บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

กล้วยไม้สกุลช้าง (*Rhynchostylis spp.*)

การแจงชั้น (Classification)

กล้วยไม้ที่มีการค้นพบแล้วในโลกนี้มีมากกว่า 1,000 สกุล และ 15,000 ชนิด (Dressler, 1981 อ้างโดย ณัฐา, 2547) ประเทศไทยนับเป็นแหล่งกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก มีกล้วยไม้พันธุ์พื้นเมือง 167 สกุล 1,140 ชนิด (อบฉันท์, 2544) มีการจัดแบ่งกล้วยไม้สกุลช้าง (*Rhynchostylis*) ตามชั้น (Dressler, 1981 อ้างโดย ณัฐา, 2547) ได้ดังนี้

Division : Magnoliophyta

Class : Liliopsida

Order : Orchidales

Family : Orchidaceae

Subfamily : Vandoideae

Tribe : Vandeae

Subtribe : Sarcanthinae

Alliance : Phalaenopsis

Genus : *Rhynchostylis*

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กล้วยไม้สกุลช้าง (*Rhynchostylis*) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย พม่า มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ในประเทศแถบอินโดจีน และหมู่เกาะอินเดียตะวันออก (อานนท์, 2547) เป็นกล้วยไม้สกุลเล็ก ๆ สกุลหนึ่งในประเภทแวนด้า มีลำต้นสั้น แข็งแรง ใบแข็งอวบน้ำ บางชนิดใบเล็กและยาว ปลายใบหยักมนหรือเป็นฟันแหลม ใบอาจมีลายหรือไม่มีลายเป็นเส้นขนานหลายเส้นตามความยาวของใบ ช่อดอกตั้งโค้งหรือห้อย ช่อดอกแน่น มีกลิ่นหอมแรง (Pridgeon, 2000) กลีบดอกอาจมีหรือไม่มีจุดม่วงหรือน้ำเงิน กลีบดอกชั้นนอกโตกว่ากลีบดอกชั้นใน ปากไม่มีข้อพับ ปากเชื่อมติดกับฐานเส้าเกสร เดือยดอกชี้ไปด้านหลัง แต่ปลายปากชี้ไปด้านหน้า ไม่มีหูหรือมีหูขนาดเล็ก และเส้าเกสรสั้น มีเรณู 2 ก้อน (มลิวัลย์, 2539) รากเป็นระบบรากอากาศ แขนงรากใหญ่ ปลายรากมีสีเขียว สามารถสังเคราะห์แสงได้ (ชวลิต, 2542) เจริญเติบโตได้ในที่ที่มีอุณหภูมิ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลางวันและกลางคืนแตกต่างกันค่อนข้างมาก (ณัฐา, 2545) การผสมพันธุ์เกิดขึ้นหลังจากมีการถ่ายละอองเกสรไปแล้วหลายวัน (postpollination phenomena) ระยะเวลาในการถือฝักประมาณ 9-12 เดือน (พิมพ์ใจ, ติดต่อส่วนตัว) กล้วยไม้สกุลช้างมีด้วยกัน 4 ชนิด แต่ที่พบในประเทศไทยมี 3 ชนิด คือ 1) ช้าง (*Rhynchostylis gigantea* Ridl.) ได้แก่ ช้างกระ ช้างแดง ช้างเผือก และช้างประหลาด 2) เขาแกะ (*Rhynchostylis coelestis* Rchbf.) ได้แก่ เขาแกะธรรมดา เขาแกะแดง และเขาแกะเผือก 3) ไอยเรศหรือพวงมาลัย (*Rhynchostylis retusa* Bl.) สำหรับชนิดที่ 4 พบในฟิลิปปินส์ คือ *Rhynchostylis violacea* (ชวลิต, 2542) กล้วยไม้สกุลช้างที่น่าสนใจ คือ

Rhynchostylis gigantea Ridl. หรือ *Saccolabium gigantea* (Hawkes, 1961) หรือเรียกว่า ช้าง พบในพม่า และป่าทางภาคเหนือของไทย เช่น เชียงใหม่ เป็นกล้วยไม้ชนิดที่มีรูปทรงของต้น ใบ ราก และดอกล่ำสันใหญ่โตกว่าชนิดอื่นภายในสกุลเดียวกัน ใบกว้าง 5-7 เซนติเมตร ยาว 25-30 เซนติเมตร ใบมีลักษณะหนา และค่อนข้างแข็ง ปลายใบแหว่งโดยธรรมชาติ ส่วนมนของสองข้างปลายใบไม่เท่ากัน ช่อดอกรูปทรงกระบอกโค้งพองาม ยาว 20-40 เซนติเมตร ช่อดอกห้อย มีดอกย่อยช่อละ 25-60 ดอก ขนาดดอกบานตามธรรมชาติ 2.5-3.0 เซนติเมตร กลีบนอกบนกว้างประมาณ 0.8 เซนติเมตร ยาว 1.5 เซนติเมตร ส่วนกลีบนอกล่างกว้างยาวพอ ๆ กับกลีบนอกบน หรือกว้างกว่าเล็กน้อย โดยเฉพาะส่วนใกล้โคนกลีบ กลีบในกว้างประมาณ 0.5 เซนติเมตร ยาว 1.4 เซนติเมตร เดือยดอกยาวประมาณ 0.6 เซนติเมตร แผ่นปากยาวประมาณ 0.7 เซนติเมตร ปลายแผ่นปากหนาและแข็งอยู่ในลักษณะเหยียดตรง ปลายสามแฉก สองแฉกข้างมน แฉกกลางเป็นปุ่มเล็ก ๆ และมีเดือยยื่นออกมาตอนใต้คาง ใกล้โคนปากมีสันนูนเตี้ยสองสัน ดอกมีกลิ่นหอมฉุน ดอกบานระหว่างเดือนมกราคม และกุมภาพันธ์ ดอกบานทนประมาณ 2-3 อาทิตย์ มีการแบ่งเป็นพันธุ์ต่าง ๆ ตามสีของดอก ได้แก่ var. *alba* คือ ช้างเผือก มีกลีบดอกและปากมีสีขาวล้วน var. *rubum* คือ ช้างแดง มีกลีบดอกและปากมีสีแดงอมม่วง และ var. *illustre* คือ ช้างกระ หรือ ช้างด่อม มีกลีบดอกพื้นสีขาว มีจุดสีแดงอมม่วงขนาดสม่ำเสมอกระจายทั้งดอก มีลักษณะใบกว้างหนา ทรงต้นล่ำสันใหญ่โตกว่าปกติ สีใบมักเขียวคล้ำกว่า ทำให้สังเกตเห็นสีเขียวทางผิวด้านบนได้ยาก หากนำมาปลูกเลี้ยงบนพื้นที่ราบภาคกลางจะเจริญเติบโตช้า ถูกศัตรูรบกวนบ่อย แต่ยังสามารถออกดอกได้ดี นอกจากนี้ยังมี ช้างประหลาด ซึ่งเกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างช้างแดงกับช้างกระ (อานนท์, 2547) บางต้นมีจุดกระเพียงเล็กน้อยเกือบเป็นช้างเผือก หรือมีจุดกระมากมาย เป็นปื้นโต ๆ จนบางต้นเกือบเป็นช้างแดง บ้างเรียกว่า ช้างประหลาด หรือช้างเผือกกระ หรือช้างแดงกระ โดยดูว่ามีลักษณะโน้มไปในทางใด (ไพบูลย์, 2521)

ลักษณะสีดอกของกล้วยไม้ช้างนี้มีความแปรปรวนกว้างมาก ตั้งแต่ช้างเผือกมีดอกสีขาว บางต้นมีดอกอมสีม่วงชมพูแดง บ้างพื้นขาวประจุดสีม่วงแดง มีขนาดและจำนวนของความ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หนาแน่นของจุดต่างกันไป จนถึงดอกสีแดง (สีม่วงแดง) คือช้างแดง ซึ่งจัดอยู่ในประเภทหายาก ความแปรปรวนเหล่านี้ล้วนแล้วแต่มีลักษณะประจำต้นแต่ละต้น

การที่กล้วยไม้ชนิดนี้ได้ชื่อว่า "ช้าง" อาจมาจากสองกรณี คือลักษณะที่มีลำต้น ใบ ราก ช่อดอก และดอกใหญ่กว่ากล้วยไม้ชนิดอื่น อีกกรณีหนึ่งอาจเป็นเพราะดอกตูมของกล้วยไม้ชนิดนี้มีรูปร่างคล้ายหัวช้าง และมีเดือยดอกคล้ายกับงวงช้าง (อานนท์, 2547)

Rhynchostylis coelestis Rchbf. หรือเรียกว่า เขาแกะ มักพบในป่าโปร่งผลัดใบ เนื่องจากมีฤดูแล้งสามารถให้กล้วยไม้ชนิดนี้พักตัวได้นานหลายเดือน ในประเทศไทยพบได้ทุกภาค มีลักษณะที่ต่างไปจากกล้วยไม้สกุลช้างชนิดอื่น คือมีช่อดอกตั้งขึ้นคล้ายแวนด้า ใบมีลักษณะแบน และบางกว่าชนิดอื่น ทรงของการเจริญเติบโตใกล้เคียงไปทางแวนด้าใบแบน เขาแกะมีใบยาวประมาณ 15 เซนติเมตร โคนใบซ้อนกันเป็นแผง ใบโค้งสลับกันไปในทางตรงกันข้าม ด้วยลักษณะนี้เองจึงได้ชื่อว่า "เขาแกะ" ลำต้นเตี้ย ช่อดอกมีรูปทรงกระบอก มีดอกแน่น มีดอกย่อย 40-50 ดอก ดอกมีขนาดใหญ่ประมาณ 2 เซนติเมตร ส่วนมากแทง 2 ช่อต่อครั้ง กลีบดอกสีขาว มีแต้มสีม่วงครามที่ปลายกลีบทุกกลีบ ปากมีสีม่วงครามมากกว่าที่กลีบ มีความผันแปรมากจากสีม่วงมากไปถึงเกือบแดง เรียกว่า "เขาแกะแดง" แต่บางต้นออกทางสีฟ้าหรือน้ำเงิน ซึ่งชนิดนี้พบเห็นตามธรรมดา บางต้นดอกมีสีขาวบริสุทธิ์ เรียกว่า "เขาแกะเผือก" ซึ่งค่อนข้างหาได้ยาก กลิ่นหอมฉุนตามลักษณะของกล้วยไม้สกุลช้าง เป็นที่นิยมมากในการผสมพันธุ์ (ณัฐา, 2545) ดอกบานทนประมาณ 2 สัปดาห์ ออกดอกตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงกรกฎาคม

ในด้านการผสมพันธุ์ เขาแกะมีสีของดอกเป็นสีม่วงคราม หรือใกล้ไปทางสีน้ำเงิน ซึ่งเป็นสีที่หาได้ยากในกล้วยไม้ทั่วไป จึงนิยมนำเขาแกะไปผสมข้ามสกุลกับกล้วยไม้ชนิดอื่น โดยเฉพาะในประเภทที่ใกล้เคียงกับแวนด้า เพื่อพัฒนาเป็นกล้วยไม้ตัดดอก หรือเป็นกล้วยไม้ประเภทสวยงาม เช่น

Rhynchovanda = *Rhynchostylis* × *Vanda*

Vascostylis = *Ascocentrum* × *Rhynchostylis* × *Vanda*

การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สกุลช้าง

กล้วยไม้สกุลนี้ออกดอกปีละครั้ง แต่ออกพร้อมกันหลาย ๆ ช่อ ต้องมีการจัดระเบียบช่อให้ช่อดอกยื่นออกไปในทางเดียวกัน ต้นรับแสงด้านหนึ่งมากกว่าอีกด้าน ส่งผลให้ช่อดอกยื่นออกไปในด้านที่มีแสงมากกว่า หรืออาจใช้ลวดไปขัดช่อดอก และใบ ง้างให้ยื่นออกมาในทิศทางเดียวกัน เมื่อช่อดอกยาวจึงจัดตามทิศที่ต้องการ การปลูกเลี้ยงมี 2 วิธี คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. ปลูกลงภาชนะเกี่ยวลวดแขวนราว ภาชนะอาจเป็นกระเช้า กระถาง หรือต้นไม้
2. ปลูกติดต้นไม้ ควรผูกด้านทิศใต้ เพราะช้างออกดอกฤดูหนาว ตะวันส่องเฉียงทางใต้ ช่อดอกจะพุ่งไปทางแสงได้ดี และสวยงาม ส่วนเขาแกะ และไอยเรศออกดอกฤดูร้อน ตะวันส่องตรงศีรษะผูกทางทิศใดได้ตามต้องการ

การขยายพันธุ์กล้วยไม้สกุลช้าง

เป้าหมายสำคัญ คือ การเพิ่มปริมาณกล้วยไม้ให้มีจำนวนมาก นอกจากนี้ยังช่วยให้กล้วยไม้ที่มีสภาพแก่เกินไปกลับมีสภาพแข็งแรงเติบโตต่อไปได้ เนื่องจากกล้วยไม้ที่มีสภาพแก่เกินไปมักพักตัวนานก่อนการแตกหน่อใหม่ จึงออกดอกจำนวนน้อยกว่าที่ควร (กลุ่มเกษตรสัญจร, 2541)

วิธีการขยายพันธุ์กล้วยไม้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ

1. ขยายพันธุ์โดยไม่มีการผสมเกสร คือ การนำส่วนหนึ่งส่วนใดของกล้วยไม้ที่ไม่ใช่เมล็ดมาขยายพันธุ์ วิธีการที่นิยม คือ ตัดยอด แยกหน่อ และเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
2. ขยายพันธุ์โดยการผสมเกสรและเพาะเมล็ด คือการนำเอาเมล็ด ซึ่งเป็นส่วนที่เกิดจากการผสมเกสรมาเพาะเป็นต้นกล้วยไม้ เช่น
   - การผสมในต้นเดียวกันเอง หรือระหว่างต้นที่แยกมาจากต้นเดียวกัน
   - การผสมข้ามต้น (Interclonal)
   - การผสมข้ามหมู่ (Intersection)
   - การผสมข้ามชนิด (Interspecific)
   - การผสมข้ามสกุล (Intergeneric)

ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid)

ดีเอ็นเอ เป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ควบคุมกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ การแสดงออกของยีนจะส่งผลให้เกิดลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด การถ่ายทอดข้อมูลเกิดจากการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ จาก 1 โมเลกุล เป็น 2 โมเลกุล ที่มีลำดับเบสเหมือนกันในขณะที่มีการแบ่งเซลล์ เรียกว่า การจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอ หรือ DNA replication การแสดงกิจกรรมของยีนนั้น จะส่งผ่านข้อมูลจากดีเอ็นเอมาสู่อาร์เอ็นเอ หรือ transcription แล้วจึงมีการแปลรหัสจากอาร์เอ็นเอเป็นกรดอะมิโน หรือ translation ในที่สุดจะได้สารโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ซึ่งอาจทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง เอนไซม์ หรืออื่น ๆ ภายในเซลล์ ส่งผลให้เซลล์ และสิ่งมีชีวิตมีลักษณะ (phenotype) ปรากฏขึ้น (สุรินทร์, 2545ข)

เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers)

สุรินทร์ (2545ก) กล่าวไว้ว่า การศึกษาเครื่องหมาย หรือ marker เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณ และคุณภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาจเป็นการจำแนกความแตกต่างในระหว่าง และภายในสปีชีส์ (between and within species) ระหว่าง และภายในประชากร (between and within populations) หรือระหว่างแต่ละตัว (between individuals) เครื่องหมายที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างนี้มี 2 ประเภท คือ

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker)

การบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตใช้วิธีเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยา หรือทางสรีรวิทยา ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักจะขึ้นกับสภาพแวดล้อมทำให้ตรวจสอบผลผิดพลาดได้ บางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษและต้องมีวิธีบอกจีโนไทป์ (genotype) ที่ถูกต้องจากฟีโนไทป์ (phenotype) ที่ตรวจสอบได้ อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นต้องทำเป็นอันดับแรก แล้วจึงใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น หรือแก้ปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวได้

2. เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker)

เครื่องหมายทางโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ 1) ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ และ 2) ระดับดีเอ็นเอ ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามความแตกต่างที่เกิดขึ้นในระดับเอนไซม์นั้น สิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลต่อกระบวนการทางชีวเคมีที่สร้างเอนไซม์หรือไอโซไซม์ ส่วนในระดับดีเอ็นเอให้ผลที่แม่นยำมากกว่าในการตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต เพราะดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละพันธุ์มีการเรียงตัวของลำดับเบสที่ต่างกัน (ภาณี, 2536) และเฉพาะตัว ซึ่งสิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตน้อยมาก

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรมากกว่า สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่เก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต หรือสภาพทางสรีรวิทยาใด ๆ ได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีน มีหรือไม่มีการแสดงออก จึงตรวจสอบได้โดยไม่จำกัด ครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่าง ๆ ให้เลือกมากมาย ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายทำได้อย่างกว้างขวาง นำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ ได้ไม่จำกัด

ความหมายและที่มาของเครื่องหมายดีเอ็นเอ

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดีเอ็นเอที่อยู่ที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บนโครโมโซมในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ เช่น ในไมโตคอนเดรียหรือคลอโรพลาสต์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเกิดโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนั่นเอง

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) เป็นวิธีการที่ทำให้เกิดลายพิมพ์ หรือแบบแผนของดีเอ็นเอที่จำเพาะ สามารถตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึมได้ เดิมได้จากการนำดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ (genomic DNA) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วแยกขนาดโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ย้ายชิ้นดีเอ็นเอที่แยกแล้วทั้งหมดไปยังแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ (membrane filter) ไฮบริไดซ์กับโพรบ (probe) ซึ่งมาจากดีเอ็นเอส่วนที่เป็นมินิแซทเทลไลท์ สามารถตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอได้จากหลายตำแหน่ง (multi-locus) พร้อม ๆ กัน เกิดเป็นลายพิมพ์ที่จำเพาะกับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด มีความหมายเดียวกับคำว่า DNA profiling หรือ DNA typing

ปัจจุบันการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอยังหมายรวมถึงวิธีตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่งพร้อม ๆ กัน (multi-locus PCR) เพราะทำให้เกิดแบบแผนของดีเอ็นเอจำเพาะเช่นเดียวกัน จะเห็นได้ว่า การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอนั่นเอง วิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเออาจทำได้โดยใช้วิธีไฮบริไดเซชัน หรือวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์เป็นหลัก (สุรินทร์, 2545ก)

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

อาร์เอพีดีใช้หลักการที่ว่าดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในการเรียงลำดับของเบส ได้แก่ adenine (A), thymine (T), guanine (G) และ cytosine (C) จึงสุ่มเอาตัวแทนของบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนสายดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณ เช่นเดียวกับกระบวนการ DNA replication ภายในเซลล์ (วัชรีและมนตรี, 2536) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วมาแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส และนำแผ่นเจลมาตรวจสอบความแตกต่างของแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ดังนั้น สิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสต่างกัน ย่อมมีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันและสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันควรมีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายกัน

สุรินทร์ (2545ก) กล่าวว่า อาร์เอพีดีเป็นเทคนิคทางพีซีอาร์ที่นำมาใช้ในการจำแนกสิ่งมีชีวิตออกเป็น type หรือ subtype โดยอาศัยหลักการแยกในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งจัดว่าเป็นการจำแนกแบบ molecular typing ซึ่งไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย วิธีการของอาร์เอพีดี นั้นง่ายและรวดเร็ว ใช้ดีเอ็นเอเป้าหมายในปริมาณน้อย (วัฒนาลัย และสรวง, 2536) หลักการของอาร์เอพีดี คือการเพิ่มปริมาณ genomic DNA ที่เราต้องการจำแนก ด้วยไพรเมอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่สั้น ๆ และเป็น universal ซึ่งส่วนมากใช้ประมาณ 10 mers เช่น 5-d (CCCGTCAGCA) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอนั้นทำในสภาวะที่เป็น low stringency คือ annealing ที่ 36-45 °C โดยใช้ $MgCl_2$ 2 mM ขึ้นไป ทำให้ไพรเมอร์สามารถจับดีเอ็นเอเป้าหมายได้หลายตำแหน่งของทั้งสองสาย เมื่อเพิ่มจำนวนเสร็จแล้วนำ PCR product ไปแยกบนโพลีอะครีลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) หรืออะกาโรสเจล (agarose gel)

วิธีอาร์เอพีดียังสามารถนำไปใช้ในการศึกษา epidemiology, molecular genetics, molecular evolution และ taxonomy และไม่จำเป็นต้องนำ PCR-product มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สามารถนำมาแยกรูปแบบของแถบ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ทันทีนับว่าเป็นวิธี DNA-base typing ที่ง่ายมากในปัจจุบัน เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) วิธีการนี้มีการเรียกชื่อแบบอื่นได้อีก เช่น arbitrarily primed PCR (AP-PCR) , DNA amplification fingerprinting (DAF) หรือ multiple arbitrary amplicon profiling (MAAP) ซึ่งแต่ละวิธีที่เรียกนี้มีข้อแตกต่างคือ ขนาดของไพรเมอร์ที่ใช้ แต่หลักการไม่แตกต่างกัน คือใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียว ส่วนวิธีที่เรียกว่าอาร์เอพีดีนี้ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (วัชรี และมนตรี, 2536)

DAF ใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นเพียง 5-8 นิวคลีโอไทด์ และใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณโดยใช้อุณหภูมิ 2 ระดับ แทนการใช้ 3 ระดับแบบที่ใช้กับพีซีอาร์ทั่วไป แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในโพลีอะครีลาไมด์เจล และย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

ส่วน AP-PCR ใช้ไพรเมอร์ขนาด 20 นิวคลีโอไทด์ขึ้นไป ใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 โปรแกรม คือ ใช้อุณหภูมิสำหรับ annealing ต่ำในรอบแรกแล้วจึงเพิ่มให้สูงขึ้นอีก 30-40 รอบ ในการทำพีซีอาร์ช่วงหลังใส่นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีลงไป แล้วจึงแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยโพลีอะครีลาไมด์เจล ตรวจสอบผลโดยทำออโตเรดิโอกราฟ ซึ่งนับเป็นวิธีที่ยุ่งยาก

เทคนิคอาร์เอพีดี ใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่มีเบสเป็นคู่สมกันโดยไม่จำเป็นต้องทราบว่าเป็นส่วนใดบนโครโมโซมโอกาสที่จะพบลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับไพรเมอร์คือ 1 ใน 10^4 ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอ โดยเกิดคู่สมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดมีสัดส่วนเท่า ๆ กันในจีโนม สามารถประมาณค่าของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์บางชนิดได้จากสมการ

$$b = (2000 \times 4^{-2n}) \times C$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อ b คือ จำนวนแถบสีดีเอ็นเอที่คาดหมายในหนึ่งไพรเมอร์ n คือ ความยาวของไพรเมอร์ คิดเป็นนิวคลีโอไทด์และ C คือค่าขนาดของจีโนมหรือค่า C value ตัวอย่างได้แก่ ข้าวโพดมีจีโนมขนาด 6x109 คู่เบส นำมาทำอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ (10-mers) จะได้แถบดีเอ็นเอประมาณ 10.9 แถบ แต่จากการทดลองของนักวิจัยหลายท่านพบว่า จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิด ขึ้นกับขนาดของจีโนม พืชที่มีจีโนมขนาดใหญ่อาจเกิดแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าพืชที่มีจีโนมขนาดเล็ก การเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นผลมาจากไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้หลายบริเวณ ถ้าไพรเมอร์ไปเกาะกับดีเอ็นเอ 2 บริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันนัก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางที่เข้าหากัน จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงเวลาดังกล่าวได้ แต่ถ้าไพรเมอร์เกาะบนดีเอ็นเอสายเดียวกันในทิศทางแยกออกจากกัน หรือเกาะได้ใน 2 สาย ที่ห่างไกลกันมากแม้ทิศทางจะเข้าหากันแต่ไม่สามารถเกิดผลผลิตได้ ความแตกต่างของแถบอาร์เอพีดี หรือโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นระหว่างแต่ละตัวอย่างอาจเกิดจาก

1. มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่มาสอดแทรกในระหว่างตำแหน่ง 2 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะ ทำให้ไพรเมอร์ทั้งสองโมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ
2. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นที่เกาะกับไพรเมอร์หายไปหนึ่งตำแหน่งหรือทั้ง 2 ตำแหน่ง ทำให้ไม่เกิดแถบสีดีเอ็นเอจากบริเวณดังกล่าว
3. มีการแทนที่หรือเปลี่ยนแปลงเบสบริเวณที่เป็นที่เกาะของไพรเมอร์ทำให้ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายไม่ได้จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ
4. มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กสอดแทรกเข้ามา หรือหายไป ทำให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเปลี่ยนแปลงไป

อย่างไรก็ดีโพลีมอร์ฟิซึมของอาร์เอพีดีมักเกิดขึ้นในลักษณะการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ มากกว่าการเปลี่ยนแปลงขนาดของแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอของพืชพบทั้งจากนิวเคลียส คลอโรพลาสต์ และไมโตคอนเดรีย ในการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ทั้งหมดนำมาวิเคราะห์อาร์เอพีดี พบว่าแถบดีเอ็นเอบางส่วนประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของไมโตคอนเดรีย และน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์มาจากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ ดังนั้นแถบเครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD marker) ส่วนใหญ่จึงมาจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส ซึ่งมีการถ่ายทอดมาจากทั้งฝ่ายพ่อและฝ่ายแม่ แม้ว่าเทคนิคอาร์เอพีดีจะทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก แต่มีข้อเสียในเรื่องของการทดลองซ้ำ บางครั้งได้ผลที่ต่างจากเดิมเนื่องจากอาร์เอพีดีมีความไวต่อการเปลี่ยนสภาวะต่าง ๆ จึงต้องระมัดระวังและควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ นอกจากนี้แถบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นยังแสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต (homozygote) และเฮทเทอร์โรไซโกต (heterozygote) ได้

ปฏิกิริยาหลักของเทคนิคอาร์เอพีดี คือ ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเข้าใจอย่างละเอียด เพื่อที่สามารถดำเนินการทดลอง และแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในระหว่างการทดลองได้

Polymerase Chain Reaction (PCR) (วัชรี และมนตรี, 2536)

พีซีอาร์ค้นพบโดย Kary B. Mullis นักเคมีวิเคราะห์ชาวอเมริกัน ในปี ค.ศ. 1985 โดยทางทฤษฎีพีซีอาร์มีส่วนคล้ายกับ DNA replication ภายในเซลล์ คือเป็นปฏิกิริยาการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลอง ซึ่งมีองค์ประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ได้แก่ ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต เช่น พืช สัตว์ ไวรัส เป็นต้น
2. ไพรเมอร์เป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ ที่นำมาจับคู่แบบสุ่มกับดีเอ็นเอต้นแบบ ในกรณีเทคนิคของอาร์เอพีดี ใช้ไพรเมอร์เพียงสายเดียวต่อหนึ่งปฏิกิริยา ไพรเมอร์ คือ oligonucleotide สายสั้น ๆ สายเดี่ยวที่สังเคราะห์ขึ้น ประกอบด้วยเบสปริมาณน้อย ในกรณีของเทคนิคอาร์เอพีดีมีเบสเพียง 10 ตัว ใช้เป็นตัวติดตามแบบสุ่ม เพื่อเข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบของสิ่งมีชีวิต ดังนั้น ไพรเมอร์จึงถูกออกแบบให้มีความหลากหลายตามการเรียงลำดับเบส ความเข้มข้นของเปอร์เซ็นต์ guanine รวมกับ cytosine เป็นต้น
3. เอนไซม์ DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการเติม dNTPs ต่อจากไพรเมอร์ เพื่อให้เกิดสายดีเอ็นเอตลอดแนวของดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งเริ่มทำงานในช่วงอุณหภูมิของ extension
4. นิวคลีโอไทด์มี 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP หรือเรียกโดยรวมว่า dNTPs คือ หน่วยย่อยของกรดนิวคลีอิกที่ใช้เติมให้เป็นดีเอ็นเอสายใหม่
5. ส่วนประกอบอื่น ๆ ได้แก่ $MgCl_2$, น้ำ (deionize water) และ reaction buffer

ขั้นตอนของปฏิกิริยาพีซีอาร์

ปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลายรอบ แต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิ 90-95 °C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ 36-60 °C เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม คือ A จับคู่กับ T และ C จับคู่กับ G
3. ขั้นตอน extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อเนื่องจากจุดไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในทิศทางจาก (5'⟶3') โดยอาศัยเอนไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น *Taq* DNA polymerase อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้อยู่ในช่วง 70-75 °C และมี Mg^{2+} เป็น cofactor ของปฏิกิริยา

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะทำตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำกัน เป็นจำนวน 30-40 รอบ ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งเรียกว่า amplified หรือ PCR product จำนวนมาก ลักษณะการเพิ่ม PCR product เป็นแบบ exponential โดยหลังจากการทำพีซีอาร์จำนวน n รอบ PCR product ที่เกิดขึ้นตามทฤษฎีจะเท่ากับ 2^n ถ้าการทำพีซีอาร์มีประสิทธิภาพการผลิต 100%

ข้อพิจารณาในการปรับสภาพที่เหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์

เนื่องจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยต่าง ๆ จึงเป็นการยากที่จะมีสูตรสำเร็จของวิธีการทำพีซีอาร์เพียงสูตรเดียวที่สามารถนำไปใช้ครอบคลุมได้ในงานทุกรูปแบบ ดังนั้นเมื่อเริ่มต้นทำพีซีอาร์ สำหรับการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่งจำเป็นต้องมีการปรับสภาพให้เหมาะสมสำหรับงานนั้น เพื่อให้ประสิทธิภาพของการทำพีซีอาร์เกิดสูงสุด การทำพีซีอาร์โดยปราศจากการปรับสภาพให้เหมาะสมนั้นอาจก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ เช่น ไม่เกิด PCR product หรือเกิดน้อย เกิด PCR product ที่ไม่จำเพาะ และอาจเกิด primer-dimer เป็นต้น

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำพีซีอาร์ และต้องปรับให้มีความเหมาะสมมีดังนี้

1.ไพรเมอร์ สิ่งสำคัญที่สุด คือการเลือกใช้ไพรเมอร์ที่เหมาะสม มีหลักเกณฑ์ดังนี้

1.1 ควรมีความยาวประมาณ 10-30 นิวคลีโอไทด์ และประกอบด้วย guanine กับ cytosine 50-60%

1.2 ควรมีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับทางปลาย 3' ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของดีเอ็นเอต้นแบบ และลำดับนิวคลีโอไทด์ควรมีความจำเพาะซึ่งไม่พบในบริเวณอื่น ๆ ในสายดีเอ็นเอต้นแบบ

1.3 การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณปลาย 3' ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ไม่ควรเป็นคู่สมกัน เพื่อป้องกันการเกิด primer-dimer

1.4 ค่า Tm (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ควรใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 55-80 °C ซึ่งค่า Tm สามารถโดยใช้สูตร Tm = (a number of A+T) × 2 + (a number of C+G) × 4 คือ A หรือ T ใช้ 2 °C และ C หรือ G ใช้ 4 °C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.5 ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 0.1-0.5 µM ถ้าปริมาณไพรเมอร์มากเกินไปมีโอกาสเกิดการจับคู่ผิดพลาด (mispriming) ทำให้เกิด PCR product ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นมาก และยังเพิ่มโอกาสการเกิด primer-dimer ทำให้เกิด PCR product ที่ต้องการลดน้อยลง

2. *Taq* DNA polymerase สามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิ 20-95 °C ความเข้มข้นของ *Taq* DNA polymerase ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 1.0-2.5 units/µl. การใช้เอนไซม์ปริมาณมากเกินไปทำให้เกิด PCR product ที่ไม่จำเพาะขึ้น

3. magnesium ion (Mg^{2+}) จัดเป็นอิออนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในปฏิกิริยา PCR เนื่องจากมีผลต่อ primer annealing และความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์ (enzyme fidelity) ถ้าความเข้มข้นของ Mg^{2+} มากเกินไปจะทำให้เกิด PCR product ที่ไม่จำเพาะขึ้น แต่ถ้าความเข้มข้นของ Mg^{2+} น้อยเกินไปจะทำให้เกิด PCR product ลดลงโดยทั่วไปความเข้มข้นจะอยู่ในช่วง 0.5-2.5 mM

4. deoxynucleoside triphosphate (dNTPs) ที่นิยมใช้มี pH 7.0 และความเข้มข้นที่เหมาะสมของแต่ละชนิดอยู่ในช่วง 50-200 µM

5. buffer มาตรฐานที่นิยมใช้มีองค์ประกอบ คือ 10-50 mM Tris-HCl pH 8.3-8.8 และมี KCl ทำหน้าที่เร่งการเกิด primer annealing แต่ถ้าความเข้มข้นของ KCl มากเกินไปจะลดประสิทธิภาพการทำงานของ *Taq* DNA polymerase

6. denaturation การตั้งอุณหภูมิต่ำหรือเวลาสั้นเกินไปทำให้ดีเอ็นเอเป้าหมายมีการแยกสายไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้เกิด PCR product น้อยลง ถ้าตั้งอุณหภูมิสูงหรือเวลานานเกินไปทำให้เอนไซม์เสียสภาพเร็ว หากดีเอ็นเอเป้าหมายมี G และ C สูงมากอาจต้องใช้อุณหภูมิสูงขึ้น

7. annealing ในขั้นตอนนี้การเลือกอุณหภูมิ และระยะเวลา ขึ้นอยู่กับลำดับเบส ความยาว และความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ใช้ ตามทฤษฎีควรใช้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าค่า Tm ของไพรเมอร์ 5 °C โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 50-55 °C ยกเว้นในเทคนิคอาร์เอพีดีซึ่งใช้ไพรเมอร์ขนาด 10-mers จะใช้อุณหภูมิประมาณ 37 °C แต่ไม่ควรใช้อุณหภูมิที่ต่ำเกินไป เพราะแม้ปฏิกิริยาจะเกิดได้ดี แต่อาจเกิดการจับคู่ผิด

8. extension ในขั้นตอนนี้เป็นการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยขึ้นอยู่กับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิ 72 °C โดยมีอัตราการสร้างสายดีเอ็นเอในช่วง 35-100 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาที ขึ้นกับธรรมชาติของดีเอ็นเอเป้าหมาย ความเข้มข้นของเกลือ และค่า pH ของ buffer ที่ใช้

9. ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลกระทบต่อการทดลอง เช่น ความสะอาดของเครื่องแก้ว และภาชนะต่าง ๆ ที่ใช้ในงานพีซีอาร์ควรล้างให้สะอาดปราศจากสารซักฟอก (detergent) น้ำที่ใช้ควรมีความบริสุทธิ์สูง และปราศจากเอนไซม์ nuclease เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจสอบ PCR product ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (gel electrophoresis)

เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสเป็นวิธีการที่จัดได้ว่ามีประสิทธิภาพสูง และใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษากรดนิวคลีอิก ทั้งในแง่การแยกขนาด หรือการศึกษาปริมาณ โครงสร้าง และคุณสมบัติบางอย่าง โดยใช้ปริมาณกรดนิวคลีอิกเพียงเล็กน้อย

หลักการ เนื่องจากกรดนิวคลีอิกมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต (PO_4^{-3}) ทำให้มีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจึงเคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก จากหลักการดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการแยก หรือวิเคราะห์กรดนิวคลีอิก โดยเฉพาะดีเอ็นเอภายใต้สนามไฟฟ้า โดยผ่านตัวกลาง คือ เจล ที่ใช้กันทั่วไป คือ อะกาโรสเจล และโพลีอะครีลาไมด์เจล โดยที่อะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่า 500 คู่เบส (bp) ในขณะที่ความเข้มข้นสูงและโพลีอะครีลาไมด์เจลใช้ศึกษาดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กกว่า 500 คู่เบส

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่านเจลของดีเอ็นเอ

1. ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอขนาดใหญ่เคลื่อนที่ผ่านเจลได้ยากกว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก ดังนั้นในเวลาเท่ากัน และสภาวะเดียวกันดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางสั้นกว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก

2. รูปร่างของดีเอ็นเอ ในกรณีของพลาสมิดดีเอ็นเอสามารถขดพันตัวเอง (supercoiled DNA) เพื่อให้มีความเสถียรมากที่สุด แต่เมื่อใดที่ดีเอ็นเอสายคู่เส้นใดเส้นหนึ่งขาดตรงตำแหน่งพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ เกิดช่องขึ้น เรียกว่า nick ทำให้ขดของดีเอ็นเอคลายออก ดีเอ็นเอจะอยู่ในสภาพเป็นวง (circular DNA) และถ้าเกลียวคู่ของดีเอ็นเอขาดออกจากกันทั้งสองเส้นดีเอ็นเอจะกลายเป็นเส้นตรง (linear DNA) ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างต่างกัน แม้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน ภายใต้สภาวะเดียวกันมีการเคลื่อนที่ผ่านเจลด้วยความเร็วต่างกัน ดีเอ็นเอขดพันตัวเองเคลื่อนที่เร็วที่สุด รองลงมาคือดีเอ็นเอที่เป็นเส้นตรง และดีเอ็นเอที่มีสภาพเป็นวงเคลื่อนที่ได้ช้าที่สุด

3. ความเข้มข้นของเจล เจลที่มีความเข้มข้นสูงมีช่องว่างระหว่างโมเลกุล (pore) น้อย ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านได้ช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นเจลที่มีความเข้มข้นสูงจึงเหมาะในการแยกดีเอ็นเอขนาดเล็ก ส่วนเจลที่มีความเข้มข้นต่ำจึงเหมาะที่จะแยกดีเอ็นเอขนาดใหญ่ และเมื่อความเข้มข้นของเจลคงที่ ระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ผ่านเจลนั้นแปรผกผันกับขนาดของดีเอ็นเอ

4. electrophoresis buffer มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่านเจลของดีเอ็นเอ ซึ่งขึ้นกับความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ (buffering capacity) การใช้บัฟเฟอร์ความเข้มข้นสูงทำให้การนำไฟฟ้าสูงขึ้น และที่แรงดันไฟฟ้า (voltage) คงที่ ความต้านทานไฟฟ้า (resistance) ลดลง กระแสไฟฟ้า (current) จะเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดความร้อนมากขึ้น ดังนั้นการเลือกใช้บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเหมาะสมจึงมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความสำคัญเพราะเป็นการกำหนดกำลังไฟฟ้าที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ถ้าสูงเกินไปสามารถขจัดปัญหาการเกิดความร้อนสูงได้ แต่ผลการแยกแถบดีเอ็นเอจะไม่ดี เนื่องจากเวลาในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสจะนานขึ้น และเกิดการแพร่ของดีเอ็นเอ

5. กระแสไฟฟ้า โดยทั่วไปในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสมักทำในสภาวะแรงดันไฟฟ้าคงที่ ดังนั้นค่าแรงดันไฟฟ้า จึงมีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอโดยมีค่าความต้านทานของตัวกลาง (เจล และ บัฟเฟอร์) มาเกี่ยวข้องด้วย จากสมการ Ohm 's law ; V = IR เมื่อ V คือแรงดันไฟฟ้า หรือ voltage (volts) , I คือกระแสไฟฟ้า หรือ current (milliamps) และ R คือค่าความต้านทาน หรือ resistance (Ohms) ของตัวกลางในสนามไฟฟ้านั้น ดังนั้นจากสมการเมื่อผ่านแรงดันไฟฟ้าจำนวนหนึ่งเข้าไปในวงจร ส่งผลให้กระแสไฟฟ้าเข้าไปในตัวกลางนั้น แล้วแรงดันไฟฟ้าเมื่อผ่านตัวกลางจะมีค่าเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับความต้านทานของตัวกลางนั้น ทำให้เกิดกระแสไฟฟ้า ซึ่งผลักดันให้ดีเอ็นเอ เกิดการเคลื่อนที่ขึ้น ทั้งนี้ความต้านทานของตัวกลางจะแปรผกผันกับความหนาของตัวกลาง ตลอดจนปริมาณประจุในบัฟเฟอร์ โดยทั่วไปเมื่อใช้ค่าแรงดันไฟฟ้าที่พอเหมาะความเร็วในการเคลื่อนที่ของ linear DNA จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณแรงดันไฟฟ้า (แรงดันเพิ่มขึ้นดีเอ็นเอเคลื่อนที่เร็วขึ้น) แต่ทว่าเมื่อใดที่ค่าแรงดันไฟฟ้าสูงเกินไป ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ไม่สม่ำเสมอ ทำให้ความสามารถในการแยก DNA fragment ลดลง

การทำ agarose gel electrophoresis

เริ่มจากการเตรียมแผ่นเจลให้มีความเข้มข้นเท่าใดขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอที่ศึกษา โดยผสมผงอะกาโรสกับบัฟเฟอร์ให้เข้ากัน นำไปต้มให้ละลาย หลังจากนั้นเทเจลในถาดเตรียมเจล แล้วเสียบแผ่น comb ลงไป ปล่อยให้เจลแข็งตัวก่อนไปทำอิเล็กโทรโฟรีซีสต่อไป โดยทั่วไปจะให้แผ่นเจลหนา 5 มิลลิเมตร หากหนาเกินไปจะแยก DNA fragment ได้ไม่ดี หากบางกว่า 3 มิลลิเมตร จะแตกหักได้ง่าย

ก่อนที่จะนำ PCR product ไปทำอิเล็กโทรโฟรีซีสต้องผสมกับสารละลายที่มีความหนาแน่นมากกว่าบัฟเฟอร์ คือ loading buffer หรือ loading dye เป็นสารที่มีสีของ bromophenol blue ซึ่งใช้เป็นสัญญาณบอกถึงระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไป

หลังจากทำอิเล็กโทรโฟรีซีสเรียบร้อยแล้วตรวจดู และบันทึกภาพโดยการย้อมเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ ซึ่งเป็นสารที่มีโครงร่างแบน สามารถแทรกเข้าไประหว่างเบสของดีเอ็นเอ เมื่อกระตุ้นด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จะปล่อยแสงฟลูออเรสเซ็นต์ (fluorescent) ออกมาให้มองเห็นได้ ต้องทำในห้องมืด เพื่อป้องกันไม่ให้แสงอื่นบดบังแสงฟลูออเรสเซ็นต์ที่ปล่อยออกมา และผู้ตรวจต้องสวมแว่นตาป้องกันแสง UV ทุกครั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัญหา สาเหตุ และการแก้ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการทำ agarose gel electrophoresis

1. ดีเอ็นเอในแต่ละช่องเจล (well) เคลื่อนที่ไม่เท่ากันทำให้มองเห็นเป็นรูปโค้ง อาจเกิดจากปริมาณเกลือในตัวอย่างดีเอ็นเอมากเกินไป หรือเกิดความร้อนมากเกินไป หรือปริมาณ glycerol/sucrose ในตัวอย่างดีเอ็นเอมากเกินไป อาจแก้ไขโดยการใช้ ficoll แทน

2. สีไม่เคลื่อนที่ออกจากช่องเจล อาจเกิดจากดีเอ็นเอไม่บริสุทธิ์ หรือได้ผ่านกระบวนการ alkaline detergent extraction ทำให้ bromophenol blue ซึ่งไม่ทนต่อด่างเสียสภาพได้

3. ดีเอ็นเอไม่เคลื่อนที่ไปพร้อมกัน อาจเกิดจากการใช้แรงดันไฟฟ้าสูงเกินไป ทำให้เกิดความร้อน

4. DNA fragment แยกจากกันได้ไม่ดี ควรปรับความเข้มข้นของเจล ถ้าต้องการแยกดีเอ็นเอขนาดใหญ่ ให้ลดความเข้มข้นลง และหากต้องการแยกดีเอ็นเอขนาดเล็ก ให้เพิ่มความเข้มข้นขึ้น

5. ผลมองเห็นเป็นปื้น (smearing) อาจเกิดจากการใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่เข้มข้นเกินไป แก้ไขโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซีสให้ช้าลง หรืออาจเกิดจากตัวอย่างมีโปรตีน หรืออาร์เอ็นเอปนเปื้อน แก้ไขโดยการใช้เอนไซม์ RNase หรือสกัดดีเอ็นเอใหม่

6. พบการเรืองแสงที่พื้นหลัง (background) อาจเกิดจากมีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน แก้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสให้สี loading dye ตกจากเจล เพราะ RNA เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสี

7. มองไม่เห็นแถบดีเอ็นเอ อาจมีดีเอ็นเอปริมาณน้อย หรือดีเอ็นเอเคลื่อนที่พร้อมสี แก้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสโดยใช้ loading dye ที่ไม่มีสี หรือใช้ปริมาณให้น้อยลง

8. แถบดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไม่เหมือนรูปแบบเดิม ซึ่งการเปลี่ยนอิเล็กโทรโฟรีซีสบัฟเฟอร์หรือความแตกต่างระหว่างอะกาโรสเจลที่ผลิตแต่ละครั้ง อาจทำให้เกิดเหตุการณ์นี้ได้

การประยุกต์เทคนิคอาร์เอพีดี

อาร์เอพีดีเป็นเทคนิคพื้นฐานที่ดีสำหรับผู้ที่เริ่มงานทางด้านดีเอ็นเอ เช่น งานด้านการอนุรักษ์พันธุ์พืช สามารถนำไปตรวจสอบวิวัฒนาการของพืช ใช้บอกความสัมพันธ์ของพืชพันธุ์ต่าง ๆ และสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบสายพันธุ์ได้ ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอแต่ละตำแหน่งมีความสัมพันธ์กับลักษณะฟีโนไทป์ ซึ่งทราบได้จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม หรือ linkage ทำให้สามารถติดตามการถ่ายทอดลักษณะนั้นไปยังรุ่นต่อไปได้ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถคัดเลือกพืชพันธุ์ได้ในระยะแรกของการเจริญเติบโต ในกรณีที่เมล็ดพันธุ์มีจำนวนจำกัด ช่วยลดระยะเวลา และค่าใช้จ่ายในการดูแลพืช (ศิริลักษณ์, 2547) จะเห็นได้ว่าเทคนิคอาร์เอพีดีนั้นสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ ได้อย่างหลากหลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถใช้บอกความสัมพันธ์ด้านพันธุกรรมของพืชได้ เช่น ในการศึกษา rhododendron จำนวน 13 ต้น มาจัดกลุ่ม พบว่า *Rhododendron yakushimanum* var. Mist Maiden และ var. Ken Janeck อยู่ในกลุ่มเดียวกัน ในขณะที่ var. Pink Parasol จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับลูกผสมที่เกิดจาก Pink Parasol × *R. smirnowii* และยังถูกจัดอยู่ร่วมกับ *R. smirnowii* และเมื่อศึกษาแถบเครื่องหมาย $OPL07_{660}$ ที่ได้จาก rhododendron 4 ชนิด คือ *R.* Anna Baldsiefens, *R. arborescens, R. atlanticum* และ *R. pouhanense* พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกัน ส่วนลำดับเบสจาก $OPL03_{900}$ ของ *R.* Anna Baldsiefens ซึ่งเป็นลูกผสมไม่เหมือนชนิดอื่นเลย ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่มีการศึกษาไว้ (Iqbal *et al.*, 1995) ในการจำแนกสายพันธุ์ (varieties) และสายต้น (clone) กุหลาบ โดยใช้ไพรเมอร์ยาว 12 เบส จำนวน 10 ชนิด และ 10 เบส จำนวน 3 ชนิด พบว่ามีเพียง 7 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และทำซ้ำได้ นอกจากนี้ยังพบว่าไพรเมอร์ A11 และ OPF4 สามารถแยกพันธุ์ Rotte Rose ออกมาได้ ส่วนพันธุ์ Roulette สามารถใช้ไพรเมอร์ A11 และ OPC1 และสามารถแยกสายต้นของพันธุ์ Marina ออกจากสายต้นของพันธุ์ Rotte Rose ด้วยไพรเมอร์ OPC1 (Matsumoto and Fukui, 1996) ในการศึกษาพืชสกุล *Halophila* ด้วยไพรเมอร์ชุด P พบว่าไพรเมอร์ P05 และ P09 ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก โดย *Halophila johnsoni, H. minor* และ *H. ovalis* มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด และมีความสัมพันธ์ห่าง ๆ กับ *H. decipiens* (Smith *et al.*, 1997) ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแกลดิโอลัสพันธุ์ป่า 33 ชนิด ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ 140 ชนิด พบเพียง 32 ชนิดที่ให้แถบดีเอ็นเอ รวมทั้งหมด 133 แถบ และเมื่อผสมข้ามระหว่างชนิดทั้งภายใน และระหว่างกลุ่ม 7 คู่ผสม พบว่าสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอดังกล่าวตรวจสอบลูกผสมของแกลดิโอลัสได้ (Takatsu *et al.*, 2001) ในการศึกษาความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมระหว่างชนิด พันธุ์ และลูกผสม *Heliconia* พบว่าสามารถใช้ไพรเมอร์ 11 ชนิด แยกความแตกต่างระหว่างชนิด และพันธุ์ได้ และพบว่า *H. psittacorum* ที่เป็น triploid 2 พันธุ์ คือ Iris และ Petra มีแบบแผนอาร์เอพีดีคล้ายกัน (Kumar *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า Fico *et al.* (2003) ได้ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีในการศึกษา *Aconitum vulparia, A. napellus* subs. Tauricum และ *A. napellus* subs. Neomontanum ซึ่งสามารถแยกได้อย่างชัดเจนระหว่างต้นที่มีดอกสีเหลือง และดอกสีน้ำเงิน ยกเว้น *A. paniculatum* ซึ่งแยกออกมาอีกกลุ่มหนึ่ง แต่มีความสัมพันธ์กับกลุ่ม *A. napellus*

เทคนิคอาร์เอพีดียังสามารถนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในไม้ดอก ได้มีการศึกษาใน Witchhazel (*Hamamelis spp.*) 37 พันธุ์ สามารถแบ่งได้เป็น 7 กลุ่ม คือ พันธุ์ *H.* x*intermedia* 3 กลุ่ม พันธุ์ *H. vernalis* 2 กลุ่ม พันธุ์ *H. mollis* และ *H. japonica* อย่างละ 1 กลุ่ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(Marquard *et al.*, 1997) ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ peony โดยใช้ไพรเมอร์ 40 ชนิด มีเพียง 11 ชนิด ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้จำนวนมาก และแบ่งพืชเป็น 4 กลุ่มได้ชัดเจน แต่ไม่ตรงกับการจำแนกด้วยลักษณะดอก ชนิดใบ หรือสีของกลีบดอก (Hosoki *et al.*, 1997) ส่วนปรีชา (2543) ได้ศึกษากระเจียว 7 ชนิด ซึ่งมีใบประดับที่มีสีแตกต่างกัน โดยใช้ไพรเมอร์ 20 ชนิด พบว่า 19 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และระบุชนิด ทั้งให้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความเป็นเอกลักษณ์ของพืชได้ จรัสศรี (2545) ได้วิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับกระเจียว 21 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ 16 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 9 ชนิด ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันในช่วง 150-3000 คู่เบส ทั้งหมด 230 แถบ สามารถจัดเป็น 6 กลุ่มใหญ่ได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพีหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ และความแปรปรวนของต้นกล้าสกุล *Osteospermum* ที่เก็บรวบรวมจากประเทศอังกฤษ อิตาลี และ เดนมาร์ก โดยเทคนิคอาร์เอพีดีแสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอที่มีระดับของโพลิมอฟิซึมสูง พบว่าพืชจากประเทศอังกฤษมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมมากที่สุด รองลงมาคือ ประเทศอิตาลี และน้อยที่สุดคือ ประเทศเดนมาร์ก และพบว่ากลุ่มที่มีความถี่คล้ายคลึงกันมากที่สุด (the most frequent similarity classes) คือจากประเทศเดนมาร์ก (0.7-0.8) ประเทศอิตาลี (0.6-0.7) และประเทศอังกฤษ (0.5-0.6) ซึ่งการวิเคราะห์อาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพีสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ และใช้ปกป้องสิทธิบัตรพืชพันธุ์ใหม่ได้ (Berino *et al.*, 2001) การศึกษาความหลากหลายของประชากรภายใน และระหว่างชนิดใน dogrose พบว่ามีการถ่ายทอดลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากต้นแม่ โดยลักษณะของแถบดีเอ็นเอ และระดับความแปรปรวนของต้นกล้าภายในวงศ์ต่ำมาก โดยเฉพาะใน *Rosa rubiginosa* เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลทางพันธุกรรมกับข้อมูลทางพฤกษศาสตร์ พบว่าประชากรของ *R. domalis* มีการกระจายตัวปานกลาง ส่วน *Rosa rubiginos* มีความแตกต่างของประชากรสูงมาก (Nybom *et al.*, 2001) การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการตรวจสอบส่วนขยายพันธุ์ หรือท่อนพันธุ์ เพื่อจำแนก *Pelargonium* เพื่อใช้ในการปกป้องสิทธิ์ของนักปรับปรุงพันธุ์ โดยการใช้เทคนิค RFLP, RAPD, SCAR, STMS, Oligofingerprinting, InterSSR และ AFLP พบว่า มีเพียง RAPD, STMS และ AFLP ที่เหมาะสมสามารถแยก *Pelargonium* 43 พันธุ์ได้ และแถบดีเอ็นเอจากอาร์เอพีดีสามารถทำซ้ำได้มากกว่าที่คาด ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอจากอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพีมีลักษณะแถบดีเอ็นเอไม่คมชัด (Lesur *et al.*, 2001) นอกจากนี้มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของนิเวศวิทยากับจีโนไทป์ของ birdfoot trefoil (*Lotus carniculantus* L.) เพื่อเปรียบเทียบการจำแนกทางสัณฐานวิทยา และอาร์เอพีดีของพืชชนิดนี้จาก 28 แหล่ง กับกลุ่มที่มีลักษณะจีโนไทป์ต่าง ๆ ใน National Plant Germplasm System (NPGS) ของกระทรวงเกษตรประเทศสหรัฐอเมริกา และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบบของจีโนไทป์ และแหล่งที่เก็บรวบรวมตัวอย่างทางนิเวศภูมิศาสตร์ พบว่าสามารถ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

จำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 18 ลักษณะ การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีให้แถบดีเอ็นเอรวม 130 แถบ และสามารถจำแนกตามจีโนไทป์ได้ 8 แบบ โดยสัมพันธ์กับแหล่งที่เก็บรวบรวมตัวอย่างทางนิเวศภูมิศาสตร์ นั่นคือจีโนไทป์คล้ายกันพบในที่อยู่อาศัยคล้ายกัน และมีเครื่องหมายดีเอ็นเอสัมพันธ์กับความคล้ายของระบบนิเวศ แต่ไม่สัมพันธ์กับความใกล้ชิดทางภูมิศาสตร์ ดังนั้นการจำแนก birdfoot trefoil ควรขึ้นอยู่กับลักษณะนิเวศภูมิศาสตร์ และสัณฐานวิทยา (Steiner and Los Santos, 2001) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของวานิลลา 3 ชนิด คือ *Vanilla planifolia* ในเม็กซิโกและอเมริกากลาง *V. tahitensis* ในตอนใต้ของเกาะแปซิฟิก และ *V. pompana* ในอินดี้ตะวันตก อเมริกากลางและใต้ พบว่า *V. planifolia* มีระดับความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำในพื้นที่เพาะปลูก เช่น เกาะรียูเนียน และโพลินีเซีย เทคนิคอาร์เอพีดีนี้ยังสามารถให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบลูกผสมระหว่าง *V. planifolia* กับ *V. tahitensis* ได้ และพบว่า *V. tahitensis* อาจไม่ใช่ลูกผสมโดยตรงของ *V. planifolia* และ *V. pompana* แต่น่าจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *V. planifolia* มาก (Besse *et al.*, 2004)

การตรวจสอบลูกผสมในไม้ดอกต่าง ๆ พบว่าเทคนิคอาร์เอพีดีสามารถใช้ประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของพิทูเนีย และซิคลาเมนได้ ทำให้คัดเลือกพันธุ์ในแต่ละรุ่นของเมล็ดดอกไม้ทั้ง 2 ชนิดได้รวดเร็ว (Jianhua *et al.*, 1997) การตรวจสอบความสัมพันธ์ของลูกผสมที่ผสมภายในชนิดเดียวกัน และข้ามชนิดใน *Pelargonium* 5 สายพันธุ์ พบว่าไพรเมอร์ OPG11 สามารถแสดงเครื่องหมายดีเอ็นเอของพ่อและแม่ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม และลูกผสมหนึ่งคู่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพ่อมากกว่าแม่ เพราะมีแถบดีเอ็นเอของพ่อปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมมากกว่าของแม่ (Renou *et al.*, 1997) ใน *Pistacia* x*saportae* (Anacardiaceae) ซึ่งเป็นลูกผสมที่มีความแข็งแรง และต้านทานต่อการติดเชื้อ *Verticillium* ซึ่งการจำแนกพันธุ์ต้านทานนี้ด้วยลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทำได้ยาก จึงได้นำเทคนิคอาร์เอพีดีมาใช้ศึกษา พบว่ามี 6 ไพรเมอร์ ที่ให้เครื่องหมายดีเอ็นเอเฉพาะเจาะจงต่อพันธุ์นี้ สามารถนำมาใช้ตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว ช่วยประหยัดทั้งเวลา และเงินทุน (Werner *et al.*, 2001) การใช้เทคนิคอาร์เอพีดีหาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับแยกลูกผสมจากจีโนไทป์ของพ่อแม่ในลิลี่ที่ได้จากการผสมข้ามทั้งหมด 4 คู่ เมื่อใช้ไพรเมอร์ 40 ชนิด พบว่ามี 8 ไพรเมอร์ ที่สามารถทำให้เกิด polymorphic bands ในคู่ผสม Marco polo × *L. henryi* และ 6 ไพรเมอร์ที่พบเครื่องหมายดีเอ็นเอในคู่ Alma Ata × *L. pumilum* และคู่ Muscadet × *L.* x*formolongi* โดยแถบดีเอ็นเอจากทั้ง 14 ไพรเมอร์ ไม่แสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอของต้นพ่อ แสดงว่าต้น (regenerants) ที่ได้นั้นเกิดขึ้นมาจากไข่ (ovules) ที่ผสมไม่ติด (Wiejacha *et al.*, 2001) การศึกษาลูกผสมของลิลี่กลุ่ม Asiatic 2 พันธุ์ คือ Montreux และ Connecticut King โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาวหลากหลาย คือ 10, 12, 15 และ 20 เบส พบว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาอาร์เอพีดีจะเพิ่มขึ้นตามความยาวของไพรเมอร์ และเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค ISSR โดยใช้ 3' ASSR ไพรเมอร์ พบว่า ให้ผลเหมือนกับเทคนิคอาร์เอพีดี และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้นั้นมีความคงตัว สามารถทำซ้ำได้ และยังถ่ายทอดไปสู่ลูกผสมรุ่นที่ 1 ได้ (Yamagishi *et al.*, 2002)

การนำเทคนิคอาร์เอพีดีมาใช้ในการศึกษากล้วยไม้นั้นมีหลายกรณี เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ ในสกุลแวนด้า พบว่า *Vanda sanderiana* และ *Ascocentrum miniature* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกว่า *V. teres* และ *V. hookeriana* ซึ่งถูกแยกไปอยู่ในสกุล *Papilionanthe* ขณะที่ *V. sanderiana* ยังอยู่ในสกุลแวนด้า (Lim *et al.*, 1998) การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเอื้องแซะที่รวบรวมจาก 4 แหล่ง จำนวน 32 ตัวอย่าง มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกัน ยกเว้นสีของแผ่นปาก ส่วนลักษณะทางปริมาณมีทั้งเหมือน และแตกต่าง โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีด้วยไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ 8 ชนิด พบว่ามี 5 ชนิด แสดงแถบดีเอ็นเอที่สามารถนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวอย่างของเอื้องแซะได้ แต่ไม่สามารถแยกตามแหล่งที่มาได้ และไม่สามารถแยกประชากรเอื้องแซะออกจากเอื้องเงินแดง และเอื้องแซะดอยปุย โดยพบว่าเอื้องแซะแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ 1) เอื้องแซะจาก อ.แม่สะเรียง และ อ.ปางมะผ้า 2) เอื้องแซะจาก อ. เชียงดาว และดอยขุนตาล (รัติกาล, 2543) การศึกษาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้ใน subtribe Oncidiinae 24 กลุ่ม โดยใช้ไพรเมอร์ 80 ชนิด มีเพียง 14 ชนิด ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และทำซ้ำได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์ของแถบร่วมอยู่ในช่วง 0.25-0.71 สามารถวิเคราะห์การจัดกลุ่มจากการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอเป็น 6 กลุ่มใหญ่ ส่วนสกุล *Miltonia* ถูกแยกออกจากสกุลอื่นใน subtribe Oncidiinae (Tsai *et al.*, 2002)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ ในสกุลแวนด้าฟ้ามุ่ย คำแพง (2543) ได้ตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ *Vanda coerulea* 34 ตัวอย่าง จาก 3 ถิ่นกำเนิดในจังหวัดเชียงใหม่ คือ อำเภออมก๋อย 28 ตัวอย่าง อำเภอแม่แจ่ม 5 ตัวอย่าง และอำเภอสะเมิง 1 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 16 ชนิด พบว่ามีเพียง 2 ชนิด คือ OPF09 และ OPF10 สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและเป็นแถบหลักจำนวน 6 แถบ พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.64-1.17 และเมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF04, OPF05, OPF09 และ OPF10 สุ่มจับกับดีเอ็นเอจาก 17 ตัวอย่าง สามารถให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก จึงพิจารณาเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันจำนวน 10 แถบ พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.51-1.06 แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้สกุลแวนด้าฟ้ามุ่ยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาก แต่ไม่ระบุถึงการแยกกลุ่มตามถิ่นกำเนิด ในการศึกษากล้วยไม้ *Arundina graminifolia* จำนวน 14 ชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ 8 ชนิด พบว่ามี 6 ชนิด คือ OPF01, OPF02, OPF03, OPF05, OPF09 และ OPF10 ที่แสดงความแตกต่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รวม 14 ตำแหน่ง และสามารถจัดแบ่งกล้วยไม้ตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม และพบว่าภายในกลุ่มเดียวกันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (สุนิศา, 2543) ส่วนการศึกษาในกล้วยไม้สกุล *Spathoglottis* ไม่ทราบชนิด จำนวน 16 ตัวอย่าง ซึ่งมีความแตกต่างของลักษณะสีดอก และแหล่งที่มา โดยใช้ไพรเมอร์ 12 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ OPF05, OPF06, OPF11 และ OPF14 สามารถแสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอรวม 16 แถบ แบ่งกลุ่มกล้วยไม้ออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ได้แก่ 1) กลุ่มกล้วยไม้สีชมพูอ่อน สีชมพูเข้ม สีชมพูอมม่วง และสีขาว 2) กลุ่มกล้วยไม้สีบานเย็น และ 3) กลุ่มกล้วยไม้สีเหลือง นอกจากนี้ยังสามารถแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ที่นำมาจากแหล่งรวบรวมเดียวกันได้ (เจนจิรา, 2543)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีสามารถใช้ตรวจสอบความถูกต้องของลูกผสมตลอดจนศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ แม่ และลูกผสมในกล้วยไม้ได้ Benner *et al.* (1995) ได้ตรวจสอบความแตกต่างของคัทลียา 8 ชนิด และลูกผสมรุ่นที่ 1 ที่ได้จากการผสมตัวเองของ *Cattleya harrisoniana* โดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างคัทลียาที่ใช้ทดลอง โดยใน *Cattleya harrisoniana* พบแถบดีเอ็นเอหลักประมาณ 55% ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด นอกจากนี้สามารถหาความจำเพาะของลักษณะชนิด และสกุลของคัทลียาได้ ส่วน Chen *et al.* (2001) ใช้ไพรเมอร์ OPC07 ในการศึกษา *Phalaenopsis* พบว่าสามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แยก *Phalaenopsis* พันธุ์ป่า 3 ชนิด คือ 1) *Phal. Amboinensis* 2) *Phal. amabilis* และ 3) ลูกผสมของ *Phalaenopsis* ทั้ง 2 ชนิด ออกจากกันได้ และแถบดีเอ็นเอจากลูกผสมรุ่นที่ 1 นั้น มาจากพ่อและแม่อย่างละครึ่ง ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำไปจดสิทธิบัตร เพื่อคุ้มครองพันธุ์พ่อ แม่ และลูกผสมใหม่ ๆ ของ *Phalaenopsis* ได้ ศิริลักษณ์ (2547) ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลหวาย 5 คู่ผสม ภายในหมู่เดียวกัน และคู่ผสมข้ามหมู่ คือ หมู่ *Phalaenanthe* (D017) × หมู่ *Formosae* (D022), หมู่ *Formosae* × หมู่ *Formosae* 2 คู่ผสม คือ (D037 × D022) และ (D030 × D031), หมู่ *Dendrobium* (D037) × หมู่ *Dendrobium* (D034) และหมู่ *Dendrobium* (D030) × หมู่ *Formosae* (D018) เมื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ แม่ และลูกผสม โดยใช้ไพรเมอร์ 21 ชนิด คือ OPF01 ถึง OPF20 และ OPD03 ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ พบว่า จำนวนไพรเมอร์ที่ใช้แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพ่อ แม่ และลูกผสม มีความแตกต่างกันในแต่ละลูกผสม โดยคู่ผสม D017 × D022 มีไพรเมอร์ 7 ชนิด คือ OPF01, 02, 03, 04, 05, 06 และ OPD03 ในคู่ผสม D037 × D022 มีไพรเมอร์ 6 ชนิด คือ OPF01, 02, 03, 04, 06 และ 20 ในคู่ผสม D030 × D031 มีไพรเมอร์ 5 ชนิด คือ OPF01, 02, 04, 05 และ 14 ในคู่ผสม D037 × D034 มีไพรเมอร์ 5 ชนิด คือ OPF01, 04, 06, 14 และ OPD03 และในคู่ผสม D030 × D018 มีไพรเมอร์ 3 ชนิด คือ OPF01, 13 และ 14

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากนี้มีการนำเทคนิคอาร์เอพีดีมาประยุกต์ใช้ในพืชต่าง ๆ มากมายทั้งพืชหัว พืชเครื่องดื่ม ผัก ผลไม้ ฯลฯ ซึ่งนิยมกันอย่างแพร่หลายทั้งในอดีต และปัจจุบัน เนื่องจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากเทคนิคอาร์เอพีดี เกิดจากการเพิ่มปริมาณในส่วนของไมโทคอนเดรียประมาณ 5% และมาจากดีเอ็นเอในส่วนของคลอโรพลาสต์น้อยกว่า 5% ดังนั้นแถบดีเอ็นเอส่วนใหญ่จึงมาจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส โดยได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อ แม่ (สุรินทร์, 2540) ซึ่งในเซลล์ทุกเซลล์ย่อมมีดีเอ็นเอที่เหมือนกัน และดีเอ็นเอมีความน่าเชื่อถือมากกว่าโปรตีน เนื่องจากไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมมาเกี่ยวข้อง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved