – 3 ชั่วโมง เมื่อเจลแข็งตัว ล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด ดึงหัวออกนำมาประกอบเข้ากับชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส

3.4.2.4.4 เติม 1x TBE Buffer ลงในช่องด้านบนและด้านล่างของ Chamber ทำการ Pre-run โดยใช้ความต่างศักย์ 230 โวลต์ นาน 30 นาที เตรียมตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ SRAP – PCR โดยผสมกับ Loading Dye ในปริมาตรเท่ากับสารละลายดีเอ็นเอ แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วฝังกลับในน้ำแข็งทันที หลังจากนั้น จึงหยอดตัวอย่างลงในช่องเจลโพลีอะครีลาไมด์

3.4.2.4.5 ย้อมแถบดีเอ็นเอโดยวิธี Silver Staining นำกระจกด้านที่มีเจลแช่ในสารละลาย Fixative (Acetic Acid 10 เปอร์เซ็นต์) นาน 30 นาที เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า แล้วล้างน้ำกลั่น 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที หลังจากนั้นแช่ในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (Silver Nitrate 0.2 เปอร์เซ็นต์) นาน 30 นาที แล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วประมาณ 10 วินาที นำเจลแช่ในสารละลาย Developer (Sodium Carbonate 2.5 เปอร์เซ็นต์, Formaldehyde 0.17 เปอร์เซ็นต์ และ Sodium Thiosulfate 5 เปอร์เซ็นต์) ที่เย็นจัด เขย่าอย่างสม่ำเสมอจนกว่าจะสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยนำเจลแช่ในสารละลาย Stop (Acetic Acid 10 เปอร์เซ็นต์) นาน 3 – 5 นาที แล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.4.2.5 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยบันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอของตาโคโดมเพสผู้และเพสเมีย แถบดีเอ็นเอที่จะใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้เพศตาโคโดมได้จะต้องปรากฏขึ้นในตัวอย่างเพศเดียว ส่วนตัวอย่างอีกเพศหนึ่งไม่ปรากฏ โดยเกิดขึ้นในตำแหน่งเดียวกัน ส่วนแถบดีเอ็นเอที่จะ

ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้พันธุ์ จะต้องมีแถบดีเอ็นเอปรากฏในตัวอย่างสายพันธุ์เดียวกัน ส่วนตัวอย่างสายพันธุ์อื่น ไม่ปรากฏ คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิก (%PPB : Percent of Polymorphic Bands) และค่า PIC (Polymorphic Information Content) จากสูตรดังนี้

$$\%PPB = \frac{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ต่างกัน}}{\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด}} \times 100$$

$$PIC = 1 - \sum (P_{ij})^2$$

เมื่อ P_{ij} คือ ความถี่ที่รูปแบบแถบดีเอ็นเอปรากฏจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์แต่ละชนิด

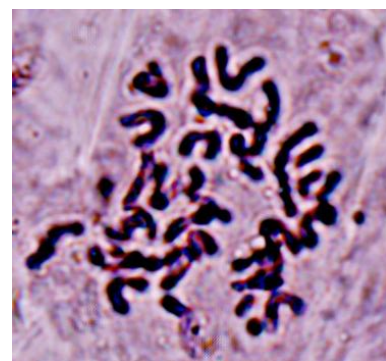
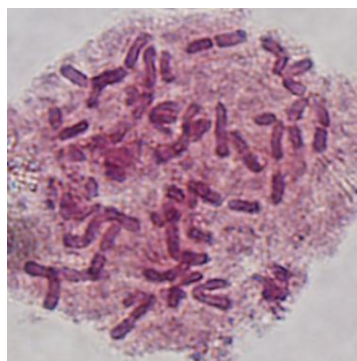
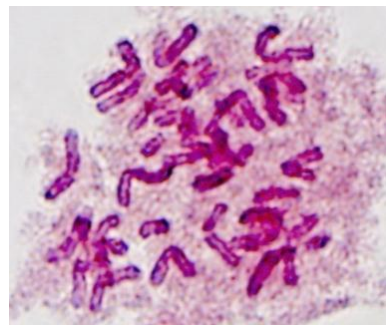
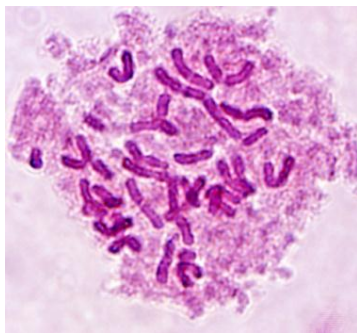
วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม NTsys Version 2.1 เพื่อหาค่าดัชนีความเหมือนและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตาลโตนด

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การศึกษาการโอโทปีตาลโดนด

การศึกษาจำนวนโครโมโซมปลายรากตาลโดนดที่เชื่อมด้วยสียอะซีโตคาร์มิน พบว่ามีเซลล์ระยะเมทาเฟสที่กระจายตัวดีจำนวน 10 เซลล์ ตัวอย่างดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 โครโมโซมปลายรากตาลโดนดระยะเมทาเฟสที่เชื่อมด้วยสียอะซีโตคาร์มิน

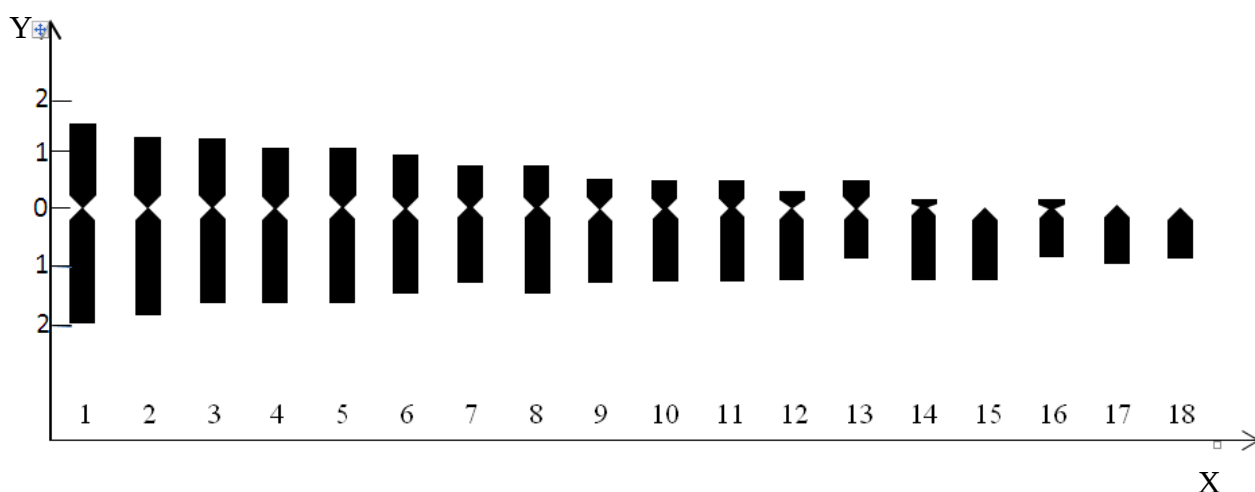
จากการนับจำนวนโครโมโซมปลายรากตาลโตนดจำนวน 10 เซลล์ พบว่ามีจำนวน 9 เซลล์ที่มี
จำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 36$ นำภาพโครโมโซมมาจัดคาริโอไทป์ ได้ผลดังภาพที่ 13



ภาพที่ 13 ก. เซลล์ระยะเมทาเฟส ข. คาริโอไทป์ตาลโตนด

วัดความยาวของแขนข้างสั้น แขนข้างยาว และความยาวทั้งแท่งของโครโมโซมทุกแท่งในเซลล์ทั้งหมด 9 เซลล์ ได้ค่าเฉลี่ยดังตารางที่ 6 หลังจากนั้นคำนวณหาค่าความยาวสัมพัทธ์และดัชนีเซนโทรเมียร์ จากค่าดัชนีเซนโทรเมียร์ สามารถจำแนกชนิดของโครโมโซมได้ดังนี้ โครโมโซมเมทาเซนทริกจำนวน 7 คู่ (คู่ที่ 1 – 7) โครโมโซมซับเมทาเซนทริกจำนวน 4 คู่ (คู่ที่ 8 – 10 และ 13) โครโมโซมอะโครเซนทริกจำนวน 4 คู่ (คู่ที่ 11, 12, 14 และ 16) และโครโมโซมเทโลเซนทริกจำนวน 3 คู่ (คู่ที่ 15, 17 และ 18) ดังตารางที่ 7 และจัดอิดิโอแกรม (Idiogram) ดังภาพที่ 14

จากสูตร (ความยาวสัมพัทธ์ของโครโมโซมแท่งยาวที่สุด + ความยาวสัมพัทธ์ของโครโมโซมแท่งสั้นที่สุด) / 2 ทำให้ได้ค่าจากการคำนวณ 0.032 และความยาวสัมพัทธ์ของโครโมโซมแท่งยาวที่สุด / 2 ทำให้ได้ค่า 0.0255 เมื่อนำค่าทั้ง 2 ไปพิจารณาเพื่อหาขนาดโครโมโซม โดยหลักเกณฑ์ คือ ถ้าความยาวโครโมโซมที่วัดได้มีค่ามากกว่า 0.032 จัดเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ ความยาวโครโมโซมที่วัดได้มีค่าน้อยกว่า 0.032 จัดเป็นโครโมโซมขนาดกลาง ความยาวโครโมโซมที่วัดได้มีค่าน้อยกว่า 0.0255 จัดเป็นโครโมโซมขนาดเล็กสามารถจำแนกโครโมโซมตามขนาดได้ตามขนาดได้ดังตารางที่ 7



ภาพที่ 14 อิดิโอแกรมตามขนาด

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น ความยาวแขนโครโมโซมข้างยาว และความยาวโครโมโซมทั้งแท่ง

โครโมโซมคู่ที่	ค่าเฉลี่ยความยาว (ไมโครเมตร)		ค่าเฉลี่ยความยาวทั้งแท่ง (ไมโครเมตร)
	แขนข้างสั้น	แขนข้างยาว	
1	1.500 ± 0.350	1.899 ± 0.635	3.399 ± 0.669
	1.305 ± 0.322	1.780 ± 0.581	3.086 ± 0.633
2	1.144 ± 0.282	1.715 ± 0.228	2.859 ± 0.304
	1.144 ± 0.256	1.586 ± 0.295	2.730 ± 0.469
3	1.144 ± 0.278	1.446 ± 0.245	2.589 ± 0.448
	1.090 ± 0.159	1.327 ± 0.279	2.417 ± 0.362
4	1.014 ± 0.266	1.435 ± 0.269	2.449 ± 0.414
	0.993 ± 0.278	1.359 ± 0.248	2.352 ± 0.408
5	1.025 ± 0.257	1.349 ± 0.191	2.374 ± 0.364
	1.079 ± 0.220	1.338 ± 0.227	2.417 ± 0.345
6	0.885 ± 0.289	1.381 ± 0.251	2.266 ± 0.434
	0.960 ± 0.293	1.349 ± 0.334	2.309 ± 0.525
7	0.885 ± 0.263	1.187 ± 0.346	2.071 ± 0.429
	0.788 ± 0.263	1.133 ± 0.228	1.920 ± 0.388
8	0.701 ± 0.372	1.284 ± 0.256	1.985 ± 0.380
	0.723 ± 0.319	1.262 ± 0.233	1.985 ± 0.296
9	0.637 ± 0.271	1.230 ± 0.206	1.866 ± 0.260
	0.637 ± 0.262	1.176 ± 0.263	1.813 ± 0.322
10	0.518 ± 0.287	1.144 ± 0.294	1.661 ± 0.185
	0.518 ± 0.326	1.154 ± 0.345	1.672 ± 0.180
11	0.464 ± 0.286	1.133 ± 0.357	1.597 ± 0.243
	0.421 ± 0.257	1.144 ± 0.356	1.564 ± 0.254
12	0.378 ± 0.235	1.187 ± 0.346	1.564 ± 0.285
	0.356 ± 0.233	1.187 ± 0.346	1.543 ± 0.324
13	0.507 ± 0.174	0.874 ± 0.233	1.381 ± 0.242
	0.442 ± 0.218	0.895 ± 0.256	1.338 ± 0.159
14	0.129 ± 0.200	1.219 ± 0.311	1.349 ± 0.203
	0.173 ± 0.216	1.154 ± 0.316	1.327 ± 0.161
15	0.076 ± 0.152	1.165 ± 0.161	1.241 ± 0.159
	0.065 ± 0.128	1.165 ± 0.175	1.230 ± 0.161
16	0.248 ± 0.296	0.885 ± 0.245	1.133 ± 0.217
	0.205 ± 0.225	0.820 ± 0.253	1.025 ± 0.169
17	0.043 ± 0.086	0.982 ± 0.191	1.025 ± 0.138
	0.054 ± 0.110	0.928 ± 0.138	0.982 ± 0.076
18	0.054 ± 0.162	0.842 ± 0.128	0.895 ± 0.106
	0.052 ± 0.162	0.809 ± 0.146	0.863 ± 0.141

ตารางที่ 7 ค่าความยาวสัมพันธ์ ค่าดัชนีเซนโทรเมียร์ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากเซลล์
ปลายรากตาลโตนด ระยะเมทาเฟส จำนวน 9 เซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

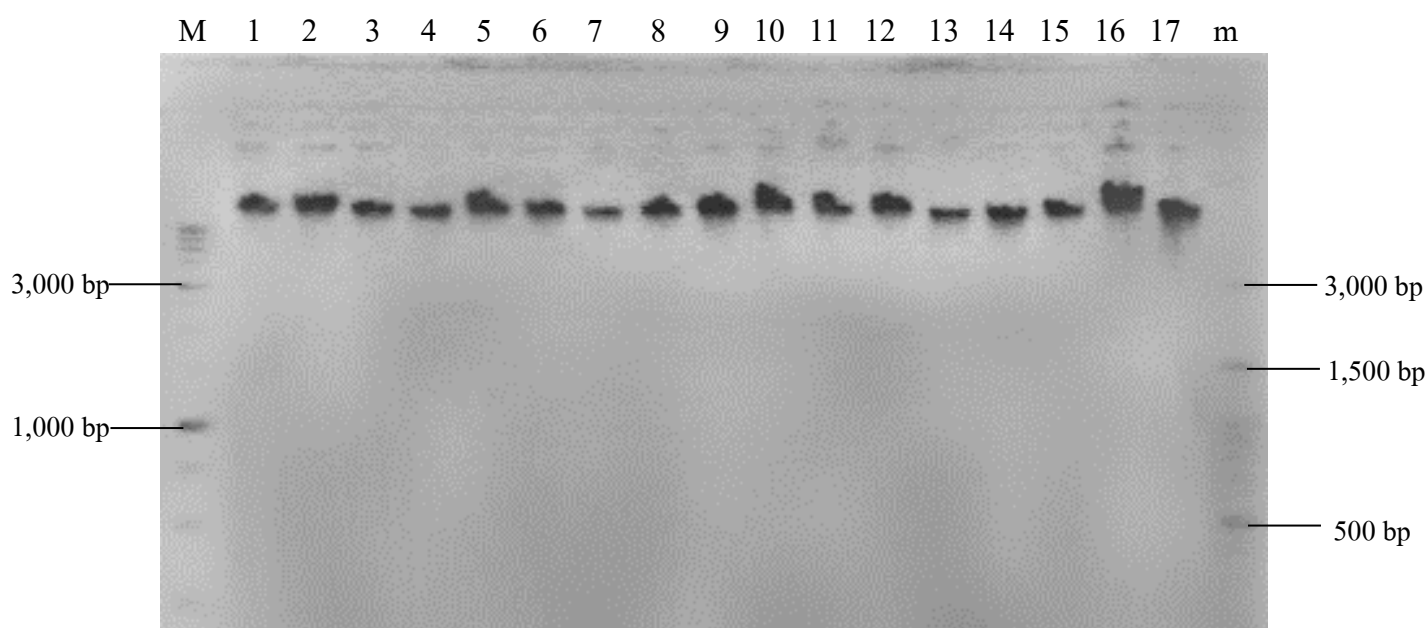
โครโมโซมคู่ที่	ความยาวสัมพันธ์	ค่าดัชนีเซนโทรเมียร์	ชนิดของโครโมโซม	ขนาดโครโมโซม
1	0.051 ± 0.007	0.551 ± 0.092	เมทาเซนทริก	ใหญ่
	0.046 ± 0.006	0.571 ± 0.082		
2	0.043 ± 0.004	0.599 ± 0.077	เมทาเซนทริก	ใหญ่
	0.041 ± 0.004	0.581 ± 0.058		
3	0.039 ± 0.005	0.561 ± 0.061	เมทาเซนทริก	ใหญ่
	0.037 ± 0.004	0.547 ± 0.054		
4	0.037 ± 0.004	0.587 ± 0.072	เมทาเซนทริก	ใหญ่
	0.035 ± 0.004	0.582 ± 0.081		
5	0.036 ± 0.006	0.572 ± 0.067	เมทาเซนทริก	ใหญ่
	0.037 ± 0.006	0.554 ± 0.061		
6	0.034 ± 0.003	0.599 ± 0.076	เมทาเซนทริก	ใหญ่
	0.035 ± 0.005	0.586 ± 0.073		
7	0.031 ± 0.006	0.568 ± 0.100	เมทาเซนทริก	กลาง
	0.029 ± 0.004	0.594 ± 0.083		
8	0.030 ± 0.003	0.657 ± 0.152	ซับเมทาเซนทริก	กลาง
	0.030 ± 0.002	0.644 ± 0.145		
9	0.028 ± 0.002	0.669 ± 0.143	ซับเมทาเซนทริก	กลาง
	0.027 ± 0.003	0.665 ± 0.144		
10	0.025 ± 0.002	0.690 ± 0.154	ซับเมทาเซนทริก	เล็ก
	0.025 ± 0.002	0.689 ± 0.184		
11	0.024 ± 0.002	0.704 ± 0.180	อะโครเซนทริก	เล็ก
	0.024 ± 0.002	0.723 ± 0.173		
12	0.024 ± 0.003	0.755 ± 0.154	อะโครเซนทริก	เล็ก
	0.023 ± 0.003	0.767 ± 0.153		
13	0.021 ± 0.003	0.630 ± 0.122	ซับเมทาเซนทริก	เล็ก
	0.020 ± 0.002	0.667 ± 0.170		
14	0.020 ± 0.002	0.898 ± 0.153	อะโครเซนทริก	เล็ก
	0.020 ± 0.002	0.862 ± 0.170		
15	0.019 ± 0.002	0.945 ± 0.110	เทโลเซนทริก	เล็ก
	0.019 ± 0.002	0.950 ± 0.100		
16	0.017 ± 0.003	0.798 ± 0.220	อะโครเซนทริก	เล็ก
	0.016 ± 0.003	0.805 ± 0.213		
17	0.016 ± 0.003	0.953 ± 0.093	เทโลเซนทริก	เล็ก
	0.015 ± 0.002	0.944 ± 0.113		
18	0.014 ± 0.002	0.949 ± 0.152	เทโลเซนทริก	เล็ก
	0.013 ± 0.002	0.949 ± 0.152		

การสกัดดีเอ็นเอจากใบตาลโตนด

การสกัดดีเอ็นเอจากใบตาลโตนดเพศผู้ (ตัวอย่างที่ 1 – 8) และเพศเมีย ซึ่งแบ่งเป็น 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ข้าว (ตัวอย่างที่ 9 – 11) พันธุ์กา (ตัวอย่างที่ 12 – 14) พันธุ์มัน (ตัวอย่างที่ 15 – 17) รวมเป็น 17 ตัวอย่าง เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธีวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร มีค่าอัตราส่วน OD_{260}/OD_{280} อยู่ระหว่าง 1.73 – 1.98 ดีเอ็นเอมีความเข้มข้นประมาณ 692.5 – 1,865 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ดังตารางที่ 8 และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลดังภาพที่ 15

ตารางที่ 8 ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอตาลโตนดที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

ตัวอย่าง		OD_{260}	OD_{280}	OD_{260}/OD_{280}	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม)
ตาลโตนด เพศผู้	1	0.452	0.228	1.98	1,130
	2	0.502	0.271	1.85	1,255
	3	0.543	0.294	1.85	1,357.5
	4	0.392	0.212	1.85	980
	5	0.402	0.204	1.97	1,005
	6	0.397	0.217	1.83	992.5
	7	0.353	0.196	1.8	882.5
	8	0.277	0.149	1.85	692.5
ตาลโตนด	9	0.488	0.277	1.76	1,220
เพศเมีย	10	0.746	0.422	1.77	1,865
พันธุ์ข้าว	11	0.353	0.192	1.84	882.5
ตาลโตนด	12	0.303	0.162	1.86	757.5
เพศเมีย	13	0.469	0.271	1.73	1,172.5
พันธุ์กา	14	0.461	0.253	1.82	1,152.5
ตาลโตนด	15	0.495	0.272	1.82	1,237.5
เพศเมีย	16	0.650	0.376	1.73	1,625
พันธุ์มัน	17	0.622	0.349	1.78	1,555



ภาพที่ 15 แถบดีเอ็นเอของตาลโตนดที่ตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิสบนเจลอะกาโรสความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 – 11 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมีย พันธุ์ข้าว; 12 – 14 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมีย พันธุ์กา; 15 – 17 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมีย พันธุ์มัน; m คือ 100 bp DNA Ladder)

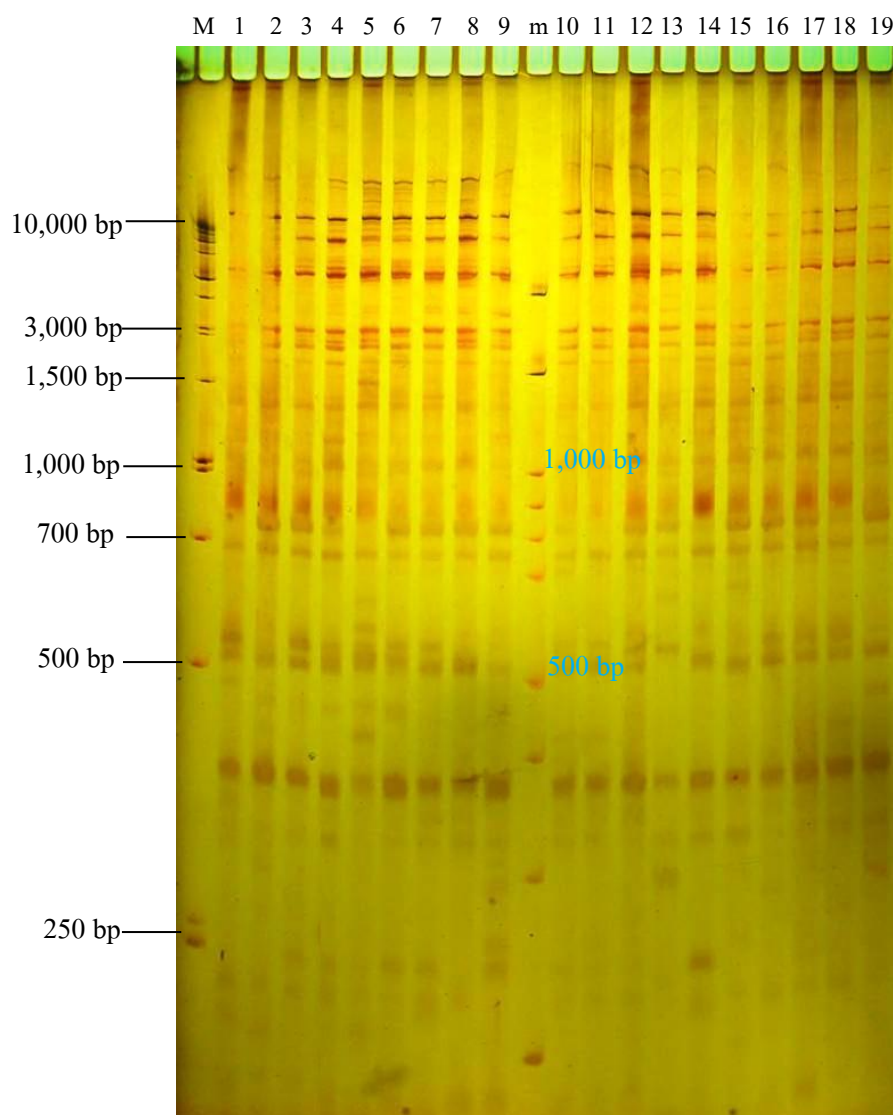
เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

ผลการทดลองที่ได้จากการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี จำนวน 20 รูปแบบไพรเมอร์ ในตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้และเพศเมียจำนวน 19 ตัวอย่าง ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 342 แถบ เฉลี่ย 17.1 แถบต่อชุดไพรเมอร์ มีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (Monomorphic Band) 210 แถบ คิดเป็นร้อยละ 61.4 และมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (Polymorphic Band) 132 แถบ คิดเป็นร้อยละ 38.6 ไพรเมอร์ me2/em5em9 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุดคือ 35 แถบ และให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมากที่สุด คือ 16 แถบ รองลงมาคือ ไพรเมอร์ me2/em5em6 และ me5/em5em14 จำนวน 15 แถบ ดังตารางที่ 9 และไพรเมอร์ทั้ง 20 รูปแบบไพรเมอร์สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้โดยพิมพ์ดีเอ็นเอ ดังภาพที่ 16 – 35 เมื่อนำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิก (PPB% : Percent of Polymorphic Bands) และค่า PIC (Polymorphic Information Content) ได้ค่าอยู่ระหว่าง 0 – 60 และ 0 – 0.941 ตามลำดับ ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์จำนวน 20 แบบ ค่า PIC และค่าเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิก

รูปแบบ ไพรเมอร์	แถบ ดีเอ็นเอ ทั้งหมด	แถบ ดีเอ็นเอที่ เหมือนกัน	แถบ ดีเอ็นเอที่ ต่างกัน	ค่า PIC	เปอร์เซ็นต์ โพลิมอร์ฟิก	ขนาดแถบ ดีเอ็นเอ (คู่เบส)
me2/ em5 em9	35	19	16	0.914	45.71	230 – 10,000
me1/ em5 em8	11	5	6	0.893	54.55	250 – 3,000
me1/ em5 em14	19	8	11	0.900	57.90	100 – 5,000
me2/ em5 em2	11	10	1	0.457	9.09	200 – 5,500
me2/ em5 em6	26	11	15	0.914	57.69	120 – 10,000
me5/ em2 em9	23	14	9	0.914	39.13	100 – 10,000
me5/ em5 em6	11	10	1	0.300	9.09	100 – 5,000
me5/ em5 em8	6	4	2	0.727	33.33	130 – 1,000
me7/ em2 em6	6	3	3	0.360	50.00	150 – 10,000
me7/ em2 em9	5	5	-	0.000	0.00	200 – 3,000
me5/em5em14	25	10	15	0.941	60.00	300 – 10,000
me5/ em5 em9	12	5	7	0.788	58.33	250 – 4,000
me2/ em5 em8	17	12	5	0.600	29.41	130 – 7,000
me7/ em2 em8	10	7	3	0.457	30.00	140 – 3,000
me7/ em2	6	5	1	0.112	16.67	200 – 3,000
me7/ em8	17	8	9	0.906	52.94	100 – 3,000
me5/ em8	28	20	8	0.941	28.57	150 – 7,000
me7/ em5	26	21	5	0.900	19.23	250 – 7,000
me5/ em5	33	25	8	0.941	24.24	100 – 7,000
me1/ em8	15	8	7	0.913	46.67	100 – 3,000
รวม	342	210 (61.4 เปอร์เซ็นต์)	132 (38.6 เปอร์เซ็นต์)	0.694±0.305	36.13 ± 18.85	

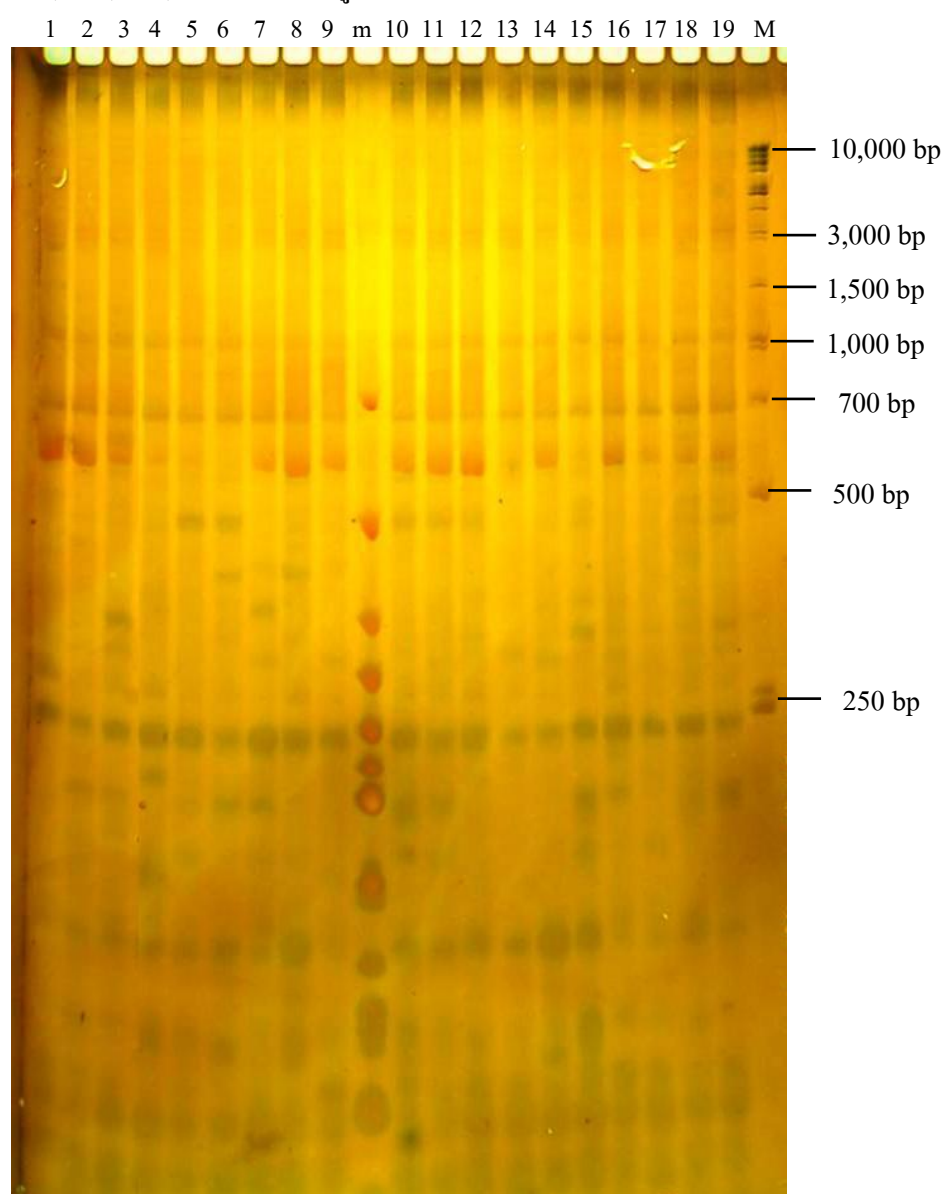
ไพรมอร์ me2 / em5 em9 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 35 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 230 – 10,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 19 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 16 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 250, 300, 350, 420, 450, 1,200, 1,300, 1,400, 1,420, 1,500, 1,550, 1,750, 3,500, 4,000 4,800 และ 7,500 คู่เบส (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมอร์ me2 / em5 em9

(M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

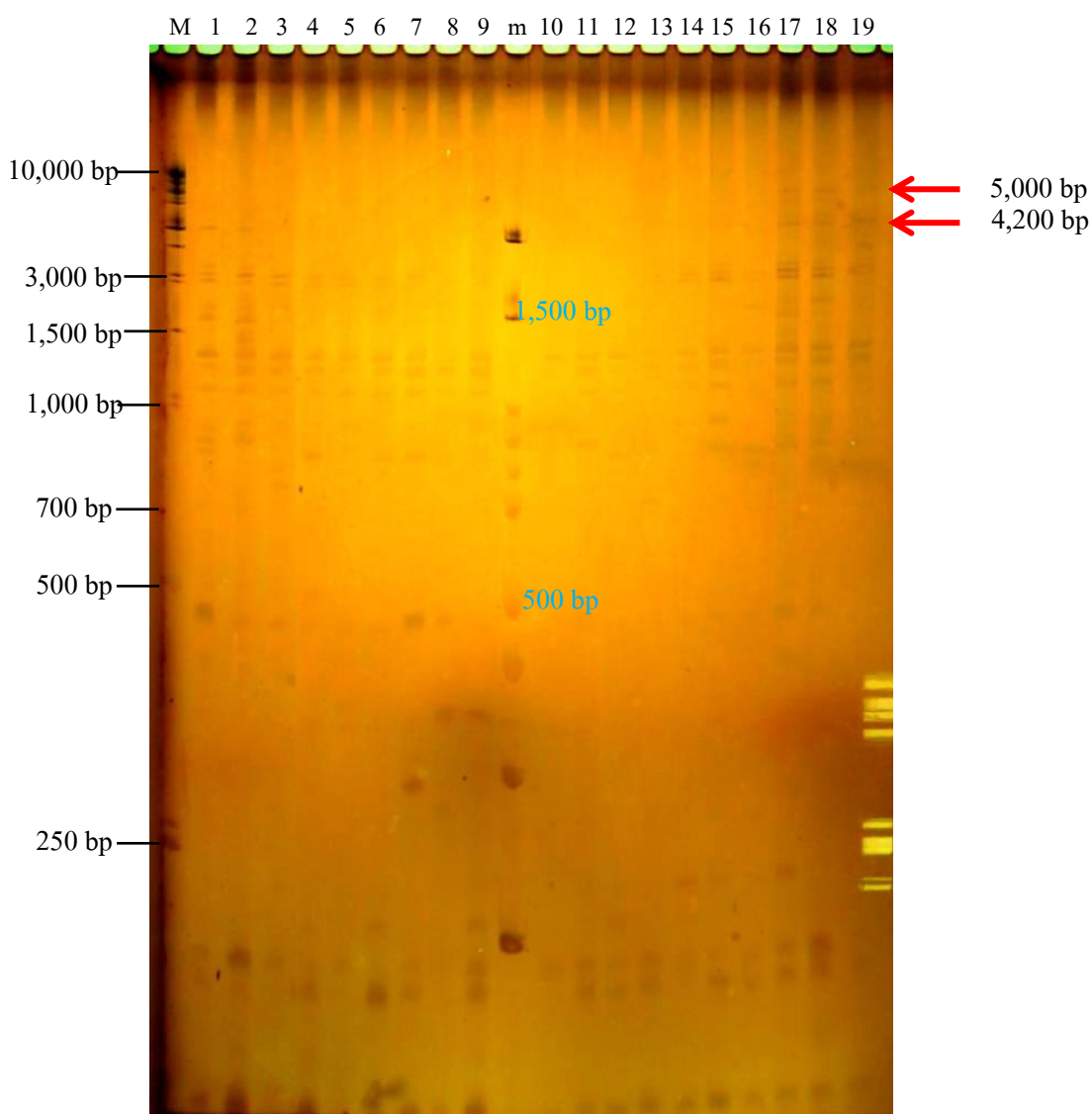
ไพรเมอร์ me1 / em5 em8 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 11 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 250 – 3,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 5 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 6 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300, 350, 400, 420, 480 และ 500 คู่เบส (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me2 / em5 em8

(M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ดำ; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

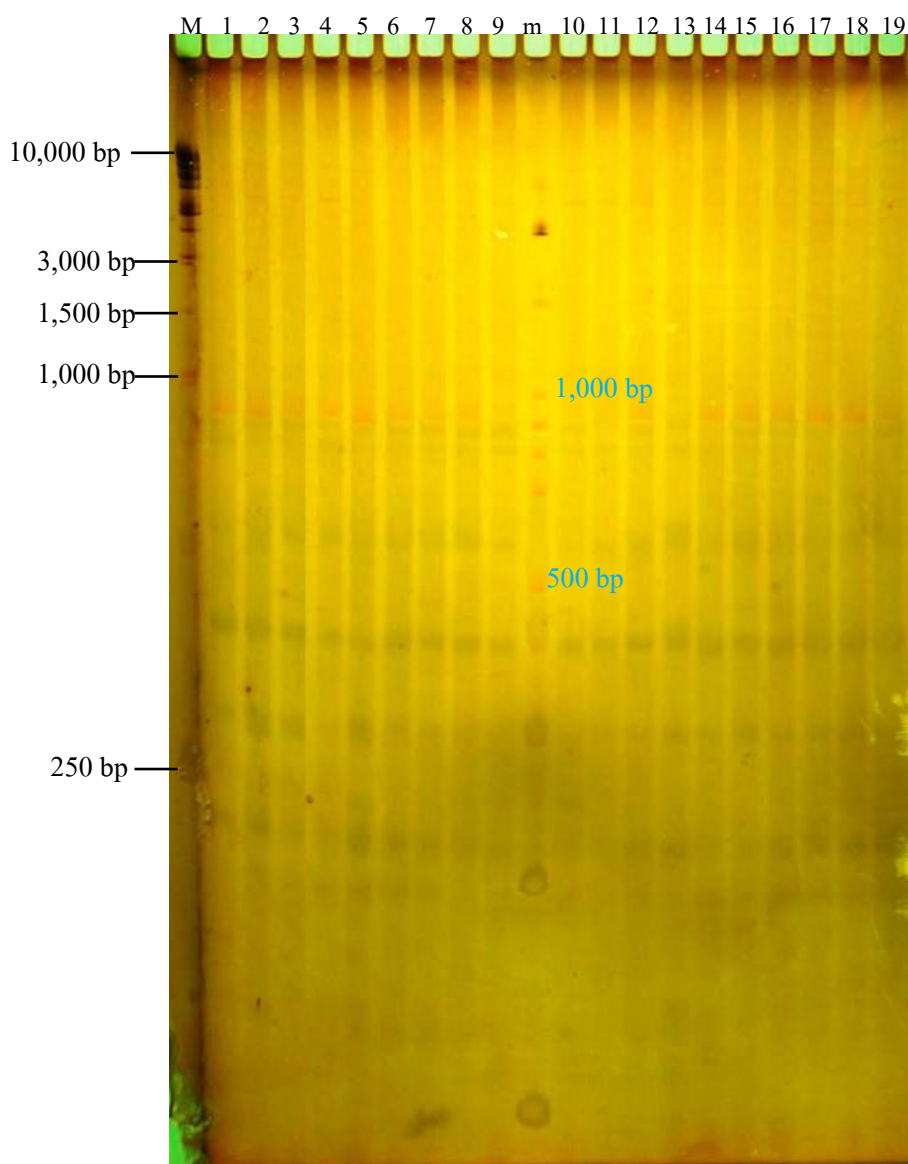
ไพรเมอร์ me1 / em5 em14 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 19 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 100 – 5,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 8 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 11 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 180, 200, 220, 350, 500, 750, 900, 1,500, 1,800, 4,200 และ 5,000 คู่เบส (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me1 / em5 em14

(M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ดำ; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

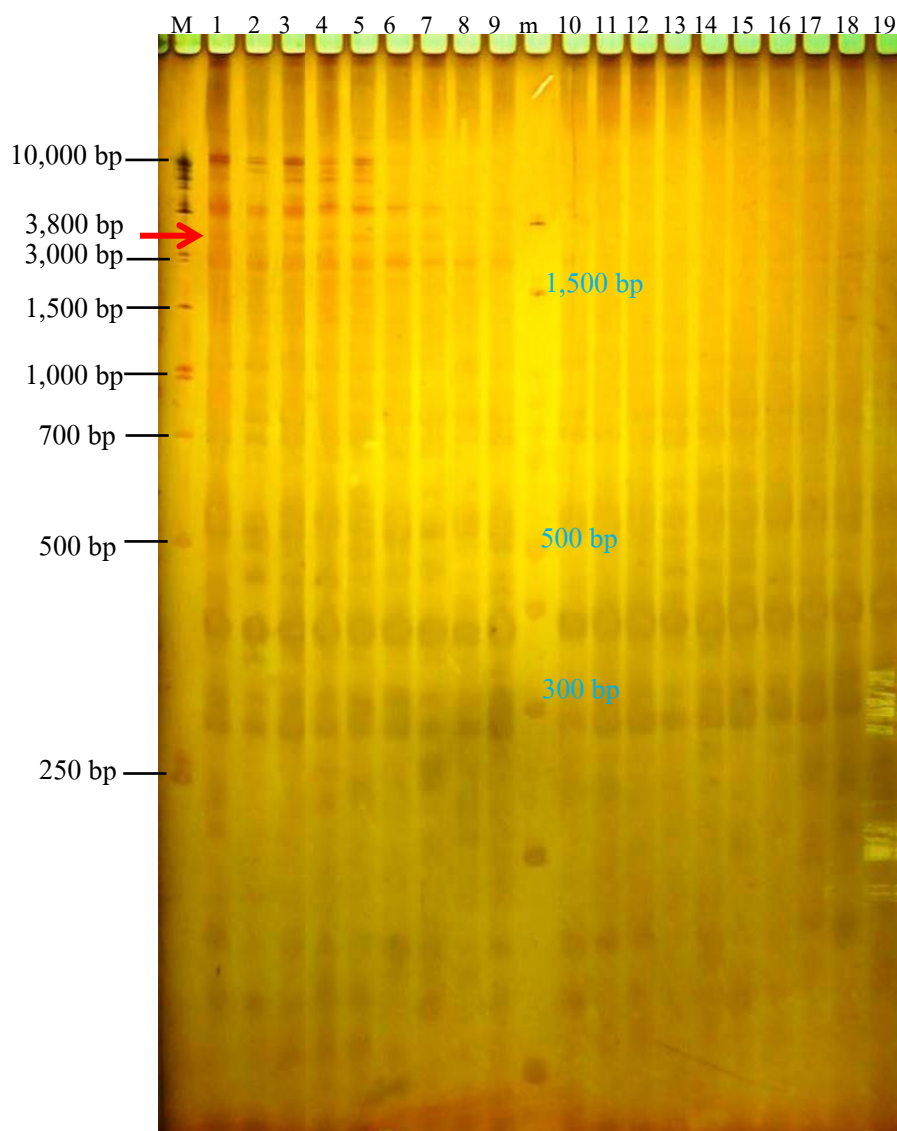
ไพรเมอร์ me2 / em5 em2 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 11 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 200 – 5,500 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 10 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 1 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 250 คู่เบส (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอฟไพรเมอร์ me2 / em5 em2

(M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์กา; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

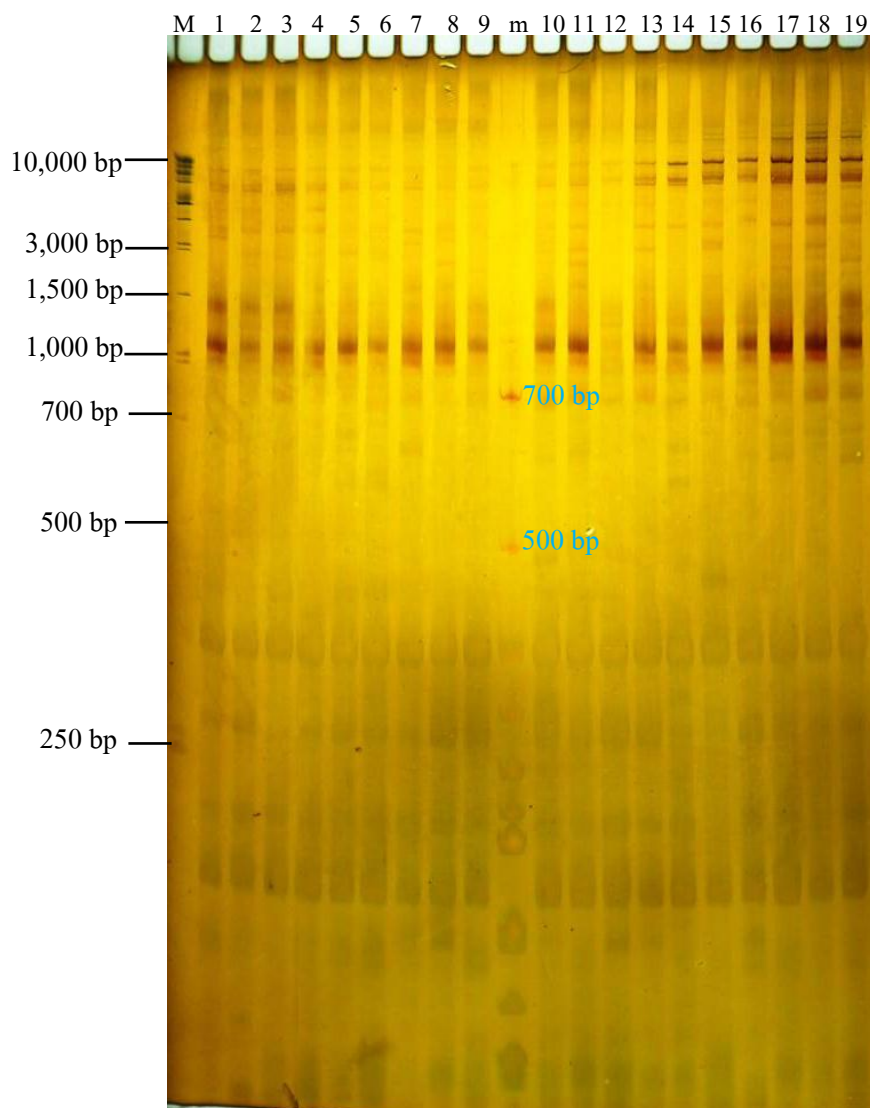
ไพรเมอร์ me2 / em5 em6 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 26 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 120 – 10,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 11 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 15 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200, 230, 350, 450, 600, 1,500, 3,800, 4,000, 5,000, 5,400, 5,500, 6,000, 8,000, 9,000 และ 10,000 คู่เบส (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me2 / em5 em6

(M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ดำ; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

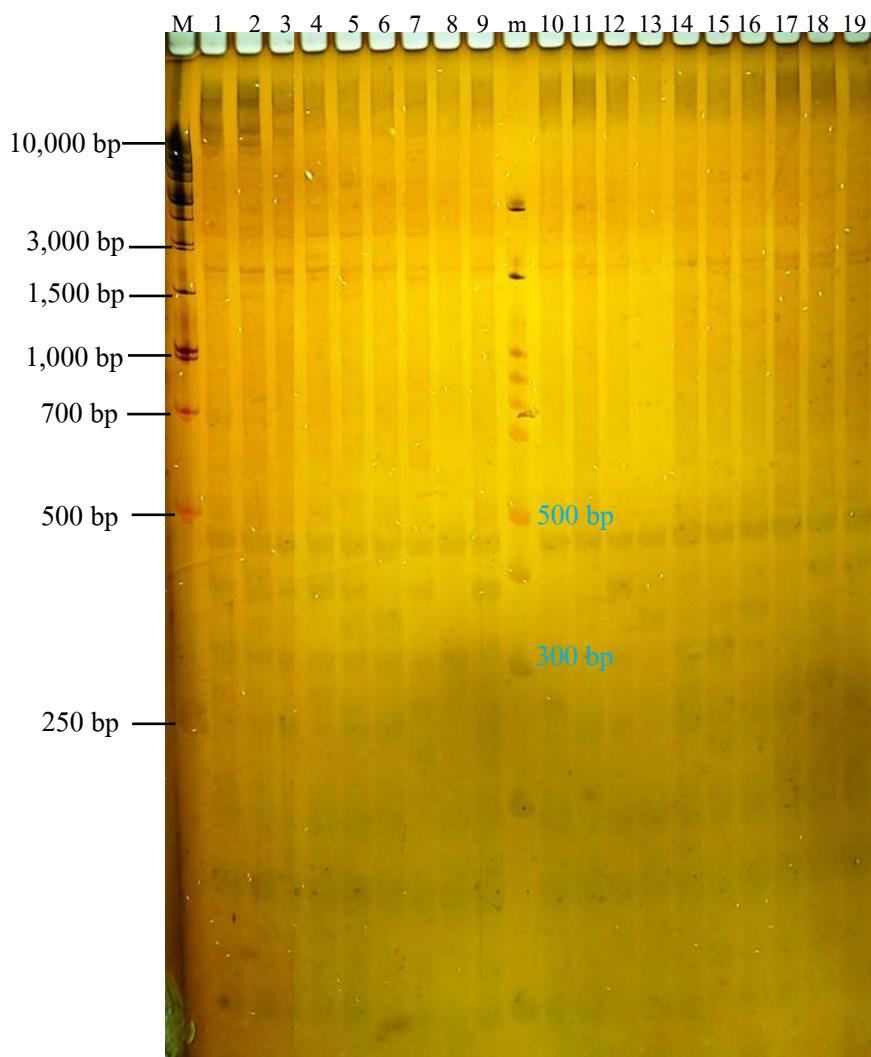
ไพรเมอร์ me5 / em2 em9 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 23 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 100 – 10,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 14 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 9 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 100, 130, 500, 680, 700, 1,800, 2,200, 4,000 และ 5,000 คู่เบส (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me5 / em2 em9

(M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์กา; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

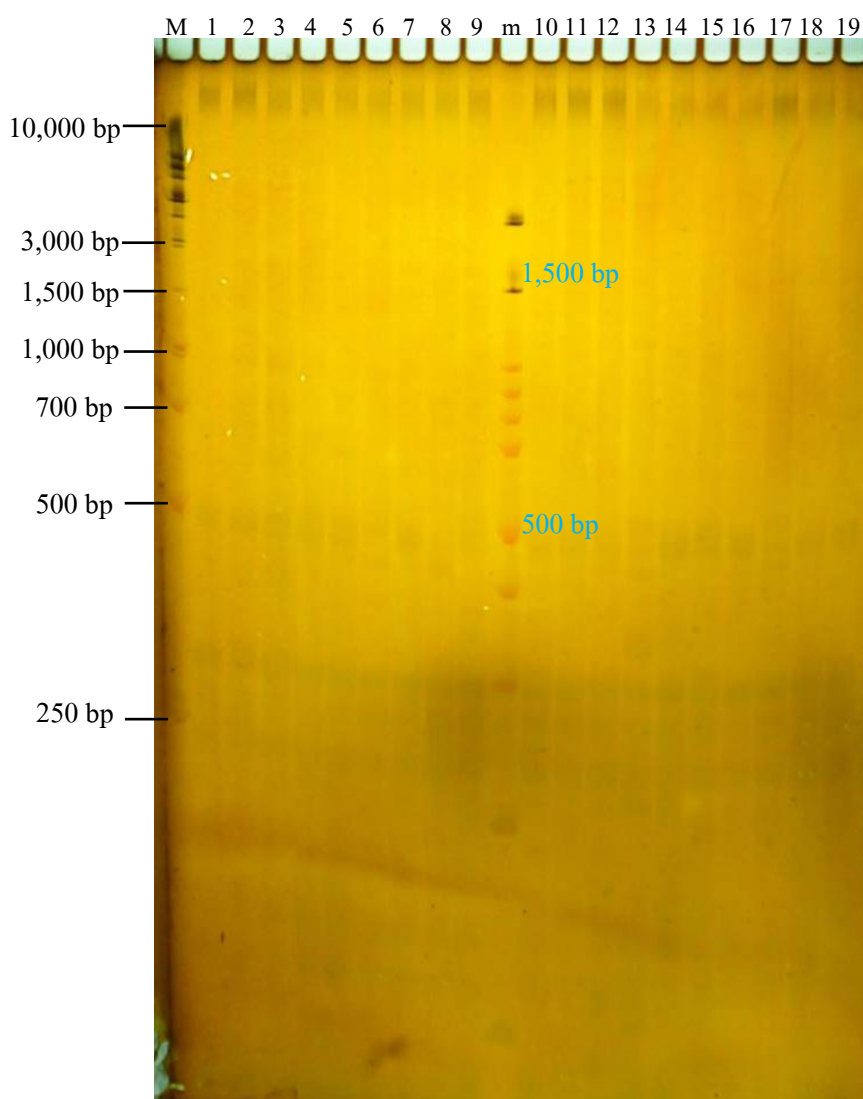
ไพรเมอร์ me5/ em5 em6 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 11 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 100 – 5,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 10 แถบและแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 1 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me5/ em5 em6

(M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ข้าว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์กา; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

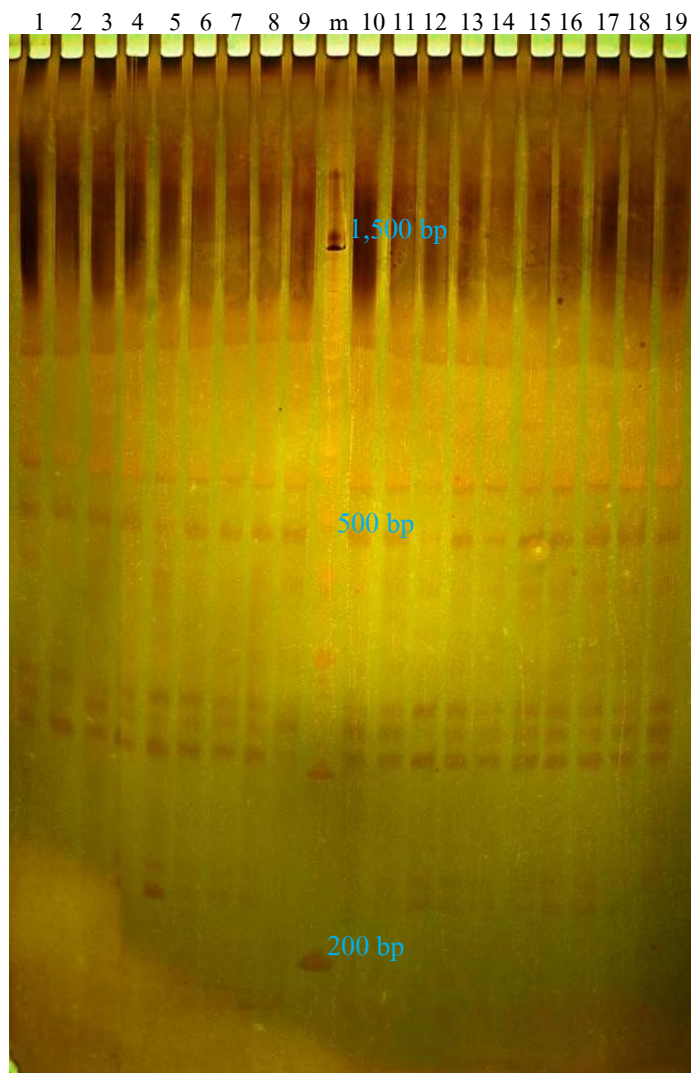
ไพรเมอร์ me5/ em5 em8 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 6 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 130 – 1,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 4 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 2 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 และ 1,000 คู่เบส (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me5/ em5 em8

(M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

ไพรเมอร์ me7/ em2 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 6 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 200 – 3,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 6 แถบ (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me7/ em2

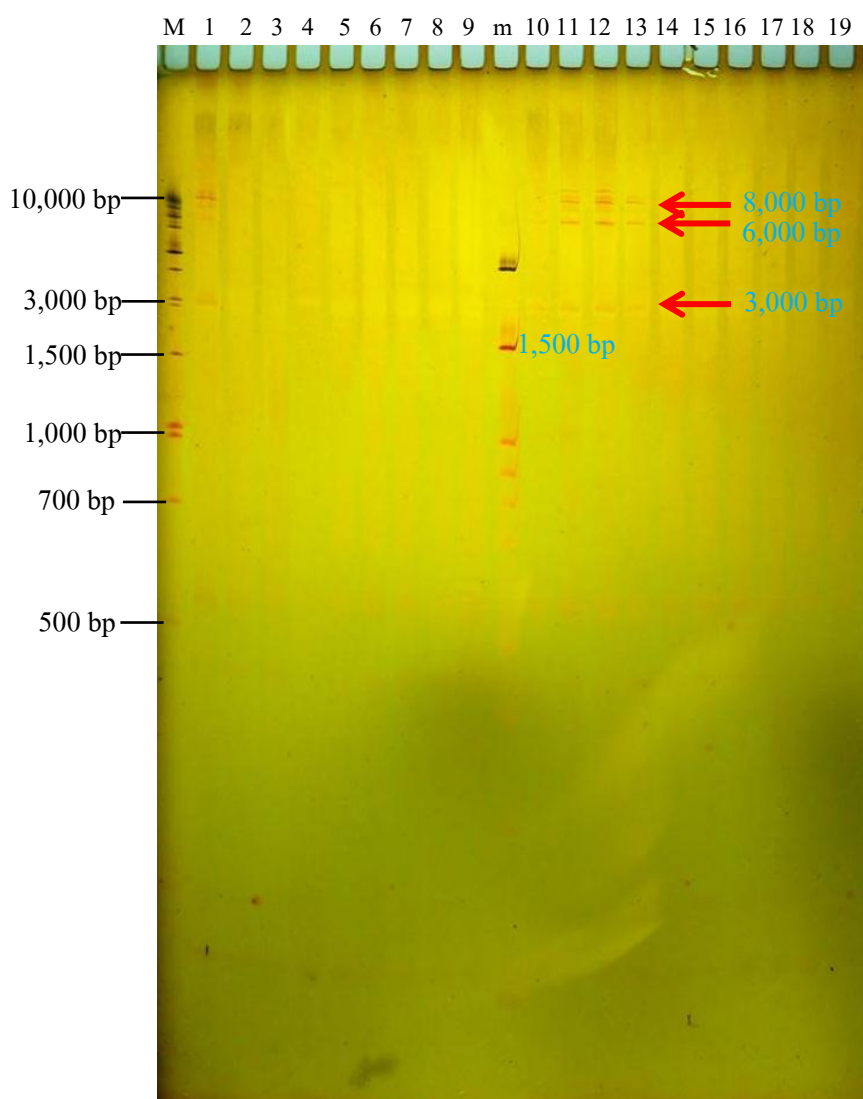
(1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม;

m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม;

11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมีย

พันธุ์ดำ; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

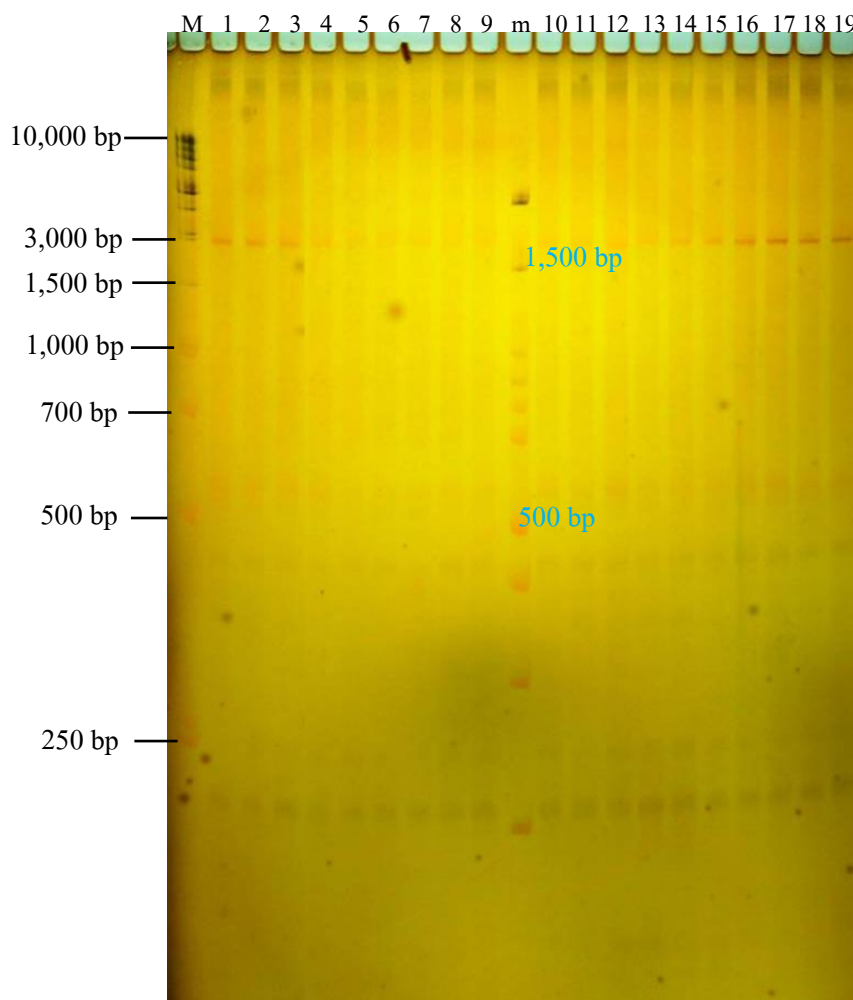
ไพรเมอร์ me7/ em2 em6 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 6 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 150 – 10,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 3 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000, 6,000 และ 8,000 คู่เบส (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me7/ em2 em6

(M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ดำ)

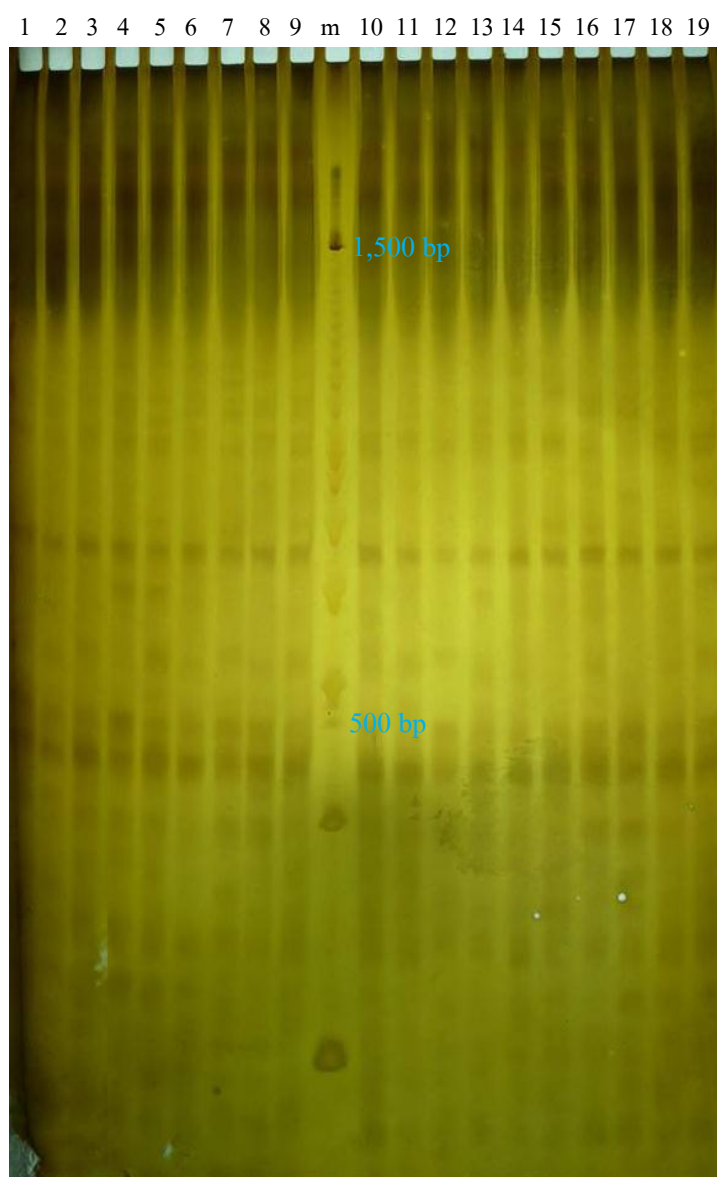
ไพรเมอร์ me7/ em2 em9 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 5 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 200 – 3,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 5 แถบ (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me7/ em2 em9

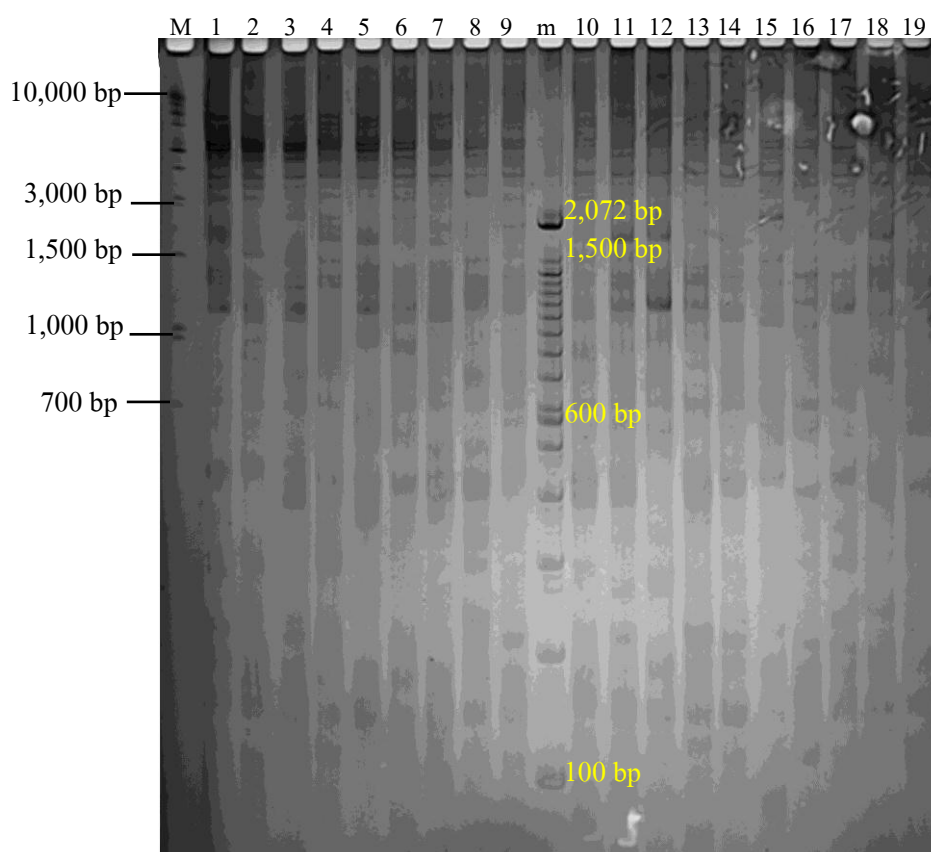
(M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์กา; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

ไพรเมอร์ me7/em8 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 17 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 100 – 3,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 8 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 9 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 180, 320, 500, 600, 730, 800, 1,100, 1,500 และ 3,000 คู่เบส (ภาพที่ 27)



ภาพที่ 27 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me7/em8
 (1 – 8 คือ ตัวอย่างตาล โตนคเพสผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาล โตนคเพสผู้รวม;
 m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาล โตนคเพสเมียรวม;
 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาล โตนคเพสเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาล โตนคเพสเมีย
 พันธุ์กา; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาล โตนคเพสเมียพันธุ์มัน)

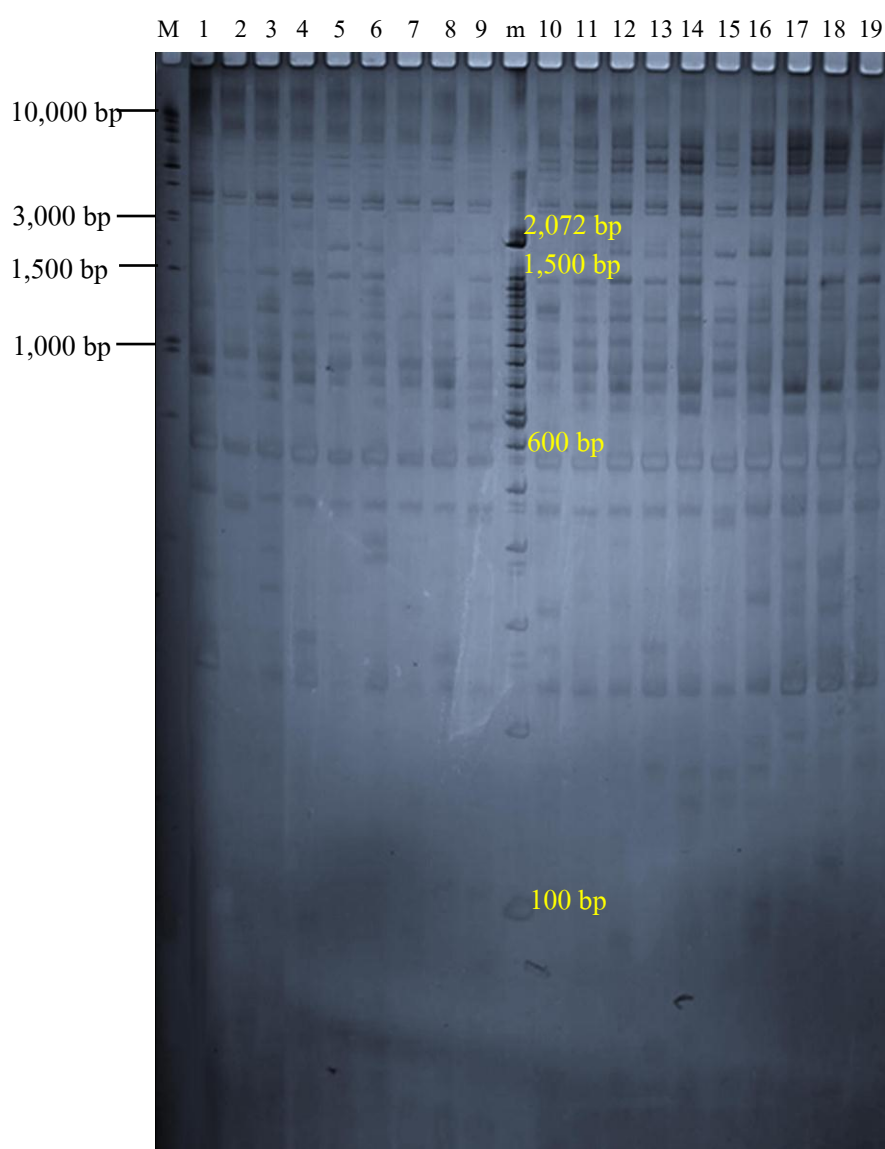
ไพรเมอร์ me5/em8 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 28 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 150 – 7,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 20 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 8 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 220, 250, 280, 350, 400, 500, 800 และ 1,000 คู่เบส (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me5/em8

(M คือ 1 Kb DNA Ladder ; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ดำ; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

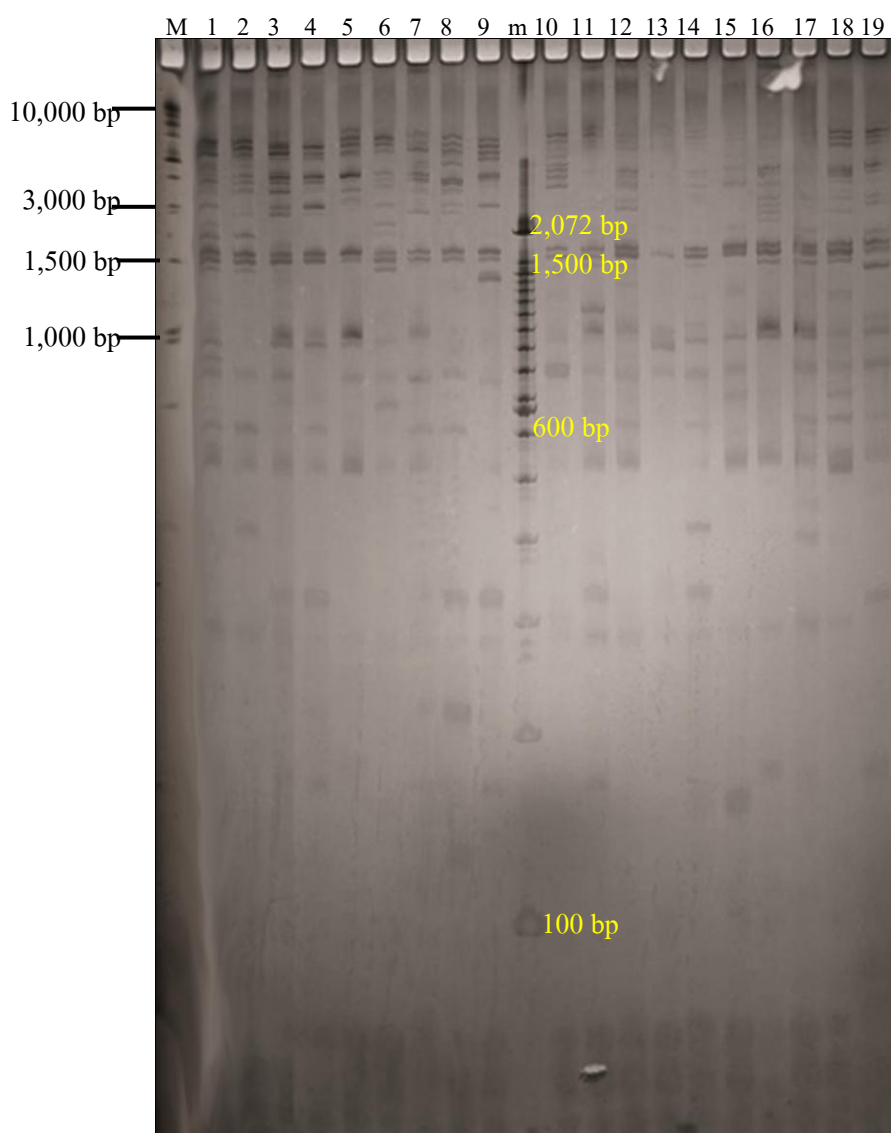
ไพรเมอร์ me7/em5 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 26 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 250 – 7,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 21 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 5 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 280, 320, 350, 380 และ 460 คู่เบส (ภาพที่ 29)



ภาพที่ 29 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me7/em5

(M คือ 1 Kb DNA Ladder ; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์กา; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

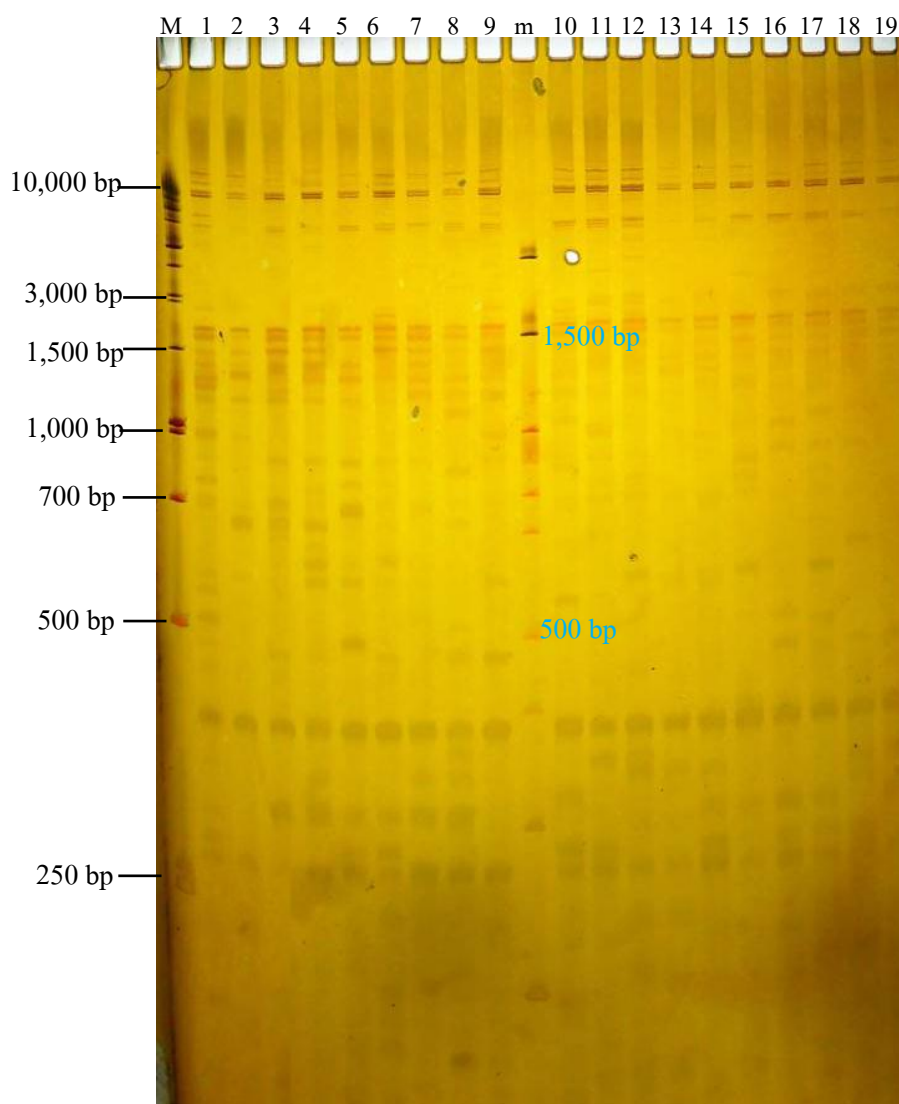
ไพรเมอร์ me5/em5 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 33 แถบ มีขนาดตั้งแต่ต่ำกว่า 100 – 7,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 25 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 8 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 180, 320, 400, 550, 600, 800, 1,100 และ 1,400 คู่เบส (ภาพที่ 30)



ภาพที่ 30 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me5/em5

(M คือ 1 Kb DNA Ladder ; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์กา; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

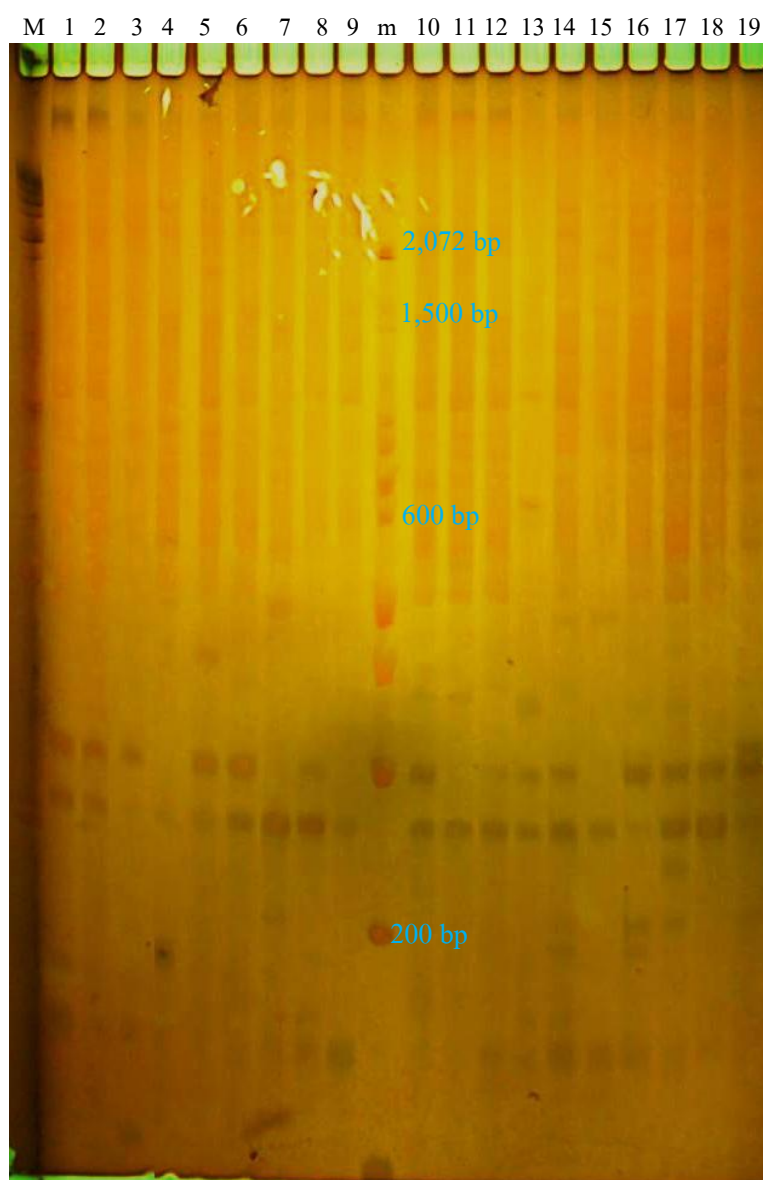
ไพรเมอร์ me5/em5 em14 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 25 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 300 – 10,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 10 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 15 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300, 360, 370, 480, 500, 550, 580, 600, 750, 800, 1,000, 1,100, 1,200, 1,300, 1,400 และ 3,000 คู่เบส (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me5/ em5 em14

(M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์กา; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

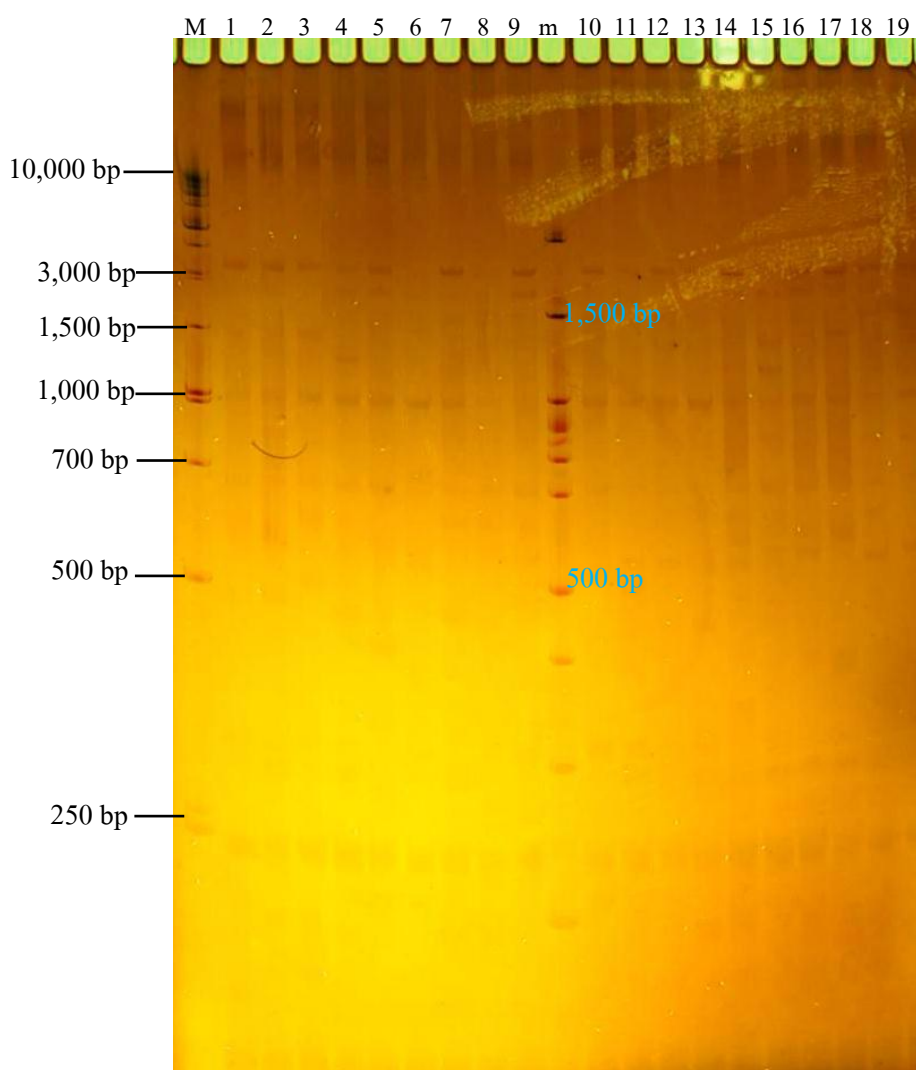
ไพรเมอร์ me5/ em5 em9 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 250 – 4,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 5 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 7 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1,500 คู่เบส (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 32 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me5/ em5 em9

(M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์กา; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

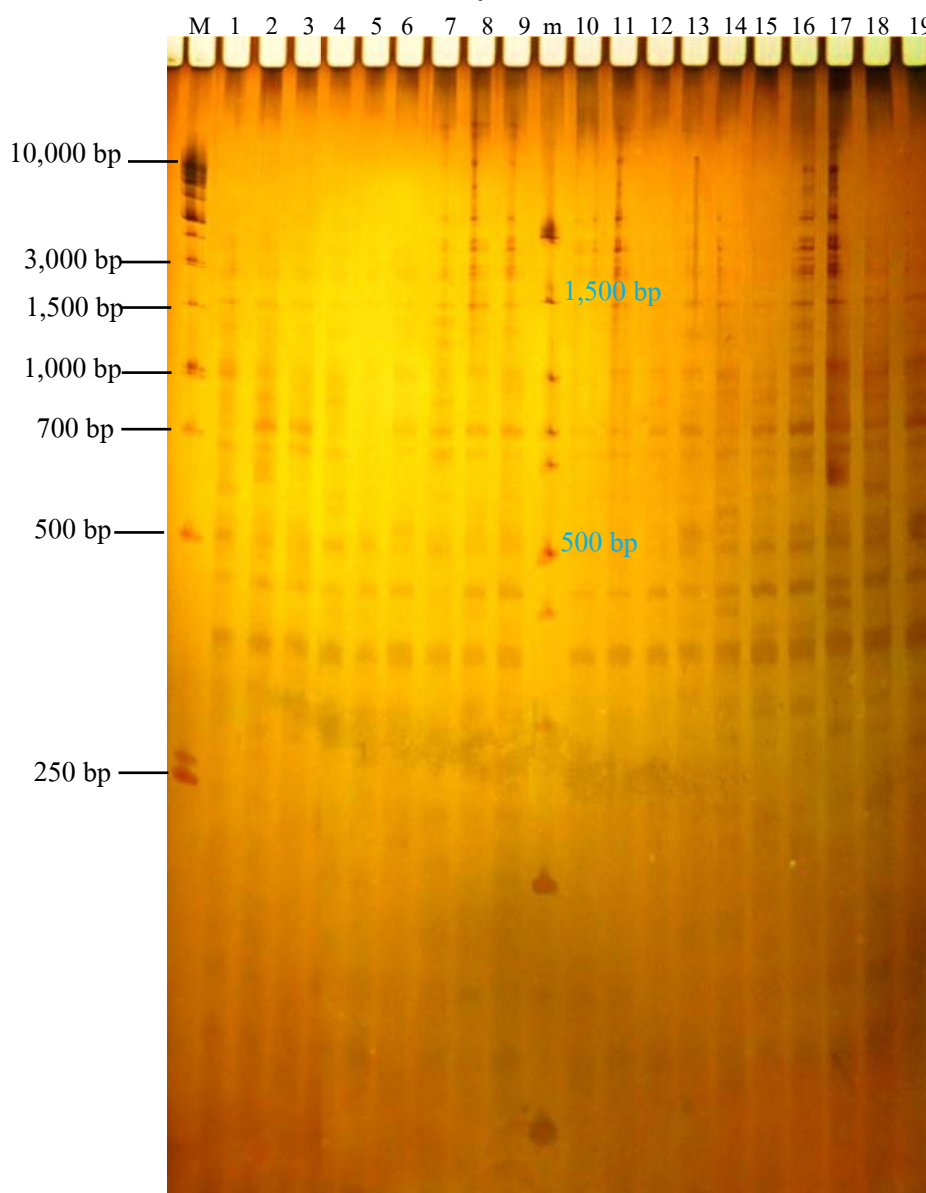
ไพรเมอร์ me1/ em8 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 15 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 100 – 3,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 8 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 7 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400, 450, 500, 550, 1,250, 1,500 และ 1,750 คู่เบส (ภาพที่ 33)



ภาพที่ 33 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me1/ em8

(M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์กา; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

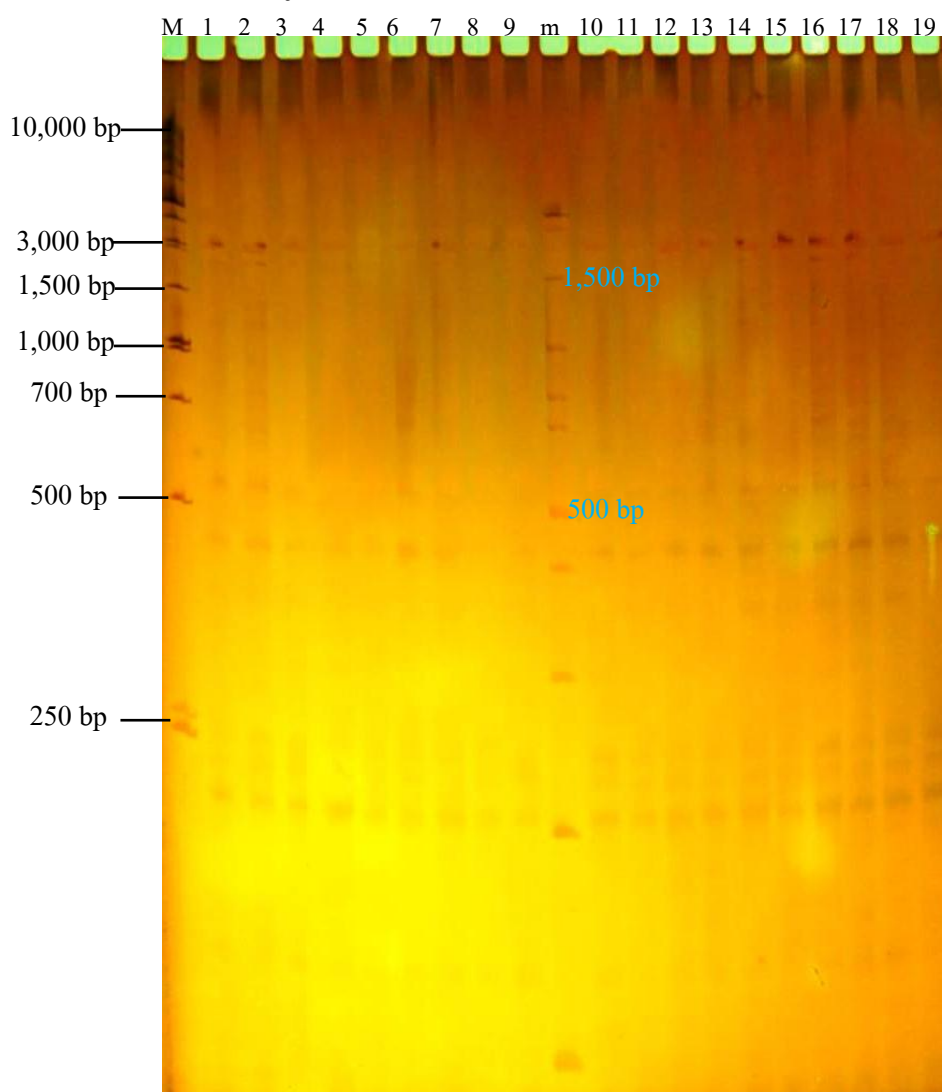
ไพรเมอร์ me2/ em5 em8 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 17 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 130 – 7,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 12 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 5 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 220, 4,000, 5,000, 6,000 และ 7,000 คู่เบส (ภาพที่ 34)



ภาพที่ 34 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me2/ em5 em8

(M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ดำ; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

ไพรเมอร์ me7/ em2 em8 ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 10 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 140 – 3,000 คู่เบส โดยพบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 7 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 350, 600 และ 700 คู่เบส (ภาพที่ 35)



ภาพที่ 35 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me7/ em2 em8

(M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ขาว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์กา; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

บันทึกข้อมูลแถบดีเอ็นเอของตาลโตนดเพศผู้และเพศเมีย จากการทำเอสอาร์เอพี จำนวน 20 รูปแบบไพรเมอร์ แล้วนำมาวิเคราะห์หลายพหุมิติเอ็นเอ คำนวณหาค่าดัชนีความเหมือน (Similarity Index) โดยใช้ Jaccard's Coefficient ด้วยโปรแกรม NTsys Version 2.1 ได้ค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.830 ± 0.07 โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.738 – 0.930 ดังตารางที่ 10 และนำมาจัดกลุ่มทาง พันธุกรรมของตาลโตนดด้วยวิธีวิเคราะห์ Unweighted Pair – Group Method with Arithmetic Average (UPGMA) โดยใช้ Jaccard's Coefficient ด้วยโปรแกรม NTsys Version 2.1 สามารถ จำแนกตาลโตนดออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้ตัวอย่างที่ 1 – 3

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม และเพศเมียตัวอย่างที่ 1 – 9 แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

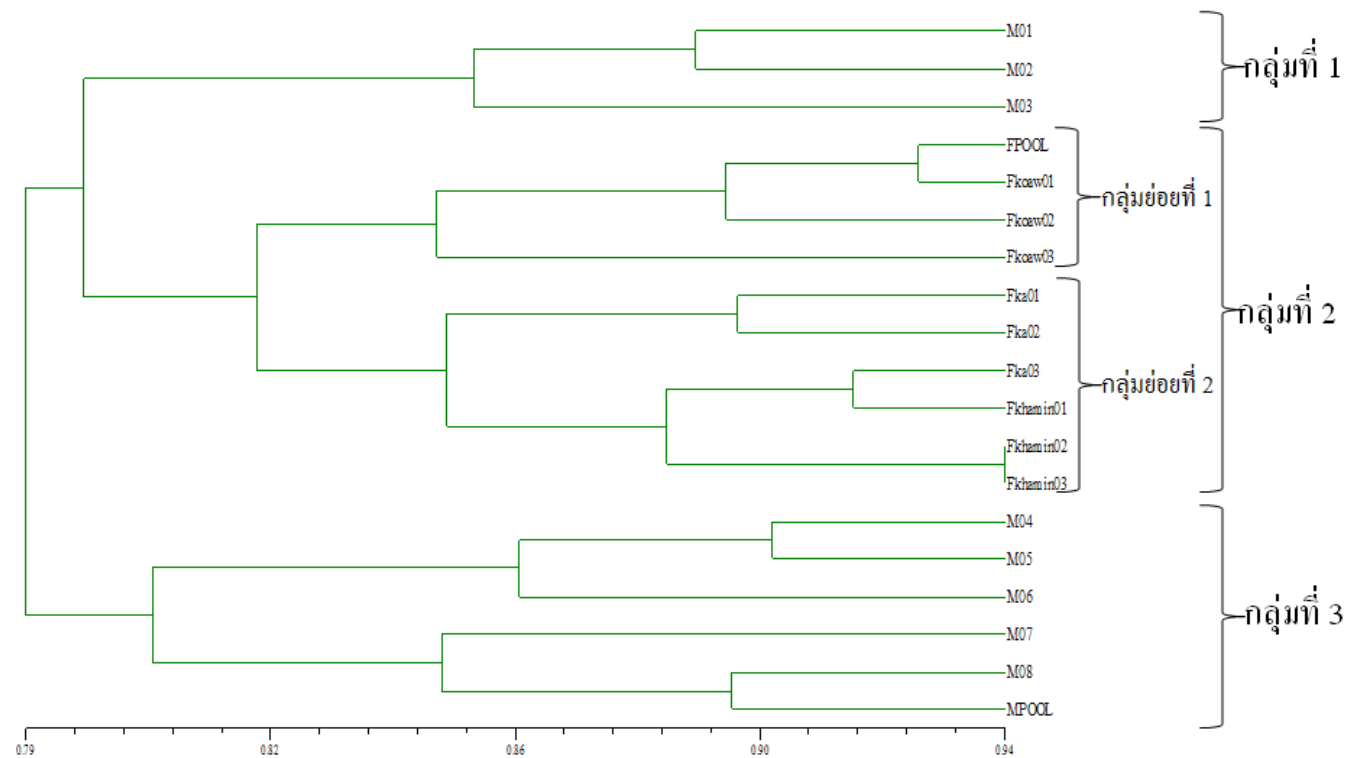
กลุ่มย่อยที่ 1 ได้แก่ เพศเมียรวม พันธุ์ขาวตัวอย่างที่ 1 – 3

กลุ่มย่อยที่ 2 ได้แก่ เพศเมียพันธุ์ดำตัวอย่างที่ 1 – 3 และพันธุ์มันตัวอย่างที่ 1 – 3

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม และเพศผู้ตัวอย่างที่ 4 – 8 ดังภาพที่ 36

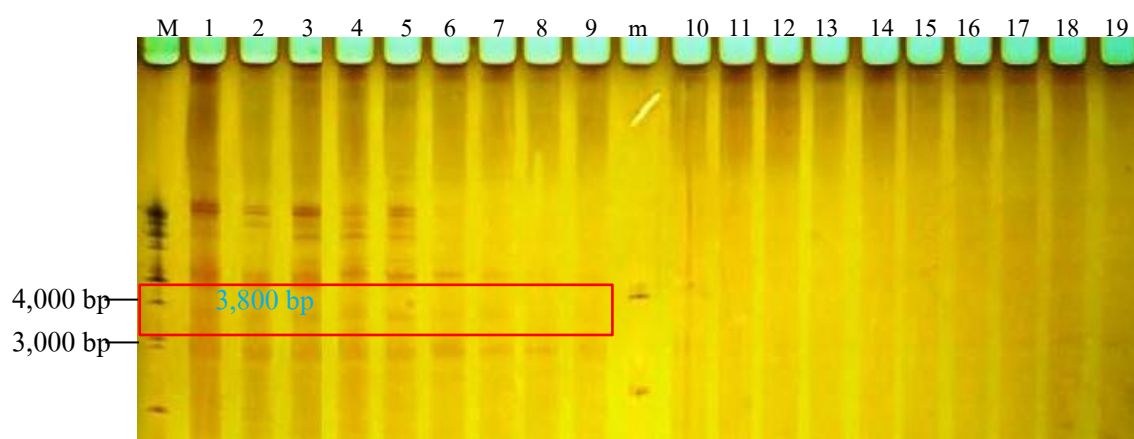
ตารางที่ 10 ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของตาลโตนด

	M01	M02	M03	M04	M05	M06	M07	M08	Fkoaw01	Fkoaw02	Fkoaw03	Fka01	Fka02	Fka03	Fkhamin01	Fkhamin02	Fkhamin03
M01	1.000																
M02	0.893	1.000															
M03	0.857	0.857	1.000														
M04	0.795	0.781	0.822	1.000													
M05	0.806	0.799	0.809	0.905	1.000												
M06	0.795	0.787	0.809	0.865	0.864	1.000											
M07	0.757	0.760	0.765	0.823	0.823	0.849	1.000										
M08	0.742	0.763	0.750	0.788	0.794	0.801	0.871	1.000									
Fkoaw01	0.807	0.782	0.786	0.789	0.783	0.801	0.793	0.795	1.000								
Fkoaw02	0.815	0.801	0.782	0.779	0.784	0.791	0.800	0.790	0.912	1.000							
Fkoaw03	0.769	0.755	0.766	0.738	0.755	0.744	0.790	0.793	0.845	0.860	1.000						
Fka01	0.767	0.777	0.770	0.766	0.777	0.778	0.819	0.803	0.867	0.869	0.854	1.000					
Fka02	0.750	0.759	0.758	0.772	0.778	0.766	0.788	0.804	0.810	0.825	0.822	0.900	1.000				
Fka03	0.798	0.791	0.771	0.768	0.785	0.786	0.795	0.798	0.829	0.837	0.809	0.864	0.866	1.000			
Fkhamin01	0.829	0.816	0.802	0.770	0.787	0.787	0.785	0.787	0.818	0.832	0.798	0.877	0.859	0.918	1.000		
Fkhamin02	0.846	0.827	0.837	0.786	0.785	0.798	0.777	0.774	0.793	0.806	0.790	0.844	0.832	0.877	0.930	1.000	
Fkhamin03	0.851	0.820	0.829	0.779	0.772	0.791	0.782	0.772	0.815	0.817	0.795	0.856	0.825	0.857	0.889	0.942	1.000

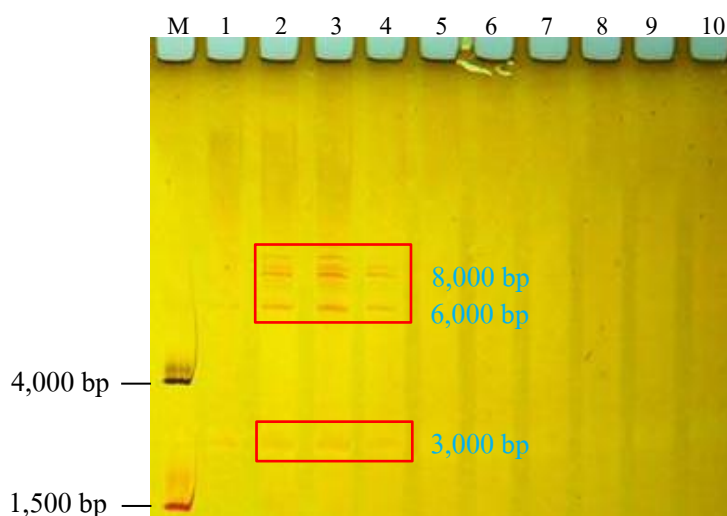


ภาพที่ 36 Cladogram ของตาลโตนด 19 ตัวอย่าง โดยโปรแกรม NTsys Version 2.1

จากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด 342 แถบ ปรากฏว่าไพรเมอร์ me2 / em5 em6 ให้แถบ ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,800 คู่เบส ที่พบเฉพาะในเพศผู้ แต่ไม่พบในเพศเมีย ซึ่งอาจจะเป็นแถบ ดีเอ็นเอที่บ่งชี้ความแตกต่างระหว่างเพศในตาลโตนดได้ (ภาพที่ 37) ไพรเมอร์ me7/ em2 em6 ให้ แถบดีเอ็นเอ 3 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000, 6,000 และ 8,000 คู่เบส ที่พบเฉพาะใน เพศเมียสายพันธุ์ข้าว (ภาพที่ 38) และไพรเมอร์ me1 / em5 em14 ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4,200 และ 5,000 คู่เบส ที่พบเฉพาะในเพศเมียสายพันธุ์มัน (ภาพที่ 39) ซึ่งอาจจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อตาลโตนดสายพันธุ์ข้าวและสายพันธุ์มัน ตามลำดับ

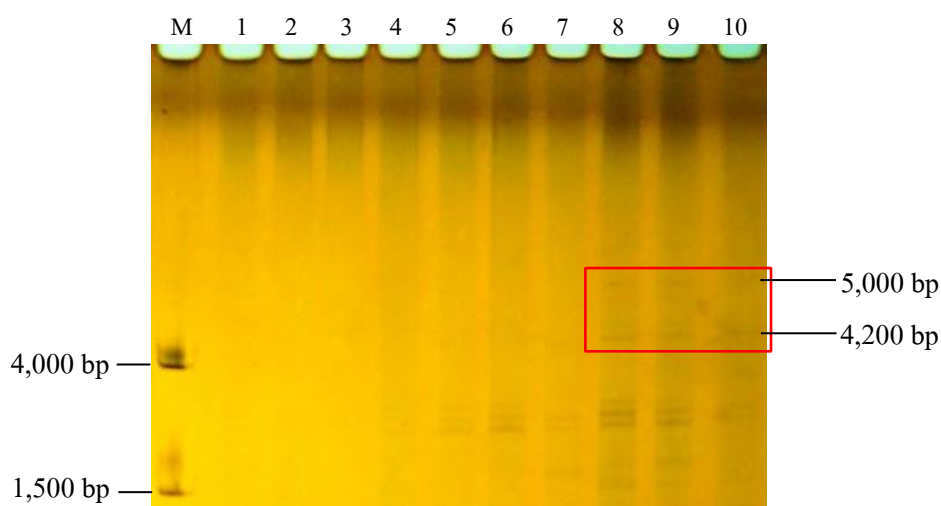


ภาพที่ 37 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรเมอร์ me2 / em5 em6 ซึ่งพบแถบ ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อตาลโตนดเพศผู้ (M คือ 1 Kb DNA Ladder; 1 – 8 คือ ตัวอย่าง ตาลโตนดเพศผู้; 9 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม; m คือ 100 bp DNA Ladder; 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 11 – 13 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ข้าว; 14 – 16 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์กา; 17 – 19 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)



ภาพที่ 38 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อตาลโตนดสายพันธุ์ข้าว ไพรเมอร์ me7/ em2 em6

(M คือ 100 bp DNA Ladder; 1 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 2 – 4 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ข้าว; 5 – 7 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์กา; 8 – 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)



ภาพที่ 39 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อตาลโตนดสายพันธุ์มัน ไพรเมอร์ me1 / em5 em14

(M คือ 100 bp DNA Ladder; 1 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม; 2 – 4 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์ข้าว; 5 – 7 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์กา; 8 – 10 คือ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียพันธุ์มัน)

บทที่ 5

บทย่อ สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

การโอไทป์ตาลโดนด

จำนวนโครโมโซมตาลโดนด คือ $2n = 2x = 36$ โครโมโซมขนาดใหญ่มีความยาวสัมพันธ์ คือ 0.034 ± 0.003 ถึง 0.051 ± 0.007 ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 1 – 6 โครโมโซมขนาดกลางมีความยาวสัมพันธ์ คือ 0.027 ± 0.003 ถึง 0.031 ± 0.006 ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 7 – 9 และโครโมโซมขนาดเล็กมีความยาวสัมพันธ์ คือ 0.013 ± 0.002 ถึง 0.025 ± 0.002 ได้แก่โครโมโซมคู่ที่ 10 – 18

ชนิดของโครโมโซม คือ โครโมโซมเมทาเซนทริกจำนวน 7 คู่ (คู่ที่ 1 – 7) โครโมโซมซับเมทาเซนทริกจำนวน 4 คู่ (คู่ที่ 8 – 10 และ 13) โครโมโซมอะโครเซนทริกจำนวน 4 คู่ (คู่ที่ 11, 12, 14 และ 16) และโครโมโซมเทโลเซนทริกจำนวน 3 คู่ (คู่ที่ 15, 17 และ 18)

สูตรการโอไทป์ของตาลโดนด คือ $2n = 2x = 36$ ประกอบด้วย $Lm12 + Mm2 + Msm4 + Ssm4 + Sac8 + St6$ และ $NF = 66$

เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี

ผลการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี จำนวน 20 รูปแบบไพรมอร์ ในตัวอย่างตาลโดนดเพศผู้และเพศเมียจำนวน 19 ตัวอย่าง ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 342 แถบ เฉลี่ย 17.1 แถบต่อชุดไพรมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 210 แถบ คิดเป็นร้อยละ 61.4 และให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 132 แถบ คิดเป็นร้อยละ 38.6 ไพรมอร์ me2/em5 em9 ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากที่สุด คือ 35 แถบ และให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันมากที่สุด คือ 16 แถบ ไพรมอร์ me2 / em5 em6 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,800 คู่เบส ที่พบเฉพาะในเพศผู้ แต่ไม่พบในเพศเมีย ซึ่งอาจจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อตาลโดนดเพศผู้ ไพรมอร์ me7/ em2 em6 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000 6,000 และ 8,000 คู่เบส ที่พบเฉพาะในเพศเมียสายพันธุ์ข้าว และไพรมอร์ me1 / em5 em14 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4,200 และ 5,000 คู่เบส ที่พบเฉพาะในเพศเมียสายพันธุ์มัน ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากไพรมอร์ทั้ง 2 รูปแบบ อาจจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อตาลโดนดสายพันธุ์ข้าวและสายพันธุ์มัน ตามลำดับ

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตาลโตนด วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTsys version 2.1 ตาลโตนด 19 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้ตัวอย่างที่ 1 – 3 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม และเพศเมียตัวอย่างที่ 1 – 9 แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือกลุ่มย่อยที่ 1 ได้แก่ เพศเมียรวม พันธุ์ข้าวตัวอย่างที่ 1 – 3 กลุ่มย่อยที่ 2 ได้แก่ พันธุ์กาตัวอย่างที่ 1 – 3 และพันธุ์มันตัวอย่างที่ 1 – 3 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ตัวอย่างตาลโตนดเพศผู้รวม และเพศผู้ตัวอย่างที่ 4 – 8 (ภาพที่ 36)

อภิปรายผลการศึกษา

การไต่ไปตาลโตนด

การเตรียมโครโมโซมจากปลายรากตาลโตนด เนื่องจากการเพาะเมล็ดตาลโตนด ต้องใช้ระยะเวลานานประมาณ 4 – 5 เดือน จึงจะงอกราก เนื้อเยื่อของรากตาลโตนดค่อนข้างแข็ง จึงต้องผ่าซีกของรากตาลโตนดออก เพื่อให้สารละลายพาราไคลคลอโรเบนซีน สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ดียิ่งขึ้น ทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะเมทาเฟส ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับนับจำนวนโครโมโซม เพราะสารละลายพาราไคลคลอโรเบนซีน ทำหน้าที่ยับยั้งการสร้างสายสปินเดิล ทำให้เห็นรอยกดของโครโมโซมชัดเจน และทำให้โครโมโซมหดสั้น น้ำยาคงสภาพคาร์บอน เป็นสารที่ทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะการแบ่งเซลล์ โดยเอทานอล ทำให้กรดนิวคลีอิกตกตะกอน เพราะเอทานอลมีคุณสมบัติดึงน้ำออกจากเซลล์ ทำให้พันธะไฮโดรเจนสลายและเกลียวที่เชื่อมกับโปรตีนขาดออกจากกัน ส่วนกรดอะซิติก ทำให้นิวคลีโอโปรตีนตกตะกอน และส่งผลให้เอทานอลมีประสิทธิภาพในการคงสภาพเซลล์ยิ่งขึ้น (สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช. 2538 : 40 – 50)

ผลการศึกษาจำนวนโครโมโซมของตาลโตนด โดยการศึกษาจากเซลล์ปลายรากด้วยวิธีการย้อมสีอะซีไดคาร์มิน พบว่ามีจำนวนโครโมโซม $2n = 2x = 36$ ใกล้เคียงกับพืชวงศ์ปาล์มชนิดอื่นซึ่งจากงานวิจัยของ Moro et al. (1995) ศึกษาจำนวนโครโมโซมของพืชวงศ์ปาล์ม 5 ชนิด โดยศึกษาจากปลายรากในระยะเมทาเฟส พบว่าจำนวนโครโมโซมของ *Aiphanes acanthophylla* $2n = 2x = 30$, *A. caryotaefolia* $2n = 2x = 30$, *Syagrus coronata* $2n = 2x = 32$, *Syagrus quinquifolia* $2n = 2x = 32$ และ *Scheelea lauromuelleriana* $2n = 2x = 32$ ซึ่งพบว่าจำนวนโครโมโซมของพืชทั้ง 5 ชนิดมีโครโมโซมใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง $2n = 2x = 30$ ถึง $2n = 2x = 32$ และงานวิจัยของ Roser (1994) ศึกษาเปรียบเทียบจำนวนโครโมโซมและการไต่ไปของพืชวงศ์ปาล์ม (Arecaceae) จากพืช 56 ตัวอย่างใน 6 Subfamilies พบว่าโครโมโซมของพืชใน Subfamily Coryphoideae ได้แก่ *Trithrinax brasiliensis*, *T. campestris*, *Cryosophila argentea*, *Itaya amicornum*, *Schippia concolor*,

Coccothrinax litoralis, *Zombia antillarum*, *Rhapis subtilis*, *Livistona rotundifolia* และ *Phoenix theophrasti* ซึ่งเป็น Subfamily เดียวกับตาลโตนด มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ $2n = 2x = 36$

ผลการศึกษาชนิดโครโมโซมของตาลโตนด พบว่าตาลโตนดมีโครโมโซมครบทั้ง 4 ชนิด คือ โครโมโซมเมทาเซนตริกจำนวน 7 คู่ (คู่ที่ 1 – 7) โครโมโซมซับเมทาเซนตริกจำนวน 4 คู่ (คู่ที่ 8 – 10 และ 13) โครโมโซมอะโครเซนตริกจำนวน 4 คู่ (คู่ที่ 11, 12, 14 และ 16) และ โครโมโซมเทโลเซนตริกจำนวน 3 คู่ (คู่ที่ 15, 17 และ 18) แตกต่างจากชนิดโครโมโซมของ อินทผาลัม (*Phoenix dactylifera* L.) ซึ่งเป็นพืชใน Sumfamily เดียวกัน โดยอินทผาลัมมีโครโมโซม 3 แบบ คือ โครโมโซมคู่ที่ 2 – 6 เป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนตริก โครโมโซมคู่ที่ 11 – 17 และ โครโมโซม Y เป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนตริก ที่เหลือเป็นโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนตริก (AbdAlla and Abd El-Kawy. 2010 : 165 – 170)

เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอฟ

การเก็บตัวอย่างใบอ่อนของตาลโตนดเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ งานวิจัยครั้งนี้ใช้ตัวอย่างเพศผู้ 8 ตัวอย่าง เพศเมีย 9 ตัวอย่าง แยกตามสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ขาว สายพันธุ์กา และสายพันธุ์ขมมีสายพันธุ์ละ 3 ตัวอย่าง เพศเมียสามารถเก็บตัวอย่างใบอ่อนตามสายพันธุ์ได้ เนื่องจาก เพศเมียติดผล ทำให้สามารถสังเกตลักษณะสีของผล คือ สายพันธุ์ขาว ผลมีสีน้ำตาลอมเหลือง สายพันธุ์กา ผลมีสีดำ มีรอยแตกกลางยาวทั่วทั้งผล และสายพันธุ์ขมมี ผลมีสีเหลืองอมน้ำตาล มีรอยแตกกลางเล็กน้อย ส่วนกันมีสีเหลืองเข้มคล้ายสีขม ในขณะที่ยังไม่ติดผล จึงไม่สามารถระบุพันธุ์ ส่วนลักษณะทางสัณฐานอื่นๆ ของตาลโตนดเพศผู้ ไม่สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์ได้ จึงเก็บตัวอย่างใบอ่อนตาลโตนดเพศผู้ โดยไม่ทราบสายพันธุ์

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนตาลโตนดด้วยวิธี Microprep DNA Extraction Buffer (ดัดแปลงจากวิธีของ Fulton, Chunzoongse and Tanksley. 1995 : 207 – 209) โดยการใช้การบดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลว เนื่องจากใบตาลโตนดมีลักษณะเหนียวและมีปริมาณเส้นใยสูงมาก จึงไม่สามารถบดให้ละเอียดได้เหมือนพืชชนิดอื่น ระยะการเจริญของใบที่นำมาใช้เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ เช่น การใช้ใบที่อ่อนเกินไป พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีสีน้ำตาลเนื่องจากมีสาร Phenolic Compound ปนเปื้อน ส่วนใบที่แก่เกินไป ดีเอ็นเอที่ได้จะมีปริมาณน้อยเนื่องจากใน 1 หน่วยพื้นที่ของใบมีเซลล์จำนวนน้อยและมีปริมาณเส้นใยมาก ดังนั้นการเลือกระยะการเจริญของใบที่เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณมากและคุณภาพดี แม้ว่าจะเลือกใบระยะที่เหมาะสม แต่ใบของตาลโตนดมีความเหนียวและมีโพลีแซคคาไรด์ปนเปื้อน

ดังนั้นจึงใช้สาร CTAB ซึ่งมีคุณสมบัติในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีนและสารโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งสามารถช่วยในการกำจัดสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีปริมาณมากในพืชออกไปได้ (ชนากร วงษา, อภินันท์ ลิ้มมงคลและอนุพันธ์ กงบังเกิด. 2008 : 165 – 175) ช่วยทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดีขึ้น

เมื่อนำดีเอ็นเอตาลโตนคที่สกัดได้ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ระหว่าง 0.277 – 0.746 ส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร มีค่าระหว่าง 0.149 – 0.422 อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร มีค่าระหว่าง 1.73 – 1.98 ค่าเฉลี่ย 1.83 ± 0.069 ซึ่งเป็นค่าที่แสดงว่าดีเอ็นเอมีคุณภาพดี แต่ถ้ามียาค่าต่ำกว่า 1.8 หรือสูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีโปรตีนหรืออาร์เอ็นเอปนเปื้อน ดังนั้นดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบตาลโตนคในการศึกษาครั้งนี้ ถ้าพิจารณาจากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ดีเอ็นเอตาลโตนคบางตัวอย่างมีโปรตีนหรืออาร์เอ็นเอปนเปื้อน อาจมีสาเหตุมาจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ เมื่อนำดีเอ็นเอซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 วันไปตรวจสอบปริมาณและคุณภาพด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีขนาดใหญ่ และแถบดีเอ็นเอเป็นแถบเดี่ยว แต่มีความหนาแน่นมาก ซึ่งหากมีอาร์เอ็นเอหรือโปรตีนปนเปื้อนตามค่าอัตราส่วนระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจะไม่เป็นแถบเดี่ยว อาจเนื่องมาจากการเก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้หลายวัน จึงทำให้อาร์เอ็นเอเสียสภาพ เมื่อนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอปรากฏว่ามีค่าระหว่าง 692.5 – 1,865 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ค่าเฉลี่ย $1,163 \pm 0.31$ ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ดังนั้นดีเอ็นเอที่สกัดได้ ซึ่งมีปริมาณมากและคุณภาพค่อนข้างดี จึงมีความเหมาะสมในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

ผลการใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอฟิ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของตาลโตนค ซึ่งมีตัวอย่างดีเอ็นเอจากใบตาลโตนค 19 ตัวอย่าง คือ เพศผู้ 8 ตัวอย่าง เพศเมีย 9 ตัวอย่าง จำแนกตามสายพันธุ์ ตัวอย่างเพศผู้รวมและเพศเมียรวมอย่างละ 1 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์ทดสอบเบื้องต้นจำนวน 10 ไพรเมอร์ คือ me 1, 2, 5, 7 และ em 2, 5, 6, 8, 9, 14 (Li and Quiros. 2001 : 455 – 461) โดยทดสอบไพรเมอร์แบบคู่ และแบบ 3 ไพรเมอร์ จำนวน 20 ชุดไพรเมอร์ พบว่าทั้ง 20 ชุดไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 5 – 35 แถบ รวม 342 แถบ เฉลี่ย 17.1 แถบต่อชุดไพรเมอร์ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการศึกษาความหลากหลายของแก่นตะวันด้วยเทคนิคเอสอาร์เอฟิ (คลรัชต์ สุธหล้า และคณะ. 2553 : 476 – 481) โดยใช้ไพรเมอร์เพียง 9 คู่ไพรเมอร์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอระหว่าง

12 – 37 แถบ มีค่าเฉลี่ย 24.33 แถบ แต่ใช้ตัวอย่างเกินตะวัน 47 สายพันธุ์ ซึ่งตัวอย่างมากกว่า ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีโอกาสทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอได้มากกว่า

ผลการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิก มีค่าระหว่าง 0 – 60 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ย คือ 36.13 เปอร์เซ็นต์ และค่า PIC มีค่า 0 – 0.941 ค่าเฉลี่ย คือ 0.694 ± 0.305 ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง แสดงว่าตาลโตนดที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีความแตกต่างมากพอที่จะวิเคราะห์ความหลากหลายทาง พันธุกรรมด้วยเทคนิคเอสอาร์เอพี ส่วนค่าดัชนีความเหมือนในงานวิจัยครั้งนี้มีค่าระหว่าง 0.738 – 0.930 เฉลี่ย 0.830 ± 0.07 ซึ่งเป็นค่าที่ค่อนข้างสูง แสดงว่าตัวอย่างตาลโตนดที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ น่าจะมีพันธุกรรมใกล้เคียงกันหรือมีฐานพันธุกรรมค่อนข้างแคบ

ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พบว่าไพรเมอร์ me2 / em5 em6 ให้แถบดีเอ็นเอขนาด ประมาณ 3,800 คู่เบส ที่พบเฉพาะในเพศผู้ แต่ไม่พบในเพศเมีย ซึ่งอาจจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ ต่อตาลโตนดเพศผู้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wenshan, Xiaodong and Youling. (2008 : 688 – 691) และ Zhou, Wang and Zhang. (2011 : 261 – 266) ใช้เทคนิคเอสอาร์เอพี เพื่อคัดเลือก แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศใน *Ficus pumila* L. และ *Buchloe dactyloides* Nutt. ตามลำดับ และ พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศ แต่งานวิจัยทั้ง 2 งานวิจัยข้างต้น พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศ เมีย และแถบดีเอ็นเอที่พบมีขนาดสั้นเพียงประมาณ 230 และ 240 คู่เบส นอกจากนี้ยังพบว่า ไพรเมอร์ me7/ em2 em6 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000, 6,000 และ 8,000 คู่เบส ที่พบเฉพาะ ในเพศเมียสายพันธุ์ข้าว และไพรเมอร์ me1 / em5 em14 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4,200 และ 5,000 คู่เบส ที่พบเฉพาะในเพศเมียสายพันธุ์มัน ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์ทั้ง 2 รูปแบบ อาจจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อตาลโตนดสายพันธุ์ข้าวและสายพันธุ์มัน แต่ใน ตัวอย่างเพศเมียรวม ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าว อาจเนื่องมาจากปริมาณดีเอ็นเอสายพันธุ์ข้าว และสายพันธุ์มันมีปริมาณน้อยมาก จึงทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวด้วย ไพรเมอร์ทั้งสองได้ แถบดีเอ็นเอที่พบควรนำไปหาลำดับเบส เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ ใช้ในการจำแนกเพศ เช่นเดียวกับการพัฒนาเครื่องหมายเอสซีเออาร์ เพื่อจำแนกเพศใน *Ginkgo biloba* L. (Liao et al. 2009 : 49 - 55)

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของตาลโตนด วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย โปรแกรม NTsys version 2.1 ตาลโตนด 19 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ตัวอย่างตาลโตนดเพศ ผู้ตัวอย่างที่ 1 – 3 กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ตัวอย่างตาลโตนดเพศเมียรวม และเพศเมียตัวอย่างที่ 1 – 9 แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือกลุ่มย่อยที่ 1 ได้แก่ เพศเมียรวม พันธุ์ข้าวตัวอย่างที่ 1 – 3 กลุ่มย่อยที่ 2 ได้แก่ พันธุ์กาตัวอย่างที่ 1 – 3 และพันธุ์มันตัวอย่างที่ 1 – 3 กลุ่มที่ 3 ได้แก่ ตัวอย่างตาลโตนดเพศ ผู้รวม และเพศผู้ตัวอย่างที่ 4 – 8 ซึ่งจากการวิเคราะห์ สามารถจำแนกเพศของตาลโตนดออกเป็น

กลุ่มได้ชัดเจน ดังนั้นเทคนิคเอสอาร์เอพี จึงมีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะใช้ในการจำแนกเพศของตาลโตนดได้

ข้อเสนอแนะ

1. ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - 1.1 ข้อมูลเกี่ยวกับคาริโอไทป์ของตาลโตนด ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงสายพันธุ์ของตาลโตนด
 - 1.2 แอบริเอ็นเอที่จำเพาะต่อเพศและสายพันธุ์ของตาลโตนด ใช้เป็นเครื่องหมายเพื่อคัดเลือกเพศและสายพันธุ์ของตาลโตนดในระยะต้นกล้า
2. ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยต่อไป
 - 2.1 การศึกษาเกี่ยวกับคาริโอไทป์ ควรใช้เทคนิคการย้อมแถบโครโมโซม เพื่อให้ง่ายต่อการจัดคาริโอไทป์
 - 2.2 ควรศึกษาแอบริเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างเพศตาลโตนด ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายเอสซีอาร์ สำหรับใช้ในการจำแนกเพศตาลโตนด

บรรณานุกรม

- คลรัชต์ สุดหล้า, ปรีชา พวงสำลี หวังสมนึก, พิเชษฐ์ศักดิ์ ศรีวงศ์, พินิจ หวังสมนึก, สนั่น จอกลอย และอรันต์ พัฒโนทัย. (2553). “ความหลากหลายของแก่นตะวันจากการวิเคราะห์ด้วย เครื่องหมายโมเลกุล SRAPs,” ในเอกสารการประชุมวิชาการเกษตร. (หน้า 476 – 481). วันที่ 25 – 26 มกราคม 2553 ณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ธนากร วงษ์สา, อภินันท์ ลิ้มมงคลและอนุพันธ์ กงบังเกิด. (2008). “การเปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้าง,” NU Science Journal. 5(2), 165 – 175.
- ปรัชญา รัศมีธรรมวงศ์. (2537). ตาลโตนดมรดกพืชจากบรรพบุรุษ แหล่งสร้างงานสร้างชีวิต. กรุงเทพฯ : เพชรกะรัต.
- ปรีชา ประเทพา. (2543). พันธุศาสตร์ยุคใหม่ เทคโนโลยีดีเอ็นเอเพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากร พันธุกรรม. มหาสารคาม : อภิชาติการพิมพ์.
- ปัทมกร วงศ์จิตรวรรณ. (2554). ตาลโตนด. สืบค้นเมื่อ 16 สิงหาคม 2554 จาก <http://www.gotoknow.org>.
- พรรณิภา โสคติพันธุ์, สอาด สินไชย, ทวิช ปริสวงศ์, สมปอง ยอดมณี, ไพฑูรย์ ศิริรักษ์และ พรชัย ศรีไพบูลย์. (2547). วัฒนธรรมตาลโตนด กระบวนการสร้างชุมชนเข้มแข็ง. กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- พวงผกา สุนทรชัยนาคแสง. (2548). การศึกษาโครโมโซมพืช. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- ไพฑูรย์ ศิริรักษ์. (2551). ๑๐๐ ประโยชน์ตาลโตนดไทย ผลผลิตวัฒนธรรมชุมชนบนคาบสมุทร สทิงพระ. สงขลา : วิทยาลัยภูมิปัญญาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง.
- ไพฑูรย์ ศิริรักษ์. (2553). วิถีแบบบ้านบ้าน. สืบค้นเมื่อ 18 สิงหาคม 2553 จาก <http://www.gotoknow.org>.
- สมศักดิ์ อภิลิทธิวาณิช. (2538). พันธุศาสตร์ของเซลล์เบื้องต้น. กรุงเทพฯ : ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สำนักงานเกษตรจังหวัดเพชรบุรี. (2545). สาขาการเกษตรที่สำคัญ. สืบค้นเมื่อ 18 สิงหาคม 2553 จาก <http://www.raisathon.com/otop/otop>.

- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. (2545). จีโนมและเครื่องหมายโมเลกุล:ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอเอฟแอลพี. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. (2552). เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุนิดา อัญจิรวโรจน์, อัจฉริยา รังษิรุจิและธวัช ดอนสกุล. (2551). “การไอโทปและชีววิทยาระดับโมเลกุลของมะขามหวาน (พืชสกุลมะขาม) ในจังหวัดเพชรบูรณ์,” วารสารวิทยาศาสตร์ศรีนครินทรวิโรฒ. 24(1), 183 – 198.
- องค์การบริหารส่วนตำบลไร่มะทอน. (มปป). แหล่งท่องเที่ยวและสินค้า OTOP. สืบค้นเมื่อ 5 สิงหาคม 2554 จาก <http://www.raisathon.com>
- อมรา คัมภีรานนท์. (2546). พันธุศาสตร์ของเซลล์. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อลงกต แทนอมทอง, สัมภาษณ์ คุณสุข, วิวรรณ แก่นสาและเรืองวิทย์ บรรจงรัตน์. (2005). “พันธุศาสตร์เซลล์ของลิงกัง (*Macaca nemestrina*) ด้วยวิธีการย้อมสีแบบธรรมดา,” Naresuan University Journal. 13(3), 1 – 11.
- อัจฉริยา รังษิรุจิ, ฐปิตรา ผ่องแผ้ว และธวัช ดอนสกุล. (2549). “การไอโทปของพืชสกุลระกำบางชนิดในประเทศไทยและอินโดนีเซีย,” วารสารวิทยาศาสตร์ศรีนครินทรวิโรฒ. 22(2), 49 – 61.
- AbdAlla, M.M. and Abd El-Kawy, A.M. (2010). “Karyotype analisis for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) compared with tissue culture derived plants,” New York Science Journal. 3(11), 165 – 170.
- Agrawal, V., Sharma, K., Gupta, S., Kumar, R. and Prasad, M. (2007). “Identification of sex in *Simmondsia chinensis* (Jojoba) using RAPD markers,” Plant Biotechnology Reports. 1, 207 – 210.
- Ainsworth, C. (2000). “Boys and girls come out to play:the molecular biology of dioecious plants,” Annals of Botany. 86(1), 211 – 221.
- Bloggang. โครโมโซม. Retrieved August 18, 2010, from <http://www.bloggang.com>
- Deputy, J.C., Ming, R., Ma, H., Liu, Z., Fitch, M.M.M., Wang, M., Manshardt, R. and Stiles, J.I. (2002). “Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.),” Theoretical and Applied Genetics. 106 (1), 107 – 111.

- Fulton, T.M., Chunwongse, J. and Tanksley, S.D. (1995). "Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants," Plant Molecular Biology Reporter. 13 (3), 207 – 209.
- Gunter, L.E., Roberts, G.T., Lee, K., Larimer, F.W. and Tuskan, G.A. (2003). "The development of two flanking SCAR markers linked to a sex determination locus in *Salix viminalis* L.," Heredity. 94, 185–189.
- Hardenack, S.L. and Grant, S.R. (1997). "Genetics of sex determination in flowering plants," Trends in Plant Sciences. 2(4), 130 – 136.
- Hormaza, J. I., Dollo, L. and Polito, V.H. (1994). "Determination of relatedness and geographical movements of *Pistacia vera* L. (pistachio, Anacardlaceae) germplasm by RAPD analysis," Economic Botany. 48, 349 – 358.
- Juarez, C. and Banks, J.A. (1998). "Sex determination in plants," Current Opinion in Plant Biology. 1, 68 – 72.
- Karun, A., George, J., Manimekalai, R., Rajesh, M.K. and Remya, P. (2007). Identification of RAPD markers linked to sex determination in palmyrah (*Borassus flabellifer* L.)," Current Science. 93(8), 1075 – 1077.
- Lemos, M.E.G., Silva, P.C.L.S. and Zaidan, A.H. (2002). "Identification of sex in *Carica papaya* L. using RAPD markers," Euphytica. 127 (2), 179 – 184.
- Li, G. and Quiros, C.F. (2001). "Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction:its application to mapping and gene tagging in Brassica," Theoretical and Applied Genetics. 103, 455 – 461.
- Liao, L., Liu, J., Dai, Y., Li, Q., Xie, M., Chen,Q., Yin, H., Qiu, G. and Liu, X. (2009). "Development and application of SCAR markers for sex identification in the dioecious species *Ginkgo biloba* L.," Euphytica. 169, 49 – 55.
- Mandolino, G., Carboni, A., Forapani, S., Faeti, V. and Ranalli, P. (1999). " Identification of DNA markers linked to the male sex in dioecious hemp (*Cannabis sativa* L.)," Theoretical and Applied Genetics. 98, 86 – 92.
- Maria, M. Clyde, M. and Cheah, S. (1995). "Cytological analysis of *Elaeis guineensis* (tenera) chromosomes," Elaeis. 7(2), 122 – 134.

- Ming, R., Wang, J., Moore, P.H. and Paterson, A.H. (2007)^a. “Sex chromosomes in flowering plants,” American Journal of Botany. 94(2), 141 – 150.
- Ming, R., Yu, Q. and Moore, P.H. (2007)^b. “Sex determination in papaya,” Seminars in Cell & Developmental Biology. 18, 401 – 408.
- Moro, J.R., Silva, M.A.S and Geraldo, J.S. (1999). “Methodology for karyological study of Brazilian palms,” Acta Horticulture. 486, 225 – 228.
- Nakayama, H., Ito, T., Hayashi, Y., Sonoda, T., Fukuda, T., Ochiai, T., Kameya, T. and Kanno, A. (2006). “Development of sex – linked primers in garden asparagus (*Asparagus officinalis* L.),” Breeding Science. 56, 327 – 330.
- Parkinson, S.E., Gross, S.M. and Hollick, J.B. (2007). “Maize sex determination and abaxial leaf fates are canalized by a factor that maintains repressed epigenetic states,” Developmental Biology. 308, 462 – 473.
- Peil, A., Flachowsky, H., Schumann, E. and Weber, W.E. (2003). “Sex-linked AFLP markers indicate a pseudoautosomal region in hemp (*Cannabis sativa* L.),” Theoretical and Applied Genetics. 107, 102 – 109.
- Rahman, M. A. and Ainsworth, C. C. (2004). “AFLP analysis of genome difference between male and female in dioecious plant *Rumex acetosa*,” Biological Sciences. 4(2), 160 – 169.
- Reamon - Buttner, S.M., Schondelmaier, J. and Jung, C. (1998). “AFLP markers tightly linked to the sex locus in *Asparagus officinalis* L.,” Molecular Breeding. 4, 91 – 98.
- Roser, M. (1994). “Pathways of karyological differentiation in palms (Arecaceae),” Plant Systematics and Evolution. 189, 83 – 122.
- Samantaray, S., Geetha, K.A., Hidayath, K.P. and Maiti, S. (2010). “Identification of RAPD markers linked to sex determination in guggal [*Commiphora wightii* (Arnott.)] Bhandari,” Plant Biotechnology Reports. 4, 95 – 99.
- Sharma, K., Agrawal, V., Gupta, S., Kumar, R. and Prasad, M. (2008). “ISSR marker-assisted selection of male and female plants in a promising dioecious crop: jojoba (*Simmondsia chinensis*),” Plant Biotechnology Reports. 2, 239 – 243.
- Tanurdzic, M. and Banks, J.A. (2004). “Sex – determining mechanisms in land plants,” The Plant Cell. 16, 61 – 71.

- Urasaki, N., Tokumoto, M., Tarora, K., Ban, Y., Kayano, T., Tanaka, H., Oku, H., Chinen, I. and Terauchi, R. (2002). "A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.)," Theoretical and Applied Genetics. 104, 281–285.
- Uzun, A., Gulsen, O., Seday, U., Bircan, M. and Yilmaz, K.U. (2010). "SRAP based genetic analysis of some apricot cultivars," Romanian Biotechnological Letters. 15(4), 5396 – 5404.
- Wenshan, W., Xiaodong, Z. and Youling, C. (2008). "Identification of a sex-associated SRAP marker in *Ficus pumila* L.," Chinese Journal of Applied and Environmental Biology. 14(5), 688 – 691.
- Yakubov, B., Barazani, O. and Golan-Goldhirsh, A. (2005). "Combination of SCAR primers and touchdown – PCR for sex identification in *Pistacia vera* L.," Scientia Horticulturae. 103, 473 – 478.
- Younis, R.A.A., Ismail, O.M. and Soliman, S.S. (2008). "Identification of sex-specific DNA markers for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) using RAPD and ISSR techniques," Agriculture and Biological Sciences. 4(4), 278 – 284.
- Zhao, W., Fang, R., Pan, Y., Yang, Y., Chung, J.W., Chung, I.M. and Park, Y.J. (2009). "Analysis of genetic relationships of mulberry (*Morus* L.) germplasm using sequence – related amplified polymorphism (SRAP) markers," African Journal of Biotechnology. 8(11), 2604 – 2610.
- Zhou, Y., Wang, X., Zhang, X. (2011). "Development and application of a SRAP marker for the identification of sex in *Buchloe dactyloides*," Euphytica. 181(2), 261 – 266.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

DNA Extraction Buffer

1 M Tris (pH 8.0)	0.5	ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0.5	ml
5 M NaCl	0.6	ml
10% SDS	1.0	ml
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	10	ml

Nuclelysis Buffer

Tris Base	24.20	g
EDTA	18.60	g
NaCl	116.9	g
CTAB	20.0	g
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 mL		

5% Sarkosyl

N-Lauroylsarcosine	5	g
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	100	ml

Microprep Buffer

DNA Extraction Buffer	125	ml
Nuclelysis Buffer	125	ml
5% Sarkosyl	50	ml
Sodium Bisulfate	2.5 g (เติมก่อนการใช้งาน)	

Chloroform : Isoamyl (24:1)

Chloroform	24	ml
Isoamyl	1	ml

5 M NaCl

Sodium Chloride	29.2	g
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	100	ml

0.5 M EDTA (pH 8.0)

EDTA	18.612	g
ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อยปรับ pH 8.0		
ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ปริมาตร	100	ml

10% CTAB

CTAB	2.5	g
5 M NaCl	3.5	ml
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	25	ml

TE Buffer (pH 8.0)

1 M Tris (pH 8.0)	0.5	ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0.1	ml
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	50	ml

10X TBE

Tris Base	54	g
Boric Acid	27.5	g
0.5 M EDTA pH 8.0	20	ml
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	500	ml

1X TBE

10X TBE	100	ml
เติมน้ำกลั่นปริมาตร	900	ml

0.8 % Agarose Gel

Agarose	0.4	g
1x TBE Buffer	50	ml

40 % Acrylamide (19:1)

Acrylamide	38	g
Bis – acrylamide	2	g
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	100	ml

10 % Ammonium Persulfate (APS)

Ammonium Persulfate	1	g
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	10	ml

Fix/Stop

10 % Acetic Acid	50	ml
------------------	----	----

เติมน้ำกลั่นปริมาตร	450	ml
---------------------	-----	----

0.2 % Silver Nitrate

Silver Nitrate	1	g
----------------	---	---

น้ำกลั่นปริมาตร	500	ml
-----------------	-----	----

Developer

Sodium Thiosulfate	12.5	g
--------------------	------	---

น้ำกลั่นปริมาตร	500	ml
-----------------	-----	----

37 % Formaldehyde	625	μl
-------------------	-----	----

10 mg/ml Sodium Thiosulfate	250	μl
-----------------------------	-----	----

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล	นายอนุรุธ หมีดเส้น
วัน เดือน ปีเกิด	4 มกราคม 2525
ภูมิลำเนา	จังหวัดราชบุรี
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	12 หมู่ 5 ตำบลกะปาง อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครศรีธรรมราช 80310
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	โรงเรียนเสมีดจวนวิทยาคม ตำบลกุแหระ อำเภอกำแพงแสน จังหวัด นครศรีธรรมราช 80240
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2548	หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยทักษิณ อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา
พ.ศ. 2554	หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยทักษิณ อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา

ผลงานทางวิชาการ

อนุรุธ หมีดเส้น และอรุณรัศมี วณิชชานนท์. (2553). “การไอบีโตปาลโตนด (*Borassus flabellifer* L.)”. ในเอกสารการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 36 (วทท 36). สถานที่จัด ศูนย์นิทรรศการและการประชุมไบเทค กรุงเทพฯ : สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์.