บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

กล้วยไม้สกุลหวาย เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae วงศ์ย่อย Epidendroideae และสกุล *Dendrobium* (ชนินทร์, 2540) โดยมีการแพร่กระจายพันธุ์ออกไปในบริเวณกว้างทั้งในเอเชีย และหมู่เกาะในมหาสมุทรแปซิฟิก ตลอดจนทางตอนเหนือของออสเตรเลีย ในปัจจุบันพบว่ากล้วยไม้สกุลนี้มีมากกว่า 1,000 ชนิด นักพฤกษศาสตร์จึงได้จำแนกกล้วยไม้สกุลหวายออกเป็นหมู่ (section) ได้อีก 41 หมู่ (Baker *et al.*, 1996) ซึ่งในประเทศไทยพบกล้วยไม้สกุลนี้ตามธรรมชาติมากกว่า 150 ชนิด

กล้วยไม้สกุลหวายที่พบในประเทศไทยทุกชนิดเป็นกล้วยไม้อิงอาศัย มีการเจริญเติบโตเป็นแบบซิมโพเดียลหรือเจริญทางด้านข้าง ลักษณะต้นมีทั้งแบบที่เป็นลำกลมยาวคล้ายหวายย่อส่วน ลำต้นรูปกล้วย รูปกระสวย รูปเหลี่ยม ตลอดจนพวกที่ลำต้นผอมยาวคล้ายเส้นลวด ใบมีทั้งพวกใบยาว พวกใบหนา ใบเล็กเรียวเกือบกลม และพวกที่ทิ้งใบก่อนฤดูออกดอก หรือพวกที่ใบมีอายุนานหลายปี รากมักมีขนาดเล็ก ออกเป็นกระจุกจากโคนต้น หรือจากข้อ (อบฉันท์, 2543)

ลักษณะดอกของกล้วยไม้สกุลนี้ คือ กลีบนอกบนและกลีบนอกคู่ล่าง มีความยาวไล่เลี่ยกันแต่กลีบนอกบนอยู่อย่างอิสระเดี่ยวๆ ส่วนกลีบนอกคู่ล่างมีส่วนโคนประสานติดกันตรงสันหลังของเส้าเกสรซึ่งมีลักษณะยื่นออกไปทางด้านหลังของส่วนล่างของดอก ส่วนโคนของกลีบนอกคู่ล่าง และส่วนฐานของเส้าเกสรซึ่งประกอบกันมีลักษณะคล้ายเดือยหรือที่เรียกกันว่า เดือยดอก (spur) (ระพี, 2530) สำหรับลักษณะกลีบในทั้ง 2 กลีบมีลักษณะต่าง ๆ กันแล้วแต่ชนิดของหวาย กล้วยไม้สกุลนี้ชอบและทนแสงแดดค่อนข้างมาก หรือมากปานกลาง (มลิวัลย์, 2539)

การปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย

การพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย เริ่มต้นจากหลักการปรับปรุงพันธุ์ทางด้าน genome breeding โดย Wilfret and Kamemoto (1969) ได้ศึกษาถึงความเข้ากันได้ทางพันธุกรรม (sexual compatibility) ของ *Dendrobium* 37 ชนิด (species) ใน 10 หมู่ จากทั้งหมด 41 หมู่ ซึ่งจากการผสมข้ามชนิดทั้งภายในและข้ามหมู่ ทั้งหมด 721 คู่ผสม พบการติดฝัก 138 ฝัก แต่เป็นฝักที่สามารถให้ลูกผสมได้ 89 ฝัก และพบว่าการผสมข้ามชนิดภายในหมู่ *Phalaenanthe* มีเปอร์เซ็นต์ของการติดฝักสูงสุด ตรงกันข้ามกับการผสมข้ามชนิดภายในหมู่ *Callista* ที่ไม่พบการติดฝักเลย ส่วนการผสมข้ามชนิดภายใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมู่ *Eugenanthe* (หมู่ *Dendrobium* ในปัจจุบัน) พบว่ามีความสามารถของการผสมข้ามที่ต่ำ ซึ่งต่อมา Kamemoto and Wilfret (1980) ได้ศึกษาการผสมเกสรข้ามหมู่ต่าง ๆ 8 หมู่ ที่จัดว่ามีความสำคัญทางด้านพืชสวน จึงทำให้ทราบถึงความใกล้ชิดระหว่างหมู่ และสามารถคาดการณ์ถึงเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดลูกผสมข้ามหมู่ โดยคู่ผสมระหว่างหมู่ *Phalaenanthe – Ceratobium* (หมู่ *Spatulata* ในปัจจุบัน), *Phalaenanthe - Eleutheroglossum* (ปัจจุบันจัดอยู่ในหมู่ *Spatulata*) และ *Ceratobium - Eleutheroglossum* มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดลูกผสมมากกว่า 50 % และ คู่ผสมระหว่างหมู่ *Latourea – Phalaenanthe* และ *Latourea – Ceratobium* มีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดลูกผสม 25–49 % สำหรับคู่ผสมระหว่างหมู่ *Latourea – Callista, Latourea - Eleutheroglossum, Latourea – Eugenanthe, Callista – Nigrohirsutae* (หมู่ *Formosae* ในปัจจุบัน), *Callista – Eugenanthe, Eugenanthe – Nigrohirsutae* และ *Eugenanthe – Stachyobium* พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดลูกผสมต่ำที่สุดคือ 0-24 %

Kamemoto (1987) ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการผสมข้ามหมู่ของกล้วยไม้สกุลหวาย 4 หมู่ ได้แก่ *Phalaenanthe, Ceratobium, Eleutheroglossum* และ *Latourea* ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าหมู่ *Phalaenanthe* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับหมู่ *Ceratobium* แต่หมู่ *Phalaenanthe* มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับหมู่ *Latourea* น้อยมาก และหมู่ *Eleutheroglossum* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับหมู่ *Phalaenanthe* และ *Ceratobium* มากกว่าหมู่ *Latourea* ต่อมาในปี 1992 ได้นำความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมตลอดจนลักษณะเด่นของทั้ง 4 หมู่ ที่ได้ศึกษามาเป็นข้อมูลสนับสนุนการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายให้เป็นกล้วยไม้กระถาง (pot plant) ที่ให้ดอกที่มีลักษณะเฉพาะตัว มีความหลากหลายในด้านสีสันและออกดอกได้ตลอดปี

ต้นกล้วยไม้กระถางได้รับความนิยมอย่างมากโดยเฉพาะในญี่ปุ่น ตลาดมีความต้องการเพิ่มขึ้นทุกปี นักปรับปรุงพันธุ์จึงเริ่มให้ความสนใจพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายให้เป็นกล้วยไม้กระถางมากขึ้น โดยมีแนวความคิดของการพัฒนาคือ สามารถประดับได้ทุกสถานที่ ลำต้นไม่สูงมาก ออกดอกง่ายและออกได้ตลอดปี มีสีสดใส บานทน และมีกลิ่นหอม ซึ่งในประเทศไทยได้มีรายงานของจิตราพรรณ (2526) (อ้างโดย อรวรรณ, 2546) ที่ได้ศึกษาอายุการใช้งานของกล้วยไม้ลูกผสม *Den.* Rosy Tip × *Den. biggibum* ซึ่งเป็นหวายแคระ พบว่าลูกผสมมีต้นขนาดเล็กใช้วางประดับได้นาน 23 วัน ต่อมา Charanasri (1992) ได้นำกล้วยไม้สกุลหวาย 2 ชนิด คือ *Den. compactum* และ *Den. dicuphum* จากหมู่ *Phalaenanthe* ซึ่งเป็นกล้วยไม้มีลักษณะต้นเตี้ยแคระมาผสมข้ามกับ *Den. canaliculatum* และ *Den. carronii* จากหมู่ *Eleutheroglossum* แล้วนำลูกผสมที่ได้มาผสมกลับกับ *Den. compactum* และ *Den. dicuphum* อีกครั้งหนึ่ง ทำให้ได้กล้วยไม้กระถางลูกผสมที่มีลักษณะทรงต้นและช่อดอกที่กะทัดรัด ช่อดอกสวยและไม่ร่วงเมื่อเหี่ยว แทงช่อดอกเร็ว ช่วงการพักตัวสั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีลักษณะการเกยกันของกลีบดอก ทำให้ได้ดอกที่มีลักษณะสวยงามเป็นที่ต้องการของตลาด นอกจากนี้ Tan (1992) ได้รายงานว่า กล้วยไม้สกุลหวายในหมู่ *Spatulata* สามารถนำมาใช้ในการผสมพันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้กระถางได้ เนื่องจากมีลักษณะเด่น คือ ก้านช่อดอกมีความแข็งแรงและทนทาน และกล้วยไม้หลายชนิดในกลุ่มนี้ยังสามารถผสมข้ามกับ หมู่ *Phalaenanthe* และ *Latourea* ได้อีกด้วย

กล้วยไม้สกุลหวายของไทย จัดอยู่ในหมู่ *Callista, Formosae* และ *Dendrobium* หลายชนิดมีต้นกำเนิดในประเทศไทย มักพบได้ตามธรรมชาติ เป็นกล้วยไม้ที่มีสีสันสดใส มีความสวยงาม แต่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจน้อย จึงนิยมเลี้ยงไว้ดูเล่น และเพื่อการค้นคว้าสำหรับเป็นแนวทางปรับปรุงพันธุ์ (ชวลิต, 2542) แต่กล้วยไม้สกุลหวายของไทยบางชนิดมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาพันธุ์ลูกผสมหวายในปัจจุบัน เนื่องจากมีลักษณะเด่นเฉพาะตัวที่สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ เช่น เอื้องแซะ (*Den. scabrillingue*) ทรงต้นเล็ก ดอกขาวปากเหลือง มีกลิ่นหอม เอื้องคำปากไก่ (*Den. trigonopus*) ดอกสีเหลือง กลีบดอกหนาเป็นมัน เอื้องสายสีแสด หรือ ครั่งแสด (*Den. unicum*) ดอกสีแสดทั้งดอก ทรงต้นเล็ก เอื้องปากนกแก้ว (*Den. cruentum*) ปากเป็นรูปตัววี คอปากมีสีส้มแดง ดอกและทรงต้นเล็ก และเอื้องตาเหิน (*Den. infundibulum*) ดอกใหญ่และมีสีขาว เป็นต้น นักปรับปรุงพันธุ์จึงใช้ประโยชน์จากลักษณะเด่นดังกล่าว โดยการนำกล้วยไม้เหล่านี้มาเป็นพ่อหรือแม่พันธุ์ในการผสมข้ามกับหวายลูกผสมที่เป็นพันธุ์ทางการค้า เพื่อปรับปรุงลักษณะต่าง ๆ ให้แตกต่างไปจากเดิม ตามความต้องการของตลาด (คีรีทร, 2540) แต่การใช้กล้วยไม้สกุลหวายของไทยในการผสมพันธุ์ ยังพบปัญหาการผสมติดยาก เมื่อเทียบกับการใช้กล้วยไม้สกุลหวายที่มีถิ่นกำเนิดแหล่งอื่น ดังในรายงานของกรมวิชาการเกษตร (2543) ที่ได้ทำการคัดเลือกพันธุ์ลูกผสมกล้วยไม้สกุลหวายจากการผสมไว้ตั้งแต่ปี 2530–2539 จำนวน 100 คู่ ซึ่งได้จากการผสมระหว่างกล้วยไม้ไทยกับกล้วยไม้ไทย กล้วยไม้ไทยกับลูกผสม ลูกผสมกับพันธุ์แท้จากต่างประเทศ และพันธุ์แท้จากต่างประเทศกับพันธุ์แท้จากต่างประเทศ พบว่าสามารถคัดเลือกลูกผสม DA 141-63, DA 141-91, DA 153-45 และ DA 153-143 ซึ่งเป็นลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่าง ชนิดพันธุ์ลูกผสมกับชนิดพันธุ์แท้จากต่างประเทศ โดยลูกผสมนี้มีลักษณะการเจริญเติบโตดีและการออกดอกดีกว่าพ่อแม่พันธุ์

การขยายพันธุ์กล้วยไม้โดยเฉพาะในการผสมเกสรเพื่อนำเอาเมล็ดซึ่งเป็นส่วนที่เกิดจากผลของการผสมเกสรมาเพาะเป็นต้นกล้วยไม้ จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องใช้เทคนิคการเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic seed culture) เนื่องจากช่วยให้ได้ต้นกล้าจำนวนมากกว่าการโรยเมล็ดรอบ ๆ โคนต้นเป็นอย่างมาก ซึ่งช่วยให้โอกาสการคัดเลือกต้นลูกผสมที่ดีมีสูงขึ้น เพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมอันเป็นผลมาจากการผสมกล้วยไม้ต่างชนิดกัน และยังช่วยขยายพันธุ์ต้นที่เป็นพันธุ์แท้ (homozygous) อีกด้วย (ครรชิต, 2541) นอกจากนี้ ยังสามารถขยายพันธุ์ในกรณีของการผสมเกสรที่ได้เมล็ดน้อย ฝักร่วง หรือการแท้งโดยการช่วยชีวิตตัวอ่อน (embryo rescue) และยังช่วยลดระยะเวลา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเกิดวิวัฒนาการเองตามธรรมชาติ ทำให้การปรับปรุงพันธุ์มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ซึ่งความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีชีวภาพทำให้การเพาะเมล็ดกล้วยไม้ประสบความสำเร็จมากขึ้น โดยมีการคิดค้นสูตรอาหารที่นำมาใช้ในการเพาะเมล็ดกันมาอย่างต่อเนื่อง และมีหลายสูตรที่สามารถเพาะเมล็ดกล้วยไม้หลายชนิดได้เป็นอย่างดี เช่น สูตร Vacin and Went (1949) (อภิชาติ, 2540)

มีรายงานการใช้อาหารสูตร Vacin and Went (1949) ในการเพาะเมล็ดกล้วยไม้สกุลหวาย โดยกรมวิชาการเกษตร (2543) ได้รวบรวมพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายที่มีลักษณะดีเพื่อใช้เป็น พ่อ–แม่พันธุ์ แล้วผสมพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวาย และสามารถคัดเลือกฝักได้จำนวน 53 คู่ผสม นำฝักมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้อาหารสูตร modified Vacin and Went (1949) และได้ต้นกล้าลูกผสมที่สามารถนำออกปลูกในเรือนเพาะชำได้ทั้งสิ้น 18 คู่ผสม ซึ่งมีการเจริญเติบโตและการแตกหน่อดี และได้ต้นกล้ามีความสูงของลำลูกกล้วย 2–4 เซนติเมตร นอกจากการขยายพันธุ์แล้ว การดัดแปลงสูตรอาหารดังกล่าวยังสามารถนำมาประยุกต์เพื่อพัฒนาพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายโดยการสร้างต้นที่เป็น polyploidy ทำให้ลักษณะลำต้นและดอกเปลี่ยนแปลงไป ดังในรายงานของ Sanguthai *et al.* (1973) ได้เพิ่มจำนวนโครโมโซมอีกเท่าตัว โดยทดลองกับ *Den.* Uniwaii Crystal (2n = 3x) ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร modified Vacin and Went (1949) ที่เติมสารโคลชิซิน (colchicine) ความเข้มข้น 0.1 % เป็นเวลา 5 –20 วัน ทำให้ต้นส่วนใหญ่มีโครโมโซม 6 ชุด (2n = 6x) หรือ hexaploid

การผสมกล้วยไม้ข้ามสกุลและข้ามชนิดมักพบปัญหาการผสมไม่ติด หรือผสมเกสรแล้วไม่ได้เมล็ด เนื่องจากความเข้ากันไม่ได้ของคู่ผสม (cross incompatibility) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากพันธุกรรมของพืชเอง คือ พ่อ–แม่พันธุ์มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันมาก หรือมีโครโมโซมบางชนิดมากกว่าหรือน้อยกว่าคู่ปกติไปอย่างน้อย 1 อัน (aneuploidy) หรือเป็นการผสมข้ามสกุลที่มีความแตกต่างกันมากทำให้โอกาสผสมติดมีน้อยลง (สมศักดิ์, 2540) อย่างไรก็ตาม ในการผสมข้ามสกุลหรือชนิดในกล้วยไม้สกุลหวายบางครั้งอาจพบการเกิด androgenesis โดยต้นอ่อนที่ได้เกิดจากการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) เพศผู้ใน embryo sac เพียงอย่างเดียว (อมรา, 2540) กรณีนี้เกิดขึ้นเนื่องจากนิวเคลียสของเซลล์แม่ถูกกำจัด หรือไข่ (egg) อยู่ในสภาพที่ไม่สามารถเกิดการปฏิสนธิได้ มีผลทำให้ลูกที่ได้มีชุดโครโมโซมที่เหมือนพ่อทุกประการ (Rieger *et al.*, 1976)

Amore and Kamemoto (1991) พบการเกิด androgenesis จากการผสมข้ามเพื่อปรับปรุงคุณภาพของ *Den.* Louis Bleriot ซึ่งเป็นต้น triploid เป็นพันธุ์แม่ โดยผสมข้ามกับต้นที่เป็น amphidiploid 3 ต้น คือ *Den.* Jaquelyn Thomas สายพันธุ์ O580–4N และ D168-12 และ *Den.* Neo-Hawaii สายพันธุ์ Y972-4N พบว่า ลูกผสมทั้งหมด 209 ต้น มี 23 ต้นที่ได้ไม่ได้เกิดจากการผสมระหว่างเซลล์แม่และเซลล์พ่อ เนื่องจากมีลักษณะของดอกที่บานเหมือนกับต้น amphidiploid ที่เป็นต้นพ่อพันธุ์มากกว่าเกิดจากการผสมพันธุ์ และสามารถบ่งบอกผลดังกล่าวได้อย่างชัดเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากการศึกษาจำนวนชุดของโครโมโซม นอกจากการศึกษารูปร่างและจำนวนโครโมโซมแล้ว การตรวจสอบกล้วยไม้สกุลหวายที่เกิดจาก androgenesis ที่สามารถทำได้อย่างรวดเร็ว และมีความแม่นยำ โดยใช้เทคนิค RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Amore *et al.*, 1996)

เทคนิค Randomly Amplified Polymorphic (RAPD)

RAPD เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยหลักการที่ว่า สิ่งมีชีวิตทุกชนิดมีสารควบคุมลักษณะทางพันธุกรรม คือ ดีเอ็นเอ (deoxy ribonucleic acid : DNA) เป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางพันธุกรรม ควบคุมกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ ควบคุมการแสดงออกของยีนใดยีนหนึ่ง ส่งผลให้เกิดลักษณะที่เฉพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (นพพร, 2543) ดีเอ็นเอของพืชแต่ละชนิดมีการเรียงตัวเป็นรหัสที่กำหนดโดยหมู่โครงสร้างของเบส 4 ชนิดคือ Adenine (A), Guanine (G), Cytosine (C) และ Thymine (T) ที่ต่อเรียงเป็นสายยาว รหัสบนสายดีเอ็นเอนี้ คือตัวกำหนดการสร้างผลผลิตโปรตีน โดยผ่านกระบวนการถอดรหัสสู่โครงสร้างที่เป็นอาร์เอ็นเอ และสารพันธุกรรมที่เป็นดีเอ็นเอนั้นมีโครงสร้างเป็นเกลียวคู่และเสถียรได้ด้วยหมู่เบสที่เป็นคู่สม (complementary base pairing) คือ A คู่กับ T และ C คู่กับ G ซึ่งโครงสร้างเช่นนี้ทำให้เกิดการศึกษากลไกของการถ่ายทอดทางพันธุกรรมสู่ลูกหลาน (สุมาลี, 2546) จากการนำดีเอ็นเอของพืชที่ทำการทดสอบมาเพิ่มปริมาณในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR) สุ่มจับกับดีเอ็นเอตัวอย่างพืชโดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นที่มีลำดับเบสเรียงกันอยู่ 10 เบส มีความสามารถในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ได้ความยาวประมาณ 3 กิโลเบส หลังจากนั้นนำสารพันธุกรรมที่ได้มาทำอิเล็คโตรโฟรีซีส (electrophoresis) บนอากาโรสเจล (agarose gel) และปรากฏเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) เมื่อย้อมด้วย ethidium bromide (พรพันธ์, 2538) ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่มีการเรียงลำดับของเบสที่ต่างกันย่อมมีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน และสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมควรมีแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่คล้ายคลึงกัน (วัชรี และ มนตรี, 2536 ; Newton and Graham, 1994)

พีซีอาร์ คือการจำลองกระบวนการลอกแบบดีเอ็นเอให้เกิดขึ้นในหลอดทดลอง ซึ่งต้องอาศัยองค์ประกอบที่สำคัญ 4 อย่างคือ 1) โมเลกุลของดีเอ็นเอ เพื่อเป็นต้นแบบ หรือเทมเพลต 2) สายดีเอ็นเอสังเคราะห์สายเดี่ยว เพื่อทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์หรือตัวตั้งต้นให้มีการสร้างต่อ ซึ่งเป็นตัวจำกัดให้เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอจำเพาะตรงบริเวณที่สนใจ 3) ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ ที่ใช้เป็นหน่วยย่อยเพื่อนำมาต่อกันเป็นดีเอ็นเอ และ 4) เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ซึ่งสำคัญมากเนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (พิสิฎฐ์, 2546) พีซีอาร์มีขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอนในหนึ่งรอบของกระบวนการคือ 1) denaturing step โดยการทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งปกติจับกันเป็นคู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แยกออกจากกันโดยใช้ความร้อน 90–95 องศาเซลเซียส 2) annealing step จากการลดอุณหภูมิลงมาที่ 50–55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอตรงตำแหน่งจำเพาะที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม และ 3) extension step เป็นการปรับอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 70–75 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะสมกับการทำงานของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส ที่นำหน่วยย่อยดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์เข้ามาต่อกันสร้างเป็นสายดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์นั้น ๆ และเมื่อเสร็จสิ้นหนึ่งรอบทำให้ได้ดีเอ็นเอบริเวณที่เราสนใจเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า และหากทำเช่นนี้หลาย ๆ รอบทำให้ได้สายดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการมีจำนวนเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ คือ 2^n เรียกดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์นี้ว่า ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR products) (วีระพงศ์, 2536)

เมื่อนำผลผลิตพีซีอาร์มาทำอิเล็คโตรโฟรีซีส ซึ่งมีหลักการ คือ ดีเอ็นเอมีประจุเป็นลบเมื่อให้เคลื่อนที่ผ่านอากาโรสเจล หรือโพลีอะครีลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) ซึ่งทำหน้าที่เป็นทางเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า ดีเอ็นเอเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก และดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วหรือช้าต่างกันตามน้ำหนักของโมเลกุล คือดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่หรือเส้นยาวเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กหรือเส้นสั้น ดังนั้นเมื่อนำดีเอ็นเอมาเคลื่อนที่ผ่านเจลในเวลาหนึ่ง ดีเอ็นเอเส้นยาวซึ่งเคลื่อนที่ได้ช้าจึงอยู่ในส่วนต้นของเจล ส่วนดีเอ็นเอเส้นสั้นนั้นเคลื่อนที่ได้เร็วสามารถเคลื่อนที่ออกไปห่างจากจุดเริ่มต้นได้มากกว่า โดยดีเอ็นเอที่แยกได้จากการทำอิเล็คโตรโฟรีซีส ยังไม่สามารถมองเห็นได้ ต้องนำเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งสามารถเข้าไปแทรกอยู่ในสายดีเอ็นเอ เมื่อนำเจลที่ย้อมแล้วไปดูภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเล็ต (UV) ethidium bromide สามารถสะท้อนแสงสีส้มออกมาในตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบ ทำให้ทราบขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอได้โดยเปรียบเทียบกับเครื่องหมายดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA standard marker) ที่ทราบขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอแล้ว (ปิยะอร, 2543)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับการปรับปรุงพันธุ์พืช

ประเทศไทยเป็นแหล่งพันธุกรรมตามธรรมชาติของพันธุ์พืช ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพ ซึ่งเป็นแหล่งทรัพยากรที่มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการเกษตร ประกอบกับปัจจุบันความก้าวหน้าของเทคโนโลยีชีวภาพ ที่สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธุ์พืชที่เป็นประโยชน์ใหม่ ๆ ได้รวดเร็ว ประเทศไทยจึงได้ออกพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช (พ.ศ. 2542) ตามแบบกฎหมายเฉพาะของไทยขึ้นโดยให้ความคุ้มครองทั้งพันธุ์พืชใหม่ พันธุ์พื้นเมืองเฉพาะถิ่น และพันธุ์ป่า โดยนำหลักการคุ้มครองพันธุ์พืชใหม่ร่วมกับหลักการคุ้มครองสิทธิเกษตรกรและชุมชนท้องถิ่น จึงจำเป็นต้องมีเครื่องมือที่ดีในการตรวจสอบว่า เป็นพันธุ์พืชใหม่จริง ที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมชัดเจนกับพันธุ์เดิมที่มีอยู่แล้ว บางครั้งการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกอาจไม่เพียงพอ การจัดทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็นหลักฐานในการบอกความเหมือน หรือความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ (กรมวิชาการเกษตร, 2543ข) เนื่องจากพืชแต่ละชนิดสามารถให้แบบแผนของแถบดีเอ็นเอ หรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจง จึงถือว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมที่สามารถตรวจสอบได้ในพืชแต่ละชนิด (สมวงษ์, 2543)

นอกจากนั้น ข้อมูลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในโครงการปรับปรุงพันธุ์พืชนั้น ๆ ได้ โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอแต่ละตำแหน่งที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางฟีโนไทป์ ซึ่งทราบได้จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมหรือลิงเกจ (linkage) ทำให้สามารถติดตามการถ่ายทอดของลักษณะนั้น ๆ ไปยังรุ่นต่อไปได้ เรียกว่า เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ทำให้สามารถคัดเลือกพันธุ์พืชได้ในระยะแรกของการเจริญเติบโตในกรณีที่เมล็ดพันธุ์มีจำนวนจำกัด ช่วยลดระยะเวลาและค่าใช้จ่ายในการดูแลพืช ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถใช้บอกความสัมพันธ์ด้านพันธุกรรมของพืชพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เป็นเครื่องมือในการคัดเลือกสายพันธุ์พ่อและแม่ที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ แล้วยังใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอในการตรวจสอบความถูกต้องหรือความบริสุทธิ์ของลูกผสมได้ (จุลภาค, 2543) โดยเฉพาะพืชที่มีการสืบพันธุ์โดยอาศัยการผสมข้ามพันธุ์ ลูกผสมที่ได้รับหน่วยพันธุกรรมจากเซลล์พ่อ 1 หน่วย และเซลล์แม่ 1 หน่วย ในระหว่างการปฏิสนธิ ดังนั้นลายพิมพ์ดีเอ็นเอทุกตำแหน่งของลูกผสมจึงต้องได้รับมาจากพ่อและแม่เท่านั้น ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงสามารถใช้พิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือดได้ (อัญชลี, 2546) โดยได้มีการใช้เทคนิค RAPD ในการจัดทำ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อใช้ตรวจสอบความถูกต้องของลูกผสม ตลอดจนการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง พ่อ แม่ และลูกผสมในพืชชนิดต่าง ๆ ได้

ในกล้วยไม้ Benner *et al.* (1995) ใช้เทคนิค RAPD ตรวจสอบความแตกต่างของกล้วยไม้ *Cattleya* 8 ชนิด และลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมตัวเองของ *Cat. harrisoniana* โดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด พบว่า สามารถสังเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ความแตกต่างกันระหว่าง *Cattleya* ทั้ง 8 ชนิดได้ ในส่วนของลูกผสมที่จากได้จาก *Cat. harrisoniana* พบว่า 55 % ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีการกระจายตัวของแถบหลัก (major band) ที่พบในลายพิมพ์ดีเอ็นเอ *Cat. harrisoniana* ซึ่งจากผลดังกล่าว สามารถช่วยในการวิเคราะห์เบื้องต้นถึงความสัมพันธ์ของลูกผสมได้ และลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ความจำเพาะของลักษณะชนิดและสกุลของ *Cattleya* ได้

Chen *et al.* (2001) ใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมในกล้วยไม้ *Phalaenopsis* โดยใช้ไพรเมอร์ OPC07 เข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบของ *Phalaenopsis* พันธุ์ป่า 3 ชนิด, *Phal. amboinensis*, *Phal. amabilis* และลูกผสมของกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิด (*Phal. amboinensis* × *Phal. amabilis*) พบว่า ไพรเมอร์ที่ใช้สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แยก *Phalaenopsis* ชนิดต่าง ๆ ออกจากกันได้ นอกจากนั้นแล้ว ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากลูกผสมชั่วที่ 1 ยังแสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอที่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มาจากพ่อและแม่อย่างละครึ่ง ซึ่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการจดสิทธิบัตรเพื่อคุ้มครองพันธุ์ พ่อ แม่ และลูกผสมใหม่ ๆ ของ *Phalaenopsis* ได้

นอกจากการใช้เทคนิค RAPD เพื่อตรวจสอบลูกผสมในกล้วยไม้แล้วยังมีการใช้เทคนิคนี้กับไม้ดอกชนิดอื่นด้วย ได้แก่

Jianhua *et al.* (1997) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมในพิทูเนีย (petunia) และซิคลาเมน (cyclamen) ซึ่งความแปรปรวนทางพันธุกรรมสามารถแสดงออกในรุ่นพ่อแม่ที่เป็นสายพันธุ์แท้ และจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เทคนิคนี้สามารถใช้ประเมินความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้การคัดเลือกพันธุ์ในแต่ละรุ่นของเมล็ดดอกไม้ทั้ง 2 ชนิดทำได้รวดเร็วมากขึ้น

Renou *et al.* (1997) ใช้เครื่องหมาย RAPD ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลูกผสม *Pelargonium* ที่ได้จากการผสมภายในชนิดเดียวกันและข้ามชนิดระหว่าง *P.* × *hortorum* (H9, H11, H32 และ H33) และ *P.* × *hederae folium* (L2 และ L44) โดยมีลูกผสมที่ใช้ในการตรวจสอบทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ H9 × H32, H32 × H33, H11 × H33, L2 × L44 และ H11 × L2 พบว่าไพรเมอร์ OPG11 สามารถแสดงเครื่องหมายอาร์เอพีดีจากพ่อและแม่ ปรากฏอยู่ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมได้ และพบว่าลูกผสม H11 × L2 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับพ่อมากกว่าแม่ เนื่องจากเครื่องหมายอาร์เอพีดีจากพ่อมีมากกว่าแม่

Benedetti *et al.* (1998) ใช้เทคนิค RAPD ในการวิเคราะห์และยืนยันถึงความเป็นลูกผสมข้ามหมู่ใน *Alstroemeria* โดยใช้ไพรเมอร์ 26 หมายเลข จาก TIB MOLBIO (Geneva, Italy) ซึ่งไพรเมอร์ 25 หมายเลข สามารถเข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบแล้วปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอ 5-25 แถบ ที่มีขนาด 200-2500 คู่เบส ไพรเมอร์ 15 หมายเลข มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันมากในแต่ละชนิด และการทดลองนี้สามารถใช้ยืนยันถึงความเป็นลูกผสมข้ามหมู่สายพันธุ์ 9.95 (E15.260 × Psitt.15), 16ER95 (E15.260 × REGINA), 3ER94 (590 × REGINA) และ 9ER95 (ORANGE KING × 205) โดยใช้ไพรเมอร์ 6, 13, 6 และ 15 หมายเลข ตามลำดับ ซึ่งจากผลดังกล่าว พบว่า เทคนิค RAPD มีประสิทธิภาพสูงในการใช้ตรวจสอบเพื่อยืนยันถึงความแตกต่างระหว่างชนิด และความเป็นลูกผสมข้ามชนิดใน *Alstroemeria* และสามารถนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้มาใช้ประโยชน์ในการจดสิทธิบัตรการคุ้มครองสายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์

Ranamukhaarachchi *et al.* (2001) ได้นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้เทคนิค RAPD มาจำแนกและศึกษาถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ในหน้าวัวลูกผสม 9 สายพันธุ์ คือ Mary Jean, Lollipop, Pink Frost, Pink Aristocrat, Lady Ann, Lady Beth, Lady Ruth, Red Hot และ Southern Blush และหน้าวัวที่นำมาใช้ในการสร้างลูกผสมอีก 3 ชนิด คือ *Anthurium*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

andraeanum, A. antioquence และ *A. amnicola* โดยใช้ไพรเมอร์ 25 หมายเลข ซึ่งมี 9 หมายเลข คือ OPB(1, 2, 10, 13, 18, 20), OPAJ02, OPAK(04 และ 15) ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอได้ทั้งหมด 104 แถบ และเป็นแถบที่มีความแตกต่างกัน 74 แถบ โดยการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอในลูกผสมทั้งหมดได้รับมาจาก *A. andraeanum* 43.1 % มากกว่า *A. antioquence* (20.2 %) และ *A. amnicola* (15.3 %) และผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยค่า C (Coefficient of similarity) และ ค่า d (genetic distance) จากการทำ RAPD พบว่า Lady Ann และ Lady Beth ได้มาจากการผสมข้ามระหว่าง *A. andraeanum* × *A. antioquence* ส่วน Red Hot เป็นลูกผสมของ (*A. andraeanum* × *A. amnicola*) × *A.* Lady Jane และ Southern Blush เป็นลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่าง *A. andraeanum* × *A. amnicola* ซึ่งผลดังกล่าวเป็นไปตามประวัติของการสร้างลูกผสม (pedigree)

Scovel *et al.* (2001) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ ช่วยในการคัดเลือกต้นคาร์เนชั่น (*Dianthus caryophyllus*) ที่มีความต้านทานต่อเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, race 2 โดยนำลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ 2217 (ต้านทาน) กับ *D. caryophyllus* cv. Eifel (ไม่ต้านทาน) มาทำอาร์เอพีดีเปรียบเทียบกับลูกผสมชั่วที่ 2 ที่ต้านทานและไม่ต้านทานต่อเชื้อราดังกล่าว โดยใช้ไพรเมอร์ AF และ VR ที่มีลำดับเบสอย่างเฉพาะเจาะจงในการติดตามยีนที่ต้านทานต่อเชื้อรานี้ โดยเครื่องหมาย GS 624 ซึ่งพบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของต้นที่ต้านทานเชื้อราในลูกผสมชั่วที่ 2 พบเครื่องหมายนี้เช่นเดียวกับในลูกผสมชั่วที่ 1 แต่ไม่พบเครื่องหมายดังกล่าวในลูกผสมชั่วที่ 2 ในต้นที่ไม่ต้านทานเชื้อรา

Wiejacha *et al.* (2001) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อใช้ตรวจสอบพันธุกรรมของลูกผสมในลิลี่ (*Lilium*) จากการผสมข้ามทั้งหมด 4 คู่ คือ Marco Polo × *L. henryi*, *L. henryi* × Marco Polo, Alma Ata × *L. pumilum* และ Muscadet × L. × *formolongi* โดยใช้ไพรเมอร์ในการตรวจสอบทั้งหมด 40 หมายเลข พบว่าไพรเมอร์ 7 หมายเลข ได้แก่ C92, P3, P4, OPY(04, 09, 10) และ OPZ12 สามารถแสดงแถบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่บ่งชี้ถึงความเป็นลูกผสมของ Marco polo × *L. henryi* ได้ สำหรับไพรเมอร์ 7 หมายเลข ได้แก่ P4, C92, OPY(04 และ 10) และ OPZ10-12 สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอบางตำแหน่งที่มีอยู่ในพ่อ หรือแม่ ไปปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมระหว่าง *L. henryi* กับ Marco Polo ส่วนอีก 14 หมายเลข ได้แก่ OPY(01-06, 08, 18 และ 20) และ OPZ(03-04, 06 และ 08) สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่าง Alma Ata, Muscadet, *L. pumilum* และ *L.* × *formolongi* ได้ แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีอยู่ในพ่อไปปรากฏอยู่ในลูกผสม

การใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบลูกผสมได้ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในพืชผักหลากหลายชนิด ได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Caporali *et al.* (1996) ใช้เทคนิค RAPD ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ พ่อ แม่ และลูกผสมในหน่อไม้ฝรั่ง (asparagus) โดยพบว่า ไพรเมอร์ OPA07 สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพ่อและแม่ได้อย่างชัดเจน และในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมชั่วที่ 1 มีแถบดีเอ็นเอที่พบในพ่อและแม่อย่างครึ่ง ส่วนในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมที่ได้จากการผสมกลับกับพันธุ์แม่ ส่วนใหญ่ได้รับแถบดีเอ็นเอจากแม่มากกว่าพ่อ

Ballester and Vicente (1998) ใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์พริกไทย (pepper) (*Capsicum annuum* L.) ลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ H14 (P1 × P4), H24 (P2 × P4), H34 (P3 × P4), H67 (P6 × P7) และ H68 (P6 × P8) โดยนำมาทำพีซีอาร์เปรียบเทียบกับ พ่อ แม่ ของแต่ละสายพันธุ์ และใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 – mer จำนวน 100 หมายเลข (Operon Technologies Kits : A, E, G, H, I, K, L, P, Q, T, V, Z และ AD) พบว่า มีไพรเมอร์ 53 หมายเลข ที่สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแต่ละสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน แต่มี 19 หมายเลข (36 %) ที่บ่งชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมของสายพันธุ์พ่อและแม่ และการถ่ายทอดความสัมพันธ์ดังกล่าวไปยังลูกผสม ซึ่งเทคนิค RAPD นี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูง สามารถใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ลูกผสมได้เป็นอย่างดี

Hansen (1998) ใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบลูกผสมที่ได้จากการทำ protoplast fusion ระหว่าง *Brassica oleracea* (L.) กับ *Camelina sativa* (L.) Carntz โดยใช้ไพรเมอร์ 20 หมายเลข พบว่ามีไพรเมอร์ 4 หมายเลข ที่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างพ่อและแม่ได้อย่างชัดเจน และแถบดีเอ็นเอจากพ่อ และ แม่ ไปปรากฏอยู่ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมทุกต้น

Liou *et al.* (1998) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจาก พ่อ แม่ ไปสู่ลูกใน *Cucumis melo* (L.) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเรียงลำดับแบบสุ่มขนาด 10–mer ทั้งหมด 100 หมายเลข (Kits A–Z, Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA) ซึ่งพบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอเครื่องหมาย 310 แถบจากพ่อ (พันธุ์ Sky Rocket) และ แม่ (*C. melo* var. *makuwa* # SLK–V-052) ไปปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 211 แถบ (68 %) และ 186 แถบ จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมชั่วที่ 1 ไปปรากฏอยู่ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมชั่วที่ 2 ซึ่งเทคนิค RAPD นี้ สามารถใช้หาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงความสัมพันธ์จาก พ่อ แม่ ไปสู่ลูกใน *C. melo* ได้

Grzebelus *et al.* (2001) ได้ใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจสอบความสัมพันธ์จาก พ่อ และแม่ ไปสู่ลูกผสมใน แครอท (*Daucus carota* L.) 3 คู่ผสม คือ 1028 × 9370, 9370 × 2158 และ 2163 × 2158 โดยใช้ไพรเมอร์ 33 หมายเลข พบว่า 15 หมายเลข สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจน และบ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ แม่ และลูกผสมทั้ง 3 คู่ ได้

การตรวจสอบลูกผสมโดยการใช้เทคนิค RAPD ได้มีการนำมาใช้กับไม้ผลหลายชนิด ได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Levi and Rowland (1997) ใช้เทคนิค RAPD ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในบลูเบอร์รี่ (*Vaccinnium corymbosum* Linn.) สายพันธุ์ Florida 4 B (แม่), W85- 20 (พ่อ), hybrid #5 และ hybrid #6 ซึ่งเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 ของทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ OPX 03 มีค่าการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันถึง 62–78 % จึงสามารถใช้ค่าดังกล่าวประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพ่อ แม่ และลูกผสมได้

Bartolozzi *et al.* (1998) ใช้เทคนิค RAPD ตรวจสอบลักษณะความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในอัลมอนด์ [*Prunus dulcis* (Mill.)] สายพันธุ์ Nonpareil (แม่), Mission (พ่อ) และ Thompson (ลูกผสมชั่วที่ 1) ไพรเมอร์ OPA08 สามารถแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง พ่อ แม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 ได้อย่างชัดเจน และสามารถใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในอัลมอนด์ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ได้

Magdalita *et al.* (1998) ได้นำเทคนิค RAPD มาใช้ในการตรวจสอบลูกผสมมะละกอจำนวน 120 ต้น ที่ได้จากการผสมข้ามชนิดระหว่าง *Carica papaya* (อ่อนแอต่อเชื้อ papaya ring spot virus–type P: PRSV–P) และ *C. cauliflora* (ต้านทานต่อเชื้อ PRSV-P) โดยใช้ Operon primers 72 หมายเลข พบว่า ไพรเมอร์ทั้งหมด สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอของ *C. papaya* และ *C. cauliflora* ได้ 238 และ 263 แถบ ตามลำดับ และเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันถึง 320 แถบ (64 %) และมีไพรเมอร์ 17 หมายเลข (24 %) ที่แสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอที่มีอยู่ในพ่อและแม่ ไปปรากฏในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมอย่างน้อย 1 แถบ ซึ่งการวิเคราะห์ดังกล่าวสามารถยืนยันถึงความเป็นลูกผสมของ *C. papaya* และ *C. cauliflora* ได้

Banno *et al.* (2000) ใช้เครื่องหมาย RAPD ตรวจลูกผสมในสาลี่ (*Pyrus pyrifolia* Nakai.) สายพันธุ์ Kuratsuki เปรียบเทียบกับสาลี่อีก 4 สายพันธุ์ คือ Shinsui, Kosuii, Hosui และ Chojuro เพื่อหาพ่อและแม่ของสายพันธุ์ Kuratsuki โดยใช้ไพรเมอร์ CMN–B41, CMN–B53, CMN–B56 และ CMN–B63 พบว่า แต่ละสายพันธุ์แสดงเครื่องหมาย RAPD ที่มีความเฉพาะเจาะจง โดยสามารถบ่งชี้ได้ว่า สายพันธุ์ Kuratsuki ได้มาจากการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ Shinsui และ Hosui จากการปรากฏของแถบดีเอ็นเอบางแถบใน 2 สายพันธุ์รวมกันอยู่ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของ Kuratsuki

Sharifani and Jackson (2000) ใช้เทคนิค RAPD ตรวจสอบความสัมพันธ์ในสาลี่ (*Pyrus communis*) 3 สายพันธุ์ คือ Josephine, Lemon Bergamot และ Packham Triumph และลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามระหว่าง Packham Triumph × Josephine, Packham Triumph × Lemon Bergamot, Josephine × Packham Triumph และ Lemon Bergamot × Packham Triumph โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10–mer ทั้งหมด 20 หมายเลข พบว่ามี 9 หมายเลข คือ OPA08, OPA10, OPA12, OPB12, OPC06, OPC07, OPD01, OPD02 และ OPD10 สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสาลี่ทุกสายพันธุ์แต่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพียงจำนวน 2 หมายเลข คือ OPC06 และ OPC07 ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง พ่อ แม่ และลูกผสม ได้อย่างชัดเจน

นอกจากนี้ ยังมีการนำเทคนิค RAPD มาใช้กับพืชหัว โดย Thompson *et al.* (1997) ใช้เครื่องหมาย RAPD เพื่อยืนยันถึงความเป็นลูกผสมในมันเทศ [*Ipomoea batatus*] 2 สายพันธุ์ คือ MD–708 × Vardaman และ Vardaman × Regal โดยใช้ไพรเมอร์ 80 และ 100 หมายเลข ตามลำดับ พบว่า ในคู่ผสม MD–708 × Vardaman และ Vardaman × Regal มีจำนวนไพรเมอร์ 24 และ 37 หมายเลข ตามลำดับ ที่สามารถแสดงแถบดีเอ็นเอในทุกสายพันธุ์ โดยสามารถสังเคราะห์เครื่องหมาย RAPD 57 และ 67 แถบ ตามลำดับ และพบการกระจายตัวของเครื่องหมาย RAPD จากพ่อและแม่ ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม 34 และ 40 แถบ ตามลำดับ ซึ่งสามารถนำไปใช้ยืนยันความเป็นลูกผสมในมันเทศทั้ง 2 สายพันธุ์ได้

และพืชเครื่องดื่ม จากรายงานของ Tanaka and Taniguchi (2002) ใช้เทคนิค RAPD จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอในชา (*Camellia sinensis*) สายพันธุ์ Sayamakaori, Kana–CK17 และลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้จากการผสมแบบสลับ (reciprocal cross) ระหว่าง 2 สายพันธุ์นี้ โดยไพรเมอร์ OPU06 ที่มีลำดับเบส 5'-ACCTTTGCGG-3' แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างพ่อ แม่ และลูกผสม จากการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอที่มีในพ่อและแม่ ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved