



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมทานตะวัน
(*Helianthus annuus* L.) สายพันธุ์แท้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเครื่องหมาย
เอเอฟแอลพี

Study of Genetic Diversity among Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Inbreds Using
Morphological Characteristics and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)
Markers

นางผู้วิจัย นางสาวลลิตา อาจสูงเนิน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ยุบผา คงสมัย, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทร์เปรม, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.)
สายพันธุ์แท้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับเครื่องหมายเอเอฟแอลพี

Study of Genetic Diversity among Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Inbreds Using
Morphological Characteristics and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Markers

โดย

นางสาวลลิตา อางสูงเนิน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)
พ.ศ. 2552

ลลิตา อาจสูงเนิน 2552: การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์กรรมทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) สายพันธุ์แท้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเครื่องหมายเอเอฟแอลพี ประยุกต์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการ สหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์บุบผา คงสมัย, Ph.D.
152 หน้า

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์ ตรวจสอบซึ่งเป็นพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ (Hybrid I Hybrid II และ Hybrid III) ที่ปลูกช่วงฤดูหนาวปี 2550 ณ แปลง ทดลองภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเครื่องหมายเอเอฟแอลพี จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 26 ลักษณะ พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความต่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.00-0.44 และจัดกลุ่มทานตะวัน สายพันธุ์แท้ได้ทั้งหมด 2 กลุ่ม โดยใช้วิธี unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) คือ กลุ่มเมล็ดไม่มีลายแถบ และกลุ่มเมล็ดที่มีลายแถบ ซึ่งแบ่งย่อยเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ ทานตะวันชนิดน้ำมัน (oil seed) และชนิดบริโภคเมล็ด (non-oil seed)

ส่วนผลการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี จำนวน 59 คู่ไพรเมอร์ พบว่า มีเพียง 23 คู่ไพรเมอร์ ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน (polymorphic bands) เมื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น พบว่า เกิดแถบ ของดีเอ็นเอทั้งหมด 1,963 แถบ (เฉลี่ย 85.35 แถบ /ไพรเมอร์) เป็นแถบของดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน 1,278 แถบ (64.85 %) ค่า Polymorphic Information Contents (PICs) มีค่าอยู่ในช่วง 0.00-0.50 โดยมีค่า PICs เฉลี่ย 0.293 และพบ 247 แถบ มีค่าอยู่ในช่วง 0.45-0.50 คิดเป็น 12.58 % ของจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด เมื่อศึกษา ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.37-1.00 และ สามารถจัดกลุ่มแบ่งทานตะวันสายพันธุ์แท้ออกจากกันได้ชัดเจนได้ทั้งหมด 2 กลุ่มโดยใช้วิธี UPGMA คือ ทานตะวันกลุ่ม restorer (R) line และกลุ่ม maintainer (B) line ซึ่งแบ่งย่อยเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ ทานตะวันชนิด น้ำมัน และชนิดบริโภคเมล็ด ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมที่คำนวณโดยใช้วิธี Principal Coordinate Analysis (PCoA) พบว่า ตัวประกอบหลักที่ 1 2 และ 3 มีความแปรปรวนครอบคลุม 40.95 23.66 และ 17.21 % ของความแปรปรวนทั้งหมด ตามลำดับ แผนภาพการกระจายตัวของกลุ่มทานตะวันสายพันธุ์แท้ จากวิธี PCoA ให้ผลสอดคล้องกับวิธี UPGMA จากผลการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่าการจัดกลุ่มทานตะวันสาย พันธุ์แท้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่สามารถจัดแบ่งกลุ่ม R-line และ B-line ได้ชัดเจน การใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาช่วยให้การจัดกลุ่มทานตะวันสายพันธุ์แท้ที่มีความ คล้ายคลึงกันของลักษณะทางสัณฐานวิทยามากได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถใช้คัดเลือกสายพันธุ์ พ่อแม่ในการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันลูกผสมหรือพัฒนาประชากรต่อไป

Lalida Ardsongnorn 2009: Study of Genetic Diversity among Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Inbreds Using Morphological Characteristics and Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Markers. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Miss Buppa Kongsamai, Ph.D. 152 pages.

Genetic diversity of fifty-six sunflower inbreds and three checks (commercial varieties; Hybrid I, Hybrid II and Hybrid III) was assessed with morphological characteristics and AFLP markers. The experiment was conducted at the Agronomy farm, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, in 2007. Based on twenty-six morphological characteristics, genetic distance among groups and phylogenetic tree were constructed by unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA). Sunflower inbreds were grouped into two major clusters with dissimilarity coefficients of 0.00-0.44. The first group represented no seed mottling and the other represented seed mottling in which comprised of two minor groups; oil seed and non-oil seed types.

Fifty-nine AFLP primers were analyzed. Only twenty-three primers showed highly polymorphic and 1,963 bands (averaged 85.35 bands/primers) were produced which 1,278 bands (64.85%) gave polymorphism. Polymorphic Information Contents (PICs) ranged from 0.00-0.50 with mean PICs of 0.293 and 247 markers (12.58 %) were in the range of 0.45-0.50. The genetic relationship in sunflower varieties has similarity coefficients between 0.37-1.00. Phylogenetic tree was constructed by UPGMA divided sunflower varieties into two groups. The first groups represented restorer (R) line while the second group represented maintainer (B) line that separated into two minor groups of oil seed and non-oil seed types. Similarity coefficients were also calculated with Principal Coordinate Analysis (PCoA). It showed that principal component (PC) 1, 2 and 3 accounted for 40.95, 23.66 and 17.21 percent, respectively, relative to total variation. The distribution pattern using PCoA method was agreement with UPGMA method. From this study, it indicated that utilization of AFLP markers and morphological data was more efficiently classified sunflower inbreds into R-line and B-line groups than that of morphological data alone, especially when sunflower inbreds had similarly morphological. However, the information of this study could be able to use for selecting the parents for further sunflower breeding programs.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.บุบผา คงสมัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เสริมศิริ จันทร์เปรม และ รองศาสตราจารย์ ดร.สนธิชัย จันทร์เปรม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความรู้ ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม ประธานกรรมการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และ ดร.ปิยรัชฎ์ เจริญทรัพย์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ที่ได้อบรมให้ความรู้ตลอดมา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบคุณ The North Central Regional Plant Introduction Station (NCRPI, Ames, Iowa, U.S.A.) และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ทานตะวันในการศึกษา ขอบคุณภาควิชาพืชไร่ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่อนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการในการทำวิจัยจนประสบความสำเร็จในครั้งนี้ และขอขอบคุณคุณวราณี โสมนัส ดร.ประกิจ สมท่า และ ดร.วรภา สีสลักษณ์ นักวิจัยห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล (A207) ที่ให้คำแนะนำที่ดี ให้ความช่วยเหลือด้านเทคนิคในห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่และคนงานของภาควิชาพืชไร่ ภาควิชาเกษตร กำแพงแสน ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดจนเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ต่าง ๆ สำหรับงานวิจัยในแปลงทดลองจนประสบความสำเร็จในครั้งนี้ ขอขอบคุณคุณนิภาพร บัวอิน คุณจินตนา จันเจิม เพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำที่ดีเสมอมา

สุดท้าย กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัวอันเป็นที่รักยิ่งที่คอยอบรมให้คำปรึกษา ให้กำลังใจ ให้การสนับสนุน รวมถึงน้องชายที่คอยเป็นกำลังใจตลอดมา

ลลิตา อาจสูงเนิน

กันยายน 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	32
อุปกรณ์	32
วิธีการ	35
ผลและวิจารณ์	49
สรุปและข้อเสนอแนะ	117
สรุป	117
ข้อเสนอแนะ	118
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	119
ภาคผนวก	133
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	152

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	รายชื่อสายพันธุ์ทานตะวัน (<i>Helianthus annuus</i> L.) ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ประกอบด้วยสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์	32
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter และไพรเมอร์ (primer) ในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี	44
3	ข้อมูลทั่วไป (วันดอกบาน 100 % วันสุกแก่ วันเก็บเกี่ยว) และลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์	52
4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนดอกของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์	56
5	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนใบของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์	60
6	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนเมล็ดของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์	64
7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนก้านใบ และจานดอกของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์	68
8	ค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง (dissimilarity coefficient) ที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าความต่างของข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์	72
9	คู่ไพรเมอร์ที่คัดเลือกและใช้ทดสอบในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์	87
10	ร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึม (percentage of polymorphism) และจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ไพรเมอร์	89
11	ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) ที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าความเหมือนของแถบดีเอ็นเอทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์	94

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	สรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ 11 ลักษณะที่นำมาพิจารณาร่วมกับข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพี เพื่อแบ่งกลุ่มทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ (กลุ่มที่ 1.1)	105
13	สรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ 11 ลักษณะที่นำมาพิจารณาร่วมกับข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพี เพื่อแบ่งกลุ่มทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ (กลุ่มที่ 1.2)	107
14	สรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ 11 ลักษณะที่นำมาพิจารณาร่วมกับข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพี เพื่อแบ่งกลุ่มทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ (กลุ่มที่ 2.1)	109
15	สรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ 11 ลักษณะที่นำมาพิจารณาร่วมกับข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพี เพื่อแบ่งกลุ่มทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ (กลุ่มที่ 2.2)	110

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ที่จัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง (dissimilarity coefficient) โดยใช้ Canberra coefficient	82
2 แผนภาพสรุปแสดงความสัมพันธ์ของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ที่ศึกษาโดยใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา	84
3 การวัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์	86
4 แผนภูมิการกระจายค่า Polymorphic Information Contents (PICs) จากข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพี 1,963 แถบ ในทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์	90
5 dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ที่จัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพี และวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) โดยใช้ Dice coefficient	104
6 แผนภาพการกระจายตัวของทานตะวันสายพันธุ์แท้สายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์วิเคราะห์ด้วยวิธี Principal coordinated analysis จากค่า PC1 และ PC2	112
7 แผนภาพสรุปแสดงความสัมพันธ์ของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ที่ศึกษาโดยใช้ข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพี	115

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
1 รูปแบบของการแตกกิ่งก้าน (type of branching)	136
2 รูปร่างใบเลี้ยง (shape of cotyledon)	137
3 รูปร่างใบ (leaf shape)	138
4 รูปร่างฐานใบ (leaf base)	138
5 รูปร่างใบเมื่อตัดตามขวาง (shape of cross section of leaf)	139
6 องศาเส้นกลางใบ (angle of lateral veins of leaf)	140
7 รูปร่างกลีบรองดอก (bract shape)	142
8 การทำมุมของจานดอก (head angle at maturity)	145
9 ลักษณะของจานดอก (head shape)	146
10 รูปร่างของเมล็ด (shape of seed)	146
11 ตำแหน่งของแถบ (position of stripes)	148
12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ ที่เกิดจากเครื่องหมายเอเอฟแอลพี คู่ไพรเมอร์ E-ACC/M-CTA แสดงตัวอย่าง ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่บอกความแตกต่าง	150
13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ ที่เกิดจากเครื่องหมายเอเอฟแอลพี คู่ไพรเมอร์ E-CGT/M-AGG แสดงตัวอย่าง ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่บอกความแตกต่าง	151

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFLP	=	amplified fragment length polymorphism
APS	=	ammonium persulfate
CTAB	=	cetyl trimethyl ammonium bromide
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
EST	=	expressed sequence tag
EtOH	=	ethanol
MgCl ₂	=	magnesium chloride
NaCl	=	sodium chloride
NTSYS	=	numerical taxonomy and multivariate system
PCA	=	principal component analysis
PCoA	=	principal coordinated analysis
PCR	=	polymerase chain reaction
PIC	=	polymorphic information contents
PVP	=	polyvinyl pyrrolidone
RAPD	=	random amplified polymorphic DNA
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
RNase	=	ribonuclease
SRAP	=	sequence related amplified polymorphism
SSR	=	simple sequence repeats
TRAP	=	target region amplification polymorphism
TBE	=	tris-borate-EDTA electrophoresis buffer solution
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
UPGMA	=	unweighted pair group method of arithmetic average

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมทานตะวัน
(*Helianthus annuus* L.) สายพันธุ์แท้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา
ร่วมกับเครื่องหมายเอเอฟแอลพี

Study of Genetic Diversity among Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Inbreds Using
Morphological Characteristics and Amplified Fragment Length Polymorphism
(AFLP) Markers

คำนำ

ทานตะวันเป็นพืชน้ำมันที่สำคัญทางเศรษฐกิจพืชหนึ่งของโลก รองจากถั่วเหลือง rapeseed และปาล์มน้ำมัน เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ทั้งนี้เพราะน้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดทานตะวัน มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ประมาณ 88 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น และยังมีวิตามินเอ ดี อี และ เค โดยเฉพาะวิตามินอีมีสาร antioxidants กันหืน ได้ดีช่วยให้เก็บรักษาได้นาน (Gentzbittel et al., 1999) ดังนั้นเมล็ดทานตะวัน และน้ำมันจากเมล็ดทานตะวันจึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศเพื่อการบริโภค และใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา, 2542; Schneider, 1997) และมีแนวโน้มที่จะทวีความต้องการมากขึ้นทุกปี เมล็ดพันธุ์ที่ใช้ปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ลูกผสมที่บริษัทเอกชนนำเข้าจากต่างประเทศ จึงทำให้ราคาเมล็ดพันธุ์ทานตะวันมีราคาสูง เนื่องจากทานตะวันสายพันธุ์ของประเทศไทยไม่สามารถปรับตัวต่อสภาพแวดล้อม และให้ผลผลิตที่ดีเทียบเท่ากับเมล็ดพันธุ์ลูกผสม ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันให้มีศักยภาพในการให้ผลผลิตที่เพิ่มขึ้น และมีคุณภาพ รวมทั้งสามารถปรับตัวต่อสภาพแปลงปลูกได้ดีจึงมีความสำคัญ สำหรับการผสมพันธุ์ทานตะวัน เพื่อให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมให้ได้ลักษณะที่ดีนั้นจะต้องมีการคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม

นักปรับปรุงพันธุ์พืชพยายามที่จะรวบรวมลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีเด่นจากแหล่งต่าง ๆ มาสร้างพืชพันธุ์ใหม่ โดยใช้กระบวนการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ที่เหมาะสม งานปรับปรุงพันธุ์พืชจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีความแม่นยำในการคัดเลือกและแยกความแตกต่างของลักษณะที่แสดงออกของแต่ละสายพันธุ์ เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ถือได้ว่าเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิต ไม่ว่า

ระหว่างหรือภายในชนิด (species) ประชากร (populations) พันธุ์ (varieties) และสายพันธุ์ (breeding lines) (สุริพร, 2546) ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำกว่าการใช้ลักษณะรูปร่างหรือลักษณะพื้นฐานทางสัณฐานวิทยาของพืช (morphological marker) ที่มักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม หรือเครื่องหมายโปรตีน (protein marker) ที่การตรวจสอบขึ้นอยู่กับ การแสดงออกของยีนลักษณะเด่น (สุริพร, 2546; สุรินทร์, 2552) เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ อาร์เอฟดี (random amplified polymorphic DNA, RAPD) (Williams *et al.*, 1990) เอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism, AFLP) (Vos *et al.*, 1995) ไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite หรือ simple sequence repeats, SSR marker) (Tautz, 1989; Brown *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 1996a)

เครื่องหมายเอเอฟแอลพี เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่รวมจุดเด่นและความน่าเชื่อถือของเครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี และประสิทธิภาพของปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว (polymerase chain reaction, PCR) เข้าด้วยกัน (Vos *et al.*, 1995) โดยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี มีข้อดีหลายประการ คือ เป็นเครื่องหมายที่มีความเป็นสากล ไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ และในการทำปฏิกิริยาแต่ละครั้ง สามารถให้เครื่องหมายโมเลกุลได้จำนวนมาก (high throughput markers) และครอบคลุมทั้งจีโนม ทำให้สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (multilocus) พร้อม ๆ กัน และใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยาจำนวนน้อยเมื่อทำการตรวจสอบซ้ำก็ ยังให้ผลเหมือนเดิม (reproducibility) (สุริพร, 2546; สุรินทร์, 2552; Vos *et al.*, 1995) จากลักษณะเด่นดังกล่าว จึงมีผู้นิยมนำเครื่องหมายเอเอฟแอลพีมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชกันอย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) การบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสายพันธุ์พืช (varietal identification) การสร้างแผนที่ยีนในพืชหลายชนิด และเป็นข้อมูลสำคัญในการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืช (plant patent) เป็นต้น ดังนั้น การวิจัยนี้จึงเลือกใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับเครื่องหมายเอเอฟแอลพีในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวัน

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของเชื้อพันธุกรรมทานตะวัน โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมายเอเอฟแอลพี สำหรับจัดกลุ่มสายพันธุ์ตามความแตกต่างทางพันธุกรรม และเป็นพื้นฐานประกอบการพิจารณาพัฒนาประชากรในโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันต่อไป

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของทานตะวัน

ทานตะวัน (Sunflower) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus annuus L.* เป็นพืชในวงศ์ Asteraceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับดาวเรือง เบญจมาศ และคำฝอย แหล่งกำเนิดของทานตะวันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีหลักฐานทำให้เชื่อได้ว่า ทานตะวันมีถิ่นกำเนิดอยู่ทางตะวันออกของอเมริกา แคนาดา และทางตอนเหนือของเม็กซิโก ระยะแรกนิยมปลูกทานตะวันเพื่อเป็นไม้ประดับ ต่อมาจึงได้นำมาบริโภคในรูปแบบเมล็ดโดยตรง หรือสกัดน้ำมัน (Schilling and Heiser, 1981) ปัจจุบันเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในหลายประเทศ เช่น รัสเซีย ยูเครน อาร์เจนตินา อินเดีย จีน ฝรั่งเศส ฮังการี ตุรกี สเปน เป็นต้น ขณะที่ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ปลูกทานตะวันเพื่อบริโภคภายในประเทศเป็นหลัก (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2537; สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2552ก)

ทานตะวัน เป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญพืชหนึ่งที่มีความสำคัญเป็นอันดับ 4 ของโลก (FAO, 2007) เนื่องจากน้ำมันที่สกัดจากเมล็ดทานตะวันมีคุณภาพดี ประกอบด้วยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว เช่น กรดลิโนเลนิก และกรดลิโนเลอิกสูงถึง 88 % ซึ่งช่วยลดโคเลสเตอรอลที่เป็นสาเหตุของโรคไขมันอุดตันในเส้นเลือดได้ อีกทั้งยังประกอบด้วยสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหลายชนิด เช่น ธาตุเหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส วิตามินเอ บี2 ดีอี และ เค โดยเฉพาะปริมาณวิตามินอีในน้ำมันทานตะวันจะสูงกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่น ๆ ซึ่งวิตามินอี หรือ alpha-tocopherol มีสาร antioxidant ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน จึงช่วยให้ไม่เกิดกลิ่นหืนเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน ดังนั้นเมล็ดทานตะวัน และน้ำมันทานตะวันจึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศเพื่อการบริโภค และใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ทำเนยเทียม สบู่ สี และน้ำมันชักเงา (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่ฯ, 2542; Schneiter, 1997)

ประเทศไทยนำทานตะวันมาทดลองปลูกเป็นการค้าเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับโรงงานสกัดน้ำมันตั้งแต่ พ.ศ. 2515-2516 (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่ฯ, 2542) และปี 2551 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกรวม 168,332 ไร่ ได้ผลผลิตประมาณ 19,346 ตัน โดยมีผลผลิตเฉลี่ย 119 กิโลกรัมต่อไร่ (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2552ก) ซึ่งปริมาณดังกล่าวยังไม่เพียงพอกับการบริโภคภายในประเทศ ต้องมีการนำเข้าเมล็ดทานตะวันจากต่างประเทศ จำนวน 6,826 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 100.2 ล้านบาท และน้ำมันเมล็ดทานตะวันจากต่างประเทศ จำนวน 9,943 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 690.5 ล้านบาท (สำนักเศรษฐกิจการเกษตร, 2552ข)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของทานตะวัน

พืชในสกุล *Helianthus* ที่มีโครโมโซม $2n = 2x = 34$ มีทั้งเป็นพืชฤดูเดียว และข้ามปี รวมกันประมาณ 68 ชนิด (species) แต่มีเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่ใช้ปลูกเป็นอาหาร คือ *H. tuberoses* เป็นพวกข้ามปี ใช้ประโยชน์จากหัว ซึ่งสะสมอาหารในรูปแป้งในส่วนราก และ *H. annuus* เป็นพืชฤดูเดียว มีทั้งชนิดบริโภคมะลิ และชนิดสกัดน้ำมัน

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไปของทานตะวัน มีดังนี้

ราก เป็นระบบรากแก้วยังลึกลงไปประมาณ 150-270 เซนติเมตร มีรากแขนงค่อนข้างแข็งแรงแผ่ขยายไปด้านข้างได้ยาวถึง 60-150 เซนติเมตร เพื่อช่วยลำต้นลำต้นได้ดี และสามารถใช้ความชื้นระดับผิวดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงทำให้ทานตะวันเป็นพืชที่ทนทานต่อความแห้งแล้ง

ลำต้น ทานตะวันมีลำต้นตั้งตรง เป็นไม้เนื้ออ่อน มีขนอ่อนปกคลุมอยู่ทั่วไป ลำต้นส่วนใหญ่ไม่มีการแตกแขนง แต่บางพันธุ์มีการแตกแขนง ขนาดของลำต้น ความสูง การแตกแขนงขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพแวดล้อม ความสูงของต้นอยู่ระหว่าง 50-500 เซนติเมตร ความสูงขึ้นอยู่กับจำนวนปล้อง และความยาวของปล้อง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-10 เซนติเมตร

ใบ เป็นใบเดี่ยวเกิดตรงกันข้าม หลังจากที่มีใบเกิดแบบตรงกันข้ามอยู่ 5 คู่แล้ว ใบที่เกิดขึ้นหลังจากนั้นจะมีลักษณะวน มีขนหยาบปกคลุมทั่วไป จำนวนใบบนต้นอาจมีตั้งแต่ 8-70 ใบ รูปร่างของใบแตกต่างกันตามพันธุ์ สีของใบอาจมีตั้งแต่เขียวอ่อน เขียว และเขียวเข้ม ใบที่เกิดออกมามีอายุใหม่ ๆ ก้านใบจะอยู่ในแนวตั้งจนกระทั่งใบมีความยาว 1 เซนติเมตร ปลายยอดจะค่อย ๆ โค้งลงจนเมื่อใบแก่แล้วก็จะโค้งลงมาเป็นรูปตัวยู (U) การสร้างใบจะมีมากจนกระทั่งดอกบาน หลังจากนั้นการสร้างใบจะลดน้อยลง

ดอก ดอกของทานตะวันเป็นดอกกรวม แต่ละจานดอก (inflorescence หรือ capitulum หรือ head) ประกอบด้วยดอกย่อย (florets) 700-3,000 ดอก สำหรับพันธุ์น้ำมัน หรืออาจมีจำนวนถึง 8,000 ดอกสำหรับพันธุ์ที่ไม่ใช่เป็นพันธุ์น้ำมัน มีเส้นผ่าศูนย์กลางของดอกอยู่ระหว่าง 6-37 เซนติเมตร ซึ่งขึ้นกับพันธุ์และสภาพแวดล้อม ในแต่ละจานดอกมีดอก 2 ประเภท คือ ray flowers และ disk flowers

ray flowers เรียงอยู่บริเวณรอบนอกสุดของจานดอก มีจำนวน 2 แถว เป็นดอกที่เป็นหมัน มีสีต่าง ๆ กันตั้งแต่สีเหลือง สีส้ม และสีแดง ส่วน disk flowers มีจำนวน 30-50 แถว มีการเรียงตัวของแถวเป็นแบบ concentric rows แต่ละดอกประกอบด้วย กลีบรองดอก (pappus/calyx) 2 อัน กลีบดอก (corolla petals) 5 อันที่เชื่อมติดกัน อับเกสร (anthers) 5 อัน เกสรตัวเมีย (stigma) 1 อัน เกสรตัวเมียนี้นี้จะยาวกว่าเกสรตัวผู้เมื่อดอกบานเต็มที่ และจะแยกเป็น 2 แฉกตรงปลายและโค้งลง

เมล็ด เมล็ดของทานตะวันเป็นแบบ achene ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเนื้อของเมล็ดเรียกว่า kernel และส่วนที่เป็นเปลือกเรียกว่า pericarp เมล็ดมีความยาวตั้งแต่ 7-25 มิลลิเมตร กว้าง 4-13 มิลลิเมตร มีน้ำหนักแห้งแปรตั้งแต่ 40-60 กรัมต่อ 1000 เมล็ด รูปร่างลักษณะของเมล็ดอาจเป็นเหลี่ยม หรือรูปไข่ สีของเมล็ดมีทั้งเป็นแบบแถบขาวสลับดำหรือเทาหรือสีดำล้วน ๆ ขนาดของเมล็ดส่วนที่อยู่ใกล้กับขอบของจานดอกจะใหญ่กว่าเมล็ดที่อยู่กลางของจานดอก และขนาดของเมล็ดที่เล็กที่สุดจะอยู่ตรงกลางจานดอก ส่วนเมล็ดที่อยู่ตรงใจกลางของจานดอกมักจะลีบเสมอ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2537; ฅณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา, 2542; Schneider, 1997)

ความหมายและที่มาของความหลากหลายทางพันธุกรรม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นหนึ่งในความหลากหลายทางชีวภาพ ซึ่งความหลากหลายทางชีวภาพ ประกอบด้วย ความหลากหลายของชนิดหรือสปีชีส์ (species diversity) ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) และความหลากหลายทางนิเวศวิทยา (ecological diversity) (ประเวศ, 2537; วิสุทธิ, 2538)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม หมายถึง ความหลากหลายของลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือความผันแปรของยีนของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่ง ทั้งความผันแปรภายใน และระหว่างประชากร ความผันแปรทางพันธุกรรม มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ (mutation) หรือการกลายพันธุ์ร่วมกับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศที่ผ่านขบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซม (crossing over) มีผลทำให้เกิดการรวมตัวกันใหม่ (gene recombination) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมนี้ถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้ สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจึงมีลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างไปตามสายพันธุ์ (ประเวศ, 2537) และทำให้สิ่งมีชีวิตมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร (ชนิด หรือพันธุ์) มากขึ้น ส่วนความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรเกิดเมื่อสมาชิกของประชากรแต่ละประชากรมีการแยกตัวหรือถูกคัดเลือกรวมจากประชากรเดิม ทำให้สมมูลของยีน

หรือความถี่ของอัลลีลเปลี่ยนไป เมื่อระยะเวลาผ่านไปนานขึ้นประชากรที่แยกจากกันจะมีลักษณะของวิวัฒนาการที่แตกต่างออกไป สิ่งมีชีวิตใดก็ตามที่ถูกทำลายทำให้มีจำนวนลดน้อยลง ความหลากหลายของพันธุกรรมก็สูญหายไป นับเป็นการสูญเสียทรัพยากรที่มีคุณค่ายิ่ง ผลกระทบที่เด่นชัดที่สุดของประชากรธรรมชาติที่ขาดแคลนความหลากหลายของพันธุกรรม คือ การนำไปสู่ภาวะความคงตัวทางพันธุกรรม (homozygosity) ของสมาชิกในประชากร นอกจากนี้ ประชากรที่ขาดความแปรผันทางพันธุกรรมยังมิผลทำให้การอยู่รอดและความสมบูรณ์ในพันธุ์ลดลง ผลกระทบดังกล่าวเป็นส่วนหนึ่งของการเกิดความเสี่ยงของลักษณะภายในสายพันธุ์ (inbreeding depression) ซึ่งก่อให้เกิดการสูญเสียความยืดหยุ่นทางวิวัฒนาการ (วิสุทธิ, 2532) โดยปัจจัยสำคัญที่เข้ามาบิบบาทต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของประชากร ได้แก่ การกลายพันธุ์ การคัดเลือกทั้งโดยมนุษย์และโดยธรรมชาติ (selection) การอพยพ (migration) ระบบการผสมพันธุ์ (mating system) และการขาดช่วงทางพันธุกรรม (genetic drift) (สมชัย และ พิระศักดิ์, 2546) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีส่วนทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างชนิดหรือพันธุ์มากขึ้น

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม

การศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรม หรือ genetic marker เพื่อบ่งชี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งลักษณะทางปริมาณและคุณภาพ ช่วยให้สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างและภายในประชากร หรือระหว่างสมาชิกภายในประชากรได้ เครื่องหมายที่ใช้ในการบ่งบอกความแตกต่างมี 2 ประเภท คือ เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) และเครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers)

เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา เป็นการบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยใช้วิธีเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยา หรือทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต ลักษณะเหล่านี้แปรผันตามสภาพแวดล้อมได้ง่าย ทำให้การตรวจสอบผิดพลาดได้ บางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ และต้องมีวิธีที่จะบอกจีโนไทป์ (genotype) ที่ถูกต้องจากฟีโนไทป์ (phenotype) ที่ตรวจสอบ อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยานิยมทำเป็นอันดับแรก แล้วจึงใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น หรือแก้ปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวได้ (สุริพร, 2546; สุรินทร์, 2552)

ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน ซึ่งเป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลโปรตีนชนิดต่าง ๆ และในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

เครื่องหมายโปรตีน (protein marker) เป็นการตรวจสอบโดยใช้ความแตกต่างของโปรตีนใช้แยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วย้อมดูแถบโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม ข้อดีของการตรวจสอบโปรตีน คือ สามารถตรวจได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก และแถบของโปรตีนหรือไอโซไซม์นี้ยังมีการข่มร่วมกันแบบ codominant ช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างโปรตีนแบบโฮโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัสได้ อย่างไรก็ตาม เครื่องหมายโปรตีนยังมีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ จำนวนยีนที่ใช้ตรวจสอบยังมีไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และต้องมีการแสดงออกของยีน (gene expression) ที่ศึกษา จึงต้องเลือกเนื้อเยื่อ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ผลที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะเวลาเจริญเติบโต และสิ่งแวดล้อมด้วย นอกจากนี้โปรตีนและไอโซไซม์ยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัดไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้นานได้ ในแง่ของโอกาสการตรวจพบความแตกต่างในระดับโปรตีนยังมีค่าต่ำมากเมื่อเทียบกับการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากอัลลีลหรือรูปแบบของยีนที่แตกต่างกันนั้น นิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันอาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนหรือบางครั้งแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งแล้วก็ตาม อาจจะไม่มียผลต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลเมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำให้ไม่สามารถตรวจพบความแตกต่างนั้น ๆ ได้ (สุริพร, 2546; สุรินทร์, 2552)

ขณะที่เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) สามารถศึกษาได้ง่าย และสะดวกกว่า มีข้อจำกัดน้อยกว่าการตรวจสอบในระดับโปรตีน โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรมากกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลานานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใด ๆ ระยะการเจริญเติบโตหรือสภาพทางสรีรวิทยาใดก็ได้ไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ จะมีการแสดงออกหรือไม่ก็ได้ ทำให้สามารถตรวจสอบได้โดยไม่จำกัด และครอบคลุมทั้งจีโนม (สุรินทร์, 2552)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) กับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซม ในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือในออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ การที่ใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากความแตกต่างหรือโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ ได้แก่ อะดีนีน (adenine) กัวนีน (guanine) ไซโตซีน (cytosine) และไทมีน (thymine) นี้เองที่มีผลทำให้เกิดความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต พืชแต่ละชนิดหรือแต่ละสายพันธุ์จะมีรหัสพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์ ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดหรือสายพันธุ์ได้ (สุริพร, 2546; สุรินทร์, 2552)

วิธีการตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอ ทำได้โดยการหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) หรือตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต มีที่มาจากการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ซึ่งเป็นวิธีการที่ทำให้เกิดลายพิมพ์หรือแบบแผนของดีเอ็นเอที่จำเพาะ สามารถตรวจสอบรูปแบบความแตกต่างหรือโพลิมอร์ฟิซึมได้ วิธีศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม ได้แก่ วิธีไฮบริไดเซชัน (hybridization) และวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพหิซาร์ (polymerase chain reaction; PCR) (สุรินทร์, 2552)

1. วิธีไฮบริไดเซชัน เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอซึ่งพัฒนาขึ้น โดยอาศัยหลักการเข้าคู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน ตัวอย่างได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP marker) (Tanksley *et al.*, 1989; McCouch and Tanksley, 1991; Kochert, 1994)

อาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism, RFLP) เป็น โมเลกุลเครื่องหมายที่อาศัยความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จดจำลำดับเบสของดีเอ็นเอและตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจดจำ เทคนิคเริ่มจากการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วนำไปแยกขนาดบนแผ่นเจลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส และถ่ายดีเอ็นเอลงบนแผ่นกรอง (membrane filter) ด้วยวิธี southern blot แล้วตรวจหาการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอตรวจสอบที่ติดฉลาก และมีความจำเพาะกับจีโนมิกดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ บนแผ่นกรองนั้น ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้เกิดจากการกลายที่ตำแหน่งตัดด้วย

เอนไซม์หรือมีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของเบส เทคนิคนี้มีคุณสมบัติที่ดี คือ เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ codominant marker คือ สามารถตรวจสอบอัลลีลที่เป็นโฮโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัสได้ ตรวจสอบได้ในทุกส่วนของพืช จำนวนของตัวตรวจสอบมีจำนวนไม่จำกัดแต่มีข้อเสีย คือ วิธีการค่อนข้างยุ่งยาก และเสียค่าใช้จ่ายสูง (สุรินทร์, 2552)

2. วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ปริมาณมากขึ้นเป็นหลายเท่าในเวลาอันรวดเร็ว เป็นเทคนิคที่ค้นพบโดย Saiki et al. (1985) ที่ประยุกต์วิธีการมาจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต (DNA replication) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) ชนิดที่ทนความร้อนสูงได้ ประกอบด้วยการทำงาน 3 ขั้นตอน คือ การทำให้ดีเอ็นเอสายคู่เสียสภาพ (denature) แยกตัวเป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อนสูง จากนั้นลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วในขั้นต่อมาเพื่อให้ไพรเมอร์ (primer) หรือดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่มีเบสคู่สมกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ามาจับคู่กับชิ้นดีเอ็นเอนั้น (annealing) และขั้นตอนสุดท้ายเปลี่ยนอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอนหรือ 1 รอบ โมเลกุลของดีเอ็นเอ เป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ดังนั้น ถ้าดำเนินปฏิกิริยาลำดับกันหลาย ๆ รอบ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้น 2^n เท่า เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ (สุรินทร์, 2552) เช่น เครื่องหมายอาร์เอฟดี (RAPD marker) (Williams et al., 1990) เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP marker) (Vos et al., 1995) และเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite) หรือ simple sequence repeats (SSR marker) (Brown et al., 1996; Powell et al., 1996b) เป็นต้น

2.1 อาร์เอฟดี (random amplified polymorphic DNA, RAPD) เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นโดย Williams et al. (1990) เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยใช้ไพรเมอร์สายสั้นๆ ความยาวประมาณ 10 เบส ที่มีลำดับเบสเป็นแบบสุ่มไม่จำเพาะเจาะจงกับยีน และแสดงผลในรูปของการเกิดหรือไม่เกิดแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งหนึ่ง ๆ คุณสมบัติที่สำคัญของการใช้เทคนิคนี้ คือ สะดวก รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของดีเอ็นเอ และใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ dominant marker คือ อาจสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้เฉพาะบางอัลลีลเท่านั้น ดังนั้นจึงไม่สามารถแยกความแตกต่างของอัลลีลที่เป็นโฮโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัสได้ (สุรินทร์, 2552)

2.2 เอสเอสอาร์ (simple sequence repeat, SSR) หรือ microsatellite เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้หลักการของการกระจายตัวของเบสซ้ำในสิ่งมีชีวิต ลักษณะที่สำคัญของเบสซ้ำนี้คือ การมีลำดับเบสจำเพาะอยู่บริเวณหัวท้ายของเบสซ้ำ ซึ่งเบสจำเพาะเหล่านี้สามารถนำมาใช้สร้างเป็นไพรเมอร์ขนาดประมาณ 20 เบส เพื่อใช้ขยายปริมาณเบสซ้ำในตำแหน่งที่ต้องการ โดยใช้หลักการของพีซีอาร์ จากนั้นนำไปแยกความแตกต่างโดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้เกิดจากความแตกต่างของจำนวนเบสซ้ำในแต่ละสิ่งมีชีวิต คุณสมบัติที่สำคัญของเทคนิคนี้คือ ความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งโมเลกุลเครื่องหมายบนจีโนม และจำนวนของรูปแบบของอัลลีลที่สามารถตรวจสอบได้ และเป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายแบบ codominant marker (สมวงษ์, 2540)

2.3 อีเอสที (expressed sequence tag, EST) เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่มีการแสดงออกมาออกเป็นไพรเมอร์เฉพาะตำแหน่งของยีนนั้น ๆ จากนั้นใช้หลักการของพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอแล้วนำไปแยกความแตกต่างโดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งความแตกต่างนั้นเกิดจากการเพิ่มหรือขาดหายไปที่ตำแหน่งยีน คุณสมบัติที่มีความสำคัญคือ ความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งโมเลกุลเครื่องหมายต่อยีนที่ใช้อย่างเป็นไพรเมอร์ แต่มีข้อจำกัดคือ จะต้องต้องมีข้อมูลลำดับเบสสำหรับใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ (อภิชาติ, 2549)

2.4 เอสอาร์เอพี (sequence related amplified polymorphism, SRAP) เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นโดย Li and Quiros (2001) โดยออกแบบไพรเมอร์ 2 ชนิด ชนิด forward มีขนาด 17 เบส ที่ประกอบด้วยลำดับเบสแกน (core sequence) ที่เหมือนกันยาว 14 เบส เป็นส่วนของลำดับเบสที่ไม่มีอะไรพิเศษเรียกว่า filler ยาว 10 เบส ต่อด้วยเบส CCGG เพื่อให้จับได้กับส่วนเอ็กซอน (exon) หรือ ORF ซึ่งมักเป็นบริเวณที่มีองค์ประกอบของเบสเป็น GC สูง (GC rich) ตรงปลาย 3' ของไพรเมอร์เป็นเบสคัดเลือก (selective base) อีก 3 เบส ที่เปลี่ยนแปลงได้ โดยอาศัยหลักการเดียวกับไพรเมอร์ของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี ส่วน reverse มีขนาด 18 เบส ประกอบด้วยลำดับเบสแกนที่เหมือนกันยาว 15 เบส เป็นส่วน filler ยาว 11 เบส ต่อด้วยเบส AATT เพื่อให้จับกับดีเอ็นเอในจีโนมบริเวณ AT สูง ซึ่งมักพบในส่วนอินตรอน (intron) และโพรโมเตอร์ของยีน ตรงปลาย 3' ของไพรเมอร์เป็นเบสคัดเลือกที่เปลี่ยนแปลงได้อีก 3 เบส การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างใช้วิธี step up PCR คือ ใช้อุณหภูมิ annealing ต่ำที่ 35 องศาเซลเซียส 5 รอบเพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้ดีแล้วจึงเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นตามปกติอีก 30-35 รอบ เพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่มาจาก 5 รอบแรกเท่านั้น ทำให้ผลที่ได้มีความคงที่

หลังจากนั้นตรวจสอบผลด้วยเจลพอลิอะครีลาไมด์ ผลที่ได้จะพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน โดยการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2552)

2.5 ทืออาร์เอพี (target region amplification polymorphism, TRAP) เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นโดย Hu and Vick (2552) ซึ่งประยุกต์วิธีออกแบบไพรเมอร์โดยอาศัยข้อมูลลำดับเบสของยีนในฐานข้อมูล EST database เลือกยีนในฐานข้อมูลที่สนใจ เช่น ยีนต้านทานโรค แล้วออกแบบไพรเมอร์จากส่วนหนึ่งของยีน อาจเป็นส่วนที่สำคัญและอนุรักษ์ สังเคราะห์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน ส่วนอีกไพรเมอร์หนึ่งเป็นแบบสุ่ม ซึ่งออกแบบโดยวิธีเดียวกับไพรเมอร์ที่ใช้กับเครื่องหมายเอสอาร์เอพี นำไพรเมอร์แต่ละคู่มาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างโดยวิธี step up PCR เช่นเดียวกับเครื่องหมายเอสอาร์เอพี และตรวจสอบผลด้วยเจลพอลิอะครีลาไมด์ ผลที่ได้จะพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน โดยการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2552)

2.6 เอเอฟแอลพี (amplified fragment length polymorphism, AFLP) เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่พัฒนาขึ้นโดย Vos and Zabeau (1993) พื้นฐานของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี คือ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ดังนั้นจึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี และประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์ เข้าไว้ด้วยกัน

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มาจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทำได้โดยการเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์โดย adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่สั้น ๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียวเหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ที่เลือกใช้ จึงสามารถเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดไว้โดยใช้ปลายเหนียว (sticky end ligation) และทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ต่อไป ด้วยวิธีการดังกล่าวนี้ ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ จะสามารถเพิ่มปริมาณขึ้นได้โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับส่วนของ adapter รวมกับส่วนของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ อย่างไรก็ตาม จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้คราวเดียวกันมีมาก และไม่สามารถจะแยกจากกันหรือตรวจสอบโดยวิธีทั่ว ๆ ไป เช่น การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังนั้นการสังเคราะห์ไพรเมอร์ในการทำเอเอฟแอลพีจึงเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกเข้าที่ปลาย 3' ต่อจากเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ เพื่อให้เลือกจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ต่อบริเวณตัดจำเพาะสอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์นั้น ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพียงบางส่วน และ

สามารถกำหนดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปนั่นเอง ถ้าดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหรือจีโนมที่ศึกษามีส่วนประกอบของเบสทั้ง 4 ชนิด (G, A, C, T) ในสัดส่วนเท่ากัน การเพิ่มเบสที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์เพื่อคัดเลือก 1 เบสจะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณเหลือเพียง 1 ใน 4 ของทั้งหมด ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 2 เบส จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ก็จะลดลงเหลือ $(1/4)^2$ หรือ 1 ใน 16 ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดได้ทั้งหมด ดังนั้น จึงสามารถควบคุมให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในจำนวนที่เหมาะสมได้ โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปแต่ละเบสจะลดปริมาณชิ้นดีเอ็นเอลงเหลือ $(1/4)^n$ ของทั้งหมด ซึ่ง n คือจำนวนเบสสำหรับคัดเลือกที่เพิ่มขึ้น ในทางปฏิบัติ ต้องการให้มีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในช่วง 50-100 แถบ ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel ในสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดเล็กจะใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกจำนวนน้อย ในขณะที่การตรวจสอบดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใหญ่หรือมีความซับซ้อนมาก ต้องใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกจำนวนมากขึ้น เพื่อปรับจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณให้มีจำนวนพอเหมาะ

หลักการทำเอเอฟแอลพี

ขั้นแรก คือ การนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดที่มีจำนวนเบสของตำแหน่งจดจำต่างกัน เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ได้มีหลายชนิด เช่น *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *BglII*, *XbaI* (6-cutter) หรือ *Sse8387I* (8-cutter) ร่วมกับ *MseI* หรือ *TaqI* ซึ่งเป็น 4-cutter เอนไซม์ *MseI* มีตำแหน่งจดจำ คือ 5'-TTAA-3' และเอนไซม์ *TaqI* มีตำแหน่งจดจำ คือ 5'-TCGA-3' ปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์ *MseI* มากกว่า เพราะตัดดีเอ็นเอได้ขนาดพอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ และการแยกโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel ส่วนเอนไซม์ที่ใช้เป็นคู่กันมักใช้เอนไซม์ *EcoRI* เนื่องจากมีราคาถูกและการตัดดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพดี พบการตัดไม่สมบูรณ์ได้น้อย แต่ก็ยังมีความวิจัยอื่น ๆ ที่ใช้เอนไซม์ *PstI* คู่กับ *MseI* เช่น ในการศึกษาความหลากหลายของข้าวโพด (L?bberstedt et al., 2000) หรือ Van de Wouw et al. (2001) ใช้เอนไซม์ *Tru9I* ซึ่งเป็น isochizomer กับเอนไซม์ *MseI* คู่กับ *PstI* ในการศึกษาถั่วในสกุล *Vicia* ส่วนการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงชนิดเดียวจะทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ปลายทั้ง 2 ด้านมีลักษณะเป็นลำดับเบสซ้ำ (inverted repeat) เมื่อถูกทำให้เสียสภาพเป็นสายเดี่ยวจะสามารถกลับมาจับกันเองเกิดโครงสร้างแบบ stem-loop ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถเข้ามาจับได้ หรืออาจทำให้ตรวจพบชิ้นดีเอ็นเอได้จำนวนน้อย เฉพาะชิ้นที่มีขนาดเล็กเท่านั้น เพราะชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเพิ่มปริมาณได้ดีกว่าจึงไม่ค่อยนิยมใช้มากนัก

เมื่อได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอพอเหมาะแล้วจึงเชื่อมต่อกับ adapter เพื่อเป็นตำแหน่งที่จับไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่ง adapter จะออกแบบให้มีปลายที่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับปลายเหนียวของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ แต่เบสที่อยู่ในตำแหน่งถัดมาเป็นคนละชนิดกับเบสที่บริเวณจดจำของเอ็นไซม์ ดังนั้นเมื่อ adapter เข้าไปเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอแล้ว เอ็นไซม์ตัดจำเพาะนั้นจะไม่สามารถตัดได้อีก

ขั้นที่สอง คือ การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสทางปลาย 5' เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำ หรือบริเวณตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' อีกส่วนหนึ่งเพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วน ส่วนของไพรเมอร์ที่เหมือนกับ adapter และบริเวณจดจำของเอ็นไซม์ เรียกว่า common part ส่วนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' เรียกว่า selective part จำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณลง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณได้ต้องมีลำดับเบสที่อยู่ต่อกับตำแหน่งตัดจำเพาะของเอ็นไซม์สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไป ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกรวมขึ้นจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณลดลงประมาณ 4 เท่าต่อทุก ๆ เบสที่เพิ่มขึ้น การศึกษาจีโนมขนาดเล็ก หรือโคลนที่อยู่ในพลาสมิด คอสมิด หรือ bacterial artificial chromosome (BAC) ไม่จำเป็นต้องเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก เนื่องจากจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดโดยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะมีจำนวนน้อยอยู่แล้ว และสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดเล็กไม่ใหญ่มาก เช่น แบคทีเรีย หรือเชื้อรา จะเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 1-2 เบส จึงทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณเพียงครั้งเดียว ส่วนพวกที่มีจีโนมขนาดใหญ่จะเพิ่มเบสมากกว่า 2 เบสที่ไพรเมอร์ทั้งสองชนิด และจะทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรก เรียกว่า preselective amplification และการทำฟิชอาร์ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification โดยไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกที่ปลาย 3' จะเรียกเป็นไพรเมอร์ +1, +2, +3, +4 ตามลำดับ เช่น ไพรเมอร์ทางปลาย EcoRI adapter จะเรียกว่า EcoRI+1, EcoRI+2, EcoRI+3 และ EcoRI+4 เป็นต้น

ขั้นสุดท้าย คือ การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel แลบดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่แยกได้ในช่วง 50-100 แลบ การตรวจสอบแลบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยการย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท การทำออโตเรดิโอกราฟ หรือตรวจสอบผลด้วยการไฮบริไดเซชันกับโพรบที่ติดฉลากด้วยสารปลดรังสี (non radioactive label) หรือตรวจสอบการเรืองแสงโดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automatic sequencer) (สุรินทร์, 2552; Vos et al., 1995)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำเอเอฟแอลพีมีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใด ๆ ก็ได้ ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ที่เหมาะสมได้โดยปรับจำนวนเบสคัดเลือกว่า 3' ของไพรเมอร์ที่ใช้ แม้ว่าวิธีการทำเอเอฟแอลพีจะค่อนข้างยุ่งยาก แต่ผลที่ได้สามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) และสามารถเลือกกลุ่มผสมของไพรเมอร์ได้หลายแบบ ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์คู่หนึ่งนั้นจะเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากในเวลาเดียวกัน รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างหรือโพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นมาจากการเปลี่ยนแปลงเบส (point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์หายไปหรือเกิดขึ้นใหม่ หรือการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ตรงส่วนที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกว่า 3' ของไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังกล่าวแล้วแต่กรณี หรืออาจเกิดจากการมีขึ้นดีเอ็นเอสั้น ๆ ขาดหายไป หรือสอดแทรกเข้ามาในระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะของเอ็นไซม์ก็ได้ ผลที่เกิดขึ้น คือ การมีแถบดีเอ็นเอ หรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้น ๆ หรือขึ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเปลี่ยนไป การถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากการทำเอเอฟแอลพี จึงมีทั้งแบบที่แสดงลักษณะข่ม (dominance) โดยปรากฏเป็นการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ และแบบที่แสดงลักษณะข่มร่วมกัน (codominance) โดยปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยทั่วไปจะพบเครื่องหมายเอเอฟแอลพีแบบที่เป็นลักษณะข่มมากกว่า ถึงแม้ว่าเครื่องหมายเอเอฟแอลพีตั้งชื่อเลียนแบบจากเครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี แต่โพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ไม่ได้เกิดจากความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอเหมือนในอาร์เอฟแอลพี แต่เกิดจากการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้น ข้อดีของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี คือ ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษามาก่อน และด้วยประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์จึงทำการศึกษาได้อย่างรวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวนน้อย นอกจากนี้ ในการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่ง ๆ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (multilocus) พร้อมกัน ในหนึ่งปฏิกิริยาจะให้แถบดีเอ็นเอมากกว่าอาร์เอฟแอลพีประมาณ 4 เท่า จึงทำให้เกิดโพลิมอร์ฟิซึมได้จำนวนมาก จึงสามารถใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง หรือการศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตได้อย่างละเอียด ซึ่งสามารถใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีได้กับสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดเล็กก็ได้ โดยการปรับจำนวนเบสที่ใช้คัดเลือกว่า 3' ของไพรเมอร์ หรือใช้กับดีเอ็นเอที่โคลนไว้ก็ได้ แต่เครื่องหมายเอเอฟแอลพีก็มีข้อจำกัดในด้านค่าใช้จ่ายเริ่มต้นที่ค่อนข้างสูง วิธีการที่ทำค่อนข้างซับซ้อนเมื่อเทียบกับอาร์เอฟแอลพี และไมโครแซทเทลไลต์ แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่แสดงการข่มแบบ dominance ซึ่งทำให้วิเคราะห์ผลได้ยากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบที่เป็น codominance เช่น อาร์เอฟแอลพี และไมโครแซทเทลไลต์ (สุรินทร์, 2552)

จากที่กล่าวมาทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า เครื่องหมายเอเอฟแอลพีเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพมาก จึงได้นำไปใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ หรือใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต เพื่อบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง รวมถึงนำไปใช้จำแนกสายพันธุ์พืช (varietal identification)

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic variation and/or genetic diversity)

การวิเคราะห์จัดกลุ่มเข้ามามีส่วนในการศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพันธุ์พืช ใช้จำแนกพันธุ์พืชที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมให้อยู่กลุ่มเดียวกัน การวิเคราะห์สามารถใช้ข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากการใช้ข้อมูลลักษณะปรากฏของพันธุ์พืช และเครื่องหมายโมเลกุล ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อโครงการปรับปรุงพันธุ์พืช

เครื่องหมายเอเอฟแอลพี สามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่เป็นชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันในพืชหลายชนิด เช่น ศึกษาในถั่ว common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (Rosales-Serna et al., 2005; Maras et al., 2008) ถั่ว alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Lerma et al., 2003) ถั่ว cowpea พันธุ์พื้นเมือง (*Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata*) (Tosti and Negri, 2002) ถั่ว azuki (Xu et al., 2000) ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr.) (Keim et al., 1997; Ude et al., 2003) งา (*Sesamum indicum* L.) (Ali et al., 2007) ข้าว indica (Prashanth et al., 2002) ข้าวสาลี (*Triticum turgidum* L. ssp. *durum*) (Soleimani et al., 2002) มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.) (Solis et al., 2007) ข้าวโพด (*Zea mays* L.) (L?bberstedt et al., 2000; Garcia et al., 2004) ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (Menz et al., 2004)

รวมถึงสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดกัน เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ของอ้อย (*Saccharum* spp.) (Lima et al., 2002) ถั่วลันเตา (*Pisum sativum* L.) (Tar'an et al., 2005) ถั่วสกุล *Mucuna* sp. (Capochichi et al., 2001) ถั่ว cowpea (*Vigna* spp.) (Coulibaly et al., 2002) *Setaria* spp. (Le Thierry d' Ennequin et al., 2000) ฝ้าย (*Gossypium* spp.) (Pillay and Myers, 1999; Abdalla et al., 2001) หญ้า tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) (Rouf et al., 2002) หญ้า Rhodesgrass (*Chloris gayana* Kunth) (Ubi et al., 2003) หญ้า Bluegrass (Larson et al., 2001) และ Bermudagrass (*Cynodon* spp.) (Zhang et al., 1999)

นอกจากนี้ยังสามารถบอกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในวงศ์เดียวกันได้เช่น Aggarwal et al. (1999) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชต่างชนิดในสกุล *Oryza* รวมทั้ง ข้าวโพด อ้อย และถั่วเหลือง โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีทำให้สามารถอธิบายวิวัฒนาการของพืชในสกุลนี้ได้ว่ามีบรรพบุรุษร่วมกัน หรือมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน แต่ถูกแยกออกจากกันในช่วงแรกของกระบวนการวิวัฒนาการ เกิดเป็นพืชหลายชนิดที่มีความแตกต่างกัน และยังพบว่าเครื่องหมายเอเอฟแอลพีสามารถที่จะจำแนกลักษณะที่เกิดจากการกลายพันธุ์ได้ (Licum and Briggs, 1995) เช่น การตรวจสอบการกลายพันธุ์เนื่องจาก somaclonal variation ในกล้วย *Musa* spp., *Arabidopsis thaliana*, *Taxus canadensis* Marsh., ข้าวไรย์ (*Secale cereale* L.) เป็นต้น (Engelborghs et al., 1998; Corradini et al., 2002; Polanco and Ruiz, 2002; De la Puente et al., 2008)

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันนั้น มีรายงานว่ามียกวิจัยหลายกลุ่มได้นำเครื่องหมายดีเอ็นเอต่าง ๆ เช่น อาร์เอฟแอลพี อาร์เอฟดี เอเอฟแอลพี เอสเอสอาร์ เป็นต้น มาใช้ศึกษา ตัวอย่างเช่น

Berry et al. (1994) และ Gentzbittel et al. (1994) ได้เริ่มศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี พบว่าทานตะวันสายพันธุ์แท้ (inbred lines) 41 พันธุ์ มีระดับโพลิมอร์ฟิซึม เท่ากับ 20-45 % และสามารถแยกเป็นกลุ่มของ maintainer (B-lines) และ restorer (R-lines) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวได้มียกวิจัยหลายกลุ่ม นำไปใช้สร้างแผนที่ยีนโดยใช้เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพีในทานตะวันพันธุ์แท้ต่าง ๆ (Berry et al., 1995; Gentzbittel et al., 1995, 1999; Jan et al., 1998; Gedil et al., 2001)

Cheres and Knapp (1998) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมทานตะวันสายพันธุ์แท่น้ำมัน (oilseed) 106 สายพันธุ์ ชนิดบริโภคมะลิ (confectionery) 50 สายพันธุ์ และเชื้อพันธุกรรมที่เป็นบรรพบุรุษ 157 สายพันธุ์ ผลการจัดกลุ่มที่วิเคราะห์ด้วยวิธีบรรพบุรุษร่วม (coancestry) และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธี principal component analysis สามารถแบ่งกลุ่มทานตะวันออกเป็น กลุ่มทานตะวันชนิดน้ำมัน (oilseed) และชนิดบริโภคมะลิ (confectionery) และแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามลักษณะ fertility restorer ออกเป็นกลุ่ม restorer (R) line และกลุ่ม maintainer (B) line โดยมีค่าเฉลี่ยของ coancestry ระหว่างชนิดน้ำมันที่เป็น R-line เท่ากับ 0.25 ชนิดน้ำมันที่เป็น B-line เท่ากับ 0.10 ชนิดบริโภคมะลิ R-line เท่ากับ 0.31 และ ชนิดบริโภคมะลิ B-line เท่ากับ 0.25 จึงสรุปได้ว่า ทานตะวันชนิดน้ำมันที่เป็น B-line มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าทานตะวันชนิดอื่น ๆ สำหรับการวิเคราะห์บรรพบุรุษร่วมสามารถ

จัด heterotic groups ของเชื้อพันธุ์กรรมทานตะวันได้ในบางพันธุ์เท่านั้นที่มีข้อมูลสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามการนำข้อมูลบรรพบุรุษและลายพิมพ์ดีเอ็นเอมาใช้ร่วมกัน ทำให้การจัด heterotic groups ของทานตะวันได้ดียิ่งขึ้น

Dehemer and Friedt (1998) ได้ใช้ลำดับเบส simple sequence repeat (SSR) motifs และ M13 repeat sequence จำนวน 16 แบบ เป็นตัวไฮบริไดเซชัน (hybridization probe) สำหรับวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในทานตะวันสายพันธุ์จากเยอรมัน 2 พันธุ์ และสายพันธุ์จากอเมริกาเหนือ (USDA) 8 พันธุ์ ที่ทราบประวัติของพันธุ์ (pedigree) พบว่า ลำดับเบสซ้ำที่มีความเหมาะสมสำหรับการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ประกอบด้วย (ACA)₆, (CAT)₆, (CATA)₅, (GACA)₄ และ (GATA)₄ ที่สามารถแบ่งแยกสายพันธุ์ทานตะวันจากทั้งสองแหล่งออกจากกันตามประวัติของพันธุ์ และจากข้อมูลไพรเมอร์เอสเอสอาร์ สามารถนำไปศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์ต่าง ๆ ทั้งที่ทราบและไม่ทราบประวัติของพันธุ์ได้อย่างชัดเจน

Lawson et al. (1994) ได้ใช้เครื่องหมายอาร์เอฟดีประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันในประเทศออสเตรเลีย ซึ่งประกอบด้วย พันธุ์การค้า (Suncross 40R, Hysun 33, Hysun 45CQ, Advance, DK3873) สายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุง (breeding lines) (Sunfola, S37-388, PhRR3, HA-R2, MC29, MC69, S37-388RR) พันธุ์ป่า (*H. annuus*, *H. argophyllus*) และ *Tithonia diversifolia* ซึ่งมีลักษณะพันธุกรรมต่างจากพันธุ์การค้า และกลุ่มสมระหว่างทานตะวันที่เป็น hexaploid และ diploid (*H. tuberosus* x *H. annuus*) โดยพบจำนวนแถบทั้งหมด 158 แถบ มี 133 แถบที่แสดงระดับโพลิมอร์ฟิซึม และพบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ คือ กลุ่มพันธุ์การค้า พันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ และพันธุ์ป่า มีความแตกต่างเท่ากับ 33, 27 และ 38% ตามลำดับ ขณะที่ *Tithonia diversifolia* และกลุ่มสม *H. tuberosus* x *H. annuus* มีความแตกต่างทางพันธุกรรม 51 % และยังพบว่าไพรเมอร์ที่ได้จาก 5s ribosomal RNA space region ไม่สามารถตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมในทานตะวันพันธุ์การค้า และสายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงได้ เนื่องจากลำดับเบสมีลักษณะเหมือนกันมากระหว่างสองกลุ่มสายพันธุ์ แต่พบความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงในพันธุ์ป่า และ *T. diversifolia* จากการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่า ทานตะวันพันธุ์การค้ามีฐานพันธุกรรมกว้าง และสรุปได้ว่า เครื่องหมายอาร์เอฟดีเหมาะสำหรับใช้เป็นเครื่องมือตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของทานตะวันเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ได้

Hongtrakul *et al.* (1997) ใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้น้ำมัน 24 สายพันธุ์ เพื่อใช้จัด heterotic group โดยใช้ไพรเมอร์ 6 คู่ ปรากฏแถบดีเอ็นเอทั้งสิ้น 359 แถบ (60 แถบต่อไพรเมอร์) โดยมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) เท่ากับ 0.70-0.91 มีค่าโพลิมอร์ฟิซึม 7-24 % และมีค่า PICs ระหว่าง 0.0-0.5 (ค่าเฉลี่ย = 0.14) จากการวิเคราะห์จัดกลุ่มสามารถแยกเป็นกลุ่มของ B-lines และ R-lines ซึ่งสองกลุ่มนี้จัดอยู่คนละ heterotic group กัน

Dong *et al.* (2007) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมทานตะวันชนิดบริโกเมล็ดที่รวบรวมจากมณฑลต่าง ๆ ของประเทศจีน จำนวน 70 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี 8 คู่ไพรเมอร์ ร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา 17 ลักษณะ แล้วนำไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยใช้วิธี Euclidean distance และวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วยวิธี principal component analysis เพื่อจัดกลุ่มข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างพบว่า ข้อมูลเอเอฟแอลพีอยู่ในช่วง 0.32-1.56 ส่วนลักษณะทางสัณฐานวิทยาอยู่ในช่วง 0.30-1.48 จากไพรเมอร์เอเอฟแอลพี 8 คู่ พบแถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 77.5 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ มีค่าโพลิมอร์ฟิซึมเท่ากับ 78.5 % และสามารถแบ่งกลุ่มได้ 5 กลุ่ม ส่วนลักษณะทางสัณฐานวิทยาแบ่งกลุ่มได้ 8 กลุ่ม ซึ่งการจัดกลุ่มดังกล่าวไม่สอดคล้องกับแหล่งที่รวบรวม เพราะทานตะวันชนิดบริโกเมล็ดที่ได้นั้นได้รับการปรับปรุงพันธุ์โดยการคัดเลือกเอาลักษณะดีเด่นที่ต้องการมาผสมพันธุ์กัน โดยมีได้คำนึงถึงแหล่งที่มา จึงทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันบริโกเมล็ดจากแหล่งต่าง ๆ เหลื่อมซ้อนกัน

Iqbal *et al.* (2008) ได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวัน 8 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอฟดี 20 คู่ไพรเมอร์ ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 156 แถบ มี 104 แถบที่แสดงลักษณะโพลิมอร์ฟิซึม และมีแถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 7.8 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เมื่อวิเคราะห์ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธี Nei and Li (1979) มีค่าเท่ากับ 51.59-77.78 % แสดงว่ามีฐานพันธุกรรมกว้าง จากข้อมูลดังกล่าวได้นำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันและพัฒนาสายพันธุ์ลูกผสม

Liu *et al.* (2003) ได้เปรียบเทียบการใช้เครื่องหมายอาร์เอฟดี และเอเอฟแอลพีในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมของทานตะวันชนิดบริโกเมล็ดของประเทศจีน จำนวน 23 accessions จากการศึกษารหัสอาร์เอฟดี พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 192 แถบ มี 165 แถบที่เกิดโพลิมอร์ฟิซึม (86.12 %) ส่วนเอเอฟแอลพี พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 576 แถบ มี 341 แถบที่เกิด

โพลิมอร์ฟิซึม (59.20 %) จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งของอาร์เอพีดี (1.76) สูงกว่าเอเอฟแอลพี (1.65) เล็กน้อย ทำให้ค่า PICs (polymorphism information content) ของเอเอฟแอลพี (PICs = 0.38) ต่ำกว่า อาร์เอพีดี (PICs = 0.41) ด้วย สำหรับค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของอาร์เอพีดีมีค่าเท่ากับ 47.84-82.06 % ส่วนเอเอฟแอลพีมีค่าเท่ากับ 54.15-83.52 % ข้อมูลจากเครื่องหมายทั้งสองสามารถแบ่ง ทานตะวันชนิดบริโภคเมล็ดออกเป็น 3 กลุ่ม

Norma *et al.* (2002) ได้พัฒนาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เพื่อประเมินความสัมพันธ์ ทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุกรรมของทานตะวัน 16 accessions พบว่า มีไพรเมอร์เอสเอสอาร์ 170 ไพรเมอร์ที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมในสายพันธุ์แท้ 16 accessions และจากไพรเมอร์ 20 ไพรเมอร์ พบ แถบโพลิมอร์ฟิซึมเฉลี่ย 3.5 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีค่า PICs เฉลี่ยเท่ากับ 0.55 และลำดับเบสซ้ำ (simple sequence repeats) ที่พบมากที่สุด คือ $(GA)_n$, $(GT)_n$, $(AT)_n$, $(ATT)_n$, $(TGG)_n$, $(ATC)_n$ และ $(CATA)_n$ ซึ่งความแตกต่างดังกล่าวสามารถนำไปในการจำแนกลักษณะต่าง ๆ และจัดกลุ่ม ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทานตะวัน สำหรับประยุกต์ใช้ศึกษาสายพันธุ์ดีเอ็นเอ และการทำ แผนที่ยีนของทานตะวัน ได้

Popov *et al.* (2002) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 30 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี และการวิเคราะห์ไอโซไซม์ (isozyme) จากไพรเมอร์ อาร์เอพีดี 12 ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 221 แถบ มี 133 แถบ (72.6 %) ที่แสดงระดับ โพลิมอร์ฟิซึม สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่มตามลักษณะ fertility restorers คือ กลุ่ม B-line และ R-line โดยมีค่าความเหมือนอยู่ในช่วง 0.230 - 0.706 ส่วนการวิเคราะห์ไอโซไซม์จาก 8 เอนไซม์ สามารถ จัดกลุ่มได้ 3 กลุ่มที่ไม่สามารถอธิบายลักษณะที่สอดคล้องกันได้ชัดเจน เพราะการวิเคราะห์ ไอโซไซม์ เป็นการตรวจสอบเฉพาะเจาะจงกับเนื้อเยื่อ และระยะการเจริญเติบโต รวมทั้งอิทธิพล ของสภาพแวดล้อมมีผลต่อการตรวจสอบ ดังนั้นการใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีศึกษาความหลากหลาย ทางพันธุกรรมจึงให้ข้อมูลที่ถูกต้อง และน่าเชื่อถือมากกว่า สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sivolap *et al.* (1997) และ Pizarro *et al.* (2000)

Quagliaro *et al.* (2001) ใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรม ของทานตะวันพันธุ์ป่า (*Helianthus argophyllus*) จาก Maputo area และ Mozambique พันธุ์ปลูก (*H. annuus* L.) และพันธุ์ลูกผสม (*H. argophyllus* x *H. annuus* L.) พบไพรเมอร์ 3 คู่ที่ให้แถบ ดีเอ็นเอชัดเจน และปริมาณมาก โดยให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึม 92 แถบ และสามารถให้

แยกพันธุ์ป้าออกจากพันธุ์ปลูก และพันธุ์ลูกผสมได้ชัดเจน และพบว่ามีค่าโพลิมอร์ฟิซึม สูงใน 2 ประชากรจาก 12 ประชากรซึ่งใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงทานตะวันต่อไปได้

Serene *et al.* (2003) ใช้เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 16 สายพันธุ์ โดยใช้ 20 คู่ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 164 แถบ มีค่าโพลิมอร์ฟิซึมเท่ากับ 69.51 % และสามารถแบ่งกลุ่มทานตะวันออกเป็น 8 กลุ่ม เป็นกลุ่ม B-lines และ R-lines โดยมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.67-0.90 ซึ่งสามารถนำข้อมูลดังกล่าวใช้เป็นพื้นฐานในการจัด heterosis ของทานตะวันได้

Sujatha *et al.* (2002) ได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 51 สายพันธุ์ และพันธุ์เปรียบเทียบ 3 สายพันธุ์ ที่มีถิ่นกำเนิดแตกต่างกัน โดยใช้เก็บข้อมูลทางสถิติทางพันธุกรรม 15 ลักษณะ และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี Mahalanobis D² statistics สามารถแบ่งกลุ่มออกเป็น 8 กลุ่ม ซึ่งไม่สอดคล้องกับถิ่นกำเนิด เพราะอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมมีส่วนทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วย จากข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรม และรูปแบบการจัดกลุ่มสามารถคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่ที่เหมาะสมสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ในอนาคตได้

Yu *et al.* (2002) ได้ศึกษาความหลากหลายของอัลลีล (allelic diversity) ด้วยเครื่องหมายเอสเอสอาร์ในทานตะวันสายพันธุ์การค้า 16 สายพันธุ์ โดยสร้างไพรเมอร์เอสเอสอาร์ จาก genomic DNA libraries 970 clones ที่มี (CA)_n, (CT)_n, (CAA)_n, (CATA)_n หรือ (GATA)_n ซ้ำ ๆ กันอยู่ โดยออกแบบ และทดสอบไพรเมอร์ที่มีจำนวนลำดับเบสซ้ำเพียงชุดเดียว (unique SSR) จำนวน 171 ชิ้น และเครื่องหมายเอสเอสอาร์จำนวน 74 เครื่องหมาย ซึ่งใช้ตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมในสายพันธุ์แท้ พบว่า มีจำนวนเฉลี่ยของอัลลีลต่อตำแหน่งของ dinucleotide, trinucleotide และ tetranucleotide เท่ากับ 3.7, 3.6 และ 9.5 ตามลำดับ มีค่า PICs เท่ากับ 0.53, 0.53 และ 0.83 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างเครื่องหมายเอสเอสอาร์ กับ อาร์เอฟแอลพี พบว่า เครื่องหมายเอสเอสอาร์แสดงระดับโพลิมอร์ฟิซึมมากกว่าอาร์เอฟแอลพี และเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น ๆ ในทานตะวัน (20% โพลิมอร์ฟิซึมเครื่องหมายเอสเอสอาร์มีค่า PICs เท่ากับ 0.70-0.93) การพัฒนาเครื่องหมายเอสเอสอาร์ใหม่นี้มีความสำคัญในการเพิ่มจำนวนของเครื่องหมายเอสเอสอาร์ สำหรับใช้สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สร้างแผนที่ยีน และการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันต่อไป

Zhang *et al.* (2005) ได้พัฒนาชุด simple sequence repeat (SSR) marker จำนวน 78 เครื่องหมาย สำหรับใช้จำแนกพันธุ์และประเมินความหลากหลายของทานตะวัน 124 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วย female maintainers 67 สายพันธุ์ และ male restorers 57 สายพันธุ์ จากการศึกษาพบจำนวนอัลลีลทั้งหมด 276 อัลลีล ซึ่งมีจำนวนอัลลีลเฉลี่ย 3.5 อัลลีลต่อตำแหน่ง มีค่า PICs ระหว่าง 0.06-0.81 และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์แท้ โดยประเมินจากระยะระหว่างอัลลีลตามวิธีของ Rogers' distances ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 0.4-0.6 จึงสรุปได้ว่า ไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม B-lines และ R-lines แต่พบความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม B-lines กับ R-lines

Yue *et al.* (2009) ได้ศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 177 สายพันธุ์ที่พัฒนาจาก USDA-ARS โดยใช้เครื่องหมายทีอาร์เอฟจำนวน 12 คู่ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึมทั้งหมด 230 แถบ มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธี simple matching เท่ากับ 0.30-0.97 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.58 แสดงให้เห็นว่าทานตะวันสายพันธุ์แท้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และสามารถแบ่งกลุ่มทานตะวันออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ทานตะวันชนิดน้ำมัน และชนิดบริโภคเมล็ด และแต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็นกลุ่ม fertility maintainer (OB, CB) และ fertility restorer (OR, CR) ที่แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 4, 3, 2 และ 2 กลุ่มย่อย ตามลำดับ จากการศึกษาสรุปว่าเครื่องหมายทีอาร์เอฟ สามารถในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันได้

การจัดกลุ่มตามความหลากหลายทางพันธุกรรม

เทคนิคการแบ่งกลุ่มมีหลายเทคนิค ในที่นี้จะกล่าวถึงเทคนิคการแบ่งกลุ่ม 2 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

1. การแบ่งกลุ่มตัวแปร

เป็นเทคนิคที่ใช้แบ่งกลุ่มตัวแปรหลายๆ ตัวที่มีความสัมพันธ์ออกเป็นกลุ่มย่อยๆ โดยที่ตัวแปรที่อยู่ในกลุ่ม (หรือเรียกว่าปัจจัย) เดียวกันจะต้องมีส่วนร่วมกันหรือสัมพันธ์กัน เช่น การวิเคราะห์ตัวองค์ประกอบหลัก (principal component analysis; PCA)

PCA เป็นเทคนิคการลดจำนวนตัวแปรเทคนิคหนึ่งเนื่องจากการทำวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ สังคมศาสตร์ ธุรกิจ ภาษาศาสตร์ ฯลฯ มักจะมีข้อมูลและตัวแปรเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นอุปสรรคในการวิเคราะห์และสรุปผลโดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าตัวแปรมีความสัมพันธ์กัน โดยการสร้างชุดของตัวแปรใหม่ให้เป็นฟังก์ชันเชิงเส้นของตัวแปรเดิม และชุดของตัวแปรใหม่จะรวมค่าความแปรปรวนของตัวแปรเดิมมาไว้ให้มากที่สุด จำนวนตัวแปรใหม่จะต้องไม่เกินจำนวนตัวแปรเดิม นั่นคือ กรณีที่ตัวแปรเดิม p ตัว จำนวนตัวแปรใหม่ เท่ากับ m ตัว จะได้ว่า $m \leq p$

PC_1 หรือตัวประกอบหลักที่ 1 เป็นฟังก์ชันเชิงเส้นของตัวแปรเดิมทั้ง p ตัว และจะดึงค่าความแปรปรวนจากตัวแปรทั้ง p ตัวมาไว้ใน PC_1 ให้มากที่สุด จึงทำให้ PC_1 มีค่าความแปรปรวนมากที่สุด เมื่อเทียบกับ PC อื่น ๆ ที่เหลือ ($PC_2, PC_3, \dots, PC_n$) โดยที่ความแปรปรวนของ PC จะลดลงเรื่อย ๆ จนทำให้ค่าความแปรปรวนของ PC_p ต่ำสุด หรือ $\text{Var}(PC_1) \geq \text{Var}(PC_2) \geq \dots \geq \text{Var}(PC_p)$ และไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่าง PC ต่าง ๆ (กัลยา, 2550)

โดยที่ $PC_i; i = 1, 2, \dots, p$ สามารถเขียนในรูปสมการเส้นตรง ดังนี้ (Everitt and Dunn, 2001)

$$PC_1 = a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \dots + a_{1p}x_p = a_1'x$$

$$PC_2 = a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + \dots + a_{2p}x_p = a_2'x$$

.

.

.

$$PC_n = a_{n1}x_1 + a_{n2}x_2 + \dots + a_{np}x_p = a_n'x$$

เมื่อ	a_{ii}	คือ สัมประสิทธิ์ของตัวแปร x_i
	a_n'	คือ transpose vector ของ a_n
	x	คือ เมตริกของตัวแปรทั้งหมด (x)

2. การแบ่งกลุ่มข้อมูล

เป็นเทคนิคที่ใช้แบ่งกลุ่มคน สัตว์ สิ่งของ องค์กร ฯลฯ ที่เหมือนกันหรือคล้ายกันไว้ในกลุ่มเดียวกัน แต่ต่างกันจะต้องอยู่คนละกลุ่ม การศึกษาความเหมือนหรือความต่างพิจารณาจากตัวแปรที่ใช้ในการแบ่งกลุ่ม เช่น การวิเคราะห์กลุ่ม (cluster analysis)

cluster analysis เป็นเทคนิคการวิเคราะห์ทางสถิติวิธีหนึ่งที่น่าสนใจไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยด้านสังคมศาสตร์ วิทยาศาสตร์ แพทย์ศาสตร์ และเกษตรศาสตร์ เป็นต้น ทางด้านเกษตรศาสตร์สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการพัฒนาพันธุ์พืชในขั้นตอนของการคัดเลือกพันธุ์พ่อแม่สำหรับการจัดผสมพันธุ์ เพื่อให้ได้สายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่มีโอกาสได้ลักษณะตามวัตถุประสงค์ของนักปรับปรุงพันธุ์ หลักการของการวิเคราะห์กลุ่ม คือ จัดให้สิ่งที่มีเหมือนกัน หรือแตกต่างกันน้อยอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ดังนั้น ตัวอย่างกลุ่มหนึ่ง ๆ ที่ต้องการตรวจสอบ หากอยู่ภายในกลุ่มเดียวกันจะมีความเหมือนกันมากกว่าตัวอย่างที่อยู่นอกกลุ่ม การตรวจสอบว่าตัวอย่างกลุ่มหนึ่ง ๆ จะเหมือนหรือแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด จะพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ซึ่งเป็นไปได้ 2 แบบดังนี้ 1) การวัดค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนหรือความคล้าย (similarity coefficient) เป็นการพิจารณาความเหมือนกันระหว่างตัวอย่าง และ 2) การวัดค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง (dissimilarity coefficient) หรือความห่าง (distance) ซึ่งเป็นการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง

การวัดค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน และความต่างทางพันธุกรรม

การวัดค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนหรือความต่างจะขึ้นอยู่กับชนิดข้อมูล การเลือกประเภทข้อมูลเพื่อการวิเคราะห์กลุ่มพันธุ์พืช ขึ้นอยู่กับความต้องการของผู้วิเคราะห์ ข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์สามารถแยกออกได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

1. ข้อมูลไบนารี (binary data) เป็นข้อมูลที่เกิดได้ 2 ลักษณะ คือ “มี” หรือ “ไม่มี” เช่น ข้อมูลจากเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่าง ๆ (อาร์เอฟแอลพี อาร์เอฟดี เอเอฟแอลพี เอสเอสอาร์ ไอเอสเอสอาร์ เอสเอสซีพี) ข้อมูลประเภทนี้นิยมใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนในการวัด

2. ข้อมูลเชิงคุณภาพ (qualitative data) เป็นข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะคุณภาพ เช่น รูปร่าง กลีบดอก สีเมล็ด การ score การเกิดโรคในพืช เป็นต้น ข้อมูลประเภทนี้บันทึกข้อมูลแบบมาตรวัดอันตรภาคชั้น (interval data) และใช้ได้ทั้งค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน และความต่างในการวัด

3. ข้อมูลเชิงปริมาณ (quantitative data) เป็นข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สามารถชั่งตวงวัดได้ เช่น ผลผลิต ความสูง วันเก็บเกี่ยว วันออกดอก เป็นต้น ข้อมูลประเภทนี้จะมีหน่วยวัดที่แตกต่างกัน ทำให้ในการจัดกลุ่มจะต้องมีการแปลงข้อมูลที่มีหน่วยวัดที่ไม่เท่ากันนี้ให้มีหน่วยวัดเท่ากัน โดยแปลงเป็นข้อมูลมาตรฐาน (standardize) ก่อนนำไปวิเคราะห์จัดกลุ่ม ถ้าไม่มีการแปลงข้อมูลก่อนจะทำให้การจัดกลุ่มที่ได้ขึ้นกับลักษณะที่มีตัวเลขที่มีค่ามาก และนิยมใช้ค่าความต่างในการวัด (ประเสริฐ, 2537)

การวัดค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนหรือความต่างระหว่างตัวแปร สามารถทำได้หลายวิธี มีสูตรที่ใช้ในการคำนวณแตกต่างกันไป ซึ่งปัจจุบันมีโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปหลายโปรแกรมช่วยในการคำนวณ การวัดค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนหรือความต่างระหว่างตัวแปรในลักษณะข้อมูลเชิงคุณภาพ และเชิงปริมาณ มีหลายวิธีดังนี้ (ประเสริฐ, 2537; Quinn and Keough, 2002)

1. Euclidean distance การวัดความต่างโดยให้ผลรวมของผลต่างระหว่างข้อมูลแต่ละจุดของตัวแปร

$$D_{ij} = \left\{ \sum_{k=1}^p (x_{ik} - x_{jk})^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

2. Square Euclidean distance การวัดความต่างโดยใช้ผลรวมกำลังสองของผลต่างระหว่างข้อมูลแต่ละจุดของตัวแปร วิธีนี้นิยมใช้กันมากโดยเฉพาะใช้กับข้อมูลลักษณะปริมาณ

$$D_{ij} = \sum_{k=1}^p (x_{ik} - x_{jk})^2$$

3. Absolute หรือ City Block หรือ Manhattan distance เป็นการวัดความต่าง โดยใช้ค่าผลรวมความแตกต่างสัมบูรณ์ (absolute difference) ระหว่างข้อมูลแต่ละจุดของตัวแปร วิธีนี้ต้องใช้ตัวแปรที่มีหน่วยวัดเดียวกัน

$$D_{ij} = \sum_{k=1}^p |x_{ik} - x_{jk}|$$

4. Mahalanobis D^2 distance วิธีนี้ดีกว่าวิธี Euclidean และ City Block เนื่องจากสามารถใช้กับตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันได้

$$D_{ij} = (x_i - x_j) S^{-1} (x_i - x_j)$$

โดยที่ S = เมทริกซ์ความแปรปรวนร่วมภายในกลุ่มที่รวมกันของทุกกลุ่ม
(pooled within-group covariance matrix)

X_i และ X_j เป็นค่าเวกเตอร์ของตัวแปร X ของหน่วยที่ i และ j ตามลำดับ

5. Minkowski distance เป็นวิธีที่เป็นกรณีพิเศษของ Euclidean และ City Block เมื่อ $r=1$ จะเป็นความต่างแบบ City Block และเมื่อ $r=2$ จะเป็นความต่างแบบ Euclidean

$$D_{ij} = \left\{ \sum_{k=1}^p |x_{ik} - x_{jk}|^r \right\}^{\frac{1}{r}}, r \geq 1$$

6. Canberra matrix เป็นการวัดความต่าง โดยใช้ค่าผลรวมความแตกต่างสัมบูรณ์ระหว่างข้อมูลแต่ละจุดของตัวแปร หาค่าผลรวมของผลบวกตัวแปรของข้อมูลทั้งสอง และแปลงเป็นข้อมูลมาตรฐาน (standardize) ด้วยจำนวนตัวแปร ค่าสัมประสิทธิ์นี้มีข้อดี คือ มีการนำค่าตัวแปรที่มีค่าเท่ากับศูนย์ของข้อมูลนำมาคำนวณด้วย

$$D_{ij} = \frac{1}{n} \frac{\sum_k |x_{ik} - x_{jk}|}{\sum_k (x_{ik} + x_{jk})}, 0 \leq D_{ij} \leq 1$$

เมื่อ D_{ij} คือ ระยะทางพันธุกรรมระหว่างพืชพันธุ์ที่ i และ j
 x_{ik} คือ ค่าความถี่ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา k ที่ปรากฏในพันธุ์ i
 x_{jk} คือ ค่าความถี่ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา k ที่ปรากฏในพันธุ์ j
 $\sum_k$ คือ ผลรวมค่าความถี่ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา k ที่ปรากฏ

สำหรับวิธีการวัดความเหมือนหรือความคล้ายในลักษณะข้อมูล binary โดยยึดหลักการ “มี” และ “ไม่มี” สามารถจำแนกเหตุการณ์ได้เป็น 4 แบบ จากตารางสองทิศทาง

		ตัวแปรที่ 1 (i)	
		มี	ไม่มี
ตัวแปรที่ 2 (j)	มี	a	b
	ไม่มี	c	d

โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์แต่ละชนิดที่มีวิธีการคำนวณที่แตกต่างกันดังนี้

1. Simple matching coefficient ประเมินโดยการนับแถบสีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏในตำแหน่งที่เป็นโฮโมโลกัส ซึ่งสามารถใช้กับดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด dominant (อาร์เอฟดี เอเอฟแอลพี และ ไอเอสเอสอาร์) เพราะลักษณะการไม่ปรากฏแถบสีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งเครื่องหมายนั้น ๆ เป็นลักษณะจีโนไทป์แบบ homologous recessive หรือนิยมใช้กับข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตชนิดแฮพลอยด์

$$\text{Simple matching coefficient (SM)} = \frac{(a + d)}{a + b + c + d}$$

2. Jaccard coefficient ประเมินโดยการนับเฉพาะแถบสีเอ็นเอที่ปรากฏ ส่วนที่ไม่ปรากฏแถบสีเอ็นเอไม่นับ ให้เป็นข้อมูลสูญหาย เพราะถ้าข้อมูลของแถบสีเอ็นเอเกิด false-positive หรือ false-negative จะทำให้การประเมินค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริงสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด codominant (อัลโลไซม์ อาร์เอฟแอลพี และ ไมโครแซทเทลไลต์) หรือใช้กับข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตชนิดโพลีพลอยด์

$$\text{Jaccard coefficient (J)} = \frac{a}{a + b + c}$$

3. Nei-Li หรือ Dice coefficient ประเมินโดยการนับแถบสีเอ็นเอที่ปรากฏ โดยให้น้ำหนักของแถบสีเอ็นเอที่ปรากฏมากกว่าแถบสีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏ สามารถใช้ได้ทั้งผลที่ทำการวิเคราะห์ด้วยดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด dominant และเครื่องหมายชนิด codominant ในสิ่งมีชีวิตชนิดแฮพลอยด์ ดิพลอยด์ หรือโพลีพลอยด์ (Anonymous, 2003; Kosman and Leonard, 2005)

$$\text{Nei-Li หรือ Dice coefficient} = \frac{2a}{2a + b + c}$$

การเลือกค่าสัมประสิทธิ์เพื่อวิเคราะห์ค่าความเหมือน หรือค่าความต่างที่แตกต่างกัน ผลลัพธ์ที่ได้ก็จะแตกต่างกันขึ้นกับสูตรที่เลือกใช้ เนื่องจากการประเมินของแต่ละค่าประสิทธิ์จะให้น้ำหนักกับการปรากฏแถบดีเอ็นเอ และการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกใช้ค่าสัมประสิทธิ์ในการจัดกลุ่มจึงมีความสำคัญต่อรูปแบบของแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree)

เมื่อคำนวณสัมประสิทธิ์ความเหมือนหรือค่าความต่างระหว่างตัวแปรแล้ว จำเป็นต้องจัดตัวแปรเข้ากลุ่มซึ่งมีอยู่หลายวิธี ดังนี้ (ประเสริฐ, 2537; กัลยา, 2544, 2550)

1. การวิเคราะห์กลุ่มแบบขั้นตอน (Hierarchical Cluster Analysis) เป็นการทำการแบ่งกลุ่มแบบเป็นขั้นตอน และเมื่อนำหน่วยใดหน่วยหนึ่งไว้ในกลุ่มใดแล้ว จะไม่มีการย้ายหน่วยนั้นไปไว้กลุ่มอื่น ๆ อีก ซึ่งมี 2 เทคนิคย่อย คือ

1.1 Agglomerative Method เทคนิคนี้จะเริ่มด้วยการถือว่า 1 หน่วยเป็น 1 กลุ่ม ถ้ามี n หน่วย ก็จะมี n กลุ่ม จากนั้นพิจารณาว่าจะรวมหน่วยคู่ใดเข้าด้วยกัน โดยพิจารณาจากความเหมือนหรือความต่าง ถ้าเป็นความเหมือนก็จะรวมหน่วยคู่ที่มีความเหมือนมากที่สุดไว้ด้วยกัน แต่ถ้าใช้ความต่าง ก็จะรวมหน่วยคู่ที่มีความต่างก็น้อยที่สุดไว้ในกลุ่มเดียวกัน หลังจากนั้นเลือกวิธีการรวมกลุ่มซึ่งมีหลายวิธี ทำการรวมกลุ่มหน่วยหรือกลุ่มต่าง ๆ เข้าด้วยกัน จนกระทั่งเหลือเพียง 1 กลุ่ม (ทุกหน่วยอยู่ในกลุ่มเดียวกัน)

ตัวอย่างวิธีการรวมกลุ่มแบบขั้นตอนด้วย เทคนิค Agglomeration

1.1.1 Between-groups linkage หรือเรียกว่าวิธี Average linkage between groups หรือ UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic average) เป็นวิธีการสร้างกลุ่มตัวแปรโดยการหาความต่างระหว่างกลุ่มตัวแปรที่ได้จากค่าเฉลี่ยของความต่างระหว่างกลุ่มตัวแปรทุกคู่ของตัวแปร วิธีการนี้ใช้ข้อมูลจากทุกตัวแปรภายในกลุ่ม

1.1.2 Nearest neighbor หรือ Single linkage เป็นการนำเอาตัวแปรที่มีความต่างกันน้อยที่สุดมาเข้าเป็นกลุ่มก่อน และความต่างระหว่างกลุ่มตัวแปรใช้ค่าที่ต่างกันน้อยที่สุดมาเป็นตัวแทนเปรียบเทียบกับความต่างระหว่างคู่ของตัวแปรอื่น ๆ ที่ยังไม่ได้จัดเข้ากลุ่ม ในทุกขั้นตอนความต่างระหว่างกลุ่มสองกลุ่มคือความต่างระหว่างจุดสองจุดที่ใกล้กันที่สุด

1.1.3 Furthest neighbor technique หรือ Complete linkage เป็นวิธีวัดตัวแปรที่ต่างกันน้อยที่สุดเข้ากลุ่มก่อน ขึ้นต่อไปหาตัวแทนของความต่างระหว่างกลุ่มตัวแปรที่มีค่าต่างกันมากที่สุด เมื่อได้ตัวแทนแล้วก็นำไปเปรียบเทียบกับความต่างระหว่างตัวแปร ค่าที่มีความต่างกันน้อยที่สุดนำมาจัดกลุ่มใหม่ต่อไป ดังนั้น ความต่างระหว่างกลุ่มสองกลุ่ม คือ ความต่างโดยเฉลี่ยระหว่างคู่ทุกคู่ที่เป็นไปได้ของหน่วยที่ก่อให้เกิดกลุ่ม

1.1.4 Centroid Clustering วิธีสร้างกลุ่มโดยยึดสมาชิกที่อยู่กึ่งกลาง ภายในแต่ละกลุ่มมาสร้างเป็นกลุ่มใหม่

1.1.5 Median Clustering คล้ายกับวิธี Centroid ต่างกันเพียงกลุ่มที่เกิดขึ้นใหม่เป็นการหาค่าเฉลี่ยโดยวิธีไม่ถ่วงน้ำหนัก

1.1.6 Ward's Method นิยมใช้วิธีนี้กันมากในการจัดกลุ่ม และมักใช้ร่วมกับการจัดความต่างแบบ Square Euclidean Distance (SED) เป็นการคำนวณหาค่าเฉลี่ยของทุกตัวแปรในกลุ่ม และหาความต่างแบบ SED จากค่าเฉลี่ยของกลุ่มของทุกหน่วย นำความต่างเหล่านี้มารวมกันทุกหน่วยในแต่ละขั้น การรวมกลุ่มกันทำให้ค่าผลรวมของความต่างภายในกลุ่มยกกำลังสองเพิ่มขึ้นน้อยที่สุด

1.2 Divisive Method เทคนิคนี้จะกำหนดให้มีตัวแปรตาม 1 ตัว ส่วนตัวแปรที่เหลือเป็นตัวแปรอิสระ ขั้นตอนการแบ่งกลุ่มจะตรงข้ามกับเทคนิค Agglomeration คือ เริ่มแรกจะถือว่าทุกหน่วยอยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือมีเพียงกลุ่มเดียว แล้วจึงแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย โดยการแบ่งจะพิจารณาตัวแปรอิสระที่ทำให้ตัวแปรตามมีค่าต่างกัน โดยพิจารณาจาก SSB/SST เมื่อ SSB คือ ผลบวกกำลังสองของผลต่างระหว่างกลุ่ม (Between Group Sum Square) และ SST คือ ผลบวกกำลังสองทั้งหมด (Total Sum Square) กลุ่มที่ได้จึงแบ่งตามค่าตัวแปรอิสระที่มีค่า SSB/SST มากที่สุดไปยังค่าน้อยที่สุด

2. การวิเคราะห์กลุ่มแบบไม่เป็นขั้นตอน (Nonhierarchical Cluster Analysis) เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า การแบ่งส่วน (partitioning) เป็นวิธีที่ผู้วิจัยเป็นผู้กำหนดเองว่าต้องการแบ่งเป็นกี่กลุ่ม เช่น k กลุ่ม จึงเรียกรูปแบบนี้ว่า K-means Clustering ที่จะหาค่าที่เหมาะสมของ K ที่ทำให้หน่วยต่าง ๆ ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันมีความเหมือนกันมากที่สุด และต่างกลุ่มกันมีความต่างกัน

วิธีการจัดกลุ่มข้อมูลหรือตัวอย่าง (phylogenetic analysis)

1. Distance matrix method เป็นวิธีการคำนวณหาค่าความเหมือน หรือค่าความต่างของตัวอย่างแต่ละคู่ที่ทำการศึกษาไปยังค่ากลางของกลุ่ม (group centroid) จากนั้นนำมาวิเคราะห์การจัดกลุ่ม โดยเริ่มจากคู่ที่มีค่าความเหมือนสูงสุด หรือมีค่า ความต่างต่ำที่สุด ผลลัพธ์จะได้แผนภูมิต้นไม้ (dendrogram หรือ tree) ออกมา

2. Maximum parsimony เป็นการเปรียบเทียบและค้นหา tree ที่สั้นที่สุด นั่นคือ จำนวน mutation เกิดขึ้นน้อยที่สุดในบรรดากลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา ซึ่งแตกต่างจากวิธี Distance matrix method คือ จะทำการพิจารณาจากข้อมูลทุกค่าร่วมกันเพื่อค้นหา evolution tree ที่สั้นที่สุด วิธี maximum parsimony จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับข้อมูลเกี่ยวกับวิวัฒนาการ เช่น ข้อมูลลักษณะที่ถ่ายทอดจากบรรพบุรุษ ข้อมูลที่เป็นลำดับเบส (gene sequence)

3. Maximum likelihood หรือ Probability methods เป็นการคำนวณหาความน่าจะเป็นหรือโอกาสที่ตัวอย่างหรือข้อมูลนั้นจะอยู่ในกลุ่มที่ $i, i = 1, 2, \dots, k$ แล้วนำมาเปรียบเทียบกันซึ่งก็คือการหาค่า probability (P) ที่ตัวอย่างอยู่ในกลุ่มที่ i เช่น ถ้ามี 2 กลุ่ม ค่า P ของตัวอย่างในกลุ่มที่ 1 มากกว่าค่า P ของตัวอย่างในกลุ่มที่ 2 ก็จะจัดตัวอย่างนั้นอยู่ในกลุ่มที่ 1 (จินตนา, 2549)

Phylogenetic tree หรือ Phylogram มีแนวทางการศึกษา 2 แนวทาง คือ

1. Cladistic เป็นการศึกษาที่เน้นความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ มีการอ้างถึงบรรพบุรุษร่วม (ancestor) ซึ่งการแสดงความสัมพันธ์ เรียกว่า cladogram ที่เป็น tree ที่สั้นที่สุด คือ ภาพแสดงความสัมพันธ์ที่มีวิวัฒนาการหรือการกลายพันธุ์ของลักษณะนั้นน้อยที่สุด วิธีการจัดกลุ่มที่ใช้ในการวิเคราะห์แบบนี้ คือ maximum parsimony และ maximum likelihood ข้อมูลที่นำมาใช้ในการจัดกลุ่มจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา หรือข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ

2. **Similarity/Distance** เป็นการประเมินความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยค่าสหสัมพันธ์ (correlation) และความน่าจะเป็นในการจัดกลุ่ม (probability) โดยใช้วิธีการจัดกลุ่มแบบ distance matrix method ที่จะคำนวณความเหมือน หรือความต่างของตัวอย่างที่ศึกษาแล้วนำค่าที่ได้นั้นมาจัดกลุ่ม โดยตัวอย่างที่คล้ายกันมากที่สุดจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ส่วนตัวอย่างที่คล้ายน้อยหรือมีความต่างกันมากจะถูกจัดแยกกลุ่มออกไป โดยไม่สามารถอ้างอิงถึงบรรพบุรุษได้เลย ลักษณะที่ใช้ในการจัดกลุ่มสามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเช่น ผลผลิตต่อพื้นที่ น้ำหนัก 100 เมล็ด ความสูงต้น เป็นต้น และข้อมูลของลักษณะการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดต่างๆ (อาร์เอฟแอลพี อาร์เอฟดี เอเอฟแอลพี เอสเอสอาร์) การแสดงความสัมพันธ์ของตัวอย่างที่ได้จากการจัดกลุ่มสามารถแสดงโดยแผนภูมิต้นไม้ บอกถึงระดับความเหมือนหรือความต่างกันของแต่ละตัวอย่าง (จินตนา, 2549)

ค่าที่ใช้ในการตรวจสอบ dendrogram

1. ค่า cophenetic correlation coefficient (r) เป็นค่าที่บ่งถึงว่าการจัดกลุ่มที่ได้ดีเพียงใดซึ่งดูได้จากค่า goodness of fit (Rohlf, 2009) โดยคำนวณหาค่า cophenetic correlation coefficient (r) โดย r มีค่ามากกว่า 0.9 ถือว่าจัดกลุ่มได้ดีมาก เมื่อ r มีค่าอยู่ระหว่าง 0.8-0.9 ถือว่าจัดกลุ่มได้ดี เมื่อ r มีค่าอยู่ระหว่าง 0.7-0.8 ถือว่าจัดกลุ่มได้ปานกลาง และเมื่อ r มีค่าน้อยกว่า 0.7 ถือว่าจัดกลุ่มได้ไม่ดี (Sirithunya et al., 2001)

2. ค่า bootstrap เป็นการทดสอบความเชื่อมั่นของ tree โดยวิธีการสุ่มข้อมูลซ้ำ (resampling) จากข้อมูลเริ่มต้นหลาย ๆ ครั้ง โดยบอกเป็น เปอร์เซ็นต์ (%) ของโอกาสที่จะสร้าง tree ขึ้นใหม่ได้เหมือนเดิมเท่าไร เมื่อมีการสุ่มเอาข้อมูลตัวแปร (variable) ใดตัวแปรหนึ่งที่ใช้ในการคำนวณสร้าง tree ออกตามจำนวนครั้งที่ต้องการ

กลุ่มตัวอย่างที่มีค่า bootstrap มาก แสดงให้เห็นว่า tree ที่สร้างมีความน่าเชื่อถือมาก โอกาสที่จะสร้าง tree เปลี่ยนแปลงไปน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับ tree ที่มีค่า bootstrap น้อย ตัวอย่างที่แยกออกเป็นกลุ่มเดียวจะไม่สามารถคำนวณค่า bootstrap ได้ (สุรินทร์, 2552)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการวิจัย

สายพันธุ์ทานตะวันที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ประกอบด้วยสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายชื่อสายพันธุ์ทานตะวัน (*Helianthus annuus* L.) ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ประกอบด้วยสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์

แหล่งที่มา	ชนิด	จำนวน	ชื่อสายพันธุ์
NCRPIS ¹ , สหรัฐอเมริกา	Maintainer (B) line	29	HA65 HA99 HA124 HA208 HA224 HA232
			HA234 HA236 HA277 HA286 HA289 HA291
			HA292 HA300 HA302 HA303 HA304 HA313
			HA314 HA316 HA341 HA343 HA349 HA353
			HA382 HA383 HA851 HA852 HA853
NCRPIS, สหรัฐอเมริกา	Restorer (R) line	20	RHA265 RHA269 RHA270 RHA276 RHA278
			RHA293 RHA294 RHA297 RHA299 RHA325
			RHA327 RHA331 RHA332 RHA333 RHA348
			RHA360 RHA364 RHA366 RHA386 RHA388
มหาวิทยาลัย เทคโนโลยีสุรนารี, ไทย		6	PK-101 No.4 No.12 No.13 No.14 No.17
นักวิชาการอิสระ, ไทย		1	หัตตรา
พันธุ์การค้า (Check)		3	Hybrid I Hybrid II Hybrid III

¹ The North Central Regional Plant Introduction Station, Ames, Iowa, U.S.A.

2. อุปกรณ์และสารเคมี

2.1 อุปกรณ์สำหรับการสกัด วัดคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอ

- 2.1.1 โกร่งบดตัวอย่าง
- 2.1.2 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath incubator)
- 2.1.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge)
- 2.1.4 ชุดแยกขนาดดีเอ็นเอ (gel electrophoresis) สำหรับ agarose gel
- 2.1.5 เตาไมโครเวฟ
- 2.1.6 ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส
- 2.1.7 ชุดฉายแสงยูวีและอุปกรณ์ถ่ายภาพเจล (Gel Documentation System)
- 2.1.8 หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2 อุปกรณ์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ ได้แก่ เครื่องพีซีอาร์ หรือเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมระบบควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ

2.3 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี ได้แก่ ชุดแยกขนาดดีเอ็นเอแบบตั้ง (sequencing gels) สำหรับ acrylamide gel

2.4 อุปกรณ์สำหรับการวัดและเก็บข้อมูลทางลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ไม้บรรทัด ไม้เมตร สายวัด กล้องถ่ายรูป เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง และอุปกรณ์ถ่ายภาพ

2.5 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำมันเมล็ด ได้แก่ ภาชนะกรอง เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง ตู้อบร้อน (Hot air oven) ตู้ดูดความชื้น และชุดสกัดสาร (soxhlet extraction)

2.6 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณ alpha-tocopherol ได้แก่ ภาชนะกรอง, syringes filter 0.45 ไมโครเมตร, เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

2.7 สารเคมีในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี

2.7.1 สารเคมีในการสกัด วัตถุคุณภาพ และปริมาณดีเอ็นเอ เช่น liquid nitrogen, CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide), PVP (polyvinylpyrrolidone), 2-mercaptoethanol, EDTA (ethylenediamine tetraacetate acid), Tris HCl, potassium acetate, chloroform, isoamyl alcohol, sodium chloride, 95% ethanol, 70% ethanol, ผง agarose และ ethidium bromide เป็นต้น

2.7.2 สารเคมีในปฏิกิริยาการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเชื่อมต่อกับ adapter เช่น เอนไซม์ *EcoRI*, *MseI*, T4 DNA ligase, *EcoRI* adapter, *MseI* adapter, ATP และ SuRE/Cut Buffer A เป็นต้น

2.7.3 สารเคมีในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ เช่น *EcoRI* primer, *MseI* primer, $MgCl_2$, dNTP และ เอนไซม์ *Taq* polymerase เป็นต้น

2.7.4 สารเคมีในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel เช่น สารละลายโพลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide), TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine), ammonium persulfate (APS), bind silane, acetic acid, silver nitrate, sodium carbonate, 37% formaldehyde และ sodium thiosulfate เป็นต้น

2.8 สารเคมีในการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำมันเมล็ด เช่น petroleum ether

2.9 สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณ alpha-tocopherol เช่น iso-octane, methanol และ น้ำกลั่น

วิธีการ

1. การปลูกทดสอบในสภาพแปลง

นำเมล็ดพันธุ์ทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ ปลูกทดสอบเพื่อบันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเก็บใบอ่อนเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีดี แปลงทดลอง ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ระหว่างเดือน พฤศจิกายน 2550 - มกราคม 2551 วางแผนการทดลองแบบ Augmented design in RCB โดยใช้พันธุ์การค้า 3 พันธุ์ คือ Hybrid I Hybrid II และ Hybrid III เป็นพันธุ์ตรวจสอบ (check) แต่ละพันธุ์ปลูกพันธุ์ละ 4 แถว ขนาดแปลงกว้าง 3 เมตร ยาว 5 เมตร ระยะระหว่างต้น 50 เซนติเมตร และระยะระหว่างแถว 75 เซนติเมตร ใส่ปุ๋ย กำจัดวัชพืช และฉีดพ่นสารเคมีป้องกันโรคและแมลงตามความเหมาะสม

2. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

บันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากส่วนต่าง ๆ ของทานตะวัน คือ ลำต้น ใบ ดอก จานดอก และเมล็ด โดยประยุกต์จาก ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ (2540) และ IBPGR (1985) ดังภาคผนวก

2.1.1 ข้อมูลทั่วไป

ข้อมูลทั่วไปจำนวน 5 ลักษณะ ได้แก่ วันปลูก วันงอก วันออกดอก วันสุกแก่ วันเก็บเกี่ยว

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงคุณภาพ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงคุณภาพจำนวน 22 ลักษณะ ได้แก่ การแตกกิ่งก้าน ชนิดการแตกกิ่งก้าน ลักษณะของก้านใบ รูปร่างใบเลี้ยง รูปร่างใบ สีใบ ความมันวาวของใบ การพองของใบ รูปร่างภาคตัดขวางใบ ลักษณะของฐานใบ องศาของเส้นกลางใบ รูปร่างกลีบรองดอก

รูปร่างของกลีบดอก สีกกลีบดอก สีดอก สีเกสรตัวผู้ การทำมุมของจานดอก ลักษณะของจานดอก
รูปร่างของเมล็ด สีเมล็ด สีลายแถบเมล็ด ตำแหน่งของแถบ

2.1.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณจำนวน 17 ลักษณะ ได้แก่ ความงอกใน
สภาพแปลง ความสูง ความยาวของก้านใบ ความยาวของปล้อง จำนวนใบต่อดัน ขนาดของใบ
ขนาดกลีบรองดอก ความยาวของกลีบรองดอก จำนวนของกลีบดอก ขนาดของจานดอก ความยาว
ของเมล็ด ความหนาของเมล็ด ความหนาของเปลือกหุ้มเมล็ด น้ำหนัก 100 เมล็ด เปอร์เซ็นต์การติด
เมล็ด เปอร์เซ็นต์น้ำมันเมล็ด และปริมาณ alpha-tocopherol

2.2 การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์น้ำมันเมล็ด

2.2.1 นำเมล็ดทานตะวันไปอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24
ชั่วโมง และปล่อยให้เย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้องในโถอบความชื้น หลังจากนั้นนำเมล็ดทานตะวันไป
บดให้ละเอียด และอบไล่ความชื้นอีกครั้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ว
ปล่อยให้เย็นตัวลงที่อุณหภูมิห้องในโถอบความชื้น

2.2.2 อบ flask ที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นตัวลงที่
อุณหภูมิห้องในโถอบความชื้น 1 ชั่วโมง แล้วชั่ง flask ด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง
จดบันทึกน้ำหนักที่ชั่งไว้

2.2.3 ชั่งตัวอย่างเมล็ดที่บดแล้ว 5-6 กรัม ใส่ในกระดวยกรองที่ปราศจากไขมันด้วย
เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง จดบันทึกน้ำหนักที่ชั่งไว้ แล้วพับกระดวยกรองใส่ใน
extraction thimble เพื่อนำไปสกัดหาปริมาณน้ำมันต่อไป

2.2.4 เท petroleum ether 150 มิลลิลิตร ลงใน flask นำ extraction thimble ประกอบ
เข้ากับ holder วางลงใน flask แล้วนำไปสกัดหาปริมาณน้ำมันโดยใช้เครื่องวิเคราะห์น้ำมัน รุ่น
S306 MK (Garhardt, Germany)

2.2.5 นำ thimble ออก และนำ flask มาปล่อยให้เย็นตัวลงสักครู่ จึงนำ flask ไปอบที่ อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นตัวลงในโอบความชื้น 1 ชั่วโมง แล้ว นำ flask ออกมาชั่งด้วยเครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง บันทึกน้ำหนักที่ได้ แล้วนำไปคำนวณหา เปอร์เซ็นต์น้ำมัน ตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์น้ำมัน} = \frac{\text{น้ำหนัก flask ครั้งหลัง} - \text{น้ำหนัก flask ครั้งแรก}}{\text{น้ำหนักเมล็ดที่บด}}$$

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณ alpha-tocopherol

วิเคราะห์ปริมาณ alpha-tocopherol ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Goftman *et al.* (1999) โดยนำเมล็ดทานตะวัน 3 เมล็ดต่อสายพันธุ์ มาแกะเพาะเปลือก ใช้เฉพาะส่วนเนื้อเมล็ด (seed kernel) มาบดให้ละเอียด ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่บดประมาณ 3 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร และเติม iso-octane ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการสกัด alpha-tocopherol ออกจาก ตัวอย่างทานตะวัน เก็บตัวอย่างไว้ในที่มืดประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการ สกัดมา กรองด้วย syringes filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วใส่ขวด HPLC vial ที่เตรียมไว้ สำหรับนำไปวิเคราะห์ปริมาณ alpha-tocopherol ด้วยเครื่อง HPLC รุ่น 10AV (Shimadzu, Japan) โดยมีสถานะที่สำคัญดังนี้

ก) คอลัมน์ที่ใช้ คือ Luna C18 100 diol column ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร i.d. บรรจุ ด้วย Particle ขนาด 5 ไมโครเมตร (Phenomenex, Germany) เชื่อมต่อกับ silica guard column (Luna C18, 4 x 3 มิลลิเมตร i.d.)

ข) สารตัวพาสารละลายให้เคลื่อนที่ (mobile phase) ใช้เมทานอล (methanol) ผสมกับ น้ำ สัดส่วน 97:3 มิลลิลิตร

ค) อัตราการไหลของสาร (flow rate) เท่ากับ 1 มิลลิลิตร/นาที

ง) ปริมาตรสารละลายที่ฉีดเข้าเครื่อง HPLC (injection volume) เท่ากับ 40 ไมโครลิตร

จ) ตัวตรวจสอบที่ใช้ คือ UV-detector ที่ความยาวคลื่น 295 นาโนเมตร

บันทึกผลและคำนวณหาปริมาณ alpha-tocopherol จากความเข้มข้นของ alpha-tocopherol ที่ใช้เป็นมาตรฐาน (Sigma-Aldrich, Germany) โดยคำนวณได้จากสมการ linear regression equation และหาค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

2.4 การวิเคราะห์ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่บันทึกได้ มาแปลงให้เป็นข้อมูลที่มีลักษณะแบบมาตรวัดอันตรภาคชั้น (interval data) โดยให้คะแนนตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยชุดโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป NTSYS pc รุ่น 2.21a (Numerical Taxonomy and Multivariate System) (Rohlf, 2009) โดยใช้โปรแกรม SIMINT คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง (dissimilarity coefficient) โดยเลือกใช้ Canberra coefficient (Lance and Williams, 1967) เนื่องจากสัมประสิทธิ์ของ Canberra เหมาะสำหรับข้อมูลแบบ interval data และข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังสูตรต่อไปนี้

$$D_{ij} = \frac{1}{n} \frac{\sum_k |x_{ik} - x_{jk}|}{\sum_k (x_{ik} + x_{jk})}, \quad 0 \leq D_{ij} \leq 1$$

เมื่อ D_{ij} คือ ระยะทางพันธุกรรมระหว่างของพืชพันธุ์ที่ i และ j
 x_{ik} คือ ค่าความถี่ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา k ที่ปรากฏในพันธุ์ i
 x_{jk} คือ ค่าความถี่ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา k ที่ปรากฏในพันธุ์ j
 $\sum_k$ คือ ผลรวมค่าความถี่ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา k ที่ปรากฏ

แล้วนำมาเข้าสู่ตาราง matrix โดยใช้ Nei and Li (1979) dissimilarity index เพื่อใช้ในการจัดกลุ่มศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แล้วนำข้อมูลที่ได้สร้าง dendrogram โดยวิธี UPGMA (unweight pair-group method with arithmetic average) (Sokal and Michener, 1958) ด้วยโปรแกรม SAHN (Sneath and Sokal, 1973) ที่ประกอบด้วยวิธีจัดกลุ่มแบบ Sequential, Agglomerative, Hierarchical และ Nested clustering ตามลำดับ แสดงผลในรูปแบบของแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) และหาค่า cophenetic correlation (r) เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมในการจัดกลุ่มซึ่งดูจากค่า goodness of fit (Rohlf, 2009) โดยใช้โปรแกรม CPH และ MXCOMP

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี

3.1 การเก็บตัวอย่างพืชเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

ขั้นตอนนี้สำคัญมากเพราะว่าดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับเครื่องหมายเอเอฟแอลพีนั้น จำเป็นต้องมีคุณภาพสูง ไม่มีการปนเปื้อนจากสิ่งต่าง ๆ เพื่อป้องกันการตัดดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์ ซึ่งอาจก่อให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ได้ ส่วนของพืชที่นิยมใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ คือ ส่วนใบอ่อน เนื่องจากดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและปริมาณมากนั้นขึ้นอยู่กับคุณภาพของเนื้อเยื่อที่ใช้ โดยเก็บตัวอย่างจากใบอ่อนทานตะวันที่มีอายุ 2 สัปดาห์ แล้วรีบนำไปในถุงพลาสติกมัดปากถุงให้แน่น แช่น้ำแข็ง แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอทันที

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช (DNA extraction)

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่ประยุกต์มาจาก Dellaporta *et al.* (1983) และ Doyle and Doyle (1990) โดยนำใบอ่อนทานตะวันที่ตัดเอาเฉพาะส่วนใบไม่เอาก้านใบเพื่อบดได้ง่าย 0.2 กรัม ใส่ลงในโกร่งที่เย็น เติมนิโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ให้ท่วมและบดให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง ปล่อยให้ไนโตรเจนเหลวระเหยไปจนหมด แล้วจึงถ่าย ผงใบลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เย็นจัด เติม DNA extraction buffer (1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA pH 8.0, 5 M NaCl, CTAB, 2-mercaptoethanol) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าแรง ๆ นำไปปั่นในอ่างน้ำร้อน (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ และปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาสู่สารละลาย หลังจากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตทเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าแรง ๆ แล้วแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 60 นาที ในขั้นตอนนี้นำโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์จะตกตะกอนร่วมกับโพแทสเซียมอะซิเตทเหลือกรดนิวคลีอิกอยู่ในสารละลาย หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที) นาน 20 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบน ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ย้ายใส่ในหลอดใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม : ไอโซอามิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol) ที่อัตราส่วน 24:1 ; v:v) 700 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ 20 นาที แล้วปั่นเหวี่ยง นาน 20 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนในสารละลาย แล้วดูดสารละลายใสส่วนบน (500 ไมโครลิตร) ใส่ในหลอดใหม่ เติมน้ำเกลือคอลลอยด์เข้มข้น 5 โมลาร์ เพื่อกำจัดสารโพลีแซคคาไรด์ ปริมาตร 0.5 เท่าของสารละลายในหลอด (250 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเบา ๆ แล้วเติมไอโซโพรพานอลที่แช่เย็น เพื่อช่วยในการตกตะกอนดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 เท่าตัว (750

ไมโครลิตร) กลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง นาน 15 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เทส่วนน้ำใสทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 % ปริมาตร 700 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยง นาน 5 นาที แล้วเทน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำจำนวน 2 รอบ ปล่อยให้แห้งโดยเปิดฝาทิ้งไว้ข้ามคืน หรือนำไปไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอพร้อมทั้งกำจัดอาร์เอ็นเอด้วย TE-RNase solution (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.0 mM EDTA pH 8.0, 10 mg/ml RNase) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

3.3 การวัดคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

การวัดคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอตัวอย่างด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยเตรียมอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8 % ซึ่งใช้อะกาโรส 0.8 กรัม ใน 0.5x TBE buffer (1x TBE : 10.8 g Tris. Base, 5.5 g boric acid, 4 ml 0.5 M EDTA; pH 8.0) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปละลายโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้เตาไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวจนกระทั่งผงอะกาโรสละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในถาดเจลที่เสียบหัว (comb) ลงไปตรงตำแหน่งที่ทำให้เกิดร่องสำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร แล้วปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อย ๆ ดึงหัวออก ย้ายเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยให้ด้านที่มีช่องหัวอยู่ด้านซ้ายลง แล้วเท 0.5x TBE buffer ลงจนท่วมเจล โดยให้สูงกว่าผิวเจล 3 มิลลิเมตร ผสมสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างกับ โหลดดิงบัฟเฟอร์ (6x loading buffer : 0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol) ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 แล้วค่อย ๆ หยอดตัวอย่างลงในช่องหัวด้วยไมโครปิเปต พร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 50 100 และ 200 นาโนกรัม ตามลำดับ ปิดฝาเครื่องแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนไปพอประมาณ (40 นาที) โดยสังเกตจากการเคลื่อนที่ของโหลดดิงบัฟเฟอร์ (loading buffer) ได้ระยะทางที่เหมาะสม แล้วจึงปิดเครื่อง นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นาน 10 นาที จากนั้นล้างเอธิเดียมโบรไมด์ ที่ไม่ได้เกาะกับดีเอ็นเอออกโดยน้ำประมาณ 10 นาที นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต แล้วถ่ายภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation System บันทึกผล และประมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

มาตรฐาน จากนั้นปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ได้ให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ด้วยสารละลาย TE

3.4 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี ทำโดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนดังนี้

3.4.1 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อกับ adapter

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดพร้อมกัน คือ *EcoRI* และ *MseI* เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดพอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการทำพีซีอาร์ได้ดี และมีขนาดเหมาะสมในการแยกบน denaturing polyacrylamide gel จากนั้นนำดีเอ็นเอไปเชื่อมต่อกับ adapter เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ สำหรับการเพิ่มปริมาณ โดย adapter ที่ต่อเข้ากับปลายของชิ้นดีเอ็นเอจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ ซึ่ง adapter ที่ใช้ คือ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter ที่มีลำดับเบส ดังตารางที่ 2

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อกับ adapter ทำโดยเติมดีเอ็นเอและสารละลายแต่ละชนิดในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2.50 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์ *SuRE/Cut Buffer A* (Roche Diagnostics Corporation, U.S.A.) เข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร, Fermentas, U.S.A.) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ *MseI* (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร, Fermentas, U.S.A.) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ร่วมกับสารละลาย *EcoRI* adapter (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ *MseI* adapter (50 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย ATP (100 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร และเอนไซม์ T4 DNA ligase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 60 วินาที เพื่อป้องกันสารละลายติดค้างที่ข้างผนังหลอด แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หลังจากนั้นแบ่งดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตรมาเจือจาง 10 เท่าด้วยสารละลาย TE เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณขั้นต่อไป ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

3.4.2.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัว ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ (preselective amplification) ดังตารางที่ 2 เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ และให้มีความจำเพาะในขั้นหนึ่งก่อน โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางในขั้นตอนการตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อกับ adapter แล้ว ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมนลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร (ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส) เติมนสารละลายไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ *EcoRI* + A กับ *MseI* + C หรือไพรเมอร์ *EcoRI* + C กับ *MseI* + A (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) อย่างละ 1 ไมโครลิตร เติมนสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำพีซีอาร์ (*Taq* buffer; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 2 ไมโครลิตร dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (25 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1.2 ไมโครลิตร และเติมเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อ แล้วให้ไค้ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 60 วินาที นำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ตั้งอุณหภูมิและเวลาของเครื่องจำนวน 20 รอบ ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที แล้วเริ่มขั้น denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้น annealing 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที ขั้น extention 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที และขั้น post extention 72 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วแบ่งบางส่วนมาเจือจาง 10 เท่าด้วยสารละลาย TE เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นต่อไปส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส

3.4.2.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัว ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ (selective amplification) ดังตารางที่ 2 เพื่อลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ และเพื่อให้เกิดการคัดเลือกการเพิ่มปริมาณชนิดดีเอ็นเอบางส่วน ทำให้มีความจำเพาะมากขึ้น โดยใช้คู่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด (forward และ reverse primer) คือ ไพรเมอร์ *EcoRI* + 3 กับ *MseI* + 3 ตามตารางที่ 2 ซึ่งจะทำได้คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอนนี้เป็นจำนวน 59 คู่ และองค์ประกอบของปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้มีดังนี้ นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางในขั้นตอน preselective amplification แล้ว ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมนลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.5 มิลลิลิตร (ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส) เติมนสารละลายไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ ไพรเมอร์ *EcoRI* + 3 และ *MseI* + 3 (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร เติมนสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำพีซีอาร์ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTP mix (ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (25 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 0.6

ไมโครลิตร และเอ็นไซม์ Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วให้ได้ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 60 วินาที นำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณซินติเอ็นเอ และทำปฏิกิริยาเพิ่ม ปริมาตร 36 รอบ โดยใช้โปรแกรม touch down PCR ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที (รอบแรก), 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 12 รอบ ในขั้นตอนนี้ตั้งโปรแกรมให้เครื่องลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียสในแต่ละรอบของการทำงาน จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อเนื่องอีกที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 23 รอบ และขั้น post extension 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

3.4.3 การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิสใน denaturing polyacrylamide gel

3.4.3.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล โดยใช้กระจก 2 แผ่น ทำให้เกิดช่องว่าง ระหว่างกันโดยใช้ spacer ซึ่งเป็นแผ่นพลาสติกแถบยาวเท่ากับกระจก และมีความหนาเท่ากับเจล ที่ต้องการ โดยนำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น แล้วเช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 3 ไมโครลิตร, glacial acetic acid 5 ไมโครลิตร และเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกับ กระจก และเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์อีก 3 ครั้ง สำหรับกระจกแผ่นหน้าที่ใช้เป็น chamber จะเช็ดให้ทั่วด้วย clearview เพื่อไม่ให้เจลติดกับ chamber จากนั้นนำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกบ เข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่เช็ด ด้วย bind silane และ clearview เข้าหากัน แล้วใช้คลิปหนีบยึดให้อยู่ติดกับที่

3.4.3.2 การเตรียม denaturing polyacrylamide gel ใช้ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (40% polyacrylamide (acrylamide : bisacrylamide, 19:1), 5X TBE, 7 M urea) ที่แช่เย็น ปริมาตร 160 มิลลิลิตร เติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 10 % ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ TEMED ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (อัตราส่วนนี้ใช้สำหรับการเทเจลในกระจก ขนาด 45 x 60 cm. จำนวน 1 กระจก) เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว (ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ) เทเจลใส่ลงใน ช่องว่างระหว่างกระจกจนเต็ม แล้วเสียบหวี (ด้านที่เรียบเป็นเส้นตรง) ลงไปด้านบน ปล่อยให้เจล แข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter และไพรเมอร์ (primer) ในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วย
เครื่องหมายเอเอฟแอลพี

สัญลักษณ์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Adapter	
EcoRI adapter	5' -CTCGTAGACTGCGTACC- 3' 3' -CATCTGACGCATGGTTAA- 5'
MseI adapter	5' -GACGATGAGTCCTGAG- 3' 3' -TACTCAGGACTCAT- 5'
Primer+1	
EcoRI+A	5' -GACTGCGTACCAATTCA- 3'
EcoRI+C	5' -GACTGCGTACCAATTCC- 3'
MseI+C	5' -GATGAGTCCTGAGTAAC- 3'
MseI+A	5' -GATGAGTCCTGAGTAA- 3'
Primer+3	
EcoRI+AAC	5' -GACTGCGTACCAATTC AAC - 3'
EcoRI+ACC	5' -GACTGCGTACCAATTC ACC - 3'
EcoRI+ACG	5' -GACTGCGTACCAATTC ACG - 3'
EcoRI+AGC	5' -GACTGCGTACCAATTC AGC - 3'
EcoRI+AGG	5' -GACTGCGTACCAATTC AGG - 3'
MseI+CAA	5' -GATGAGTCCTGAGTAA CAA - 3'
MseI+CAC	5' -GATGAGTCCTGAGTAA CAC - 3'
MseI+CAG	5' -GATGAGTCCTGAGTAA CAG - 3'
MseI+CAT	5' -GATGAGTCCTGAGTAA CAT - 3'
MseI+CTA	5' -GATGAGTCCTGAGTAA CTA - 3'
MseI+CTC	5' -GATGAGTCCTGAGTAA CTC - 3'
MseI+CTG	5' -GATGAGTCCTGAGTAA CTG - 3'
EcoRI+CAG	5' -GACTGCGTACCAATTC CAG - 3'
EcoRI+CGT	5' -GACTGCGTACCAATTC CGT - 3'
MseI+AAG	5' -GATGAGTCCTGAGTAA AAG - 3'
MseI+AAT	5' -GATGAGTCCTGAGTAA AAT - 3'
MseI+ACA	5' -GATGAGTCCTGAGTAA ACA - 3'
MseI+ACC	5' -GATGAGTCCTGAGTAA ACC - 3'
MseI+ACG	5' -GATGAGTCCTGAGTAA ACG - 3'

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สัญลักษณ์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
MseI+ACT	5' -GATGAGTCCTGAGTAA ACT - 3'
MseI+AGC	5' -GATGAGTCCTGAGTAA AGC - 3'
MseI+AGG	5' -GATGAGTCCTGAGTAA AGG - 3'
MseI+ATA	5' -GATGAGTCCTGAGTAA ATA - 3'
MseI+ATC	5' -GATGAGTCCTGAGTAA ATC - 3'
MseI+ATG	5' -GATGAGTCCTGAGTAA ATG - 3'
MseI+ATT	5' -GATGAGTCCTGAGTAA ATT - 3'

3.4.3.3 การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ดึงหัวออก และใช้น้ำล้าง กระจกด้านนอกให้สะอาด เพื่อดึงเศษเจลโพลีอะครีลาไมด์ แล้วประกอบกระจกเข้ากับชุด อิเล็กโตรโฟรีซิส เติมน้ำบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ลงในช่องสำหรับใส่บัฟเฟอร์ทั้งด้านบนและด้านล่าง ต่อ สายไฟเข้ากับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส ทำ pre-run ใช้ความต่างศักย์ 160 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที ปิด เครื่อง และใช้เข็มฉีดยาคูดับฟเฟอร์มาล้างผิวหน้าของเจล และใส่หัวด้านที่เป็นพื้นแหลมลงไปให้ สัมผัสกับผิวหน้า เจลเพียงเล็กน้อย และใช้เข็มฉีดยาคูดับฟเฟอร์ล้างยูเรียที่อยู่ในช่องหัวแต่ละช่อง ให้หมดอีกครั้ง หลังจากนั้นดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการทำพีซีอาร์มา 5 ไมโครลิตร ผสมกับ sequencing dye (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.01% (w/v) bromophenol blue, 0.01% (w/v) xylene cyanal) 5 ไมโครลิตร แล้วทำการคลายเกลียวดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วโดยวางบนน้ำแข็งทันที แล้วหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอลงใน ช่องแต่ละช่องของเวล พร้อมกับหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน (? X174 DNA/HinfI) หลังจากนั้นเปิด เครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ 70 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกว่า loading buffer จะเคลื่อนที่ลง มาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล ปิดเครื่อง นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้ง 2 แผ่นออกจาก กัน เจลจะติดอยู่กับกระจกแผ่นหลังที่เป็นสีเหลี่ยมตรง นำเจลไปย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรทต่อไป

3.4.3.4 การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท โดยนำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาแช่ ในสารละลาย fixative (10% acetic acid) นาน 30 นาที เขย่าเบา ๆ บนเครื่องเขย่าแล้วล้างในน้ำ deionized 3 นาที เปลี่ยนน้ำล้างใหม่ และล้างต่ออีก 3 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา จากนั้นนำแผ่นเจล ใส่ในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (1% silver strain, 0.56% formaldehyde) เพื่อย้อมเจลเป็นเวลา 30 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ แล้วนำแผ่นเจลออกมาจุ่มในน้ำ deionized อย่างรวดเร็ว ไม่เกิน 5 วินาที เพราะถ้าล้างนานซิลเวอร์ไนเตรทจะหลุดหมดแล้วต้องย้อมใหม่ หลังจากนั้นนำแผ่นเจลมาใส่ใน

สารละลาย developer (30% sodium carbonate, 0.1% sodium thiosulfate, 0.56% formaldehyde) ที่เตรียมใหม่ ๆ และแช่เย็นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เขย่าอย่างสม่ำเสมอ 5-10 นาที หรือจนกว่าจะปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจน หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลมาใส่ในสารละลาย stop (10% acetic acid) นาน 3-5 นาที แล้วจึงนำแผ่นเจลมาจุ่มลงในน้ำ deionized แล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ

3.5. การวิเคราะห์ข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพี

3.5.1 คัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมจากทั้งหมด 59 คู่ โดยเลือกเฉพาะคู่ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ชัดเจน และแสดงความแตกต่างระหว่างทานตะวันแต่ละชนิด

3.5.2 คำนวณหาร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึม (percentage of polymorphism) และจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ไพรเมอร์ได้จาก

$$\text{percentage of polymorphism} = \frac{\text{จำนวนของยีนหรือแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึม}}{\text{จำนวนของยีนหรือแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ศึกษา}} \times 100$$

$$\text{จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ไพรเมอร์} = \frac{\text{จำนวนของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด}}{\text{จำนวนคู่ไพรเมอร์ที่ศึกษา}}$$

3.5.3 คำนวณค่า Polymorphic Information Content (PICs) (Ott, 1991) จากสูตร

$$\text{PICs} = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

โดย P_i คือความถี่ของแอลลีลที่ i ซึ่ง P_i ประกอบด้วย P_a (absent allele) และ P_p (present allele) ค่า PICs เป็นค่าที่บอกถึง โอกาสที่จะพบตัวอย่างที่เลือกแบบสุ่ม 2 ตัวอย่างที่เกิดโพลิมอร์ฟิซึม

3.5.4 วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยแปลผลข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของทานตะวันแต่ละชนิด โดยเปรียบเทียบจากความเหมือน และความแตกต่างของรูปแบบของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยพันธุ์ที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ให้สัญลักษณ์เป็น “1” ส่วนพันธุ์ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกันนั้นให้สัญลักษณ์เป็น “0” แล้วนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยชุดโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป NTSYSpc 2.21a (Rohlf, 2009) โดยใช้โปรแกรม SIMQUAL คำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) โดยเลือกใช้ Dice (1945) coefficient เนื่องจากสัมประสิทธิ์ความเหมือนของ Dice เหมาะสมสำหรับข้อมูลของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี ดังสูตรต่อไปนี้

$$SI_{ij} = \frac{2a}{(2a + b + c)}$$

เมื่อ SI_{ij} คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของพันธุ์ที่ i และ j
 a คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งพันธุ์ i และพันธุ์ j
 b คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะพันธุ์ i
 c คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะพันธุ์ j

จากนั้นนำมาเข้าสู่ตาราง matrix โดยใช้ Nei and Li (1979) similarity index เพื่อใช้ในการจัดกลุ่มศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม แล้วนำข้อมูลที่ได้สร้าง dendrogram โดยวิธีการคำนวณแบบ UPGMA (Sokal and Michener, 1958) ด้วยโปรแกรม SAHN (Sneath and Sokal, 1973) แสดงผลในรูปแบบของแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม หาค่า cophenetic correlation (r) เพื่อตรวจสอบความเหมาะสมในการจัดกลุ่มซึ่งดูจากค่า goodness of fit (Rohlf, 2009) โดยใช้โปรแกรม CPH และ MXCOMP และวิเคราะห์ความเชื่อมั่นของการจัดกลุ่มโดยวิเคราะห์ bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง ซึ่งแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของโอกาสที่การจัดกลุ่มไม่เปลี่ยนแปลง หรือให้ผลคงเดิมด้วยโปรแกรม FreeTree (Pavlicek et al. 1999)

3.5.5 วิเคราะห์ Principal Coordinate Analysis (PCoA) เพื่อจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างจีโนไทป์ในรูป 2 มิติ (2 dimension) ด้วยชุดโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป NTSYSpc 2.21a (Rohlf, 2009) โดยใช้โปรแกรม Dcenter และ Eigen

4. สถานที่ทำการทดลอง

4.1 โรงเรือน และแปลงทดลอง ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

4.2 ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล (A207) ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

4.3 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

5. ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง เดือน พฤศจิกายน พ.ศ.2550

สิ้นสุดการทดลอง เดือน มกราคม พ.ศ. 2552

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1.1 การศึกษาข้อมูลทางลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ (ตารางที่ 1) ซึ่งปลูกที่แปลงทดลอง คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ระหว่างเดือน พฤศจิกายน 2550 - มกราคม 2551 วางแผนการทดลองแบบ Augmented design in RCB บันทึกข้อมูลทั่วไป ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากส่วนต่าง ๆ ของทานตะวัน คือ ลำต้น ใบ ดอก จานดอก และเมล็ด ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณ และเชิงคุณภาพ ที่ประยุกต์จาก ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ (2540) และ IBPGR (1985) ประกอบด้วยข้อมูลที่ศึกษารวม 44 ลักษณะ โดยรายละเอียดของแต่ละสายพันธุ์แสดงไว้ดังตารางที่ 3-7

1.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ ได้จากการนำข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่บันทึกได้ มาแปลงให้เป็นข้อมูลที่มีลักษณะแบบมาตรวัดอันดับภาคชั้นก่อน พบว่า มีเพียง 26 ลักษณะ ได้แก่ การแตกกิ่งก้าน รูปร่างกลีบรองดอก สีกลิบบอก รูปร่างกลีบดอก จำนวนกลีบดอก สีดอก สีเกสรตัวผู้ สีเมล็ด รูปร่างเมล็ด ความหนาของเมล็ด ความยาวของเมล็ด สีลายแถบเมล็ด ตำแหน่งลายแถบเมล็ด ความหนาของเปลือกหุ้มเมล็ด รูปร่างใบเลี้ยง รูปร่างใบ ขนาดใบ รูปร่างฐานใบ จำนวนใบต่อต้น องศาจานดอก ขนาดจานดอก รูปร่างจานดอก ความสูง น้ำหนัก 100 เมล็ด เปอร์เซ็นต์น้ำมันเมล็ด และปริมาณ alpha-tocopherol ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรม และสามารถใช้จัดกลุ่มทานตะวันได้ ขณะที่ลักษณะอื่น ๆ มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์น้อยมาก โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความต่างอยู่ในช่วง 0.00-0.44 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.122 (ตารางที่ 8) แสดงให้เห็นว่าข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทานตะวันที่ทำการศึกษามีความแตกต่างทางพันธุกรรม หรือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับต่ำถึงปานกลาง

เมื่อนำข้อมูลที่ได้สร้าง dendrogram โดยวิธี UPGMA (Sokal and Michener, 1958) และแสดงผลในรูปแบบของ phylogenetic tree สามารถแบ่งทานตะวันออกเป็น 2 กลุ่ม ตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ปรากฏ (ภาพที่ 1 และตารางที่ 3-8) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (14 สายพันธุ์) มีความต่างทางพันธุกรรมอยู่ช่วง 0.00-0.44 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.173) เป็นกลุ่มของทานตะวันที่มีเมล็ดไม่มีลายแถบทั้งหมดที่มีลักษณะส่วนใหญ่ร่วมกัน คือ มีลักษณะต้นเตี้ย มีการแตกกิ่งเกิดขึ้นทุกส่วนของลำต้น มีดอกตรงกลางขนาดใหญ่ ส่วนดอกย่อยมีขนาดเล็ก มีรูปร่างใบเลี้ยงแบบค่อนข้างกลม มีรูปร่างใบและรูปร่างฐานใบแบบรูปหัวใจ ใบมีขนาดเล็ก มีจำนวนใบต่อต้นน้อย มีจานดอกขนาดเล็ก เมล็ดมีรูปร่างแบบรูปไข่ยาวเรียว เมล็ดมีสีดำ ขนาดเล็กบาง และมีเปลือกหุ้มเมล็ดบาง มีน้ำหนัก 100 เมล็ดต่ำ แต่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันค่อนข้างสูง และมีปริมาณ alpha-tocopherol ปานกลาง

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของทานตะวันที่มีเมล็ดที่มีลายแถบทั้งหมด ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 2.1 (9 สายพันธุ์) มีความต่างทางพันธุกรรมอยู่ช่วง 0.00-0.30 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.124) มีลักษณะส่วนใหญ่ร่วมกัน คือ เป็นทานตะวันชนิดบริโภคมะลิ (non-oilseed) ทั้งหมด คือ มีเปอร์เซ็นต์น้ำมัน และปริมาณ alpha-tocopherol ต่ำ เมล็ดมีขนาดใหญ่ มีน้ำหนัก 100 เมล็ดสูง มีเมล็ดและเปลือกหุ้มเมล็ดหนามาก เมล็ดมีสีดำและมีลายแถบเฉพาะตรงขอบของเปลือกหุ้มเมล็ด เป็นสีขาว เมล็ดมีรูปร่างแบบรูปไข่กลมมน ลำต้นไม่มีการแตกกิ่งสูงปานกลาง มีรูปร่างใบเลี้ยงแบบกลม มีรูปร่างใบและรูปร่างฐานใบแบบรูปหัวใจ มีจำนวนใบต่อต้นปานกลาง และพบว่า HA314 HA313 HA286 และ HA 349 เป็นสายพันธุ์ที่มีขนาดใบและขนาดจานดอกปานกลาง จึงแยกกลุ่มออกจาก HA304 HA316 HA353 HA292 และ HA300 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีขนาดใบและขนาดจานดอกใหญ่

กลุ่มย่อยที่ 2.2 (36 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์) มีความต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.00-0.38 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.103) เป็นทานตะวันชนิดน้ำมัน (oil seed) ซึ่งสายพันธุ์กลุ่มใหญ่ที่อยู่ในกลุ่มย่อยนี้มีลักษณะร่วมกัน คือ ลำต้นไม่มีการแตกกิ่งสูงปานกลาง มีรูปร่างใบเลี้ยงแบบค่อนข้างกลม มีรูปร่างใบแบบรูปหัวใจ และรูปร่างฐานใบแบบรูปหัวใจ มีจำนวนใบต่อต้นปานกลาง มีขนาดจานดอก และขนาดใบปานกลาง เมล็ดมีรูปร่างแบบรูปไข่กลมมน เมล็ดมีสีดำและมีลายแถบเป็นสีเทาที่ขอบและตรงกลางของเปลือกหุ้มเมล็ด เมล็ดหนาปานกลาง มีเปลือกหุ้มเมล็ดบาง มีน้ำหนัก 100 เมล็ดปานกลาง มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันและปริมาณ alpha-tocopherol ปานกลาง ส่วนพันธุ์พันธุ์ No.17 HA853 HA302 HA236 และ HA852 แยกออกมานอกกลุ่ม เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มี

ลักษณะดีเด่นใกล้เคียงกับพันธุ์การค้าที่ใช้เป็นพันธุ์ตรวจสอบ มีลักษณะส่วนใหญ่ร่วมกัน คือ มีลำต้นสูงไม่มีการแตกกิ่ง ใบมีขนาดใหญ่มาก มีขนาดจานดอกใหญ่และมีลักษณะนูนออก มีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดสูง มีน้ำหนัก 100 เมล็ดปานกลาง มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง และมีปริมาณ alpha-tocopherol ปานกลาง

สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า มีค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.80 ซึ่งถือว่าการจัดกลุ่มได้ปานกลางถึงดี เนื่องจากค่าดังกล่าวเป็นตรวจสอบความเหมาะสมในการจัดกลุ่มโดยดูจากค่า goodness of fit (Rohlf, 2009) ซึ่งมีเกณฑ์ที่ใช้โดย Sirithunya et al. (2001) คือ ถ้าค่า cophenetic correlation น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.7 ถือว่าการจัดกลุ่มได้ไม่ดี ค่าอยู่ระหว่าง 0.7-0.8 ถือว่าการจัดกลุ่มได้ปานกลาง ค่าอยู่ระหว่าง 0.8-0.9 ถือว่าการจัดกลุ่มที่ดี ค่าอยู่ระหว่าง 0.9-1.0 เป็นการจัดกลุ่มที่ดีมาก

ตารางที่ 3 ข้อมูลทั่วไป (วันดอกบาน 100 % วันสุกแก่ วันเก็บเกี่ยว) และลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์

List no.	Varieties	Accession	% Seeding	Day to			Plant height (cm)	Type of branching	% Oil	Tocopherol (mg/g)
				100%flower	maturation	harvest				
1	RHA265	PI 599754	31.82	68	78	87	60.6	no branching	35.07	73.55
2	HA291	PI 552936	52.27	60	70	79	53.6	basal branching	29.02	46.06
3	RHA360	PI 531073	11.36	66	70	86	49.6	fully brached with central head	34.44	52.33
4	RHA348	PI 509058	45.45	60	70	85	96.6	fully brached with central head	36.17	47.88
5	RHA269	PI 599756	31.82	66	70	79	102.4	fully brached with central head	29.98	52.73
6	RHA386	PI 578008	45.45	66	70	83	83.2	fully brached with central head	40.73	52.58
7	RHA364	PI 534650	34.09	60	70	84	91.6	no branching	40.15	45.76
8	RHA299	PI 599767	18.18	66	70	92	106.6	fully brached with central head	39.10	48.00
9	No.13		31.82	74	82	91	110.4	no branching	36.07	66.45
10	RHA278	PI 599762	70.45	62	78	93	96.8	fully brached with central head	47.35	117.33
11	RHA297	PI 599765	68.18	57	78	87	108.0	fully brached with central head	31.85	59.41
12	RHA388	PI 578010	25.00	66	74	86	94.0	fully brached with central head	38.47	54.67
13	No.14		56.82	72	82	99	140.8	no branching	42.93	35.48
14	HA224	PI 599776	15.91	56	60	74	97.4	basal branching	42.81	N/A
15	HA314	PI 599783	9.09	60	70	83	76.8	no branching	13.86	N/A
16	HA313	PI 599983	50.00	57	78	88	76.4	basal branching	14.54	52.12

ตารางที่ 3 (ต่อ)

List no.	Varieties	Accession	% Seeding	Day to			Plant height (cm)	Type of branching	% Oil	Tocopherol (mg/g)
				100%flower	maturation	harvest				
17	RHA286	PI 552932	18.18	47	77	85	97.2	no branching	26.14	43.33
18	HA349	PI 509059	13.64	60	75	85	101.8	no branching	24.96	25.15
19	HA304	PI 599782	70.45	62	78	90	95.4	no branching	20.56	64.67
20	HA316	NSL 208764	27.27	74	81	99	91.8	no branching	27.19	27.27
21	HA353	PI 509063	68.18	62	78	88	117.4	no branching	23.09	N/A
22	HA292	PI 552937	70.45	73	77	93	138.2	no branching	23.94	29.69
23	HA300	PI 552938	59.09	62	78	99	112.0	no branching	42.75	61.25
24	RHA270	PI 559757	47.73	60	70	79	74.0	no branching	32.44	43.94
25	RHA366	PI 534652	31.82	49	70	74	37.8	no branching	29.53	53.33
26	HA65	Ames 3960	40.91	57	78	87	70.8	basal branching	26.82	N/A
27	HA382	PI 578871	45.45	66	70	92	78.2	no branching	40.18	39.33
28	RHA276	PI 599761	54.55	66	74	86	89.8	fully brached without central head	34.96	58.33
29	HA343	PI 509053	22.73	54	70	82	90.4	no branching	37.61	41.29
30	RHA331	NSL 202287	79.55	57	78	93	85.4	fully brached with central head	33.28	31.61
31	RHA332	NSL 202288	59.09	57	78	87	94.6	fully brached with central head	43.00	38.33
32	No.12		68.18	62	81	100	109.4	no branching	44.83	42.33
33	RHA294	PI 599764	36.36	56	70	80	100.2	fully brached with central head	29.47	49.00

ตารางที่ 3 (ต่อ)

List no.	Varieties	Accession	% Seeding	Day to			Plant height (cm)	Type of branching	% Oil	Tocopherol (mg/g)
				100%flower	maturation	harvest				
34	HA232	PI 599777	11.36	63	70	82	90.8	no branching	33.68	31.21
35	RHA325	NSL 208774	40.91	66	73	84	78.4	fully brached without central head	26.33	40.94
36	RHA293	PI 559788	9.09	66	75	86	85.2	basal branching	24.20	38.00
37	HA851	NSL 202853	50.00	74	78	94	114.4	no branching	39.88	42.67
38	HA383	PI 578872	63.64	66	74	84	121.6	no branching	30.93	22.90
39	No.4		43.18	46	82	91	99.4	no branching	37.15	5.08
40	RHA333	NSL 202289	70.45	57	78	72	100.8	fully brached without central head	41.45	45.67
41	PK-101	PI 420138	43.18	66	70	91	132.2	no branching	42.23	47.88
42	HA303	PI 552941	65.91	74	78	94	131.6	no branching	39.57	N/A
43	HA234	PI 599778	61.36	68	78	92	126.4	no branching	36.33	52.00
44	HA289	PI 599781	47.73	60	70	95	101.8	no branching	32.14	42.00
45	HA341	PI 509051	40.91	72	78	92	73.2	no branching	36.36	28.79
46	HA277	PI 599779	52.27	62	78	100	108.0	no branching	33.70	33.03
47	HA208	Ames 3986	38.64	66	70	83	108.8	fully brached with central head	26.16	50.33
48	HA99	PI 599774	70.45	82	88	90	83.6	no branching	35.89	33.67
49	HA124	PI 599775	15.91	66	70	86	108.8	no branching	33.37	48.39
50	RHA327	NSL 208775	50.00	62	78	92	114.6	fully brached without central head	27.46	37.42

ตารางที่ 3 (ต่อ)

List no.	Varieties	Accession	% Seeding	Day to			Plant height (cm)	Type of branching	% Oil	Tocopherol (mg/m)
				100%flower	maturation	harvest				
51	Hybrid I		72.16	69	78	97	163.4	no branching	44.55	34.52
52	Hybrid II		72.73	68	81	99	159.4	no branching	44.14	48.44
53	Hybrid III		72.16	72	79	97	174.6	no branching	44.73	39.14
54	Hantra		63.64	57	78	88	158.0	no branching	45.35	40.63
55	No.17		36.36	74	83	92	120.4	no branching	34.47	N/A
56	HA853	NSL 202855	56.82	64	68	84	140.2	no branching	32.49	N/A
57	HA302	PI 552940	70.45	57	82	90	128.0	basal branching	40.43	42.00
58	HA236	Ames 3998	72.73	71	81	99	159.8	no branching	44.17	N/A
59	HA852	NSL 202854	68.18	62	78	90	127.8	basal branching	43.27	50.30

หมายเหตุ N/A หมายถึง ข้อมูลสูญหาย

ตารางที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนดอกของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์

List no.	Varieties	Accession	Bract shape	Bract size	Bract length	Rayflower color	Rayflower shape	Number of rayflower	Rayflower size	Diskflower color	Pollen color
1	RHA265	PI 599754	rounded	small	short	yellow	elongated	46	small	yellow	white
2	HA291	PI 552936	rounded	medium	long	yellow	elongated	43	small	yellow	orange
3	RHA360	PI 531073	parallel edges	medium	long	yellow	ovoid	34	small	purple	yellow
4	RHA348	PI 509058	parallel edges	medium	long	yellow	ovoid	34	medium	yellow	yellow
5	RHA269	PI 599756	convergent	small	long	yellow	elongated	34	medium	yellow	yellow
6	RHA386	PI 578008	convergent	medium	medium	yellow	elongated	36	small	yellow	yellow
7	RHA364	PI 534650	convergent	medium	medium	yellow	elongated	54	large	yellow	yellow
8	RHA299	PI 599767	convergent	medium	long	yellow	ovoid	54	small	yellow	yellow
9	No.13		rounded	medium	long	yellow	ovoid	52	medium	yellow	yellow
10	RHA278	PI 599762	rounded	large	long	yellow	ovoid	42	medium	purple	yellow
11	RHA297	PI 599765	convergent	medium	medium	yellow	ovoid	40	medium	yellow	yellow
12	RHA388	PI 578010	curly	medium	short	yellow	elongated	44	small	yellow	yellow
13	No.14		rounded	medium	medium	yellow	ovoid	36	medium	yellow	yellow
14	HA224	PI 599776	convergent	small	medium	yellow	ovoid	32	small	yellow	yellow
15	HA314	PI 599783	rounded	medium	medium	yellow	rounded	20	medium	yellow	yellow
16	HA313	PI 599983	convergent	medium	long	yellow	rounded	32	large	yellow	yellow

ตารางที่ 4 (ต่อ)

List no.	Varieties	Accession	Bract shape	Bract size	Bract length	Rayflower color	Rayflower shape	Number of rayflower	Rayflower size	Diskflower color	Pollen color
17	RHA286	PI 552932	rounded	medium	short	yellow	ovoid	34	medium	yellow	yellow
18	HA349	PI 509059	rounded	medium	long	yellow	ovoid	44	small	yellow	yellow
19	HA304	PI 599782	convergent	large	long	yellow	ovoid	36	medium	yellow	yellow
20	HA316	NSL 208764	parallel edges	medium	long	yellow	ovoid	38	large	yellow	yellow
21	HA353	PI 509063	convergent	medium	long	yellow	ovoid	38	medium	yellow	yellow
22	HA292	PI 552937	convergent	large	long	yellow	ovoid	46	large	yellow	yellow
23	HA300	PI 552938	rounded	medium	long	yellow	rounded	46	medium	yellow	white
24	RHA270	PI 559757	rounded	small	short	yellow	ovoid	26	small	yellow	yellow
25	RHA366	PI 534652	rounded	medium	long	yellow	ovoid	23	medium	yellow	yellow
26	HA65	Ames 3960	parallel edges	small	medium	yellow	ovoid	24	small	yellow	yellow
27	HA382	PI 578871	convergent	small	long	yellow	ovoid	36	medium	yellow	yellow
28	RHA276	PI 599761	rounded	medium	medium	yellow	ovoid	34	medium	purple	yellow
29	HA343	PI 509053	convergent	medium	long	yellow	ovoid	34	medium	yellow	yellow
30	RHA331	NSL 202287	parallel edges	medium	long	yellow	ovoid	32	medium	yellow	yellow
31	RHA332	NSL 202288	convergent	small	medium	yellow	ovoid	24	small	yellow	yellow
32	No.12		convergent	small	long	yellow	elongated	34	small	yellow	yellow
33	RHA294	PI 599764	rounded	small	medium	yellow	ovoid	30	medium	yellow	yellow

ตารางที่ 4 (ต่อ)

List no.	Varieties	Accession	Bract shape	Bract size	Bract length	Rayflower color	Rayflower shape	Number of rayflower	Rayflower size	Diskflower color	Pollen color
34	HA232	PI 599777	parallel edges	medium	long	yellow	ovoid	34	medium	yellow	yellow
35	RHA325	NSL 208774	convergent	medium	medium	pale yellow	ovoid	28	medium	yellow	yellow
36	RHA293	PI 559788	convergent	small	long	yellow	ovoid	38	medium	yellow	yellow
37	HA851	NSL 202853	parallel edges	medium	long	yellow	elongated	38	medium	yellow	yellow
38	HA383	PI 578872	convergent	large	long	yellow	ovoid	52	large	yellow	yellow
39	No.4		convergent	medium	short	yellow	ovoid	52	medium	yellow	yellow
40	RHA333	NSL 202289	rounded	small	medium	yellow	elongated	24	small	yellow	yellow
41	PK-101	PI 420138	convergent	medium	long	yellow	ovoid	52	large	yellow	yellow
42	HA303	PI 552941	rounded	large	long	yellow	elongated	28	medium	yellow	orange
43	HA234	PI 599778	rounded	medium	long	yellow	ovoid	40	medium	yellow	yellow
44	HA289	PI 599781	convergent	large	short	yellow	elongated	24	medium	yellow	yellow
45	HA341	PI 509051	rounded	small	medium	yellow	ovoid	30	small	yellow	yellow
46	HA277	PI 599779	rounded	large	medium	yellow	ovoid	32	medium	yellow	yellow
47	HA208	Ames 3986	rounded	medium	medium	yellow	elongated	34	medium	yellow	orange
48	HA99	PI 599774	convergent	medium	long	yellow	ovoid	32	medium	yellow	yellow
49	HA124	PI 599775	convergent	medium	long	yellow	ovoid	33	large	yellow	pale yellow
50	RHA327	NSL 208775	rounded	medium	medium	pale yellow	ovoid	36	medium	yellow	yellow

ตารางที่ 4 (ต่อ)

List no.	Varieties	Accession	Bract shape	Bract size	Bract length	Rayflower color	Rayflower shape	Number of rayflower	Rayflower size	Diskflower color	Pollen color
51	Hybrid I		convergent	large	medium	yellow	ovoid	56	large	yellow	yellow
52	Hybrid II		rounded	large	long	yellow	elongated	54	large	yellow	yellow
53	Hybrid III		convergent	large	long	yellow	ovoid	44	large	yellow	yellow
54	Hantra		curly	large	medium	yellow	ovoid	40	large	yellow	orange
55	No.17		convergent	large	long	yellow	ovoid	32	large	yellow	yellow
56	HA853	NSL 202855	convergent	large	long	yellow	ovoid	34	large	yellow	yellow
57	HA302	PI 552940	convergent	medium	long	yellow	ovoid	38	medium	yellow	yellow
58	HA236	Ames 3998	rounded	large	medium	yellow	ovoid	30	large	yellow	yellow
59	HA852	NSL 202854	rounded	medium	medium	yellow	ovoid	32	medium	yellow	yellow

ตารางที่ 5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนใบของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์

List no.	Varieties	Accession	Cotyledon shape	Leaf shape	Number of leaves	Leave color	Leaf size	Leaf base shape	Leaf glassiness	Leaf blistering	Shape cross section
1	RHA265	PI 599754	rounded	cordate	20	green	small	auriculate	+	0	concave
2	HA291	PI 552936	elliptical	triangular	24	green	medium	auriculate	0	0	flat
3	RHA360	PI 531073	rounded	triangular	24	green	small	cordate	0	0	flat
4	RHA348	PI 509058	rounded	triangular	18	green	medium	cordate	+	+	flat
5	RHA269	PI 599756	elliptical	cordate	16	green	medium	cordate	+	0	flat
6	RHA386	PI 578008	extended	triangular	20	green	medium	cordate	+	0	flat
7	RHA364	PI 534650	rounded	cordate	18	green	medium	auriculate	+	0	flat
8	RHA299	PI 599767	rounded	cordate	16	green	medium	auriculate	+	+	flat
9	No.13		elliptical	cordate	12	green	large	auriculate	+	0	flat
10	RHA278	PI 599762	elliptical	cordate	16	green	medium	cordate	+	0	flat
11	RHA297	PI 599765	elliptical	cordate	20	green	small	cordate	+	0	flat
12	RHA388	PI 578010	rounded	triangular	18	green	small	deltoid	+	0	flat
13	No.14		rounded	cordate	24	dark green	medium	auriculate	+	0	flat
14	HA224	PI 599776	elliptical	cordate	30	green	medium	auriculate	+	0	flat
15	HA314	PI 599783	rounded	cordate	16	green	medium	cordate	+	0	flat
16	HA313	PI 599983	rounded	triangular	18	green	medium	deltoid	+	0	concave

ตารางที่ 5 (ต่อ)

List no.	Varieties	Accession	Cotyledon shape	Leaf shape	No. leaves (flowering)	Leave color	Leaf size	Leaf base shape	Leaf glassiness	Leaf blistering	Shape cross section
17	RHA286	PI 552932	extended	triangular	20	green	medium	cordate	+	0	flat
18	HA349	PI 509059	elliptical	cordate	20	green	medium	auriculate	+	+	convex
19	HA304	PI 599782	rounded	cordate	18	green	large	auriculate	+	0	flat
20	HA316	NSL 208764	rounded	cordate	22	green	medium	auriculate	+	0	flat
21	HA353	PI 509063	elliptical	cordate	20	green	large	auriculate	+	+	flat
22	HA292	PI 552937	rounded	cordate	32	green	large	cordate	+	0	flat
23	HA300	PI 552938	elliptical	cordate	30	green	large	auriculate	+	0	flat
24	RHA270	PI 559757	rounded	cordate	16	green	medium	cordate	+	0	concave
25	RHA366	PI 534652	elliptical	tiangular	14	green	medium	deltoid	+	0	convex
26	HA65	Ames 3960	elliptical	cordate	16	green	medium	cordate	+	0	flat
27	HA382	PI 578871	rounded	cordate	16	green	small	deltoid	+	0	flat
28	RHA276	PI 599761	elliptical	triangular	16	green	medium	deltoid	+	0	flat
29	HA343	PI 509053	extended	cordate	18	green	medium	cordate	+	0	flat
30	RHA331	NSL 202287	elliptical	cordate	18	green	medium	cordate	+	0	flat
31	RHA332	NSL 202288	extended	triangular	16	green	small	deltoid	+	0	flat
32	No.12		elliptical	triangular	24	green	medium	deltoid	+	0	flat
33	RHA294	PI 599764	elliptical	cordate	20	green	medium	cordate	+	0	flat

ตารางที่ 5 (ต่อ)

List no.	Varieties	Accession	Cotyledon shape	Leaf shape	No. leaves (flowering)	Leave color	Leaf size	Leaf base shape	Leaf glassiness	Leaf blistering	Shape cross section
34	HA232	PI 599777	rounded	cordate	22	green	medium	cordate	+	+	concave
35	RHA325	NSL 208774	elliptical	cordate	14	green	medium	cordate	+	0	flat
36	RHA293	PI 559788	rounded	cordate	18	green	medium	auriculate	+	0	convex
37	HA851	NSL 202853	elliptical	triangular	30	green	medium	auriculate	+	0	flat
38	HA383	PI 578872	elliptical	cordate	22	green	medium	cordate	+	0	flat
39	No.4		elliptical	cordate	16	green	medium	cordate	+	0	flat
40	RHA333	NSL 202289	elliptical	cordate	24	green	medium	auriculate	+	0	flat
41	PK-101	PI 420138	rounded	cordate	28	green	medium	auriculate	+	0	flat
42	HA303	PI 552941	rounded	cordate	20	dark green	medium	cordate	+	+	convex
43	HA234	PI 599778	rounded	rounded	30	green	medium	cordate	+	+	convex
44	HA289	PI 599781	rounded	triangular	18	green	large	deltoid	+	0	flat
45	HA341	PI 509051	rounded	triangular	16	green	small	deltoid	+	0	flat
46	HA277	PI 599779	rounded	cordate	18	green	medium	cordate	+	+	flat
47	HA208	Ames 3986	rounded	cordate	18	green	medium	cordate	+	0	flat
48	HA99	PI 599774	rounded	cordate	20	green	large	cordate	+	+	flat
49	HA124	PI 599775	extended	cordate	28	green	small	auriculate	+	0	flat
50	RHA327	NSL 208775	elliptical	cordate	22	green	medium	auriculate	+	0	convex

ตารางที่ 5 (ต่อ)

List no.	Varieties	Accession	Cotyledon shape	Leaf shape	No. leaves (flowering)	Leave color	Leaf size	Leaf base shape	Leaf glassiness	Leaf blistering	Shape cross section
51	Hybrid I		rounded	cordate	29	green	extremely large	auriculate	+	+	flat
52	Hybrid II		rounded	cordate	29	green	extremely large	auriculate	+	0	flat
53	Hybrid III		rounded	cordate	30	green	extremely large	auriculate	+	0	flat
54	Hantra		rounded	cordate	28	green	large	auriculate	+	+	flat
55	No.17		rounded	cordate	28	green	large	cordate	+	0	flat
56	HA853	NSL 202855	elliptical	cordate	22	green	large	auriculate	+	0	flat
57	HA302	PI 552940	rounded	cordate	18	green	medium	cordate	+	0	flat
58	HA236	Ames 3998	rounded	cordate	26	green	medium	auriculate	+	0	flat
59	HA852	NSL 202854	elliptical	cordate	26	green	medium	auriculate	+	0	flat

ตารางที่ 6 ลักษณะทางลักษณะพื้นฐานวิทยาส่วนเมล็ดของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์

List no.	Varieties	Accession	% Seedset	Seed				Seedstripe	Position stripes	Pericarp	100 Seed weight (g)
				length (cm)	color	shape	thickness	color		thickness	
1	RHA265	PI 599754	85	1.0	black	ovoid elongated	thin	no	no	extremely thin	2.42
2	HA291	PI 552936	90	0.8	brown	rounded	medium	no	no	thin	3.22
3	RHA360	PI 531073	50	0.9	black	elongated	thin	no	no	extremely thin	2.23
4	RHA348	PI 509058	95	0.8	black	ovoid wide	thin	no	no	extremely thin	3.01
5	RHA269	PI 599756	80	1.1	brown	ovoid elongate	thin	no	no	extremely thin	2.90
6	RHA386	PI 578008	90	1.1	brown	elongated	medium	no	no	thin	2.86
7	RHA364	PI 534650	80	1.3	black	elongated	medium	no	no	thin	6.45
8	RHA299	PI 599767	80	0.8	black	ovoid elongate	thin	no	no	extremely thin	2.97
9	No.13		90	1.1	black	ovoid elongate	thin	no	no	extremely thin	5.60
10	RHA278	PI 599762	70	0.8	brown	elongated	medium	no	no	thin	3.60
11	RHA297	PI 599765	95	1.0	black	elongated	thin	no	no	extremely thin	1.71
12	RHA388	PI 578010	50	0.8	black	ovoid elongate	thin	no	no	extremely thin	2.45
13	No.14		90	1.0	black	rounded	medium	no	no	thin	6.13
14	HA224	PI 599776	85	0.6	black	rounded	medium	no	no	thin	5.41
15	HA314	PI 599783	90	1.6	black	ovoid wide	thick	white	marginal	thick	9.88
16	HA313	PI 599983	90	1.5	black	ovoid wide	thick	white	marginal	thick	9.79

ตารางที่ 6 (ต่อ)

List no.	Varieties	Accession	% Seedset	Seed				Seedstripe	Position stripes	Pericarp	100 Seed weight (g)
				length (cm)	color	shape	thickness	color		thickness	
17	RHA286	PI 552932	80	1.8	black	ovoid wide	thick	white	both marginal and lateral	thick	11.37
18	HA349	PI 509059	60	1.0	black	rounded	medium	brown	both marginal and lateral	thick	6.17
19	HA304	PI 599782	90	0.8	black	rounded	thick	white	marginal	thin	8.34
20	HA316	NSL 208764	95	0.9	black	rounded	thick	white	marginal	thick	8.73
21	HA353	PI 509063	90	1.2	black	ovoid wide	thick	grey	both marginal and lateral	medium	6.26
22	HA292	PI 552937	90	1.6	black	ovoid wide	thick	brown	marginal	thick	10.77
23	HA300	PI 552938	80	1.0	black	ovoid wide	thick	grey	marginal	thin	6.09
24	RHA270	PI 559757	85	1.0	black	rounded	medium	grey	marginal	thin	3.29
25	RHA366	PI 534652	90	1.0	black	rounded	medium	grey	marginal	thin	5.02
26	HA65	Ames 3960	90	1.0	black	elongated	medium	grey	both marginal and lateral	thin	3.68
27	HA382	PI 578871	90	1.0	black	ovoid wide	medium	grey	both marginal and lateral	thin	3.97
28	RHA276	PI 599761	90	0.8	black	ovoid wide	medium	grey	both marginal and lateral	extremely thin	3.50
29	HA343	PI 509053	90	1.2	black	ovoid wide	medium	grey	marginal	thin	4.12
30	RHA331	NSL 202287	85	1.1	black	ovoid wide	medium	brown	both marginal and lateral	thin	3.97
31	RHA332	NSL 202288	95	1.2	black	elongated	medium	white	both marginal and lateral	thin	3.67
32	No.12		90	1.2	black	ovoid elongate	medium	brown	marginal	thin	4.87
33	RHA294	PI 599764	95	0.8	black	elongated	medium	white	both marginal and lateral	thin	3.96

ตารางที่ 6 (ต่อ)

List no.	Varieties	Accession	% Seedset	Seed				Seedstripe	Position stripes	Pericarp	100 Seed weight (g)
				length (cm)	color	shape	thickness	color		thickness	
34	HA232	PI 599777	90	1.1	black	ovoid elongate	medium	grey	both marginal and lateral	thin	4.28
35	RHA325	NSL 208774	50	0.9	black	ovoid wide	medium	brown	marginal	thin	4.95
36	RHA293	PI 559788	80	1.1	black	rounded	medium	brown	marginal	thin	7.37
37	HA851	NSL 202853	90	0.7	black	rounded	medium	grey	marginal	thin	4.02
38	HA383	PI 578872	80	1.0	black	elongated	thin	grey	marginal	thin	3.58
39	No.4		95	1.0	black	ovoid elongate	medium	grey	both marginal and lateral	thin	4.22
40	RHA333	NSL 202289	80	0.9	black	elongated	thin	white	both marginal and lateral	thin	3.55
41	PK-101	PI 420138	90	1.1	black	ovoid wide	medium	grey	marginal	thin	6.48
42	HA303	PI 552941	85	0.8	black	rounded	thin	grey	both marginal and lateral	thin	4.41
43	HA234	PI 599778	70	0.9	black	ovoid wide	thin	grey	marginal	extremely thin	4.49
44	HA289	PI 599781	70	1.2	black	ovoid wide	medium	grey	marginal	thin	6.55
45	HA341	PI 509051	90	0.8	black	ovoid elongate	medium	grey	marginal	thin	2.35
46	HA277	PI 599779	90	1.3	black	ovoid elongate	medium	grey	marginal	thin	7.80
47	HA208	Ames 3986	80	1.0	black	ovoid elongate	thin	grey	both marginal and lateral	thin	3.18
48	HA99	PI 599774	60	1.1	black	ovoid elongate	medium	grey	both marginal and lateral	medium	3.00
49	HA124	PI 599775	90	1.1	black	ovoid elongate	medium	grey	both marginal and lateral	thin	5.45
50	RHA327	NSL 208775	50	1.0	black	ovoid elongate	medium	grey	both marginal and lateral	thin	5.11

ตารางที่ 6 (ต่อ)

List no.	Varieties	Accession	% Seedset	Seed				Seedstripe	Position stripes	Pericarp	100 Seed weight (g)
				length (cm)	color	shape	thickness	color		thickness	
51	Hybrid I		95	1.4	black	ovoid elongate	medium	grey	both marginal and lateral	thin	6.12
52	Hybrid II		95	1.1	black	ovoid wide	medium	grey	both marginal and lateral	thin	5.46
53	Hybrid III		95	1.1	black	ovoid elongate	medium	grey	both marginal and lateral	thin	6.93
54	Hantra		90	1.0	black	ovoid wide	medium	grey	both marginal and lateral	thin	6.60
55	No.17		95	1.1	black	ovoid elongate	medium	grey	marginal	thin	5.52
56	HA853	NSL 202855	70	1.2	black	ovoid wide	medium	grey	marginal	thin	8.59
57	HA302	PI 552940	50	1.3	black	ovoid elongate	medium	grey	marginal	thin	8.08
58	HA236	Ames 3998	90	1.2	black	ovoid elongate	medium	grey	both marginal and lateral	thin	6.00
59	HA852	NSL 202854	80	1.0	black	ovoid elongate	medium	grey	both marginal and lateral	medium	5.54

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาส่วนก้านใบ และจานดอกของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์

List no.	Varieties	Accession	Angle of veins	Angle of petiole	Leaf habit of petiole	Length of petiole	Length of internodes	Head angle (mature)	Head Size	Head shape	Weight of seed/head(g)
1	RHA265	PI 599754	obtuse	medium	semi- erect	long	medium	135	small	flat	6.15
2	HA291	PI 552936	obtuse	medium	semi- erect	medium	short	135	medium	convex	12.61
3	RHA360	PI 531073	obtuse	low	horizontal	medium	short	90	small	flat	5.35
4	RHA348	PI 509058	obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	90	small	flat	7.58
5	RHA269	PI 599756	obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	135	medium	convex	15.80
6	RHA386	PI 578008	right angle	low	horizontal	medium	short	90	small	flat	14.60
7	RHA364	PI 534650	obtuse	high	erect	long	short	135	medium	flat	15.50
8	RHA299	PI 599767	obtuse	medium	semi- erect	long	short	135	medium	convex	12.24
9	No.13		obtuse	medium	semi- erect	long	long	135	medium	convex	33.33
10	RHA278	PI 599762	obtuse	medium	semi- erect	long	medium	135	medium	concave	15.95
11	RHA297	PI 599765	obtuse	low	horizontal	medium	medium	90	small	flat	10.41
12	RHA388	PI 578010	acute	low	horizontal	long	medium	90	small	flat	2.84
13	No.14		obtuse	low	horizontal	medium	medium	135	medium	convex	54.41
14	HA224	PI 599776	obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	135	medium	flat	27.21
15	HA314	PI 599783	obtuse	high	erect	medium	medium	135	medium	convex	N/A
16	HA313	PI 599983	obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	135	medium	convex	9.79

ตารางที่ 7 (ต่อ)

List no.	Varieties	Accession	Angle of veins	Angle of petiole	Leaf habit of petiole	Length of petiole	Length of internodes	Head angle (mature)	Head size	Head shape	Weight of seed/head(g)
17	RHA286	PI 552932	acute	low	horizontal	long	medium	135	medium	convex	8.88
18	HA349	PI 509059	obtuse	medium	semi- erect	medium	short	135	medium	flat	10.49
19	HA304	PI 599782	obtuse	medium	semi- erect	medium	short	180	large	convex	11.72
20	HA316	NSL 208764	obtuse	medium	semi- erect	long	medium	135	large	convex	21.74
21	HA353	PI 509063	obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	135	large	flat	18.59
22	HA292	PI 552937	obtuse	high	erect	medium	short	180	large	convex	20.39
23	HA300	PI 552938	obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	135	large	convex	7.35
24	RHA270	PI 559757	obtuse	medium	semi- erect	medium	long	90	small	convex	8.83
25	RHA366	PI 534652	obtuse	low	horizontal	medium	short	135	large	flat	6.63
26	HA65	Ames 3960	obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	90	small	flat	4.24
27	HA382	PI 578871	acute	low	semi- erect	long	short	135	small	convex	18.40
28	RHA276	PI 599761	obtuse	high	erect	medium	short	135	medium	flat	6.08
29	HA343	PI 509053	obtuse	medium	semi- erect	long	long	135	medium	flat	8.57
30	RHA331	NSL 202287	obtuse	high	erect	medium	medium	135	small	convex	9.87
31	RHA332	NSL 202288	obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	135	small	convex	13.59
32	No.12		obtuse	low	horizontal	long	medium	90	medium	flat	44.43
33	RHA294	PI 599764	obtuse	high	erect	long	medium	135	medium	convex	15.52

ตารางที่ 7 (ต่อ)

List no.	Varieties	Accession	Angle of veins	Angle of petiole	Leaf habit of petiole	Length of petiole	Length of internodes	Head angle (mature)	Head size	Head shape	Weight of seed/head(g)
34	HA232	PI 599777	obtuse	high	erect	long	medium	90	medium	misshappen	14.83
35	RHA325	NSL 208774	obtuse	medium	semi- erect	medium	short	135	medium	convex	8.62
36	RHA293	PI 559788	obtuse	medium	semi- erect	long	short	90	small	convex	23.53
37	HA851	NSL 202853	acute	medium	semi- erect	long	long	90	medium	flat	10.71
38	HA383	PI 578872	acute	medium	semi- erect	long	short	135	medium	convex	14.69
39	No.4		acute	high	erect	long	short	90	medium	convex	53.48
40	RHA333	NSL 202289	obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	90	small	convex	14.87
41	PK-101	PI 420138	obtuse	high	erect	long	medium	90	medium	flat	43.15
42	HA303	PI 552941	obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	135	medium	flat	1.13
43	HA234	PI 599778	right angle	medium	semi- erect	long	medium	90	medium	flat	9.91
44	HA289	PI 599781	obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	90	medium	convex	11.75
45	HA341	PI 509051	acute	low	horizontal	long	medium	90	small	flat	6.67
46	HA277	PI 599779	obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	135	medium	convex	10.62
47	HA208	Ames 3986	obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	135	medium	flat	9.87
48	HA99	PI 599774	obtuse	medium	semi- erect	medium	short	135	medium	convex	7.10
49	HA124	PI 599775	obtuse	high	erect	long	short	90	small	flat	11.60
50	RHA327	NSL 208775	obtuse	medium	semi- erect	medium	short	135	small	convex	20.19

ตารางที่ 7 (ต่อ)

List no.	Varieties	Accession	Angle of veins	Angle of petiole	Leaf habit of petiole	Length of petiole	Length of internodes	Head angle (mature)	Head size	Head shape	Weight of seed/head(g)
51	Hybrid I		obtuse	medium	semi- erect	medium	short	135	large	convex	42.86
52	Hybrid II		obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	135	large	convex	68.35
53	Hybrid III		obtuse	medium	semi- erect	long	short	135	extremely large	convex	82.49
54	Hantra		obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	135	large	flat	44.74
55	No.17		obtuse	low	horizontal	medium	medium	135	large	flat	40.32
56	HA853	NSL 202855	obtuse	medium	semi- erect	long	medium	135	medium	flat	9.02
57	HA302	PI 552940	obtuse	medium	semi- erect	medium	medium	180	medium	misshappen	6.63
58	HA236	Ames 3998	obtuse	high	erect	long	medium	135	medium	flat	19.22
59	HA852	NSL 202854	obtuse	high	erect	medium	short	135	medium	convex	25.67

หมายเหตุ N/A หมายถึง ข้อมูลสูญหาย

ตารางที่ 8 ค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง (dissimilarity coefficient) ที่ได้จากการเปรียบเทียบค่าความต่างของข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทานตะวัน
สายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์

	RHA265	HA314	RHA270	Hybrid I	RHA360	HA291	RHA364	HA383	Hybrid II	PK-101	HA234	No.14	RHA278	Hybrid III	HA289
RHA265	0.000														
HA314	0.050	0.000													
RHA270	0.222	0.110	0.000												
Hybrid I	0.321	0.226	0.130	0.000											
RHA360	0.050	0.080	0.150	0.345	0.000										
HA291	0.037	0.115	0.104	0.270	0.074	0.000									
RHA364	0.049	0.110	0.156	0.232	0.076	0.057	0.000								
HA383	0.295	0.150	0.037	0.077	0.238	0.147	0.149	0.000							
Hybrid II	0.186	0.158	0.100	0.024	0.258	0.192	0.140	0.085	0.000						
PK-101	0.210	0.121	0.056	0.060	0.185	0.151	0.095	0.018	0.067	0.000					
HA234	0.217	0.096	0.043	0.126	0.194	0.168	0.165	0.034	0.090	0.042	0.000				
No.14	0.087	0.113	0.118	0.221	0.053	0.055	0.037	0.128	0.150	0.098	0.134	0.000			
RHA278	0.033	0.147	0.127	0.261	0.060	0.050	0.310	0.135	0.185	0.135	0.114	0.053	0.000		
Hybrid III	0.329	0.197	0.100	0.032	0.329	0.239	0.255	0.093	0.057	0.066	0.107	0.195	0.255	0.000	
HA289	0.267	0.108	0.062	0.090	0.171	0.160	0.127	0.060	0.068	0.042	0.068	0.130	0.160	0.077	0.000
RHA276	0.350	0.104	0.034	0.132	0.231	0.215	0.248	0.053	0.134	0.073	0.045	0.192	0.167	0.117	0.036
HA303	0.333	0.143	0.048	0.120	0.335	0.194	0.249	0.016	0.117	0.044	0.044	0.167	0.229	0.115	0.083

ตารางที่ 8 (ต่อ)

	RHA265	HA314	RHA270	Hybrid I	RHA360	HA291	RHA364	HA383	Hybrid II	PK-101	HA234	No.14	RHA278	Hybrid III	HA289
HA65	0.440	0.158	0.018	0.096	0.244	0.213	0.267	0.042	0.119	0.053	0.059	0.248	0.217	0.096	0.067
RHA388	0.060	0.109	0.210	0.324	0.061	0.111	0.043	0.257	0.181	0.187	0.169	0.102	0.018	0.331	0.133
HA341	0.175	0.117	0.030	0.096	0.120	0.171	0.193	0.095	0.079	0.089	0.085	0.156	0.156	0.103	0.036
No.17	0.219	0.181	0.097	0.045	0.167	0.217	0.171	0.085	0.052	0.067	0.100	0.124	0.177	0.061	0.049
HA302	0.256	0.133	0.169	0.093	0.253	0.196	0.147	0.079	0.093	0.120	0.144	0.120	0.144	0.117	0.145
RHA293	0.248	0.122	0.046	0.121	0.156	0.134	0.121	0.088	0.103	0.059	0.081	0.082	0.150	0.087	0.057
HA232	0.289	0.156	0.067	0.094	0.200	0.218	0.211	0.056	0.121	0.058	0.067	0.181	0.171	0.114	0.062
RHA348	0.100	0.117	0.140	0.332	0.017	0.090	0.059	0.185	0.241	0.152	0.134	0.057	0.036	0.298	0.140
RHA331	0.400	0.147	0.062	0.126	0.244	0.220	0.253	0.068	0.134	0.080	0.074	0.192	0.186	0.091	0.060
HA349	0.317	0.089	0.093	0.128	0.289	0.205	0.225	0.102	0.145	0.074	0.081	0.178	0.211	0.114	0.108
HA313	0.120	0.000	0.121	0.234	0.057	0.119	0.141	0.170	0.190	0.145	0.127	0.119	0.170	0.198	0.090
No.4	0.390	0.147	0.044	0.076	0.317	0.217	0.200	0.013	0.073	0.042	0.044	0.215	0.180	0.104	0.050
HA286	0.257	0.059	0.137	0.175	0.178	0.189	0.232	0.124	0.184	0.122	0.114	0.151	0.197	0.146	0.108
RHA366	0.307	0.157	0.000	0.097	0.200	0.129	0.178	0.025	0.097	0.068	0.054	0.133	0.120	0.093	0.068
HA343	0.300	0.147	0.049	0.126	0.200	0.153	0.158	0.048	0.134	0.067	0.049	0.130	0.109	0.110	0.055
HA382	0.325	0.119	0.013	0.113	0.250	0.224	0.267	0.074	0.106	0.089	0.059	0.205	0.236	0.079	0.036
HA851	0.267	0.157	0.036	0.142	0.156	0.130	0.139	0.068	0.124	0.073	0.068	0.124	0.127	0.128	0.057
RHA332	0.320	0.183	0.044	0.072	0.175	0.158	0.178	0.020	0.083	0.083	0.078	0.158	0.120	0.065	0.040

ตารางที่ 8 (ต่อ)

	RHA265	HA314	RHA270	Hybrid I	RHA360	HA291	RHA364	HA383	Hybrid II	PK-101	HA234	No.14	RHA278	Hybrid III	HA289
HA124	0.289	0.210	0.103	0.060	0.260	0.272	0.248	0.097	0.090	0.077	0.122	0.205	0.260	0.065	0.073
RHA297	0.033	0.133	0.200	0.299	0.040	0.068	0.024	0.184	0.248	0.161	0.168	0.043	0.000	0.281	0.200
HA304	0.122	0.116	0.161	0.117	0.171	0.123	0.098	0.121	0.100	0.169	0.202	0.063	0.121	0.094	0.145
RHA269	0.067	0.105	0.192	0.332	0.029	0.083	0.059	0.164	0.221	0.208	0.171	0.061	0.033	0.320	0.178
HA853	0.248	0.141	0.101	0.081	0.190	0.181	0.165	0.079	0.094	0.048	0.085	0.106	0.171	0.066	0.044
No.13	0.043	0.105	0.193	0.216	0.092	0.094	0.020	0.154	0.124	0.140	0.171	0.072	0.062	0.236	0.140
HA300	0.200	0.108	0.104	0.103	0.286	0.167	0.174	0.117	0.059	0.099	0.086	0.166	0.183	0.081	0.055
HA353	0.371	0.121	0.127	0.095	0.314	0.284	0.285	0.128	0.118	0.098	0.114	0.220	0.291	0.081	0.080
Hantra	0.268	0.172	0.097	0.049	0.301	0.215	0.218	0.081	0.065	0.046	0.084	0.178	0.233	0.036	0.057
RHA386	0.086	0.181	0.140	0.283	0.036	0.053	0.067	0.164	0.219	0.156	0.177	0.045	0.017	0.271	0.145
No.12	0.229	0.158	0.073	0.132	0.150	0.148	0.158	0.068	0.139	0.091	0.095	0.144	0.120	0.147	0.062
HA277	0.200	0.094	0.067	0.105	0.175	0.170	0.134	0.074	0.082	0.063	0.073	0.108	0.133	0.112	0.045
RHA299	0.043	0.104	0.153	0.249	0.059	0.078	0.018	0.114	0.156	0.129	0.135	0.072	0.029	0.266	0.164
HA208	0.300	0.121	0.061	0.133	0.318	0.210	0.243	0.062	0.104	0.093	0.062	0.201	0.212	0.138	0.068
HA852	0.317	0.111	0.097	0.084	0.304	0.213	0.243	0.067	0.090	0.056	0.073	0.158	0.224	0.092	0.086
HA99	0.343	0.134	0.085	0.102	0.244	0.252	0.267	0.080	0.109	0.098	0.086	0.205	0.233	0.109	0.055
RHA327	0.267	0.128	0.078	0.080	0.231	0.213	0.212	0.080	0.086	0.067	0.104	0.155	0.196	0.079	0.073
HA292	0.289	0.095	0.237	0.148	0.342	0.265	0.247	0.155	0.113	0.195	0.169	0.195	0.246	0.122	0.194

ตารางที่ 8 (ต่อ)

	RHA265	HA314	RHA270	Hybrid I	RHA360	HA291	RHA364	HA383	Hybrid II	PK-101	HA234	No.14	RHA278	Hybrid III	HA289
RHA325	0.300	0.107	0.031	0.142	0.163	0.135	0.156	0.053	0.133	0.067	0.059	0.140	0.129	0.125	0.073
HA236	0.263	0.137	0.080	0.058	0.263	0.220	0.199	0.059	0.079	0.043	0.070	0.144	0.204	0.071	0.071
RHA294	0.233	0.127	0.020	0.110	0.156	0.124	0.153	0.043	0.117	0.061	0.054	0.096	0.100	0.101	0.044
HA316	0.133	0.079	0.115	0.161	0.029	0.139	0.121	0.134	0.159	0.115	0.129	0.081	0.152	0.134	0.129
RHA333	0.200	0.124	0.022	0.087	0.193	0.140	0.150	0.018	0.088	0.038	0.043	0.122	0.134	0.078	0.067
HA224	0.117	0.135	0.140	0.243	0.067	0.063	0.028	0.171	0.180	0.130	0.153	0.023	0.046	0.231	0.140

ตารางที่ 8 (ต่อ)

	RHA276	HA303	HA65	RHA388	HA341	No.17	HA302	RHA293	HA232	RHA348	RHA331	HA349	HA313	No.4	HA286
RHA276	0.000														
HA303	0.043	0.000													
HA65	0.067	0.075	0.000												
RHA388	0.244	0.345	0.342	0.000											
HA341	0.036	0.101	0.022	0.140	0.000										
No.17	0.086	0.098	0.081	0.192	0.033	0.000									
HA302	0.084	0.081	0.152	0.254	0.121	0.042	0.000								
RHA293	0.090	0.076	0.055	0.193	0.078	0.073	0.135	0.000							
HA232	0.031	0.063	0.017	0.253	0.033	0.053	0.098	0.067	0.000						
RHA348	0.180	0.263	0.218	0.061	0.145	0.174	0.240	0.129	0.169	0.000					
RHA331	0.042	0.083	0.050	0.304	0.080	0.086	0.098	0.042	0.043	0.167	0.000				
HA349	0.073	0.093	0.113	0.297	0.147	0.134	0.113	0.048	0.105	0.274	0.090	0.000			
HA313	0.106	0.161	0.133	0.100	0.093	0.165	0.113	0.109	0.139	0.093	0.133	0.117	0.000		
No.4	0.044	0.062	0.018	0.268	0.053	0.090	0.144	0.082	0.036	0.230	0.056	0.101	0.164	0.000	
HA286	0.052	0.126	0.151	0.218	0.113	0.144	0.116	0.102	0.117	0.166	0.097	0.061	0.055	0.125	0.000
RHA366	0.029	0.038	0.022	0.211	0.033	0.073	0.087	0.060	0.067	0.149	0.054	0.103	0.141	0.053	0.130
HA343	0.000	0.063	0.022	0.229	0.060	0.088	0.067	0.062	0.031	0.120	0.018	0.098	0.133	0.044	0.087
HA382	0.018	0.069	0.000	0.289	0.018	0.067	0.089	0.073	0.046	0.220	0.033	0.134	0.097	0.061	0.124

ตารางที่ 8 (ต่อ)

	RHA276	HA303	HA65	RHA388	HA341	No.17	HA302	RHA293	HA232	RHA348	RHA331	HA349	HA313	No.4	HA286
HA851	0.042	0.062	0.020	0.207	0.078	0.106	0.151	0.033	0.038	0.104	0.031	0.103	0.128	0.056	0.125
RHA332	0.014	0.069	0.044	0.150	0.044	0.068	0.108	0.073	0.040	0.133	0.000	0.092	0.152	0.000	0.096
HA124	0.073	0.121	0.060	0.280	0.067	0.045	0.140	0.072	0.043	0.255	0.073	0.106	0.188	0.061	0.108
RHA297	0.293	0.381	0.300	0.000	0.200	0.192	0.318	0.175	0.244	0.022	0.275	0.286	0.160	0.268	0.200
HA304	0.116	0.113	0.215	0.217	0.176	0.068	0.091	0.110	0.176	0.168	0.080	0.116	0.114	0.200	0.099
RHA269	0.213	0.291	0.300	0.025	0.200	0.194	0.171	0.173	0.200	0.020	0.200	0.304	0.104	0.212	0.181
HA853	0.073	0.082	0.096	0.249	0.073	0.042	0.033	0.069	0.067	0.186	0.080	0.105	0.133	0.101	0.090
No.13	0.241	0.302	0.311	0.054	0.193	0.168	0.184	0.170	0.241	0.103	0.261	0.223	0.148	0.200	0.180
HA300	0.117	0.109	0.133	0.220	0.120	0.095	0.140	0.095	0.143	0.222	0.117	0.129	0.134	0.112	0.132
HA353	0.083	0.123	0.111	0.371	0.111	0.062	0.117	0.086	0.092	0.267	0.091	0.092	0.117	0.128	0.066
Hantra	0.102	0.068	0.110	0.269	0.102	0.039	0.084	0.079	0.101	0.268	0.109	0.100	0.179	0.095	0.144
RHA386	0.195	0.249	0.218	0.040	0.140	0.158	0.240	0.133	0.169	0.017	0.182	0.273	0.147	0.212	0.178
No.12	0.033	0.082	0.044	0.133	0.036	0.079	0.140	0.061	0.015	0.120	0.020	0.106	0.115	0.044	0.106
HA277	0.044	0.087	0.073	0.168	0.018	0.053	0.024	0.052	0.049	0.158	0.072	0.101	0.094	0.051	0.080
RHA299	0.221	0.262	0.267	0.034	0.193	0.189	0.170	0.159	0.195	0.044	0.211	0.243	0.139	0.167	0.197
HA208	0.031	0.040	0.060	0.276	0.038	0.081	0.068	0.080	0.039	0.231	0.062	0.128	0.121	0.040	0.109
HA852	0.077	0.080	0.085	0.321	0.073	0.050	0.042	0.067	0.063	0.268	0.096	0.068	0.109	0.067	0.067
HA99	0.036	0.093	0.067	0.275	0.044	0.057	0.077	0.094	0.040	0.240	0.067	0.091	0.123	0.056	0.098

ตารางที่ 8 (ต่อ)

	RHA276	HA303	HA65	RHA388	HA341	No.17	HA302	RHA293	HA232	RHA348	RHA331	HA349	HA313	No.4	HA286
RHA327	0.057	0.093	0.094	0.244	0.055	0.045	0.073	0.048	0.053	0.229	0.050	0.058	0.151	0.056	0.076
HA292	0.157	0.185	0.299	0.335	0.247	0.122	0.132	0.190	0.234	0.297	0.137	0.111	0.104	0.234	0.088
RHA325	0.036	0.091	0.053	0.220	0.050	0.121	0.114	0.073	0.067	0.149	0.029	0.080	0.127	0.050	0.116
HA236	0.061	0.061	0.075	0.279	0.052	0.037	0.020	0.060	0.041	0.238	0.081	0.088	0.142	0.060	0.102
RHA294	0.012	0.029	0.055	0.192	0.025	0.068	0.073	0.036	0.029	0.120	0.015	0.061	0.133	0.028	0.074
HA316	0.116	0.135	0.133	0.152	0.147	0.113	0.117	0.056	0.114	0.053	0.092	0.073	0.073	0.158	0.061
RHA333	0.022	0.032	0.073	0.186	0.057	0.078	0.223	0.053	0.036	0.149	0.034	0.059	0.175	0.000	0.085
HA224	0.205	0.244	0.218	0.104	0.173	0.160	0.125	0.077	0.195	0.049	0.196	0.195	0.118	0.221	0.177

ตารางที่ 8 (ต่อ)

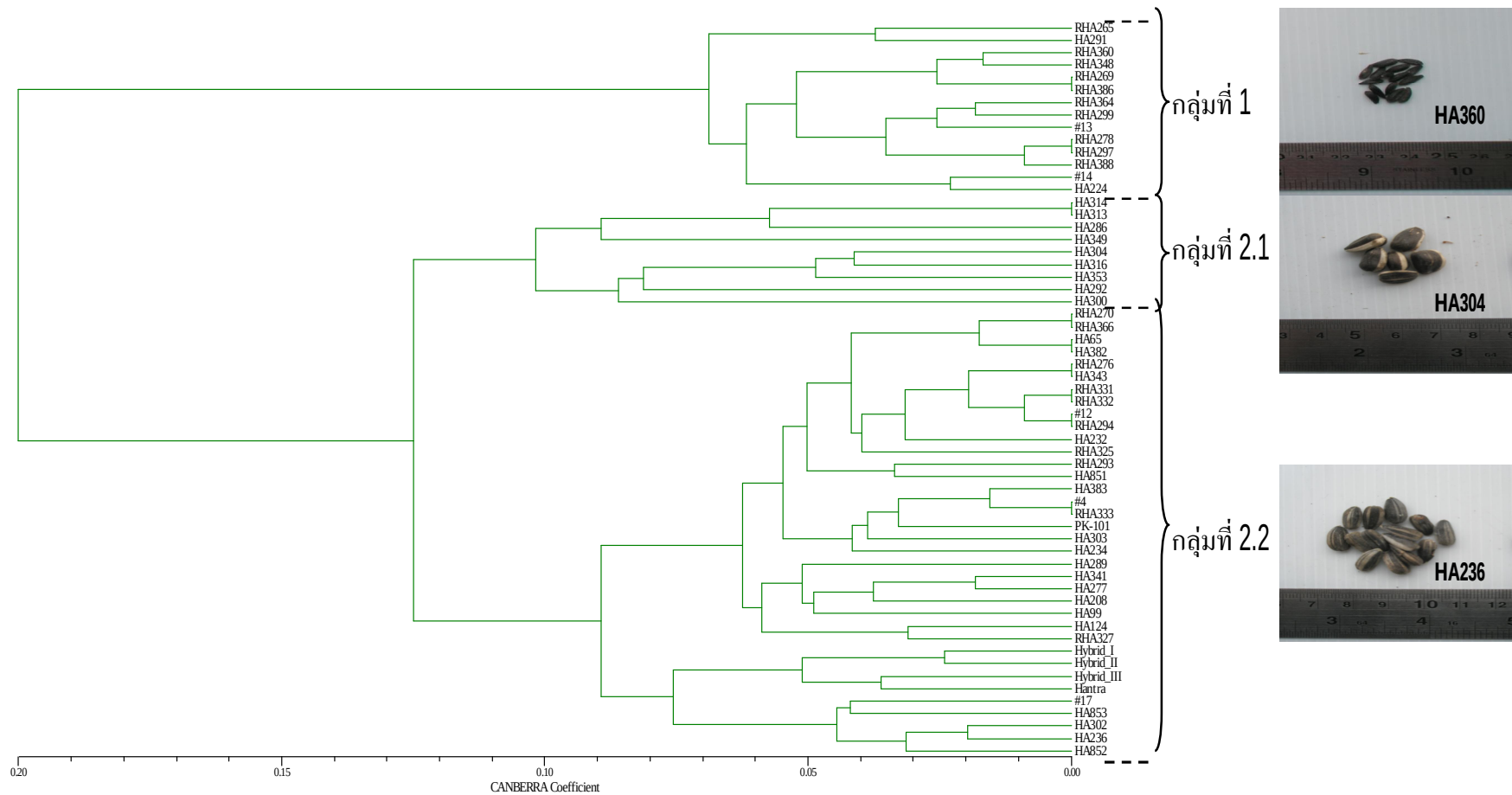
	RHA366	HA343	HA382	HA851	RHA332	HA124	RHA297	HA304	RHA269	HA853	No.13	HA300	HA353	Hantra	RHA386
RHA366	0.000														
HA343	0.034	0.000													
HA382	0.016	0.036	0.000												
HA851	0.050	0.013	0.054	0.000											
RHA332	0.000	0.000	0.036	0.025	0.000										
HA124	0.104	0.055	0.092	0.078	0.060	0.000									
RHA297	0.250	0.200	0.343	0.200	0.167	0.267	0.000								
HA304	0.093	0.106	0.090	0.161	0.093	0.173	0.200	0.000							
RHA269	0.219	0.133	0.267	0.148	0.143	0.300	0.029	0.119	0.000						
HA853	0.098	0.056	0.079	0.078	0.085	0.057	0.192	0.057	0.208	0.000					
No.13	0.213	0.193	0.285	0.206	0.175	0.253	0.020	0.092	0.067	0.165	0.000				
HA300	0.104	0.109	0.109	0.103	0.100	0.091	0.233	0.057	0.222	0.099	0.145	0.000			
HA353	0.114	0.091	0.091	0.112	0.100	0.067	0.314	0.044	0.311	0.068	0.248	0.067	0.000		
Hantra	0.086	0.099	0.083	0.126	0.089	0.077	0.286	0.075	0.329	0.049	0.229	0.063	0.063	0.000	
RHA386	0.125	0.100	0.240	0.100	0.100	0.200	0.022	0.193	0.000	0.168	0.092	0.222	0.280	0.257	0.000
No.12	0.067	0.036	0.060	0.062	0.000	0.067	0.171	0.206	0.111	0.098	0.193	0.150	0.133	0.130	0.083
HA277	0.079	0.056	0.061	0.072	0.059	0.049	0.200	0.072	0.133	0.045	0.140	0.103	0.104	0.098	0.153
RHA299	0.193	0.158	0.244	0.167	0.140	0.267	0.018	0.117	0.028	0.201	0.031	0.195	0.285	0.248	0.053

ตารางที่ 8 (ต่อ)

	RHA366	HA343	HA382	HA851	RHA332	HA124	RHA297	HA304	RHA269	HA853	No.13	HA300	HA353	Hantra	RHA386
HA208	0.075	0.049	0.049	0.061	0.043	0.073	0.390	0.110	0.195	0.102	0.240	0.091	0.114	0.099	0.234
HA852	0.103	0.068	0.094	0.098	0.094	0.045	0.318	0.118	0.231	0.057	0.206	0.124	0.067	0.086	0.249
HA99	0.104	0.067	0.050	0.085	0.044	0.067	0.314	0.106	0.220	0.073	0.230	0.133	0.062	0.092	0.236
RHA327	0.085	0.055	0.077	0.087	0.049	0.031	0.260	0.073	0.213	0.068	0.195	0.100	0.077	0.082	0.195
HA292	0.167	0.175	0.154	0.254	0.163	0.261	0.335	0.072	0.263	0.120	0.194	0.094	0.095	0.102	0.355
RHA325	0.054	0.036	0.020	0.054	0.038	0.111	0.224	0.116	0.154	0.097	0.180	0.127	0.140	0.116	0.149
HA236	0.078	0.065	0.079	0.085	0.085	0.046	0.306	0.102	0.245	0.047	0.214	0.118	0.089	0.070	0.221
RHA294	0.022	0.000	0.020	0.036	0.000	0.040	0.150	0.085	0.100	0.061	0.158	0.117	0.091	0.095	0.091
HA316	0.127	0.128	0.128	0.106	0.141	0.128	0.040	0.041	0.108	0.102	0.128	0.125	0.052	0.131	0.119
RHA333	0.029	0.000	0.050	0.040	0.038	0.044	0.163	0.170	0.143	0.085	0.156	0.067	0.075	0.083	0.114
HA224	0.145	0.112	0.229	0.092	0.160	0.210	0.067	0.062	0.067	0.131	0.072	0.165	0.224	0.215	0.050

ตารางที่ 8 (ต่อ)

	No.12	HA277	RHA299	HA208	HA852	HA99	RHA327	HA292	RHA325	HA236	RHA294	HA316	RHA333	HA224
No.12	0.000													
HA277	0.048	0.000												
RHA299	0.153	0.139	0.000											
HA208	0.034	0.037	0.206	0.000										
HA852	0.079	0.037	0.221	0.057	0.000									
HA99	0.055	0.056	0.211	0.045	0.039	0.000								
RHA327	0.033	0.026	0.206	0.045	0.055	0.057	0.000							
HA292	0.259	0.137	0.210	0.186	0.138	0.137	0.144	0.000						
RHA325	0.040	0.078	0.140	0.074	0.122	0.083	0.043	0.154	0.000					
HA236	0.065	0.028	0.214	0.046	0.021	0.061	0.030	0.161	0.094	0.000				
RHA294	0.000	0.028	0.121	0.013	0.053	0.033	0.024	0.173	0.031	0.035	0.000			
HA316	0.145	0.097	0.109	0.140	0.097	0.108	0.093	0.077	0.141	0.119	0.106	0.000		
RHA333	0.022	0.042	0.127	0.016	0.080	0.050	0.017	0.288	0.025	0.045	0.013	0.096	0.000	
HA224	0.149	0.123	0.082	0.243	0.192	0.241	0.191	0.222	0.156	0.186	0.123	0.090	0.173	0.000



ภาพที่ 1 dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ที่จัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทาง
สัณฐานวิทยา และวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความต่าง (dissimilarity coefficient) โดยใช้ Canberra coefficient (Lance and Williams, 1967)

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า สายพันธุ์ทานตะวันที่นำมาศึกษามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาลักษณะคล้ายคลึงกัน เนื่องจากประวัติของพันธุ์ (pedigree) ของทานตะวันส่วนใหญ่ พบว่า มีบรรพบุรุษบางส่วนร่วมกัน (GRIN, 2009) ดังนั้น dendrogram ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจึงแยกความแตกต่างได้ชัดเจนเฉพาะกับทานตะวันบางกลุ่มสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงคุณภาพที่คล้ายคลึงกันเท่านั้น (ลักษณะเมล็ด ใบ จานดอก และการแตกกิ่งก้าน) แต่ไม่สามารถที่แยกความแตกต่างตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณที่สำคัญสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ (ความสูง น้ำหนัก 100 เมล็ด เปอร์เซ็นต์น้ำมัน และปริมาณ alpha-tocopherol) หรือลักษณะความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ที่ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม (Restorer (R) line และ Maintainer (B) line) ได้ ซึ่งสอดคล้องกับ สุริพร (2546) ที่กล่าวว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยวิธีเปรียบเทียบลักษณะภายนอก ไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชบางชนิดที่มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมมาก ขณะที่ Sujatha *et al.* (2002) ได้จัดกลุ่มทานตะวันสายพันธุ์แท้ 51 สายพันธุ์จากแหล่งต่าง ๆ เช่น สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส อินเดีย และออสเตรเลีย โดยใช้วิธี Mahalanobis D^2 statistics พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม คือ ความสูง ขนาดลำต้น ผลผลิตต่อต้น น้ำหนักเมล็ด การติดเมล็ด ขนาดจานดอก และเปอร์เซ็นต์น้ำมัน ส่วนจำนวนใบต่อต้น และอายุการออกดอก มีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยมาก และ Dong *et al.* (2007) ได้ศึกษาความหลากหลายของทานตะวันชนิดบริโคมเมล็ดของประเทศจีน โดยใช้ Euclidean distance พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม คือ ปริมาณผลผลิต ขนาดจานดอก พื้นที่ใบต่อต้น น้ำหนัก 100 เมล็ด และน้ำหนักเมล็ดต่อจานดอก ส่วนลักษณะการแตกกิ่งและระยะเวลาการเจริญเติบโต มีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อยมาก จากการทดลองทั้งสองพบว่าการคัดเลือกสายพันธุ์แท้โดยอาศัยข้อมูลภูมิประเทศ (geographical data) ไม่มีประสิทธิภาพ แต่การคัดเลือกโดยอาศัยความต่างทางพันธุกรรมจะประสบผลสำเร็จมากกว่า จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการใช้ข้อมูลจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์พ่อและแม่ จำเป็นต้องใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องและสมบูรณ์ขึ้น

และจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า ส่วนที่สามารถตรวจพบความแตกต่างได้ดีที่สุด คือ ลักษณะเมล็ด รองลงมาคือ ลักษณะลำต้น จานดอก ดอก และใบ ตามลำดับ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจำแนกสายพันธุ์ทานตะวันได้อย่างคร่าว ๆ จากการสังเกตพบว่า สายพันธุ์ทานตะวันที่มีเมล็ดไม่มีลายแถบ เมล็ดมีขนาดเล็กสีดำ มีเมล็ดและเปลือกหุ้มเมล็ดบาง เป็นทานตะวันชนิดน้ำมัน มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง (35-45%) แต่ถ้าเป็นสายพันธุ์ทานตะวัน

ที่เมล็ดมีขนาดใหญ่ มีเมล็ดและเปลือกหุ้มเมล็ดหนา เมล็ดมีลายแถบ จะเป็นทานตะวันชนิดบริโกล เมล็ด มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่ำ (14-30%) หรือการใช้ลักษณะการแตกกิ่งก้านของลำต้นใช้ในการ จำแนกได้เช่นเดียวกัน โดยสายพันธุ์ RHA (R-line) ส่วนใหญ่ลำต้นจะมีการแตกกิ่งก้าน มีต้น ค่อนข้างเตี้ยเล็ก แต่สายพันธุ์ HA (B-line) ลำต้นจะไม่มีแตกกิ่งก้าน มีดอกเดี่ยว ต้นค่อนข้างสูง ใหญ่

ดังนั้น การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้โดยใช้ข้อมูล ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถสรุปผลการศึกษาได้ว่า

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า มี ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียง 26 ลักษณะ จาก 44 ลักษณะ ที่สามารถนำมาจัดกลุ่ม และแยก ความแตกต่างของทานตะวันสายพันธุ์แท้ได้ชัดเจน

2. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ ความต่างอยู่ในช่วง 0.00-0.44 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการกระจายตัวต่ำถึงปานกลาง แสดงให้เห็นว่า ทานตะวันสายพันธุ์แท้ที่นำมาศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ

3. dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถแยกความแตกต่างและจัด จำแนกทานตะวันสายพันธุ์แท้ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มของทานตะวันที่มี เมล็ดไม่มีลายแถบ ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของทานตะวันที่มีเมล็ดมีลายแถบ ซึ่งประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือ ทานตะวันชนิดน้ำมัน (oil seed) และชนิดบริโกลเมล็ด (non-oilseed) (ภาพที่ 2)



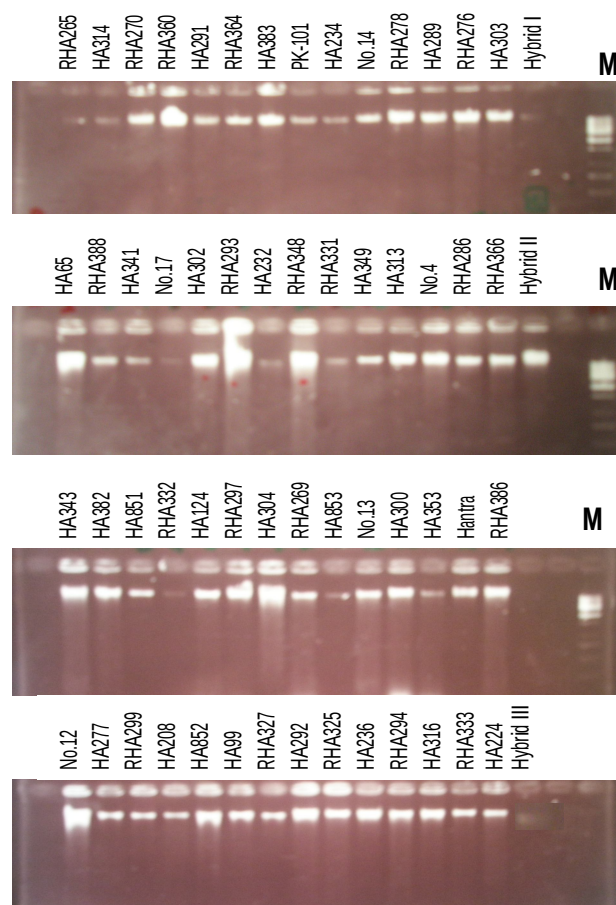
ภาพที่ 2 แผนภาพสรุปแสดงความสัมพันธ์ของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์ การค้า 3 พันธุ์ที่ศึกษาโดยใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา

4. การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงคุณภาพได้ดีกว่าการจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณ เนื่องจากลักษณะปริมาณมีการกระจายของข้อมูลอย่างต่อเนื่องไม่สามารถจัดกลุ่มได้อย่างชัดเจน และทานตะวันที่นำมาศึกษามีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำ ดังนั้น การใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวจึงไม่สามารถที่จะจัดกลุ่มสายพันธุ์ทานตะวันที่ศึกษาได้ชัดเจน

2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหมายเอเอฟแอลพี

2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากทานตะวัน

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB จากใบอ่อนของทานตะวัน ตามวิธีที่ประยุกต์มาจาก Dellaporta *et al.* (1983) และ Doyle and Doyle (1990) นำมาวัดปริมาณและคุณภาพด้วยวิธีอิลีกโทรโฟริซิสบนแผ่นอะกาโรส เปรียบเทียบความเข้มข้นกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นประมาณ 100-400 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำใบอ่อนของทานตะวัน 0.2 กรัม (ภาพที่ 3) ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ มีปริมาณแตกต่างกัน ซึ่งไม่ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของทานตะวัน แต่ขึ้นอยู่กับอายุและความสดของใบทานตะวันที่นำมาสกัด



ภาพที่ 3 การวัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ แถว M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

2.2 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

2.2.1 การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษา

จากการนำไพรเมอร์จำนวน 59 คู่ มาเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในขั้นตอน selective amplified และแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสภายใต้ตัวกลางชนิด denature polyacrylamide gel แล้วคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษา ซึ่งเป็นคู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้ดี ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และเป็นคู่ที่แสดงความแตกต่างของทานตะวันแต่ละสายพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้ พบไพรเมอร์ที่เหมาะสมจำนวน 23 คู่ ในแต่ละคู่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน เป็นคู่ที่แสดงความแตกต่างของทานตะวันแต่ละสายพันธุ์ และมีจำนวนแถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 52-118 แถบ ดังตารางที่ 9-10

ตารางที่ 9 คู่ไพรเมอร์ที่คัดเลือกและใช้ทดสอบในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์

	M-CAA	M-CAC	M-CAG	M-CAT	M-CTA	M-CTC	M-CTG
E-ACC	*		*		*		
E-ACG			*				*
E-AAC			*				*
E-AGC	*	*	*				*
E-AGG							

	M-AAG	M-AAT	M-ACA	M-ACC	M-ACG	M-ACT	M-AGC	M-AGG	M-ATG	M-ATA	M-ATC	M-ATT
E-CAG	*		*		*		*			*		
E-CGT		*			*	*	*	*	*	*		

หมายเหตุ * คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอได้

2.2.2 ร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึม (percentage of polymorphism) และจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ไพรเมอร์

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบรูปแบบและจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในทาบะวัน สายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 23 คู่ พบว่า ที่ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอ 100-600 bp ส่วนใหญ่มีความแตกต่างกัน จากจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1,963 แถบ แบ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน 685 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 1,278 แถบ เมื่อนำมา คำนวณหาจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ไพรเมอร์มีค่าเท่ากับ 85.35 แถบ คิดเป็นสัดส่วน ค่าโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ที่เกิดขึ้นเท่ากับ 64.85 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10) แสดงให้เห็นว่า ข้อมูลจากเครื่องหมายเอเอฟแอลพีของทาบะวันที่ทำการศึกษา มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ในระดับปานกลาง ซึ่งรูปแบบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากทาบะวันที่ทำการศึกษา อาจเกิดการกลายของเบสที่ตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะโดยการเปลี่ยนแปลงขนาดหายไป หรือเกิดตำแหน่งเอ็นไซม์ตัดจำเพาะเพิ่มขึ้นมาใหม่ การมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไป และมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลดีเอ็นเอใหม่ ในช่วงระหว่างตำแหน่งจำเพาะเดิม ทำให้ ขนาดชิ้นดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป (Lee et al., 1997; Kokotovic et al., 1999; Saliba et al., 2000) อย่างไรก็ตาม การเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันที่ได้สูงกว่ารายงานของ Hongtrakul et al. (1997) ซึ่งศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทาบะวันชนิดน้ำมัน 24 สายพันธุ์ด้วยเครื่องหมาย เอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ 6 คู่ (E-CAG/M-AAG, E-CAG/M-AAT, E-CAG/M-ACG, E-CAG/M-AGA, E-CAG/M-AGG และ E-CAG/M-ATA) พบว่า จากตำแหน่งแถบ 50-350 bp มี จำนวนแถบดีเอ็นเอ 359 แถบ จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ไพรเมอร์มีค่าเท่ากับ 60 แถบ เป็นแถบ ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 172 แถบ เมื่อคิดเป็นสัดส่วนค่าโพลิมอร์ฟิซึมเท่ากับ 47.9 เปอร์เซ็นต์ แต่ผล การศึกษาที่ได้มีค่าต่ำกว่าการทดลองของ Dong et al. (2007) ซึ่งศึกษาความหลากหลายทาง พันธุกรรมของทาบะวันชนิดบริ โภคเมล็ด 70 สายพันธุ์ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพีโดยใช้ ไพรเมอร์ 8 คู่ (E-AGC/M-CTA, E-AGC/M-CAC, E-AGC/M-CAG, E-AGC/M-CAT, E-ACT/M-CTA, E-ACT/M-CAC, E-ACT/M-CAG และ E-ACT/M-CAT) พบว่า จากตำแหน่งแถบ 100-600 bp มีจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ไพรเมอร์เท่ากับ 77.5 แถบ และมีสัดส่วนค่าโพลิมอร์ฟิซึมเท่ากับ 78.50 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องจากการศึกษาแต่ละการทดลองเลือกใช้สายพันธุ์ทาบะวันที่แตกต่างกัน รวมถึงการใช้จำนวนไพรเมอร์ และมีช่วงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน จึงทำให้ค่าโพลิมอร์ฟิซึมจาก แต่ละการทดลองแตกต่างกัน ซึ่งการใช้ไพรเมอร์จำนวนมาก และมีช่วงแถบดีเอ็นเอที่ศึกษา กว้าง แสดงให้เห็นว่าการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมมีความละเอียด และครอบคลุมลำดับ นิวคลีโอไทด์มากขึ้น

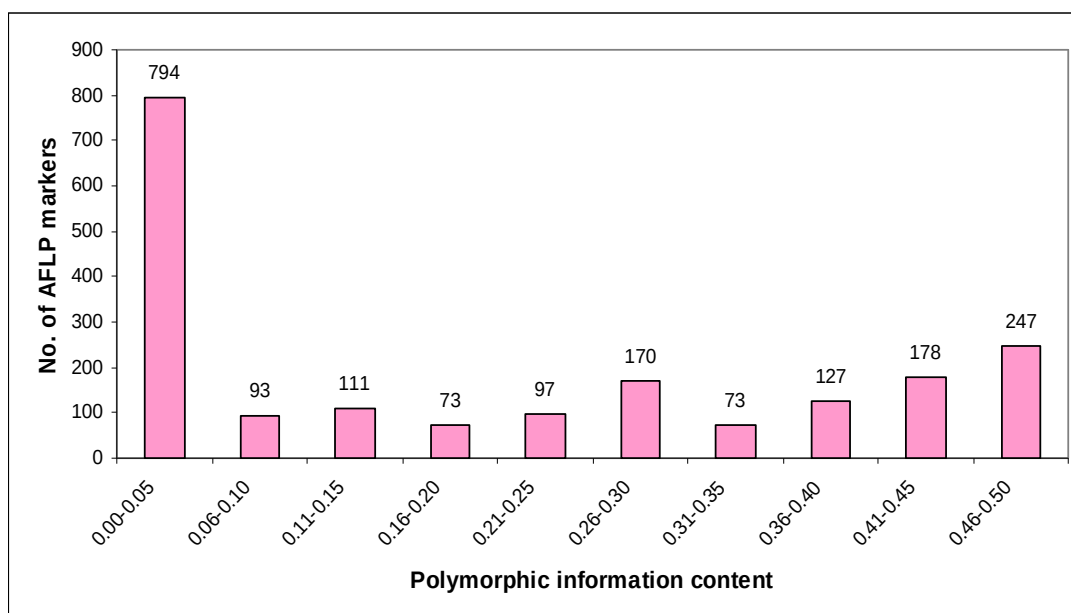
นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ จากรายงานของ Hongtrakul *et al.* (1997) ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์สูงกว่าไพรเมอร์ 2 คู่ที่รายงานไว้โดย Dong *et al.* (2007) (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ร้อยละของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่แสดงโพลิมอร์ฟิซึม (percentage of polymorphism) และจำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยต่อคู่ไพรเมอร์

ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอ			% Polymorphism
	ที่แตกต่าง	ที่เหมือนกัน	ทั้งหมด	
CAG-AAG	89	23	112	79.46
CAG-ACA	67	25	92	72.83
CAG-ACG	56	23	79	70.89
CAG-AGC	69	18	87	79.31
CAG-ATA	77	41	118	65.25
CGT-AAT	57	39	96	59.38
CGT-ACT	52	33	85	61.18
CGT-ACG	52	23	75	69.33
CGT-AGC	76	14	90	84.44
CGT-AGG	36	16	52	69.23
CGT-ATA	68	46	114	59.65
CGT-ATG	37	37	74	50.00
AAC-CAG	54	42	96	56.25
AAC-CTG	49	39	88	55.68
ACC-CAA	49	36	85	57.65
ACC-CAG	54	27	81	66.67
ACC-CTA	46	30	76	60.53
ACG-CAG	43	33	76	56.58
ACG-CTG	53	22	75	70.67
AGC-CAA	70	32	102	68.63
AGC-CAC	38	36	74	51.35
AGC-CAG	44	22	66	66.67
AGC-CTG	42	28	70	60.00
ผลรวม	1278	685	1963	1491.61
ค่าเฉลี่ย	55.57	29.78	85.35	64.85

2.2.3 Polymorphic Information Contents (PICs)

จากข้อมูลจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1,963 แถบ หรือ 1,963 เครื่องหมาย ของ ทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ เมื่อนำมาคำนวณค่า Polymorphic Information Contents (PICs) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงโอกาสที่จะพบตัวอย่างที่สุ่มมา 2 ตัวอย่าง ว่ามีความแตกต่างกันมากน้อยเพียงไร หรือบอกค่า heterozygosity สำหรับ dominant marker เช่น เครื่องหมายเอเอฟแอลพีจะมีค่า PICs ระหว่าง 0.00-0.50 และค่าเฉลี่ย PICs ของการทดลองนี้มีค่าเท่ากับ 0.293 แสดงว่าโอกาสที่จะพบตัวอย่างทานตะวันที่สุ่มมาแบบสุ่ม 2 ตัวอย่างมีความแตกต่างกัน หรือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับปานกลาง สอดคล้องกับผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์ โพลิมอร์ฟิซึมเฉลี่ยของแถบดีเอ็นเอที่กล่าวมาข้างต้น คือ มีเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึมเฉลี่ย 64.85 เปอร์เซ็นต์ และค่า PICs ของ dominant marker มีค่าสูงสุด เท่ากับ 0.50 ซึ่งหมายถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างที่ศึกษาทั้งหมดให้แถบดีเอ็นเอ และอีก 50 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างไม่พบแถบดีเอ็นเอในแต่ละตำแหน่ง ซึ่งจากการศึกษาพบจำนวนแถบดีเอ็นเอ 247 แถบ ที่ให้ค่า PICs ในช่วง 0.45-0.50 ซึ่งคิดเป็น 12.58 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแถบทั้งหมด และพบจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ให้ค่า PICs ในช่วง 0.00-0.05 ซึ่งเป็นส่วน monomorphism สูงถึง 794 แถบ คิดเป็น 40.44 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แผนภูมิการกระจายค่า Polymorphic Information Contents (PICs) จากจำนวนแถบดีเอ็นเอ 1,963 แถบในทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์

ค่า PICs ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Hongtrakul et al. (1997) และ Liu et al. (2003) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 24 และ 23 สายพันธุ์ ตามลำดับ ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี พบว่ามีค่า PICs เฉลี่ยเท่ากับ 0.14 และ 0.38 ตามลำดับ และค่า PICs ของ dominant marker จะมีค่าต่ำกว่า codominant marker เสมอ เนื่องจากค่า PICs ของ codominant marker มีค่าสูงสุด เท่ากับ 1.00 จึงทำให้มีค่า PICs เฉลี่ยสูงกว่า dominant marker (Berry et al., 1994; Norma et al., 2002; Yu et al., 2002)

2.2.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ ซึ่งได้จากการนำข้อมูลของขนาดและจำนวนจีนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี จากทั้งหมด 23 คู่ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1,963 แถบ โดยแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 1,278 แถบ และแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันจำนวน 685 แถบ เมื่อนำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ในช่วง 0.37-1.00 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.662 (ตารางที่ 11) เมื่อพิจารณาค่าดังกล่าวแล้วมีค่าสูง มีการกระจายตัวกว้าง แสดงให้เห็นว่า ข้อมูลจากเครื่องหมายเอเอฟแอลพีของทานตะวันที่ทำการศึกษามีความแตกต่างทางพันธุกรรม หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าข้อมูลของลักษณะทางสัณฐานวิทยา เมื่อนำข้อมูลที่ได้สร้าง dendrogram โดยวิธี UPGMA (Sokal and Michener, 1958) แสดงผลในรูปแบบของ phylogenetic tree สามารถแบ่งทานตะวันออกเป็น 2 กลุ่ม ตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ปรากฏ (ภาพที่ 5) และเมื่อพิจารณาพร้อมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา (ตารางที่ 12-15) ได้ผลดังนี้

กลุ่มที่ 1 (39 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์) เป็นทานตะวันกลุ่มใหญ่ที่มีขึ้นรักษาความเป็นมัน (B-Line) ที่มีลักษณะเด่นร่วมกัน คือ ลำต้นไม่มีการแตกกิ่งก้าน ซึ่งสามารถแบ่งย่อยได้เป็น 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 1.1 (20 สายพันธุ์) มีความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.45-1.00 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.714) เป็นทานตะวันชนิดน้ำมัน ที่มีลักษณะส่วนใหญ่ร่วมกัน คือ ต้นค่อนข้างสูง มีรูปร่างกลีบรองดอกแบบ convergent มีกลีบดอกแบบรูปไข่ มีรูปร่างใบเลี้ยงแบบค่อนข้างกลม มีรูปร่างใบแบบรูปหัวใจ แต่มีรูปร่างฐานใบแบบหูใบ ใบมีขนาดปานกลาง ขนาดจานดอกค่อนข้างใหญ่ เมล็ดมีรูปร่างแบบรูปไข่ยาวรี เมล็ดขนาดปานกลาง เมล็ดมีลายแถบดำ สลับเทาที่ขอบและตรงกลางของเปลือกหุ้มเมล็ด เมล็ดหนาปานกลาง และมีเปลือกหุ้มเมล็ดบาง มีน้ำหนัก 100 เมล็ดปานกลาง มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง แต่มีปริมาณ alpha-tocopherol ปานกลาง แต่

พันธุ์หัตตรา HA236 HA302 และ HA852 แยกออกมานอกกลุ่มเนื่องจากมีน้ำหนัก 100 เมล็ด เปรอร์เซ็นต์น้ำมันและปริมาณ alpha-tocopherol สูงกว่า และใกล้เคียงกับพันธุ์การค้าที่ใช้เป็นพันธุ์ ตรวจสอบ

กลุ่มย่อยที่ 1.2 มีความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.42-0.86 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.665) เป็นกลุ่มทานตะวันที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันและปริมาณ alpha-tocopherol ต่ำ ลำต้นสูง ปานกลาง ประกอบด้วย 19 สายพันธุ์ โดย 9 สายพันธุ์ (HA314 HA349 HA286 HA304 HA353 HA292 HA316 HA277 และ HA313) เป็นทานตะวันชนิดบริโกลเมล็ด มีเมล็ดใหญ่ มีน้ำหนัก 100 เมล็ดสูง มีเมล็ดและเปลือกหุ้มเมล็ดที่หนามาก เมล็ดมีสีดำและมีลายแถบเฉพาะตรงขอบของเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นสีขาว เมล็ดมีรูปร่างแบบรูปไข่กลมมน มีรูปร่างใบเลี้ยงแบบค่อนข้างกลม มีรูปร่างใบและรูปร่างฐานใบแบบรูปหัวใจ มีจำนวนใบต่อต้นปานกลาง และพบว่า HA314 HA313 HA286 HA 349 และ HA277 เป็นสายพันธุ์ที่มีขนาดใบและจานดอกปานกลาง แยกกลุ่มออกจาก HA 304 HA 316 HA 353 และ HA 292 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีขนาดใบและขนาดจานดอกใหญ่ และ 7 สายพันธุ์ (HA232 HA383 HA289 HA124 No.17 HA853 และ HA208) ที่เป็นทานตะวันชนิดน้ำมัน ที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่ำ มีเมล็ดขนาดปานกลาง มีน้ำหนัก 100 เมล็ดปานกลาง มีเมล็ดหนาปานกลาง แต่มีเปลือกหุ้มเมล็ดบาง เมล็ดมีสีดำ และมีลายแถบเฉพาะตรงขอบของเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นสีขาว เมล็ดมีรูปร่างแบบรูปไข่ยาวเรียว มีรูปร่างกลีบรองดอกแบบ convergent มีกลีบดอกแบบรูปไข่ มีรูปร่างใบเลี้ยงแบบค่อนข้างกลม มีรูปร่างใบ และรูปร่างฐานใบแบบรูปหัวใจ มีขนาดใบและขนาดจานดอกปานกลาง ส่วนสายพันธุ์ HA291 HA65 และ HA224 แยกออกมาอยู่นอกกลุ่มเนื่องจากมีการแตกกิ่งแบบที่มีดอกตรงกลางใหญ่ และมีดอกย่อยแตกออกมาที่โคนต้น ต้นเดี่ยว มีขนาดจานดอกปานกลาง มีใบเลี้ยงแบบกลม มีน้ำหนัก 100 เมล็ดปานกลาง และเมล็ดไม่มีลายแถบ

กลุ่มที่ 2 (20 สายพันธุ์) เป็นกลุ่มของทานตะวันที่มีอินก้าการเป็นหมัน (R-Line) และสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยที่ 2.1 (10 สายพันธุ์) มีความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.40-0.87 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.580) เป็นทานตะวันที่มีเมล็ดไม่มีลายแถบทั้งหมด ที่มีลักษณะส่วนใหญ่ร่วมกัน คือ เป็นทานตะวันชนิดน้ำมัน มีลักษณะต้นเดี่ยว มีการแตกกิ่งเกิดขึ้นทุกส่วนของลำต้น มีดอกตรงกลางขนาดใหญ่ ส่วนดอกย่อยมีขนาดเล็ก มีรูปร่างกลีบรองดอกแบบ convergent มีกลีบดอกแบบรูปไข่ยาวเรียว มีจำนวนกลีบดอกมาก มีรูปร่างใบเลี้ยงแบบค่อนข้างกลม มีรูปร่างใบ และรูปร่างฐานใบแบบรูปหัวใจ ใบมีขนาดค่อนข้างเล็ก มีจำนวนใบต่อต้นน้อย ขนาดจานดอกเล็ก เมล็ดมีรูปร่างแบบยาวเรียว เมล็ดมีสีดำ ขนาดเล็กบาง และมีเปลือกหุ้มเมล็ดบาง มีน้ำหนัก 100 เมล็ดต่ำ มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง แต่มีปริมาณ alpha-tocopherol ปานกลาง

กลุ่มย่อยที่ 2.2 (10 สายพันธุ์) มีความเหมือนทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.37-0.90 (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.635) เป็นทานตะวันที่มีเมล็ดมีลายแถบ และมีลักษณะส่วนใหญ่ร่วมกัน คือ เป็นทานตะวันชนิดบริโกเคมีล็ด ต้นมีลักษณะค่อนข้างเตี้ย มีการแตกกิ่งเกิดขึ้นทุกส่วนของลำต้น ดอกตรงกลางและดอกย่อยมีขนาดเท่ากัน มีรูปร่างกลีบรองดอกแบบกลม มีกลีบดอกแบบรูปไข่ มีจำนวนกลีบดอกปานกลาง มีรูปร่างใบเลี้ยงแบบกลม มีรูปร่างใบแบบรูปหัวใจ แต่มีรูปร่างฐานใบแบบหุบ ใบมีขนาดปานกลาง มีจำนวนใบต่อด้านปานกลาง มีจานดอกขนาดปานกลาง เมล็ดมีสีดำ และมีลายแถบที่ขอบและตรงกลางของเปลือกหุ้มเมล็ด เมล็ดมีรูปร่างแบบรูปกลมมน เมล็ดมีความหนาปานกลาง และมีเปลือกหุ้มเมล็ดบาง มีน้ำหนัก 100 เมล็ดค่อนข้างต่ำ มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่ำ และปริมาณ alpha-tocopherol ปานกลาง

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีพบว่า มีค่า cophenetic correlation (r) เท่ากับ 0.82 ซึ่งถือว่าเป็นการจัดกลุ่มที่ดี (Sirithunya *et al.* 2001) ส่วนผลการวิเคราะห์ค่า bootstrap ด้วยโปรแกรม Free tree (Pavlicek *et al.* 1999) พบว่าส่วนใหญ่มีค่า bootstrap สูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า การจัดกลุ่มแต่ละครั้งมีการจัดกลุ่มได้เหมือนเดิมสูงตามค่าเปอร์เซ็นต์ที่ปรากฏ จึงมีความน่าเชื่อถือของการจัดกลุ่มสูง ดังภาพที่ 5

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยคำนวณจากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน พบว่า ข้อมูลจากเครื่องหมายเอเอฟแอลพีของทานตะวันที่ทำการศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง ผลที่ได้แตกต่างจากผลการคำนวณจากค่าโพลิมอร์ฟิซึม และค่า PICs ที่พบว่า ข้อมูลจากเครื่องหมายเอเอฟแอลพีมีความหลากหลายทางพันธุกรรมปานกลาง เพราะค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเป็นการคำนวณหาความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ ซึ่งพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างทานตะวัน B-line กับ R-line มีค่าต่ำมาก เช่น สายพันธุ์ RHA276 กับ HA224 RHA278 กับ HA316 และ RHA278 กับ HA353 ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนเท่ากับ 0.37 0.38 และ 0.39 ตามลำดับ จึงทำให้มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง นอกจากนี้ยังพบว่าทานตะวัน B-line ชนิดน้ำมัน เป็นสายพันธุ์ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมกว้างกว่าชนิดบริโกเคมีล็ด และทานตะวัน R-line ชนิดน้ำมัน และชนิดบริโกเคมีล็ด ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Cheres *et al.* (1999) ส่วนค่าโพลิมอร์ฟิซึม และค่า PICs เป็นการคำนวณจากข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด จึงเป็นการหาความแตกต่างภายในประชากร ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ได้จึงอยู่ในระดับปานกลาง

ตารางที่ 11 ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) ที่ได้จากการเปรียบเทียบกับค่าความเหมือนของแถบดีเอ็นเอทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์

	RHA265	HA314	RHA270	RHA360	HA291	RHA364	HA383	PK-101	HA234	No.14	RHA278	HA289	RHA276	HA303	HA65
RHA265	1.000														
HA314	0.525	1.000													
RHA270	0.686	0.692	1.000												
RHA360	0.686	0.534	0.726	1.000											
HA291	0.562	0.638	0.649	0.675	1.000										
RHA364	0.769	0.548	0.721	0.684	0.607	1.000									
HA383	0.531	0.754	0.696	0.568	0.665	0.613	1.000								
PK-101	0.612	0.701	0.682	0.521	0.647	0.662	0.732	1.000							
HA234	0.686	0.661	0.647	0.553	0.649	0.637	0.691	0.795	1.000						
No.14	0.695	0.614	0.652	0.601	0.743	0.720	0.648	0.799	0.752	1.000					
RHA278	0.774	0.419	0.624	0.743	0.573	0.699	0.444	0.575	0.654	0.690	1.000				
HA289	0.542	0.739	0.725	0.560	0.688	0.575	0.796	0.753	0.718	0.701	0.501	1.000			
RHA276	0.532	0.526	0.671	0.663	0.489	0.519	0.551	0.512	0.514	0.458	0.559	0.600	1.000		
HA303	0.608	0.701	0.691	0.528	0.667	0.651	0.734	0.804	0.788	0.761	0.560	0.769	0.514	1.000	
HA65	0.501	0.702	0.673	0.550	0.772	0.528	0.715	0.706	0.705	0.672	0.531	0.772	0.565	0.767	1.000
RHA388	0.778	0.434	0.605	0.740	0.542	0.697	0.466	0.548	0.624	0.630	0.846	0.459	0.559	0.588	0.524
HA341	0.591	0.704	0.687	0.521	0.643	0.643	0.728	0.798	0.755	0.740	0.547	0.742	0.508	0.839	0.716

ตารางที่ 11 (ต่อ)

	RHA265	HA314	RHA270	RHA360	HA291	RHA364	HA383	PK-101	HA234	No.14	RHA278	HA289	RHA276	HA303	HA65
No.17	0.500	0.672	0.672	0.507	0.611	0.534	0.719	0.704	0.637	0.640	0.428	0.721	0.501	0.697	0.685
HA302	0.526	0.631	0.598	0.488	0.678	0.580	0.642	0.713	0.711	0.663	0.517	0.650	0.454	0.774	0.763
RHA293	0.545	0.551	0.734	0.616	0.594	0.589	0.598	0.552	0.525	0.491	0.533	0.587	0.613	0.579	0.671
HA232	0.457	0.685	0.648	0.463	0.594	0.508	0.755	0.654	0.656	0.571	0.394	0.734	0.477	0.689	0.672
RHA348	0.664	0.409	0.586	0.652	0.529	0.708	0.464	0.504	0.508	0.599	0.703	0.452	0.485	0.533	0.478
RHA331	0.557	0.552	0.718	0.686	0.542	0.586	0.581	0.560	0.527	0.508	0.590	0.579	0.625	0.560	0.612
HA349	0.517	0.797	0.665	0.507	0.633	0.560	0.756	0.683	0.676	0.631	0.431	0.770	0.498	0.713	0.712
HA313	0.484	0.704	0.601	0.547	0.682	0.484	0.687	0.595	0.657	0.553	0.480	0.689	0.541	0.650	0.743
No.4	0.562	0.648	0.656	0.491	0.602	0.634	0.677	0.775	0.743	0.732	0.536	0.717	0.489	0.789	0.665
HA286	0.502	0.776	0.699	0.528	0.668	0.555	0.747	0.680	0.689	0.640	0.461	0.790	0.505	0.749	0.718
RHA366	0.630	0.590	0.768	0.659	0.532	0.624	0.619	0.598	0.619	0.539	0.561	0.636	0.655	0.628	0.612
HA343	0.570	0.682	0.662	0.490	0.615	0.624	0.709	0.779	0.748	0.713	0.516	0.711	0.463	0.814	0.693
HA382	0.539	0.639	0.622	0.448	0.583	0.599	0.679	0.748	0.713	0.676	0.514	0.672	0.394	0.778	0.644
HA851	0.567	0.693	0.646	0.484	0.617	0.622	0.706	0.763	0.744	0.692	0.501	0.692	0.447	0.815	0.671
RHA332	0.585	0.497	0.651	0.605	0.475	0.619	0.486	0.601	0.561	0.537	0.652	0.501	0.570	0.593	0.542
HA124	0.467	0.702	0.679	0.511	0.663	0.529	0.763	0.682	0.669	0.614	0.418	0.806	0.530	0.719	0.724
RHA297	0.649	0.483	0.667	0.807	0.610	0.646	0.509	0.477	0.519	0.564	0.708	0.524	0.627	0.500	0.547
HA304	0.538	0.743	0.652	0.549	0.638	0.523	0.709	0.650	0.708	0.625	0.472	0.731	0.545	0.700	0.705

ตารางที่ 11 (ต่อ)

	RHA265	HA314	RHA270	RHA360	HA291	RHA364	HA383	PK-101	HA234	No.14	RHA278	HA289	RHA276	HA303	HA65
RHA269	0.668	0.512	0.662	0.786	0.617	0.650	0.521	0.505	0.526	0.572	0.697	0.540	0.618	0.505	0.560
HA853	0.536	0.680	0.719	0.562	0.662	0.590	0.716	0.704	0.673	0.661	0.488	0.753	0.540	0.715	0.698
No.13	0.720	0.571	0.574	0.580	0.656	0.674	0.601	0.699	0.762	0.757	0.664	0.614	0.448	0.703	0.588
HA300	0.614	0.692	0.576	0.483	0.579	0.546	0.617	0.695	0.794	0.651	0.559	0.651	0.489	0.729	0.630
HA353	0.439	0.755	0.640	0.481	0.616	0.481	0.705	0.657	0.633	0.593	0.391	0.723	0.506	0.697	0.678
Hantra	0.534	0.601	0.609	0.446	0.566	0.575	0.634	0.732	0.689	0.676	0.485	0.649	0.423	0.734	0.618
RHA386	0.740	0.412	0.595	0.714	0.538	0.693	0.448	0.544	0.622	0.603	0.809	0.464	0.531	0.548	0.478
No.12	0.572	0.645	0.647	0.470	0.592	0.632	0.687	0.794	0.739	0.726	0.524	0.709	0.471	0.783	0.663
HA277	0.483	0.723	0.686	0.497	0.648	0.552	0.750	0.705	0.672	0.624	0.441	0.767	0.510	0.733	0.720
RHA299	0.675	0.459	0.602	0.678	0.552	0.713	0.470	0.572	0.531	0.626	0.729	0.469	0.512	0.580	0.508
HA208	0.481	0.636	0.612	0.594	0.642	0.474	0.665	0.607	0.670	0.570	0.524	0.684	0.562	0.670	0.710
HA852	0.584	0.519	0.543	0.492	0.591	0.535	0.556	0.645	0.722	0.605	0.600	0.556	0.490	0.677	0.656
HA99	0.537	0.633	0.617	0.444	0.595	0.589	0.703	0.751	0.730	0.706	0.489	0.730	0.451	0.809	0.670
RHA327	0.527	0.538	0.710	0.605	0.554	0.561	0.587	0.539	0.535	0.516	0.533	0.606	0.714	0.562	0.624
HA292	0.471	0.747	0.644	0.482	0.632	0.501	0.742	0.655	0.653	0.622	0.400	0.758	0.493	0.713	0.702
RHA325	0.547	0.569	0.737	0.632	0.565	0.579	0.584	0.559	0.543	0.529	0.540	0.602	0.694	0.584	0.630
HA236	0.540	0.642	0.598	0.440	0.579	0.570	0.667	0.739	0.715	0.677	0.467	0.702	0.442	0.772	0.649
RHA294	0.541	0.557	0.722	0.684	0.551	0.573	0.576	0.559	0.539	0.511	0.591	0.605	0.648	0.573	0.624

ตารางที่ 11 (ต่อ)

	RHA265	HA314	RHA270	RHA360	HA291	RHA364	HA383	PK-101	HA234	No.14	RHA278	HA289	RHA276	HA303	HA65
HA316	0.442	0.740	0.633	0.463	0.611	0.477	0.691	0.649	0.634	0.597	0.381	0.720	0.447	0.693	0.683
RHA333	0.571	0.462	0.643	0.542	0.466	0.612	0.506	0.599	0.596	0.552	0.580	0.543	0.656	0.621	0.552
HA224	0.556	0.524	0.491	0.506	0.722	0.596	0.547	0.623	0.619	0.701	0.556	0.570	0.368	0.675	0.671
Hybrid I	0.523	0.604	0.592	0.439	0.548	0.563	0.617	0.708	0.681	0.670	0.462	0.649	0.437	0.728	0.621
Hybrid II	0.597	0.573	0.561	0.467	0.519	0.534	0.584	0.672	0.745	0.636	0.539	0.615	0.468	0.691	0.589
Hybrid III	0.523	0.604	0.592	0.439	0.548	0.563	0.617	0.708	0.681	0.670	0.462	0.649	0.437	0.728	0.621

ตารางที่ 11 (ต่อ)

	RHA388	HA341	No.17	HA302	RHA293	HA232	RHA348	RHA331	HA349	HA313	No.4	HA286	RHA366	HA343	HA382
RHA388	1.000														
HA341	0.563	1.000													
No.17	0.457	0.699	1.000												
HA302	0.550	0.751	0.713	1.000											
RHA293	0.586	0.572	0.642	0.664	1.000										
HA232	0.435	0.698	0.735	0.648	0.625	1.000									
RHA348	0.740	0.539	0.456	0.558	0.604	0.489	1.000								
RHA331	0.629	0.557	0.613	0.569	0.739	0.565	0.677	1.000							
HA349	0.437	0.719	0.731	0.670	0.599	0.733	0.466	0.650	1.000						
HA313	0.494	0.644	0.659	0.709	0.669	0.654	0.446	0.623	0.806	1.000					
No.4	0.536	0.804	0.734	0.726	0.590	0.699	0.553	0.599	0.748	0.698	1.000				
HA286	0.460	0.743	0.743	0.680	0.628	0.748	0.473	0.635	0.864	0.808	0.795	1.000			
RHA366	0.589	0.632	0.685	0.561	0.730	0.636	0.556	0.698	0.652	0.644	0.655	0.707	1.000		
HA343	0.529	0.931	0.696	0.755	0.582	0.712	0.560	0.558	0.721	0.641	0.819	0.756	0.651	1.000	
HA382	0.514	0.813	0.674	0.712	0.545	0.697	0.502	0.526	0.696	0.625	0.794	0.745	0.596	0.857	1.000
HA851	0.523	0.825	0.690	0.748	0.571	0.694	0.541	0.566	0.720	0.640	0.798	0.740	0.621	0.858	0.824
RHA332	0.655	0.631	0.503	0.602	0.645	0.464	0.694	0.730	0.509	0.525	0.633	0.540	0.617	0.650	0.583
HA124	0.426	0.740	0.726	0.644	0.584	0.772	0.462	0.587	0.756	0.674	0.720	0.774	0.648	0.769	0.721

ตารางที่ 11 (ต่อ)

	RHA388	HA341	No.17	HA302	RHA293	HA232	RHA348	RHA331	HA349	HA313	No.4	HA286	RHA366	HA343	HA382
RHA297	0.730	0.549	0.540	0.508	0.640	0.516	0.726	0.719	0.543	0.590	0.534	0.562	0.687	0.567	0.486
HA304	0.480	0.721	0.710	0.653	0.588	0.701	0.461	0.604	0.822	0.791	0.704	0.823	0.701	0.736	0.666
RHA269	0.727	0.559	0.540	0.538	0.646	0.506	0.712	0.715	0.560	0.590	0.526	0.574	0.708	0.558	0.486
HA853	0.484	0.735	0.798	0.738	0.640	0.695	0.491	0.649	0.747	0.675	0.741	0.765	0.692	0.743	0.716
No.13	0.669	0.723	0.615	0.667	0.508	0.582	0.586	0.489	0.628	0.612	0.736	0.656	0.608	0.730	0.700
HA300	0.556	0.738	0.615	0.699	0.487	0.617	0.482	0.513	0.716	0.698	0.736	0.744	0.598	0.751	0.714
HA353	0.405	0.710	0.726	0.636	0.589	0.722	0.413	0.569	0.800	0.713	0.695	0.812	0.656	0.729	0.676
Hantra	0.480	0.745	0.713	0.757	0.535	0.621	0.506	0.548	0.663	0.600	0.767	0.688	0.590	0.770	0.733
RHA386	0.809	0.575	0.456	0.576	0.576	0.423	0.743	0.645	0.482	0.539	0.575	0.515	0.614	0.588	0.557
No.12	0.516	0.790	0.708	0.749	0.566	0.684	0.554	0.581	0.707	0.656	0.832	0.744	0.621	0.818	0.808
HA277	0.442	0.742	0.712	0.687	0.608	0.767	0.452	0.616	0.775	0.720	0.733	0.800	0.654	0.764	0.754
RHA299	0.738	0.582	0.462	0.606	0.608	0.434	0.782	0.680	0.490	0.492	0.581	0.506	0.581	0.595	0.552
HA208	0.533	0.660	0.650	0.683	0.604	0.645	0.507	0.684	0.693	0.746	0.663	0.723	0.644	0.683	0.650
HA852	0.603	0.670	0.625	0.796	0.602	0.547	0.515	0.533	0.570	0.688	0.680	0.599	0.585	0.688	0.642
HA99	0.495	0.806	0.667	0.752	0.534	0.707	0.540	0.549	0.703	0.652	0.799	0.730	0.596	0.828	0.794
RHA327	0.535	0.571	0.585	0.590	0.695	0.587	0.609	0.722	0.596	0.587	0.589	0.620	0.700	0.579	0.529
HA292	0.418	0.706	0.719	0.664	0.573	0.747	0.452	0.574	0.803	0.739	0.695	0.817	0.646	0.723	0.679
RHA325	0.567	0.579	0.619	0.612	0.734	0.592	0.599	0.752	0.628	0.616	0.608	0.636	0.723	0.592	0.545

ตารางที่ 11 (ต่อ)

	RHA388	HA341	No.17	HA302	RHA293	HA232	RHA348	RHA331	HA349	HA313	No.4	HA286	RHA366	HA343	HA382
HA236	0.477	0.764	0.725	0.796	0.530	0.670	0.503	0.566	0.705	0.642	0.777	0.713	0.574	0.783	0.749
RHA294	0.603	0.564	0.590	0.593	0.712	0.570	0.643	0.825	0.618	0.621	0.607	0.631	0.698	0.580	0.529
HA316	0.402	0.698	0.730	0.639	0.578	0.717	0.413	0.583	0.797	0.743	0.707	0.829	0.639	0.719	0.671
RHA333	0.596	0.613	0.530	0.637	0.650	0.521	0.656	0.679	0.527	0.535	0.649	0.548	0.631	0.630	0.578
HA224	0.580	0.680	0.565	0.746	0.561	0.577	0.602	0.506	0.587	0.657	0.695	0.619	0.478	0.705	0.654
Hybrid I	0.479	0.732	0.708	0.754	0.521	0.620	0.496	0.535	0.662	0.605	0.764	0.676	0.570	0.750	0.694
Hybrid II	0.556	0.695	0.671	0.717	0.493	0.586	0.469	0.506	0.628	0.625	0.724	0.642	0.593	0.710	0.656
Hybrid III	0.479	0.732	0.708	0.754	0.521	0.620	0.496	0.535	0.662	0.605	0.764	0.676	0.570	0.750	0.694

ตารางที่ 11 (ต่อ)

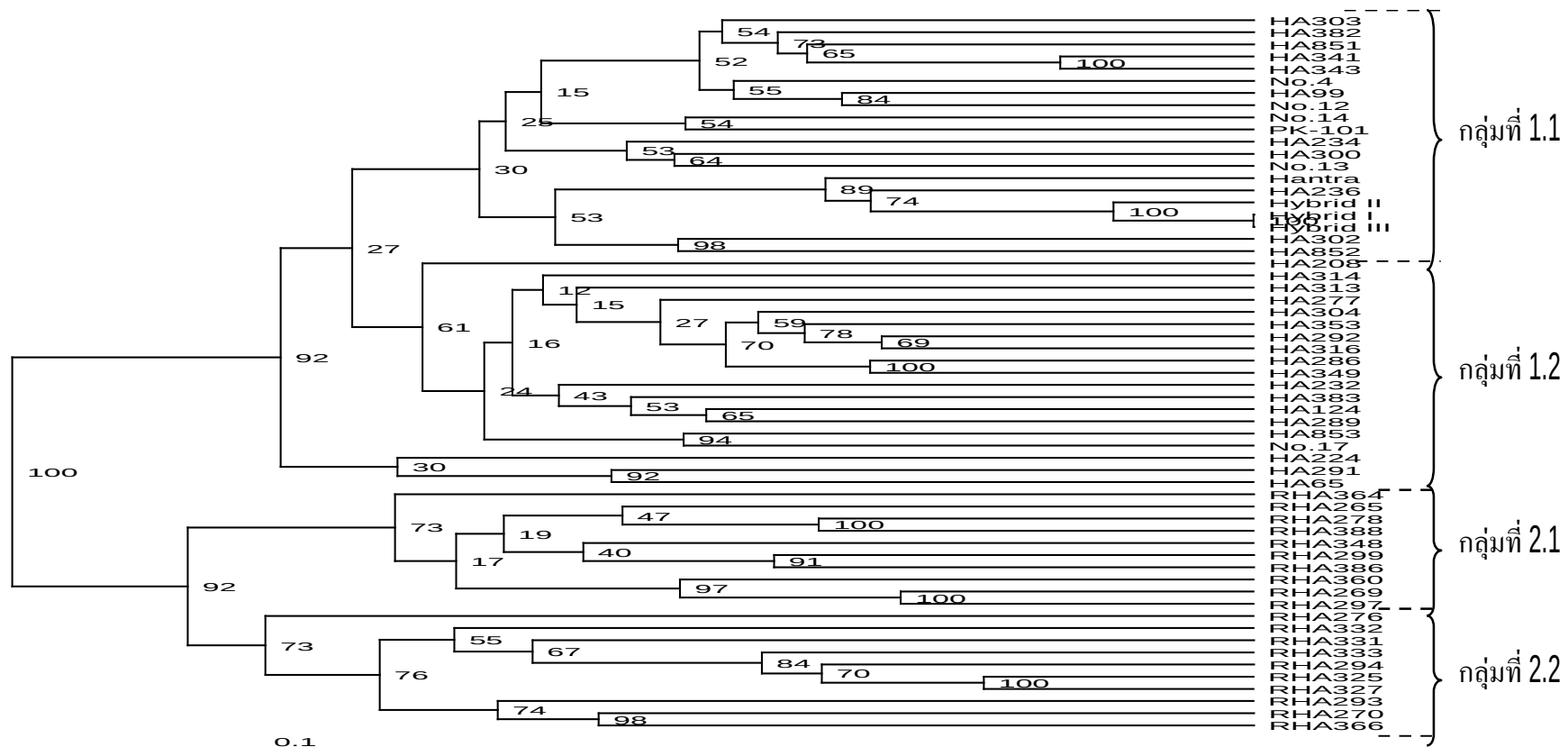
	HA851	RHA332	HA124	RHA297	HA304	RHA269	HA853	No.13	HA300	HA353	Hantra	RHA386	No.12	HA277	RHA299
HA851	1.000														
RHA332	0.660	1.000													
HA124	0.757	0.549	1.000												
RHA297	0.549	0.682	0.597	1.000											
HA304	0.733	0.542	0.784	0.634	1.000										
RHA269	0.532	0.690	0.559	0.875	0.652	1.000									
HA853	0.744	0.583	0.777	0.623	0.763	0.715	1.000								
No.13	0.728	0.544	0.640	0.632	0.683	0.660	0.707	1.000							
HA300	0.772	0.567	0.672	0.536	0.770	0.532	0.698	0.795	1.000						
HA353	0.744	0.542	0.791	0.543	0.832	0.550	0.746	0.621	0.717	1.000					
Hantra	0.766	0.612	0.680	0.494	0.685	0.526	0.786	0.711	0.714	0.679	1.000				
RHA386	0.573	0.722	0.475	0.787	0.540	0.792	0.564	0.747	0.619	0.468	0.613	1.000			
No.12	0.811	0.652	0.730	0.531	0.708	0.548	0.754	0.755	0.756	0.707	0.824	0.657	1.000		
HA277	0.759	0.566	0.797	0.557	0.764	0.580	0.779	0.653	0.683	0.792	0.719	0.553	0.828	1.000	
RHA299	0.587	0.768	0.479	0.743	0.492	0.757	0.555	0.643	0.542	0.488	0.593	0.830	0.667	0.605	1.000
HA208	0.687	0.601	0.717	0.666	0.772	0.673	0.713	0.650	0.696	0.702	0.659	0.635	0.731	0.781	0.628
HA852	0.659	0.590	0.597	0.551	0.645	0.542	0.710	0.712	0.729	0.582	0.735	0.670	0.727	0.644	0.615
HA99	0.800	0.604	0.751	0.501	0.712	0.507	0.735	0.710	0.750	0.705	0.775	0.587	0.854	0.785	0.615

ตารางที่ 11 (ต่อ)

	HA851	RHA332	HA124	RHA297	HA304	RHA269	HA853	No.13	HA300	HA353	Hantra	RHA386	No.12	HA277	RHA299
RHA327	0.568	0.672	0.626	0.675	0.618	0.680	0.668	0.529	0.549	0.588	0.562	0.601	0.626	0.639	0.640
HA292	0.723	0.515	0.797	0.539	0.819	0.552	0.759	0.635	0.748	0.821	0.678	0.482	0.729	0.788	0.503
RHA325	0.587	0.676	0.614	0.689	0.631	0.695	0.685	0.543	0.562	0.616	0.577	0.624	0.628	0.660	0.659
HA236	0.776	0.597	0.702	0.494	0.698	0.500	0.784	0.711	0.751	0.688	0.827	0.581	0.830	0.771	0.611
RHA294	0.576	0.761	0.615	0.749	0.627	0.742	0.689	0.542	0.558	0.596	0.589	0.692	0.642	0.675	0.735
HA316	0.712	0.524	0.759	0.540	0.821	0.530	0.747	0.623	0.728	0.860	0.669	0.485	0.744	0.819	0.503
RHA333	0.625	0.745	0.558	0.609	0.551	0.605	0.611	0.572	0.588	0.535	0.631	0.683	0.688	0.585	0.708
HA224	0.688	0.565	0.604	0.587	0.602	0.571	0.615	0.732	0.636	0.593	0.657	0.662	0.728	0.661	0.685
Hybrid I	0.747	0.602	0.668	0.499	0.670	0.500	0.760	0.695	0.706	0.656	0.869	0.567	0.796	0.716	0.584
Hybrid II	0.707	0.568	0.631	0.525	0.686	0.525	0.723	0.759	0.770	0.620	0.827	0.638	0.754	0.676	0.553
Hybrid III	0.747	0.602	0.668	0.499	0.670	0.500	0.760	0.695	0.706	0.656	0.869	0.567	0.796	0.716	0.584

ตารางที่ 11 (ต่อ)

	HA208	HA852	HA99	RHA327	HA292	RHA325	HA236	RHA294	HA316	RHA333	HA224	Hybrid I	Hybrid II	Hybrid III
HA208	1.000													
HA852	0.713	1.000												
HA99	0.713	0.752	1.000											
RHA327	0.646	0.586	0.669	1.000										
HA292	0.722	0.615	0.777	0.705	1.000									
RHA325	0.660	0.600	0.626	0.904	0.700	1.000								
HA236	0.698	0.757	0.846	0.609	0.764	0.654	1.000							
RHA294	0.729	0.601	0.627	0.831	0.678	0.863	0.674	1.000						
HA316	0.731	0.609	0.754	0.643	0.868	0.681	0.778	0.694	1.000					
RHA333	0.582	0.645	0.702	0.825	0.609	0.853	0.712	0.799	0.623	1.000				
HA224	0.644	0.713	0.744	0.551	0.640	0.594	0.758	0.606	0.691	0.680	1.000			
Hybrid I	0.644	0.729	0.783	0.596	0.704	0.630	0.880	0.649	0.738	0.694	0.725	1.000		
Hybrid II	0.663	0.793	0.740	0.564	0.667	0.597	0.833	0.614	0.698	0.656	0.685	0.950	1.000	
Hybrid III	0.644	0.729	0.783	0.596	0.704	0.630	0.880	0.649	0.738	0.694	0.725	1.000	0.950	1.000



ภาพที่ 5 dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ที่จัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลเครื่องหมายเอฟแอลพี และวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) โดยใช้ Dice (1945) coefficient

ตารางที่ 12 สรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ 11 ลักษณะที่นำมาพิจารณาร่วมกับข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพี เพื่อแบ่งกลุ่มทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ (กลุ่มที่ 1.1)

List no.	Varieties	Type of branching	Plant height (cm)	Head size	Seed			Seedstripe color	Pericarp thickness	100 Seed weight (g)	% Oil	Tocopherol (mg/g)
					length (cm)	color	thickness					
1	HA303	no branching	131.6	medium	0.8	black	thin	grey	thin	4.41	39.57	N/A
2	HA382	no branching	78.2	small	1.0	black	medium	grey	thin	3.97	40.18	39.33
3	HA851	no branching	114.4	medium	0.7	black	medium	grey	thin	4.02	39.88	42.67
4	HA341	no branching	73.2	small	0.8	black	medium	grey	thin	2.35	36.36	28.79
5	HA343	no branching	90.4	medium	1.2	black	medium	grey	thin	4.12	37.61	41.29
6	No.4	no branching	99.4	medium	1.0	black	medium	grey	thin	4.22	37.15	5.08
7	HA99	no branching	83.6	medium	1.1	black	medium	grey	medium	3.00	35.89	33.67
8	No.12	no branching	109.4	medium	1.2	black	medium	brown	thin	4.87	44.83	42.33
9	No.14	no branching	140.8	medium	1.0	black	medium	no	thin	6.13	42.93	35.48
10	PK-101	no branching	132.2	medium	1.1	black	medium	grey	thin	6.48	42.23	47.88
11	HA234	no branching	126.4	medium	0.9	black	thin	grey	extremely thin	4.49	36.33	52.00
12	HA300	no branching	112.0	large	1.0	black	thick	grey	thin	6.09	42.75	61.25
13	No.13	no branching	110.4	medium	1.1	black	thin	no	extremely thin	5.60	36.07	66.45
14	Hantra	no branching	158.0	large	1.0	black	medium	grey	thin	6.60	45.35	40.63
15	HA236	no branching	159.8	medium	1.2	black	medium	grey	thin	6.00	44.17	N/A
16	Hybrid I	no branching	159.4	large	1.2	black	medium	grey	thin	5.14	44.09	53.87

ตารางที่ 12 (ต่อ)

List no.	Varieties	Type of branching	Plant height (cm)	Head size	Seed		Seedstripe color	Pericarp thickness	100 Seed weight (g)	% Oil	Tocophero (mg/g)	
					length (cm)	color						thickness
17	Hybrid II	no branching	163.4	large	1.3	black	medium	grey	thin	5.86	43.57	29.33
18	Hybrid III	no branching	174.6	extremely large	1.1	black	medium	grey	thin	6.25	43.11	40.00
19	HA302	basal branching	128.0	medium	1.3	black	medium	grey	thin	8.08	40.43	42.00
20	HA852	basal branching	127.8	medium	1.0	black	medium	grey	medium	5.54	43.27	50.30

หมายเหตุ N/A หมายถึง ข้อมูลสูญหาย

ตารางที่ 13 สรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ 11 ลักษณะที่นำมาพิจารณาร่วมกับข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพี เพื่อแบ่งกลุ่มทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ (กลุ่มที่ 1.2)

List no.	Varieties	Type of branching	Plant height (cm)	Head size	Seed			Seedstripe color	Pericarp thickness	100 Seed weight (g)	% Oil	Tocopherol (mg/g)
					length (cm)	color	thickness					
1	HA208	fully brached with central head	108.8	medium	1.0	black	thin	grey	thin	3.18	26.16	50.33
2	HA314	no branching	76.8	medium	1.6	black	thick	white	thick	9.88	13.86	N/A
3	HA313	basal branching	76.4	medium	1.5	black	thick	white	thick	9.79	14.54	52.12
4	HA277	no branching	108	medium	1.3	black	medium	grey	thin	7.80	33.70	33.03
5	HA304	no branching	95.4	large	0.8	black	thick	white	thin	8.34	20.56	64.67
6	HA353	no branching	117.4	large	1.2	black	thick	grey	medium	6.26	23.09	N/A
7	HA292	no branching	138.2	large	1.6	black	thick	brown	thick	10.77	23.94	29.69
8	HA316	no branching	91.8	large	0.9	black	thick	white	thick	8.73	27.19	27.27
9	HA286	no branching	97.2	medium	1.8	black	thick	white	thick	11.37	26.14	43.33
10	HA349	no branching	101.8	medium	1.0	black	medium	brown	thick	6.17	24.96	25.15
11	HA232	no branching	90.8	medium	1.1	black	medium	grey	thin	4.28	33.68	31.21
12	HA383	no branching	121.6	medium	1.0	black	thin	grey	thin	3.58	30.93	22.90
13	HA124	no branching	108.8	small	1.1	black	medium	grey	thin	5.45	33.37	48.39
14	HA289	no branching	101.8	medium	1.2	black	medium	grey	thin	6.55	32.14	42.00
15	HA853	no branching	140.2	medium	1.2	black	medium	grey	thin	8.59	32.49	N/A
16	No.17	no branching	120.4	large	1.1 cm	black	medium	grey	thin	5.52	34.47	N/A

ตารางที่ 13 (ต่อ)

List no.	Varieties	Type of branching	Plant height (cm.)	Head size	Seed length (cm)	Seed color	Seed thickness	Seedstripe color	Pericarp thickness	100 Seed weight (g)	% Oil	Tocopherol (mg/g)
17	HA224	basal branching	97.4	medium	0.6 cm	black	medium	no	thin	5.41	42.81	N/A
18	HA291	basal branching	53.6	medium	0.8 cm	brown	medium	no	thin	3.22	29.02	46.06
19	HA65	basal branching	70.8	small	1.0 cm	black	medium	grey	thin	3.68	26.82	N/A

หมายเหตุ N/A หมายถึง ข้อมูลสูญหาย

ตารางที่ 14 สรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ 11 ลักษณะที่นำมาพิจารณาร่วมกับข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพี เพื่อแบ่งกลุ่มทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ (กลุ่มที่ 2.1)

List no.	Varieties	Type of branching	Plant height (cm)	Head size	Seed		Seedstripe color	Pericarp thickness	100 Seed weight (g)	% Oil	Tocophero (mg/g)	
					length (cm)	color						thickness
1	RHA364	no branching	91.6	medium	1.3	black	medium	no	thin	6.45	40.15	45.76
2	RHA265	no branching	60.6	small	1.0	black	thin	no	extremely thin	2.42	35.07	73.54
3	RHA278	fully brached with central head	96.8	medium	0.8	brown	medium	no	thin	3.60	47.35	117.33
4	RHA388	fully brached with central head	94	small	0.8	black	thin	no	extremely thin	2.45	38.47	54.67
5	RHA348	fully brached with central head	96.6	small	0.8	black	thin	no	extremely thin	3.01	36.17	47.88
6	RHA299	fully brached with central head	106.6	medium	0.8	black	thin	no	extremely thin	2.97	39.10	48.00
7	RHA386	fully brached with central head	83.2	small	1.1	brown	medium	no	thin	2.88	40.73	52.58
8	RHA360	fully brached with central head	49.6	small	0.9	black	thin	no	extremely thin	2.23	34.44	52.33
9	RHA269	fully brached with central head	102.4	medium	1.1	brown	thin	no	extremely thin	2.90	29.98	52.73
10	RHA297	fully brached with central head	108	small	1.0	black	thin	no	extremely thin	1.71	31.85	59.41

หมายเหตุ N/A หมายถึง ข้อมูลสูญหาย

ตารางที่ 15 สรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญ 11 ลักษณะที่นำมาพิจารณาร่วมกับข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพี เพื่อแบ่งกลุ่มทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ (กลุ่มที่ 2.2)

List no.	Varieties	Type of branching	Plant height (cm.)	Head size	Seed		Seedstripe color	Pericarp thickness	100 Seed weight (g)	% Oil	Tocopherol (mg/g)
					length (cm)	thickness					
1	RHA276	fully brached without central head	89.8	medium	0.8	black medium	grey	extremely thin	3.50	34.96	58.33
2	RHA332	fully brached with central head	94.6	small	1.2	black medium	white	thin	3.67	43.00	38.33
3	RHA331	fully brached with central head	85.4	small	1.1	black medium	brown	thin	3.97	33.28	31.61
4	RHA333	fully brached without central head	100.8	small	0.9	black thin	white	thin	3.55	41.45	45.67
5	RHA294	fully brached with central head	100.2	medium	0.8	black medium	white	thin	3.96	29.47	49.00
6	RHA325	fully brached without central head	78.4	medium	0.9	black medium	brown	thin	4.95	26.33	40.94
7	RHA327	fully brached without central head	114.6	small	1.0	black medium	brown	thin	5.11	27.46	37.42
8	RHA293	basal branching	85.2	small	1.1	black medium	brown	thin	7.37	24.20	38.00
9	RHA270	no branching	74	small	1.0	black medium	grey	thin	3.29	32.44	43.94
10	RHA366	no branching	37.8	large	1.0	black medium	grey	thin	5.02	29.53	53.33

หมายเหตุ N/A หมายถึง ข้อมูลสูญหาย

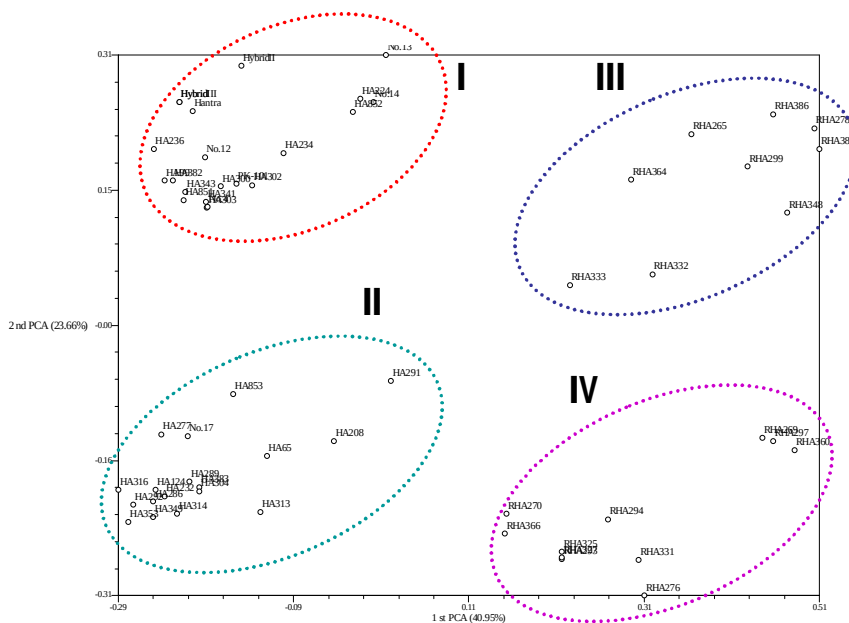
2.2.5 Principal Coordinate Analysis (PCoA)

จากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (similarity coefficient) ของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ เมื่อนำมาวิเคราะห์แสดงการกระจายตัวของข้อมูลโดยวิธี Principal coordinate analysis (PCoA) เพื่อเปรียบเทียบกับผลการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA พบว่า มีค่า PC1 2 และ 3 มีความแปรปรวนเท่ากับ 40.95 23.66 และ 17.21 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนทั้งหมด ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำมาสร้างแผนภาพการกระจายตัวของทานตะวันโดยใช้ PC1 และ PC2 (ความแปรปรวน 64.51 เปอร์เซ็นต์) พบว่า สามารถจัดกลุ่มการกระจายตัวได้ 4 กลุ่ม (ภาพที่ 6) ดังนี้ กลุ่มที่ 1 (21 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์) เป็นกลุ่มทานตะวันที่มียีนรักษาความเป็นมัน (B-line) ลำต้นไม่มีการแตกกิ่งก้าน ต้นค่อนข้างสูง มีรูปร่างกลีบรองดอกแบบ convergent มีกลีบดอกแบบรูปไข่ มีรูปร่างใบเลี้ยงแบบค่อนข้างกลม มีรูปร่างใบแบบรูปหัวใจ แต่มีรูปร่างฐานใบแบบรูปไข่ มีขนาดใบปานกลาง มีขนาดจานดอกค่อนข้างใหญ่ เมล็ดมีรูปร่างแบบรูปไข่ยาวเรียว เมล็ดขนาดปานกลาง เมล็ดมีลายแถบดำสลับเทาที่ขอบและตรงกลางของเปลือกหุ้ม เมล็ด มีน้ำหนัก 100 เมล็ดปานกลาง มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง และมีปริมาณ alpha-tocopherol ต่ำ ยกเว้นพันธุ์พันธุ์การค้า HA236 และ HA852 มีเปอร์เซ็นต์น้ำมัน และปริมาณ alpha-tocopherol สูงกว่า และใกล้เคียงกับพันธุ์การค้าที่ใช้เป็นพันธุ์ตรวจสอบ

กลุ่มที่ 2 (18 สายพันธุ์) เป็นกลุ่มทานตะวันที่มียีนรักษาความเป็นมัน (B-line) ลำต้นไม่มีการแตกกิ่งก้าน เป็นกลุ่มทานตะวันที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันและปริมาณ alpha-tocopherol ต่ำ ลำต้นสูงปานกลาง โดยที่ 8 สายพันธุ์ คือ HA316 HA292 HA286 HA353 HA349 HA304 HA314 และ HA313 เป็นทานตะวันชนิดบริโภคมะลิ มีเมล็ดใหญ่ มีน้ำหนัก 100 เมล็ดสูง มีเมล็ด และเปลือกหุ้มเมล็ดที่หนามาก เมล็ดมีสีดำและมีลายแถบเฉพาะตรงขอบของเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นสีขาว เมล็ดมีรูปร่างแบบรูปไข่กลมมน มีรูปร่างใบเลี้ยงแบบค่อนข้างกลม มีรูปร่างใบเป็นแบบรูปหัวใจ แต่มีรูปร่างฐานใบแบบรูปไข่ มีจำนวนใบต่อต้นปานกลาง และพบว่า HA314 HA313 HA286 และ HA349 เป็นสายพันธุ์ที่มีขนาดใบและขนาดจานดอกปานกลาง จึงแยกกลุ่มออกจาก HA304 HA316 HA353 และ HA292 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีขนาดใบและขนาดจานดอกใหญ่ และ 10 สายพันธุ์ คือ HA291 HA208 HA65 No.17 HA277 HA289 HA383 HA232 HA124 และ HA853 เป็นทานตะวันชนิดน้ำมันที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่ำ แต่มีปริมาณ alpha-tocopherol ปานกลาง มีเมล็ดขนาดปานกลาง มีน้ำหนัก 100 เมล็ดปานกลาง เมล็ดหนาปานกลางแต่มีเปลือกหุ้มเมล็ดบาง เมล็ดมีสีดำและมีลายแถบเฉพาะตรงขอบของเปลือกหุ้มเมล็ดเป็นสีเทา เมล็ดมีรูปร่างแบบรูปไข่ยาวเรียว มี

รูปร่างกลีบรองดอกแบบ convergent มีกลีบดอกแบบรูปไข่ มีรูปร่างใบเลี้ยงแบบค่อนข้างกลม มีรูปร่างใบ และรูปร่างฐานใบแบบรูปหัวใจ มีขนาดใบและขนาดจานดอกปานกลาง

กลุ่มที่ 3 (9 สายพันธุ์) เป็นกลุ่มของทานตะวันที่มีอินเทอร์เป็นหมัน (R-line) เมล็ดมีสีดำไม่มีลายแถบ เมล็ดมีรูปร่างแบบยาวเรียว เมล็ดมีขนาดเล็กบาง และมีเปลือกหุ้มเมล็ดบาง มีน้ำหนัก 100 เมล็ดต่ำ มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง มีปริมาณ alpha-tocopherol ปานกลาง ต้นมีลักษณะค่อนข้างเตี้ย มีการแตกกิ่งเกิดขึ้นทุกส่วนของลำต้น มีดอกตรงกลางขนาดใหญ่ ส่วนดอกย่อยมีขนาดเล็ก มีรูปร่างกลีบรองดอกแบบ convergent มีกลีบดอกแบบรูปไข่ยาวเรียว มีจำนวนกลีบดอกมาก มีรูปร่างใบเลี้ยงแบบค่อนข้างกลม มีรูปร่างใบแบบรูปหัวใจ แต่มีรูปร่างฐานใบแบบหุบใบ ใบมีขนาดปานกลาง มีจำนวนใบต่อต้นปานกลาง และมีขนาดจานดอกเล็ก



ภาพที่ 6 แผนภาพการกระจายตัวของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Principal coordinate analysis จากค่า PC1 และ PC2

กลุ่มที่ 4 (11 สายพันธุ์) เป็นกลุ่มของทานตะวันที่มีอินเทอร์เป็นหมัน (R-line) เมล็ดมีสีดำและมีลายแถบ เมล็ดมีรูปร่างแบบรูปไข่ยาวเรียว มีความหนาปานกลาง และมีเปลือกหุ้มเมล็ดบาง มีน้ำหนัก 100 เมล็ดปานกลาง มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่ำ ปริมาณ alpha-tocopherol ต่ำ มีลักษณะต้นเตี้ย มีการแตกกิ่งเกิดขึ้นทุกส่วนของลำต้น มีดอกตรงกลางขนาดใหญ่ ส่วนดอกย่อยมี

ขนาดเล็ก มีรูปร่างกลีบรองดอกแบบกลม มีกลีบดอกแบบรูปไข่ มีจำนวนกลีบดอกปานกลาง มีรูปร่างใบเลี้ยงแบบกลม มีรูปร่างใบ และรูปร่างฐานใบแบบรูปหัวใจ ใบมีขนาดปานกลาง และมีจานดอกขนาดค่อนข้างเล็ก

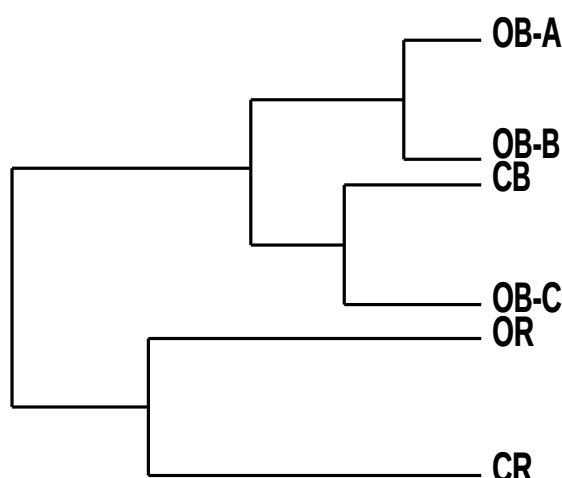
การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์โดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของข้อมูลด้วยวิธี Principal coordinate analysis (PCoA) พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของทานตะวันที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันได้ชัดเจน และมีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น สามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์ HA291 HA65 และ HA224 ที่แยกออกมาอยู่นอกกลุ่มของ B-line สายพันธุ์อื่นในการวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA ได้

และผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยวิธี PCoA ให้ผลสอดคล้องกับการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA โดยแบ่งกลุ่มทานตะวันออกเป็น R-line และ B-line ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีความสำคัญสำหรับใช้ในการจัด heterotic group เพื่อสร้างเมล็ดพันธุ์ลูกผสมในโครงการปรับปรุงทานตะวัน ผลการทดลองที่ได้คล้ายคลึงกับการทดลองของ Hongtrakul *et al.* (1997); Norma *et al.* (2002); Popov *et al.* (2002) และ Yue *et al.* (2009) ที่แบ่งกลุ่มของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 24 12 30 และ 177 สายพันธุ์ ตามลำดับ ออกเป็นกลุ่ม R-line และ B-line ได้ชัดเจนเช่นเดียวกัน รวมถึงการจัดกลุ่มข้อมูลเปอร์เซ็นต์น้ำมัน และปริมาณ alpha-tocopherol ได้ชัดเจนขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณที่ศึกษาอื่น ๆ เช่น อายุการออกดอก อายุสุกแก่ เป็นต้น ไม่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันที่ศึกษาได้เนื่องจากข้อมูลมีความใกล้เคียงกันมาก และมีการกระจายของข้อมูลอย่างต่อเนื่องจึงไม่สามารถจัดกลุ่มได้อย่างชัดเจน ทำนองเดียวกับรายงานของ Sujatha *et al.* (2002) และ Dong *et al.* (2007) ซึ่งพบว่าอายุออกดอก และระยะเวลาการเจริญเติบโตไม่สามารถใช้จัดกลุ่มทานตะวันสายพันธุ์แท้ได้

ในการการจัดกลุ่มสายพันธุ์ทานตะวันกลุ่ม R-line และกลุ่ม B-line ด้วยวิธี PCoA ให้ผลสอดคล้องกับวิธี UPGMA เช่น ในสายพันธุ์ HA349 HA313 และ HA353 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเนื่องจากเป็นทานตะวันชนิดบริโภคมะลิที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันต่ำ และพัฒนามาจากสายพันธุ์พ่อหรือแม่เดียวกัน คือ HA292 หรือสายพันธุ์ HA341 HA343 และ HA382 ซึ่งเป็นทานตะวันชนิดน้ำมันที่มีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูง และถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เนื่องจากสายพันธุ์เหล่านี้พัฒนามาจากสายพันธุ์ HA89 เหมือนกัน และสายพันธุ์ RHA297 RHA348 RHA360 RHA366 และ RHA388 ซึ่งเป็นทานตะวันชนิดน้ำมันที่มีอินกับการเป็นหมัน (R-line) ที่พัฒนามาจากสายพันธุ์ RHA274 ที่มีควมดีเด่นในการให้น้ำมันเหมือนกัน จึงถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน (GRIN, 2009) ผลการทดลองที่

ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Hongtrakul *et al.* (1997) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ ทานตะวันชนิดน้ำมัน 24 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายเอเอฟแอลพี แล้วพบว่าสายพันธุ์ HA124 HA234 HA852 จัดอยู่ในกลุ่ม B-line ส่วนสายพันธุ์ RHA265 RHA294 จัดอยู่ในกลุ่ม R-line และจัด กลุ่มของ B-line กับ R-line แยกออกจากกันคนละกลุ่ม และ Norma *et al.* (2002) ที่จัดจำแนกกลุ่ม ทานตะวันพันธุ์ดีเด่น 16 สายพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ และพบว่า สายพันธุ์ HA303 HA292 และ RHA293 ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ทานตะวันชนิด บริโภคเมล็ดเช่นเดียวกัน โดย HA292 กับ RHA293 ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง นอกจากนี้ยัง มีการศึกษาของ Sujatha *et al.* (2002) ที่ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันสาย พันธุ์แท้ 51 สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างของแหล่งกำเนิด โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ สามารถจัดกลุ่มทานตะวันได้ 8 กลุ่ม โดยมีสายพันธุ์ RHA278 และ RHA348 จัดกลุ่มได้สอดคล้อง กับการจัดกลุ่มในการทดลองนี้

การจัดกลุ่มสายพันธุ์ทานตะวันที่ได้จากข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพีโดยวิธี UPGMA และ PCoA สามารถแบ่งทานตะวันออกเป็น 2 กลุ่ม คือ B-line และ R-line ที่แต่ละกลุ่มสามารถแบ่ง ออกเป็น 2 กลุ่มย่อยโดยแบ่งตามเปอร์เซ็นต์น้ำมัน เป็นทานตะวันชนิดน้ำมัน และชนิดบริโภคเมล็ด คือ ทานตะวัน B-line ชนิดบริโภคเมล็ด (CB) ชนิดน้ำมัน (OB-A, B, C) และทานตะวัน R-line ชนิด บริโภคเมล็ด (CR) ชนิดน้ำมัน (OR) ดังภาพที่ 7 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Cheres and Knapp (1998) ที่ศึกษาเกี่ยวกับแหล่งกำเนิดของบรรพบุรุษกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของ ทานตะวันสายพันธุ์แท้จากแหล่งต่าง ๆ 156 สายพันธุ์ โดยการวิเคราะห์ coancestry สามารถ แบ่งกลุ่มทานตะวันออกเป็นทานตะวันชนิดบริโภคเมล็ด และชนิดน้ำมันที่มีความหลากหลายของ แหล่งพันธุกรรมที่แคบ การจัดกลุ่มทานตะวันจึงมีจำนวนกลุ่มน้อย เช่น ในทานตะวันที่มียีนรักษา ความเป็นหมัน (B-line) ชนิดน้ำมัน แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 4 กลุ่มย่อย ส่วนทานตะวันที่มียีนแก้การ เป็นหมัน (R-line) ชนิดน้ำมัน แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่มย่อย และไม่สามารถแบ่งแยกกลุ่ม ทานตะวันชนิด R-line ได้ชัดเจนเหมือนกับชนิด B-line เนื่องจากมีลักษณะ heterogeneous และผล การทดลองของ Yue *et al.* (2009) ที่ใช้เครื่องหมายทีอาร์เอฟพีในศึกษาความหลากหลายและ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 177 สายพันธุ์ที่พัฒนาจาก USDA-ARS โดยใช้ 12 คู่ไพรเมอร์ สามารถแบ่งกลุ่มทานตะวันออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ทานตะวันชนิดน้ำมัน และ ชนิดบริโภคเมล็ด และแต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็นกลุ่ม fertility maintainer (OB, OR) และ fertility restorer (CB, CR) ที่แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 4, 3, 2 และ 2 กลุ่มย่อย ตามลำดับ



ภาพที่ 7 แผนภาพสรุปแสดงความสัมพันธ์ของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์ลูกผสมทางการค้าที่ศึกษาโดยใช้ข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพี

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเครื่องหมายเอเอฟแอลพี พบว่า สายพันธุ์ทานตะวันที่นำมาศึกษาเป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาก เนื่องจากพื้นฐานแล้วทานตะวันที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ (Tang and Knapp, 2003; Liu and Burke, 2006) พ่อแม่พันธุ์ที่นำมาปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันส่วนใหญ่มีประวัติของพันธุ์ (pedigree) ที่มีบรรพบุรุษร่วมกัน (GRIN, 2009) โดยข้อมูลดังกล่าวได้ถูกรวบรวมไว้ในวารสาร Crop Science หรือใน Germplasm Resources Information Network (GRIN)

การจัดกลุ่มสายพันธุ์ทานตะวัน โดยใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเครื่องหมายเอเอฟแอลพีให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกันในกลุ่มทานตะวันชนิดไม่มีลายแถบ (R-line ชนิดน้ำมัน; RHA265 RHA360 RHA348 RHA269 RHA386 RHA364 RHA299 RHA278 RHA297 RHA388) กลุ่มทานตะวัน B-line ชนิดบริโภคมะลิ (HA314 HA313 HA286 HA349 HA304 HA316 HA353 HA292) และกลุ่มทานตะวันที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ เหมือนกับพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ (HA236 HA852 HA853 HA302 หันตรา) ที่แยกออกมาจากกลุ่มอื่น ๆ ชัดเจน การจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่สามารถแบ่งกลุ่มทานตะวันมีลายแถบชนิดน้ำมัน (กลุ่มที่ 2.2) ซึ่งมีกลุ่มใหญ่เป็นกลุ่มย่อยได้ แต่การจัดกลุ่มโดยใช้ข้อมูลเครื่องหมายเอเอฟแอลพีสามารถจัดจำแนกกลุ่มที่ 2.2 ออกเป็นกลุ่มย่อย คือ ทานตะวัน B-line ชนิดน้ำมัน และ R-line ชนิดบริโภคมะลิได้ เพราะข้อมูลจากเครื่องหมายเอเอฟแอลพีเป็นการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ใน

โมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ การตรวจหาความแตกต่างหรือโพลิมอร์ฟิซึมของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ จึงทำให้พบความแตกต่างโดยละเอียดของสายพันธุ์พืช จึงสามารถแยกความแตกต่างของพืชที่มีลักษณะภายนอก (phenotype) เหมือนกันมากได้ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจึงนิยมนำมาใช้ศึกษาประกอบกับข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชเพื่อให้ได้ข้อมูลสายพันธุ์พืชที่ถูกต้องและสมบูรณ์มากขึ้น

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมายเอเอฟแอลพี สามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในด้านต่าง ๆ เช่น การคัดเลือกหาสายพันธุ์พ่อแม่สำหรับสร้างประชากรในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า มีเพียง 26 ลักษณะ ที่สามารถนำมาจัดกลุ่ม และแยกความแตกต่างของทานตะวันสายพันธุ์แท้ได้ชัดเจน เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความต่างอยู่ช่วงระหว่าง 0.00-0.44 ซึ่งสามารถจัดจำแนกทานตะวันสายพันธุ์แท้ ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มของทานตะวันที่มีเมล็ดไม่มีลายแถบ และกลุ่มของทานตะวันที่มีเมล็ดมีลายแถบ ซึ่งประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือ ทานตะวันชนิดน้ำมัน และชนิดบริโภคมะลิ
2. การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวันสายพันธุ์แท้ สามารถใช้จัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงคุณภาพได้ดีกว่าการจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณ
3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี พบว่า มีไพรเมอร์ 23 คู่ไพรเมอร์ จากจำนวน 59 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทานตะวัน ที่นำมาศึกษาได้ มีเปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึมเท่ากับ 64.85 เปอร์เซ็นต์ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมปานกลางถึงสูง และเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ช่วงระหว่าง 0.37-1.00 และจัดจำแนกสายพันธุ์ของทานตะวันสายพันธุ์แท้ได้อย่างชัดเจน ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ ทานตะวันกลุ่ม Restorer (R) line และกลุ่ม Maintainer (B) line ซึ่งประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย คือ ทานตะวันชนิดน้ำมัน และชนิดบริโภคมะลิ โดยมีค่า PICs เฉลี่ยเท่ากับ 0.293
4. จากการวิเคราะห์ PCoA สามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์ทานตะวันตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณได้ชัดเจนมากขึ้น โดยมีค่า PC1 เท่ากับ 40.95 เปอร์เซ็นต์ PC2 เท่ากับ 23.66 เปอร์เซ็นต์ และ PC3 เท่ากับ 17.21 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนทั้งหมด และสามารถจัดกลุ่มการกระจายตัวได้ 4 กลุ่ม เช่นเดียวกับการจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA
5. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทำให้สามารถศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมทานตะวันสายพันธุ์แท้

ได้ชัดเจน และละเอียดมากขึ้น โดยจัดกลุ่มทานตะวันตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณได้ชัดเจน เช่น น้ำหนัก 100 เมล็ด เปอร์เซ็นต์น้ำมัน ลักษณะ Restorer (R) line และ Maintainer (B) line ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญสำหรับนำไปใช้ปรับปรุงพันธุ์ สร้างสายพันธุ์ใหม่ และการจัด heterotic group เพื่อสร้างเมล็ดพันธุ์ลูกผสม หรือการสร้างประชากรใหม่ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. เพื่อให้ได้ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้นควรเพิ่มด้วยการศึกษาด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจง เช่น เครื่องหมายเอสเอสอาร์ เอสเอสซีพี อีเอสที หรือเครื่องหมายโปรตีนที่มากขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มความละเอียดของข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวัน และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ได้ดียิ่งขึ้นเช่น การทำแผนที่ยีน การวิเคราะห์ QTL และการคัดเลือกโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (MAS)

2. ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของทานตะวัน ควรมีการรวบรวมสายพันธุ์ทานตะวันจากแหล่งต่าง ๆ เพิ่มขึ้น เพื่อเพิ่มข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมสำหรับโครงการปรับปรุงพันธุ์ทานตะวันในอนาคต

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2537. การปลูกทานตะวัน. เอกสารคำแนะนำที่ 128. ฝ่ายเอกสาร
คำแนะนำ กองเกษตรสัมพันธ์ กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์,
กรุงเทพฯ.
- กัลยา วานิชย์บัญชา. 2550. การวิเคราะห์ข้อมูลหลายตัวแปร. คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- _____. 2544. การวิเคราะห์ข้อมูลสำหรับตัวแปรหลายตัวด้วย SPSS for Windows.
คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา. 2542. พืชเศรษฐกิจ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- จินตนา อิงคินันท์. 2549. เอกสารประกอบคำสอนวิชาการวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- ประเวศ วะสี. 2537. ความหลากหลายทางชีวภาพกับการพัฒนาอย่างยั่งยืน. สถาบันชุมชน
ท้องถิ่นพัฒนา, กรุงเทพฯ.
- ประเสริฐ นิตรวชิระวงษ์. 2537. การวิเคราะห์ข้อมูลจากการเปรียบเทียบพันธุ์ในหลายท้องที่.
เอกสารประกอบการอภิปรายเรื่อง การวิเคราะห์ข้อมูลจากการเปรียบเทียบพันธุ์ใน
หลายท้องที่, 2 พฤษภาคม 2537. ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง, ระยอง.
- วิสุทธิ ใบไม้. 2538. สถานภาพความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย. สำนักงานกองทุน
สนับสนุนการวิจัย (สกว.), กรุงเทพฯ.
- _____. 2532. ความหลากหลายทางชีวภาพ, น.1-13 ใน รายงานสัมมนาชีววิทยาของ
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ครั้งที่ 7 “ความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย”. บริษัท
ประชาชน จำกัด, กรุงเทพฯ.

ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่. 2540. การบันทึกข้อมูลทานตะวัน, น.147-163 ใน **คู่มือการบันทึกข้อมูลพืชไร่**. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สมชัย จันทะสว่ง และ พิระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2546. **พันธุศาสตร์ประชากร**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมวงษ์ ตระกูลรุ่ง. 2540. Molecular marker technology, น. 122 - 129. ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ **National Training Course on “Crop Improvement by Using Mutation Technique and Biotechnology” 10-14 พฤศจิกายน 2540**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักเศรษฐกิจการเกษตร. 2552ก. ทานตะวัน: เนื้อที่เก็บเกี่ยว ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ของประเทศไทยผู้ผลิตที่สำคัญ ปี 2551. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 51. แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th/statistic/yearbook51>, 20 สิงหาคม 2552.

_____. 2552ข. ทานตะวัน: ปริมาณและมูลค่าการนำเข้ารายเดือน ปี 2546-2552. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 52. แหล่งที่มา: <http://www.oae.go.th/statistic/yearbook51>, 20 สิงหาคม 2552.

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

สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 5 (2): 37-58.

อภิชาติ วรรณวิจิตร. มปป. การวางตำแหน่งยีน genome mapping. ใน **คู่มือการสอน วิชา 003579 ชีวโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์พืช**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- Abdalla, A.M., O.U.K. Reddy, K.M. El-Zik and A.E. Pepper. 2001. Genetic diversity and relationships of diploid and tetraploid cottons revealed using AFLP. **Theor. Appl. Genet.** 102: 222-229.
- Aggarwal, R.K., D.S. Brar, S. Nandi, N. Huang and G.S. Khush. 1999. Phylogenetic relationship among *Oryza* species revealed by AFLP markers. **Theor. Appl. Genet.** 98: 1320-1328.
- Ali, G.M., S. Yasumoto and M.S. Katsuta. 2007. Assessment of genetic diversity in sesame (*Sesamum indicum* L.) detected by amplified fragment length polymorphism markers. **Electronic J. Biotech.** 10(1): 12-23.
- Anonymous. 2003. **Fundamental concepts in genetics**. Available Source: <http://www.smd.qmul.ac.uk/statgen/dcurtis/lectures/introgen.html>, May 20, 2009.
- Berry, S.T., A.J. Leon, C.C. Hanfrey, P. Challis, A. Burkholz, S.J. Barnes, G.K. Rufener, M. Lee and P.D.S. Caligari. 1995. Molecular-marker analysis of *Helianthus annuus* L. II. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. **Theor. Appl. Genet.** 91: 195-199.
- _____, R.J. Allen, S.R. Barnes and P.D.S. Caligari. 1994. Molecular marker analysis of *Helianthus annuus* L. I. Restriction fragment length polymorphism between inbred lines of cultivated sunflower. **Theor. Appl. Genet.** 89: 435-441.
- Brown, S.M., A. K. Szewc-McFadden and S. Kresovich. 1996. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis, pp. 147-159. In P.P. Jauhar, eds. **Methods of Plant Genome Analysis: Their Merits and Pitfalls**. CRS Press, Boca Raton, FL.
- Capochichi, L.J.A., D.B. Weaver and C.M. Morton. 2001. AFLP assessment of genetic variability among velvet bean (*Mucuna* sp.) accessions. **Theor. Appl. Genet.** 103: 1180-1188.

- Cheres, M.T., J.F. Miller and S.J. Knapp. 1999. Donor inbred lines for enhancing the performance of single-cross sunflower hybrids. **Crop Sci.** 39: 1325-1331.
- _____ and S.J. Knapp. 1998. Ancestral origins and genetic diversity of cultivated sunflower: Coancestry analysis of public germplasm. **Crop Sci.** 38: 1476-1482.
- Corradini, P., C. Edelin, A. Bruneau and A. Bouchard. 2002. Architectural and genotypic variation in the clonal shrub *Taxus canadensis* as determined from random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism. **Canadian J. Bot.** 80: 205-219.
- Coulibaly, S., R.S. Pasquet, R. Papa and P. Gepts. 2002. AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. **Theor. Appl. Genet.** 104:358-366.
- De la Puente, R., A.I. Gonzalez, M.L. Ruiz and C. Polanco. 2008. Somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) analyzed using polymorphic and sequenced AFLP markers. **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant** 44 (5): 419-426.
- Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. **Plant Mol. Biol. Rept.** 1: 19-21.
- Dehemer, K.J. and W. Friedt. 1998. Evaluation of different microsatellite motifs for analyzing genetic relationships in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Plant Breed** 1: 39-42.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology** 26(3): 297-302.

- Dong, G.J., G.S. Liu and K. F. Li. 2007. Studying genetic diversity in the core germplasm of confectionary sunflower (*Helianthus annuus L.*) in China based on AFLP and morphological analysis. **Russian J. of Genet.** 43(6): 627-635.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus** 12: 13-15.
- Engelborghs, I., S. Campenhout and R. Swennen. 1998. The potential of AFLP to detect genetic differences and somaclonal variants in *Musa* spp.. **Infomusa** 7(2): 3-6.
- Everitt, B.S. and G. Dunn. 2001. **Applied multivariate data analysis**. Edward Arnold, Sevenoaks, England.
- FAO. 2007. **ProdSTAT**. Available Source: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>, September 20, 2009.
- Garcia, A.A.F., L.L. Benchimol, A.M.M. Barbosa, I.O. Geraldi, C.L. Souza Jr. and A.P. de Souza. 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. **Genet. and Mol. Biol.** 27(4): 579-588.
- Gedil, M.A., C. Wye, S. Berry, B. Segers, J. Peleman, R. Jones, A. Leon, M.B. Slabaugh and S.J. Knapp. 2001. An integrated restriction fragment length polymorphism - amplified fragment length polymorphism linkage map for cultivated sunflower. **Genome** 44: 213-221.
- Gentzbittel, L., E. Mestries, S. Mouzeyar, F. Mazeyrat, S. Badaoui, F. Vear, D. de Labrouhe Tourvieille and P. Nicolas. 1999. A composite map of expressed sequences and phenotypic traits of the sunflower (*Helianthus annuus L.*) genome. **Theor. Appl. Genet.** 99: 218-234.
- _____, F. Vear, Y.X. Zhang, A. Berville and P. Nicolas. 1995. Development of a consensus linkage RFLP map for cultivated sunflower. **Theor. Appl. Genet.** 90: 1079-1086.

- _____, Y.X. Zhang, F. Vear and B. Griveau. 1994. RFLP studies of genetic relationships among inbred lines of the cultivated sunflower, *Helianthus annuus* L.: evidence for distinct restorer and maintainer germ plasm pools. **Theor. Appl. Genet.** 89: 419-425.
- Goftman, F.D., L. Velasco and W. Thies. 1999. Quantitative determination of tocopherols in single seeds of rapeseed (*Brassica napus* L.). **Fett/lipid** 101(4): 142-145.
- GRIN. 2009. **Sunflower**. National Genetic Resources Program., Available Source: <http://www.ars-grin.gov>., June 30, 2009.
- Hongtrakul, V., G.M. Huestis and S. Knapp. 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. **Theor. Appl. Genet.** 95: 400-407.
- Hu, J. and B.A. Vick. 2003. Target region amplification polymorphism : a novel marker technique for plant genotyping. **Plant Mol. Biol. Rept.** 21: 289-294.
- IBPGR. 1985. **Sunflower Descriptors**. Crop genetic resources centre plant production and protection division food and agriculture organization. Rome, Italy.
- Iqbal, M.A., H.A. Sadaqat and I.A. Khan. 2008. Estimation of genetic diversity among sunflower genotypes through random amplified polymorphic DNA analysis. **Genet. and Mol. Res.** 7(4): 1408-1413.
- Jan, C.C., B.A. Vick, J.K. Miller, A.L. Kahler and E.T.I. Butler. 1998. Construction of a RFLP linkage map for cultivated sunflower. **Theor. Appl. Genet.** 96: 15-22.
- Keim, P., J.M. Schupp, S.E. Travis, K. Clayton, T. Zhu, L. Shi, A. Ferreira and D.M. Webb. 1997. A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. **Crop Sci.** 37: 537-543.

- Kochert, G. 1994. RFLP technology, pp. 8-38. *In* R.L. Phillips and Vasil, I.K. eds. **DNA-based Markers in Plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Kokotovic, B., N.F. Friis, J.S. Jensen and P. Ahrens. 1999. Amplified fragment length polymorphism fingerprint of *Mycoplasma* species. **J. Clin. Microbiol.** 37: 3300-3307.
- Kosman, E. and K.J. Leonard. 2005. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid and polyploid species. **Mol. Ecol.** 14: 415-424.
- Lance, G.N. and W.T., Williams. 1967. A general theory of classificatory sorting strategies. I. hierarchical systems. **Comput. J.** 9: 373-380.
- Larson, S.R., B.L. Waldron, S.B. Monsen, L.St. John, A.J. Palazzo, C.L. McCracken and R. D. Harrison. 2001. AFLP variation in agamosperous and dioecious bluegrasses of Western North America. **Crop Sci.** 41:1300-1305.
- Lawson, W.R., R.J. Henry, J.K. Kochman and G.A. Kong. 1994. Genetic diversity in sunflower (*Helianthus Annuus*) as revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. **Aust. J. Agric. Res.** 45: 1319-1327.
- Lee, T. Van der, I. De Witte, A. Deenth, C. Alfonso and F. Govers. 1997. AFLP linkage map of omycete *phytophthora infestans*. **Fungi Genet. Biol.** 21: 278-291.
- Lerma, A.S., R.G. Cantrell, J.M. Conway and I.M. Ray. 2003. AFLP-based assessment of genetic diversity among nine alfalfa germplasms using bulk DNA templates. **Genome** 46: 51-58.

- Le Thierry d'Ennequin M., O. Panau and B. Toupance. 2000. Assessment of genetic relationships between *Setaria italica* and its wild relative *S. viridis* using AFLP markers. **Theor. Appl. Genet.** 100: 1061-1066.
- Li, G. and C.F. Quiros. 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*. **Theor. Appl. Genet.** 103: 455-461.
- Lima, M.L.A., A.A.F. Garcia, K.M. Oliveira, S. Matsuoka, H. Arizono, C.L. de Souza Jr. and A.P. de Souza. 2002. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). **Theor. Appl. Genet.** 104: 30-38.
- Liscum, E. and W.R. Briggs. 1995. Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. **Plant cell** 7: 473-485.
- Liu, A. and J.M. Burke. 2006. Patterns of nucleotide diversity in wild and cultivated sunflower. **Genetics** 173: 321-330.
- Liu J., G.S. Liu and C.C. Jan. 2003. Comparison of genetic diversity of the germplasm resources of confectionary sunflower (*Helianthus Annuus*) in China based on RAPDs and AFLPs. **Acta Bot. Sin.** 45(3): 352-358.
- L?bberstedt, T., A. E. Melchinger, C. Du?le, M. Vuylsteke and M. Kuiper. 2000. Relationships among early European maize inbreds: IV. genetic diversity revealed with AFLP markers and comparison with RFLP, RAPD and pedigree data. **Crop Sci.** 40:783-791.
- Maras, M., J?. Vozlic, B. Javornik and V. Meglic. 2008. The efficiency of AFLP and SSR markers in genetic diversity estimation and gene pool classification of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Acta agricult. Solovenica** 91(1): 87-96.

- McCouch, S. and S.D. Tanksley. 1991. Development and use of restriction fragment length polymorphisms in rice breeding and genetic, pp. 109- 133. *In* G.S. Khush and G.H. Toenniessen, eds. **Rice Biotechnology**. CAB International, Wallingford, Oxon.
- Menz, M.A., R.R. Klein, N.C. Unruh, W.L. Rooney, P.E. Klein and J.E. Mullet. 2004. Genetic diversity of public inbreds of sorghum determined by mapped AFLP and SSR markers. **Crop Sci.** 44: 1236-1244.
- Nei, M. and W.H. Li. 1979. Mathematical mode for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 76: 5269-5237.
- Norma P., M. Echaide, M. Mu?oz, L. Fern?ndez, S. Torales, P. Faccio, I. Fuxan, M. Carrera, R. Zandomeni, E.Y. Su?rez and H.E. Hopp. 2002. Microsatellite isolation and characterization in sunflower *Helianthus annuus* L.). **Genome** 45: 34-43.
- Ott, J. 1991. **Analysis of Human Genetic Linkage**. John Hopkins University Press. Baltimor, Maryland.
- Pavlicek, A., S. Hrda and J. Flegr. 1999. FreeTree: Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. **Folia Biologica (Praha)** 45: 97-99.
- Pillay, M. and G. O. Myers. 1999. Genetic diversity in cotton assessed by variation in ribosomal RNA genes and AFLP markers. **Crop Sci.** 39: 1881–1886.
- Pizarro, G.G., Carrera, A.D. and M. Poverene. 2000. Comparative analysis of genetic relationships in sunflower inbred lines based on isozymic, RAPD and pedigree data. **15th Int. Sunflower Conf.** Toulouse.

- Polanco, C. and M. L. Ruiz. 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. **Plant Sci.** 162: 817-824.
- Powell, W., C. Machray and J. Provan. 1996a. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends in Plant Sci.** 1: 215-222.
- _____, M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996b. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Mol. Breed.** 2: 225-238.
- Popov, V.N., O.Yu. Urbanovich and V.V. Kirichenko. 2002. Studying genetic diversity in inbred sunflower lines by RAPD and isozyme analyses. **Russian J. of Genet.** 38(7): 785-790.
- Prashanth, S.R., M. Parani, B.P. Mohanty, V. Talame, R. Tuberosa and A. Parida. 2002. Genetic diversity in cultivars and landraces of *Oryza sativa* subsp. indica as revealed by AFLP markers. **Genome** 45: 451-459.
- Quagliaro, G., M. Vischi, M. Tyrka and A.M. Olivieri. 2001. Identification of wild and cultivated sunflower for breeding purposes by AFLP markers. **The Amer. Genet. Assoc.** 92: 38-42.
- Quinn, G.P. and M.J. Keough. 2002. **Experimental design and analysis for biologists.** Cambridge University Press, England.
- Rohlf, F.I. 2009. **NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.21a.** Exeter Software. Setauket, New York.
- Rosales-Serna, R., S. Hernandez-Delgado, M. Gonzalez-Paz, J. A. Acosta-Gallegos and N. Mayek-Perez. 2005. Genetic relationships and diversity revealed by AFLP markers in mexican common bean bred cultivars. **Crop Sci.** 45: 1951-1957.

- Rouf, M.A., A. A. Hopkins and J. C. Zwonitzer. 2002. Determination of genetic diversity in tall fescue with AFLP markers. **Crop Sci.** 42: 944-950.
- Saiki, R.K., S. Scharf, A. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 230: 1350-1354.
- Sokal, R.R. and C.D. Michener. 1958. A statistic method for evaluating systematic relationships. **Univ. of Kansas Sci. Bul.** 28: 1409-1438.
- Saliba, V.C.M. Causse, L. Gervais and J. Philouze. 2000. Efficiency of RFLP, RAPD and AFLP markers for the construction of an intraspecific map of the tomato genome. **Genome** 43: 29-40.
- Schilling, E.E. and C.B. Heiser. 1981. Intrageneric classification of *Helianthus* (compositae). **Taxon** 30: 393-403.
- Schneiter, A.A. 1997. **Sunflower Technology and Production.** American Society of Agronomy, Crop Science Society of American, Publishers, Madison, Wisconsin.
- Serene, M.I., N. Manivannan and V. Muralidharan. 2003. Genetic diversity analysis using RAPD marker in inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **Helia** 26(39): 59-66.
- Sirithunya, P., E. Roumn, S. Mongkolsamrit, S. Sriprakhon, P. Hutamekalin, S. Mayteeworakoon and T. SreewonGchai. 2001. **Molecular Genetic Analysis of Diversity of Blast Pathogen in Thailand.** Yothee Laboratory Unit, Bangkok.
- Sivolap, Yu.M., N.E. Kozhukhova and Yu. A. Asyka. 1997. A study of the genetic relationships in maize lines with the use of RAPDs and zeins. **Tsitol. Genet.** 31(1): 16-20.

- Sneath, P.H.A. and R.R. Sakal. 1973. **Numerical Taxonomy: the Principles and Practice of Numerical Classification**. W.H. Freeman, San Fransisco, California.
- Soleimani, V.D., B.R. Baum and D.A. Johnson. 2002. AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat [*Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.) Husn.]. **Theor. Appl. Genet.** 104: 350-357.
- Solis, J. S., D.M. Ulloa and L.A. Rodr?guez. 2007. Molecular description and similarity relationships among native germplasm potatoes (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* L.) using morphological data and AFLP markers. **Electronic J. Biotech.** 10(3): 436-443.
- Sujatha, H.L., H. Chikkadevaia and R. Nandini. 2002. Assessment of genetic diversity among 51 inbred sunflower lines. **Helia** 25(37): 101-108.
- Tang, S. and S.J. Knapp. 2003. Microsatellites uncover extraordinary diversity in native American land races and wild populations of cultivated sunflower. **Theor. Appl. Genet.** 106: 990-1003.
- Tanksley, S.D., N.D. Young, A.H. Paterson and M.W. Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. **Biotechnology** 7: 257-264.
- Tar'an, B., C. Zhang, T. Warkentin, A. Tullu and A. Vandenberg. 2005. Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. **Genome** 48: 257-272.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res.** 17: 6463-6471.

- Tosti, N. and V. Negri. 2002. Efficiency of three PCR-based markers in assessing genetic variation among cowpea (*Vigna unguiculata* subsp. *unguiculata*) landraces. **Genome** 45: 268-275.
- Ubi, B.E., R. K?lliker, M. Fujimori and T. Komatsu. 2003. Genetic diversity in diploid cultivars of rhodegrass determined on the basis of amplified fragment length polymorphism marker. **Crop Sci.** 43: 1516-1522.
- Ude, G. N., W. J. Kenworthy, J. M. Costa, P. B. Cregan and J. Alvernaz. 2003. Genetic diversity of soybean cultivars from China, Japan, North America and North American ancestral lines determined by amplified fragment length polymorphism. **Crop Sci.** 43:1858-1867.
- Van de Wouw, M., N. Maxted, K. Chabane and B.V. Ford-Lloyd. 2001. Molecular taxonomy of *Vicia* ser. *Vicia* based on amplified fragment length polymorphisms. **Plant Syst. Evol.** 229: 91-105.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zebeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprintings. **Nucleic Acids Res.** 23: 4407-4414.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.U. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.** 8(22): 6531-6535.
- Xu, R.Q., T. Norihiko and D. A. Vaughan. 2000. AFLP markers for characterizing the azuki bean complex. **Crop Sci.** 40: 808-815.
- Yu, J.K, J. Mangor , L. Thompson, K.J. Edwards, M.B. Slabaugh and S.J. Knapp. 2002. Allelic diversity of simple sequence repeats among elite inbred lines of cultivated sunflower. **Genome** 45(4): 652-660.

- Yue, B., X. Cai, B.A.Vick and J.Hu. 2009. Genetic diversity and relationships among 177 public sunflower inbred lines assessed by TRAP markers. **Crop Sci.** 49: 1242-1249.
- Zhang, L.H., P. Ozias-Akins, G.Kochert, S. Kresovich, R. Dean and W. Hanna. 1999. Differentiation of bermudagrass (*Cynodon* spp.) genotypes by AFLP analysis. **Theor. Appl. Genet.** 98: 895-902.
- Zhang, L.S., V. Le Clerc, S. Li and D. Zhang. 2005. Establishment of an effective set of simple sequence repeat markers for sunflower variety identification and diversity assessment. **Canadian J. Bot.** 83(1): 66-72.

ภาคผนวก

การบันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา

บันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทานตะวัน โดยประยุกต์จาก การบันทึกข้อมูลทานตะวัน (ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่, 2540) และ Descriptors for cultivated and wild sunflower (IBPGR, 1985) มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. ข้อมูลทั่วไป

1.1 วันปลูก บันทึกวันที่หยอดเมล็ดลงในแปลง

1.2 วันงอก บันทึกโดยนับจำนวนวันตั้งแต่วันที่หยอดเมล็ดลงในแปลงถึงวันที่ลำต้นอ่อนโผล่พ้นดิน 50% หรือเกินครึ่งหนึ่งของจำนวนต้นในแปลง

1.3 วันออกดอก บันทึกโดยนับจำนวนวันตั้งแต่วันงอกถึงวันที่ดอกเริ่มบาน 50% หรือเกินครึ่งหนึ่งของจำนวนต้นในแปลง

1.4 วันสุกแก่ บันทึกโดยนับจำนวนวันตั้งแต่วันงอกถึงวันที่จานดอกเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือหลังจานดอกเป็นสีน้ำตาล

1.5 วันเก็บเกี่ยว บันทึกโดยนับจำนวนวันตั้งแต่วันงอกถึงวันที่จานดอกแห้งหมด

2. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลำต้น

2.1 ความงอกในสภาพแปลง บันทึกเปอร์เซ็นต์ความงอกในแปลงเมื่อทานตะวันมีอายุ 2 สัปดาห์หลังการปลูก แบ่งเป็น 5 ประเภท ดังนี้

- | | |
|---|---------------------------|
| 1 | เมล็ดงอกประมาณ > 90% |
| 2 | เมล็ดงอกประมาณ > 81- 90% |
| 3 | เมล็ดงอกประมาณ > 71- 80% |
| 4 | เมล็ดงอกประมาณ > 61- 70% |
| 5 | เมล็ดงอกประมาณ $\leq$ 60% |

2.2 ความสูง (plant height at full flowering) บันทึกความสูงของลำต้นโดยทำการวัดจากระดับผิวดิน (ground level) จนถึงจุดสูงสุดของลำต้น โดยรวมส่วนของดอกเมื่อดอกทานตะวันบาน 100 % และคำนวณค่าเฉลี่ยจาก 5 ต้น บันทึกหน่วยเป็นเซนติเมตร แบ่งเป็น 9 ระดับ คือ

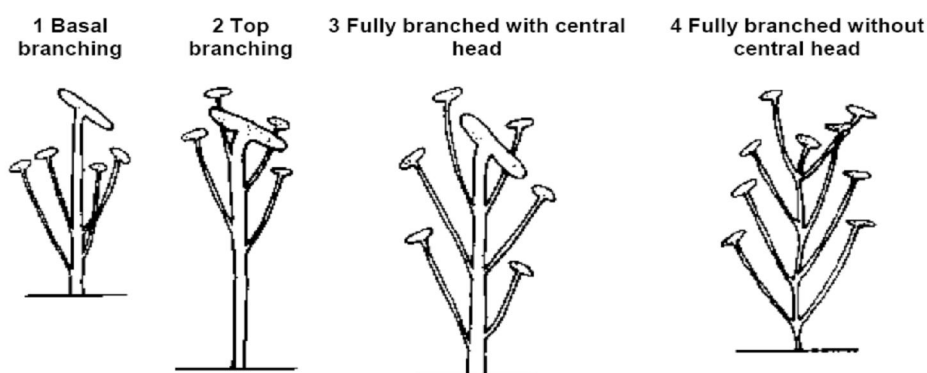
1	Dwarf	(< 40 เซนติเมตร)
2	Extremely small	(40.1 - 80.0 เซนติเมตร)
3	Small	(80.1 - 120.0 เซนติเมตร)
4	Small to medium	(120.1 - 160.0 เซนติเมตร)
5	Medium	(160.1 - 200.0 เซนติเมตร)
6	Medium to tall	(200.1 - 240.0 เซนติเมตร)
7	Tall	(240.1 - 280.0 เซนติเมตร)
8	Tall to extremely tall	(280.1 - 320.0 เซนติเมตร)
9	Extremely tall	(> 320.0 เซนติเมตร)

2.3 การแตกกิ่งก้าน บันทึกการแตกกิ่งก้าน เมื่อดอกทานตะวันบาน 100 % คือ

0	ไม่มีการแตกกิ่ง
+	มีการแตกกิ่ง

2.4 รูปแบบของการแตกกิ่งก้าน (type of branching) บันทึกรูปแบบการแตกกิ่งก้านสำหรับสายพันธุ์ที่มีการแตกกิ่งก้าน เมื่อดอกทานตะวันบาน 100 % แบ่งเป็น 4 ประเภท (ภาพผนวกที่ 1) คือ

- 1 เกิดบริเวณส่วนล่างของลำต้น (basal branching)
- 2 เกิดบริเวณส่วนบนของลำต้น (top branching)
- 3 เกิดขึ้นทุกส่วนของลำต้น โดยดอกกลางมีขนาดใหญ่ ดอกอื่น ๆ มีขนาดเล็ก (fully branched with central head)
- 4 เกิดขึ้นทุกส่วนของลำต้น โดยทุกดอกมีขนาดเท่ากัน (fully branched without central head)



ภาพผนวกที่ 1 รูปแบบของการแตกกิ่งก้าน (type of branching)

2.5 ความยาวของก้านใบ (petiole) วัดความยาวของก้านใบ (เซนติเมตร) ระยะดอกบาน 100 % แบ่งเป็น 4 ระดับ คือ

- 0 ไม่มีก้านใบ (sessile leaves)
- 1 ค่อนข้างสั้น (extremely short)
- 5 ปานกลาง (medium)
- 9 ค่อนข้างยาว (extremely long)

2.6 ลักษณะของก้านใบ (leaf habit of petiole) บันทึกลักษณะของก้านใบ เมื่อดอก ทยอยบาน 100 % แบ่งเป็น 5 ประเภท คือ

- 1 ตั้งตรง (Erect)
- 3 ตั้งตรงถึงกึ่งตั้งตรง (Erect to semi-erect)
- 5 กึ่งตั้งตรง (Semi-erect)
- 7 กึ่งตั้งตรงถึงขนานกับพื้นดิน (Semi-erect to horizontal)
- 9 ขนานกับพื้นดิน (Horizontal)

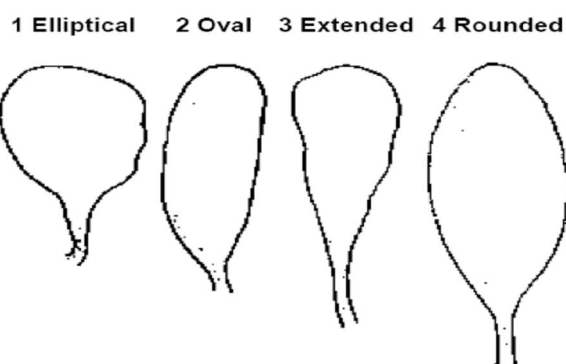
2.7 ความยาวของปล้อง (length of internodes of stem) วัดความยาวของปล้อง ระยะดอก บาน 100 % แบ่งเป็น 3 ระดับ คือ

- 3 สั้น (short)
- 5 ปานกลาง (medium)
- 7 ยาว (long)

3. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ

3.1 รูปร่างใบเลี้ยง (shape of cotyledon) บันทึกลักษณะรูปร่างใบเลี้ยงเมื่อทานตะวันมีอายุ 2 สัปดาห์หลังการปลูก แบ่งเป็น 4 ประเภท (ภาพผนวกที่ 2) ดังนี้

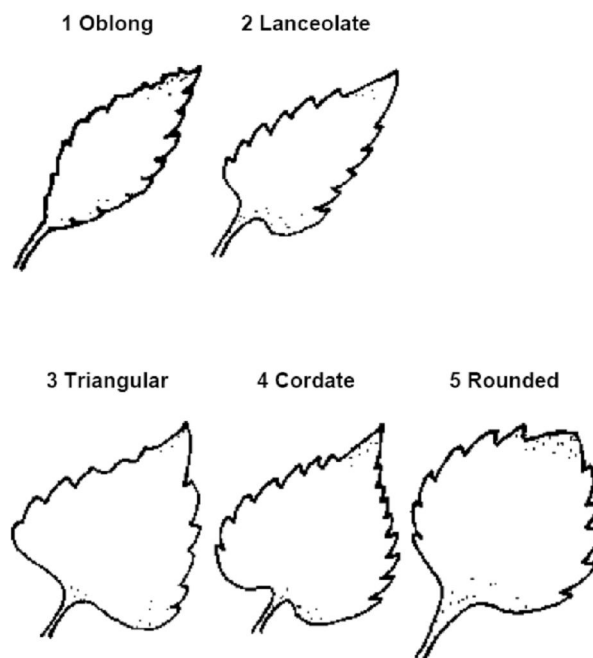
- 1 รูปกลมมน (elliptical)
- 2 รูปไข่ (oval)
- 3 รูปค่อนข้างยาว (extended)
- 4 รูปค่อนข้างกลม (rounded)



ภาพผนวกที่ 2 รูปร่างใบเลี้ยง (shape of cotyledon)

3.2 รูปร่างใบ (leaf shape) บันทึกลักษณะรูปร่างใบ เมื่อดอกทานตะวันบาน 100 % แบ่งเป็น 5 ประเภท (ภาพผนวกที่ 3) ดังนี้

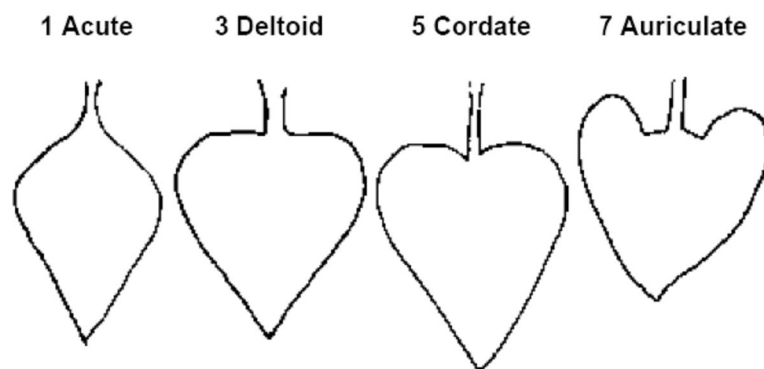
- 1 ใบรูปไข่ (oblong)
- 2 ใบรูปหอก (lanceolate)
- 3 ใบรูปสามเหลี่ยม (triangular)
- 4 ใบรูปหัวใจ (cordate)
- 5 ใบรูปค่อนข้างกลม (rounded)



ภาพผนวกที่ 3 รูปร่างใบ (leaf shape)

3.3 รูปร่างฐานใบ (leaf base) ระยะดอกบาน 100 % แบ่งเป็น 4 ประเภท (ภาพผนวกที่ 5) คือ

- 1 ลักษณะฐานรีหรือแหลม (acute)
- 3 ลักษณะฐานสามเหลี่ยม (deltoid)
- 5 ลักษณะฐานหัวใจ (cordate)
- 7 ลักษณะฐานรูปร่างเหมือนหูใบ (auriculate)



ภาพผนวกที่ 4 รูปร่างฐานใบ (leaf base)

ดังนี้

3.4 สีใบ (leaf color) บันทึกลักษณะสีใบ ระยะดอกบาน 100 % แบ่งเป็น 3 ประเภท

- 3 สีเขียวอ่อน (light green)
- 5 สีเขียว (medium green)
- 7 สีเขียวเข้ม (dark green)

3.5 ความมันวาวของใบ (leaf glassiness) ระยะดอกบาน 100 % คือ

- 0 ไม่มีความมันวาว
- +

3.6 การพุพองของใบ (leaf blistering) ระยะดอกบาน 100 % คือ

- 0 ไม่มีความพุพอง
- +

3.7 รูปร่างใบเมื่อตัดตามขวาง (shape of cross section of leaf) ระยะดอกบาน 100 % แบ่งเป็น 3 ประเภท (ภาพผนวกที่ 4) คือ

- 3 Concave
- 5 Flat
- 7 Convex



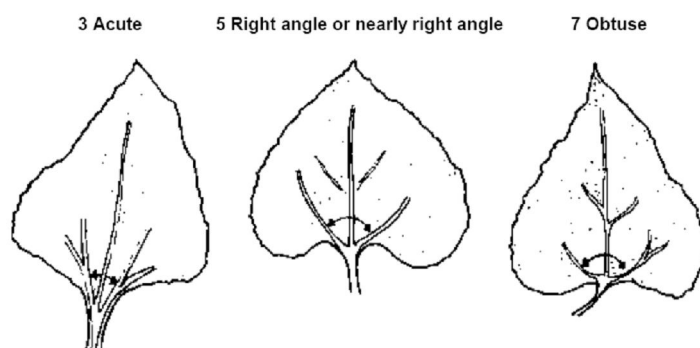
ภาพผนวกที่ 5 รูปร่างใบเมื่อตัดตามขวาง (shape of cross section of leaf)

3.8 จำนวนใบต่อต้น (number of leaves) นับจำนวนใบในระยะออกดอก 50% แบ่งเป็น 3 ประเภท ดังนี้

3	น้อย (few)	: ≤ 15 ใบ/ต้น
5	ปานกลาง (medium)	: 16-25 ใบ/ต้น
7	มาก (many)	: ≥ 26 ใบ/ต้น

3.9 องศาเส้นกลางใบ (angle of lateral veins of leaf) ระยะดอกบาน 100 % แบ่งเป็น 3 ประเภท (ภาพผนวกที่ 6) คือ

3	acute
5	right angle or nearly right angle
7	obtuse



ภาพผนวกที่ 6 องศาเส้นกลางใบ (angle of lateral veins of leaf)

3.10 ขนาดใบ (leaf size) วัดส่วนกว้างสุดของใบ ระยะดอกบาน 100 % แบ่งเป็น 5 ประเภท คือ

1	ขนาดเล็กมาก (extremely small)	: ≤ 5 เซนติเมตร
3	ขนาดเล็ก (small)	: 6-10 เซนติเมตร
5	ขนาดปานกลาง (medium)	: 11-15 เซนติเมตร
7	ขนาดใหญ่ (large)	: 16-20 เซนติเมตร
9	ขนาดใหญ่มาก (extremely Large)	: > 20 เซนติเมตร

4. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอก

4.1 รูปร่างกลีบรองดอก (bract shape) บันทึกลักษณะรูปร่างกลีบรองดอก เมื่อดอกทานตะวันบาน 100 % แบ่งเป็น 4 ประเภท (ภาพผนวกที่ 7) ดังนี้

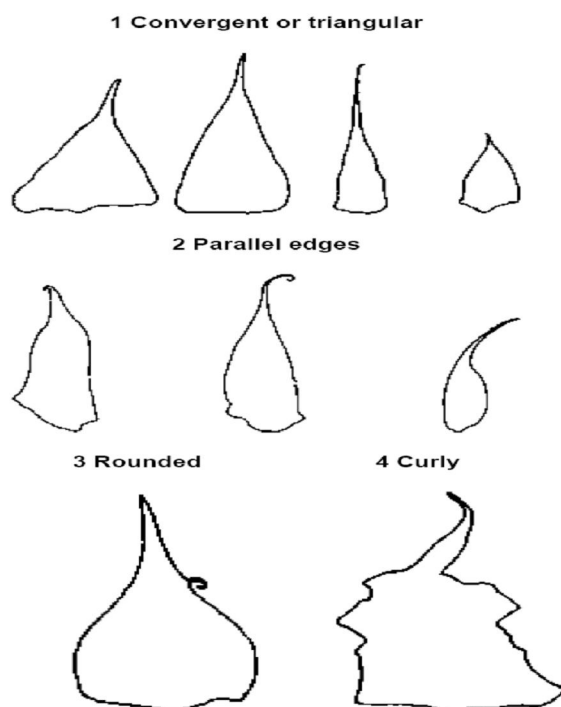
- 1 รูปร่างกรวยปลายแหลม (convergent)
- 2 ค่อนข้างยาวขอบขนานกัน (parallel edges)
- 3 ค่อนข้างกลม (rounded)
- 4 ลักษณะหยัก (curly)

4.2 ขนาดกลีบรองดอก (bract size) บันทึกขนาดกลีบดอกรูปร่างเมื่อดอกทานตะวันบาน 100 % แบ่งเป็น 3 ประเภท ดังนี้

- 3 เล็ก (small)
- 5 ปานกลาง (medium)
- 7 ใหญ่ (large)

4.3 ความยาวของกลีบรองดอก (bract peak length) บันทึกความยาวของกลีบรองดอก เมื่อดอกทานตะวันบาน 100 % แบ่งเป็น 3 ประเภท ดังนี้

- 3 สั้น (short)
- 5 ปานกลาง (medium)
- 7 ยาว (long)



ภาพผนวกที่ 7 รูปร่างกลีบรองดอก (bract shape)

4.4 รูปร่างของกลีบดอก (shape of ray flower) บันทึกลักษณะรูปร่างกลีบดอก เมื่อดอกทานตะวันบาน 100 % แบ่งเป็น 3 ประเภท ดังนี้

- 1 รูปร่างยาวเรียว (elongated)
- 2 รูปคล้ายไข่ (ovoid)
- 3 รูปกลม (rounded)

4.5 สีกลีบดอก (color of ray flower) บันทึกลักษณะสีกลีบดอก เมื่อดอกทานตะวันบาน 100 % แบ่งเป็น 7 สี ดังนี้

- 1 สีงา (ivory)
- 2 สีเหลืองอ่อน (pale yellow)
- 3 สีเหลือง (yellow)
- 4 สีส้ม (orange)
- 5 สีม่วง (purple)

- 6 สีแดง (red)
- 7 หลากหลายสี (multicolour)

4.6 จำนวนของกลีบดอก (number of ray flowers) บันทึกจำนวนกลีบดอก เมื่อดอกทานตะวันบาน 100 % แบ่งเป็น 5 ประเภท ดังนี้

- 1 ค่อนข้างน้อย (extremely few) : ≤ 25 กลีบ/จานดอก
- 3 น้อย (few) : 26-35 กลีบ/จานดอก
- 5 ปานกลาง (medium) : 36-45 กลีบ/จานดอก
- 7 มาก (many) : ≥ 45 กลีบ/จานดอก
- 9 จำนวนมาก และมีขนาดเล็กฝอยคล้ายดอกเบญจมาศ (chrysanthemum)

4.7 สีดอก (color of disk flower) บันทึกลักษณะสีดอก เมื่อดอกทานตะวันบาน 100 % แบ่งเป็น 3 สี ดังนี้

- 1 สีเหลือง (yellow)
- 2 สีแดง (red)
- 3 สีม่วง (purple)

4.8 สีเกสรตัวผู้ (pollen color) บันทึกลักษณะสีเกสรตัวผู้ เมื่อดอกทานตะวันบาน 100 % แบ่งเป็น 4 สี ดังนี้

- 1 สีขาว (white)
- 2 สีเหลืองอ่อน (pale yellow)
- 3 สีเหลือง (yellow)
- 4 สีส้ม (orange)

5. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของจานดอก

5.1 การทำมุมของจานดอก (head angle at maturity) บันทึกลักษณะการทำมุมของจานดอกกับลำต้น เมื่อจานดอกทานตะวันเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แบ่งเป็น 6 ประเภท (ภาพผนวกที่ 8) คือ

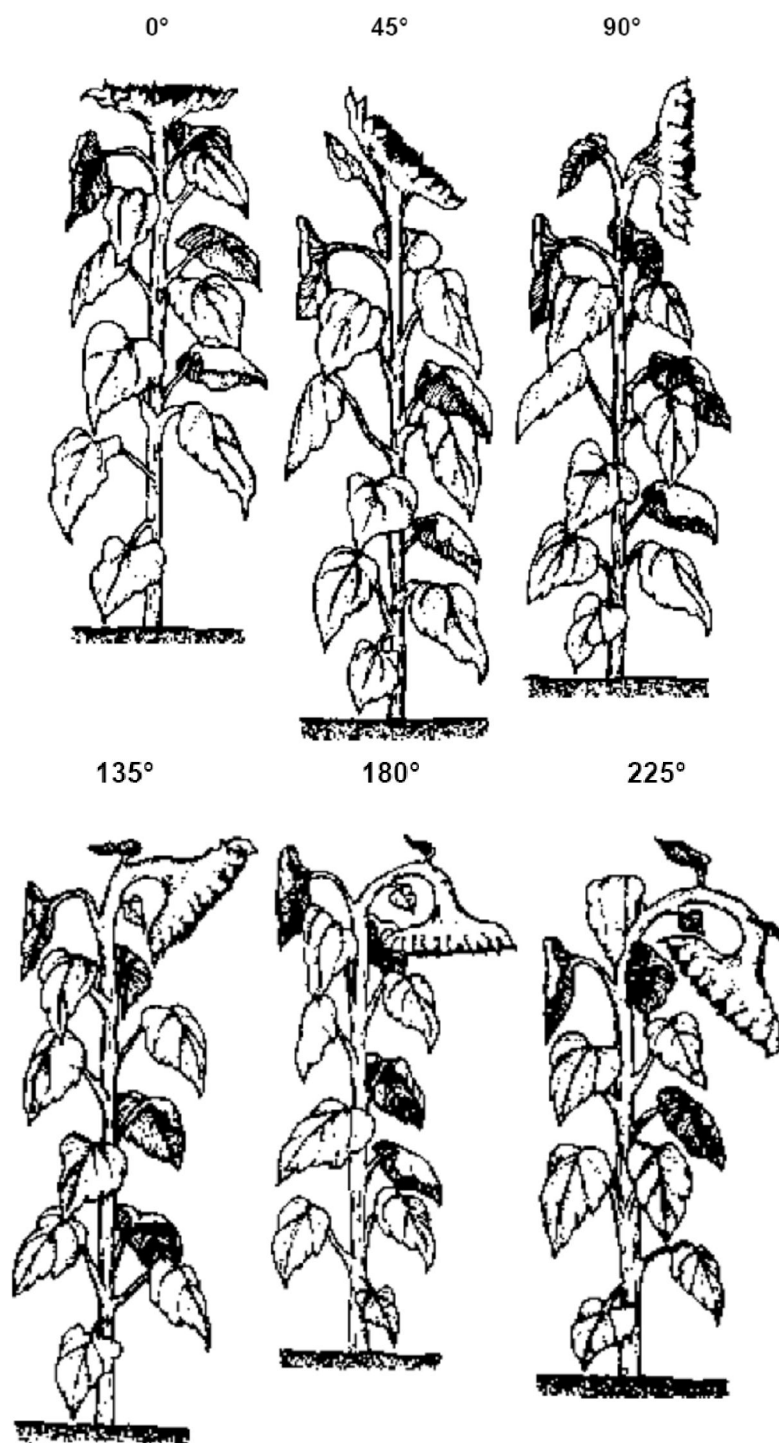
- | | |
|---|------------------------------------|
| 1 | 0° (จานดอกหงายขึ้นขนานกับพื้นดิน) |
| 2 | 45° (จานดอกทำมุม 45° กับพื้นดิน) |
| 3 | 90° (จานดอกทำมุม 90° กับพื้นดิน) |
| 4 | 135° (จานดอกทำมุม 135° กับพื้นดิน) |
| 5 | 180° (จานดอกทำมุม 180° กับพื้นดิน) |
| 6 | 225° (จานดอกทำมุม 225° กับพื้นดิน) |

5.2 ขนาดของจานดอก (head size) บันทึกโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของจานดอกเป็นเซนติเมตร เมื่อจานดอกทานตะวันเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล คำนวณจากค่าเฉลี่ย 5 จานดอก แบ่งเป็น 4 ประเภท คือ

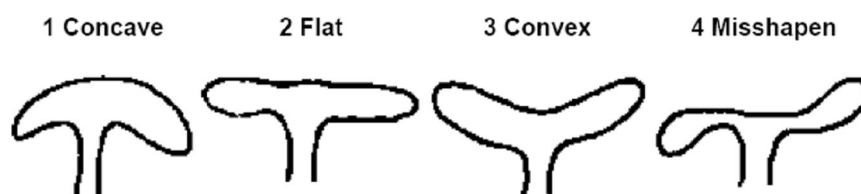
- | | | |
|---|----------------------|-------------------|
| 3 | เล็ก (small) | : < 10 เซนติเมตร |
| 5 | ปานกลาง (medium) | : 11-15 เซนติเมตร |
| 7 | ใหญ่ (large) | : 16-20 เซนติเมตร |
| 9 | ใหญ่มาก (very large) | : >20 เซนติเมตร |

5.3 ลักษณะของจานดอก (head Shape) บันทึกลักษณะรูปร่างของจานดอก เมื่อจานดอกทานตะวันเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล แบ่งเป็น 4 ประเภท (ภาพผนวกที่ 9) คือ

- | | |
|---|--------------------------------|
| 1 | จานดอกเว้าเข้าข้างใน (concave) |
| 2 | จานดอกเรียบ (flat) |
| 3 | จานดอกโค้งออกข้างนอก (convex) |
| 4 | จานดอกบิดเบี้ยว (misshappen) |



ภาพผนวกที่ 8 การทำมุมของจานดอก (head angle at maturity)



ภาพผนวกที่ 9 ลักษณะของจานดอก (head Shape)

6. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ด

6.1 ความยาวของเมล็ด (length of seed) บันทึกโดยวัดความยาวของเมล็ดเป็น เซนติเมตร แบ่งเป็น 3 ประเภท ดังนี้

3	สั้น (short)	: < 1.0 เซนติเมตร
5	ปานกลาง (medium)	: 1.0-1.3 เซนติเมตร
7	ยาว (long)	: ≥ 1.4 เซนติเมตร

6.2 รูปร่างของเมล็ด (shape of seed) บันทึกลักษณะรูปร่างของเมล็ด แบ่งเป็น 4 ประเภท (ภาพผนวกที่ 10) คือ

- 1 เมล็ดรูปรียาว (elongated)
- 2 เมล็ดรูปไข่หัวแหลม (ovoid elongated)
- 3 เมล็ดรูปไข่บานกว้าง (ovoid wide)
- 4 เมล็ดรูปกลม (rounded)

1 Elongated 2 Ovoid elongated 3 Ovoid wide 4 Rounded



ภาพผนวกที่ 10 รูปร่างของเมล็ด (shape of seed)

6.3 ความหนาของเมล็ด (thickness of seed) บันทึกลักษณะความหนาของเมล็ด แบ่งเป็น 3 ประเภท คือ

3	เมล็ดบาง (thin)	: < 0.5 มิลลิเมตร
5	เมล็ดหนานปานกลาง (medium)	: 0.5-0.7 มิลลิเมตร
7	เมล็ดหนามาก (thick)	: > 0.7 มิลลิเมตร

6.4 สีเมล็ด (seed color) บันทึกลักษณะสีของเมล็ด แบ่งเป็น 5 สี คือ

1	สีขาว (white)
2	สีเทา (grey)
3	สีน้ำตาล (brown)
4	สีดำ (black)
5	สีม่วง (anthocyanin)

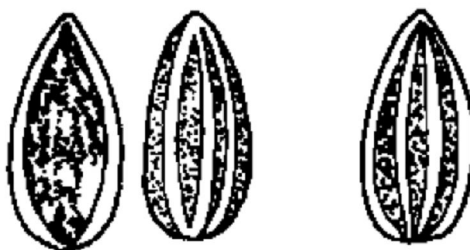
6.5 สีลายแถบเมล็ด (color of seed stripes) บันทึกลักษณะสีลายแถบเมล็ด แบ่งเป็น 3 สี คือ

1	ลายแถบขาว (white)
2	ลายแถบเทา (grey)
3	ลายแถบเทาออกม่วง (violet grey)

6.6 ตำแหน่งของแถบ (position of stripes) บันทึกลักษณะตำแหน่งของลายแถบเมล็ด แบ่งเป็น 3 ประเภท (ภาพผนวกที่ 11) คือ

1	ลายแถบขอบเมล็ด (marginal)
2	ลายแถบขาวตรงส่วนกลาง (lateral)
3	ลายแถบทั้งด้านริม และกลางเมล็ด (both marginal and lateral)

1 Marginal 2 Lateral 3 Both marginal and lateral



ภาพผนวกที่ 11 ตำแหน่งของแถบ (position of stripes)

6.7 ความหนาของเปลือกหุ้มเมล็ด (pericarp thickness) บันทึกลักษณะความหนาของเปลือกหุ้มเมล็ด แบ่งเป็น 5 ประเภท คือ

1	บางมาก (extremely thin)	: < 0.30 มิลลิเมตร
3	บาง (thin)	: 0.31 - 0.50 มิลลิเมตร
5	ปานกลาง (medium)	: 0.51 - 0.70 มิลลิเมตร
7	หนา (thick)	: 0.71 - 0.90 มิลลิเมตร
9	หนามาก (very thick)	: > 0.90 มิลลิเมตร

6.8 น้ำหนัก 100 เมล็ด บันทึกน้ำหนัก 100 เมล็ด คำนวณจากค่าเฉลี่ยจำนวน 5 ซ้ำ แบ่งเป็น 3 ประเภท คือ

3	น้อย (few)	: < 5 กรัม
5	ปานกลาง (medium)	: 5-10 กรัม
7	มาก (many)	: > 10 กรัม

6.9 เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด บันทึกเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด คำนวณจากค่าเฉลี่ยจำนวน 5 จานดอก แบ่งเป็น 3 ประเภท คือ

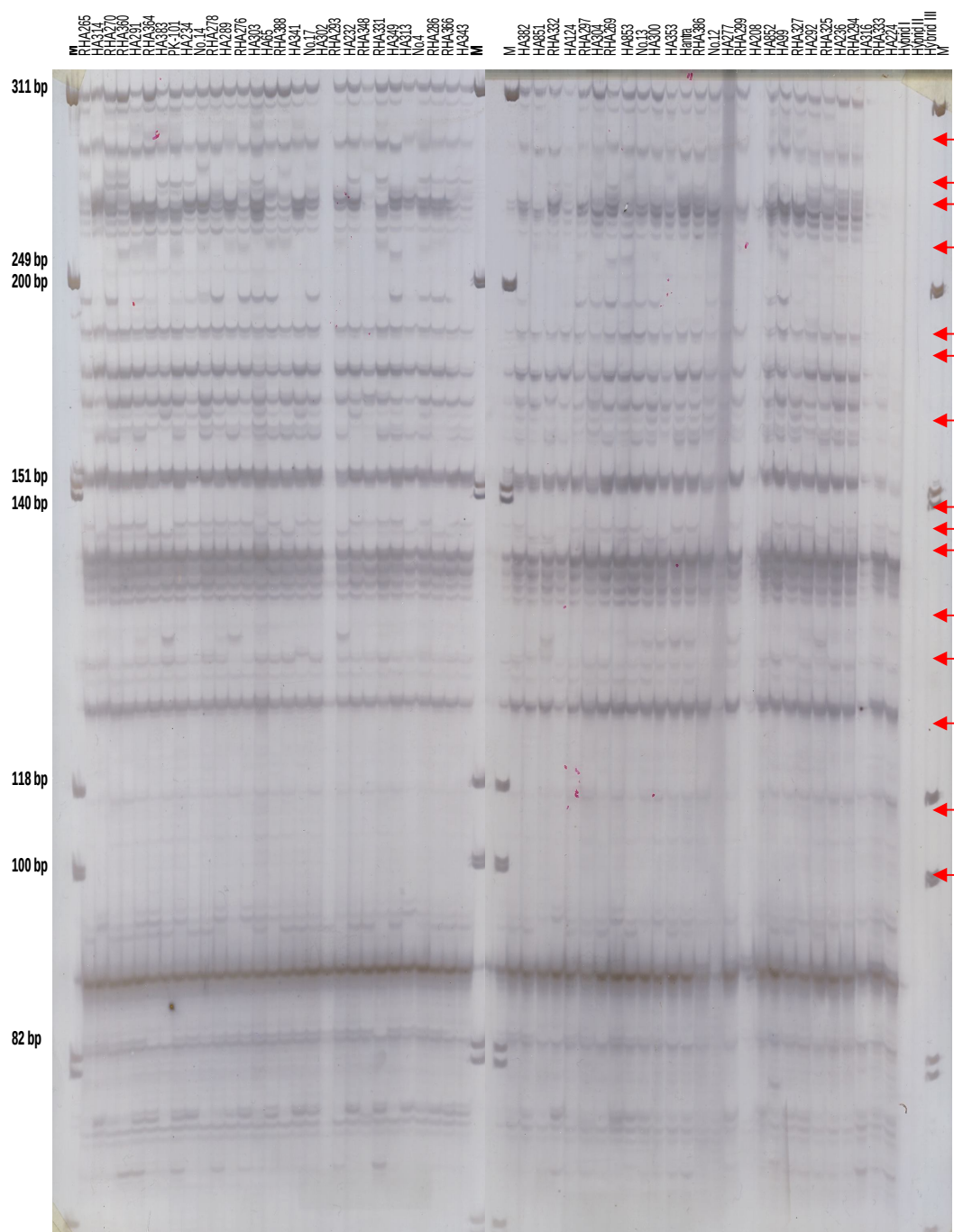
3	ต่ำ (low)	: < 60 %
5	ปานกลาง (medium)	: 61-80 %
7	สูง (high)	: > 81 %

6.10 เปอร์เซนต์น้ำมัน บันทึกเปอร์เซนต์น้ำมัน คำนวณจากค่าเฉลี่ยจำนวน 2 ซ้ำ
แบ่งเป็น 5 ระดับ คือ

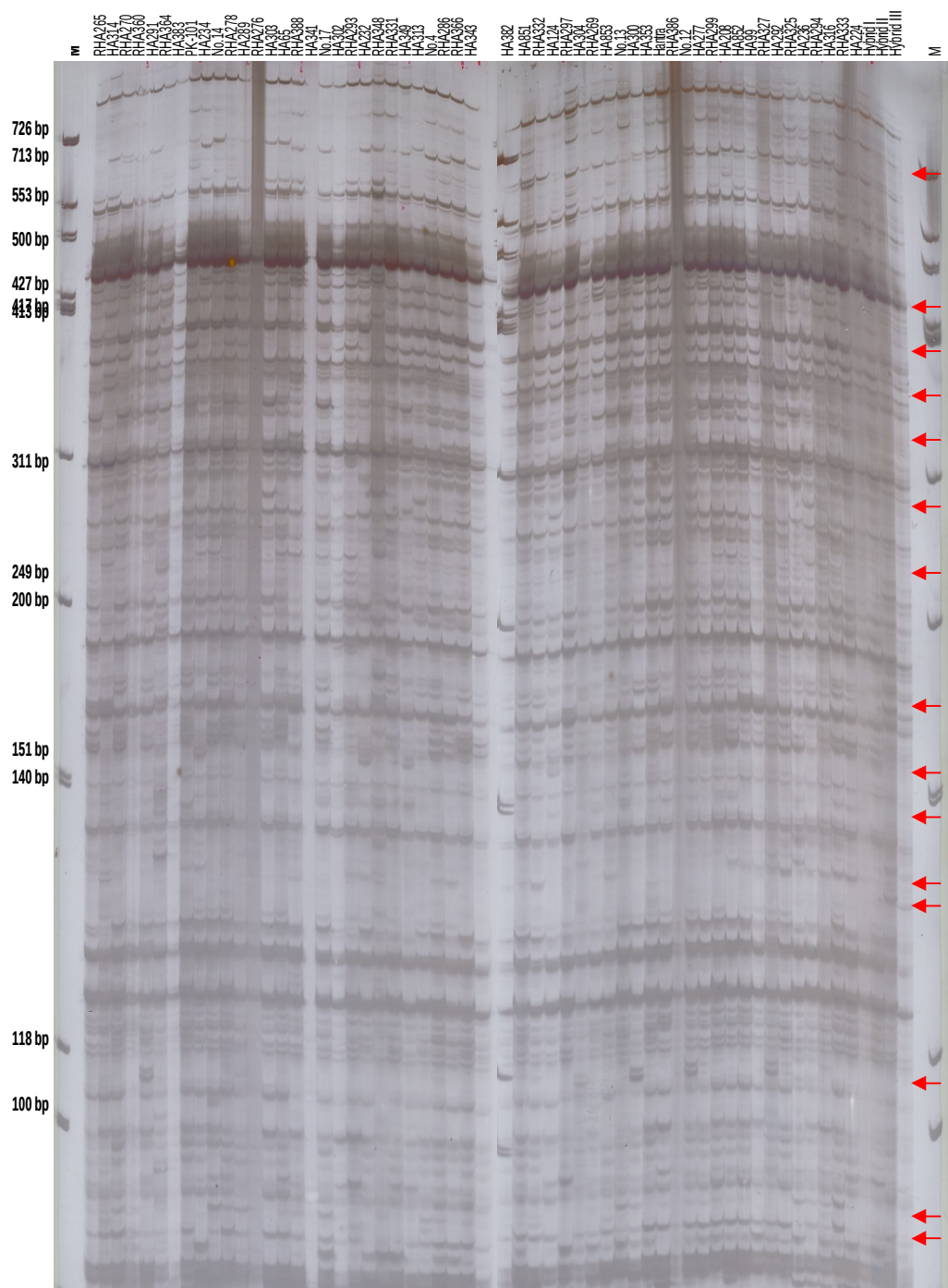
1	ต่ำมาก (extremely low)	: < 20 %
3	ต่ำ (low)	: 21 – 25 %
5	ปานกลาง (medium)	: 26 – 30 %
7	สูง (high)	: 31 – 35 %
9	สูงมาก (extremely high)	: > 40 %

6.11 ปริมาณ alpha-tocopherol (มิลลิกรัม/กรัม) วิเคราะห์ปริมาณ alpha-tocopherol ของ
เมล็ดที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Gofman et al. (1999) แบ่งเป็น 5 ระดับ
คือ

1	ต่ำมาก (extremely low)	: < 30 มิลลิกรัม/กรัม
3	ต่ำ (low)	: 31-50 มิลลิกรัม/กรัม
5	ปานกลาง (medium)	: 51-70 มิลลิกรัม/กรัม
7	สูง (high)	: 71-90 มิลลิกรัม/กรัม
9	สูงมาก (extremely high)	: > 90 มิลลิกรัม/กรัม



ภาพผนวกที่ 12 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์ ที่เกิดจากเครื่องหมายเอฟแอลพี คู่ไพรเมอร์ E-ACC/M-CAG แสดงตัวอย่าง ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่บอกความแตกต่าง (ลูกศรชี้) แถว M คือ แถบดีเอ็นเอ มาตรฐาน (? X174 DNA/Hinfl)



ภาพผนวกที่ 13 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของทานตะวันสายพันธุ์แท้ 56 สายพันธุ์ และพันธุ์การค้า 3 พันธุ์
 ที่เกิดจากเครื่องหมายเอฟแอลพี คู่ไพรเมอร์ E-CGT/M-AGG แสดงตัวอย่าง
 ตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่บอกความแตกต่าง (ลูกศรชี้) แถว Marker คือ แถบดีเอ็นเอ
 มาตรฐาน (? X174 DNA/Hinfl)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ -นามสกุล	นางสาวลลิตา อาจสูงเนิน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	19 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	จังหวัดอุบลราชธานี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (พืชศาสตร์) เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง มหาวิทยาลัยแม่โจ้
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนบัณฑิตผู้ช่วยวิจัยจากศูนย์ความเป็นเลิศ เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานักบัณฑิตศึกษาและ วิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงาน คณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ