บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

แมลงบั่ว *Orseolia oryz*ae (Wood-Mason) เป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญของประเทศต่างๆ ในเอเชีย เอเชียตะวันออกเฉียงใต้และแอฟริกา โดยมีเขตแพร่กระจายอยู่ระหว่างเส้นรุ้งที่ 24 องศาเหนือและ 10 องศาใต้ (Hidaka *et al*., 1974) ต่อมาได้มีการศึกษาด้านอนุกรมวิทยาของแมลงบั่วที่เกิดขึ้นในเอเชียและแอฟริกา พบว่าแมลงบั่วแอฟริกาถูกจำแนก ชื่อ-สกุล เป็น *Orseolia oryzivora* (Harris&Gagen) และเอเชียเป็น *Orseolia oryzae* (Wood-Mason)

สำหรับแมลงบั่วเอเชียนั้น มีรายงานพบการทำลายของแมลงบั่วในประเทศบังคลาเทศ ปากีสถาน ศรีลังกา (Hill, 1975) พม่า เขมร จีน อินเดีย อินโดนีเซีย ลาว เนปาล ไทย เวียดนาม (Plumb, 1967) และยังพบว่าเกิดขึ้นในปาปัวนิวกินี ซึ่งการแพร่กระจายและความเสียหายจากการทำลายของแมลงบั่วได้เพิ่มมากขึ้น ในอินเดียซึ่งเดิมพบว่าเป็นศัตรูข้าวที่สำคัญเฉพาะฤดูฝน แต่ปัจจุบันพบว่ามีการระบาดในข้าวที่ปลูกในฤดูหนาวด้วย (Kalode and Kasiviswanathan, 1976) สำหรับประเทศไทยโดยปกติจะพบการระบาดในฤดูฝนที่มีการปลูกข้าวนาปี พื้นที่ที่แมลงระบาดรุนแรงและทำความเสียหายแก่ข้าวมากคือ ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Thongphug *et al*., 1999) ในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมักจะเกิดระบาดรุนแรงทุกๆ 5-6 ปี ในภาคเหนือพบระบาดที่ จังหวัดแพร่ จังหวัดน่าน จังหวัดเชียงราย จังหวัดพะเยา จังหวัดแม่ฮ่องสอน จังหวัดเชียงใหม่ และจังหวัดลำปาง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบระบาดเสมอที่ จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดหนองคาย จังหวัดนครพนม จังหวัด สกลนคร จังหวัดอุดรราชธานี และจังหวัดขอนแก่น แหล่งที่พบระบาดมักจะเป็นพื้นที่ใกล้ภูเขา หรือเชิงเขา ชายป่า หรือใกล้น้ำ ทั้งนี้เนื่องจากมีความชื้นสูง สภาพแวดล้อมเหมาะสม พืชอาหารอุดมสมบูรณ์ ปัจจุบันพบว่ามีการระบาดเป็นครั้งคราวใน เขตภาคกลางจนถึงภาคกลางตอนบน ซึ่งจะมีการระบาดในฤดูนาปรัง เช่น ในปี พ. ศ. 2528 ที่ จังหวัดฉะเชิงเทรา ปี พ. ศ. 2537 ที่ จังหวัดปทุมธานี ในปี พ. ศ. 2541 พบระบาดที่ จังหวัดอยุธยา จังหวัดสุพรรณบุรี และจังหวัดชัยนาท และยังพบระบาดที่ภาคใต้ ในปี พ. ศ. 2540 ระหว่างเดือนธันวาคมที่ จังหวัดพัทลุง และจังหวัดสงขลา ความเสียหายที่เกิดจากแมลงบั่วจะรุนแรงในปีที่มีฝนตกชุกตั้งแต่ต้นฤดู ถ้าปลูกข้าวในช่วงเวลาที่แมลงบั่วมีประชากรสูง ความเสียจะมีความรุนแรงมาก บางครั้งเกิดความเสียหายได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากข้าวไม่ออกรวง ทุกแขนงที่แตกกอจำนวนมากจะมีหนอนบั่วอยู่ภายในทั้งสิ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แมลงบั่วเป็นแมลงศัตรูข้าวที่มีการทำลายภายในต้นข้าว อาการที่เกิดขึ้นจึงไม่สามารถแสดงให้เห็นเด่นชัด จนกว่าจะเห็นหลอดบั่วสีขาวซึ่งก็หมายถึงต้นข้าวแขนงนั้นเสียหายไปแล้ว แมลงบั่วจะวางไข่ที่ใบข้าวและกาบใบใกล้ระดับน้ำ ไข่แมลงบั่วที่ฟักออกมาเป็นตัวหนอนจะเข้าไปภายในจุดเจริญโดยอาศัยน้ำฝนหรือหยดน้ำค้างที่อยู่บนซอกใบข้าว ความชื้นสัมพัทธ์มีผลโดยตรงต่อปริมาณการวางไข่ เปอร์เซ็นต์ไข่ฟักเป็นตัวหนอน และการอยู่รอดของตัวหนอนที่จะเข้าทำลายยอดข้าว ตัวหนอนจะเข้ากินจุดเจริญ (Growing point) ของต้นข้าวโดยฝังตัวอยู่ภายใน กัดกินเนื้อเยื่อ และน้ำเลี้ยงให้มีลักษณะเป็นโพรง เจริญเติบโตลอกคราบ 3 ครั้ง ในขณะเดียวกันเนื้อเยื่อข้าวบริเวณนั้นจะถูกกระตุ้นโดยสารจากน้ำลายของหนอนแมลงบั่ว ให้เซลล์ที่จะพัฒนาเป็นกาบใบนั้นพองตัวออกมีลักษณะเป็นเซลล์หลวมๆ และจะยืดตัวด้านยาวขึ้นเรื่อยๆ ตามวัยของหนอนเมื่อหนอนจะเข้าดักแด้หลอดบั่วจะโผล่จากซอกกาบใบเพื่อให้ดักแด้เจริญเป็นตัวเต็มวัย และเจาะออกที่ปลายหลอดบริเวณเซลล์อ่อนนุ่ม หลอดบั่วที่ฝังอยู่ในจุดเจริญของทุกหน่อจะค่อยๆ ทยอยกันเป็นหลอดตามลำดับการแตกหน่อของข้าว ดังนั้นจะเห็นต้นข้าวแตกกอคล้ายกอหญ้า เนื่องจากข้าวจะแตกหน่อชดเชยหน่อที่ถูกทำลาย

การทำลายของแมลงบั่ว ถ้าเกิดในระยะกล้าอายุน้อยๆ ต้นกล้าจะเตี้ยแคระแกร็นและจะมีการแตกแขนงมากผิดปกติ ใบสุดท้ายที่อยู่บนสุดไม่โผล่ ถ้าต้นกล้าอยู่ในระยะ 5 ใบ จะเห็นว่าข้าวใบที่ 4 จะทำมุมกับใบที่ 5 กว้างกว่าข้าวปกติที่ไม่ถูกทำลาย ใบสีเขียวเข้ม และมีลักษณะชี้แข็งไม่โน้ม โคนต้นจะค่อนข้างแข็งและลำสั้นกลม ต้นกล้าปกติจะมีลำต้นแบนและอ่อนนุ่ม ถ้าเกิดในระยะแตกกอ ใบข้าวจะสั้นกว่าปกติ โดยเฉพาะใบบนสุดจะสั้นมากถ้าผ่าต้นข้าวดูจะพบว่าหนอนอยู่ในวัยที่ 1 จนถึงระยะหนอนเตรียมเข้าดักแด้ มีหลอดสีเขียวอ่อนหรือสีขาวโผล่ขึ้นมาแทนใบยอดและหลอดจะยืดตัวขึ้นเรื่อยๆ ภายใน 3-5 วัน ซึ่งเป็นระยะที่ดักแด้จะเปลี่ยนเป็นตัวเต็มวัย ลักษณะและขนาดความยาวของหลอดขึ้นอยู่กับลักษณะพันธุ์และอายุของต้นข้าว ข้าวแตกกอมากผิดปกติ มีหน่อเล็กๆ มากมายซึ่งหน่อที่เกิดขึ้นบางต้นอาจสร้างหลอดได้ ถ้ามีการระบาดรุนแรงมากต้นข้าวจะเตี้ยแคระ ใบตั้งแข็งเหมือนกอหญ้า และถ้าเกิดในระยะออกรวง ในบางกรณีที่มีการระบาดของแมลงบั่วในช่วงหลังของฤดูในระยะที่ข้าวเริ่มติดรวงอ่อน หนอนบั่วไม่สามารถสร้างหลอดได้ แต่จะทำให้ตายอดที่เริ่มเปลี่ยนเป็นรวงนั้นมีลักษณะผิดปกติไป อาการผิดปกติของรวงอ่อนจะเป็นไปได้หลายลักษณะเช่น เป็นแฉกหรือกระจุก คล้ายดอกกุหลาบหรือดอกจัน บางครั้งใบธงจะหงิกงอบิดเป็นเกลียวและรวงข้าวบิดงอไม่โผล่พ้นกาบใบธง

การใช้สารกำจัดแมลงในระยะที่มีการระบาดนั้น พบสารเคมีหลายชนิดที่สามารถใช้กำจัดแมลงบั่วได้ดี แต่เป็นสารที่ไม่ปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม สารบางชนิดเป็นสารที่กระตุ้นให้มีการระบาดของแมลงศัตรูข้าวชนิดอื่นได้ เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (จินตนา, 2545) การใช้พันธุ์ข้าวต้านทานต่อแมลงบั่วจึงเป็นวิธีการที่นิยมใช้ อย่างไรก็ตามข้าวพันธุ์ต้านทานของไทย เช่น เหมย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอง 62 เอ็ม, กข. 4 และ กข. 9 มีความต้านทานต่อบั่วในแต่ละพื้นที่ต่างกัน (Pongprasert *et al.*, 1972) ทำให้เชื่อว่าประชากรของบั่วในแต่ละแหล่งปลูกข้าวน่าจะมีความแตกต่างกัน

จินตนาและคณะ (2539) ได้ทำการทดลองในช่วงปี พ.ศ. 2534-2538 โดยทดสอบข้าวพันธุ์ต้านทานกับประชากรของบั่วที่เก็บจาก 4 แหล่งระบาดในประเทศไทยต่อข้าวพันธุ์ผสมต้านทานบั่ว 6 สายพันธุ์และพันธุ์ต้านทาน กข.4 กข. 9 และเหมยนอง 62 เอ็ม พบว่ามีความแตกต่างของปฏิกิริยาต่อพันธุ์ทดสอบ ซึ่งสามารถบอกถึงความแตกต่างของไบโอไทด์ของแมลงบั่วในจังหวัดน่าน จังหวัดแพร่ จังหวัดนครพนม และจังหวัดอุบลราชธานี ในช่วงปี พ.ศ. 2547 พันนิภาและคณะ (2548) ได้ทดสอบปฏิกิริยาของพันธุ์ข้าวต่อการทำลายของแมลงบั่วภาคเหนือตอนบนในสภาพโรงเรือนปฏิบัติการ พบว่าแมลงบั่วทั้ง 4 แหล่งระบาดมีความสามารถในการทำลายข้าวทดสอบแตกต่างกัน โดยแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 แมลงบั่วจาก จังหวัดแพร่ จังหวัดน่าน และจังหวัดตาก กลุ่มที่ 2 แมลงบั่วจากจังหวัดเชียงราย

ด้วยเหตุนี้การวิเคราะห์และจำแนกหมวดหมู่ของแมลงมีความสำคัญมาก เพราะจะช่วยในการวิเคราะห์หาแนวทางการควบคุมกำจัดแมลง หรือการนำแมลงมาใช้ประโยชน์อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทั่วไปการจำแนกหมวดหมู่ของแมลง ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นสำคัญซึ่งสามารถใช้จำแนกแมลงได้ถึงระดับสปีชีส์ (species) แต่เป็นที่ทราบกันว่า แมลงในสปีชีส์เดียวกันอาจไม่มีความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยา แต่มีความแตกต่างกันด้านลักษณะนิสัย ความเป็นอยู่ ความแข็งแรงและอ่อนแอ รวมทั้งความชอบพืชอาหาร ซึ่งเข้าใจว่าเกิดจากวิวัฒนาการและพัฒนาการที่เกี่ยวข้องกับความสัมพันธ์ระหว่างแมลงกับพืชอาศัยและสภาพแวดล้อม เรียกว่าประชากรของแมลงในสปีชีส์เดียวกันที่มีความแตกต่างในลักษณะนี้ว่า ไบโอไทพ์ (biotype) การศึกษาโครงสร้างประชากรของแมลง และสามารถวิเคราะห์ความแตกต่างในประชากรของแมลงชนิดนั้นๆ เช่น วิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ การแพร่ระบาดของแมลง พืชอาหาร นิสัยความเป็นอยู่ และที่สำคัญยิ่งสำหรับแมลงศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจ คือ ทำให้สามารถพัฒนาแนวทางการควบคุมกำจัดแมลงที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพได้

ปัจจุบันเทคโนโลยีทางชีวภาพโมเลกุลมีความก้าวหน้าเป็นอย่างมาก และนิยมนำมาใช้ในการจำแนกความหลากหลายของแมลง โดยอาศัยเครื่องหมายทางโมเลกุล

เครื่องหมายทางโมเลกุล

การศึกษาเครื่องหมายหรือ marker เพื่อบ่งชี้ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณและคุณภาพอาจเป็นการจำแนกความแตกต่างในระหว่างและภายในสปีชีส์ (between and within species) ระหว่างและภายในประชากร (between and within

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

populations) หรือระหว่างแต่ละตัว (between individuals) ก็ได้ เครื่องหมายที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างนี้มี 2 ประเภท คือ

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker)

การบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต ใช้วิธีเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยาหรือทางสรีรวิทยา ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักจะขึ้นกับสภาพแวดล้อมทำให้ตรวจสอบผลผิดพลาดได้ บางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษและต้องมีวิธีที่จะบอกจีโนไทป์ (genotype) ที่ถูกต้องจากฟีโนไทป์ (phenotype) ที่ตรวจสอบได้อย่างไรก็ตามการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นต้องทำเป็นอันดับแรก แล้วจึงใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น หรือแก้ปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวได้

2. เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker)

เครื่องหมายทางโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ และระดับดีเอ็นเอ ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

2.1 เครื่องหมายโปรตีน (Protein marker)

การตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลของโปรตีนใช้วิธีแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนในเลือด โปรตีนสะสมในเมล็ดพืช เป็นต้น นอกจากนี้ยังนิยมตรวจสอบรูปแบบของเอนไซม์บางชนิดหรือไอโซไซม์ต่างๆ ข้อดีของการตรวจสอบโปรตีนคือสามารถตรวจได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก และแถบของโปรตีนหรือไอโซไซม์นี้ยังมีการข่มร่วมกันแบบ codominant ช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ ข้อจำกัดของการตรวจสอบโปรตีนหรือไอโซไซม์คือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังมีไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษา จึงต้องเลือกเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ผลที่ได้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะของการเจริญเติบโตและสิ่งแวดล้อมด้วย นอกจากนี้โปรตีนและไอโซไซม์ยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัด ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้นานได้ ในแง่ของโอกาสการตรวจพบความแตกต่างในระดับโปรตีนยังมีค่าต่ำมาก เมื่อเทียบกับการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากอัลลีลหรือรูปแบบของยีนที่แตกต่างกันนั้น นิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันอาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน หรือบางครั้งแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งแล้วก็ตาม อาจจะไม่มีผลต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลเมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำให้ไม่สามารถตรวจพบความแตกต่างนั้นๆ ได้ พบว่าการตรวจสอบระดับโปรตีนนี้ตรวจพบความแตกต่างของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องหมายโปรตีนได้เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ ของที่เกิดการแทนที่เบสทั้งหมดเท่านั้น ทำให้ผลที่ตรวจสอบได้พบความแตกต่างต่ำกว่าที่เป็นจริง

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใดๆ ระยะการเจริญเติบโตหรือสภาพทางสรีรวิทยาใดก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อมตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ จะมีการแสดงออกหรือไม่ก็ได้จึงตรวจสอบได้โดยไม่จำกัด ครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่างๆ ให้เลือกมากมาย ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายทำได้อย่างกว้างขวาง ประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้ไม่จำกัด

เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ใช้วิธีการ DNA-DNA hybridization เช่น FISH (Fluorescence in *situ* Hybridization) และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้วิธีการพีซีอาร์ (PCR: Polymerase Chain Reaction) เช่น SSR (Simple Sequence Repeat), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) และ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Weising *et al.*, 1995)

เทคนิค RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

เทคนิคนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นโดย William และคณะในปี ค. ศ. 1990 โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลและย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่มีเบสเป็นคู่สมกันโดยไม่จำเป็นต้องทราบว่าไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอส่วนใดบนโครโมโซมใด โดยใช้หลักการที่ว่าดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันในการเรียงลำดับของเบส (base) ได้แก่ adenosine (A), thymine (T), guanine (G) และ cytosine (C) โอกาสที่จะพบลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับไพรเมอร์คือ 1 ใน 4^{10} โดยประมาณ จึงสุ่มเอาตัวแทนบริวเณใดบริเวณหนึ่งบนสายดีเอ็นเอ มาเพิ่มปริมาณเช่นเดียวกับประสิทธิภาพในการศึกษากับแมลง (Hadrys *et al.*, 1992) วิธีการนี้มีการเรียกชื่อแบบอื่นได้อีก เช่น arbitrarily primed PCR, DNA amplification fingerprinting (DAF) ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอโดยเกิดคู่สมได้ 100 เปอร์เซ็นต์และนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดมีสัดส่วนเท่าๆ กันในจีโนม สามารถประมาณค่าของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่จะเกิดขึ้นจากไพรเมอร์ (สุรศักดิ์, 2540; สุรินทร์, 2545)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เทคนิค AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

AFLP เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) แบบหนึ่ง พื้นฐานของ AFLP คือ การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้นจึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) และประสิทธิภาพของพีซีอาร์เข้าด้วยกัน เทคนิค AFLP ถูกพัฒนาขึ้นโดย Zaveau และ Vos และได้จดสิทธิบัตรในปี ค. ศ. 1993 (สุรินทร์, 2545)

หลักการทำ AFLP

การทำ AFLP ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ การตัด-ต่อดีเอ็นเอด้วย adaptor การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์และการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย polyacrylamide gel electrophoresis

Restriction / Ligation คือการนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ 2 ชนิด นิยมใช้เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส (race cutter) ตำแหน่ง เช่น *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I, *Bgl*II, *Xbl*I จึงช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจากการทำพีซีอาร์ลง ซึ่งจะตัดกับดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 4 (= 4,096) คู่เบส ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส (frequent cutter) คือ *Mse*I และ *Taq*I เป็นต้น จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นขนาดเล็ก ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 4 (= 256) คู่เบส เมื่อใช้เอนไซม์ 2 ชนิดตัดดีเอ็นเอที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์ที่เป็น race cutter และอีกด้านหนึ่งเป็น frequent cutter แล้วเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ adapter ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด เพื่อให้เป็นที่จับจองของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์ในขั้นต่อไป (สุรินทร์,2545; Vos *et al.*, 1995)

Amplification คือ การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสทางปลาย 5' เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3 เรียกว่า selective past จำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3 จะช่วยลดจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณลดลง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ต้องไปมีลำดับเบสที่อยู่ต่อตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไป ซึ่งดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหรือจีโนมที่ศึกษาส่วนประกอบของเบสทั้ง 4 ชนิด คือ G, C, A, T มีในสัดส่วนเท่ากัน การเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์เพื่อคัดเลือก 1 เบสจะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณเหลือเพียง 1 ใน 4 ของทั้งหมด ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 2 เบส จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ก็จะลดลงเหลือ (1/4) ของทั้งหมด (n คือ จำนวนเบสสำหรับคัดเลือกที่เพิ่มขึ้น) ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกเบสที่ปลาย 3 จะเรียกว่าเป็นไพรเมอร์ +1, +2, +3 เช่น ไพรเมอร์ทางปลาย *Eco*RI adaptor จะเรียกว่า *Eco*RI+1, *Eco*RI+2, *Eco*RI+3 เป็นต้น (สุรินทร์, 2545; อุไรวรรณ, 2545)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3 มากกว่า 2 เบส จะทำปฏิกิริยาเพิ่ม 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่า preselective amplification และการทำซีพีอาร์ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบให้มากขึ้น และช่วยให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกต้อง ใช้ไพรเมอร์โดยเพิ่มเบสคัดเลือก +1 เพื่อคัดเลือกปริมาณดีเอ็นเอพบว่าจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ลดลง

(2) selective amplification การทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณเบสครั้งที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3 มากกว่า 2 เบสขึ้นไป นอกจากเป็นการประกันว่าเป็นการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่ใช้อย่างถูกต้อง และมีประสิทธิภาพสูงสุดแล้ว ยังช่วยลดพื้นหลังไม่ให้ดำในลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ที่มาความแตกต่างของลายพิมพ์ AFLP

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำ AFLP มีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใดๆ ก็ได้ ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ที่เหมาะสมได้โดยปรับจำนวนเบสคัดเลือกที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ที่ใช้ แม้ว่าวิธีการทำ AFLP จะค่อนข้างยุ่งยาก แต่ผลที่ได้สามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) และสามารถเลือกคู่ผสมของไพรเมอร์ได้หลายแบบ ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์คู่หนึ่งนั้นจะเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากในเวลาเดียวกัน แบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นมาจากการเปลี่ยนแปลงเบส (point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไปหรือเกิดขึ้นใหม่ หรือการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตรงส่วนที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกของไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวแล้วแต่กรณี หรืออาจเกิดจากมีชิ้นดีเอ็นเอสั้นๆ ขาดหายไป หรือสอดแทรกเข้ามาในระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ก็ได้ ผลที่เกิดขึ้นคือการที่แถบดีเอ็นเอ หรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้นๆ หรือชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเปลี่ยนไป การถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากการทำ AFLP จึงมีทั้งแบบที่แสดงลักษณะข่ม (dominance) โดยปรากฏเป็นการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ และแบบที่แสดงลักษณะข่มร่วมกัน (codominance) โดยปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยทั่วไปจะพบเครื่องหมาย AFLP (AFLP marker) แบบที่เป็นลักษณะข่มมากกว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้อดีและข้อด้อยของเทคนิค AFLP

เทคนิค AFLP ตั้งชื่อเลียนแบบจากเทคนิค RFLP แต่โพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ไม่ได้เกิดจากความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอเหมือนใน RFLP จะเกิดจากการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้น อย่างไรก็ตาม AFLP เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่งซึ่งใช้ในการศึกษาทางพันธุกรรมได้แบบเดียวกับเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอื่น เช่น การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร ศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางชีวภาพ และใช้ทำแผนที่องจีโนมได้เป็นอย่างดี

ข้อดีของเทคนิค AFLP คือ

1. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค AFLP ไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับเทคนิค RAPD จึงทำได้อย่างกว้างขวาง

2. ทำได้รวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวนน้อย โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์จึงมีประสิทธิภาพสูง

3. ในการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่งๆ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (multi-locus) พร้อมกันคือมี multiplex ratio สูง ในหนึ่งปฏิกิริยาจะให้แถบดีเอ็นเอมากกว่า RAPD ประมาณ 4 เท่า

4. ทำให้เกิดโพลิมอร์ฟิซึมได้จำนวนมาก จึงสามารถใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างได้ดี ใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต การจดทะเบียนลิขสิทธ์ การตรวจสอบความเป็นลูกผสม เป็นต้น

5. ใช้กับสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใดก็ได้ โดยการปรับจำนวนเบสที่ใช้คัดเลือกที่ส่วนปลาย 3' ของไพรเมอร์ หรือใช้กับดีเอ็นเอที่โคลนไว้ก็ได้

6. สามารถแยกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้โดยดูจากความเข้มของแถบ จึงวิเคราะห์ผลได้แบบเดียวกับดีเอ็นเอเครื่องหมาย AFLP แสดงการข่มแบบ dominance

ข้อด้อยหรือข้อกำจัดของเทคนิค AFLP คือ

1. ค่าใช้จ่ายในการทำ AFLP ค่อนข้างสูง วัสดุหลายอย่างมีราคาแพง วิธีการที่ใช้ค่อนข้างซับซ้อนเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค RAPD หรือการวิเคราะห์ microsattelite

2. แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่แสดงการข่มแบบ dominance ซึ่งทำให้วิเคราะห์ผลได้ยากกว่าเครื่องหมายแบบที่เป็น codominance เช่น RFLP

3. เนื่องจากการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่งๆ เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และมีขนาดใกล้เคียงกัน บางครั้งแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันอาจมาจากชิ้นดีเอ็นเอคนละตำแหน่ง ทำให้การวิเคราะห์ผลผิดพลาดได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. เทคนิค AFLP ไม่เหมาะสำหรับใช้เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันมากๆ คือมีลำดับเบสที่เหมือนกันต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เพราะจะมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (common band) จำนวนน้อย ทำให้การวิเคราะห์ผลในแง่การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการผิดพลาดได้

5. สำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกันมากก็ไม่เหมาะสมเช่นกัน เพราะจะพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวนน้อย แม้ว่าในการทำปฏิกิริยาจะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากก็ตาม (สุรินทร์, 2545)

การประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD และ AFLP เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

เทคนิค RAPD ได้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารพันธุกรรมของแมลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแมลงตัวเล็กๆ เช่น ใช้วิเคราะห์สายพันธุ์ของแมลงตัวเบียน (Landry *et al.*, 1993) และแมลงวันผลไม้ (Haymer and Mclnnis, 1994)

Thongphak (1997) ได้จัดจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของแมลงบั่ว โดยใช้เทคนิค RAPD-PCR จาก 14 กลุ่มประชากร พบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มเอ ประกอบด้วย จังหวัด จังหวัดน่าน จังหวัดแพร่ และจังหวัดเชียงราย กลุ่มบี ประกอบด้วยจังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดลำปาง จังหวัดพะเยา จังหวัดอุดรธานี จังหวัดหนองคาย และจังหวัดอุบลราชธานี กลุ่มซี ประกอบด้วยจังหวัดนครพนม และกลุ่มดี ประกอบด้วยจังหวัดฉะเชิงเทรา และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์พบว่าแมลงบั่วกลุ่มเอมีความใกล้ชิดกับกลุ่มบี และประชากรแมลงบั่วกลุ่มซีมีความใกล้ชิดกับแมลงบั่วกลุ่มเอและบีมากกว่ากลุ่มดี Thongphak *et al.* (1999) ได้ใช้เทคนิค RAPD-PCR เช่นเดียวกัน ในการจำแนกประชากรของแมลงบั่ว โดยวิเคราะห์ดีเอ็นเอ จาก 14 แหล่ง และใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ NTSYS-PC สามารถจัดกลุ่มของแมลงบั่วทั้ง 14 แหล่ง ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่ง ประกอบด้วยแมลงบั่ว จังหวัดน่าน จังหวัดแพร่ จังหวัดพะเยา จังหวัดลำปาง จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดเชียงราย จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดกำแพงเพชร และจังหวัดพิจิตร กลุ่มที่สองประกอบด้วยแมลงบั่วจากจังหวัดนครพนม จังหวัดอุบลราชธานี และจังหวัดพัทลุง กลุ่มที่สามประกอบด้วยแมลงบั่วจากจังหวัดอุดรธานี และจังหวัด หนองคาย การสร้าง Dendrogram แสดงความสัมพันธ์ของประชากรบั่วในแต่ละแหล่ง โดยดูจากข้อมูลความแตกต่างของเส้นดีเอ็นเอ พบว่าบั่วจากภาคกลางและภาคเหนือจะมีความใกล้ชิดกันมากกว่าบั่วจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

อย่างไรก็ดี เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) ยังมีข้อจำกัดต่าง ๆ คือ ความไวในการตรวจหา (sensitivity) และสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา และการแยก electrophoresis ซึ่งอาจจะไม่แน่นอน แปรผันตามการทดลองแต่ละครั้ง หรือแต่ละห้องปฏิบัติการ ทำให้การแปลผลเป็นไปได้ยาก โดยเฉพาะเมื่อต้องการเปรียบเทียบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แต่ละ strain ในแต่ละการทดลองหรือแต่ละห้องปฏิบัติการ และ RAPD ยังให้ discriminating power ต่ำกว่าวิธี AFLP (สุรศักดิ์, 2540ก) นอกจากนี้ ถึงแม้ว่าเทคนิค RAPD จะทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก แต่ก็มีข้อเสียในเรื่องการทดลองซ้ำ บางครั้งได้ผลที่ต่างจากเดิมเนื่องจาก RAPD มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่าง ๆ จึงต้องระมัดระวังและควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ อีกทั้งแถบดีเอ็นเอที่เกิดจาก RAPD ยังแสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกตและเฮเทอโรไซโกตได้ (สุรินทร์, 2545)

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค AFLP มาใช้ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา สัตว์ (arthropods และ vertebrates) และพืช มากขึ้นเป็นลำดับ (Mueller and Wolfenbarger, 1999) ต่อมา Katiyar *et al.* (2000) ได้นำเทคนิค AFLP มาศึกษาถึงความหลายหลายทางชีวภาพของแมลงบั่ว สามารถแบ่งความสัมพันธ์ของแมลงบั่วออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่งประกอบด้วย ประชากรจากประเทศจีน 2 กลุ่มประชากร และประชากรจากสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวและอินเดีย ประเทศละ 1 กลุ่มประชากร กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยประชากรจากประเทศอินเดีย 11 กลุ่มประชากร และประชากรจากประเทศเนปาลและศรีลังกา ประเทศละ 1 กลุ่มประชากร AFLP ยังสามารถบอกถึงการเกิด biotypeใหม่ คือ biotype 3M ที่เกิดจากการ mutation ของ biotype 3 จากประเทศอินเดีย นอกจากนี้ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ AFLP ยังสามารถบอก sexual dimorphism ของแมลงบั่วตัวเต็มวัย และแมลงบั่วที่ถูกเบียนจากแตนเบียน *Platygaster oryzae* ได้ แสดงให้เห็นว่า AFLP เป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูง น่าเชื่อถือ รวมทั้งสามารถนำไปใช้ศึกษาสิ่งมีชีวิตที่มีความผันแปรสูงได้ทั้งภายในและระหว่างสปีชีส์ มีความผิดพลาดน้อย เมื่อทำการทดลองซ้ำจะพบว่ามีความคลาดเคลื่อนเนื่องจาก mispriming และ scorings error น้อยกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองซ้ำใน 8 ห้องปฏิบัติการในประเทศแถบยุโรป พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันเพียง 1 แถบ จากทั้งหมด 172 แถบ ดังนั้น AFLP marker จึงเป็นเทคนิคที่มีความผิดพลาดเนื่องจากการทดลองคนละสถานที่น้อยกว่า 0.6 เปอร์เซ็นต์ (Mueller and Wolfenbarger, 1999)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved