บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

2.1 การจำแนก *Oryza* species

สกุล *Oryza* มีทั้งหมด 22 ชนิด (ตาราง 1) ประกอบด้วยข้าวปลูก 2 ชนิด คือ *O. sativa* L และ *O. glaberrima* Sterd. และยังมีข้าวป่าอีกประมาณ 20 ชนิด (Vaughan, 1994) ที่มีความสัมพันธ์กันซึ่งจะเป็นพวกหญ้าอยู่ใน family *Poaceae* เมื่อศึกษาในระดับจีโนมของข้าวปลูกทั้งสองชนิด พบว่า จำนวนโครโมโซมพื้นฐานของข้าวมีจำนวน 12 โครโมโซมและเป็นจีโนม A ซึ่งข้าวป่าที่ใกล้เคียงกันก็มีจีโนมเหมือนกัน (Kataya, 1997) ทำให้เชื่อกันว่าข้าวป่าเป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูก (Oka, 1988)

Xie and Zhou (1998) ได้ทำการศึกษาบรรพบุรุษของข้าวปลูกโดยใช้เทคนิค RAPD analysis (Random amplified polymorphic DNA) พบว่าข้าวป่าที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับข้าวปลูก และถือได้ว่าเป็นบรรพบุรุษของข้าวปลูกพวก Indica และ japonica คือ *O. nivara* และ *O. rufipogon* ซึ่งดูได้จากค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน ที่มีค่าใกล้เคียงกันมากที่สุด

Chang *et al.* (1991) รายงานว่า ข้าวปลูกในปัจจุบันมีวิวัฒนาการมาจากข้าวป่าเป็นเวลานานกว่า 7,000 ปี ซึ่งนอกจากจะวิวัฒนาการโดยธรรมชาติแล้ว ข้าวปลูกส่วนใหญ่ได้มาจากการปรับปรุงพันธุ์สายพันธุ์ของ *O. rufipogon* ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น annual type (ชนิดฤดูเดียว), perennial type (ชนิดหลายฤดู) และ intermediate type (ชนิดที่ก้ำกึ่งระหว่างฤดูเดียวกับหลายฤดู) (Oka, 1988) ประชากรของ perennial type ส่วนใหญ่พบขึ้นริมคลองชลประทาน และคูน้ำข้างๆ ทาง มีความลึกของน้ำผันแปรอยู่ตั้งแต่ 0 เมตรถึง 1 เมตร แต่ในพื้นที่ที่ขึ้นอยู่กับน้ำขึ้นน้ำลงจะมีระดับน้ำผันแปรตั้งแต่ 1 เมตร ถึง 1.5 เมตร ข้าวป่าจะมีความสูง 1-3 เมตร มีความยาวอับเกสรตัวผู้ 4-5 ม.ม. และมีช่อดอกที่ยาวมาก ระยะการเจริญเติบโตตั้งแต่ออกดอกจนถึงสุกแก่จะขึ้นอยู่กับลักษณะทางสัณฐานของข้าวเองและสภาพแวดล้อมที่ข้าวขึ้นอยู่นั้น (Morishima *et al.*, 1996)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 จำนวนโครโมโซม สัญลักษณ์จีโนมและแหล่งที่แพร่กระจายอยู่ของชนิด*Oryza*

Section, species	2*n*	Genome	Geographical distribution
Section Oryzae			
sativa L.	24	*AA*	Worldwide, cultivated
rufipogon Griff. (=*perennis* Moench)	24	*AA*	Asia, America
barthii A. Chev. (=longistaminata A. Chev. Et Roehr.)	24	*AA*	Africa
glaberrima Steud	24	*AA*	Africa, cultivate
Section Oryzae			
breviligulata A. Chev et Roehr. (*barthii* in the sense of Clayton, 1968)	24	*AA*	Africa
australiensis Domin	24	*EE*	Australia
eichingeri A. Peter	24	*CC*	Africa
punctata Kotschy	24, 48	*BB*	Africa
officinalis Wall.	24	*BBCC*	Asia
minuta J.S. Presl	48	*CC*	Asia
latifolia Desv.	48	*BBCC*	America
alta Swallen	48	*CCDD*	America
grandiglumis Prod	48	*CCDD*	America
Section Schlichterianae		*CCDD*	
Schlechteri Pilger			New guinea
Section Granulatae			
Meyeriana Baill. (granulata Nees et Arn.)	24		Asia
Section Ridleyanae			
ridleyi Hook. f.	48		Asia
longiglumis Jansen	48		New guinea
Section Angustifoliae			
brachyantha A. Chev. Et Roehr.	24		Africa
angustifolia Hubbard	24	*FF*	Africa

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 (ต่อ)

Section, species	2*n*	Genome	Geographical distribution
perrieri A. Camus	24		Malagasy
tesseranti A. Chev.	24		Africa
Section Coarctatae			
coarctata Roxb.	48		Asia

ที่มา: ดัดแปลงจาก Morishima *et al.* (1984)

2.2 โครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรข้าวป่า

ข้าวป่าเป็นพืชที่ผสมข้ามซึ่ง Barbier and Ishihama (1991) ได้ศึกษาอัตราผสมข้ามของข้าวป่าที่พบในประเทศไทย พบว่าอัตราการผสมข้ามในข้าวป่าชนิดหลายฤดูมีค่าประมาณ 50 % และข้าวป่าฤดูเดียวมีอัตราการผสมข้ามประมาณ 7 % Oka และ Morishima *et al.* (1996) พบว่าข้าวป่าในแอฟริกันมีอัตราการผสมข้ามสูง ส่วนข้าวป่าในเอเชียชนิดหลายฤดูมีอัตราการผสมข้ามสูงกว่าชนิดฤดูเดียวแต่ข้าวป่ายังสามารถขยายพันธุ์ด้วยวิธีอื่นๆ ได้อีกไม่ว่าจะเป็นแบบอาศัยเพศหรือไม่อาศัยเพศ ดังนั้นโครงสร้างทางพันธุกรรมของข้าวป่าจะได้รับผลกระทบจากระบบการสืบพันธุ์ของพืชเอง ไม่ว่าจะเป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศหรือไม่อาศัยเพศ การผสมชิดหรือผสมภายในเครือญาติและการผสมระหว่างเครือญาติ และปัจจัยต่างๆอีกที่มีผลเกี่ยวข้อง เช่น ขนาดประชากรนั้น รูปแบบการแพร่กระจาย (แพร่กระจายกว้างหรือแพร่เฉพาะท้องถิ่นนั้น แพร่กระจายต่อเนื่องหรือไม่ต่อเนื่อง) การแลกเปลี่ยนยีนจากพืชชนิดอื่น (ละอองปลิวตกลงมาหรือเมล็ดปะปนกันไป) สิ่งแวดล้อมของสภาพที่อยู่แตกต่างกัน รวมไปถึงลักษณะของพืชแตกต่างกัน

สำหรับความผันแปรทางพันธุกรรมของลักษณะทางปริมาณ สามารถประมาณได้จากความแปรปรวนทางลักษณะบวกกับความแปรปรวนทางสิ่งแวดล้อมในประชากรที่ศึกษา ในข้าวป่าชนิดหลายฤดูมีความแปรปรวนกว้างกว่าข้าวป่าชนิดฤดูเดียว (Morishima *et al.*, 1996) นอกจากนั้นระบบการสืบพันธุ์ยังมีผลต่อความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากร ในประชากรที่การผสมข้ามจะมีการเพิ่ม heterozygosity และ genetic heterogeneity รวมทั้งผลที่ได้จากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนั้นทำให้สามารถเก็บรักษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมไว้ได้ (Frankel *et al.*, 1991)

การกระจายของความแปรปรวนของลักษณะในความยาวรวงและความกว้างของรวง พิจารณาจากข้าวหลายสายพันธุ์พบว่าพวกที่เป็น spontanea forms จะมีความแปรปรวนมาก ซึ่งในชนิดหลายฤดูความแปรปรวนจะมากกว่าชนิดฤดูเดียว (Morishima, 1991) แต่ความแปรปรวน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภายในประชากรและระหว่างประชากรนั้นเราพบว่าชนิดฤดูเดียวจะมีค่าเฉลี่ยความแปรปรวนที่มากกว่าชนิดหลายฤดู โครงสร้างทางพันธุกรรมสามารถอธิบายได้ชัดเจนโดยใช้ความถี่ของ isozyme ชุดโครโมโซม AA ของ *O. rufipogon* ที่ Morishima (1991) ศึกษาพบว่ามี alleles ของ isozyme อยู่ 6 ตำแหน่ง โดยให้รหัส คือ *Acp-1, Cat-1, Pgi-1, Pgi-2, Pox-1* และ *Pox-2*

ความผันแปรระหว่างกลุ่มของข้าวป่า (subpopulation) ที่พบจะมีความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทาง isozyme ด้วย Morishima *et al.* (1996) พบว่าประชากรของ intermediate perennial-annual type ที่จังหวัดอ่างทองประเทศไทย สามารถแบ่งได้เป็น 9 กลุ่ม เส้นผ่านศูนย์กลางของแต่ละกลุ่มประมาณ 3-5 เมตร และขึ้นอยู่ในทุกๆ 2-10 เมตร ระหว่างกลุ่มนั้นจะมีวัชพืชใบแคบ *Brachiaria mutica* (หญ้าขน) และหญ้าชนิดต่างขึ้นอยู่ อาจเป็นไปได้ที่ประชากรเหล่านี้จะเกิดการผสมข้ามกับประชากรข้าวป่าทำให้เกิดความแปรปรวนในข้าวป่าขึ้นมาและสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้

การเปรียบเทียบการอยู่รอดของพืชที่เกิดจากการงอกจากเมล็ดและจากต้นเก่า พบว่าข้าวป่าที่เกิดจากต้นเก่าจะมีการอยู่รอดได้ดีข้าวป่าที่เกิดจากเมล็ด (Berbier, 1987) แต่ประชากรที่เกิดจากเมล็ดจะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าประชากรที่เกิดจากต้นเก่า โดยที่ข้าวป่าชนิดฤดูเดียวส่วนใหญ่จะมีการเกิดจากเมล็ด แต่ข้าวป่าชนิดหลายฤดูจะมาจากการงอกออกมาจากต้นเก่า

2.3 การแพร่กระจายของข้าวป่า

ในภูมิภาคเอเชียพบว่าการกระจายแหล่งที่อยู่ทางภูมิศาสตร์ของ *O. rufipogon* ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จะพบข้าวป่าในบริเวณที่ราบลุ่มแม่น้ำ และพื้นที่รอบๆ ของแม่น้ำสายใหญ่ในเขตร้อน (Oka, 1988) ในประเทศจีน *O. rufipogon* แพร่กระจายในเขตทางใต้ของจีน (23.5 °N) และทางเหนือพบที่จังหวัด Jiangxi (ประมาณ 28 °N) Morishima *et al.* (1996) พบการกระจายของ *O. rufipogon* อยู่ในประเทศลาวที่เมืองปากเซและเมืองหลวงพระบาง ในประเทศไทยจะพบในบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ ซึ่งชนิดที่เป็นฤดูเดียวจะอยู่กระจายในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยจนถึงที่ราบลุ่มแม่น้ำโขง และชนิดที่เป็นหลายฤดูจะอยู่กระจายในฝั่งทางด้านตะวันตกของแม่น้ำโขง สำหรับการแพร่กระจายและความผันแปรลักษณะของข้าวป่าในประเทศไทย สงกรานต์ และคณะ (2538) ได้รวบรวมตัวอย่างข้าวป่าจำนวน 578 ตัวอย่าง พบว่ามาจากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคใต้ และภาคตะวันออก จำนวน 186, 155, 95, 55, 54 และ 25 ตัวอย่างตามลำดับ พบการกระจายตัวของ *O. rufipogon* ทุกภาคเหมือนกับ *O. nivara.* และ spontanea forms แต่ *O. rufipogon* ค่อนข้างพบมากกว่าชนิดอื่น แสดงว่า *O. rufipogon* มีการแพร่กระจายกว้างขวางกว่าชนิดอื่น (Walter, 1979 อ้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดย Chitrakorn, 1995) เมื่อพิจารณาฤดูแล้งสำหรับพืชจากความสมดุลระหว่างอุณหภูมิกับปริมาณน้ำฝน พืชประสบแล้งเมื่ออุณหภูมิสูงกว่าปริมาณน้ำฝนรอบตามเดือน พบว่าความแห้งแล้งจะเกิดในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จึงทำให้พบข้าวป่าอายุปีเดียว ค่อนข้างบ่อยกว่าชนิดอื่น ดังจะเห็นได้จากมีการรวบรวมตัวอย่าง *O. nivara* มาจากภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือค่อนข้างมากกว่าภาคอื่น (สงกรานต์ และคณะ, 2538)

2.4 ลักษณะความไวต่อช่วงแสงและอายุของข้าวป่า

ลักษณะความไวต่อช่วงแสงและอายุของข้าวป่า สงกรานต์ และคณะ (2538) พบว่าส่วนมากตัวอย่างของ *O. rufipogon* มีอายุข้ามปี (78%) และไวต่อช่วงแสง (72%) ส่วน *O. nivara* ประมาณ 50% มีอายุปีเดียว ในจำนวนนี้ประมาณ 68% ไวต่อช่วงแสง สำหรับ spontanea forms พบว่า ประมาณ 78% มีอายุข้ามปี และ 60% ไวต่อช่วงแสง โดยสรุปแล้วในกลุ่มนี้ประมาณ 65% มีอายุข้ามปี และ 70% ไวต่อช่วงแสง สำหรับ *O. officinalis* พบว่าทุกตัวอย่างมีอายุข้ามปี และ 75% ไม่ไวต่อช่วงแสง

2.5 ความหลากหลายในข้าวป่า

ข้าวป่านั้นจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันไป ซึ่งจะเป็นการปรับตัวให้เหมาะสมกับกับสภาพแวดล้อมที่อยู่ของข้าวป่าชนิดนั้น ไม่ว่าจะเป็นชนิดฤดูเดียวและชนิดหลายฤดูในเขตร้อนชื้น บางพื้นที่ข้าวป่าจะขึ้นอยู่เดี่ยวๆ สงกรานต์ และคณะ (2538) พบว่า ความผันแปรภายในและระหว่างชนิดในแต่ละลักษณะในกลุ่มของข้าวป่าโครโมโซมชุด AA ส่วนมากลักษณะทางปริมาณมีรูปแบบการแพร่กระจายไปในทางเดียวกัน อย่างไรก็ดี ทรงกอของ *O. rufipogon* และ *O. nivara* ค่อนข้างเอนจนถึงราบแนวนอน ในขณะที่ทรงกอของ spontanea forms มีความผันแปรมาก เมื่อเทียบความผันแปรในกลุ่มโครโมโซม AA กับ *O. officinalis* (ชุดโครโมโซม CC) พบว่าอย่างน้อย 13 ลักษณะมีแบบการแพร่กระจายต่างกันคือ ความสูงของกล้า ทรงกอ ขนาดต้น จำนวนหน่อ ความยาวของลิ้นใบ จำนวนใบ ความยาวของแผ่นใบและใบธง ความยาวของฐานรวง ขนาดของเมล็ด ความยาวของหางและน้ำหนัก 100 เมล็ด ลักษณะเหล่านี้อาจใช้แยกข้าวป่า *O. officinalis* ออกจากข้าวป่าชนิดจีโนม AA ได้ สำหรับลักษณะด้านปริมาณก็เหมือนกัน ข้าวป่าในกลุ่ม AA มีแบบของการแพร่กระจายของลักษณะคล้ายกัน แต่จะมี 6 ลักษณะที่กลุ่ม AA มีการแพร่กระจายต่างจากกลุ่ม CC คือ รูปร่างลิ้นใบ สียอดเมล็ดและหูใบ มุมใบธง ขนาดของเกสรตัวเมีย และสีของเกสรตัวเมีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.6 ข้าววัชพืชหรือข้าวแดง

ข้าววัชพืชในระยะที่เป็นต้นกล้าจะมีลักษณะเหมือนต้นข้าวปลูก จนแยกกันไม่ออกจะแยกความแตกต่างได้ก็ต่อเมื่อเห็นช่อดอก ที่ปลายเมล็ดจะมีหางยาวบ้างสั้นบ้าง หากมีลมพัดแรงในช่วงเมล็ดข้าววัชพืชเริ่มสุกแก่ เมล็ดจะดีดตัวหลุดจากรวงหายไปหมดส่วนต้นที่เมล็ดไม่ร่วงจะถูกเก็บเกี่ยวไปพร้อมกับข้าวปลูก จรรยา (2547) พบว่า มีการระบาดของข้าววัชพืชอย่างรุนแรงในนาข้าวพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรีเมื่อปี 2544 และได้เก็บตัวอย่างและตรวจสอบผลผลิตของข้าวในนาที่มีการระบาดของข้าววัชพืชพบว่าบางแปลงมีขึ้นหนาแน่นมากเกือบ 100 % ในพื้นที่ 1 ตารางเมตร มีต้นข้าวปลูกเพียง 3 ต้น ในขณะที่มีข้าวหางถึง 800 ต้น และถ้ามีข้าววัชพืชในแปลงมากกว่า 40 % ผลผลิตข้าวของเกษตรกรจะลดลงมากกว่าครึ่ง และปีถัดมาข้าววัชพืชได้ระบาดกระจายตัวเป็นวงกว้างลุกลามไปในพื้นที่ใกล้เคียงและลักษณะการระบาดจะแปลกไปจากเดิม คือ เมล็ดข้าววัชพืชจะมีหางสั้นลง บางรวงเมล็ดไม่มีหางเลยเมื่อลมพัดแรงในระยะข้าวเริ่มแก่เมล็ดจะดีดหรือเด้งหนี จากรวงไปหมดทำให้ผลผลิตเสียหายมาก

2.7 สภาพนิเวศน์วิทยาของข้าวป่าชนิดที่เกี่ยวเนื่องกับข้าวปลูก

สงกรานต์และคณะ (2538) พบว่าข้าวป่าที่มีความใกล้ชิดเกี่ยวเนื่องกับข้าวปลูก (โครโมโซมชุด AA) คือ *O. rufipogon* และ *O. nivara* และ spontanea forms ส่วนมากรวบรวมมาจากบริเวณที่เป็นแอ่งน้ำมีน้ำตื้นถึงลึกมาก *O. rufipogon* รวบรวมมาจากน้ำลึก ส่วน *O. nivara* และ spontanea forms รวบรวมมาจากบริเวณน้ำตื้นหรือดินชื้น แสดงว่าข้าวป่า 2 ชนิดหลังชอบระดับน้ำตื้น *O. officinalis* และ *O. ridleyi* รวบรวมมาจากแอ่งน้ำหรือบริเวณชื้นตามภูเขา ในขณะที่ *O. granulata* พบในบริเวณดินค่อนข้างแห้ง เป็นที่น่าสังเกตว่า ข้าวป่าโครโมโซมชนิด AA ส่วนมากรวบรวมมาจากที่โล่งแจ้ง ส่วนชนิดอื่นมาจากบริเวณที่เป็นร่มเงา ความผันแปรทรงกอของข้าวป่าชนิดต่างๆ ในชุด AA ทรงกอของ *O. rufipogon* มีความผันแปรมากกว่าทรงกอของ *O. nivara* และ spontanea อย่างไรก็ดี ข้าวป่าทุกชนิดส่วนมากมีทรงกอเอนมาก

2.8 การนำมาใช้ประโยชน์และการใช้เชื้อพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์พืช

ข้าวป่ามีลักษณะหลายอย่างที่นักปรับปรุงพันธุ์สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวสมัยใหม่ได้ สงกรานต์ และคณะ (2538) พบว่าส่วนมากเมล็ดข้าวป่ามีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูง spontanea forms มีปริมาณโปรตีนผันแปรมากกว่า *O. rufipogon* และ *O. nivara* ปริมาณโปรตีนใน *O. nivara* มีความผันแปรน้อยแต่ให้ผลเฉลี่ยสูงสุด Chang *et al.* (1991) พบว่า *O. officinalis* Wall, *O. minuta* (Presl), *O. nivara* Sherma et Shastry ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 3 ชนิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(biotype) และ *O. rufipogon* Griff กับ *O. nivara* มีความต้านทานโรคเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และยังพบว่ามีชนิดที่ต้านทานต่อโรคหลาวข้าวอยู่ 13 สปีชีส์ และต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลอยู่ 11 สปีชี่ส์ ต้านทานต่อการเข้าทำลายของบัคเตรี 8 ชนิด *O. rufipogon* สามารถต้านทานต่อการถูกน้ำท่วมได้ โดยจะมีการยืดตัวของปล้องให้ยาวขึ้น (IRRI, 1991) ในศรีลังกา *O. rufipogon* สามารถต้านทานต่อการขึ้นในดินเค็มได้ (IRRI, 1991) และยังเป็นแหล่งของการเป็นหมันในเกสรตัวผู้ ใน *O. officinalis* สามารถต้านทานต่อ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ต้นเหลืองของข้าว เพลี้ยกระโดดหลังขาว

2.9 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล RAPD โดยอาศัยเทคนิค PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) ค้นพบโดย Saiki *et al.* (1985) เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยทำในหลอดทดลอง (*in vitro*) แบบซ้ำๆ กันหลายรอบ ซึ่งต้องอาศัยสารต่างๆ ได้แก่ double deionized water, buffer, $MgCl_2$, dNTP, primer, Taq DNA polymerase และ DNA template ผสมด้วยกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม โดยปฏิกิริยาแต่ละรอบของ PCR จะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. Denaturation เป็นกระบวนการที่ทำให้ดีเอ็นเอเป้าหมายสายคู่แยกจากกันเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยอุณหภูมิสูงประมาณ 90 – 95 องศาเซลเซียส

2. Primer annealing เป็นกระบวนการที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายสายเดี่ยวที่เป็นแม่พิมพ์ (DNA template) อาศัยอุณหภูมิประมาณ 40 – 60 องศาเซลเซียส

3. Primer extension เป็นกระบวนการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase อาศัยอุณหภูมิประมาณ 72 องศาเซลเซียส ปัจจุบัน Taq DNA polymerase สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ จากการสกัด จากแบคทีเรียที่อาศัยในน้ำพุร้อนชื่อว่า *Thermus aquaticus* โดย Saiki *et al.* (1988) ทำให้สามารถแก้ปัญหาการเสียสภาพของเอนไซม์เนื่องจากอุณหภูมิสูงได้

เมื่อปฏิกิริยาครบ 1 รอบ จะได้ดีเอ็นเอเป้าหมายเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อทำซ้ำกันหลายๆ รอบ จะมีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น 2^n เท่า เมื่อ n เป็นจำนวนรอบ โดยปัจจัยต่างๆ ต้องมีประสิทธิภาพ 100%

เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ถูกคิดค้นโดย Willium *et al.* (1990) เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic markers) เพื่อบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอผ่านปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) ในหลอดทดลองโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) และอุณหภูมิในช่วง primer annealing ประมาณ 37 – 40 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มดีเอ็นเอที่ให้มีปริมาณมาก ซึ่ง RAPD ใช่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลักการที่ว่าดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันในการเรียงลำดับของเบส (base) ได้แก่ adenine (A), thymine (T), guanine (G) และ cytosine (C) จึงทำการสุ่มตัวแทนบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนสายดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณเช่นเดียวกับกระบวนการ DNA replication ภายในเซลล์ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วมาตรวจสอบแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis) เช่นวิธี agarose gel electrophoresis แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และนำไปดูแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายใต้แสง UV (Newton และ Graham, 1994 และ Golestein และ Schlotterer, 1998) ดังนั้นสิ่งมีชีวิตที่มีการเรียงลำดับของเบสที่ต่างกันย่อมมีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน และสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมควรจะมีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกัน

แต่ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ PCR ของเทคนิค RAPD เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส บางครั้งพบว่า แถบดีเอ็นเอที่ได้มีความคมชัดต่ำ และแถบดีเอ็นเอบางแถบไม่สามารถทำซ้ำได้ (non reproducible) ซึ่ง Anuntalabhochai et al. (2000) ได้รายงานว่าเทคนิค High Annealing Temperature-Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) โดยใช้อุณหภูมิในช่วง primer annealing ประมาณ 46 – 62 องศาเซลเซียส ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก มีความคมชัดสูง (high resolution) และแถบดีเอ็นเอเกิดซ้ำได้ (reproducible)

2.10 การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Microsattelite โดยอาศัยเทคนิค PCR

ความแตกต่างของดีเอ็นเอนั้นเกิดเนื่องจากส่วนที่ไม่ใช่ยีนและมักจะมีลักษณะเป็นเบสซ้ำ (repetitive DNA) เบสซ้ำ พบกระจายอยู่ภายในจีโนม บางชุดพบซ้ำกันมากกว่า 100,000 ครั้ง เบสซ้ำแบบต่อเนื่อง (tandem repeats) ซึ่งมีการเรียงตัว ของเบสซ้ำๆ ต่อเนื่องกันเป็นช่วงยาว สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบ ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ดี โดยความแตกต่างที่พบเกิดขึ้นจากจำนวนซ้ำที่ต่างกันในแต่สิ่งมีชีวิต เบสซ้ำ สามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิดตามจำนวนซ้ำและความยาวของหน่วยซ้ำ (Golestein และ Schlotterer, 1998) คือ

1. แซทเทลไลท์ (satellite) คือ เบสซ้ำสั้น ขนาด 1-6 เบส หรือเบสซ้ำยาวขนาดยาวหลายร้อยเบส โดยมีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งตั้งแต่ 10^3-10^7 ครั้ง ซึ่งจัดเป็นพวกที่มีการซ้ำของเบสเป็นจำนวนมาก (highly repetitive DNA) แซทเทลไลท์แต่ละแบบจะพบเพียง 1 หรือ 2 ตำแหน่งต่อโครโมโซม

2. มินิแซทเทลไลท์ (minisatellite) คือ เบสซ้ำขนาด 9-100 เบส ที่มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 10 และไม่เกินพันครั้ง จัดเป็นพวกที่มีการซ้ำของเบสเป็นระดับปานกลาง (moderately repetitive DNA) ดร. เจฟฟรีย์และคณะเป็นกลุ่มแรกที่ค้นพบวิธีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยการนำเบสซ้ำชนิดนี้มาใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เป็นดีเอ็นเอตรวจสอบ จากการศึกษาพบว่ามินิแซทเทลไลท์จำนวนมากมีความคล้ายคลึงของลำดับเบส หรือมีลำดับเบสแกน (core sequence) เดียวกัน ดีเอ็นเอในบริเวณนี้มีความหลากหลายสูง เนื่องจากความแตกต่างในจำนวนซ้ำ บางครั้งจึงมีผู้เรียกว่า variable number of tandem repeats หรือ VNTR

3. ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) คือ เบสซ้ำกันขนาด 1-6 เบสเช่น $(A)_n$, $(CA)_n$, $(TAA)_n$ เมื่อ n เป็นจำนวนซ้ำ โดยจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง เบสซ้ำชนิดนี้ พบกระจายอยู่ในบริเวณต่างๆ ของจีโนม ประมาณ 10^4-10^5 ตำแหน่ง ความหลากหลายของจำนวนซ้ำที่พบในบริเวณนี้สามารถนำมาใช้ประยุกต์ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้

Gealy ea al. (2002) นำเทคนิค Microsattelite markers มาใช้ในการศึกษาปัญหาข้าวแดงที่เกิดขึ้นเป็นวัชพืชในนาข้าวทางตอนใต้ของสหรัฐอเมริกา โดยพบว่า Microsattelite marker สามารถบอกความแตกต่างระหว่างข้าวแดง ข้าวปลูก และลูกผสมที่เกิดขึ้นจากการผสมข้ามระหว่างข้าวแดงและข้าวปลูก Rong et al. (2004) พบว่าในการตรวจสอบลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามตามธรรมชาติระหว่างข้าวปลูกและลูกผสมในประเทศจีน Microsattelite markers สามารถใช้ในการตรวจสอบลูกผสมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved