

การโอบีปป์ตาลโตนด (*Borassus flabellifer* L.) และความแตกต่างทาง
พันธุกรรมระหว่างเพศโดยใช้เครื่องหมาย SRAP

อนรุทธิ รมิดเสน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยทักษิณ

2555



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยทักษิณ

ชื่อวิทยานิพนธ์ : คาริโอไทป์ตาลโตนด (*Borassus flabellifer* L.) และความแตกต่างทางพันธุกรรม
ระหว่างเพศโดยใช้เครื่องหมาย SRAP
ชื่อ – ชื่อสกุลผู้ทำวิทยานิพนธ์ : นายอนุรุทธิ์ หมิดเส้น

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์

(อาจารย์ ดร. อรุณรศมี วณิชชานนท์)
ประธานที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี)
ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร. เปลื้อง สุวรรณมณี)
กรรมการที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร. อรุณรศมี วณิชชานนท์)
กรรมการ

(อาจารย์ ดร. เปลื้อง สุวรรณมณี)
กรรมการ

มหาวิทยาลัยทักษิณอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยทักษิณ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมภพ อินทสุวรรณ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือนมีนาคม พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยทักษิณ

บทคัดย่อ

ชื่อวิทยานิพนธ์ : คาริโอไทป์ตาลโดนด (*Borassus flabellifer* L.) และความแตกต่างทางพันธุกรรม

ระหว่างเพศโดยใช้เครื่องหมาย SRAP

ชื่อ – ชื่อสกุลผู้ทำวิทยานิพนธ์ : นายอนุรุทธิ์ หมิดเสน

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : อาจารย์ ดร. อรุณรัสมิ์ วัฒนชานนท์

อาจารย์ ดร. เปลื้อง สุวรรณมณี

ปริญญาและสาขาวิชา : ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยา

ปีที่สำเร็จการศึกษา : 2554

ตาลโดนด เป็นพืชแยกเพศที่มีความสำคัญต่อวิถีชีวิตและเศรษฐกิจของจังหวัดสงขลา ดันเพศเมียมีประโยชน์มากกว่าดันเพศผู้ เนื่องจากดอกเพศเมียพัฒนาไปเป็นผลและเมล็ด แต่เกษตรกรไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างดันเพศผู้และเพศเมียได้ในระยะแรกของการเจริญเติบโต อีกทั้งข้อมูลพื้นฐานทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ยังมีน้อย งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อศึกษาจำนวนโครโมโซม และลักษณะคาริโอไทป์ พบว่า ตาลโดนดมีสูตรคาริโอไทป์ $2n = 2x = 36 = Lm12 + Mm2 + Msm4 + Ssm4 + Sac8 + St6$, $NF = 66$ และการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี เพื่อค้นหาเครื่องหมายบ่งชี้เพศ ใช้ตัวอย่างตาลโดนดเพศผู้ 8 ตัวอย่าง เพศเมีย 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ขาว สายพันธุ์กา และสายพันธุ์มัน สายพันธุ์ละ 3 ตัวอย่าง ทดสอบด้วยไพรเมอร์ 20 ชุด ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 342 แถบ เฉลี่ย 17.1 แถบต่อไพรเมอร์ โดยมีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 132 แถบ (38.6%) พบว่าไพรเมอร์ $me2 / em5$ $em6$ ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,800 คู่เบส ที่พบเฉพาะในดันเพศผู้ อาจจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่บ่งชี้ความแตกต่างระหว่างเพศในตาลโดนดได้ ไพรเมอร์ $me7 / em2$ $em6$ ให้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,000, 6,000 และ 8,000 คู่เบส ที่พบเฉพาะในสายพันธุ์ขาว และไพรเมอร์ $me1 / em5$ $em14$ ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ คือ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4,200 และ 5,000 คู่เบส ที่พบเฉพาะในสายพันธุ์มัน อาจจะเป็นแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อตาลโดนดสายพันธุ์ขาวและสายพันธุ์มัน ตามลำดับ ค่าดัชนีความเหมือนเฉลี่ยเท่ากับ 0.83 ± 0.07 ค่าเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิกเฉลี่ย 36.13 และค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.694 ± 0.305 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี Unweighted Pair – Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA) สามารถจัดตาลโดนดเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ตาลโดนดเพศผู้ตัวอย่างที่ 1 – 3 กลุ่มที่ 2 ตาลโดนดเพศเมียตัวอย่างที่ 1 – 9 แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือกลุ่มย่อยที่ 1 เพศเมียพันธุ์ขาวตัวอย่างที่ 1 – 3 กลุ่มย่อยที่ 2 พันธุ์กาตัวอย่าง

ที่ 1 – 3 และพันธุ์มันตัวอย่างที่ 1 – 3 กลุ่มที่ 3 ตาลโตนดเพศผู้ตัวอย่างที่ 4 – 8 ผลการศึกษาครั้งนี้
เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับจำแนกเพศของตาลโตนด เพื่อใช้ในการ
การจัดการสวนตาลโตนด

Abstract

Thesis Title : Karyotype of Palmyra Palm (*Borassus flabellifer* L.) and Genetic Differentiation

Between Sexes by Sequence – Related Amplified Polymorphism (SRAP) Markers

Student's Name : Mr. Anuruth Meedsen

Advisory Committee : Dr. Arunrut Vanichanon

Dr. Pluang Suwanmanee

Degree and Program : Master of Science Program in Biology

Academic Year : 2011

Palmyra palm (*Borassus flabellifer* L.) is an economically important dioecious plant species. Palmyra palm is also a crucial farmer's way of life especially in Songkhla province. Female plant is more useful for farmers because female flowers bearing fruits and seeds. However male and female plants cannot be distinguished in seedling stage. Chromosome number and karyotype of palmyra palm were studied for basic cytological data. In this research aimed to study the karyotype formula of *Borassus flabellifer* L. which was found to be $2n = 2x = 36 = Lm12 + Mm2 + Msm4 + Ssm4 + Sac8 + St6$ and $NF = 66$. Genetic analysis for sex differentiation was investigated among 19 samples of palmyra palm using SRAP. Samples consisted of male pool, 8 male samples, female pool and 9 female samples. Female samples belongs to 3 varieties (Khoa, Khamin and Ka). Twenty primer combinations were used in this study. From the results, 131 of total 342 bands obtained were polymorphic bands (38.6%) with an average of 17.1 bands per primer combination. Approximately 3,800 bp generated from me2 / em5 em6 was found in all male plants. The me7 / em2 em6 primer combination produced 3,000, 6,000 and 8,000 bp fragments for only Khoa variety. The me1 / em5 em14 primer combination produced 4,200 and 5,000 bp fragment for only Khamin variety. An average of similarity index was found to be 0.83 ± 0.07 . Percent of polymorphic bands were 36.13. Polymorphic Information Content (PIC) average 0.694 ± 0.305 . Cluster analysis of all samples by Unweighted Pair – Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA) method based on genetic similarity indexes separated into 3 clusters. Group I consisted of male sample 1 – 3. Group II consisted of two subgroups (subgroup I included female pool, Khoa 1 – 3 subgroup II consisted Ka 1 – 3 and Khamin 1 – 3.) The last

group included male pool and male sample 4 – 8. Therefore, the use of sex – linked primers to detect sex expression in palmyra palm may be very useful for this particular plant.

แหล่งทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการ
วิจัยแห่งชาติ (วช.) กลุ่มเรื่องที่ 5 การเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร ปีงบประมาณ 2554 และ
ทุนอุดหนุนการวิจัย จากโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางด้านวิทยาศาสตร์
และคณิตศาสตร์ (สกวค)

ประกาศคุณูปการ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร. อรุณรัศมี วัฒนชานนท์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้วิทยานิพนธ์และให้ความสะดวกในทุกๆ ด้านด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.เปลื้อง สุวรรณมณี กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. จรัสศรี นวลศรี ประธานกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำและตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมภพ อินทสุวรรณ คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ คุณเกษศิริรินทร์ รัตจร คุณศุภลักษณ์ ภูมิคงและคุณฟารีดา มะลิ ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางการวิจัย และขอขอบคุณ คุณศรัณย์ วัชรสินธุ์ ที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจจนเสร็จสิ้นการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณยาย บิดา มารดา ที่ให้โอกาสในการศึกษาและเป็นที่กำลังใจให้เสมอมา ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่เป็นกำลังใจให้จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

อนรุทธิ์ หมิดเสน

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	บทนำ.....	1
	ภูมิหลัง.....	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
	สมมติฐานงานวิจัย.....	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	3
	ขอบเขตการวิจัย.....	3
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
	ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับตาลโตนด.....	4
	ลักษณะพฤกษศาสตร์ของตาลโตนด.....	7
	การใช้ประโยชน์จากตาลโตนด.....	10
	โครโมโซมและคาริโอไทป์.....	11
	การกำหนดเพศในพืชดอก.....	14
	เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Marker).....	16
	เทคนิค Sequence – Related Amplified Polymorphism (SRAP).....	18
3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
	ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย.....	21
	วัสดุ อุปกรณ์.....	21
	สารเคมี.....	22
	วิธีการ.....	23
4	ผลการวิจัย.....	31
	การศึกษาคาริโอไทป์ของตาลโตนด.....	31
	การสกัดดีเอ็นเอจากใบตาลโตนด.....	36
	เครื่องหมายโมเลกุลเอสอาร์เอพี.....	37
5	บทย่อ สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....	64
	สรุปผล.....	64
	อภิปรายผลการศึกษา.....	65
	ข้อเสนอแนะ.....	69

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม	70
ภาคผนวก	75
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	80

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลำดับเบสของไพรเมอร์.....	23
2	เกณฑ์จัดจำแนกขนาดโครโมโซม.....	25
3	เกณฑ์การจำแนกชนิดโครโมโซม.....	25
4	โปรแกรมจำนวนรอบอุณหภูมิในการทำเอสอาร์เอพี พีซีอาร์.....	28
5	องค์ประกอบของเจลโพลีอะครีลาไมด์.....	29
6	ค่าเฉลี่ยความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น ความยาวแขนโครโมโซมข้างยาว และความยาวโครโมโซมทั้งแท่ง	34
7	ค่าความยาวสัมพัทธ์ ค่าดัชนีเซนโทรเมียร์ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) จากเซลล์ ปลายรากตาลโตนด ระยะเมทาเฟส จำนวน 9 เซลล์ (กำลังขยาย 1,000 เท่า)	35
8	ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอตาลโตนดที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร.....	36
9	แถบดีเอ็นเอจากไพรเมอร์จำนวน 20 แบบ ค่า PIC และค่าเปอร์เซ็นต์โพลีเมอร์ฟิเคชัน.....	38
10	ค่าดัชนีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของตาลโตนด.....	60

สารบัญภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะผลตาลโตนดสายพันธุ์ต่างๆ.....	6
2 ลักษณะรากตาลโตนด	7
3 ลักษณะลำต้นตาลโตนด.....	8
4 ลักษณะใบตาลโตนด.....	8
5 ลักษณะช่อดอกเพศผู้และช่อดอกเพศเมียตาลโตนด	9
6 ผลและเมล็ดตาลโตนด.....	9
7 ผลิตภัณฑ์จากตาลโตนด	11
8 โครงสร้างและรูปแบบของโครโมโซม	12
9 ตัวอย่างการจัดคาริโอไทป์ของลิงกัง	13
10 ขั้นตอนการศึกษาด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของตาลโตนด	24
11 ลักษณะของไพรมอร์ Forward และ Reverse ที่ใช้ในเทคนิคเอสอาร์เอพี	27
12 โครโมโซมปลายรากตาลโตนดระยะเมทาเฟสที่ย้อมด้วยสีอะซีโตคาร์มีน.....	31
13 เซลล์ระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ตาลโตนด	32
14 อิดิโอแกรมตาลโตนด	33
15 แถบดีเอ็นเอของตาลโตนดที่ตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสบนเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์	37
16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมอร์ me2/em5 em9.....	39
17 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมอร์ me2/em5 em8.....	40
18 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมอร์ me1/em5 em14.....	41
19 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมอร์ me2/em5 em2.....	42
20 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมอร์ me2/em5 em6.....	43
21 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมอร์ me5/em2 em9.....	44
22 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมอร์ me5/em5 em6.....	45
23 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมอร์ me5/em5 em8.....	46
24 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมอร์ me7/em2.....	47
25 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมอร์ me7/em2 em6.....	48

สารบัญภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
26	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมเมอร์ me7/em2 em9..... 49
27	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมเมอร์ me7/em8 50
28	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมเมอร์ me5/em8..... 51
29	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมเมอร์ me7/em5 52
30	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมเมอร์ me5/em5 53
31	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมเมอร์ me5/em5 em14..... 54
32	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมเมอร์ me5/em5 em9..... 55
33	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมเมอร์ me1/em8..... 56
34	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมเมอร์ me2/em5 em8..... 57
35	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมเมอร์ me7/em2 em8..... 58
36	Cladogram ของตาลโตนด 19 ตัวอย่าง โดยโปรแกรม NTsys version 2.1..... 61
37	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคเอสอาร์เอพี ไพรมเมอร์ me2 / em5 em6 ซึ่งพบแถบ ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อตาลโตนดเพศผู้..... 62
38	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อตาลโตนดสายพันธุ์ข้าว ไพรมเมอร์ me7/ em2 em6..... 63
39	ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อตาลโตนดสายพันธุ์ขม ไพรมเมอร์ me1 / em5 em14 63

