บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

มะม่วง จัดอยู่ในวงศ์ Anacardiaceae ชื่อสามัญ Mango Tree มีจำนวนโครโมโซม 2n = 40 เป็นวงศ์ที่เป็นไม้ต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ สูง 10 - 40 เมตร ใบเป็นแบบใบเดี่ยว ไม่ผลัดใบ รูปขอบขนานแกมรูปหอก ขอบใบเรียบ ฐานใบมน ปลายใบแหลม เนื้อใบหนาเขียวเป็นมัน เรือนยอดเป็นพุ่มกลม ลำต้นเปลาตรง เปลือกสีเทาหรือสีน้ำตาล ค่อนข้างเรียบ ดอก เป็นช่อแบบแยกแขนงรวมกันเป็นช่อใหญ่ ตามปลายกิ่งช่อจะตั้งขึ้น และมีขนประปราย ดอกย่อยมี 2 ประเภท คือ ดอกเพศผู้ และดอกสมบูรณ์เพศ กลีบดอกมี 5 กลีบ ดอกออกช่วงเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ ผลเป็นแบบผลเมล็ดเดียวแข็ง ลูกดิบสีเขียว เมื่อสุกเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือเหลืองส้ม มีเมล็ดภายใน 1 เมล็ด

มะม่วงที่ปลูกกันอยู่ในปัจจุบันถูกแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ตามลักษณะถิ่นกำเนิดและการกระจายพันธุ์ คือ

1. มะม่วงกลุ่มอินเดีย เป็นมะม่วงที่มีถิ่นกำเนิดทางตอนเหนือของประเทศอินเดีย ปากีสถานและมีการปลูกมากในรัฐฟลอริดา สหรัฐอเมริกา มะม่วงกลุ่มนี้มีลักษณะเด่น คือ เมล็ดที่เพาะให้ต้นกล้า 1 ต้นต่อเมล็ด ต้นกล้านั้นจะกลายพันธุ์ไม่ตรงกับต้นแม่ เพราะเป็นต้นกล้าที่เกิดจากการปฏิสนธิ (zygotic หรือ gametic seedling) เท่านั้น ผลของมะม่วงในกลุ่มนี้มีสีสันสะดุดตา เช่น มีผิวสีแดง สีม่วงส้ม มีกลิ่นขี้ไต้แรงและต้องการช่วงแล้งก่อนออกดอกประมาณ 4 เดือน

2. มะม่วงกลุ่มอินโดจีน เป็นมะม่วงของประเทศแถบอินโดจีนและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย ฯลฯ เมื่อนำเมล็ดมาเพาะจะให้ต้นกล้ามากกว่า 1 ต้นต่อเมล็ด คือ ต้นกล้าที่เกิดจากการปฏิสนธิ และต้นกล้าที่เกิดจากนิวเซลลัส (nucellar seedling) ต้นกล้าที่ได้ส่วนมากจะตรงกับพันธุ์เดิม แต่อาจมีการกลายพันธุ์บ้างในบางต้น มะม่วงในกลุ่มนี้มีผลสีเขียวหรือสีเหลือง เนื้อผลมีกลิ่นไม่แรง มีช่วงพักตัวก่อนออกดอกสั้นกว่ามะม่วงอินเดีย

ความหลากหลายทางพันธุกรรมในต้นที่ได้จากเมล็ด เป็นโอกาสที่สามารถใช้เป็นวิธีการคัดเลือกในการปรับปรุงพันธุ์ได้ หลังจากมีการขยายพันธุ์เชิงการค้าแบบไม่อาศัยเพศ เช่น การต่อกิ่งจากต้นใดต้นหนึ่งที่มีลักษณะดีออกมาจำนวนมาก เรียกกิ่งพันธุ์ทั้งหมดว่าเป็นสายต้นเดียวกัน

มะม่วงสามารถเจริญเติบโตได้ในความสูงตั้งแต่ระดับน้ำทะเล จนถึงความสูงมากกว่า 1,250 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ความสูงที่เหมาะสำหรับการปลูกเป็นการค้า ควรอยู่ในความสูงไม่เกิน 600 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล ถ้าเกินกว่านี้ขึ้นไป การติดผลจะไม่ดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเป็นมาของมะม่วงในประเทศไทยคล้ายกับแหล่งอื่นของโลก คือ มีการขยายพันธุ์ด้วยวิธีเพาะเมล็ด โดยเฉพาะจากต้นที่มีลักษณะดี เช่น รสหวาน มัน เมื่อระยะเวลาผ่านไปจึงเกิดมีพันธุ์มะม่วงเพิ่มเติมมากขึ้น ปัจจุบันนิยมขยายพันธุ์ด้วยวิธีการต่อกิ่ง ซึ่งทำให้ได้ต้นพันธุ์ที่เหมือนกับต้นแม่ มะม่วงเป็นพืชที่ปลูกเพื่อรับประทานผล และผลที่ได้นั้น สามารถรับประทานได้ทั้งดิบและสุก มะม่วงสามารถปลูก และผลิดอกออกผลได้ดีในพื้นที่ทุกจังหวัด และทุกภาคของประเทศ แต่ให้ผลแตกต่างกันไปตามสภาพของท้องที่ มะม่วงหลายพันธุ์ยังเป็นผลไม้ที่ตลาดต่างประเทศต้องการอีกด้วย

การแบ่งมะม่วงเป็นกลุ่มตามลักษณะการใช้ประโยชน์ คือ

(1) **มะม่วงสำหรับรับประทานผลดิบ** เช่น พิมเสนมัน แรด เขียวเสวย มันหนองแซง ฟ้าลั่น เป็นต้น

(2) **มะม่วงสำหรับรับประทานผลสุก** เช่น อกร่อง น้ำดอกไม้ หนังกลางวัน ทองดำ เป็นต้น

(3) **มะม่วงที่ปลูกเพื่ออุตสาหกรรมการแปรรูปผลไม้**

- มะม่วงสำหรับดอง เช่น มะม่วงแก้ว เป็นต้น
- มะม่วงสำหรับบรรจุกระป๋อง เช่น ทำน้ำคั้น มะม่วงแช่อิ่ม เช่น มะม่วงสามปี เป็นต้น

มะม่วงเขียวมรกต ชื่อวิทยาศาสตร์ *Mangifera indica* L. cv. Kiew Morakot (กรมวิชาการเกษตร, 2547) เป็นพันธุ์ที่เกิดจากการกลายพันธุ์มาจากพันธุ์แก้ว และพันธุ์สามปีในตำบลเหล่ายาว ของอำเภอบ้านโฮ่ง จ. ลำพูน จัดเป็นพันธุ์หนัก สามารถเก็บเกี่ยวได้ประมาณเดือนกรกฎาคม มีเนื้อแน่นเหมาะแก่การแปรรูปได้ดีและสามารถรับประทานสุกได้ รสชาติดี เนื้อละเอียด มีสีเหลืองเข้ม กลิ่นหอม (สุรินทร์, 2549) ใบป้อมโคนใบ ปลายใบเรียวแหลม ฐานใบแหลม ขอบใบเป็นคลื่น เปลือกลำต้นเรียบ ไม่มีการเลื้อยของกิ่ง (กรมวิชาการเกษตร, 2547) เริ่มแทงช่อดอกตั้งแต่กลางเดือนธันวาคม ถึง มกราคม ก้านช่อดอกยาว ดอกสีขาวครีม มีกลิ่นหอม อัตราดอกสมบูรณ์เพศสูง และมีการออกดอกทะวาย (นิรนาม, 2549)

มะม่วงเขียวมรกต เป็นมะม่วงบ้านชนิดหนึ่งมีการปลูกมากในเขต อำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน ปี พ.ศ. 2496 นาง นาง ใจมะสิทธิ์ ชาวบ้านตำบลเหล่ายาว เป็นผู้นำมะม่วงเขียวมรกตมาปลูกเป็นครั้งแรก ต่อมาในปี พ.ศ. 2526 นายผัน จอมธัญ ได้ขอยอดมะม่วงพันธุ์นี้ไปเสียบกับต้นมะม่วงตลับนาคที่ปลูกไว้ ซึ่งเป็นคนที่นำพันธุ์มาขยายเป็นคนแรก และได้นำผลผลิตออกสู่ตลาดในเวลาต่อมา (กลุ่มผู้ปลูกมะม่วงเขียวมรกต อ. บ้านโฮ่ง, 2547) ซึ่งเป็นที่นิยมปลูกมากเนื่องจากมีลักษณะที่ดี คือ มีการแทงช่อดอกพร้อมกับมะม่วงบ้านทั่วๆ ไป มีช่อดอกใหญ่ ดอกสีขาว ให้ผลดก ทนโรค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และแมลง ผลสดมีเนื้อกรอบ น้ำหนักดีมาก ผลสุกรสหวาน หอม ผลผลิตที่เก็บเกี่ยวแล้วสามารถอยู่ได้นานนับเดือนโดยไม่เหี่ยวเฉา (กลุ่มผู้ปลูกมะม่วงเขียวมรกต อ. บ้านโฮ่ง, 2547)

ต่อมานักวิชาการเกษตรจากสำนักงานเกษตรบ้านโฮ่งได้ตั้งชื่อพันธุ์เพื่อเป็นเกียรติแก่อำเภอบ้านโฮ่งและเป็นการเฉลิมพระเกียรติเนื่องในวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงมีพระชนมายุครบ 65 พรรษา จึงตั้งชื่อใหม่ว่า มะม่วงพันธุ์บ้านโฮ่ง 65 (นิลปัทม์, 2538) และมีการขยายพื้นที่การปลูกมะม่วงเขียวมรกตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อย่างต่อเนื่อง เพราะมะม่วงเขียวมรกตสามารถยืดอายุการเก็บเกี่ยวออกไปได้อีก 2 เดือน โดยออกดอกช่วงระยะเวลาเดียวกับมะม่วงพันธุ์อื่นคือช่วงเดือนมกราคม แต่จะแก่ช้ากว่า เป็นผลให้สามารถเก็บผลผลิตขายได้ในช่วงเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม เป็นช่วงที่มะม่วงในท้องตลาดน้อย ทำให้ขายได้ราคาดี (แม่โจ้ 54, 2546) ผลอ่อนและใบของมะม่วงพันธุ์นี้ยังมีกลิ่นฉุน จึงไม่มีแมลงมารบกวนใบและผิวของมะม่วง นอกจากนี้มะม่วงเขียวมรกตยังมีขั้วผลเหนียว ปัญหาการร่วงจากลมพายุจึงมีน้อย ผลดก เมื่อเริ่มแก่เนื้อมีลักษณะแข็งกรอบ ผลสุกรสหวานเนื้อไม่เละ (นิลปัทม์, 2538)

มะม่วงเขียวมรกตเป็นมะม่วงที่ราคาดี ผลผลิตเมื่อปี พ.ศ. 2535 ของนายผัน จอมธัญ ขายที่สวนราคากิโลกรัมละ 24-25 บาท (นิลปัทม์, 2538) ปี พ.ศ. 2545 นายอดุลย์ พูนสุขสันติ ขายได้ราคาสูงสุด 20 บาทต่อกิโลกรัม ต่ำสุด 10 บาทต่อกิโลกรัม (แม่โจ้ 54, 2546) ซึ่งเป็นราคาที่สูงพอสมควร เพราะต้นทุนการผลิตต่ำเมื่อเทียบกับการทำมะม่วงนอกฤดู การผลิตมะม่วงเพื่อบริโภคสดให้มีมูลค่าสูงควรเป็นมะม่วงล่าฤดู ที่มีเป้าหมายการเก็บเกี่ยวช้ากว่าฤดูการเก็บเกี่ยวมะม่วงปกติของประเทศไทย (ตารางที่ 1) ซึ่งจะมีราคาที่สวนเพิ่มสูงขึ้นไปเป็นลำดับ (ธวัชชัย และคณะ, 2545)

ตารางที่ 1 ฤดูการเก็บเกี่ยวมะม่วงของประเทศไทย

ภาค	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.
กลางตอนล่าง		■	■			
กลาง		■	■			
ตะวันออก			■	■		
กลางตอนบน			■	■		
อีสานตอนล่าง			■	■		
อีสานตอนบน			■	■		
เหนือตอนบน				■	■	

ที่มา: ธวัชชัย และคณะ, 2545

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่องหมายที่ใช้ในการบ่งบอกความแตกต่างระดับของประชากร มี 2 ประเภท คือ

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker)

เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาเป็นเครื่องหมายที่ใช้เปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยา หรือทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต เป็นเครื่องหมายที่มองเห็นได้ทันที เช่น ลักษณะสีตาหรือสีผมในมนุษย์ ลักษณะสีกลีบดอกของดอกไม้ เป็นต้น เครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) ชนิดนี้จัดว่าเป็นเครื่องหมายที่มีความต้องการในวงการปรับปรุงพันธุ์พืช (อรรัตน์, 2548) เพราะถ้าเป็นเครื่องหมายที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ผลผลิตสูง หรือต้านทานโรคและแมลง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกได้ และข้อได้เปรียบของเครื่องหมายชนิดนี้ คือ ไม่จำเป็นต้องใช้วิธีใดมาตรวจสอบ เพราะสามารถมองเห็นได้ด้วยตา แต่เครื่องหมายชนิดนี้มีข้อจำกัดคือ ลักษณะที่นำมาใช้เปรียบเทียบได้มีจำนวนน้อย และที่สำคัญคือสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลักษณะภายนอก เช่น ความสูงต้น ผลผลิต หรือสีดอก ได้รับผลกระทบโดยตรงจากความอุดมสมบูรณ์ของดินหรือปุ๋ย การตรวจสอบจึงอาจมีความคลาดเคลื่อน นอกจากนี้ลักษณะบางอย่างที่มีการแสดงออกในบางระยะการเจริญเติบโตเท่านั้น เช่น ลักษณะสีดอก มีการแสดงออกในระยะที่ต้นพืชมีดอกเท่านั้น จึงเป็นข้อจำกัดเรื่องระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจสอบ แต่การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นอันดับแรกเพราะสามารถแสดงความหมายได้ทุกโอกาส สะดวกและรวดเร็ว หากใช้ลักษณะทางสัณฐานควบคู่กับความรู้ด้านอื่นเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น หรือแก้ปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ทำให้การจัดจำแนกพืชประสบผลสำเร็จมากขึ้น

ลักษณะที่นิยมใช้เป็นเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยามีหลายอย่าง ผู้ทำการศึกษาจึงจำเป็นต้องศึกษาและเข้าใจลักษณะโครงสร้างของพืช และควรมีความรู้พอที่จะเปรียบเทียบความแตกต่างและความคล้ายคลึงกันของลักษณะต่างๆ (เกศิณี, 2546) โดยลักษณะที่นิยมใช้เป็นเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา ได้แก่

สัณฐานวิทยาทั่วไป หมายถึง โครงสร้างของพืชโดยรวม โดยไม้ผลส่วนใหญ่เป็นพืชบนดิน และสร้างอาหารเองได้ ไม้ผลส่วนน้อยเป็นพืชน้ำหรือพืชทนแล้ง

นิสัยการเจริญเติบโตของพืช หมายถึง พฤติกรรมในการดำรงชีพและสืบพันธุ์ของชีพตลอดชีพจักร แบ่งพืชตามนิสัยการเจริญเติบโตได้ 4 แบบ คือ

- พืชล้มลุก (herb; herbaceous) คือพืชที่มีลำต้นอ่อน ไม่มีเนื้อไม้ หรือมีเนื้อไม้น้อยมาก เมื่อครบฤดูปลูกแล้วลำต้นจะตาย และไม่ทิ้งซาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ไม้พุ่ม (shrub) คือพืชที่มีเนื้อไม้ ลำต้นมีหลายอัน แต่ไม่มีลำต้นประธาน ลำต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง มักสูงไม่เกิน 3-4 เมตร

- ไม้ยืนต้น (tree) คือพืชที่ลำต้นมีเนื้อไม้ ลำต้นประธานมีอันเดียว และมีขนาดใหญ่

- ไม้เลื้อย (climber; lianes) คือ พืชที่มีลำต้นอ่อนหรือมีเนื้อไม้ก็ได้ ลำต้นมีลักษณะเรียวยาว และมักเกาะพันกับสิ่งอื่นเสมอ ไม้เลื้อยที่ขึ้นบนพืชอื่นโดยมีหนามที่ผิวของลำต้น ช่วยพยุงให้ลำต้นติดกับพืชอื่น เรียกว่า ไม้พาดเลื้อย (scramble) พบมากในป่าน้ำฝนเขตร้อนซึ่งมีพืชหนาแน่น เช่น หวายขม (เกศิณี , 2546)

ราก เป็นส่วนของพืชที่เจริญเติบโตอยู่ใต้ผิวดิน แบ่งออกตามกำเนิดและรูปร่างลักษณะได้เป็น 3 ชนิด คือ รากแก้ว รากฝอย และรากพิเศษ

ลำต้น เป็นส่วนสำคัญของแกนหลักของพืช ลำต้นเจริญมาจากยอดอ่อน (plumule) ลำต้นมีรยางค์ที่เป็นกิ่งก้าน ใบ ดอก และผล

ตา เป็นส่วนของพืชที่อยู่ปลายยอดของกิ่งก้าน หรือที่ซอกของใบบนลำต้น มีลักษณะเป็นกลุ่มของใบอ่อนหรือดอกอ่อนขนาดเล็กมาก ที่เรียงซ้อนกันแน่น ตาอาจมีเกล็ดหุ้ม (scaly bud; covered bud) หรือตาเปลือย (naked bud) ทำหน้าที่เป็นส่วนที่จะเจริญเติบโตเป็นกิ่งก้าน ใบ หรือดอกของพืช ตาแบ่งตามลักษณะโครงสร้างที่อยู่ภายในได้ 3 ประเภท คือ ตาใบ ตาดอก และตาผสม โครงสร้างของตามักใช้ในการจำแนกไม้ยืนต้นในเขตหนาว

ใบ เป็นส่วนของพืชที่เจริญเติบโตออกมาจากตาบนข้อของลำต้น นับเป็นรยางค์ที่สำคัญและปรากฏเด่นชัดที่สุดของพืช ทำหน้าที่สังเคราะห์แสง พืชแต่ละชนิดมีใบที่มีความแตกต่างกันในด้านส่วนประกอบของใบ การเรียงใบบนลำต้นหรือกิ่ง การประกอบตัวของใบ การเรียงเส้นใบ รูปร่างใบ ลักษณะเนื้อใบ ผิวใบ และการปรากฏของขน ลักษณะดังกล่าวของใบสามารถนำมาประกอบร่วมกับลักษณะทางสัณฐานอื่นๆ ในการจัดจำแนกได้ทั้งสิ้น

ช่อดอก เป็นกลุ่มของดอกที่เกิดบนก้านร่วมกัน ช่อดอกประกอบด้วยดอกย่อย (floret) จำนวนน้อยหรือมาก ดอกย่อยอาจเรียงตัวกันอย่างง่ายหรืออย่างซับซ้อน การศึกษาสัณฐานของดอกมักจะพิจารณาถึง ชนิดของช่อ ก้านช่อดอก ใบประดับ

ดอก เป็นส่วนยอดที่แปรรูปอย่างมาก ทำหน้าที่สืบพันธุ์ ดอกมีรยางค์ที่มีรูปร่างลักษณะพิเศษ ทำหน้าที่เฉพาะ ลักษณะที่นิยมใช้เป็นเครื่องหมายทางสัณฐานได้แก่ ฐานดอก (receptacle; thalamus) วงกลีบดอก (corolla) วงกลีบเลี้ยง (calyx) วงเกสรเพศผู้ (androecium) วงเกสรเพศเมีย (gynoecium; pistil) ชนิดตามองค์ประกอบดอก (complete and incomplete flower) ชนิดตามเพศดอก สมมาตรดอก การเรียงกลีบดอก เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผล เป็นส่วนที่เจริญและพัฒนามาจากส่วนของดอก ประกอบด้วยผนังผล (pericarp) ซึ่งพัฒนามาจากรังไข่เดิม มักมี 3 ชั้น คือ ผนังผลชั้นนอก (exocarp) ผนังผลชั้นกลาง (mesocarp) และผนังผลชั้นใน (endocarp) การแบ่งกลุ่มของผลออกตามลักษณะของดอกที่ให้กำเนิดแบ่งได้ 3 ชนิด คือ ผลเดี่ยว (simple fruit) ผลกลุ่ม (aggregate fruit) และผลรวม (multiple fruit) นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งรูปแบบของผลตามลักษณะของผนังผล รูปร่างผล ขนาดผล จำนวนช่องในผล จำนวนตะเข็บบนผล ลักษณะการแตกของผล และจำนวนเมล็ดในผล

เมล็ด เป็นโอวัมที่ได้รับการปฏิสนธิและเจริญเต็มที่แล้ว ซึ่งประกอบด้วย เปลือกหุ้มเมล็ด ชั้นอาหารสะสม (endosperm) เอ็มบริโอ (embryo) การศึกษาสัณฐานของเมล็ดมักจะพิจารณาถึงรูปร่าง ขนาด สี และลักษณะการงอกของเมล็ด

สุรินทร์ (2529) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา กายวิภาควิทยา และการเจริญเติบโตของมะเดื่อฝรั่ง (*Ficus carica*.) ในส่วนของการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการศึกษาพบว่า ลักษณะภายนอกของราก ลำต้น ใบ เมล็ดหุ้มตายอด ดอก และเมล็ด มีความคล้ายคลึงกัน แตกต่างกันบ้างในด้านขนาด ลักษณะที่แตกต่างกันมากคือผล สามารถใช้เป็นลักษณะเฉพาะในแต่ละพันธุ์ได้ ชินวัฒน์ (2541) ทำการศึกษาพันธุ์ลิ้นจี่ที่ปลูกในแปลงรวบรวมพันธุ์ของศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จำนวน 19 พันธุ์ โดยใช้การจำแนกพันธุ์ด้วยวิธีสัณฐานวิทยา จากการสังเกตและวัดค่าทางปริมาณและคุณภาพพบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ สามารถจัดทำรูปวิธานเพื่อจำแนกพันธุ์โดยใช้ลักษณะของสีใบ รูปร่างใบ ฐานใบ ปลายใบ และขอบใบ สามารถจำแนกลิ้นจี่บางพันธุ์ที่มีลักษณะเฉพาะประจำพันธุ์ได้ ปฐมา (2543) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานตามคุณสมบัติในการแปรรูป ทั้งค่าทางปริมาณ และคุณภาพของมะม่วงแก้ว ได้พบทั้งลักษณะที่มีความแปรปรวน และไม่มีความแปรปรวนในสายต้น ซึ่งลักษณะส่วนใหญ่ที่เหมาะสมในการแปรรูปมีอยู่ในประชากร แต่ไม่ได้รวมอยู่ในต้นใดต้นหนึ่ง ลักษณะสัณฐานที่ใช้ในการจำแนกได้แก่ รูปทรงต้น มุมกิ่ง เปลือกลำต้น และสีของก้านช่อดอก ซึ่งแยกสายต้นมะม่วงแก้วออกได้ 11 สายต้น และอีก 10 กลุ่ม นอกจากนี้ปราโมทย์ (2544) จำแนกสายพันธุ์สตรอเบอรี่ลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ และการศึกษาความสัมพันธ์ของพันธุ์ แม่ พ่อ และลูกผสมชั่วที่ 1 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการศึกษารูปแบบเอนไซม์ พบว่าการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาด้วยการสังเกต และการวัดค่าทางปริมาณรวมทั้งคุณภาพของโครงสร้างใบ ดอก และผล ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ชัดเจน และเมื่อใช้รูปแบบไอโซไซม์ พบว่าสามารถจำแนกลูกผสมบางหมายเลขออกจากพันธุ์แม่ พันธุ์พ่อ หรือระหว่างลูกผสมออกจากกันได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การจำแนกพันธุ์พืชโดยทั่วไปพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่ในปัจจุบันเนื่องจากมีลูกผสมเกิดขึ้นมาก ลักษณะสัณฐานที่แสดงออกมักมีความแตกต่างจากต้นพ่อแม่เล็กน้อย ทำให้เกิดความสับสน จึงได้มีการนำเทคนิคหรือวิธีการอื่นมาช่วยในการจัดจำแนกลูกผสม และ/หรือสายพันธุ์พืช ในปี 1969 Larsen พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พืชแสดงออกให้เห็นในธรรมชาติที่มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ ย่อมมีความแตกต่างกันในทางชีวเคมี แต่ความแตกต่างกันทางชีวเคมีไม่จำเป็นเสมอไปที่พืชจะมีลักษณะแตกต่างกันในทางสัณฐานวิทยา ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและรูปแบบไอโซไซม์ของพืชสกุลรองเท้านารีของไทย โดยพสุ (2546) พบว่า การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยากล้วยไม้รองเท้านารี 11 ชนิด มีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาสูงทั้งในชนิดเดียวกันและระหว่างชนิด การใช้รูปแบบแถบสีของของไอโซไซม์จากเอนไซม์ 6 ระบบ ที่แสดงรูปแบบไอโซไซม์แตกต่างกัน พบว่าสามารถจัดกลุ่มรองเท้านารี 5 ต้นจากชนิดเดียวกันออกจากชนิดอื่นได้ที่ค่าความแตกต่าง 17.5เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้แถบสีทั้งหมดของไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นมาวิเคราะห์ร่วมกัน และหากใช้เพียงแถบสีหลักมาวิเคราะห์ร่วมกัน สามารถจำแนกชนิดออกจากกันได้ที่ค่าความแตกต่างเพียง 1เปอร์เซ็นต์ แต่การวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมไม่เป็นไปในทำนองเดียวกับการจำแนกทางอนุกรมวิธาน

2. เครื่องหมายระดับโมเลกุล (molecular marker)

เครื่องหมายระดับโมเลกุล (molecular marker) เป็นเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจสอบหรือบอกตำแหน่งโมเลกุลภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ที่ใช้กันทั่วไปมี 2 ชนิดคือ โปรตีน (ในรูปไอโซไซม์) และกรดนิวคลีอิค (ในรูปของดีเอ็นเอ) ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในโมเลกุลของ ดีเอ็นเอ (สุคนทิพย์, 2546)

2.1 เครื่องหมายโปรตีน (protein marker)

การตรวจสอบโดยแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วย้อมแถบโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม ข้อดี คือสามารถตรวจได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูง แต่มีข้อจำกัด คือจำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังมี ไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน จึงต้องเลือกเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ผลที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสิ่งแวดล้อม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไอโซไซม์ หรือ ไอโซเอนไซม์ จัดเป็นตัวระบุตำแหน่งชนิด co-dominant marker ใช้ในระยะแรกของงานวิจัยเพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ การใช้เทคนิคนี้ยังพบข้อจำกัดในการตรวจสอบเพื่อจำแนกพันธุ์และลูกที่เกิดจากการผสมข้าม การศึกษาของ Gallacher และคณะในปี ค.ศ. 1995 ยังพบด้วยว่าเครื่องหมายไอโซไซม์ ไม่เป็น polymorphic และมักให้ผลแตกต่างกันในห้องปฏิบัติการที่แตกต่างกัน (Glaszmann *et al*., 1988) การแปลผลทางพันธุกรรมของข้อมูลที่ได้จากการทำไอโซไซม์ในพืชที่เป็น highly polyploid บ่อยครั้งมีความซับซ้อน จึงไม่สามารถที่จะแปลผลความผันแปรที่มีอยู่มากนี้ได้ ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการใช้ไอโซไซม์ในการตรวจสอบระหว่างพันธุ์

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

ดีเอ็นเอเป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางพันธุกรรม และเป็นตัวควบคุมกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ รวมทั้งการถ่ายทอดข้อมูลจากเซลล์หนึ่งไปเซลล์หนึ่ง การเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันทำให้เกิดความหลากหลาย และ สร้างความแตกต่างในพืชแต่ละชนิด (สุรีพร, 2545) การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ มีวัตถุประสงค์เพื่อบ่งชี้ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity)

การตรวจสอบพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบในระดับโปรตีน เนื่องจาก โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บได้นานกว่า สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบจากเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโตหรือสภาพทางสรีรวิทยาที่ต่างกันได้ โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม การตรวจสอบครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่หลากหลาย ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายทำได้อย่างกว้างขวางประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ ได้ (สุรินทร์, 2545)

สำหรับการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในรูปของดีเอ็นเอได้พัฒนาไปมาก มีการดัดแปลงเทคนิค ให้สามารถใช้ในการตรวจสอบพืช เครื่องหมายโมเลกุลที่นำมาใช้ในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์เพื่อบ่งชี้ลักษณะสำคัญ มีอยู่หลายชนิด สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ คือ single-locus markers และ multi-locus markers

(1) single-locus markers คือ เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่สามารถตรวจสอบได้ครั้งละหนึ่งตำแหน่ง และให้ผลเป็น codominant markers สามารถจำแนกความแตกต่างของจีโนไทป์ homozygous dominant, heterozygous และ homozygous recessive ออกจากกันได้ ซึ่งเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่นักปรับปรุงพันธุ์ให้ความสนใจมากกว่า dominant markers (multi-locus markers) เครื่องหมายโมเลกุลในประเภทนี้ได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

RFLP หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เนื่องจากข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตจะเก็บอยู่ในนิวเคลียสและออร์แกเนลล์บางชนิดและมีคุณสมบัติในการจำลองตัวเองอย่างถูกต้องแม่นยำไปสู่รุ่นลูกต่อๆ ไป แต่ในบางครั้งอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้น อันเนื่องมาจากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มขึ้น (duplication) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอภายในโครโมโซม หรือจากต่างโครโมโซม (transposition) ซึ่งทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

RFLP เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม ที่มีในยุคเริ่มแรกของการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ ก่อนที่เทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) จะถูกพัฒนาขึ้นมา และเมื่อเทคนิค PCR ถูกพัฒนาขึ้นมา RFLPs จึงถูกนำมาผนวกเข้ากับเทคนิค PCR รวมเรียกว่า PCR-RFLPs โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในบริเวณที่มีจุดกลายพันธุ์ตั้งอยู่ด้วยเทคนิค PCR และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตรวจสอบจุดกลายพันธุ์ดังกล่าว ปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุลนี้ยังคงมีการใช้งานกันอย่างแพร่หลาย

Microsatellites

Microsatellites คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่มีจำนวนซ้ำแตกต่างกัน ตั้งแต่ 1-4 bp เช่น A, CA, GAG หรือ CCGG เป็นต้น และมีจำนวนซ้ำกัน (repeated) ประมาณ 10-50 ครั้ง ซึ่งกระจายตัวอยู่ทั่วทั้งจีโนม โดยจำนวนซ้ำของ microsatellite ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด มีจำนวนซ้ำไม่เท่ากัน ทำให้เกิดความผันแปรในประชากร ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยการใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มี microsatellite ตั้งอยู่ ความยาวของชิ้นส่วน PCR ที่แตกต่างกัน คือ ผลสะท้อนของจำนวนซ้ำของ microsatellite ที่ไม่เท่ากัน เครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดนี้มีการนำไปใช้สร้างแผนที่จีโนมกันอย่างแพร่หลาย เพื่อใช้ในการค้นหาตำแหน่งที่ตั้งของยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญที่ต้องการศึกษา

SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)

SNPs คือ นิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่เกิดการกลายพันธุ์ หรือเปลี่ยนไป 1 ตำแหน่ง โดยทั่วไป ลำดับนิวคลิโอไทด์ในจีโนมที่ความยาวทุกๆ 1 กิโลเบส จะมีนิวคลีโอไทด์ผันแปรไป 1 ตำแหน่ง ปัจจุบันนิยมเรียกนิวคลีโอไทด์ที่ผันแปรนี้ว่า single nucleotide polymorphisms (SNPs) มากกว่าจุดกลายพันธุ์ (point mutation) และ สามารถตรวจสอบได้โดย RFLPs หรือ PCR-RFLPs หรือใช้การตรวจสอบจาก conformation ของดีเอ็นเอสายเดี่ยว ในขณะวิ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยความเร็วแตกต่างกัน เรียกวิธีการตรวจสอบนี้ว่า single stranded conformation polymorphism (SSCP) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบได้โดยตรงลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ เป็นต้น

(2) multi-locus markers คือ เครื่องหมายทางพันธุกรรม ที่สามารถตรวจสอบได้ ครั้งละหลายตำแหน่งในคราวเดียวกัน ส่วนมากให้ผลเป็น dominant markers (ปรากฏ/ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ) ได้แก่

Minisatellite / VNTR marker (Variable Number Tandem Repeat markers)

Minisatellite หรือ เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า VNTR marker คือ การศึกษารูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ จากลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่มีจำนวนซ้ำแตกต่างกัน ซึ่งมีขนาดตั้งแต่ 5-100 คู่เบส (base pair, bp) กระจายตัวอยู่ทั่วจีโนม โดยสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด มีจำนวนซ้ำของนิวคลีโอไทด์ไม่เท่ากัน สามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิค Southern hybridization คือ การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แล้วแยกขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้าย ดีเอ็นเอจากเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน และนำดีเอ็นเอตัวติดตาม (DNA probe) ที่เป็น repeated nucleotide sequence ไปจับกับ (hybridized) ดีเอ็นเอเป้าหมาย และตรวจสอบด้วย autoradiography รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏหรือไม่ปรากฏ โดยสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีรูปแบบเฉพาะตัว ซึ่งได้รับการถ่ายทอดทางพันธุกรรมมาจากพ่อและแม่ ส่วนมากวิธีการนี้ถูกนำมาใช้พิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูก หรือตรวจสอบความถูกต้องของประวัติพันธุ์ รวมถึงศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเช่นกัน

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA fragments)

RAPD คือ เครื่องหมายโมเลกุล ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ที่ใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ค่อนข้างต่ำ ซึ่งไพรเมอร์สามารถจับกับ ดีเอ็นเอได้อย่างสุ่มทั่วทั้งจีโนม และผลผลิต PCR มีจำนวนมากโดยมีขนาดความยาวแตกต่างกัน สามารถแยกขนาดได้ด้วยเจลแบบ agarose ความผันแปรของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ/ไม่ปรากฏ (dominant markers) เป็นผลสะท้อนของการมีจุดกลายพันธุ์บนสายดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ เครื่องหมายโมเลกุลของ RAPD สามารถทำได้ง่าย และมีราคาถูก ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับของดีเอ็นเอมาก่อน แต่มีข้อจำกัดคือให้ผลลัพธ์ไม่สม่ำเสมอ และยากที่จะตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการปนเปื้อนได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

RAPD เป็นการพัฒนาเทคนิค PCR ในปี 1990 โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (arbitrary primer) ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสที่บริเวณใดเลย ในกรณีที่จีโนมมีการเรียงตัวของเบสซึ่งเป็นเบสคู่สมกับไพรเมอร์ หลายบริเวณที่อยู่ใกล้กันมาก หรือมีทิศทางเดียวกัน แม้จะมีไพรเมอร์เข้าไปจับ ก็จะไม่เกิดผลผลิตของ PCR แต่ถ้าไพรเมอร์เข้าไปจับกับสายดีเอ็นเอในบริเวณที่ใกล้กัน และมีทิศทางเข้าหากัน จะทำให้เกิดผลผลิตของ PCR (Weising *et al.,* 1995)

ในส่วนของไม้ผลไทย สมจิต และคณะ (2550) ได้นำเทคนิค RAPD มาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์กล้วยน้ำว้า โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 22 ชนิด ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยน้ำว้าจำนวน 19 สายพันธุ์ โดยเทคนิค RAPD พบว่า มีไพรเมอร์ 11 ชนิดเท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยน้ำว้าทั้ง 19 สายพันธุ์ได้ โดยให้แถบดีเอ็นเอที่สามารถตรวจสอบได้ 151 แถบ มีขนาดโดยประมาณตั้งแต่ 210 ถึง 2443 bp โดยมี polymorphic bands 114 แถบ นอกจากนี้ยังพบว่ามีไพรเมอร์ 5 ชนิด ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่เฉพาะในกล้วยบางสายพันธุ์ คือ ไพรเมอร์ OPA13 ให้แถบดีเอ็นเอที่เฉพาะขนาด 1404 และ 907 bp ในกล้วยน้ำว้ามุกดาหาร และไพรเมอร์ OPC11, OPC15, OPD03 และ OPD13 ให้แถบดีเอ็นเอที่เฉพาะขนาด 1250, 473, 967 และ 742 bp ในกล้วยน้ำว้านครศรีธรรมราช น้ำว้าไส้เหลือง น้ำว้าอ่องชัยภูมิ และน้ำว้าสุรินทร์ ตามลำดับ

จุลภาค และเฉลิมพล (ไม่ระบุปี) พบว่า การจำแนกพันธุ์ มะม่วงโดยอาศัยสัณฐานวิทยา ทำได้ในระดับที่มีความแตกต่างกันมากในลักษณะของผล ใบ สี กลิ่น ฯลฯ แต่ในกรณีที่เป็น ความแตกต่างเล็กน้อย วิธีการดังกล่าวไม่สามารถจะใช้ได้ การใช้ดีเอ็นเอซึ่งเป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในการจำแนกพันธุ์ เป็นวิธีการซึ่งมีความแม่นยำสูง ไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมและข้อจำกัดอื่นๆ ที่พบในวิธีทางสัณฐานวิทยา และไอโซไซม์ วิธีการจำแนกพันธุ์มะม่วงที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ คือ RAPD เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก และสามารถทำได้ในห้องทดลองซึ่งมีอุปกรณ์ไม่มากนัก มีความเชื่อถือได้สูง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms)

เทคนิค AFLP เป็นการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลแบบหลายตำแหน่ง (multi-locus markers) ในคราวเดียวกัน โดยพื้นฐานของ AFLP คือ การตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR ดังนั้นจึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิค RFLP, RAPD และประสิทธิภาพของ PCR เข้าด้วยกัน เทคนิค AFLP พัฒนาขึ้นโดย Zabeau และ Vos นักวิจัยของบริษัท Keygene N.V. ประเทศเนเธอร์แลนด์ จดสิทธิบัตรในปี ค.ศ. 1993

เทคนิค AFLP อาศัยหลักการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด (มีตำแหน่งจดจำ 4 และ 6 bp) การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มาจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำได้โดยการเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ โดย adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่ชิ้นสั้นๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียว (sticky end) และมีลำดับนิวคลิโอไทด์ที่เป็นคู่สมกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ดังนั้นจึงสามารถเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอที่ตัดไว้โดยใช้ปลายเหนียว (sticky end ligation) และจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับกับไพรเมอร์ในการทำ PCR ต่อไปด้วย วิธีการดังกล่าวนี้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะก็สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นได้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสตรงกับส่วนของ adapter รวมกับส่วนของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มในคราวเดียวกันมีมาก และไม่สามารถแยกจากกัน หรือตรวจสอบโดยวิธีทั่วไป เช่น การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังนั้นการสังเคราะห์ไพรเมอร์ในการทำ AFLP จึงเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกเข้าที่ปลาย 3' ต่อจากเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะ ของเอนไซม์ เพื่อให้เลือกจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ต่อจากบริเวณตัดจำเพาะสอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์เท่านั้น ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอเพียงบางส่วน และสามารถกำหนดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไป ถ้าดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหรือจีโนมที่ศึกษา มีส่วนประกอบของเบสทั้ง 4 ชนิด (G, A, T, C) ในสัดส่วนที่เท่ากัน การเพิ่มเบสเข้าที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์ที่คัดเลือก 1 เบสจะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ช่วยเพิ่มปริมาณเหลือเพียง 1 ใน 4 ของทั้งหมด ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 2 เบส จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ จะลดลงเหลือ $(1/4)^2$ หรือ 1 ใน 16 ของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ทั้งหมดเท่านั้น ดังนั้นจึงสามารถควบคุมให้เกิดปริมาณชิ้นดีเอ็นเอลงเหลือ $(1/4)^n$ ของทั้งหมด (n คือจำนวนเบสสำหรับคัดเลือกที่เพิ่มขึ้น) ในทางปฏิบัติ ต้องการให้มีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในช่วง 50-100 แถบ ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ในสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดเล็ก จะใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกจำนวนน้อย เพราะจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีจำนวนน้อย ในขณะที่การตรวจสอบสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใหญ่ หรือมีความซับซ้อนมากต้องใช้ ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพื่อคัดเลือกจำนวนมากขึ้น เพื่อปรับจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณ ให้มีจำนวนพอเหมาะ รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์คู่หนึ่งๆ เรียกว่า ลายพิมพ์เอเอฟแอลพี (AFLP fingerprint) ดังนั้นเทคนิค AFLP จึงเป็นการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอวิธีหนึ่ง แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่าง บ่งบอกถึงความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ใช้ศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตได้เช่นเดียวกับเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอื่น

ขั้นตอนการทำ AFLP

แม้ว่า AFLP เป็นเทคนิคแบบ PCR แต่ไม่สามารถใช้ไพรเมอร์ ของ AFLP ทำ PCR ได้โดยตรงกับดีเอ็นเอที่ได้สกัดมา จึงจำเป็นต้องดัดแปลงดีเอ็นเอก่อน โดยวิธีการดังนี้

การเตรียมดีเอ็นเอ คือ การนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ 2 ชนิด นิยมใช้เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 4^6 (=4096) คู่เบส เรียกว่า rare cutter ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 4^4 (=256) คู่เบส เรียกว่า frequent cutter แล้วเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ adapter ของเอนไซม์ทั้งสอง เพื่อให้เป็นที่จับของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ในขั้นต่อไป

การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะอาจใช้ชนิดที่เป็น rare cutter ทั้ง 2 เอนไซม์ แต่จะตรวจพบชิ้นดีเอ็นเอจำนวนน้อย เนื่องจากเมื่อนำไปเพิ่มปริมาณโดยการทำ PCR จะได้ผลผลิตเฉพาะชิ้นที่มีขนาดเล็กเท่านั้น จึงไม่ค่อยนิยม ส่วนการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด จะทำให้ได้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอพอเหมาะ และมีข้อดีอีกหลายประการ ดังนี้

1. เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น frequent cutter จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นขนาดเล็ก ซึ่งจะเพิ่มปริมาณได้ดีในการทำ PCR และอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับแยกด้วยวิธี denaturing polyacrylamide gel electrophoresis

2. เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น rare cutter มีตำแหน่งที่จะตัดดีเอ็นเอได้น้อย จึงช่วยลดจำนวน ชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจากการทำ PCR ลง เนื่องจากชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด หรือ เกือบทั้งหมด เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่ปลายด้านหนึ่งเป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์ที่เป็น rare cutter และอีกด้านหนึ่งเป็น frequent cutter ส่วนชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายทั้ง 2 ด้านเป็นตำแหน่งของเอนไซม์แบบ frequent cutter เมื่อเชื่อมต่อกับ adapter แล้วจะเป็นลำดับเบสซ้ำ (inverted repeat) เมื่อทำให้เกิดการเสียสภาพเป็นสายเดี่ยวจะสามารถจับกันเองโดยเบสคู่สม เกิดเป็นโครงสร้างแบบ stem – loop ทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถจับได้ ส่วนชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ที่เป็น rare cutter ทั้งสองด้านจะมีขนาดใหญ่มาก จึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในสภาวะที่ใช้ทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การทำ PCR จะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดเช่นเดียวกัน ทำให้สามารถเลือกติดฉลากที่ไพรเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่ง ดังนั้นจึงมีดีเอ็นเอที่ติดฉลากเพียงสายเดียว เมื่อนำไปแยกขนาดโดย denaturing polyacrylamide gel จะตรวจพบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวทำให้วิเคราะห์ง่ายขึ้น

4. การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ช่วยให้การปรับจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณมีความยืดหยุ่นดี โดยปรับจำนวนเบสเพื่อคัดเลือกที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน

5. การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด สามารถทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้จำนวนมาก โดยใช้คู่ผสมของไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดจำนวนน้อย เช่น มีไพรเมอร์ชนิดละ 5 แบบ จากการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก สามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ถึง 25 แบบ เป็นต้น

เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ได้มีหลายชนิด เช่น *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I, *Bgl*II, *Xba*I (6-cutter) และ *Sse* 8387 (8-cutter) ร่วมกับ *Mse*I หรือ *Taq*I ซึ่งเป็น 4-cutter เอนไซม์ *Mse*I มีตำแหน่งจดจำเป็น 5′-TTAA-3′ และ *Taq*I มีตำแหน่งจดจำเป็น 5′-TCGA-3′)

ดีเอ็นเอของยูคาริโอตส่วนใหญ่จะมีองค์ประกอบเป็นเบส A และ T จำนวนมาก (AT rich) เอนไซม์ *Mse*I จึงตัดดีเอ็นเอได้ขนาดเล็กกว่าเอนไซม์ *Taq*I นอกจากนั้นแล้วยังพบว่าการใช้เอนไซม์ *Taq*I ทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มักไม่ค่อยสม่ำเสมอ จะปรากฏเป็นแถบขนาดใหญ่ซึ่งอยู่ส่วนบนของเจล ดังนั้นจึงนิยมใช้เอนไซม์ *Mse*I มากกว่า เพราะตัดดีเอ็นเอได้พอเหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR และ การแยกโดยใช้ denaturing polyacrylamide gel ส่วนเอนไซม์ที่เป็น rare cutter ใช้ได้ทั่วไป แต่ที่ใช้เอนไซม์ *Eco*RI กันมากเนื่องจากมีราคาถูก และการตัดดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพดี โดยมีโอกาสพบการตัดไม่สมบูรณ์ได้น้อย

การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter สามารถทำพร้อมกันได้ เนื่องจาก adapter ที่สังเคราะห์ขึ้นมานั้น ออกแบบให้มีปลายที่เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวมีลำดับเบสเป็นคู่สมกับปลายเหนียวของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ แต่เบสคู่ที่อยู่ในตำแหน่งถัดมา เป็นเบสคนละชนิดกับเบสที่บริเวณจดจำของเอนไซม์ ดังนั้นเมื่อ adapter เข้าไปต่อกับชิ้นดีเอ็นเอแล้ว เอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นจะไม่สามารถตัดได้อีก แต่ถ้าชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเชื่อมกลับไปใหม่จะสามารถตัดได้อีก การเชื่อมต่อ adapter โดยมีเอนไซม์ตัดจำเพาะอยู่ด้วยจึงไม่มีผลเสียใดๆ และยังช่วยให้การตัดดีเอ็นเอเกิดได้สมบูรณ์อีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ คือ การทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสทางปลาย 5′ เหมือนกับลำดับเบสของ adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3′ อีกส่วนหนึ่ง เพื่อการคัดเลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบ ส่วนของไพรเมอร์ที่เหมือนกับ adapter และบริเวณจดจำของเอนไซม์ เรียกว่า common part ส่วนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3′ เรียกว่า selective part จำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3′ จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณลง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ต้องมีลำดับเบสที่อยู่ต่อกับตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไป เช่นถ้าใช้ไพรเมอร์ CCA/CCA ในการทำ PCR จะเห็นว่าเฉพาะชิ้นที่มีลำดับเบส ณ ตำแหน่งที่ตรงกับ selective base เป็น GGT เท่านั้นที่จะถูกเพิ่มปริมาณขึ้นมา เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกมากขึ้นจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจะลดลงประมาณ 4 เท่า ต่อทุกๆ เบสที่เพิ่มขึ้น เช่น การใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือก 1 เบสในแต่ละด้าน จะลดชิ้นส่วนลงได้ 16 ส่วน ซึ่งถ้าเริ่มต้นชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 2,000,000 ชิ้น จะมีเพียง 2,000,000 X 1/16 = 125,000 ชิ้นที่ถูกเพิ่มปริมาณ เมื่อทำ PCR ซ้ำอีกครั้งโดยการใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือก 2 เบสในแต่ละด้าน และใช้ผลผลิตที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือก 1 เบสในแต่ละด้านเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จะลดชิ้นส่วนลงได้ 256 ส่วน ทำให้มีเพียง 125,000 X 1/256 = 488 ชิ้นที่ถูกเพิ่มปริมาณ ถ้าใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือก 3 เบสในแต่ละด้าน ทำ PCR โดยใช้ผลผลิตที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือก 1 เบสในแต่ละด้านเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จะลดชิ้นส่วนลงได้ 4096 ส่วน จะมีเพียง 125,000 X 1/4096 = 30 ชิ้นที่ถูกเพิ่มปริมาณ ในการศึกษาจีโนมขนาดเล็กหรือโคลนที่อยู่ในพลาสมิด คอสมิด หรือ BAC (Bacterial artificial chromosome) ไม่จำเป็นต้องเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก เนื่องจากจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะมีจำนวนน้อยอยู่แล้ว สิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดไม่ใหญ่มาก เช่น แบคทีเรียหรือเชื้อรา จะเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 1-2 เบส ส่วนพวกที่มีจีโนมขนาดใหญ่จะเพิ่มเบสมากกว่า 2 เบส ที่ไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิด ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกที่ปลาย 3′ จะเรียกว่าเป็นไพรเมอร์ +1, +2, +3 หรือ +4 เช่น ไพรเมอร์ทางปลาย *Eco*RI adapter จะเรียกว่า *Eco*RI+1, *Eco*RI+2, *Eco*RI+3 หรือ *Eco*RI+4 ตามลำดับ

การทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3’ มากกว่า 2 เบส จะทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรกจะเรียกว่า preselective amplification และการทำ PCR ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification

การทำปฏิกิริยา preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบให้มากขึ้นและช่วยให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกต้อง มีการทดลองเพิ่มปริมาณเพียงครั้งเดียวโดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก +1, +2, +3 หรือ +4 เบส พบว่าจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ลดลงเป็นลำดับ การใช้ไพรเมอร์แบบ +1, +2 และ +3 พบว่าประสิทธิภาพในการคัดเลือก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ถูกต้อง แต่ไพรเมอร์ +4 ให้ผลไม่สอดคล้องกัน สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอจำนวนมากที่ไม่ตรงกับแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร +1, +2 และ +3 แสดงว่าเกิดการจับคู่ของเบสที่ไม่จำเพาะ (mismatch) ในตำแหน่งอยู่ห่างจากปลาย 3′ 3 เบสหรือเบสคัดเลือกตัวแรกที่อยู่ติดกับตำแหน่งตัดจำเพาะนั่นเอง ต่อมาพบว่า การเพิ่มปริมาณครั้งเดียวโดยใช้เบสคัดเลือก 3 เบส ก็ทำให้เกิดการจับคู่ที่ไม่จำเพาะของเบสที่เพิ่มขึ้นตัวแรกสุดได้เช่นเดียวกัน แต่เกิดในความถี่ต่ำ ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกตั้งแต่ 3 เบสขึ้นไป จึงต้องใช้วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 ครั้ง โดยครั้งแรกใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกเพียง 1-2 เบส และครั้งที่ 2 จึงใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัด เลือกต่อจากไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในครั้งแรก 1-2 เบส รวมเบสที่เพิ่มเพื่อการคัดเลือก 3-4 เบสตามต้องการ

การทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็น 2 ขั้น นอกจากเป็นการประกันว่าการคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่ใช้ เป็นไปอย่างถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงสุดแล้ว ยังช่วยลด background ที่เป็นพื้นดำในลายพิมพ์ด้วย นอกจากนี้ยังอาจทำ preselective amplification โดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่มีเบสคัดเลือก (ไพรเมอร์ +0) ได้ในกรณีวิเคราะห์จีโนมขนาดเล็กที่ต้องใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกจำนวนน้อย เพื่อทำให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มมากขึ้น และสามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนขึ้น

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เมื่อนำผลผลิต PCR ไปแยกขนาดโดยการทำ อิเล็กโตรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel พบว่า แถบดีเอ็นเอที่เหมาะสม ในการแยกด้วยวิธีนี้อยู่ในช่วง 50-100 แถบ ในระยะแรกการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยติดฉลากไพรเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งด้วยสารกัมมันตรังสี หลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเสร็จแล้ว ตรวจผลโดยการทำออโตเรดิโอกราฟ (autoradiograft) หรืออาจใช้วิธีติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye) แล้วตรวจสอบด้วยเครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ (automated sequencer) จากการที่ต้องตรวจสอบผลการทำ AFLP โดยใช้สารกัมมันตรังสี หรือใช้เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ ทำให้เกิดข้อจำกัดในห้องปฏิบัติการหลายแห่ง เนื่องจากขาดประสบการณ์และระบบการปฏิบัติงานที่ใช้สารกัมมันตรังสี หรือไม่สามารถซื้อเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติที่มีราคาแพงได้ จึงมีการประยุกต์ใช้วิธีตรวจสอบ AFLP ด้วยการไฮบริไดเซชั่นด้วยโพรบ (probe) ที่ติดฉลากด้วยสารปลอดรังสี (non radioactive label) หรือ วิธีย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท (silver staining) ซึ่งให้เป็นผลที่น่าพอใจ และสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการทางดีเอ็นเอทั่วไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เทคนิคการตรวจวิเคราะห์ผลผลิต PCR ขั้นพื้นฐาน

วิธีการตรวจหาผลผลิต PCR กระทำได้หลายวิธี เทคนิคที่ใช้แบ่งออกเป็น 2 เทคนิคใหญ่ๆ คือ

1. gel electrophoresis

การตรวจดูผลผลิต PCR จากการย้อมดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide หลังจากผ่านกระบวนการอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้ว วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วที่สุดเหมาะสำหรับการตรวจสอบหาผลผลิต PCR ที่ทราบขนาดแน่นอน และได้ผลผลิต PCR เพียงชนิดเดียวหรือจำนวนน้อยชนิดที่สามารถเห็นความแตกต่างของขนาดได้ชัดเจน หากเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 500 bp นิยมใช้ 1% agarose gel เป็นเจลตรวจหา แต่หากเป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดสั้นกว่า 500 bp นิยมใช้ 2% agarose gel หรือ 5% polyacrylamide gel

2. Nucleic Acid Hybridization

วิธีการตรวจหาผลผลิต PCR ที่ต้องการในกรณีที่การดูผลจากเจล ไม่ชัดเจนหรือต้องการเพิ่มความมั่นใจ วิธีการนี้ต้องใช้ตัวติดตามที่มีเบสคู่สม (complementary) กับผลผลิต PCR และจะจับเบสคู่สมกันในสภาวะที่เหมาะสม ตัวติดตามอาจเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ แต่ต้องติดฉลากด้วยสารรังสีหรือสารปลอดรังสี ซึ่งมีการตรวจหาตัวติดตามนั้นอีกครั้ง

ความแตกต่างระหว่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำ AFLP มีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้ได้กับดีเอ็นเอใดๆ ก็ได้ ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ที่เหมาะสมได้ โดยปรับจำนวนเบสคัดเลือกที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์ที่ใช้ แม้ว่าวิธีการทำ AFLP จะค่อนข้างยุ่งยาก แต่ผลที่ได้ สามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) และสามารถเลือกคู่ผสมของไพรเมอร์ได้หลายแบบ ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยไพรเมอร์คู่หนึ่งนั้นจะเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากในเวลาเดียวกัน แบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่าง หรือ polymorphism ที่เกิดขึ้นมาจากการเปลี่ยนแปลงเบส (point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไปหรือเกิดขึ้นใหม่ หรือการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตรงส่วนที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกของไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวแล้วแต่กรณี หรืออาจเกิดจากมีชิ้นดีเอ็นเอสั้นๆ ขาดหายไป หรือสอดแทรกเข้ามาในระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ก็ได้ ผลที่เกิดขึ้นคือการมีแถบดีเอ็นเอ หรือไม่มีแถบดีเอ็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอที่ตำแหน่งนั้นๆ หรือชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเปลี่ยนไป การถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากการทำ AFLP จึงมีทั้งแบบที่แสดงข่ม (dominance) โดยปรากฏเป็นการมีแถบหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ และแบบที่แสดงลักษณะข่มร่วมกัน (codominance) โดยปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยทั่วไปจะพบเครื่องหมาย AFLP แบบที่เป็นลักษณะข่มมากกว่า

ประโยชน์ของเทคนิค AFLP

1. สามารถทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้โดยไม่จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นมาก่อน เช่น ทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสัตว์หรือพืชแปลกๆ ที่ยังไม่เคยมีใครศึกษาด้านดีเอ็นเอ และไม่สามารถใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอชนิดอื่นตรวจสอบได้ หรือทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชและสัตว์หายาก รวมทั้งพืชและสัตว์ทั่วไป

2. ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ ยืนยันสายพันธุ์ หรือยืนยันความคงตัวของพันธุกรรม เพราะการใช้เทคนิค AFLP ได้ข้อมูลมากในการทำแต่ละครั้ง เหมาะสำหรับหน่วยงานอนุรักษ์และขึ้นทะเบียนพันธุ์ เพราะลงทุนซื้อไพรเมอร์ชุดเดียวใช้ได้กับสัตว์และพืชทุกชนิด

3. ช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ เช่น ใช้เป็นเครื่องหมายช่วยในการผสมกลับ (marker assisted backcrossing) ในกรณีนี้เทคนิค AFLP จะใช้วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic distance analysis) ในการตรวจสอบ genome background ของประชากร

4. ทำแผนที่ทางพันธุกรรม ข้อมูลของ AFLP ให้ลักษณะการถ่ายทอดแบบเมนเดล สามารถนำข้อมูลที่ได้จาก AFLP ร่วมกับข้อมูลที่มีอยู่แล้วจากเครื่องหมายดีเอ็นเออื่น เพื่อที่จะวางตำแหน่งลงบนโครโมโซมในประชากรที่ใช้ทำแผนที่ ในกรณีนี้ AFLP สามารถใช้ในการหาเครื่องหมายเพิ่มเติมจากที่มีอยู่แล้วได้

5. ใช้ในการติดตามยีนที่สนใจ (gene tagging) โดยการหาความแตกต่างเฉพาะตำแหน่งของกลุ่มที่มีลักษณะแตกต่างกันสองกลุ่ม เช่น กลุ่มข้าวที่ทนทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและกลุ่มข้าวที่ไม่ทนทาน แถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างกันในกลุ่มทั้งสองน่าจะเกี่ยวข้องกับยีนที่สนใจ กรณีการปรับปรุงพันธุ์พืชจะสามารถคัดเลือกพันธุ์ได้ตั้งแต่ระยะต้นอ่อน โดยที่ไม่ต้องทำการปลูกพืชให้โตแล้วรอสังเกตผลในแปลงทดลอง จึงช่วยให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย

6. สามารถทำได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช เมื่อเปรียบเทียบกับการตรวจหาเอนไซม์หรือโปรตีนซึ่งต้องมีการแสดงออกของยีน จึงต้องเลือกชนิดของเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการศึกษา เช่น โปรตีนบางชนิดพบในส่วนดอก หรือผล จึงทำได้ในระยะที่พืชเจริญเติบโตเต็มที่เท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. เนื่องจากปริมาณดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมีเท่ากันในทุกเซลล์ จึงสามารถใช้ส่วนใดของพืชในการศึกษาก็ได้ เช่น ดอก ใบ เมล็ด และเหง้า เป็นต้น

8. ช่วยในการคัดเลือกสายพันธุ์ เนื่องจากไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม ส่วนของพืชที่ใช้ตรวจ หรือพื้นที่การเพาะปลูกมาเกี่ยวข้อง

ข้อดีของเทคนิค AFLP

เทคนิค AFLP มีคุณสมบัติที่ดีอยู่หลายประการด้วยกัน เช่น

1. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLP ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอมาก่อน เช่นเดียวกับเทคนิค RAPD จึงทำได้อย่างกว้างขวาง

2. ทำได้รวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอจำนวนน้อย โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณโดย วิธี PCR จึงมีประสิทธิภาพสูง

3. ในการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่งๆ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน คือมี multiplex ratio สูง ในหนึ่งปฏิกิริยาจะให้แถบดีเอ็นเอ มากกว่าเทคนิค RAPD ประมาณ 4 เท่า

4. ทำให้เกิด polymorphism ได้จำนวนมาก จึงสามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต แต่ละตัวได้อย่างดี ใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต การจดทะเบียนลิขสิทธ์ การตรวจสอบการเป็นลูกผสม เป็นต้น

5. ใช้กับสิ่งมีชีวิตขนาดใดก็ได้ โดยการปรับจำนวนเบสที่ใช้คัดเลือกส่วนปลาย 3’ ของไพรเมอร์ หรือใช้กับดีเอ็นเอที่โคลนไว้ได้

6. ในบางกรณีสามารถแยกความแตกต่างของแถบ ดีเอ็นเอบนโฮโมไซกัส และเฮเทอโรไซกัสได้ โดยดูจากความเข้มข้นของแถบ จึงวิเคราะห์ผลได้แบบ เดียวกับเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงเครื่องหมายการข่มแบบ codominance แต่ส่วนใหญ่แล้วถือว่าเครื่องหมาย AFLP แสดงการข่มแบบ dominance

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้อเสียหรือปัญหาที่อาจเกิดขึ้นเมื่อใช้เทคนิค AFLP

ปัญหาเกี่ยวกับทางด้านเทคนิค

1. ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับการทำ PCR โดยทั่วไป เพราะมีขั้นตอนในการทำที่ซับซ้อนกว่า ต้องอาศัยความชำนาญ และระบบการวิเคราะห์ผลที่ต้องใช้สารเคมีที่มีราคาแพง

2. การเลือกใช้คู่เอนไซม์ในการตัดดีเอ็นเอ และการเลือกคู่ไพรเมอร์ในขั้นตอนที่ไพรเมอร์เข้าเกาะกับดีเอ็นเอให้ได้เหมาะสม และได้ข้อมูลพอเพียงในแต่ละการศึกษา ขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งที่มีชีวิตต้องการศึกษา ซึ่งอาจจะต้องทำการทดลองมากครั้งเพื่อให้ได้ตามที่ต้องการ

3. ความสามารถในการทำซ้ำได้ของเทคนิค AFLP ถึงแม้ว่าได้รับการยืนยันว่ามีความสามารถในการทำซ้ำได้สูง ซึ่งจะมากกว่าเทคนิค RAPD แต่มีหลายการศึกษาที่ให้ข้อสังเกตถึงความสามารถในการทำซ้ำของ AFLP เช่น มีรายงานถึงความแตกต่างของรูปแบบแถบเมื่อทำซ้ำ (Winfield *et al.,* 1998) การอ่านผลแถบดีเอ็นเอ อาจได้ผลไม่เหมือนกันในการอ่านของแต่ละคนซึ่งขึ้นอยู่กับความชัดเจนของแถบดีเอ็นเอเป็นสำคัญ ขั้นตอนของการเตรียมจีโนมิกดีเอ็นเออาจมีผลต่อรูปแบบของแถบ ความไม่สมบูรณ์ของการตัดดีเอ็นเอ อันเป็นผลมาจากดีเอ็นเอมีคุณภาพต่ำ หรือความด้อยประสิทธิภาพของเอนไซม์ (Lin and Kuo, 1995)

4. แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่แสดงการข่มแบบ dominance ซึ่งทำให้วิเคราะห์ได้ยากกว่าเครื่องหมายที่เป็น codominance เช่น เทคนิค RFLP

5. เนื่องจากการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่งๆ เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากและมีขนาดใกล้เคียงกัน บางครั้งแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันอาจมาจากชิ้นดีเอ็นเอคนละตำแหน่ง ทำให้เกิดการวิเคราะห์ผลผิดพลาดได้

6. เทคนิค AFLP ไม่เหมาะกับการใช้เปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตที่มีความแตกต่างกันมาก คือมีลำดับเบสที่เหมือนกันต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เพราะจะมีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (common band) จำนวนน้อย ทำให้การวิเคราะห์ผลในแง่ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการผิดพลาดได้

7. สำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสที่ใกล้เคียงกันมาก ก็ไม่เหมาะสมเช่นกัน เพราะจะพบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวนน้อย แม้ว่าในการทำปฏิกิริยาจะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากก็ตาม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัญหาเกี่ยวกับข้อมูล

1. Dominance เครื่องหมาย AFLP เหมือนกับเครื่องหมาย RAPD ที่ polymorphism ส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะ dominance ซึ่งมาจากผลของแถบที่อ่านได้เป็น ปรากฏ และ ไม่ปรากฏ ในแต่ละตำแหน่ง บางครั้งก็พบตำแหน่งที่ปรากฏเป็น co-dominance แต่จำนวนมีน้อยมากหรืออาจมีมากกว่าที่เห็นแต่ไม่สามารถบ่งบอกได้อย่างชัดเจนเนื่องจากความซับซ้อนของรูปแบบของแถบ

2. Homology ปัญหาข้อนี้เกิดขึ้นมาจากการที่ไม่สามารถบอกได้ว่าแถบที่เคลื่อนที่มาอยู่ในตำแหน่งเดียวกันบนเจลเป็นแถบเดียวกัน หรือมาจากตำแหน่งเดียวกันบนจีโนม (homologous) หรือไม่ เนื่องจากไพรเมอร์ของ AFLP ไม่ได้ออกแบบโดยทราบลำดับมาก่อน ท่อนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ ได้นั้นมีความจำเพาะกับ selective base เท่านั้น ลำดับที่ถัดเข้าไปด้านในจึงอาจมีความแตกต่างกัน ชิ้นที่มีขนาดเท่ากันจึงไม่จำเป็นจะต้องเหมือนกัน ซึ่งอาจจะมาจากคนละที่ในจีโนม แต่จากหลายการศึกษาพบว่าส่วนใหญ่แล้วแถบที่เคลื่อนที่มาอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกัน (co-migration band) เหล่านั้นจะเป็น homologous band (Riesberg *et al.,* 1996)

จากการที่งานด้านชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) ได้พัฒนาก้าวไปไกลมาก ซึ่งมีส่วนช่วยในงานด้านการเกษตร โดยเฉพาะในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีมาตรฐาน (conventional breeding) เครื่องหมายโมเลกุลเข้ามาช่วยในหลายด้าน เช่น การตรวจสอบความหลากหลายของเชื้อพันธุกรรม การคัดเลือกพันธุ์ และการตรวจสอบการตรงตามพันธุ์ เป็นต้น ในปัจจุบันมีเครื่องหมายโมเลกุลหลายเทคนิคที่สามารถช่วยนักปรับปรุงพันธุ์และนักพันธุศาสตร์แก้ปัญหาได้หลากหลาย

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ เครื่องหมาย RAPD (William *et al.,* 1990) เครื่องหมาย AFLP (Vos *et al.,* 1995) และ Microsatellite หรือเครื่องหมาย SSR เป็นต้น การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์พืชมีข้อได้เปรียบกว่าเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological markers) คือสามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้แม่นยำ เที่ยงตรง ส่วนเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา พบว่าลักษณะสัณฐานของพืชมักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป อาจส่งผลให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ (สุรีพร, 2548)

เครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละตัวมีข้อดีข้อจำกัดและขั้นตอนในการตรวจสอบที่แตกต่างกัน พบว่าการศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรมในพันธุ์พืช การสร้างแผนที่ยีนในพืชหลายชนิด จะใช้เครื่องหมาย AFLP เนื่องจากจัดเป็นเครื่องหมายที่ให้ข้อมูลมาก ประกอบกับข้อจำกัดของเครื่องหมายดีเอ็นเอวิธีการอื่น เช่น เทคนิค RAPD ให้ผลไม่แน่นอน เทคนิค RFLP มีวิธีการที่ยุ่งยาก ใช้เวลานาน ให้แถบ polymorphic น้อย ส่วนเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับเบสแม้เป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เทคนิคที่มีความแม่นยำสูง แต่ในการทดลองจำเป็นต้องทราบข้อมูลของจีโนม และเป็นวิธีการที่เสียค่าใช้จ่ายสูง จึงทำให้มีการนำเอาเทคนิค AFLP มาใช้ศึกษาด้านอณูวิทยามากขึ้น (Vos *et al.,* 1995)

เทคนิค AFLP เป็นเทคนิคในการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในลายพิมพ์ AFLP สามารถใช้เป็นตัวแทนหรือเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) ใช้สร้างแผนที่ยีน วิเคราะห์ linkage group ศึกษาการกระจายตัว หรือศึกษาการถ่ายทอดของเครื่องหมายได้ด้วย (Lanham *et al.,* 1995) ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค AFLP มาใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชหลายชนิด เช่น มะม่วง (Eiadthong *et al*., 1999) ส้ม (Ulubelde and Tan, 1986) ลิ้นจี่ (Degani *et al*., 1995) และลำไย (Ratchadaporn *et al.,* 2003) เป็นต้น

อจลี และวีณัน (2546) ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของบัวชั้นโดยใช้เครื่องหมาย AFLP โดยศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบัวชั้น 28 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ AFLP 4 คู่ พบว่าเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ยังไม่สามารถจำแนกบัวชั้นตามลักษณะสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจัดกลุ่ม คือ สีกลีบใบประดับ และลักษณะกลีบใบประดับส่วนบน เมื่อนำลักษณะกลีบใบประดับ สีกลีบดอก สีก้านดอก ความยาวช่อ และระยะห่างกลีบใบประดับมาวิเคราะห์เพิ่มเติม พบว่ากลุ่มที่จำแนกได้จากเดนโดรแกรมมีลักษณะร่วมภายในกลุ่ม หรือลักษณะเฉพาะที่แตกต่างไปจากกลุ่มอื่น

นอกจากนี้ยังได้มีการใช้เทคนิค AFLP ในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อศึกษาพันธุกรรมระหว่างแหล่งของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ซึ่งมีการแพร่กระจายพันธุ์อยู่ในบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย โดยรวบรวมกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่จาก 6 แหล่งในบริเวณจังหวัดตรัง กระบี่ และพังงา การคัดเลือกไพรเมอร์ 64 คู่ พบว่า มีจำนวนไพรเมอร์ 13 คู่ ที่ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ศึกษา (จักรพันธ์ และสุจิตรา, 2550)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ผล พบว่า Schnell *et al.,* (2001) ได้ศึกษาการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของขนุน เมื่อใช้เทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ 12 คู่ จากจำนวนไพรเมอร์ 30 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอ187 แถบ หรือ 187 เครื่องหมาย AFLP มี 92 เครื่องหมายแสดง polymorphism คิดเป็น 49.2 เปอร์เซ็นต์ของเครื่องหมายทั้งหมด ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมมีค่าระหว่าง 0.569-0.950 เมื่อแบ่งตัวอย่างขนุนโดยใช้วิธี principle component analysis (PCA) พบว่าในกลุ่มหลักขนุนมีถิ่นกำเนิดอยู่ในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ Panie *et al.* (2002) ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ของลิ้นจี่ไทย ด้วยเทคนิค RAPD และ AFLP โดยเลือกใช้ 14 ไพรเมอร์ และ 7 ไพรเมอร์ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้เทคนิค RAPD ให้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกัน (polymorphic marker) 52 แถบ คิดเป็น 34.6เปอร์เซ็นต์ ส่วนเทคนิค AFLP ให้ 101 polymorphic markers คิดเป็น 36.3 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเครื่องหมาย AFLP สามารถจำแนกได้มากกว่า ในขณะที่เครื่องหมาย RAPD ไม่สามารถแสดงผลได้อย่างมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประสิทธิภาพ ยุคลธร (2542) วิเคราะห์จีโนมของพืชโดยใช้เทคนิค AFLP กับพืชในสกุล *Garcinia* จำนวน 22 ตัวอย่าง ประกอบด้วยมังคุด 11 ตัวอย่าง และพืชสกุลใกล้เคียงอีก 2 ชนิด รวม 24 ตัวอย่าง ใช้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างของมังคุดกับพืชสกุล *Garcinia* ชนิดอื่น และสกุลใกล้เคียง ซึ่งสามารถใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายทางโมเลกุลที่จำเพาะในการจำแนกชนิดของพืชได้

ภาณี และคณะ (2544) ศึกษาการใช้ดีเอ็นเอกำกับลักษณะพันธุ์ไม้ไทย โดยได้ศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลระดับดีเอ็นเอ เพื่อจัดทำมาตรฐานลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สำหรับใช้เป็นเอกลักษณ์ประจำพันธุ์พืช โดยได้เก็บรวบรวมดีเอ็นเอของพืชพื้นบ้าน 5 ชนิด จากจังหวัดลำพูน เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง น่าน นครราชสีมา สมุทรสงคราม และนครปฐม ได้แก่ มะเกี๋ยง 450 สายต้น หว้า 120 สายต้น ชมพู่ 87 สายต้น ลิ้นจี่ 120 สายต้น ลำไย 121 สายต้น วิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD และ AFLP พบว่า เครื่องหมาย RAPD แสดงความหลากหลายภายในพันธุ์อย่างเด่นชัดในมะเกี๋ยงและหว้า บ่งชี้ว่าสามารถใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสายต้น และช่วยคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ในการปรับปรุงพันธุ์มะเกี๋ยงและหว้าได้ ส่วนเทคนิค AFLP มีประสิทธิภาพดีกว่า เทคนิค RAPD โดยที่เครื่องหมาย AFLP ของลิ้นจี่ ลำไย ชมพู่พันธุ์ต่างๆ มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ทุกพันธุ์ อีกทั้งให้ความแตกต่างระหว่างสายต้นภายในพันธุ์ที่มีชื่อเดียวกันอีกด้วย เทคนิคAFLP สามารถยืนยันเอกลักษณ์ของดีเอ็นเอสายต้นใดสายต้นหนึ่งได้โดยเฉพาะได้ชัดเจน และทำซ้ำยืนยันผลได้ดังเดิม และตรวจสอบได้แม้แต่ชมพู่ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วเกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรม (somaclonal variation)

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ (2550) ได้ทำการวิจัยเรื่องการจัดจำแนกทุเรียน (*Durio zibethinus* Merr.) โดยใช้เทคนิค AFLP กับทุเรียนพันธุ์ต่างๆ จำนวน 130 ตัวอย่างจากทั่วประเทศ ได้แก่ นมสวรรค์ (จ. จันทบุรี, ระยอง), กระปุกทองดี (จ. จันทบุรี, ระยอง), กบสุวรรณ (จ. จันทบุรี, นนทบุรี, ระยอง), ห้าลูกไม่ถึงผัว (ไม่ทราบประวัติ), อาพร4 (จ. นครศรีธรรมราช), พายุ1 (จ. สงขลา), สมหมาย (จ. สงขลา), สมะแอ (จ. ยะลา) จากการศึกษาเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์ 12 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 361 แถบ เฉลี่ย 30 แถบต่อหนึ่งคู่ไพรเมอร์ มีจำนวนแถบที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic band) 349 แถบ ขนาดตั้งแต่ 66-500 คู่เบส คิดเป็น 96.68 เปอร์เซ็นต์ จากจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด เมื่อนำข้อมูลแถบดีเอ็นเอ ไปหาความสัมพันธ์ของทุเรียนทั้ง 130 ตัวอย่าง โดยสร้างเป็นเดนโดรแกรม สามารถจัดได้เป็น 2 กลุ่ม พบว่าทุเรียนในกลุ่มที่ 1 และ 2 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เนื่องจากในกลุ่มใหญ่ยังแยกเป็นกลุ่มย่อยได้อีกหลายกลุ่ม ซึ่งบางพันธุ์ไม่มีการจับกลุ่ม เพราะชาวสวนมักเอาเมล็ดทุเรียนมาเพาะปลูกใหม่ เนื่องจากกิ่งพันธุ์ดีหายาก เมื่อนำทุเรียนพันธุ์หนึ่งๆ มาเพาะเมล็ดแล้วได้ลักษณะที่ผิดแปลกไปจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เดิมและมีคุณลักษณะที่ดีจะนำมาตั้งเป็นพันธุ์ใหม่ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าถึงแม้จะมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง แต่ยังมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงเช่นเดียวกัน เนื่องจากเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างอยู่ระหว่าง 50-70 เปอร์เซ็นต์ โดยการทำการวิจัยนี้พบว่า การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็น polymorphism จำนวนมาก ทำให้ทราบถึงข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุเรียน อย่างไรก็ตามการจำแนกพันธุ์จะชัดเจนยิ่งขึ้นถ้ามีข้อมูลทางสัณฐานวิทยามาพิจารณาประกอบกัน

Kashkush and Jinggui (2001) ทำการจัดจำแนกพันธุ์ปลูก (cultivars) และแผนที่พันธุกรรม (genetic linkage map) ของมะม่วง (*Mangifera indica* L.) โดยใช้เทคนิค AFLP ในการจัดจำแนกพันธุ์ปลูกมะม่วง 16 พันธุ์ และ ต้นตอมะม่วง (rootstocks) 7 ต้น สำหรับสร้างแผนที่พันธุกรรม พบว่า ไพรเมอร์ 6 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน 204 แถบ เฉลี่ย 34 แถบต่อคู่ไพรเมอร์ เฉลี่ยแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic ทั้งหมดคือ 81เปอร์เซ็นต์ ความน่าจะเป็นของรูปแบบความคล้ายคลึงกันของมะม่วงแต่ละชนิด คือ $6x10^{-3}$ และ $2x10^{-3}$ ตามลำดับ แผนที่พันธุกรรมของจีโนมมะม่วงถูกสร้างขึ้นโดยอาศัยลูกผสมข้ามระหว่างพันธุ์ Keitt และพันธุ์ Tommy-Atkins แผนที่ประกอบด้วย 13 กลุ่ม และครอบคลุม 161.5 เซนติเมตร ที่ได้จาก 34 เครื่องหมาย AFLP

Yamanakai *et al*., (2003) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ความแตกต่างระหว่าง และภายในสปีชีส์ของมะม่วง โดยอาศัยลักษณะภายนอก เช่น ใบ ผล และเมล็ด แต่วิธีนี้ใช้เวลาการเพาะปลูกนาน และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมมีผลกระทบต่อลักษณะที่แสดงออกได้ง่าย การวิเคราะห์ AFLP จะทำให้การบ่งบอกเอกลักษณ์ของมะม่วงได้ชัดเจนขึ้น โดยทำการทดลองกับมะม่วง 4 สปีชีส์ จำนวน 35 ตัวอย่าง ประกอบด้วย *M. indica* L. 11 ตัวอย่าง (8 cultivars และ 3 landraces), *M. odorata* Griff. 11 ตัวอย่าง (landraces), *M. foetida* Lour. 7 ตัวอย่าง (landraces), และ *M. caesia* Jack. 6 ตัวอย่าง (landraces) โดยใช้ไพรเมอร์ 8 คู่ ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 518 แถบ เฉลี่ย 64.8 แถบต่อหนึ่งคู่ไพรเมอร์ เป็นแถบ polymorphic จำนวน 499 แถบ คิดเป็น 96.3 เปอร์เซ็นต์ ของแถบทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มพบว่า มะม่วง 35 ตัวอย่างสามารถแยกได้เป็น 4 กลุ่ม ตรงกับ 4 สปีชีส์ แต่ Mi3 ซึ่งอยู่ใน *M. indica* L. ถูกจัดให้อยู่นอกกลุ่ม แต่รวมอยู่ในกลุ่ม *M. odorata* Griff. และถึงแม้ว่าตัวอย่างในกลุ่ม *M. odorata* Griff. จะแสดงความแตกต่างกันเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่าง มะม่วงกลุ่มอื่น แต่เทคนิค AFLP คือวิธีที่เหมาะสมสำหรับการจัดจำแนกมะม่วงในกลุ่มของ *M. caesia* Jack. ยกเว้น Mc5 ที่ถูกจัดให้อยู่นอกกลุ่ม และ *M. caesia* Jack. ถูกจัดแยกกลุ่มออกจาก สปีชีส์อื่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved