บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พืชกลุ่มกระเจียวจัดอยู่ในสกุลขมิ้น (Genus *Curcuma*) Tribe Hedychieae ซึ่งอยู่ในตระกูล Zingiberaceae (Dahlgren *et al.*, 1985) มีถิ่นกำเนิดกระจายอยู่ทั่วไปในเขตร้อนของโลกตั้งแต่อินเดีย อินโดนีเซีย ไทย มาเลเซีย ไปจนถึง ควีนสแลนด์และหมู่เกาะแปซิฟิค (Apavatjrut *et al.*, 1999 ; Ardiyani, 2000) สำหรับประเทศไทยแหล่งกำเนิดของพืชกลุ่มนี้มีกระจายอยู่ทั่วทุกภาค ในระดับความสูงตั้งแต่ระดับน้ำทะเลจนถึงประมาณ 1000 เมตร (พิมพ์ใจ และ คณะ, 2539) เคยมีรายงานว่าพบพืชสกุล *Curcuma* ประมาณ 70 ชนิด (Purseglove, 1972) พืชกลุ่มนี้มีความหลากหลายในลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แสดงออกมาก สุรวิช (2539) ได้รายงานว่านักพฤกษศาสตร์แบ่งพืชสกุลนี้ตามลักษณะของใบประดับ ช่อดอก และอับเรณู ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม Eucurcuma และ กลุ่ม Paracurcuma และได้อธิบายเพิ่มเติมว่า Eucurcuma เป็นกลุ่มที่ไม่มีสีกลุ่มม่วงแดงที่ปากกลีบสเตมิโนด ปากมักมีสีขาวหรือเหลือง ช่อดอกมีทั้งเกิดจากเหง้าโดยตรง และเกิดจากตายอดของลำต้นเทียม ตัวอย่างของพืชกลุ่มนี้ได้แก่ ฉัตรทิพย์ ฉัตรทอง อุษา พลอยชมพู พลอยทักษิณ ว่านกระบี่ทอง ว่านเพชรม้า ส่วนกลุ่ม Paracurcuma เป็นกลุ่มที่มีสีม่วงแดงที่ปาก กลีบสเตมิโนดมีสีขาวหรือสีม่วง ช่อดอกเกิดจากตายอดของลำต้นเทียม ตัวอย่างของพืชกลุ่มนี้ได้แก่ ปทุมมา พลอยมยุรา แววอุบล มณีกาญจน์ เทพรำลึก และเทพอัปสร เป็นต้น

พืชในสกุลนี้เป็นไม้หัวอายุยืนหลายปีที่ไม่มีเนื้อไม้ (herbaceous perennial) มีการพักตัวในช่วงอากาศแล้งและช่วงวันสั้น โดยมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไปดังนี้ (นิพัฒน์ และ คณะ, 2537 ; สุรวิช, 2539 ; Dahlgren *et al.*, 1985 ; Purseglove, 1972)

ลำต้น อยู่ใต้ดินทำหน้าที่สะสมน้ำและอาหารมีลักษณะป้อมและโป่ง เรียกว่า เหง้า (tuberous rhizome) ตาข้างของเหง้าจะเจริญเติบโตเป็นลำต้นเทียม (pseudostem) อยู่เหนือดินซึ่งเกิดจากกาบใบที่ห่อตัวกันแน่น

ใบ มีลักษณะเป็นใบเดี่ยว ขอบใบเรียบหรือเป็นคลื่น รูปร่างใบจะแตกต่างไปตามชนิดของพืช ส่วนก้านใบและใบอาจมีขนหรือไม่มีขน และก้านใบจะรวมตัวกันแน่นเป็นลำต้นเทียม

ช่อดอก เป็นแบบช่อแน่น (compact spike) มีใบประดับ (bract) โอบรอบช่อดอกทำให้เห็นใบประดับเรียงซ้อนกันเกิดเป็นช่อที่มีลักษณะเป็นทรงกระบอกหรือทรงกระสวย ภายในใบประดับจะเป็นที่อยู่ของดอกจริงประมาณ 2-7 ดอก ส่วนใบประดับส่วนบน (coma bract) มีลักษณะ รูปร่าง

และสีสันแตกต่างจากใบประดับปกติและจะไม่มีดอกจริงอยู่ภายใน นอกจากนี้การเกิดช่อดอกของพืชกลุ่มนี้จะเกิดในตำแหน่งที่แตกต่างกันตามชนิด ซึ่งอาจจะเกิดจากปลายลำต้นเทียมหรือเกิดจากเหง้าโดยตรง

ดอก มีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ อยู่เหนือรังไข่ ส่วนกลีบดอกมีโคนที่เชื่อมกันเป็นหลอดแต่ปลายแยกเป็น 3 กลีบ เกสรตัวผู้วงนอกเป็นหมัน 3 อัน ถูกเปลี่ยนรูปเป็นกลีบ 3 กลีบ เรียกกลีบสเตมิโนด (staminode) โดย 1 กลีบเปลี่ยนรูปไปเรียกว่า ปาก (lip) พืชบางชนิดในสกุลนี้มีฐานของอับละอองเกสรลักษณะเป็นเดือยยื่นออกมาอย่างชัดเจน สำหรับยอดเกสรเพศเมียอยู่สูงกว่าปลายอับละอองเกสรเล็กน้อย โดยแทรกอยู่ระหว่างกลางอับละอองเกสร

ผลและเมล็ด ผลเมื่อพัฒนาเต็มที่แบ่งเป็น 3 พูอย่างชัดเจน ภายในแต่ละพูเป็นที่อยู่ของเมล็ด ผลแก่มีอายุประมาณ 1-2 เดือน โดยผลที่แก่เต็มที่จะมีผนังบางและใสจนสามารถมองเห็นเมล็ดได้ เมล็ดมีรูปร่างคล้ายหยดน้ำหรือเมล็ดองุ่นขนาดยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร เมล็ดที่แก่เต็มที่มีสีน้ำตาลเข้ม

ราก เป็นระบบรากฝอย รากส่วนหนึ่งมีปลายบวมพองออกมีลักษณะเป็นตุ้มทำหน้าที่เก็บสะสมน้ำและอาหาร

วงจรชีวิต นิพัฒน์ และ คณะ (2537) ได้รายงานว่าพืชกลุ่มกระเจียวมีอายุการเจริญเติบโตประมาณ 7 - 8 เดือน คือมีช่วงการเจริญเติบโตและออกดอกในฤดูฝน โดยช่วงออกดอกประมาณ 2 - 3 เดือน เมื่อเริ่มออกดอกจะเริ่มลงหัวใหม่ไปพร้อมกัน เมื่อพ้นช่วงออกดอกแล้วใบจะเริ่มเหี่ยวแห้งและต้นยุบตัวลง ถ้าทิ้งหัวพันธุ์ไว้ในดินก็จะพักตัวในช่วงฤดูหนาว หัวเริ่มงอกใหม่หลังพ้นระยะพักตัวคือฤดูฝนของปีถัดไป หัวที่พักตัวนี้เรียกว่า stubbed rhizome (Ruamrungsri *et al.*, 2001)

พืชในสกุลนี้แต่ละชนิดจะมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่แตกต่างกัน และเมื่อทำการศึกษาโครโมโซมจะพบว่ามีจำนวนแตกต่างกัน ซึ่งถกลวรรณ และ คณะ (2539) ได้รายงานผลการตรวจนับจำนวนโครโมโซมของกระเจียว 8 ชนิด ดังนี้

ชนิดกระเจียว	2n	n
Curcuma sp.	63	28 – 35
กระเจียวกาบแดง (*C. rubescens* Roxb.)	63	28 – 35
ขมิ้นอ้อย (*C. zedoaria* Rosc.)	63	28 – 35
ว่านชักมดลูก (*C. xanthorrhiza* Roxb.)	63	28 – 35
ว่านมหาเมฆ (*C. aeruginosa* Roxb.)	63	28 – 35
กระเจียวกุหลาบ (*Curcuma sp.*)	42	21
บัวสีส้ม (*Curcuma sp.*)	42	21

ตามที่ พิมพ์ใจ และ คณะ (2539) ได้ศึกษาจำนวนโครโมโซมดิพพลอยด์ (2n) จากเซลล์ปลายรากที่มีการแบ่งเซลล์ จากพืช 17 ชนิด พบว่าพืชกลุ่มกระเจียวนี้มีโครโมโซมขนาดเล็กมากประมาณ 0.5 – 2.0 ไมโครเมตรและมีจำนวนโครโมโซม 2n ตั้งแต่ 24 – 84 จำแนกตามจำนวนโครโมโซมได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 32 ได้แก่ ปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) บัวลาย (*Curcuma sp.*) เกล็ดหยก (*Curcuma sp.*)
2. กลุ่มที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 42 ได้แก่ กระเจียวส้ม (*C. roscoeana* Wall.) เพชรเชียงใหม่ (*C. petiolata* Wall.) และพลอยทักษิณ (*C. aurantiaca* van Zijp)
3. กลุ่มที่มีจำนวนโครโมโซม 2n = 63 ได้แก่ ขมิ้นอ้อย (*C. zedoaria* Rosc.) ว่านชักมดลูก (*C. xanthorrhiza* Raxb.) พลอยชมพู (*C. elata* Roxb.) และว่านมหาเมฆ (*C. aeruginosa* Roxb.)
4. กลุ่มกระเจียวดอกอาว มีจำนวนโครโมโซม 2n = 84 ได้แก่ *C. attenuata* Wall. และ *Curcuma sp.*
5. กลุ่มที่มีจำนวนโครโมโซมที่แตกต่างกันออกไป เช่น 2n = 24 ได้แก่ บัวโกเมน (*Curcuma sp.*) และพวกที่มีโครโมโซมหลายแบบ เช่น เทพรำลึก (*C. thorellii* Gagnep.) มีจำนวนโครโมโซม 2n = 34, 36 และกระเจียวขาวหรือหิ่งห้อย (*C. parviflora* Wall.) มีจำนวนโครโมโซม 2n = 28, 34, 36 และ 56 เป็นต้น

วรรณภา และ อดิศร (2540) ได้รายงานการนับจำนวนโครโมโซมของกระเจียว 3 ชนิดได้แก่ กระเจียวแดง (*Curcuma sp.*) กระเจียวจาก อ.ท่าอ่าง (*Curcuma sessilis* Gage) และกระเจียวจาก อ. สูงเนิน (*Curcuma sp.*) ว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n เท่ากับ 42, 56 และ 56 แท่ง ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิคทางอณูชีวโมเลกุลมาศึกษาเพื่อบ่งบอกความแตกต่างของพืชกลุ่มกระเจียวโดยอุไรวรรณ (2540) ได้ทำการวิเคราะห์พันธุกรรมของพืชกลุ่มกระเจียวในระดับชนิด และระดับโคลน (clone) ด้วยเทคนิค RAPD เพื่อตรวจสอบความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกระเจียวจำนวน 10 ชนิด พบว่า จากการใช้ไพรเมอร์ (primer) จำนวน 48 ไพรเมอร์ มีเพียง 3 ไพรเมอร์ ที่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ขนาดแตกต่างกันได้รวมทั้งหมด 37 แถบ โดยมีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 200 – 1700 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถแบ่งกระเจียวได้ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยมีลักษณะสอดคล้องกับพฤติกรรมการออกดอกเร็วหรือช้า และสอดคล้องกับการจำแนกกลุ่มด้วยเทคนิคไอโซไซม์ที่เคยมีการรายงานจากการวิจัยของ Apavatjrut *et al.* (1999) โดยนำเทคนิค ไอโซไซม์มาใช้แยกชนิดในพืชกลุ่มกระเจียวจำนวน 7 ชนิดเพื่อสนับสนุนข้อมูลทางอนุกรมวิธาน โดยพบว่าเมื่อใช้เอนไซม์จำนวน 21 ชนิด มีเอนไซม์ 8 ชนิด ได้แก่ PGM (phosphoglucomutase) GOT (glutamic-oxaloacetate transaminase) DIA (diaphorase) ACO (aconitase) EST (esterases) SKD (shikimate dehydrogenase) LAP (leucine aminopeptidase)

และ IDH (isocitrate dehydrogenase) ที่สามารถให้รูปแบบแถบไอโซไซม์ซึ่งมีลักษณะ polymorphic เมื่อนำไปวิเคราะห์โดย cluster analysis และ UPGMA ทำให้ได้ dendrogram แสดงระดับความสัมพันธ์ของพืชกลุ่มนี้ นอกจากนี้ปรีชา (2543) ยังได้กล่าวว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในจีโนมของสิ่งมีชีวิตโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR มีไพรเมอร์ให้เลือกเป็นจำนวนมาก ไพรเมอร์เหล่านี้มีศักยภาพในการนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับจีโนมที่ต้องการศึกษา ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึงการคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาจีโนมของกระเจียว (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) จำนวน 7 ตัวอย่าง พบว่า เมื่อทดสอบด้วย 20 ไพรเมอร์ มี 19 ไพรเมอร์ (95%) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเงื่อนไขที่ใช้ทดลองได้ แต่มีเพียง 7 ไพรเมอร์ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจนและเกิดซ้ำได้จึงนำมาศึกษาเพื่อประเมินความหลากหลายของดีเอ็นเอ จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค RAPD - PCR มีศักยภาพในการนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ และสามารถใช้แถบดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการระบุชนิดของกระเจียว เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมข้ามชนิดต่อไป

เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD เป็นการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) และอุณหภูมิในช่วง primer annealing ประมาณ 37 – 40 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มดีเอ็นเอที่ไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ให้มีปริมาณมาก (ธีระชัย, 2540) ซึ่ง RAPD ใช้หลักการที่ว่าดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันในการเรียงลำดับของเบส (base) ได้แก่ adenine (A), thymine (T), guanine (G) และ cytosine (C) จึงทำการสุ่มเอาตัวแทนบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนสายดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณเช่นเดียวกับกระบวนการ DNA replication ภายในเซลล์ (วัชรี และ มนตรี, 2536) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วมาตรวจสอบแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis) ดังนั้นสิ่งมีชีวิตที่มีการเรียงลำดับของเบสที่ต่างกันย่อมมีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน และสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมควรจะมีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกัน

แต่ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการ PCR ของเทคนิค RAPD เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส บางครั้งพบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีความคมชัดต่ำ และแถบดีเอ็นเอบางแถบไม่สามารถทำซ้ำได้ (non reproducible) ในขณะที่ Anuntalabhochai *et al.* (2000) รายงานว่าเทคนิค HAT-RAPD ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วง primer annealing ประมาณ 46 – 62 องศาเซลเซียส ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก มีความคมชัดสูง (high resolution) และแถบดีเอ็นเอเกิดซ้ำได้ (reproducible)

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR เป็นปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยอาศัยหลักการของการเกิด DNA replication ภายในเซลล์ ซึ่งปฏิกิริยา PCR มีองค์ประกอบและขั้นตอนดังนี้ (วัชรี และ มนตรี, 2536 ; Newton and Graham, 1994)

องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR

1. ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA) เช่น genomic DNA, cDNA และชิ้นส่วนดีเอ็นเอ
2. ไพรเมอร์ (primer) คือ oligonucleotide สายสั้น ๆ สายเดี่ยวที่สังเคราะห์ขึ้นประกอบด้วยเบสจำนวนน้อย ในกรณีของเทคนิค RAPD จะประกอบด้วยเบสเพียง 10 ตัว (10 mer) ใช้เป็นตัวจับคู่แบบสุ่มกับดีเอ็นเอต้นแบบ ดังนั้นไพรเมอร์จึงถูกออกแบบให้มีความหลากหลายตามการเรียงลำดับของเบส
3. Deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) ประกอบด้วย dATP (deoxyadenosine triphosphate) dCTP (deoxycytidine triphosphate) dGTP (deoxyguanosine triphosphate) และ dTTP (deoxythymidine triphosphate) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของกรดนิวคลีอิกที่ใช้เติมให้เป็นดีเอ็นเอสายใหม่
4. เอนไซม์ (enzyme) ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้จะต้องทำหน้าที่ในการเติม dNTPs ต่อจากไพรเมอร์เพื่อให้เกิดสายดีเอ็นเอตลอดแนวของดีเอ็นเอต้นแบบเช่น Taq DNA Polymerase, Vent™ DNA Polymerase และ *Tth* DNA Polymerase ซึ่งเอนไซม์จะเริ่มทำงานในช่วง primer extension
5. ส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ buffer และ $MgCl_2$

ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR

ปฏิกิริยาการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลาย ๆ รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. ขั้นตอน Denaturation : เป็นขั้นตอนทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกจากกันเป็นสายเดี่ยว จะเกิดที่อุณหภูมิสูงประมาณ 90 – 95 องศาเซลเซียส
2. ขั้นตอน Primer annealing : เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นแม่พิมพ์ (template) ตรงบริเวณที่มีเบสคู่สมกัน เกิดขึ้นที่อุณหภูมิประมาณ 40 – 60 องศาเซลเซียส

3. ขั้นตอน Primer extension : เป็นขั้นตอนการต่อลำดับนิวคลิโอไทด์เข้าที่ปลาย 3'-OH ของไพรเมอร์ โดยใช้เอนไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น Taq DNA polymerase อุณหภูมิที่ใช้ในช่วงนี้จะอยู่ประมาณ 70 – 75 องศาเซลเซียส

เมื่อทำปฏิกิริยา PCR ซ้ำจำนวนหลายรอบ ทำให้สามารถเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอจากเดิมได้อย่าง exponential โดยมีจำนวนผลผลิต (PCR product) คำนวณได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบ) ถ้าปฏิกิริยา PCR มีประสิทธิภาพ 100 %

การปรับสภาพที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR

เนื่องจากปฏิกิริยา PCR ถูกนำไปประยุกต์ใช้กับงานวิจัยอย่างกว้างขวาง จึงไม่มีสูตรสำเร็จของวิธีการทำ PCR เพียงสูตรเดียว ดังนั้นเมื่อนำเทคนิค PCR ไปใช้ในงานวิจัยเรื่องใหม่จำเป็นต้องมีการปรับสภาพให้เหมาะสมสำหรับงานนั้น ๆ เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นสูงสุด การทำ PCR โดยปราศจากการปรับสภาพที่เหมาะสมอาจก่อให้เกิดปัญหาต่าง ๆ เช่น การไม่ได้ผลผลิตหรือได้ผลผลิตปริมาณต่ำ การมีผลผลิตที่ไม่จำเพาะซึ่งเกิดจากความผิดพลาดของไพรเมอร์ และการเกิด primer-dimer เป็นต้น

วัชรี และ มนตรี (2536) และ วีระพงศ์ (2539) กล่าวถึงการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบและหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR ดังต่อไปนี้

1. การคัดเลือกและออกแบบไพรเมอร์

ในการคัดเลือกหรือออกแบบไพรเมอร์สิ่งที่ควรพิจารณาคือ

1.1 ไพรเมอร์ควรมีขนาดความยาว 10 – 30 นิวคลีโอไทด์ และมีปริมาณ guanine กับ cytosine อยู่ระหว่าง 50-60 %

1.2 การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์ ไม่ควรจะเป็นเบสที่คู่สมกัน เพื่อป้องกันการเกิด primer-dimer

1.3 ค่า Tm (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ควรใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 55 องศาเซลเซียส ถึง 80 องศาเซลเซียส การคำนวณค่า Tm ใช้สูตร คือ 2 องศาเซลเซียส สำหรับ A หรือ T และ 4 องศาเซลเซียส สำหรับ G หรือ C [Tm = (number of A+T)x 2 + (number of G+T)x 4] (Newton and Graham, 1994)

1.4 ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่พอเหมาะควรอยู่ระหว่าง 0.1 - 0.5 M ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปจะส่งเสริมให้เกิดการจับคู่ผิดพลาด (mispriming) และมีการสะสมของผลผลิตที่ไม่จำเพาะมากขึ้น

2. ความเข้มข้นของเอนไซม์ Taq DNA Polymerase

เมื่อเริ่มต้นใช้ควรมีการทดสอบหาความเข้มข้นที่พอเหมาะของเอนไซม์ในช่วงตั้งแต่ 0.5 - 5 หน่วย (unit) ต่อ 100 ไมโครลิตร (µl) การใช้เอนไซม์ในปริมาณที่สูงจะสะสมผลผลิตที่ไม่จำเพาะ แต่ถ้าใช้ในปริมาณต่ำจะทำให้ได้ผลผลิตที่ต้องการในปริมาณน้อย

3. ความเข้มข้นของ magnesium ion

Mg^{2+} มีผลต่อการเกิด primer annealing และความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์ ถ้าในปฏิกิริยามีความเข้มข้นของ Mg^{2+} มากเกินไป ทำให้มีการเพิ่มขยายผลผลิตที่ไม่จำเพาะ แต่ถ้าความเข้มข้นน้อยเกินไปจะลดปริมาณผลผลิตที่ต้องการ โดยทั่วไปในปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ dNTPs แต่ละชนิดในความเข้มข้น 200 ไมโครโมล่าร์ (µM) ความเข้มข้นของ Mg^{2+} จะอยู่ในช่วง 0.5 - 2.0 มิลลิโมล่าร์ (mM) แต่ถ้ามีการใช้ dNTPs ในปริมาณที่สูงกว่านี้ ต้องปรับความเข้มข้นของ Mg^{2+} ให้สูงขึ้น เพื่อให้มี Mg^{2+} ในรูปอิสระเพียงพอต่อการทำปฏิกิริยา PCR เนื่องจาก dNTPs สามารถจับกับ Mg^{2+} ได้

4. ความเข้มข้นของ deoxyribonucleoside triphosphates

dNTPs (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR มีความเข้มข้นของแต่ละชนิดอยู่ระหว่าง 50 – 200 µM โดยต้องปรับให้เป็นกลางที่ pH 7.0 ความเข้มข้นของ dNTPs ที่พอเหมาะจะทำให้ได้ผลผลิตที่จำเพาะถูกต้องและได้ปริมาณผลผลิตสูง

5. องค์ประกอบอื่น ๆ ในปฏิกิริยา PCR

บัฟเฟอร์มาตรฐานที่นิยมใช้คือ 10 – 15 mM Tris-HCl pH 8.3 - 8.8 ที่ 20 องศาเซลเซียส และมี KCl เป็นส่วนผสม เนื่องจาก KCl ทำหน้าที่เร่งการเกิด primer annealing แต่ถ้าความเข้มข้น KCl สูงกว่า 50 mM จะลดประสิทธิภาพการทำงานของ Taq DNA Polymerase

การเติม dimethylsulfoxide (DMSO) 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในส่วนผสมของปฏิกิริยา จะลดประสิทธิภาพการทำงานของ Taq DNA Polymerase ถึง 50%

Gelatin และ Bovine serum albumin (BSA) จะช่วยรักษาความคงสภาพ (stabilize) ของเอนไซม์

6. สภาวะพอเหมาะของขั้นตอน primer annealing

การเลือกอุณหภูมิและระยะเวลาในขั้นตอน primer annealing ขึ้นอยู่กับลำดับเบส ความยาว และความเข้มข้นของไพรเมอร์ อุณหภูมิสำหรับ annealing ควรใช้ต่ำกว่าค่า Tm ของไพรเมอร์ลงไป 5 องศาเซลเซียส

7. สภาวะพอเหมาะของขั้นตอน primer extension

เวลาในการเกิด extension ขึ้นกับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย

อุณหภูมิที่เลือกใช้โดยทั่วไปคือ 72 องศาเซลเซียส อัตราการต่อลำดับเบสอยู่ในช่วง 35 - 100 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาที ขึ้นกับ pH ของบัฟเฟอร์ และความเข้มข้นของเกลือ เวลาในการเกิด extension 1 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียส เพียงพอสำหรับผลผลิตที่มีความยาว 2 กิโลเบส (kb)

8. สภาวะพอเหมาะของขั้นตอน denaturation

โดยทั่วไปอุณหภูมิและระยะเวลาสำหรับการแยกสายดีเอ็นเอ คือ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที หรือ 97 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที ถ้าใช้อุณหภูมิสูงเกินไปหรือเวลานานเกินไป จะไปลดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์

9. จำนวนรอบ (cycle number)

จำนวนรอบที่พอเหมาะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นเริ่มต้นของดีเอ็นเอต้นแบบ และการปรับองค์ประกอบอื่น ๆ ของปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสม สำหรับจำนวนรอบที่พิจารณาควบคู่กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้น มีดังนี้

จำนวนดีเอ็นเริ่มต้น (โมเลกุล)	จำนวนรอบ
3.0×10^5	25-30
1.5×10^4	30-35
1.0×10^3	35-40
50	40-45

10. ปัจจัยอื่น ๆ

ปัจจัยอื่นที่มีผลกระทบต่อการทดลอง เช่น ความสะอาดของเครื่องแก้วและภาชนะต่าง ๆ ที่ใช้ในงาน PCR ควรล้างให้สะอาดปราศจากสารซักฟอก (detergent) น้ำที่ใช้ควรมีความบริสุทธิ์สูง และปราศจากเอนไซม์ nuclease ต่าง ๆ เป็นต้น

หลักการพื้นฐานของอิเล็กโตรโฟรีซีส

อิเล็กโตรโฟรีซีสเป็นการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าในสนามไฟฟ้า โดยส่วนใหญ่พอลิเมอร์ทางชีวภาพ (biological polymer) จะมีประจุ เช่นกรดนิวคลีอิคมีประจุเป็นลบจึงสามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ ดังนั้นเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสจึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของโมเลกุล เช่น โมเลกุลของโปรตีน และกรดนิวคลีอิค เป็นต้น อิเล็กโตรโฟรีซีสมีหลายแบบ ได้แก่ อิเล็กโตรโฟรีซีสแบบโซน แบบกระดาษ แบบเซลลูโลสอะซีเตต และแบบเจล ซึ่งจะแตกต่าง

กันตามชนิดของตัวกลาง ในกรณีของอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเจล (gel electrophoresis) ตัวกลางที่ใช้มีหลายชนิด เช่น แป้ง พอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) และ อกาโรส (agarose) เจลพวกนี้ถูกเคลือบเป็นแผ่นบาง ๆ บนแผ่นพลาสติกหรือเคลือบแผ่นกระจก การใช้ตัวกลางค้ำจุนเป็นเจลเหล่านี้จะให้ผลการแยกสารดีขึ้น โดยเฉพาะเมื่อใช้แยกโปรตีนและกรดนิวคลีอิค ทั้งนี้เนื่องจากตาข่ายร่างแหของเจลจะลดการแพร่และช่วยการแยกซึ่งเป็นผลมาจากคุณสมบัติในการเป็นตะแกรงร่อนโมเลกุล (molecular sieving) (อาภัสสรา, 2537) ดังนั้น gel electrophoresis จึงเป็นวิธีการที่จัดได้ว่ามีประสิทธิภาพสูงและใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษากรดนิวคลีอิคทั้งในแง่ของการแยกขนาดหรือการศึกษาปริมาณ โครงสร้าง และคุณสมบัติบางอย่าง โดยใช้ปริมาณกรดนิวคลีอิคเพียงเล็กน้อย

เนื่องจากกรดนิวคลีอิคมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต (PO_4^{3-}) ทำให้มีประจุเป็นลบเมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก จากโครงสร้างดังกล่าวทำให้สามารถนำไปใช้แยกหรือวิเคราะห์กรดนิวคลีอิค ภายใต้สนามไฟฟ้าโดยผ่านตัวกลางคือเจล ซึ่งเจลที่ใช้กันอยู่ทั่วไปได้แก่ agarose gel และ polyacrylamide gel โดยที่ agarose gel ที่มีความเข้มข้นต่ำมีความสามารถในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 500 คู่เบส ขณะที่ agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูงและ polyacrylamide gel ส่วนใหญ่จะใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 500 คู่เบส (วาสนา, 2539)

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่านเจลของดีเอ็นเอ

วาสนา (2539) ได้กล่าวถึงปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่านเจลของดีเอ็นเอ ดังนี้ คือ

1. ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ (molecular size of the DNA)

ดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะผ่านเจลได้ช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก ดังนั้นในเวลาเท่ากัน และสภาวะเดียวกัน ดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางสั้นกว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก

2. รูปร่างของดีเอ็นเอ (conformation of the DNA)

ในกรณีของพลาสมิดดีเอ็นเอสามารถขดตัวเอง (supercoiled DNA) เพื่อให้มีความเสถียรมากที่สุด แต่เมื่อใดที่เกลียวคู่ของดีเอ็นเอสายคู่เส้นใดเส้นหนึ่งขาดตรงตำแหน่งพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ เกิดช่องขึ้นเรียกว่า nick จะทำให้ขดดีเอ็นเอคลายออก ดีเอ็นเอจะอยู่ในสภาพเป็นวง (circular DNA) และถ้าเกลียวคู่ของดีเอ็นเอขาดออกจากกันทั้งสองเส้น ดีเอ็นเอจะกลายเป็นเส้นตรง (linear DNA) ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างแตกต่างกันแม้ขนาดโมเลกุลเท่ากัน ภายใต้สภาวะเดียวกันจะเคลื่อนที่ผ่านเจลด้วยความเร็วต่างกัน ดีเอ็นเอที่มีลักษณะขดพันตัวเองจะเคลื่อนที่ได้เร็วที่สุด รองลงมาคือดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรง และช้าที่สุดคือดีเอ็นเอที่อยู่ในสภาพเป็นวง

3. ความเข้มข้นของเจลและขนาดช่องว่าง (gel concentration and pore size of the gel)

เจลที่มีความเข้มข้นสูงจะมีช่องว่างระหว่างโมเลกุลน้อย ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านได้ช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นเจลที่มีความเข้มข้นสูงจึงเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก และเจลที่มีความเข้มข้นต่ำจึงเหมาะที่จะใช้แยกดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ และเมื่อค่าความเข้มข้นของเจลคงที่ ระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ผ่านเจลจะแปรผกผันกับขนาดของดีเอ็นเอ

4. บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis buffer)

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในกระบวนการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสมีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถในการรักษาความเสถียรของความเป็นกรด - ด่าง (buffering capacity) ของบัฟเฟอร์แต่ละชนิด การใช้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้เกิดการนำไฟฟ้าสูง และที่แรงดันไฟฟ้า (voltage) คงที่ ความต้านทานไฟฟ้า (resistance) ลดลง กระแสไฟฟ้า (current) จะเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดความร้อนมากขึ้น ดังนั้นการเลือกใช้บัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้นเหมาะสมจึงมีความสำคัญ เพราะเป็นการกำหนดกำลังไฟฟ้าที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ถ้าสูงเกินไปจะทำให้เกิดความร้อนสูงจนอาจทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ ในทางตรงกันข้ามถ้าใช้ต่ำเกินไป จะสามารถขจัดปัญหาการเกิดความร้อนสูงได้ แต่ผลการแยกแถบดีเอ็นเอจะไม่ดี เนื่องจากเวลาที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสจะนานขึ้น และเกิดการแพร่ของดีเอ็นเอ (อาภัสสรา, 2537) นอกจากนี้บัฟเฟอร์แต่ละชนิด ไม่ว่าจะเป็น TBE buffer (Tris Borate/EDTA buffer) หรือ TAE buffer (Tris Acetate/EDTA buffer) จะมีผลต่อคุณภาพของแถบดีเอ็นเอ เช่น ความคมชัดของแถบดีเอ็นเอ เป็นต้น

5. กระแสไฟฟ้า

โดยทั่วไปการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสมักทำในสภาวะแรงดันไฟฟ้าคงที่ ดังนั้นค่าแรงดันไฟฟ้า จึงมีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ โดยค่าความต้านทานของตัวกลาง (gel และ buffer) มาเกี่ยวข้องด้วย จากสมการ Ohm's law ; V=IR เมื่อ V คือค่าแรงดันไฟฟ้า หรือ voltage (volts), I คือกระแสไฟฟ้า หรือ current (milliamps) และ R คือค่าความต้านทาน หรือ resistance (ohms) ของตัวกลางในสนามไฟฟ้า ดังนั้นเมื่อผ่านแรงดันไฟฟ้าจำนวนหนึ่งเข้าไปในวงจร จะส่งผลให้กระแสไฟฟ้าเข้าไปในตัวกลางนั้น แรงดันไฟฟ้าเมื่อผ่านตัวกลางจะมีค่าเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับความต้านทานของตัวกลางนั้น ทำให้เกิดกระแสไฟฟ้า ซึ่งผลักดันให้ดีเอ็นเอเกิดการเคลื่อนที่ขึ้น ทั้งนี้ความต้านทานของตัวกลางจะแปรผกผันกับความหนาของตัวกลาง ตลอดจนปริมาณประจุในบัฟเฟอร์ โดยทั่วไปเมื่อใช้ค่าแรงดันไฟฟ้าที่เหมาะสม ความเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้นตรง จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณแรงดันไฟฟ้า (voltage เพิ่มขึ้นดีเอ็นเอจะ

เคลื่อนที่เร็วขึ้น) แต่ถ้าค่าแรงดันไฟฟ้ามีค่าสูงเกินไป ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ไม่สม่ำเสมอ ทำให้ความสามารถในการแยกแถบดีเอ็นเอลดลง

การทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสเริ่มจากการเตรียมแผ่น agarose gel โดยจะให้มีความเข้มข้นเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอที่ทำการศึกษา วิธีการคือผสมผง agarose กับบัฟเฟอร์ให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มให้ละลาย หลังจากนั้นเทสารละลาย agarose ลงบนถาดแล้วเสียบแผ่น comb ลงไป ปล่อยให้เจลแข็งตัวก่อนนำไปทำอิเล็กโตรโฟรีซีสต่อไป สำหรับความหนาของแผ่นเจล โดยทั่วไปจะใช้แผ่นเจลหนา 5 มิลลิเมตร ถ้าแผ่นเจลหนาเกินไปจะทำให้ความสามารถในการแยกแถบดีเอ็นเอไม่ดีเท่าที่ควร แต่ถ้าแผ่นเจลที่บางกว่า 3 มิลลิเมตร แผ่นเจลก็จะแตกหักง่ายดังนั้นขณะที่เตรียมจึงต้องเพิ่มความระมัดระวังให้มากขึ้น ก่อนที่จะนำดีเอ็นเอไปทำอิเล็กโตรโฟรีซีสจะต้องผสมดีเอ็นเอกับสารละลายที่มีความหนาแน่นมากกว่าบัฟเฟอร์ สารนั้นเรียกว่า DNA loading buffer หรือ loading dye ซึ่งเป็นสารมีสีเช่น bromophenol blue จะใช้เป็นสัญญาณบอกถึงระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไป เมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซีสเรียบร้อยแล้วจะทำการตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยการย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide ซึ่งเป็นสารที่มีโครงร่างแบนสามารถแทรกเข้าไประหว่างเบสของดีเอ็นเอ เมื่อกระตุ้นด้วยแสง UV (ultra violet) ที่ความยาวคลื่นประมาณ 300 นาโนเมตร จะเรืองแสงออกมาทำให้สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอได้ การตรวจดูแถบดีเอ็นเอจะต้องทำในห้องมืดหรือใช้อุปกรณ์ที่กันไม่ให้แสงสว่างหรือแสงแดดไปบดบังแสงฟลูออเรสเซนต์จากแถบดีเอ็นเอ และผู้ตรวจสอบจะต้องสวมแว่นตาป้องกันอันตรายจากแสง UV ทุกครั้ง

เทคนิค RAPD และ HAT – RAPD ในการวิเคราะห์พันธุกรรมพืช

สุมน และ คณะ (2539) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบพันธุ์มังคุดในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างมังคุด 25 ตัวอย่าง จากการตรวจสอบกับ 152 ไพรเมอร์ มีเพียง 26 ไพรเมอร์ (17 เปอร์เซ็นต์) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของมังคุดได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ 12 ไพรเมอร์ ที่ให้ผลชัดเจนในการตรวจสอบกับดีเอ็นเอทั้งหมด พบว่ามังคุดแต่ละตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน จึงสรุปว่าพันธุ์มังคุดดั้งเดิมน่าจะมีเพียงพันธุ์เดียว แต่การปลูกและขยายพันธุ์ต่อมาทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นเพียงเล็กน้อยในธรรมชาติ

จันทร์จีรา (2541) นำเทคนิค RAPD มาวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) จำนวน 20 พันธุ์ จากการใช้ไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 69 ไพรเมอร์ มี 5 ไพรเมอร์ ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ทั้งหมด 60 แถบและมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 200 – 2000 คู่เบส เมื่อทำการวิเคราะห์ dendrogram สามารถแบ่งลิ้นจี่ออกเป็น 2 กลุ่ม และในแต่ละกลุ่มยังแบ่งพันธุ์ลิ้นจี่ได้อีกกลุ่มละ 3 กลุ่มย่อย

วันทนา (2541) ได้นำเทคนิค RAPD มาใช้ในการจำแนกความแตกต่างในข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์ โดยสุ่มใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 เบส จำนวน 9 ไพรเมอร์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า ไพรเมอร์ขนาด 10 เบส จำนวน 5 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงถึงความแตกต่างของข้าวฟ่างทั้ง 6 สายพันธุ์ จำนวน 13 แถบ ซึ่งสามารถแสดงความแตกต่างของข้าวฟ่างแต่ละสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจนจากการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ปรีชา (2542) ได้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับดีเอ็นเอของข้าวหอมพื้นเมือง 9 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค RAPD ทดสอบกับ 6 ไพรเมอร์ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดรวม 42 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 341 – 1400 คู่เบส และดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างจีโนมของข้าวทั้ง 9 พันธุ์ มีจำนวน 23 แถบ (54%) และจากการประเมินระดับความหลากหลายของดีเอ็นเอ พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.01 – 0.64 ซึ่งเป็นระดับความหลากหลายของดีเอ็นเอที่มีความผันแปรมาก นั้นอธิบายได้ว่ามีสาเหตุจากข้าวทั้ง 9 พันธุ์นี้มีฐานพันธุกรรมที่กว้าง

Lu *et al.* (1996) ได้นำเทคนิค RAPD มาใช้ในการแยกต้นตอของท้อ (*Prunus persica* L.) จำนวน 18 พันธุ์ (cultivars) โดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์จำนวน 80 ไพรเมอร์ มี 20 ไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจำนวน 40 แถบ แต่มีเพียง 6 ไพรเมอร์ คือ OPC-03, OPC-09, OPC-11, OPL-13, OPL-20 และ OPZ-09 เท่านั้นที่แยกต้นตอท้อทั้งหมดได้

Sosinski และ Douches (1996) ใช้เทคนิค RAPD ในการหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) 46 พันธุ์ (cultivars) โดยทดสอบ 20 ไพรเมอร์ มี 16 ไพรเมอร์หรือประมาณ 64% ที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอซึ่งมีโมเลกุลขนาด 600 – 1700 คู่เบส และสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของมันฝรั่งได้

Al-Zahim *et al.* (1997) ได้จัดจำแนกและหาความสัมพันธ์ของกระเทียม ได้แก่ *Allium sativum* var. *sativum* 11 พันธุ์, *A. sativum* var. *ophiscorodon* 11 พันธุ์ และ *A. longicurpis* (พันธุ์ป่า) 5 พันธุ์ พบว่า เมื่อใช้ 35 ไพรเมอร์ มี 26 ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 292 แถบ และมีแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ polymorphic ถึง 63 แถบ (21%) ทำให้สามารถจัดจำแนกกระเทียมเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรก ได้แก่ กระเทียมพันธุ์ *ophiscorodon* และพันธุ์ป่าทั้งหมด ส่วนกลุ่มที่ 2 ได้แก่ กระเทียมพันธุ์ *sativum*

Fofana *et al.* (1997) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) จำนวน 46 accessions ซึ่งประกอบด้วย 16 พันธุ์ป่ากับ 30 พันธุ์ปลูก เมื่อนำเทคนิค RAPD มาวิเคราะห์พบว่า มีไพรเมอร์จำนวน 12 ไพรเมอร์ จาก 33 ไพรเมอร์ ที่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจำนวน 172 แถบ และสามารถบ่งบอกความแตกต่างโดยแบ่งพืชตัวอย่างที่นำมาศึกษา

ได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม mesoamerican และกลุ่ม andean โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี Analysis of Molecular Variance (AMOVA)

Jianhua *et al.* (1997) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมในพีทูเนีย (petunia) และซิคลาเมน (cyclamen) ซึ่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมจะแสดงออกในรุ่นพ่อแม่ที่เป็นสายพันธุ์แท้ และจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เทคนิคนี้สามารถใช้ประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้มีผลต่อการคัดเลือกพันธุ์ในแต่ละรุ่นของเมล็ดดอกไม้ทั้ง 2 ชนิด

Ling *et al.* (1997) ได้นำเทคนิค RAPD มาแยกความแตกต่างของต้นคริสต์มาสหรือ poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Wild ex Klotzch) 9 พันธุ์ ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันมากจนไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ จากการใช้ 60 ไพรเมอร์ มี 57 ไพรเมอร์ ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR แต่มีเพียง 9 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอซึ่งมีลักษณะเป็น polymorphic เมื่อวิเคราะห์ dendrogram สามารถแบ่ง poinsettia ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกได้แก่ พันธุ์ Jingle Bell, Supjibi และ V-17 Angelika ส่วน V-14 Glory, Red Sails, Jolly Red และ Freedom เป็นกลุ่มที่ 2 แสดงว่าเทคนิค RAPD มีประสิทธิภาพในการแยกความแตกต่างและหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของต้นคริสต์มาสได้

Weir *et al.* (1997) ได้นำเทคนิค RAPD มาแยกความแตกต่างของต้น Saskatoon (*Amelanchier* spp.) 16 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 9 นิวคลีโอไทด์จำนวน 8 ไพรเมอร์ สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 98 แถบ มี 54 แถบที่สามารถเกิดซ้ำได้ โดยเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ polymorphic 29 แถบ และ monomorphic 25 แถบ

Cao *et al.* (1998) กล่าวว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในพืชชนิดเดียวกัน จะเป็นพื้นฐานในการพัฒนาพืชชนิดนั้น จึงได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) ชนิดย่อย (subspecies) *spelta* จำนวน 69 accessions และข้าวสาลีชนิดย่อย *macha* จำนวน 32 accessions โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าข้าวสาลีชนิดย่อย *macha* มีความหลากหลายมากกว่าข้าวสาลีชนิดย่อย *spelta* ดังนั้นเทคนิค RAPD สามารถใช้คาดคะเนความหลากหลายทางพันธุกรรมได้

Nicese *et al.* (1998) ได้ใช้เทคนิค RAPD ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ walnut (*Juglans regia* L.) 19 จีโนไทป์ พบว่า จากการใช้ไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 72 ไพรเมอร์ มี 23 ไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ polymorphic ขนาด 250 – 1700 คู่เบส จึงสามารถแบ่ง walnut ได้เป็น 2 กลุ่ม และสามารถตรวจสอบความแตกต่างของ walnut แต่ละจีโนไทป์ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์ได้

Sagredo *et al.* (1998) กล่าวว่าเทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่ถูกประยุกต์ใช้เพื่อการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของมันเทศ (*Ipomoea batatas* L.) ในประเทศชิลี ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์มันเทศ 28 พันธุ์ (cultivars) จากทั่วโลก พบว่ามี 18 ไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอซึ่งมีลักษณะ polymorphic รวมทั้งหมด 124 แถบ โดยเฉลี่ย 6.9 แถบต่อไพรเมอร์ จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่ามันเทศมีความแปรรวนทางพันธุกรรมสูง นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งมันเทศที่นำมาศึกษาออกได้เป็น 2 กลุ่ม

Ahmad (1999) ได้นำเทคนิค RAPD มาใช้แยกความแตกต่างในพืชสกุล *Cicer* จำนวน 9 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 75 ไพรเมอร์ (UBC#1-1 – UBC#1-75) มีเพียง 8 ไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอใน *Cicer* ทั้งหมดได้ โดยให้แถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 115 แถบ และเมื่อนำแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติ (cluster analysis) สามารถแบ่ง *Cicer* ออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งกลุ่มแรกได้แก่ *C. arietinum*, *C. reticulatum* และ *C. echinospermum* กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *C. chorassanicum* และ *C. yamashitae* กลุ่มที่ 3 ได้แก่ *C. bijugum*, *C. judaicum* และ *C. pinnatifidum* กลุ่มที่ 4 ได้แก่ *C. cuneatum* การศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าเทคนิคนี้เป็นวิธีการพื้นฐานที่ใช้ศึกษาประวัติบรรพบุรุษหรือหาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของ *Cicer* ได้

นอกจากนี้ Fuentes *et al.* (1999) ยังกล่าวว่า เทคนิค RAPD และ AFLP เป็นเทคนิคที่พิสูจน์แล้วว่าสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวได้

Galderisi *et al.* (1999) ได้นำเทคนิค RAPD มาใช้ในการคาดคะเนความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในพืช โดยใช้แยกความแตกต่างของ *Ficus carica* จำนวน 6 สายพันธุ์ พบว่ามีจำนวน 5 ไพรเมอร์ ได้แก่ U1, U3, U4, U11 และ U144 ที่ให้แถบดีเอ็นเอซึ่งสามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ และการตรวจสอบครั้งนี้มีความสำคัญมาก เนื่องจากหากหา marker สำหรับแยกแต่ละสายพันธุ์ได้จะทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะควบคุมคุณภาพของผลผลิตและป้องกันการหลอกลวงทางการค้าได้

Gutman *et al.* (1999) ได้รายงานการนำเทคนิค RAPD มาใช้เพื่อจำแนกความแตกต่างทางจีโนไทป์ของต้น Marula (*Sclerocarya birrea* subsp. *caffra*) จำนวน 24 จีโนไทป์ โดยทดสอบกับ 20 ไพรเมอร์ พบว่า 15 ไพรเมอร์ สามารถทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ แต่มีเพียง 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ A01, A03, A13 และ A18 เท่านั้น ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ polymorphic ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของพืชกลุ่มนี้ได้

Jan *et al.* (1999) ได้นำเทคนิค RAPD มาวิเคราะห์พันธุกรรมของพืชกลุ่มกุหลาบ เพื่อสนับสนุนข้อมูลอนุกรมวิธานที่มีอยู่ก่อนแล้ว พบว่าเมื่อนำกุหลาบ 119 accessions จาก 36 ชนิด มาทำการวิเคราะห์ สามารถแบ่งกุหลาบออกเป็น 2 กลุ่ม โดยที่กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย subgenus

Hesperhodos, *Platyhodon* และ 2 sections ของ subgenus *Eurosa* ได้แก่ *Cassiorhodon* และ *Caroline* ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 5 sections ของ subgenus Eurosa ได้แก่ *Banksianae*, *Synstylae*, *Chinenses*, *Pimpinellifoliae* และ *Laevingatae* จากการศึกษาครั้งนี้ได้ให้ข้อเสนอแนะว่าควรนำเอา section *Cassiorhodon* และ *Caroline* ออกจาก subgenus *Eurosa* เพราะมีความแตกต่างจากกลุ่มของ 5 sections ที่กล่าวมาข้างต้น

Joyce *et al.* (1999) ได้ใช้เทคนิค RAPD-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสายพันธุ์แท้ (inbred line) ของ white clover (*Trifolium repens* L.) เพื่อศึกษาความใกล้ชิดระหว่างสายพันธุ์ ซึ่งตามปกติจะถูกประเมินและเปรียบเทียบจากการเกิด heterosis ในการทำลูกผสม การศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้สามารถจำแนกตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษาได้เป็น 4 กลุ่ม

Li และ Midmore (1999) ได้ทำการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis* (Burm.f.) Hensch) ซึ่งเป็นพืชอุตสาหกรรมของประเทศออสเตรเลีย พบว่าการนำเทคนิค RAPD มาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใน 28 พันธุ์ โดยทดสอบกับ 52 ไพรเมอร์ มีเพียง 14 ไพรเมอร์ ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 96 แถบ จึงสามารถแยกตัวอย่างจากไต้หวัน (พันธุ์ Shu-Lin), จีน (พันธุ์ Da Hong Pao), New South Wales, Australia (ไม่ทราบสายพันธุ์) และ สหรัฐอเมริกา (ไม่ทราบสายพันธุ์) ออกจากพันธุ์ที่เหลือของออสเตรเลีย การที่พันธุ์ที่ปลูกในออสเตรเลียต่างจากกลุ่มอื่น ๆ อาจจะเกิดจากความผิดพลาดในการกำหนดแถบดีเอ็นเอและการเก็บตัวอย่างมากกว่าเกิดจากความแปรปรวนทางพันธุกรรม

Nebauer *et al.* (1999) ได้นำเทคนิค RAPD มาประเมินและหารูปแบบความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Digitalis obscura* L. (Scrophulariaceae) จำนวน 50 ต้น ใน 6 ประชากร จากการศึกษาพบว่า มี 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ OPA10, OPA13, OPB7, OPC5, OPC7 และ OPC8 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 350 – 4000 คู่เบส จำนวน 96 แถบ ซึ่งแถบดีเอ็นเอ 90.6 % มีลักษณะ polymorphic เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Analysis of Molecular Variance (AMOVA) และ Homogeneity of Molecular Variance (HOMOVA) พบว่า ประชากรทั้ง 6 กลุ่มมีความแตกต่างกันในเรื่องของความแปรปรวนทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการศึกษาหาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วย UPGMA แสดงให้เห็นว่าลักษณะทางภูมิศาสตร์ (geography) และลักษณะทางพันธุกรรมไม่มีความสัมพันธ์หรือเกี่ยวข้องกัน

Ruas *et al.* (1999) ได้นำเทคนิค RAPD มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Chenopodium* โดยตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษามีทั้งหมด 19 accessions จาก 6 ชนิด เมื่อทำการวิเคราะห์ dendrogram สามารถแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ได้แก่ 3 สายพันธุ์ ของ *C. nuttalliae* กลุ่มที่ 2 ได้แก่ 8 สายพันธุ์ ของ *C. nuttallia* กับ 2 พันธุ์ป่าของ *C. quinoa* กลุ่มที่ 3

ได้แก่ *C. berlandieri* และ *C. album* กลุ่มที่ 4 ได้แก่ 2 accessions ของ *C. pallidicauale* และกลุ่มที่ 5 ได้แก่ 2 accessions ของ *C. ambrosiades* ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงความสัมพันธ์ของพืชในระดับชนิด ดังนั้นเทคนิค RAPD จึงสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชสกุลนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Shimada *et al.* (1999) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Prunus* โดยใช้เทคนิค RAPD จากการใช้ 237 ไพรเมอร์ พบว่ามีเพียง 20 ไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 283 แถบ ซึ่งจำนวน 68 แถบมีลักษณะเป็น polymorphic จึงสามารถนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของพืชภายในสกุล *Prunus* ได้

Vidal *et al.* (1999) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของต้นองุ่น (*Vitis vinifera* L.) ซึ่งมีถิ่นกำเนิดจากฝรั่งเศสและสเปนโดยใช้เทคนิค RAPD พบว่า เมื่อนำต้นองุ่น 32 สายพันธุ์ มาทดสอบด้วย 100 ไพรเมอร์ มีเพียง 33 ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ polymorphic เมื่อวิเคราะห์ dendrogram ที่ได้สามารถแบ่งองุ่นออกเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งเมื่อทำการศึกษาด้านภูมิศาสตร์พบว่า องุ่นทั้ง 3 กลุ่มถูกแบ่งโดยอิทธิพลของเขต Atlantic และเขต Mediterranean

Anuntalabhochai *et al.* (2000) รายงานว่าเทคนิค HAT-RAPD ซึ่งใช้อุณหภูมิในช่วง primer annealing มากกว่าหรือเท่ากับ 46 องศาเซลเซียส ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัดสูง (high resolution) และการทดลองสามารถทำซ้ำได้โดยทำการศึกษาในลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.)

Arifin *et al.* (2000) ใช้เทคนิค RAPD คาดคะเนความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในการเก็บรวบรวมหอมหัวเล็ก (*Allium cepa* var. *ascalonicum*) และ *Allium x wakegi* (interspecific hybrid) โดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 12 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 100 ไพรเมอร์ มี 20 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอลักษณะ polymorphic ขนาด 240- 2200 คู่เบส และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมทางสถิติสามารถแยกหัวหอมทั้ง 2 กลุ่มออกจากกันได้อย่างชัดเจน

Bai *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายและความใกล้ชิดทางพันธุกรรมใน tef [*Eragrostis tef* (Zucc) Trotter] โดยใช้เทคนิค RAPD ซึ่งตัวอย่างที่นำมาศึกษามีจำนวน 47 accessions โดย 3 accessions เป็น *E. pilosa* 6 accessions เป็น *E. curvula* และ 38 accessions เป็น *E. tef* ผลการศึกษาพบว่า ในพันธุ์ป่าจะมี polymorphic สูง ขณะที่ tef บาง accessions มีระดับ polymorphic ต่ำ นอกจากนี้พันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่าแยกออกจากกันโดยใช้ไพรเมอร์ชนิดต่าง ๆ ส่วน accessions จาก *E. curvula* และ *E. pilosa* สามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้ไพรเมอร์เพียงตัวเดียว ในการทดลองครั้งนี้สุ่มเลือกใช้ไพรเมอร์ 25 ไพรเมอร์ โดยมี 4 ไพรเมอร์ ที่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ monomorphic และ 21 ไพรเมอร์ ที่สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอรวม 149 แถบ มี 56 แถบ มีลักษณะ polymorphic เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วย cluster analysis พบว่า tef

[*Eragrostis tef* (Zucc) Trotter] มีความใกล้ชิดกับ *E. pilosa* ถึง 45% ซึ่งสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า *E. pilosa* เป็นต้นกำเนิดหรือเป็นพื้นฐานทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ tef

Claros *et al.* (2000) ได้ทำการศึกษาหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และจัดจำแนกต้นโอลีฟ (*Olea europaea* L.) จำนวน 56 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค RAPD และ AP-PCR (arbitrarily primer PCR) สามารถแบ่งต้นโอลีฟที่นำมาศึกษาออกเป็น 3 กลุ่มหลัก ได้แก่ กลุ่มพันธุ์ป่า กลุ่มพันธุ์พื้นเมือง และกลุ่มพันธุ์อื่น ๆ

เนื่องจากเทคนิค RAPD เป็นวิธีการที่รวดเร็วและมีความน่าเชื่อถือในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตดังนั้น Gwanama *et al.* (2000) จึงนำเทคนิคนี้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของฟักทอง (*Cucurbita moschata*) พบว่ามี 16 ไพรเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอรวมทั้งหมด 144 แถบ แต่มีเพียง 39 แถบ (23%) ที่สามารถใช้แยกความแตกต่างของ 31 จีโนไทป์ ของพืชชนิดนี้ได้

Kaundun *et al.* (2000) ทำการศึกษาความหลากหลายของต้นชา (*Camellia sinensis* L. var. *sinensis*) จำนวน 27 accessions ที่มาจากเกาหลี ญี่ปุ่น และไต้หวัน โดยใช้เทคนิค RAPD จากการใช้ 50 ไพรเมอร์ มี 17 ไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ polymorphic 58 แถบ และมีอย่างน้อย 3 ไพรเมอร์ที่สามารถแยกต้นชาทั้งหมดได้ เมื่อนำดัชนี Shannon มาใช้เพื่อแบ่งความหลากหลายภายในและระหว่างกลุ่มของต้นชา พบว่ามีความแปรปรวนภายในกลุ่ม 71 เปอร์เซ็นต์ และระหว่างกลุ่ม 29 เปอร์เซ็นต์ ความหลากหลายภายในกลุ่มจะพบมากในต้นชาที่มาจากเกาหลี ไต้หวัน และญี่ปุ่นตามลำดับ

Selbach และ Cavalli-Molina (2000) ได้นำเทคนิค RAPD มาอธิบายลักษณะของข้าวบาร์เล่ย์ (barley) จากบราซิล (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) จำนวน 13 สายพันธุ์ โดยทดสอบกับ 18 ไพรเมอร์ ซึ่งสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 160 – 2500 คู่เบส มีแถบดีเอ็นเอที่เกิดทุกครั้งจำนวน 221 แถบ และมี 206 แถบมีลักษณะ polymorphic (93%) จากการศึกษาครั้งนี้พบแถบดีเอ็นเอที่เป็น marker ในแต่ละสายพันธุ์หรือกลุ่มสายพันธุ์ที่นำมาศึกษา

Te-chato (2000) ได้นำเทคนิค RAPD มาใช้ในการประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรมของมังคุด (*Garcinia mangostana* L.) โดยชิ้นส่วนพืชที่นำมาศึกษาได้แก่ แคลลัสและสายต้นที่เกิดจากการชักนำจากใบอ่อน ผลของการศึกษาพบว่า ชิ้นส่วนพืชจำนวน 20 มิลลิกรัม สามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอได้ 5 – 30 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่เหมาะสมในปฏิกิริยา PCR คือ 3 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ให้ผลดีคือ 41 องศาเซลเซียส จากการใช้ 8 ไพรเมอร์เพื่อสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอพบว่า ไม่เกิดการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะ polymorphic ในแต่ละสายต้น มีแถบดีเอ็นเอลักษณะ monomorphic จำนวน 5 – 15 แถบ

จากลักษณะแถบดีเอ็นเอดังกล่าวใช้แยกความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแคลลัสและสายต้นมังคุดได้ ซึ่งในอนาคตเทคนิคนี้สามารถนำมาหาความใกล้ชิดหรือระยะห่างทางพันธุกรรมของพืชที่ขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้

Qian และ Hong (2001) ได้ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของข้าวป่า (*Oryza granulata*) ทั้งภายในและระหว่างกลุ่มประชากรจากประเทศจีน 5 กลุ่ม คือจาก Yunan 3 กลุ่ม และ Hainan 2 กลุ่ม โดยใช้เทคนิค RAPD ผลการศึกษาพบว่าเมื่อเลือกสุ่มใช้ 79 ไพรเมอร์ มีเพียง 20 ไพรเมอร์ ที่ตอบสนองต่อดีเอ็นเอต้นแบบและให้แถบดีเอ็นเอที่เสถียรขนาด 220 – 2000 คู่เบส จำนวน 199 แถบ (9.95 แถบ/ไพรเมอร์) โดย 61 แถบ (30.65%) มีลักษณะ polymorphic และเมื่อนำผลการเกิดแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ด้วย cluster analysis (UPGMA) จะแสดง dendrogram ที่แยกกลุ่มประชากรของ Yunan และ Hainan ออกจากกันอย่างชัดเจน

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University