บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

พืชสกุล *Curcuma*

พืชในสกุล *Curcuma* อยู่ในตระกูล Zingiberaceae ลักษณะทั่วไปเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี (herbaceous perennial) มีลำต้นใต้ดินแบบเหง้า ลำต้นเทียม (pseudostem) เกิดจากการอัดตัวของกาบใบ ใบเป็นใบเดี่ยวรูปร่างป้อม (oval) จนถึงค่อนข้างยาว (oblong) เส้นใบขนานทแยงขึ้น (pinnately parallel) ขอบใบเรียบ (entire) ปลายใบป้าน (obtuse) จนถึงปลายใบแหลม (acute) โคนใบมนจนถึงเรียวแหลม (พิชัยและคณะ, 2536) ช่อดอกเป็นแบบช่อแน่น (compact spike) ประกอบด้วยกลีบใบประดับ (bract) เวียนซ้อนเป็นชั้นเกิดเป็นช่อทรงกระบอก โคนใบประดับเชื่อมติดกันเป็นถ้วย มีดอกจริงในซอกของใบประดับ สีของใบประดับแตกต่างกันไปตามชนิดและพันธุ์ ใบประดับส่วนบน (coma bract) มักยาวกว่าใบประดับส่วนล่างเล็กน้อยแต่ไม่มีดอกจริงในซอกใบประดับ ดอกจริงของพืชใน สกุล *Curcuma* มีกลีบเลี้ยง 3 กลีบ อยู่เหนือรังไข่ ส่วนกลีบดอกมีโคนที่เชื่อมกันเป็นหลอดแต่ปลายแยกเป็น 3 กลีบ เกสรตัวผู้วงนอกเป็นหมัน 3 อัน ถูกเปลี่ยนรูปเป็นกลีบ 3 กลีบ เรียก กลีบสเตมิโนด (staminode) โดย 1 กลีบเปลี่ยนรูปไปเรียกว่า ปาก (lip) พืชบางชนิดในสกุลนี้มีฐานของอับละอองเกสรลักษณะเป็นเดือยยื่นออกมาอย่างชัดเจน สำหรับยอดเกสรตัวเมียอยู่สูงกว่าปลายอับละอองเกสรเล็กน้อย โดยแทรกอยู่ระหว่างกลางอับละอองเกสร

ไม้ดอกในสกุล *Curcuma* แบ่งเป็น 2 สกุลย่อยคือ Eucurcuma หรือ กลุ่มกระเจียว และ Paracurcuma หรือ กลุ่มปทุมมา ลักษณะที่แตกต่างกันของพืช 2 กลุ่มในสกุล *Curcuma* ที่เห็นได้ชัดคือ กลุ่มกระเจียว มีกลีบดอกและกลีบเลี้ยงสีขาวหรือเหลืองโดยปากสีขาวหรือเหลือง ส่วนกลุ่มปทุมมามักมีกลีบเลี้ยงและกลีบ staminode สีขาวแต่ปากมีสีม่วงน้ำเงิน นอกจากนี้ดอกของกลุ่มกระเจียวยังบานไม่ผึ่งผายเต็มที่ กลีบเลี้ยง และ กลีบ staminode ค่อนข้างกว้างกว่าทำให้ดอกบานมีลักษณะคล้ายถ้วย ส่วนดอกของกลุ่มปทุมมาบานผึ่งผาย กลีบเลี้ยง และ กลีบ staminode แคบดอกจึงบานได้เต็มที่ (สุรวิช, 2537)

พืชในสกุลนี้เป็นไม้หัวอายุยืนหลายปีที่ไม่มีเนื้อไม้ มีการพักตัวในช่วงอากาศแล้ง และช่วงวันสั้น วงจรชีวิตของพืชกลุ่มกระเจียวมีอายุการเจริญเติบโตประมาณ 7-8 เดือน คือ มีช่วงการเจริญเติบโตและออกดอกในฤดูฝน โดยช่วงออกดอกประมาณ 2-3 เดือน เมื่อเริ่มออกดอกจะเริ่มลงหัวใหม่ไปพร้อมกัน เมื่อพ้นช่วงออกดอกแล้วใบเริ่มเหี่ยวแห้งและค้นยุบตัวลง ถ้าทิ้งหัวพันธุ์

ไว้ในดินมีการพักตัวในช่วงฤดูหนาว หัวเริ่มงอกใหม่หลังพ้นระยะพักตัว เมื่อฤดูฝนของปีถัดไปเริ่มขึ้น (นิพัฒน์และคณะ, 2537)

บัวชั้น (*Curcuma petiolata* Roxb.) ฉัตรทิพย์ หรือ ฉัตรเงิน เป็นพืชในกลุ่มกระเจียว (*Curcuma* spp.) ที่มีทรงต้นคล้ายต้นกล้วย มีถิ่นกำเนิดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย

ลำต้น ลักษณะต้นเป็นทรงพุ่มสูงประมาณ 110 เซนติเมตร กว้างประมาณ 120 เซนติเมตร ลำต้นเทียมสูงประมาณ 36 เซนติเมตร

ใบ กาบใบสีเขียว ก้านใบยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ใบเป็นรูปรี กว้างประมาณ 25 เซนติเมตร ยาวประมาณ 72 เซนติเมตร แผ่นใบเป็นคลื่น ไม่มีขน มีเส้นลอย

ดอก ช่อดอกเกิดจากปลายลำต้นเทียม ก้านช่อดอกยาวประมาณ 50 เซนติเมตร ใบประดับสีชมพูอมม่วง ไม่มีขน ขนาดกว้างประมาณ 4.2 เซนติเมตร ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ดอกสีขาว ปากมีสีเหลือง มีสันสีเหลืองเข้ม กลีบ staminode สีขาวปลายชิดกัน อับละอองเรณูป่องตลอดอัน (สุรวิช, 2539)

เครื่องหมายทางโมเลกุล

การจำแนกพันธุ์พืชโดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลักษณะภายนอก เช่น ลักษณะใบ สี ดอก รูปร่าง และ ขนาดของผล เป็นวิธีที่ใช้กันมานาน และ ยังคงใช้ได้ผลดีในปัจจุบัน แต่บางครั้งอาจเกิดความสับสนได้ในกรณีของสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน หรือ มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมมาเกี่ยวข้อง จึงได้มีการนำเครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) มาใช้เพื่อการจำแนกหรือตรวจสอบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต ทั้งในระดับโปรตีน และ ดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ไอโซไซม์ สามารถใช้เพื่อการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลของโปรตีน (protein polymorphism) กระบวนการประกอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อแยกโมเลกุลของโปรตีน แล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะ (ไอโซไซม์) โดยใช้สารตั้งต้นที่เหมาะสม ซึ่งตรวจสอบได้จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของพืช (สุรินทร์, 2540)

การวิเคราะห์ไอโซไซม์สามารถใช้ในการจัดกลุ่มพืชตามลักษณะภายนอก แหล่งปลูก และสกุล โดยปฐมา (2543) ศึกษามะม่วงแก้วสายต้นคัดจำนวน 52 สายต้น จาก 8 จังหวัด ภาคเหนือตอนบน เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐาน และ ไอโซไซม์ พบว่า ที่ความเข้มข้นของโพลี

อะคริลาไมด์เจลเท่ากับ 22% เมื่อใช้เอ็นไซม์ ACP และ EST และ ที่ความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์เจลเท่ากับ 7.5% เมื่อใช้เอ็นไซม์ POX สามารถจำแนกสายต้นมะม่วงแก้วออกได้เป็น 10, 4 และ 15 กลุ่ม ตามลำดับ รัติกาล (2543) ได้ทำการแยกกลุ่มกล้วยไม้หวายชนิดเอื้องแซะที่รวบรวมมาจาก 4 แหล่งโดยการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ ด้วยระบบเอ็นไซม์ 6 ชนิด คือ EST, GOT, MDH, SKD, GPI และ LAP พบว่า EST, GOT, MDH และ SKD แสดงแถบสีหลายรูปแบบ ซึ่งสามารถนำมาแยกความแตกต่างของประชากรเอื้องแซะออกเป็น 4 กลุ่มตามแหล่งที่มา นอกจากนี้ วิชญา (2544) ยังได้ศึกษารูปแบบไอโซไซม์เพื่อจำแนกความแตกต่างของพืช 10 ชนิด ใน 5 สกุลคือ *Eurycles, Eucrosia, Haemanthus, Hippeastrum* และ *Zephyranthus* โดยใช้ตัวอย่างจากส่วนของใบอ่อนกับเอ็นไซม์ 6 ชนิด คือ ADH, ALD, DIA, EST, GOT และ MDH พบว่า รูปแบบแถบสีไอโซไซม์ของเอ็นไซม์ทั้ง 6 ชนิด แสดงความแตกต่างของพืชทั้ง 10 ชนิดได้

อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์ไอโซไซม์ยังมีข้อจำกัดอยู่ คือ ต้องเลือกเนื้อเยื่อ และ ระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ การเปรียบเทียบควรใช้เนื้อเยื่อชนิดเดียวกัน และ การเจริญเติบโตอยู่ในระยะเดียวกัน นอกจากนี้สิ่งแวดล้อมภายนอกยังเป็นปัจจัยที่สำคัญที่อาจมีผลต่อการแสดงออกของยีน และ โมเลกุลโปรตีน เป็นผลให้การตรวจสอบในระดับโปรตีนทำได้ไม่กว้างขวางเท่าที่ควร จึงมีการนำการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมาใช้ ซึ่งมีข้อได้เปรียบ คือ สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดๆของพืช โดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และ สภาพแวดล้อม ทั้งยังสามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีน และ ส่วนที่ไม่ใช่ยีน จากดีเอ็นเอในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตในนิวเคลียส และ ออร์กาเนลล์บางชนิด ได้แก่ คลอโรพลาสต์ และ ไมโตคอนเดรีย โมเลกุลของดีเอ็นเอนี้มีความสามารถในการจำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูก และคงลักษณะที่เหมือนเดิม แต่บางครั้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง นอกจากมีการเปลี่ยนแปลงของเบสแต่ละตัว อาจมีการเปลี่ยนแปลงของชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่หรือเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซม การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน (สุรินทร์, 2540)

DNA Fingerprinting หรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอ คือ การตรวจสอบเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมโดยการใช้ดีเอ็นเอที่สามารถให้แบบแผนความแตกต่างของดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีใหญ่ๆ คือ วิธีที่ต้องตรวจสอบโดยการทำ hybridization และ วิธีที่ใช้เทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ หรือ PCR (Polymerase Chain Reaction) โดยทั้งสองวิธีการนี้มีการประยุกต์เป็นแบบต่างๆ อีกหลายวิธี (สุรินทร์, 2536)

เทคนิค RFLP

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) (สุรินทร์, 2540) เป็นการทำ DNA fingerprinting ที่ใช้หลักการของ hybridization ขั้นตอนของการทำ RFLP นั้น เริ่มจากการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ เอ็นไซม์ประเภทนี้จะสามารถจดจำลำดับเบสบนดีเอ็นเอที่จำเพาะและตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะนั้น หลังจากนั้นจึงแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัด โดยใช้วิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) บนแผ่นเจลแล้วย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลมาไว้บนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ (Southern blotting) ซึ่งใช้โพรบ (probe) หรือดีเอ็นเอตรวจสอบที่ติดฉลาก เป็นตัวบ่งชี้ความแตกต่างของแต่ละจีโนม (วิสุทธิ์, 2536; Meyers, 1995) RFLP marker สามารถตรวจสอบได้กับทุกส่วนของพืช และ ชนิดของโพรบมีจำนวนไม่จำกัด แต่มีวิธีการทำที่ยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง (พัฒนา, 2538; Morgante, 1994) RFLP marker มีประโยชน์หลายอย่างในทางพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์ (Lander and Botstein, 1989) โดยนำมาใช้เป็นเครื่องหมายเชิงโมเลกุลเพื่อระบุตำแหน่งยีนจำเพาะ Tan *et al.* (1998) ตรวจหายีนแก้ความเป็นหมัน (*Rf*) โดย RFLP marker จาก bulk line analysis พบว่า ยีนนี้มีตำแหน่งอยู่ตรงกลางของแขนข้างยาวของโครโมโซมที่ 10

นอกจากนี้ RFLP marker ยังมีการประยุกต์ใช้เพื่อสร้างแผนที่ยีน Yano *et al.* (1991) ได้รวบรวมแผนที่ยีนของข้าวโดยใช้ประชากร F_2 จำนวน 144 ต้น จากคู่ผสมระหว่าง Indica และ Japonica โดยใช้ RFLP marker 209 markers, isozyme marker 3 ชนิด และ physiological marker 5 ชนิด แผนที่ที่ได้สามารถบอกตำแหน่งของยีนรวมทั้งลักษณะที่มีความสำคัญทางการเกษตร และ ลักษณะทางปริมาณที่ได้

ถึงแม้ว่าได้มีการพัฒนาเทคนิค RFLP เพื่อจำแนกความแตกต่างของพันธุกรรม และยีนได้ แต่เทคนิคนี้ยังเสียค่าใช้จ่ายสูง เครื่องมือ และ อุปกรณ์ในการปฏิบัติงานต้องมีเพียงพอสำหรับการทำ hybridization และ ต้องมีโพรบจำเพาะที่ต้องอาศัยข้อมูลพื้นฐานของพืชที่ต้องการตรวจสอบ จึงได้มีการคิดค้นวิธีตรวจสอบความแตกต่างที่ระดับดีเอ็นเอด้วย เทคนิค Polymerase Chain Reaction หรือ PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะส่วนเพื่อประโยชน์ในการตรวจสอบความแตกต่างของจีโนมโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการยุ่งยากเท่ากับการทำ hybridization ปฏิกิริยา PCR ต้องมีองค์ประกอบคือ ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template), นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด (A, C, G, T), ไพรเมอร์, เอ็นไซม์ DNA polymerase และ บัฟเฟอร์ (buffer) หลักการทำ PCR มีดังนี้

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermal Cycler ที่ตั้งโปรแกรมไว้ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ ซึ่งแต่ละอุณหภูมิมีจุดประสงค์ที่แตกต่างกัน คือ อุณหภูมิสูง (90-95 องศาเซลเซียส) สำหรับทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นเกลียวคู่เสียสภาพเป็นเส้นเดี่ยว (denaturation) อุณหภูมิกลาง (35-60 องศาเซลเซียส) สำหรับให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอเส้นเดี่ยวเข้ามาจับกับดีเอ็นเอต้นแบบบริเวณที่เป็นคู่สม (annealing) และ อุณหภูมิที่เหมาะกับการทำงานของเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase คือ 72 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (extension)

การนำเทคนิค PCR มาใช้เพื่อการจำแนกพันธุกรรมพืช มีการประยุกต์ใช้ และ มีชื่อเรียกต่างกันไป เช่น RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), DAF (DNA Amplification Fingerprinting), AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นต้น

เทคนิค RAPD

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) เป็นการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) และ อุณหภูมิในช่วงของ primer annealing ประมาณ 37-40 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มดีเอ็นเอที่ไม่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ให้มีปริมาณมาก (ธีระชัย, 2540) ซึ่ง RAPD ใช้หลักการที่ว่าดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด มีลำดับของเบสที่แตกต่างกัน จึงทำการสุ่มเอาตัวแทนบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนสายดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณเช่นเดียวกับกระบวนการ DNA replication ภายในเซลล์ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วมาตรวจสอบแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส (วัชรีและมนตรี, 2536) ดังนั้นสิ่งมีชีวิตที่มีการเรียงลำดับของเบสที่ต่างกันย่อมมีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน และ สิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมควรมีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกัน การทำ RAPD สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และ ไม่จำเป็นต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสีในการติดฉลากดีเอ็นเอตรวจสอบ แต่ผลการทดลองอาจมีความไม่แน่นอนสูง (พัฒนา, 2538)

<u>การนำเทคนิค RAPD ในการวิเคราะห์พันธุกรรมพืช</u>

จันทร์จีรา (2541) วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมของลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) จำนวน 20 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 10 เบส จำนวน 69 ชนิด พบว่ามี 5 ไพรเมอร์ ที่สามารถ

สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ทั้งหมด 60 แถบ และ มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 200-2000 คู่เบส เมื่อทำการวิเคราะห์ dendrogram สามารถแบ่งลิ้นจี่ออกเป็น 2 กลุ่ม และในแต่ละกลุ่มยังแบ่งพันธุ์ลิ้นจี่ได้อีกกลุ่มละ 3 กลุ่มย่อย

นอกจากนี้ วันทนา และ คณะ (2541) ได้นำเอาเทคนิค RAPD มาใช้ในการจำแนกความแตกต่างในข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 เบส จำนวน 9 ชนิด ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่า มีไพรเมอร์จำนวน 5 ชนิด ที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ทั้งหมด 13 แถบ ที่แสดงความแตกต่างในข้าวฟ่าง 6 สายพันธุ์

Fritz *et al.* (1995) ใช้เครื่องหมายเชิงโมเลกุลเพื่อศึกษาการกระจายตัว และ recombination ของโครโมโซมในข้าวสาลี (common wheat, *Triticum aestivum* L. และ *T. tuashii*) โดยพิจารณาจากโปรตีน 1 ชนิด ใช้เทคนิค RFLP มี marker 25 markers และ RAPD มี marker 8 makers พบว่าจีโนม D ใน common wheat มี polymorphism ต่ำ แต่ระดับ polymorphism ระหว่าง *T. tuashii* กับ *T. aestivum* สูง แสดงว่ามีความแตกต่างที่ระดับนิวคลีโอไทด์ในข้าวสาลีที่ต่างสปีชีส์กัน ส่วน recombination ของจีโนม D ระหว่าง *T. tuashii* กับ *T. aestivum* เกิดขึ้นได้ระดับหนึ่ง

Ling *et al.*(1997) ได้นำเทคนิค RAPD มาแยกความแตกต่างของต้นคริสต์มาส (*Euphorbia pulcherrima* Wild ex Klotzch) ที่มีความคล้ายคลึงกันทางสัณฐานวิทยามาก การจำแนกทำได้ยาก จำนวน 9 พันธุ์ โดยใช้ 60 ไพรเมอร์ มี 57 ไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดแถบ ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR แต่มีเพียง 9 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอซึ่งมีลักษณะเป็น polymorphic และ สามารถแยกต้นคริสต์มาสออกเป็น 2 กลุ่ม

Jan *et al.* (1999) ได้นำเทคนิค RAPD มาวิเคราะห์พันธุกรรมของพืชกลุ่มกุหลาบ พบว่าเมื่อนำกุหลาบ 36 ชนิด จำนวน 119 accessions มาทำการวิเคราะห์ สามารถแบ่งกลุ่มกุหลาบออกเป็น 2 กลุ่ม

Carlos and Osborn (1992) เปรียบเทียบการใช้ RAPD และ RFLP marker ใน *Brassica* เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในสปีชีส์เดียวกัน พบว่าผลการวิเคราะห์จาก RAPD และ RFLP ให้ผลเหมือนกันมาก แต่เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมของต่างสปีชีส์ให้ผลที่แตกต่างกัน

เทคนิค DAF และ AP-PCR

DAF (DNA Amplification Fingerprinting) ใช้ครั้งแรกโดย Caetano-Anolles และ คณะ ในปี คศ. 1991 โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นเพียง 5-8 นิวคลีโอไทด์ และ ใช้โปรแกรมการเพิ่ม

ปริมาณโดยใช้อุณหภูมิ 2 ระดับเท่านั้น แทนการใช้ 3 ระดับแบบที่ใช้กับ PCR ทั่วๆไป แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล และ ย้อมด้วย silver stain

AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) โดย Welsh และ McClelland ในปีคศ. 1990 ได้ใช้ไพรเมอร์ขนาดตั้งแต่ 20 นิวคลีโอไทด์ขึ้นไป และ ใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 โปรแกรม คือ ใช้อุณหภูมิสำหรับ annealing ต่ำในรอบแรก แล้วจึงเพิ่มให้สูงขึ้นอีก 30-40 รอบ ในการทำ PCR ช่วงหลังใส่นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีลงไป แล้วจึงแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจล ตรวจสอบผลโดยทำออโตเรดิโอกราฟ (Autoradiography) (สุรินทร์, 2540)

เทคนิค AFLP

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) เป็นเทคนิคที่ได้รับการพัฒนาโดย Vos *et al.* (1995) เป็นเทคนิคที่รวมเอาวิธี RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) และ RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) เข้าด้วยกัน เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ นำมาตัดโดยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ที่มีความถี่ในการตัดต่างกันคือ *Eco*RI ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส และ *Mse*I มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจง จากนั้นต่อชิ้นดีเอ็นเอสั้นๆ ที่เรียกว่า adapter เข้าที่ปลายทั้งสองด้านของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดแล้ว เพื่อทำหน้าที่เป็นที่จับของไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR จีโนมิคดีเอ็นเอ (genomic DNA) ที่ได้จากการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวเกิดเป็นดีเอ็นเอ 3 แบบด้วยกัน คือ ชิ้นที่ปลายทั้งสองด้านถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI, ชิ้นที่ปลายทั้งสองด้านถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mse*I และชิ้นที่มีปลายด้านหนึ่งถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI และ ปลายอีกด้านหนึ่งถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mse*I ขั้นตอนการต่อ adapter เข้ากับดีเอ็นเอที่ได้จากการตัด มีองค์ประกอบของปฏิกิริยาที่เอื้อต่อการต่อ adapter กับดีเอ็นเอแบบที่มีปลายที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ต่างชนิดกัน

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบ่งเป็นการทำ PCR 2 ขั้นตอน โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับ adapter และ มีเบสจำเพาะเพิ่มที่ปลายด้าน 3′ ขั้นตอนที่ 1 เรียกว่า pre-selective amplification โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเติมเบสเพิ่มขึ้นอีก 1 ตัวที่ปลาย 3′ ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอต้นแบบที่ตัด และ ต่อกับ adapter หลังจากนั้นนำผลผลิตของการทำ PCR มาเจือจางแล้วใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการทำ PCR ขั้นตอนที่ 2 เรียกว่า selective amplification โดยไพรเมอร์ที่ใช้มีการเติมเบสจำเพาะเพิ่มขึ้นอีก 3 เบส ซึ่งจำนวนของเบสที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นเงื่อนไขสำคัญที่กำหนดดีเอ็นเอเป้าหมายที่จะเพิ่มปริมาณ เพื่อให้เกิดการเลือกจับได้เฉพาะชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบส

ส่วนที่อยู่ติดกับบริเวณที่จดจำของเอ็นไซม์ซึ่งเข้าคู่ได้กับไพรเมอร์ที่เลือกใช้เท่านั้น แล้วจึงนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มาแยกขนาดโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน denaturing polyacrylamide gel

เทคนิค AFLP ถูกนำมาใช้เพื่อตรวจสอบความแตกต่างในระดับชนิด และ สายพันธุ์ของพืชหลายชนิด เช่น Maughan *et al.* (1996) ใช้เทคนิค AFLP เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของถั่วเหลืองพันธุ์ปลูก (*Glycine max*) และ พันธุ์ป่า (*G. soja*) จำนวน 23 ตัวอย่าง โดยเป็นพันธุ์ที่นำเข้าจำนวน 16 ตัวอย่าง พันธุ์ที่ปลูกในประเทศจำนวน 6 ตัวอย่าง พันธุ์ที่มียีนต้านทานจำนวน 4 ตัวอย่าง ในการทดลองครั้งนี้ใช้ไพรเมอร์ 15 คู่ พบจำนวนแถบทั้งหมด 759 แถบ มีขนาด 35-400 คู่เบส แต่ละตัวอย่างมี 19-86 แถบ จากจำนวนแถบที่ปรากฏมีแถบที่แตกต่างระหว่างสปีชีส์ ทั้งสองจำนวน 90 แถบ แถบที่แตกต่างในกลุ่มของ *G. max* จำนวน 37 แถบ และ แถบที่แตกต่างกันในกลุ่มของ *G. soja* จำนวน 147 แถบ แสดงให้เห็นว่าถั่วเหลืองพันธุ์ป่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ปลูก

Folkertsma *et al.* (1996) ศึกษาความหลากหลายของพยาธิที่ทำให้เกิดโรคในมันฝรั่ง จำนวน 24 ชนิด ซึ่งเก็บมาจากแหล่งต่างๆกันในเนเธอร์แลนด์ โดยเป็น *Globodera rostochiensis* 9 ชนิด และ *G. pallida* 15 ชนิด จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์ 12 คู่ เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 987 แถบ แต่ละตัวอย่างมีจำนวนแถบ 22-105 แถบ และ มีขนาด 50-500 คู่เบส เมื่อพิจารณาแถบที่แตกต่างใน *G. rostochiensis* พบว่ามี 81 แถบ ส่วนใน *G. pallida* มีจำนวนแถบ 127 แถบ และ เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของประชากรพบว่า *G. pallida* มีความหลากหลายสูงกว่า *G. rostochiensis* ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะ และ ความรุนแรงของโรคที่เกิดจาก *G. pallida* ซึ่งมีความหลากหลายมากกว่าเช่นกัน

Paul *et al.* (1997) ศึกษาความหลากหลาย และ ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของชาจากอินเดีย และ ชาจากเคนยา (*Camello sinensis* (L.) O. Kuntze) จำนวน 32 ตัวอย่าง เป็นชาที่เก็บจากอินเดีย 15 ตัวอย่าง และ ชาที่เก็บจากเคนยา 17 ตัวอย่าง เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วสามารถแบ่งชาได้เป็น 3 ชนิด คือ China type, Assam type และ Cambod type ซึ่ง Cambod type เป็นชนิดที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาอยู่กึ่งกลางระหว่าง China type และ Assam type จากผลการทดลองใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ พบว่าเกิดแถบที่แตกต่างกัน จำนวน 73 แถบ โดยเฉลี่ยแล้วไพรเมอร์ 1 คู่ เกิด 15 แถบ แถบมีขนาด 106-218 คู่เบส และ เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของประชากรพบว่า ชาจากเคนยามีความหลากหลายสูงกว่าชาจากอินเดีย เมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายของกลุ่มชาพบว่า Cambod type เป็นชาที่มีความหลากหลายในสายพันธุ์ต่ำสุดเมื่อเทียบกับ China type และ Assam type

Sharma *et al.* (1996) ใช้เทคนิค AFLP เพื่อจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม และศึกษาวิวัฒนาการของถั่วฝักยาว 54 ตัวอย่าง เป็นพันธุ์ปลูก 26 ตัวอย่าง และ พันธุ์ป่า 28 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 4 คู่ พบว่าได้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 23, 25, 52 และ 48 แถบตามลำดับ ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ และ แบ่งแยกความหลากหลายของถั่วฝักยาวสายพันธุ์ต่างๆได้มากกว่าเทคนิค RAPD

การศึกษาความหลากหลายของพืช *Caladieae* เพื่อแยก *Caladium* 4 ชนิด คือ *C. bicolor, C. humboldtii, C. lindenii,* และ *C. schomburgkii* โดยอาศัยรูปแบบการสร้างแถบดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ โดยใช้ ไพรเมอร์ 3 ชนิดเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอ 235 แถบ ที่มีลักษณะเป็น polymorphic พบว่า *C. humboldtii* เป็นชนิดซึ่งแตกต่างจาก *C. bicolor* และ *C. lindenii* และเป็น *Caladium* สายพันธุ์แท้ (Loh, 2000) และ สามารถแยก *C. bicolor* และ *C. schomburgkii* จากกันได้โดยใช้ไพรเมอร์ 17 ชนิด (Loh, 1999)

Fuentes *et al.* (1999) กล่าวว่าเทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่พิสูจน์แล้วว่าสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวได้โดยได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้กับข้าว และ พืชอีกหลายชนิด ดังนี้

Maheswaran *et al.* (1997) ใช้เทคนิค AFLP เพื่อศึกษาความแตกต่าง การกระจายตัว และ การถ่ายทอด AFLP marker โดยใช้ประชากรของข้าวที่เป็น double haploid ของ F1 ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างข้าว Indica พันธุ์ IR64 กับข้าว Japonica พันธุ์ Azucena โดยใช้ไพรเมอร์ในการศึกษาครั้งนี้จำนวน 20 คู่ พบแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 945 แถบ เป็นแถบที่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์จำนวน 208 แถบ โดยแต่ละคู่ไพรเมอร์ให้จำนวนแถบ 23-75 แถบ ผลการทดลองพบว่า AFLP marker มีการกระจายตัวอยู่บนโครโมโซม ทั้ง 12 แท่ง การกระจายของ AFLP marker เป็นไปตามกฎของเมนเดล (1:1) เมื่อเปรียบเทียบ AFLP marker กับ RFLP marker ที่ได้จากประชากรข้าว โดย Huang *et al.* (1994) พบว่า AFLP marker ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสูงกว่า และ มีประสิทธิภาพมากกว่า RFLP marker นอกจากนี้การใช้เทคนิค AFLP ยังได้ผลรวดเร็วกว่า RFLP

Dong *et al.* (2000) ใช้เทคนิค AFLP เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวระหว่าง bulk fertile, bulk sterile และ ต้นพ่อ และ ต้นแม่ พบว่ามี 4 marker ด้วยกัน โดย marker E5/M12-600 มีระยะห่างจาก *tgms-vn1 gene* ประมาณ 3.3 cM ส่วนอีก 3 marker อยู่ห่างจาก *tgms-vn1 gene* มากกว่า 20 cM จึงได้นำ AFLP fragment E5/M12-600 มาวิเคราะห์

ลำดับเบสเพื่อพัฒนาเป็น PCR marker สำหรับนำมาใช้สำหรับ marker assisted selection ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวลูกผสมต่อไป

Pakniyat *et al.* (1997) ทำการศึกษาข้าวบาร์เล่ย์พันธุ์ป่า (*Hordeum spontaneum*) 39 ชนิด จากประเทศแถบตะวันออกกลางโดยใช้เทคนิค AFLP โดยเลือกบริเวณที่มีภูมิประเทศต่างกัน 3 บริเวณ เมื่อใช้ไพรเมอร์ 12 คู่ เกิดแถบทั้งหมด 268 แถบ โดยมีขนาด 83-500 คู่เบส แบ่งเป็นแถบที่พบในทุกตัวอย่างจำนวน 64 แถบ (monomorphic) และ แถบที่พบในบางตัวอย่าง (polymorphic) จำนวน 204 แถบ ซึ่งคิดเป็น 76% ของทั้งหมด สามารถแบ่งกลุ่มข้าวบาร์เล่ย์พันธุ์ป่าได้ 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับแหล่งที่เก็บตัวอย่าง 3 แหล่ง มีเพียง 2 ตัวอย่างที่แบ่งแยกออกจากกลุ่ม

Donini *et al.* (1997) ใช้เทคนิค AFLP เพื่อศึกษารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในส่วนต่างๆของพืช จาก *Triticum aestivum, Aegilops speltoides* และ *Aegilops mutica* โดยใน *Triticum aestivum* ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากเมล็ด และ ใบอ่อน ส่วน *Aegilops spp.* ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากราก และ ใบอ่อน พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแตกต่างกัน และ ยังพบอีกว่าเกิดแถบที่แตกต่างในเมล็ด และ รากมากกว่าในใบอ่อน

ในการแยกชนิดกล้วยออกเป็นสกุลต่างๆ พิจารณาจากจำนวนของโครโมโซมร่วมกับคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาสามารถแบ่งออกได้เป็น *Musa, Rhodochlamys, Callimusa* และ *Australimusa* ต่อมา มีการนำเทคนิค AFLP มาใช้เพื่อตรวจสอบกล้วย 15 พันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ 8 ชนิด สามารถระบุได้ว่า *M. beccarri* และ *M.monticola* อยู่ในกลุ่มของ *Australimusa* (Wong *et al.*, 2001)

ยุคลธร (2542) ได้ทำการวิเคราะห์จีโนมของพืชในสกุล *Garcinia* จำนวน 22 ตัวอย่าง ประกอบด้วยมังคุด (*G. mangostana* Linn.) 11 ตัวอย่าง พืชในสกุล *Garcinia* ชนิดอื่น 11 ตัวอย่าง และ พืชในสกุลใกล้เคียงอีก 2 ชนิด จำนวนทั้งสิ้น 24 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค AFLP พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ เกิดแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 524 แถบ และ เกิดแถบที่แตกต่างกันในตัวอย่างมังคุดจำนวน 125 แถบ เมื่อทำการตรวจ polymorphism ของมังคุดกับพืชสกุล *Garcinia* ชนิดอื่น และ สกุลใกล้เคียง พบว่า เกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถใช้เป็น ดีเอ็นเอเครื่องหมายทางโมเลกุลที่จำเพาะในการจำแนกชนิดของพืชได้

ชลธิชา (2542) ได้ทำการศึกษาการจัดกลุ่มของพริก 3 สกุล จำนวน 18 accessions ประกอบด้วย *Capsicum annuum* จำนวน 8 accessions *C. frutescens* จำนวน 5 accessions และ *C. chinense* จำนวน 5 accessions ด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ ในการตรวจสอบ 4 คู่ คือ CAG/CTC, CAG/CAG, CGT/CTC และ CGT/CAG พบว่าให้จำนวนแถบดีเอ็นเอ 259 แถบ

ข้อมูลที่ได้สามารถใช้ในการจัดกลุ่มได้ใกล้เคียงกับการจัดจำแนกโดยการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Cervera *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาพืช *Populus* ที่ต้านทาน *Melampsora laricipopulina* ด้วยเทคนิค AFLP โดยนำพันธุ์แม่ที่ต้านทานผสมกับสายพันธุ์พ่อที่อ่อนแอสร้างลูกผสมพบว่าได้ลูกผสมที่ต้านทานในระดับต่างๆ และ นำมาใช้ในการศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เชื่อมโยงกับยีน *Mer* ซึ่งเป็นยีนที่ต้านทานโรคได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้เทคนิค AFLP ร่วมกับการใช้เทคนิค BSA (Bulked Segregant Analysis) สามารถหาเครื่องหมายได้จำนวนมากในระยะเวลาสั้น จากการวิเคราะห์พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอ ทั้งสิ้น 11,500 แถบ จากจำนวนไพรเมอรทั้งสิ้น 144 คู่ มี 3 แถบ ที่สามารถเชื่อมโยงกับ *Mer* locus ซึ่งเป็นประโยชน์ในการสร้างพันธุ์ต้านทาน

กาญจนา (2544) ได้ศึกษาเครื่องหมายเชิงโมเลกุลที่ใช้บ่งชี้ลักษณะต้านทานโรคขอบใบแห้งของข้าวที่เป็น Near Isogenic Line จำนวน 120 ต้นด้วยเทคนิค AFLP พบว่ามีไพรเมอร์ 12 คู่ที่สามารถบ่งบอกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันได้ ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับประชากร bulk resistant และ bulk susceptible ที่ได้จากการรวมดีเอ็นเอ 2 กลุ่ม โดยดูทั้งจากฟีโนไทป์ และ จากการรวมจีโนไทป์ ของดีเอ็นเอแต่ละกลุ่ม

วารุณี (2544) ศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว จากประชากร 3 กลุ่ม กลุ่มละ 15 สายพันธุ์ โดยกลุ่มประชากรทั้งสามมีจีโนไทป์ที่แตกต่างกัน นำกลุ่มดีเอ็นเอทั้งสามและสายพันธุ์พ่อแม่มาวิเคราะห์ AFLP หาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากร พบว่า มี 8 แถบที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ทนทาน และ อ่อนแอต่อการขาดธาตุเหล็ก

Mackill *et al.* (1996) ศึกษาเปรียบเทียบเทคนิค AFLP, RAPD และ microsatellite marker ในข้าวพันธุ์ปลูก japonica 12 สายพันธุ์ และ indica 2 สายพันธุ์ โดยเทคนิค AFLP มีการใช้ไพรเมอร์ จำนวน 18 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 529 แถบ ซึ่งในจำนวนนี้มีแถบที่แตกต่างในระหว่างตัวอย่างจำนวน 147 แถบ ส่วนเทคนิค RAPD มีการใช้ไพรเมอร์ 21 ชนิด ให้จำนวนแถบทั้งหมด 103 แถบ โดยมีแถบที่แตกต่างกันจำนวน 43 แถบ สำหรับ microsatellite marker 1-6 อัลลีล ต่อ 1 ตำแหน่ง ทุกเทคนิคให้ผลของการจัดจำแนกที่คล้ายกันในระดับ subspecies และจากการที่เทคนิค AFLP ให้แถบที่แตกต่างกันจำนวนมาก คือ โดยเฉลี่ยแล้วมากกว่า 8 แถบ ต่อ 1 เจล จึงมีการทำแผนที่โดยใช้เทคนิค AFLP ซึ่งสามารถระบุตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอ 50 ตำแหน่ง ในจีโนมของข้าว

Redona and Mackill (1996) ได้ศึกษาแผนที่ทางโมเลกุล (molecular map) ของยีนควบคุมลักษณะทางปริมาณ ในการพัฒนาแผนที่ทางพันธุกรรมของคู่ผสม Japonica X Indica โดยใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลทั้งสามแบบคือ RFLP, RAPD และ AFLP แล้ววิเคราะห์ลักษณะทางปริมาณ 7 ลักษณะ คือ จำนวนเมล็ดต่อรวง เมล็ดดีต่อรวง ความยาวของเมล็ด ความกว้างของเมล็ด เปอร์เซ็นต์เมล็ดดี รูปร่างของเมล็ด และ น้ำหนักเมล็ด พบว่า ลักษณะเหล่านี้ มีความแปรปรวนอยู่ระหว่าง 6-27 %

Lin *et al.* (1996) ได้เปรียบเทียบการทำแผนที่ดีเอ็นเอถั่วเหลือง (*Glycine max*) โดยใช้เทคนิค RFLP, RAPD และ AFLP พบว่าเทคนิค AFLP เหมาะสมในการนำมาทำแผนที่ดีเอ็นเอของถั่วเหลืองมากที่สุด เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างมากกว่าเทคนิคอื่นๆ Powell *et al.* (1996) วิเคราะห์แหล่งพันธุกรรมของถั่วเหลืองโดยเปรียบเทียบเทคนิค RFLP, RAPD, AFLP และ SSR โดยวัดจากความสามารถของเทคนิคต่างๆ ในการตรวจพบ expected heterozygosity และ วัดจากจำนวน loci ที่วิเคราะห์ได้ ในการทดลอง multiplex ratio พบว่าเทคนิค SSR มี expected heterozygosity สูงที่สุด ในขณะที่เทคนิค AFLP มี multiplex ratio สูงสุด ส่วนการประเมินความสัมพันธ์ เพื่อคาดคะเนความเหมือนกันทางพันธุกรรม เทคนิค RFLP, AFLP และ SSR แสดงความสัมพันธ์ได้สูง ในพันธุ์ปลูก และ พันธุ์ป่า แต่ถ้าเปรียบเทียบเฉพาะ *Glycine max* ด้วยกันเท่านั้นเทคนิค RAPD และ AFLP ให้ความสัมพันธ์ได้มากกว่าเทคนิคอื่น

Yee (1999) ศึกษาเปรียบเทียบเทคนิค RAPD และ AFLP ในการตรวจสอบความหลากหลายของ *Vigna angularis* (Azuki) เพื่อการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ ในโครงการขยายพันธุ์ทดลองกับ Azuki 58 ชนิด พบว่าด้วยไพรเมอร์ 1 คู่ มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี RAPD 57 แถบ และ วิธี AFLP 214 แถบ และในปฏิกริยาหนึ่งๆ มีค่าเฉลี่ยในการเกิดแถบ ในลักษณะ polymorphic จากวิธี RAPD และ AFLP เป็น 3.2 และ 11.3 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเทคนิค AFLP มีประสิทธิภาพสูงกว่าเทคนิค RAPD ในการเพิ่มแถบดีเอ็นเอ

Morgante (1994) ได้เปรียบเทียบเทคนิค AFLP กับเทคนิค RAPD ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติแตกต่างกันหลายประการ (ตาราง 1)

ตาราง 1 คุณสมบัติของ RFLP, RAPD และ AFLP

เทคนิค	RFLP	RAPD	AFLP
หลักการ	Endonuclease restriction, Southern blotting, hybridization	DNA amplification with random primers	Endonuclease restriction, adapter ligation, PCR
สาเหตุการเกิดความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ	Point mutations, Insertions, Deletions	Point mutations, Insertions, Deletions	Point mutations, Insertions, Deletions
จำนวนของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น	สูง	สูงมาก	สูงมาก
ลักษณะการเกิดแถบ	Codominant	Dominant	Dominant
ปริมาณของดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้	2-10 ไมโครกรัม	10-25 นาโนกรัม	1-2 ไมโครกรัม
ข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย	ไม่ต้องการ	ไม่ต้องการ	ไม่ต้องการ
การใช้สารกัมมันตรังสีในการตรวจสอบ	ใช้หรือไม่ก็ได้	ไม่ใช้	ใช้หรือไม่ก็ได้
ค่าใช้จ่าย	ปานกลาง	ต่ำ	ต่ำ
ความยากง่ายในการใช้	ยากปานกลางถึงยาก	ง่าย	ยากปานกลางถึงยาก
การปรับเพื่อวิเคราะห์อัตโนมัติ	ยาก	ง่าย	ปานกลาง

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

RAPD : Randomly Amplified Polymorphic DNA

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism

ในพืชกลุ่มกระเจียว มีการศึกษาด้านชีวโมเลกุลหลายวิธีทั้งในระดับดีเอ็นเอ และ โปรตีน การใช้เทคนิค RAPD เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกระเจียว 10 ชนิด โดยใช้ 48 ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์ 3 ชนิดสามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้ สามารถแบ่งกระเจียวออกเป็น 2 กลุ่ม โดยสอดคล้องกับพฤติกรรมการออกดอกเร็วหรือช้า (อุไรวรรณ, 2540) นอกจากนี้จรัสศรี (2545) ได้ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในพืชกลุ่มกระเจียวโดยเทคนิค RAPD และ HAT-RAPD (High Annealing Temperature Random Amplified Polymorphic DNA) พบว่า เทคนิค HAT-RAPD สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอซึ่งมีความคมชัดสูงจำนวนมากกว่า และ เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกระเจียวจำนวน 27 ชนิดโดยใช้ไพรเมอร์ 16 ชนิด สามารถจัดกระเจียวเป็น 6 กลุ่มใหญ่ โดยมีความสอดคล้องกับการจำแนกกลุ่มของพืชกลุ่มกระเจียว 10 ชนิดด้วยเทคนิค RAPD ที่เคยมีรายงานมาแล้วโดย อุไรวรรณ (2540)

ปรีชา (2543) ใช้เทคนิค RAPD-PCR ศึกษาจีโนมของกระเจียว (*Curcuma aerugenosa* Roxb.) จำนวน 7 ตัวอย่าง พบว่า เมื่อทดสอบด้วย 20 ไพรเมอร์ มี 19 ไพรเมอร์ (95%) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ แต่มีเพียง 7 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอชัดเจน และ เกิดซ้ำได้ จึงนำมาศึกษาเพื่อประเมินความหลากหลายของพันธุกรรม การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค RAPD-PCR มีศักยภาพในการนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ และสามารถใช้แถบดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการระบุชนิดของกระเจียว เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์แบบผสมข้ามชนิดต่อไป

Apavatjrut *et al.* (1999) ได้จำแนกพืชกลุ่มกระเจียว 7 ชนิดด้วยเทคนิคไอโซไซม์เพื่อสนับสนุนข้อมูลทางอนุกรมวิธาน พบว่าเมื่อใช้เอ็นไซม์จำนวน 21 ชนิด มีเอ็นไซม์ 8 ชนิด ได้แก่ PGM, GOT, DIA, ACO, EST, SKD, LAP และ IDH ที่สามารถให้รูปแบบแถบ ไอโซไซม์ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ หทัยรัตน์ (2545) ได้ทำการจัดกลุ่มพืชตระกูลขิง(Zingiberaceae) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและรูปแบบไอโซไซม์ จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของพืชสกุลขมิ้น (*Curcuma*) 16 ชนิด และ *Smithatris* 1 ชนิด พบว่าสามารถแบ่งแยกพืชสกุล *Smithatris* ออกจากสกุลขมิ้นได้ โดยใช้ลักษณะจงอย และ anther crest บนอับเรณู และ ผลจากการศึกษาของรูปแบบไอโซไซม์ 8 ชนิด คือ ADH, PGM, LAP, GDH, GOT, G_6PDH, MDH และ EST พบว่า มีการแสดงออกของรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด โดยเอ็นไซม์ G_6PDH, MDH และ EST สามารถจำแนกชนิดของพืชที่ทำการศึกษาชัดเจน เมื่อวิเคราะห์และ จัดกลุ่มโดยคำนวณค่าระยะทางพันธุกรรมและหาความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA พบว่าแบ่งพืชออกเป็น 3 กลุ่มหลัก และ สามารถแยกพืชสกุล *Smithatris* ออกจากพืชสกุลขมิ้นได้

กัญจนา (2539) ได้แยกความแตกต่างจากเนื้อเยื่อชิ้นส่วนต่างๆของปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) กลีบกว้างพันธุ์คัดเลือก (Siam Tulip หรือ Chiang mai Pink)และ ปทุมมากลุ่มกลีบแคบ ได้แก่ หัว, ราก, ยอด และ ดอก พบว่า การใช้สารสกัดจากส่วนยอดโดยศึกษารูปแบบไอโซไซม์ 7 ชนิด ได้แก่ EST, GOT, LAP, SKD, ME, MDH และ GLD และ เมื่อศึกษาความแปรปรวนระหว่างต้น (clonal variation) พบว่า EST สามารถแยกความแตกต่างของปทุมมาได้ถึง 35 รูปแบบ เมื่อนำมาพิจารณาร่วมกับ ไอโซไซม์ LAP, GOT และ SKD สามารถแยกความแตกต่างได้ 46 รูปแบบ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University