บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

2.1 รูปร่างลักษณะและวงจรชีวิต

มอดหัวป้อมหรือมอดข้าวเปลือก (lesser grain borer) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) จัดอยู่ในวงศ์ Bostrichidae อันดับ Coleoptera เป็นแมลงปีกแข็งขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 2.5-3.0 มิลลิเมตร รูปร่างทรงกระบอกสีน้ำตาลเข้มปนแดงผิวเป็นมันเงา ส่วนหัวสั้นและงุ้มซ่อนอยู่ใต้อกปล้องแรก ต้องมองจากด้านข้างจึงจะเห็นส่วนหัวได้ชัดเจน หากมองดูด้านบนจะเห็นส่วนของท่อนอกเหมือนส่วนของท่อนหัวจึงได้ชื่อว่ามอดหัวป้อม หนวดมี 10 ปล้องแบบกระบอง ปลายหนวด 3 ปล้องสุดท้ายขยายใหญ่กว่าปล้องอื่น ๆ ปีกคู่หน้าค่อนข้างขรุขระเป็นหลุม (puncture) เรียงเป็นแถวอย่างมีระเบียบ (Koehler and Pereira, 2008; กรมการข้าว, 2550) มอดหัวป้อมเพศเมียวางไข่แบบเดี่ยวตามเศษผงในกองข้าวหรือเป็นกลุ่มตามรอยแตกกะเทาะบนเมล็ดครั้งละ 30 ฟอง ตลอดชีวิตสามารถวางไข่ได้มากที่สุดถึง 500 ฟอง (Stuart, 2003; Koehler and Pereira, 2008) ไข่มีลักษณะยาวรีขนาด 0.52 ± 0.05 x 0.2 ± 0.01 มิลลิเมตร ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ตัวหนอนมีขา 3 คู่ รูปร่างแบบตัวซี (C-shaped) สีขาวขุ่น ระยะหนอนลอกคราบ 4 ครั้ง ใช้เวลา 21-28 วัน จึงเข้าดักแด้อยู่ภายในเมล็ดข้าว 6-8 วัน เมื่อลอกคราบเป็นตัวเต็มวัยจะอาศัยอยู่ภายในเปลือกข้าว 3-5 วัน จึงออกจากเมล็ดเพื่อหาอาหาร ตัวเต็มวัยมีวงจรชีวิตประมาณ 1-5 เดือน หรือมากกว่า ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ (บุษรา, 2547) ในสภาพอากาศที่ค่อนข้างร้อนมอดหัวป้อมสามารถทนทานได้มากกว่าแมลงในโรงเก็บหลายชนิด (กุสุมา, 2526; กุสุมา และคณะ, 2548) อุณหภูมิสูงสุดที่มอดหัวป้อมสามารถมีชีวิตอยู่ได้คือ 38.2 องศาเซลเซียส (Dobie *et al*., 1985) แต่ไม่สามารถทนทานต่อสภาพอากาศเย็นได้ ในปี 2005 Baldassari และคณะทดลองเลี้ยงมอดหัวป้อมที่อุณหภูมิต่ำพบว่ามอดหัวป้อมมีอัตราการตายสูง และระบบสืบพันธุ์ของเพศเมียไม่พัฒนาที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส มอดหัวป้อมมีอัตราการตายสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์

มอดหัวป้อมสามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้ไกลและเข้าทำลายผลผลิตได้หลายชนิด พบการแพร่ระบาดทั่วไปในที่เก็บผลผลิตทางการเกษตร เช่น ข้าวเปลือก ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ข้าวสาร ข้าวบาร์เลย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รำข้าวเจ้า และรำข้าวสาลี เป็นต้น นอกจากเข้าทำลายผลผลิตทางการเกษตรแล้วมอดหัวป้อมยังสามารถเจาะทะลุภาชนะบรรจุเมล็ดพันธุ์ เช่น กระสอบ กล่องกระดาษ ถุงพลาสติก ถุงผ้าดิบหรือผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น อาหารสัตว์ รากไม้แห้ง มันสำปะหลังอัดเม็ด และไม้คอร์ก เป็นต้น ซึ่งแมลงชนิดอื่นเข้าทำลายได้ยาก อีกทั้งสามารถบินได้ไกลจึงทำให้เกิดการระบาดไปยังโรงเก็บอื่น ๆ ที่อยู่ใกล้เคียงได้ง่าย (Koehler and Pereira, 2008) การแพร่ระบาดของมอดหัวป้อมพบมากในประเทศแถบร้อน และอบอุ่น เช่น อินโดนีเซีย มาเลเซีย เวียดนาม บริติชกิอานา สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย บราซิล และทรินิแดด เป็นต้น

มอดหัวป้อมทั้งตัวอ่อน และตัวเต็มวัยสามารถเข้าทำลายผลผลิตให้เกิดความเสียหายได้ทั้งภายนอก และภายในโดยตัวอ่อนจะอาศัย และกัดกินอยู่ภายในเมล็ดจนกลายเป็นตัวเต็มวัย จากนั้นจึงเจาะรูออกมาโดยใช้ปากกัดเมล็ดจนเป็นรูซึ่งมีลักษณะกลมหรือรี บริเวณขอบของรูจะขรุขระไม่เรียบ เปลือกของเมล็ดเป็นรูพรุนบางและอาจแตกจากกัน หากแกะเปลือกออกจะพบว่ามอดหัวป้อม กินเมล็ดภายในจนหมด เมื่อกินเมล็ดข้าวหมดแล้วแมลงจะเจาะออกมาภายนอกเพื่อเข้าทำลายเมล็ดอื่นต่อไป (กุสุมา และคณะ, 2548) ในระหว่างการกัดกินผลผลิตจะเกิดฝุ่นผงภายในภาชนะบรรจุหรือกระจายตกตามพื้นเกิดความสกปรก ซึ่งอาจเป็นปัจจัยดึงดูดให้ศัตรูพืชชนิดอื่นเข้าทำลายซ้ำ หรือเป็นแหล่งเพาะเชื้อโรคได้

2.2 การป้องกันกำจัดมอดหัวป้อม

2.2.1 การป้องกันกำจัดโดยไม่ใช้สารเคมี

หมายถึงการนำเอาวิธีการต่าง ๆ โดยที่ไม่ใช้สารเคมีเพื่อการป้องกัน และกำจัดแมลง หรือเพื่อลดการทำลายของแมลง มีข้อควรปฏิบัติ ดังนี้

วิธีกล (Mechanical control)

1) การรักษาความสะอาด และการจัดการโรงเก็บควรเตรียมความพร้อมของสภาพโรงเก็บทำความสะอาดพื้นและส่วนต่าง ๆ ของโรงเก็บทั้งภายใน และภายนอกก่อนที่จะนำข้าวเข้าเก็บรักษา และต้องดูแลทำความสะอาดอย่างสม่ำเสมอตลอดระยะเวลาของการเก็บรักษาทำให้การแพร่ระบาดของแมลงลดน้อยลง

2) การใช้วิธีทางอ้อมกับแมลงเป็นการใช้สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของแมลงสามารถป้องกันการเข้าทำลายของแมลงได้ เช่น การเก็บข้าวเปลือกแทนการเก็บข้าวสาร และการแยกเมล็ดแตกหักออกจากเมล็ดดี เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3) การใช้วิธีทางตรงกับแมลงการแยกแมลงออกจากผลิตผลเป็นวิธีที่ใช้ได้ดีกับแมลงในระยะตัวเต็มวัย เช่น การร่อนแยกแมลง การพลิกกลับกองข้าวบ่อย ๆ และการใช้เครื่องดูดเมล็ดโดยวิธีสุญญากาศ เป็นต้น

4) การใช้สารหรือวัสดุบางอย่างคลุกเมล็ด

- น้ำมันพืชมีคุณสมบัติเป็นการไล่ และเป็นสารต้านการกิน เช่น น้ำมันจากขมิ้น และสะเดา

- การใช้ส่วนต่าง ๆ ของพืชใช้ว่านน้ำ (Sweetflag : *Acorus calamus* Linn.) คลุกเมล็ดสามารถใช้กำจัดแมลงได้ดี

- การใช้ inert dust ในปัจจุบันมีการใช้ diatomaceous earth และ silica aerogels คลุกเมล็ดเพื่อป้องกันแมลง ซึ่งไม่มีพิษต่อผลิตผล diatomaceous earth มีผลทำให้ลำตัวแมลงเกิดบาดแผลและตายในที่สุด ส่วน silica aerogels สามารถดูดซับน้ำมันได้ 3 เท่า เมื่อแมลงเดินผ่านสารดังกล่าวจะดูดขี้ผึ้งที่หุ้มผิวแมลง (cuticle) ทำให้สูญเสียน้ำจนตาย นอกจากนี้ยังมีการใช้ปูนขาว ขี้เถ้าแกลบและทรายเพื่อลดการเข้าทำลายของแมลงได้

วิธีทางกายภาพ (physical control)

1) การลดความชื้นในเมล็ดก่อนนำเข้าเก็บรักษาเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งเพราะนอกจากช่วยป้องกันการเข้าทำลายของแมลงแล้วยังทำให้อายุการเก็บรักษานานขึ้น การลดความชื้นเมล็ดลงเหลือ 10% จะพบแมลงเข้าทำลายน้อย หากลดความชื้นในเมล็ดต่ำกว่า 8% มักไม่พบการเข้าทำลายจากแมลง

2) การควบคุมโดยใช้อุณหภูมิ

- ความร้อน การใช้อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ติดต่อกันจะทำให้แมลงบางชนิดหยุดการเจริญเติบโต และตายได้ หากใช้อุณหภูมิระหว่าง 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หรืออุณหภูมิระหว่าง 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะทำให้แมลงทุกชนิดตายทั้งหมด

- ความเย็น การเก็บเมล็ดข้าวที่อุณหภูมิต่ำกว่า 12 องศาเซลเซียส จะทำให้แมลงหยุดการเจริญเติบโต และขยายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ –2 ถึง –5 องศาเซลเซียส จะทำให้แมลงตายทั้งหมด

3) การใช้พลังงาน มีการใช้พลังงานต่าง ๆ เช่น พลังงานไฟฟ้า และพลังงานจากรังสี เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถกำจัดแมลงโดยแมลงจะดูดพลังงานได้เร็วกว่าเมล็ดพืชแมลงจึงตายอย่างรวดเร็วโดยเมล็ดยังไม่ถูกทำลาย

4) การใช้ภาชนะบรรจุชนิดต่าง ๆ ปัจจุบันได้มีถุงพลาสติกถักที่หนา และสามารถป้องกันการเข้าทำลายของแมลงได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5) การเก็บรักษาในสภาพสุญญากาศหรือภาชนะที่ปิดผนึกแน่น แมลงต้องการออกซิเจนเพื่อการหายใจ เมื่ออยู่ในที่ไม่มีอากาศผ่านจึงทำให้แมลงขาดอากาศตายได้ ในกรณีที่ต้องการให้แมลงตายเร็วขึ้นอาจเพิ่มก๊าซที่เป็นพิษ เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือก๊าซไนโตรเจน เป็นต้น

6) การใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide) มีการนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้รมเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาพิษตกค้าง และการสร้างความต้านทานของแมลงต่อสารรม

วิธีทางชีวภาพ (Biological control) หมายถึงการใช้ตัวห้ำ ตัวเบียนหรือเชื้อจุลินทรีย์ในการลดปริมาณแมลงศัตรูในโรงเก็บ

1) แมลงศัตรูธรรมชาติ โดยนำแมลงศัตรูธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ และปล่อยสู่แมลงเป้าหมาย เช่น แตนเบียน และตัวห้ำ เป็นต้น

2) โรคของแมลง (insect pathogen) การนำจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อก่อโรคกับแมลงชนิดต่าง ๆ มาใช้ในการควบคุม เช่น เชื้อแบคทีเรีย รา โปรโตซัว และไวรัส เป็นต้น

2.2.2 การป้องกันกำจัดโดยใช้สารเคมี

การใช้สารเคมีเพื่อป้องกันกำจดเป็นวิธีที่นิยมปฏิบัติเพราะมีประสิทธิภาพสูง และรวดเร็ว แต่ต้องคำนึงถึงการนำเมล็ดพืชไปใช้ประโยชน์ หากนำไปใช้เป็นเมล็ดพันธุ์อาจใช้สารเคมีที่ออกฤทธิ์นาน และอัตราสูงได้ แต่ถ้าใช้เมล็ดเพื่อการบริโภคต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภค เลือกใช้สารที่สลายตัวได้ในเวลาที่กำหนด และใช้ตามอัตราแนะนำ สารฆ่าแมลงที่ใช้สำหรับผลิตผลในโรงเก็บ แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

1) สารฆ่าแมลงในรูปของเหลว และผงมีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงโดยมีพิษทางการสัมผัส การกิน การได้กลิ่นหรือไอระเหยสารฆ่าแมลงที่มีความเป็นพิษต่ำส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มออแกโนฟอสฟอรัส และกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช (2547) แนะนำให้ใช้สารเพอร์เมทริน 10% EC อัตราการใช้ 3 มิลลิลิตรต่อน้ำ 300 มิลลิลิตร หรือไซเปอร์เมทริน 15% EC อัตราการใช้ 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 300 มิลลิลิตร คลุกกับเมล็ดพันธุ์ 100 กิโลกรัม ก่อนนำไปเก็บหรือรอจำหน่าย

2) สารรม เป็นสารเคมีที่เป็นพิษในรูปของไอหรือควัน มีลักษณะเป็นเม็ด ของเหลว หรือก๊าซ สารพิษจะออกฤทธิ์ในรูปของก๊าซ (บุษรา, 2547) สารสำคัญ และนิยมใช้ ได้แก่

- การพ่นภายใน และภายนอกโรงเก็บ เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีแมลงรอดชีวิตอยู่ควรกระทำหลังทำความสะอาดโรงเก็บก่อนนำผลผลิตเข้าไปเก็บโดยใช้สารฆ่าแมลง เช่น phoxim, fenitrothion และ chlorpyrifos methyl อัตรา 0.5–2.0 กรัมต่อตารางเมตร ฉีดพ่นบริเวณพื้น และฝาโรงเก็บ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- การพ่นแบบหมอกควัน โดยใช้เครื่องพ่นหมอกควันพ่นลงบนกองเมล็ดพืชที่เก็บไว้ในยุ้งฉาง โรงเก็บหรือห้องที่มีสภาพปิดมิดชิด วิธีการนี้สามารถกำจัดผีเสื้อข้าวเปลือกได้เป็นอย่างดี สารฆ่าแมลงที่แนะนำให้ใช้คือ fenitrothion อัตรา 20 มิลลิลิตร หรือ esbioallethrin deltamethrin อัตรา 5 มิลลิลิตร ผสมน้ำมันโซล่า 100 มิลลิลิตรต่อข้าวเปลือก 6 ตัน

2.3 สารไซเปอร์เมทริน (Cypermethrin)

สารไซเปอร์เมทรินคือสารฆ่าแมลงในกลุ่มไพรีทรอยด์ (pyrethroid) สังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกในปี 1974 เพื่อใช้ควบคุมศัตรูต่าง ๆ ในสวนผลไม้ ฝ้าย และแปลงผัก อีกทั้งยังใช้ควบคุมแมลงศัตรูที่พบในบ้านเรือน โรงเก็บสินค้า เรือนเพาะชำ ห้องปฏิบัติการ รถโดยสาร เรือ และเครื่องบิน เป็นต้น สารพิษเข้าสู่ร่างกายแมลงโดยการกินหรือสัมผัสออกฤทธิ์อย่างรวดเร็วกับระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system)

สารไซเปอร์เมทรินมีชื่อการค้า เช่น Arrivo, Basathrin, Cynoff, Cyperkill, Demon, Flectron, Fligene CI, Polythrin, Ripcord, Siperin และ Stockade เป็นต้น

สารไซเปอร์เมทรินเป็นสารเคมีกลุ่มไพรีทรอยด์ที่สังเคราะห์เลียนแบบโครงสร้างของไพรีทริน (pyrethrin) ซึ่งเป็นสารที่พบในพืชดอกวงศ์ Chrysanthemums มีฤทธิ์ทำให้แมลงเกิดอาการหมดสติ (knock down) ได้อย่างรวดเร็ว แต่สารไพรีทรินเสื่อมสภาพได้เร็วในธรรมชาติ จึงมีการสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ขึ้นเพื่อให้มีความคงทนในธรรมชาติได้ยาวนานขึ้น

ความเป็นพิษของสารไซเปอร์เมทรินมีผลกับระบบประสาทของแมลง เมื่อแมลงได้รับสารไซเปอร์เมทรินเข้าไปในร่างกายจากการกินหรือสัมผัส สารไซเปอร์เมทรินจะแสดงความเป็นพิษโดยเข้าจับกับโปรตีนบริเวณสายประสาทส่วนที่เรียกว่า voltage – gated sodium channel โดยปกติโปรตีนนี้จะทำหน้าที่เป็นประตูเปิดปิดช่องทางผ่านของโซเดียมไอออนในการแลกเปลี่ยนประจุให้เกิดกระแสประสาทขึ้นขณะมีสิ่งเร้ามากระตุ้น เมื่อกระแสประสาทสิ้นสุดลงโปรตีนดังกล่าวจะปิดช่องทางผ่านนี้ทันที สารไซเปอร์เมทรินจะเข้าจับโปรตีนบริเวณทางผ่านของโซเดียมไอออนขัดขวางการทำงานของโปรตีนดังกล่าวให้เกิดการสร้างกระแสประสาทอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งระบบประสาทสูญเสียการควบคุมส่งผลต่อการเคลื่อนไหว (Valles and Koehler, 2003)

2.4 การต้านทานของแมลงต่อสารฆ่าแมลง

การต้านทานต่อสารฆ่าแมลงคือความสามารถของประชากรแมลงที่ยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้เมื่อได้รับสารฆ่าแมลงเข้าสู่ร่างกาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลไกการสร้างความต้านทานต่อสารไพรีทรอยด์เกิดจาก 2 กลไก คือ

2.4.1 Target-resistance หรือ Target site insensitive เป็นความต้านทานที่เกิดขึ้นจากการลดจำนวนของ sodium channels การเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มประสาทที่มีหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่านหรือเปลี่ยนแปลงใน voltage-sensitive sodium channels ซึ่งแต่ละกลไกมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของสารฆ่าแมลงชนิดนั้น ๆ

2.4.2 Metabolic resistance เป็นความต้านทานที่เกิดจากกลไกการลดความเป็นพิษโดยการออกซิเดชัน (oxidation) ผ่านระบบ monooxygenase และ hydrolysis โดย esterases

การใช้สารไพรีทรอยด์อย่างต่อเนื่องเป็นสาเหตุให้ศัตรูพืชสามารถพัฒนาความต้านทานขึ้นโดยอาจเกิดการกลายพันธุ์ของยีนบริเวณที่สารไพรีทรอยด์เข้าไปออกฤทธิ์ (target site) คือบริเวณ sodium channel ทำให้ลำดับเบสเปลี่ยนไปจากเดิม ส่งผลให้สารพิษไม่สามารถออกฤทธิ์กับบริเวณดังกล่าวได้ หรือมีพิษน้อยลง ในแมลงพบความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างความต้านทานต่อสารไพรีทรอยด์กับยีนบริเวณ sodium channel โดยศึกษายีน *para* ที่พบอยู่ใน sodium channel ของแมลงหวี่ *Drosophila melanogaster* ซึ่งเป็นยีนแบบ homologous แมลงหวี่ที่เกิดความต้านทานจะพบจุดกลายพันธุ์ (point mutation) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบริเวณยีนดังกล่าว

กลไกความต้านทานต่อสารไพรีทรอยด์ที่สำคัญคือ knockdown resistance (*kdr*) แบ่งได้เป็นการสร้างความต้านทานต่อการเกิดอัมพาตอย่างฉับพลัน (knockdown resistance) และการสร้างเอนไซม์ต้านทานต่อสารพิษจากสารฆ่าแมลง จากการศึกษาของ Wang *et al*., (2003) ; Brogdon and McAllister (1998) พบว่าการเกิดจุดกลายพันธุ์ของ *para* sodium channel มีผลกับ knockdown resistance ต่อสารไพรีทรอยด์ในแมลงวันบ้าน และแมลงสาบ ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบนดีเอ็นเอในยีน voltage-sensitive sodium channels (*Vssc*) ทำให้เนื้อเยื่อบริเวณ sodium channel ซึ่งเป็นเยื่อเลือกผ่านในระบบประสาท ลดการตอบสนอง (insensitive) ต่อพิษของสารไพรีทรอยด์ทำให้ต้านทานการ knock down

กลไกความต้านทานต่อสารไพรีทรอยด์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือความต้านทานที่เกิดขึ้นจากขบวนการเมแทบอลิซึมซึ่งเกิดขึ้นเมื่อมีการเพิ่มขึ้นหรือเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของ esterases oxidases และ glutathione S-transferases เอนไซม์ทั้งสองช่วยป้องกันสารฆ่าแมลงเข้าไปออกฤทธิ์ในบริเวณเป้าหมาย โดยมีสารประกอบที่สำคัญในปฏิกิริยา คือเอนไซม์ไซโตโครม P450 ในแมลงต้านทานพบเอนไซม์ไซโตโครม P450 ในระดับสูงเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของดีเอ็นเอในยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไซโตโครม P450 ทำให้ยีนเกิดการแสดงออกมากผิดปกติ (over expression) ส่งผลให้เอนไซม์ไซโตโครม P450 ถูกผลิตออกมามากจนสามารถลดความเป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พิษของไพรีทรอยด์ได้ (Gong *et al*., 2005; Brogdon and McAllister, 1998; Pittendrigh *et al*., 1997)

ตามปกติเอนไซม์ไซโตโครม P450 เป็นกลุ่มเอนไซม์สำคัญในกลุ่มโมโนออกซิจิเนส สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตตั้งแต่แบคทีเรียจนถึงแมลง พืช และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของสารเคมีหลายชนิด มณี (2546) รายงานว่าเอนไซม์ไซโตโครม P450 มีหน้าที่หลัก 2 ประการ คือหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบการกำจัดสารพิษในสิ่งมีชีวิตหรือสารเคมีแปลกปลอมให้ออกไปจากร่างกาย และหน้าที่จำเพาะในขบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของสารเคมีที่สร้างขึ้นเองภายในร่างกายสิ่งมีชีวิต กระบวนการเมแทบอลิซึม สารแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในร่างกายสามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ หรือ phase คือ phase I ซึ่งเป็น functionalization reaction โดยเกิดปฏิกิริยาผ่านกระบวนการออกซิเดชัน รีดักชัน (reduction) และไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ซึ่งส่วนใหญ่ทำให้สิ่งแปลกปลอมมีความเป็นขั้วเพิ่มขึ้นแล้วถูกกำจัดออกทางไตได้ง่าย โดยเอนไซม์ P450 จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน เกิดเป็นสารใหม่ที่มีคุณสมบัติต่างไปจากเดิม ส่วนใน phase II หรือ conjugation reaction เป็นการนำสารที่มีขั้วสูง เช่น glucuronides sulfate หรือ glutathione มารวมตัวกับสิ่งแปลกปลอม ทำให้สิ่งแปลกปลอมมีขั้วสูงตามไปด้วย ส่งผลให้การขับสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นผ่านออกทางไตได้ดีขึ้น (กนกวรรณ และธนกร, 2553)

2.5 เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular markers)

สุรินทร์ (2545) ได้เรียบเรียงเกี่ยวกับการศึกษาเครื่องหมายทางโมเลกุลไว้ว่าการศึกษาเครื่องหมาย หรือ marker ใช้บ่งชี้ความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณ และคุณภาพอาจเป็นการจำแนกความแตกต่างในระหว่างหรือภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน (between and within species) ระหว่าง และภายในประชากร (between and within populations) หรือระหว่างแต่ละตัว (between individuals) เครื่องหมายที่ใช้บ่งชี้ความแตกต่างมี 2 ประเภท คือ

2.5.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker)

การบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตใช้วิธีเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยาหรือทางสรีรวิทยา ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักจะขึ้นกับสภาพแวดล้อมทำให้ตรวจสอบผลผิดพลาดได้บางครั้งต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเป็นพิเศษ และต้องมีวิธีที่จะบอกจีโนไทป์ (genotype) ที่ถูกต้องจากฟีโนไทป์ (phenotype) ที่ตรวจสอบได้ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบลักษณะทาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นต้องทำเป็นอันดับแรก แล้วจึงใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น หรือแก้ปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวได้

2.5.2 เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker)

เครื่องหมายทางโมเลกุลมี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีนเป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่าง ๆ และระดับดีเอ็นเอซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

1) เครื่องหมายโปรตีน (protein marker)

การตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลโปรตีนใช้วิธีแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม เช่น การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนในเลือด โปรตีนสะสมในเมล็ดพืช เป็นต้น นอกจากนี้ยังนิยมตรวจสอบรูปแบบของเอนไซม์บางชนิดหรือไอโซไซม์ต่างๆ ข้อดีของการตรวจสอบโปรตีน คือ สามารถตรวจได้หลายตำแหน่งค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก และแถบของโปรตีนหรือไอโซไซม์นี้ยังมีการข่มร่วมกันแบบ codominant ช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้

ข้อจำกัดของการตรวจสอบโปรตีนหรือไอโซไซม์ คือจำนวนยีนที่ตรวจสอบได้มีไม่มากไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษาจึงต้องเลือกเนื้อเยื่อ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ผลที่ได้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้โปรตีน และไอโซไซม์ยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่ายจึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัดไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้นานได้ ทำให้โอกาสการตรวจพบความแตกต่างในระดับโปรตีนยังมีค่าต่ำมากเมื่อเทียบกับการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากอัลลีล (allele) หรือรูปแบบของยีนที่แตกต่างกัน นิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันอาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนหรือบางครั้งจะมีการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งแล้วก็ตาม อาจจะไม่มีผลต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลเมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิสทำให้ไม่สามารถตรวจพบความแตกต่างนั้น ๆ ได้ พบว่าการตรวจสอบระดับโปรตีนนี้ตรวจพบความแตกต่างของเครื่องหมายโปรตีนได้เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ของที่เกิดการแทนที่เบสทั้งหมดเท่านั้น ทำให้ผลที่ตรวจสอบได้พบความแตกต่างต่ำกว่าที่เป็นจริง

2) เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึงดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์ (species) หนึ่งหรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ บน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอหรือเกิดโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอนั่นเอง

วิธีตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) ทำโดยการหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) หรือตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตมีที่มาจากการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอซึ่งยังใช้อยู่ในปัจจุบัน

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) เป็นวิธีการที่ทำให้เกิดลายพิมม์หรือแบบแผนของดีเอ็นเอที่จำเพาะสามารถตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึมได้ ซึ่งเกิดจากการนำดีเอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ (genomic DNA) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วแยกขนาดโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ย้ายชิ้นดีเอ็นเอที่แยกแล้วทั้งหมดไปยังแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ (membrane filter) ไฮบริไดซ์กับโพรบ (probe) ซึ่งมาจากดีเอ็นเอส่วนที่เป็นมินิแซทเทลไลท์สามารถตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอได้จากหลายตำแหน่ง (multi-locus) พร้อม ๆ กัน เกิดเป็นลายพิมพ์ที่จำเพาะกับแต่ละบุคคล มีความหมายเดียวกับคำว่า DNA profiling หรือ DNA typing

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในปัจจุบันยังหมายถึงวิธีตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase chain reaction: PCR) ที่เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่งพร้อม ๆ กัน (multi-locus PCR) ทำให้เกิดแบบแผนของดีเอ็นเอแบบจำเพาะสำหรับการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมนุษย์ ในทางการแพทย์จะใช้วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่เป็นแบบจำเพาะครั้งละ 1 ตำแหน่ง (single locus PCR) แต่ทำหลายตำแหน่ง โดยใช้ไพรเมอร์หลายคู่นำมาวิเคราะห์ผลร่วมกัน ทำให้แยกความแตกต่างของบุคคลได้เช่นเดียวกัน

การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบโปรตีน คือโมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลานานได้ เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากันจึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใด ๆ ระยะการเจริญเติบโตหรือสภาพทางสรีรวิทยาใดก็ได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อมตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ จะมีการแสดงออกหรือไม่ก็ได้จึงตรวจสอบได้โดยไม่จำกัดครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่าง ๆ ให้เลือกมากมาย ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายทำได้อย่างกว้างขวาง ประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ได้ไม่จำกัด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.6 เทคนิค Random Amplified polymorphic DNA (RAPD)

Random Amplified Length Polymorphism (RAPD) เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่มีหลักการใช้นิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ความยาวประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ เป็นไพรเมอร์เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ไพรเมอร์นั้นสามารถเข้าจับได้ โดยอาศัยหลักการลูกโซ่โพลีเมอร์เรสหรือพีซีอาร์ (PCR) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้รับการเพิ่มปริมาณจะถูกนำไปแยกขนาดโดยวิธี electrophoresis ซึ่งความแตกต่างในประชากรนั้นเกิดจากการเพิ่ม ลด หรือการกลายพันธุ์ในตำแหน่งนั้น ๆ บนโครโมโซม คุณสมบัติที่สำคัญของอาร์เอพีดี คือวิธีการทำง่าย และประหยัดต้นทุนในการดำเนินการ เนื่องจากการสร้างไพรเมอร์เป็นแบบสุ่มซึ่งไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) และไม่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลจากลำดับเบส อีกทั้งใช้ปริมาณของดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อยมากจากระบบของพีซีอาร์ อย่างไรก็ตามโมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้มักจะเป็น dominant marker จึงไม่สามารถตรวจสอบ heterozygous ได้ อีกทั้งไม่สามารถระบุตำแหน่งที่แน่นอนในจีโนมได้ วิธีการนี้มีการเรียกชื่อแบบอื่นได้อีก เช่น arbitrarily primed PCR (AR-PCR), DNA amplification fingerprinting (DAF) หรือ multiple arbitrary amplicon profiling (MAAP) ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อแตกต่างกันบ้างคือขนาดของไพรเมอร์ที่ใช้ แต่หลักการไม่แตกต่างกันคือใช้ไพรเมอร์ที่สั้นเพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม นิยมใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว และให้วิธีแบบที่เรียกว่าอาร์เอพีดีซึ่งตั้งขึ้นโดย William และคณะ ในปี ค.ศ. 1990 โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์

DAF ใช้ครั้งแรกโดย Caetano-Anolles และคณะในปี ค.ศ. 1991 โดยใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นเพียง 5-8 นิวคลีโอไทด์และใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณโดยใช้อุณหภูมิ 2 ระดับเท่านั้น แทนการใช้ 3 ระดับแบบพีซีอาร์ทั่วไป แล้วแยกชิ้นดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในโพลีอะคริลาไมด์เจลและย้อมด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

AP-PCR คิดค้นโดย Welsh และ McClelland ในปี ค.ศ. 1990 โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 20 นิวคลีโอไทด์ หรือมากกว่า ใช้โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) 2 โปรแกรม คือใช้อุณหภูมิสำหรับ annealing ต่ำในรอบแรกแล้วจึงเพิ่มให้สูงขึ้นอีก 30-40 รอบ ในการทำพีซีอาร์ช่วงหลัง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใส่นิวคลีโอไทด์ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีลงไป แล้วจึงแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจล ตรวจสอบผลโดยทำออโตเรดิโอกราฟ ซึ่งนับเป็นวิธีที่ยุ่งยากที่สุด

การวิเคราะห์ผลจากวิธีอาร์เอพีดีหากมีการใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่มีเบสเป็นคู่สมกัน (complementary) โดยไม่จำเป็นต้องทราบว่าไพรเมอร์จะไปเกาะกับดีเอ็นเอส่วนใดบนโครโมโซมใด โอกาสที่จะพบลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับไพรเมอร์คือ 1 ใน 4^{10} โดยประมาณ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอโดยเกิดคู่สมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดมีสัดส่วนเท่า ๆ กันในจีโนมสามารถประมาณค่าของจำนวนแถบดีเอ็นเอที่จะเกิดขึ้นจากไพรเมอร์ 1 ชนิดได้จากสมการ

$$b = (2{,}000 \times 4^{-2n}) \times C$$

เมื่อ b คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่คาดหมายในหนึ่งไพรเมอร์

n คือความยาวของไพรเมอร์คิดเป็นจำนวนนิวคลีโอไทด์

C คือค่าขนาดของจีโนมหรือค่า C value

การเกิดแถบดีเอ็นเอเป็นผลมาจากไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้หลายบริเวณถ้าไพรเมอร์ไปเกาะกับดีเอ็นเอ 2 บริเวณที่อยู่ไม่ไกลกันมาก โดยเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายในทิศทางเข้าหากัน (5'→3') จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงดังกล่าวได้ แต่หากไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอสายเดียวกันในทิศทางเดียวกัน หรือเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายแต่ทิศทางแยกออกจากกัน หรือเกาะได้ใน 2 สายที่ห่างไกลกันมากแม้ทิศทางจะเข้าหากันก็ไม่สามารถทำให้เกิดผลผลิตได้ ความแตกต่างของแถบอาร์เอพีดีหรือโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นระหว่างแต่ละตัวอย่างอาจเกิดจาก

1) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่มาสอดแทรกในระหว่างตำแหน่ง 2 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะทำให้ไพรเมอร์ทั้งสองโมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

2) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอส่วนที่เป็นที่เกาะกับไพรเมอร์หายไปหนึ่งตำแหน่งหรือทั้ง 2 ตำแหน่งทำให้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอจากบริเวณดังกล่าว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3) มีการแทนที่หรือเปลี่ยนแปลงเบสบริเวณที่เป็นที่เกาะของไพรเมอร์ทำให้ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายไม่ได้จึงเกิดแถบดีเอ็นเอ

4) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กสอดแทรกเข้ามาหรือหายไปทำให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเปลี่ยนแปลงไป

โพลีมอร์ฟิซึมของอาร์เอพีดีมักเกิดขึ้นในลักษณะการมี และไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ มากกว่าการเปลี่ยนขนาดของแถบดีเอ็นเอ เนื่องจากดีเอ็นเอของพืชพบทั้งจากนิวเคลียส คลอโรพลาสต์ และไมโตคอนเดรีย ในการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ทั้งหมดนำมาวิเคราะห์ อาร์เอพีดีพบว่าแถบดีเอ็นเอบางส่วนประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของไมโตคอนเดรีย และน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์มาจากดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ ดังนั้นแถบดีเอ็นเอเครื่องหมายอาร์เอพีดี (RAPD marker) ส่วนใหญ่จึงมาจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส ซึ่งมีการถ่ายทอดมาจากทั้งฝ่ายพ่อและฝ่ายแม่ แม้ว่าเทคนิคอาร์เอพีดีสามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลมาก แต่มีข้อเสียในเรื่องการทดลองซ้ำ บางครั้งได้ผลที่ต่างจากเดิมเนื่องจากอาร์เอพีดีมีความไวต่อการเปลี่ยนสภาวะต่าง ๆ จึงต้องระมัดระวัง และควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ นอกจากนี้แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากอาร์เอพีดียังแสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต และเฮเทอโรไซโกตได้

เทคนิคอาร์เอพีดีเป็นวิธีที่เหมาะสมในการศึกษาทางด้านแมลง ซึ่งมีข้อมูลทางพันธุกรรมน้อย เป็นเทคนิคที่ใช้ดีเอ็นเอในปริมาณน้อย จึงใช้ศึกษาแมลงที่มีขนาดเล็กมาก ๆ ได้ อีกทั้งวิธีการนี้ยังให้ผลที่รวดเร็วในราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางอณูพันธุศาสตร์อื่น ๆ (Hadrys et al., 1992) สามารถนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายในงานด้านกีฏวิทยาหลายด้าน เช่น งานวิจัยเกี่ยวกับโครงสร้างประชากรในระบบนิเวศวิทยา การค้นพบแมลงชนิดใหม่ การศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในประชากรแมลง เป็นต้น (Jain *et al*., 2010) เทคนิคอาร์เอพีดีทำได้ง่าย และรวดเร็ว ซึ่งเป็นวิธีการพื้นฐานที่ดีสำหรับผู้เริ่มต้นทำงานด้านดีเอ็นเอ วิธีปฏิบัติเริ่มจากการเก็บตัวอย่างที่ต้องการศึกษามาสกัดดีเอ็นเอ วัดปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ ตรวจสอบคุณภาพ และเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์แบบสุ่มเลือกไพรเมอร์หลาย ๆ ชนิด เมื่อเลือกได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมแล้ว จึงวิเคราะห์อาร์เอพีดีจากตัวอย่างและวิเคราะห์ผลที่ได้

2.7 การวิเคราะห์ผลอาร์เอพีดี

แถบดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนอิเล็กโทรโฟรีซิสสามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างและบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างตัวอย่างได้ด้วย โดยการเปรียบเทียบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความเหมือนและแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ ให้สัญลักษณ์เป็น + หรือให้คะแนนเป็น 1 ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันนั้น ให้สัญลักษณ์เป็น – หรือให้คะแนนเป็น 0 การให้คะแนนแถบดีเอ็นเอจะเกิดปัญหาได้ เช่น แถบดีเอ็นเอในบางแถวจางหรือไม่ชัดเจนหรือตำแหน่งอาจคลาดเคลื่อนจากกันเนื่องจากเจลเกิด smile มีสาเหตุจากแถบดีเอ็นเอที่อยู่ด้านนอกเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าแถบดีเอ็นเอที่อยู่แถวกลาง ในกรณีนี้แถบดีเอ็นเอในแถวใดไม่ชัดเจน ไม่สามารถบอกได้ชัดเจน ให้แก้ไขโดยตัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าวออกไปไม่นำมาคิดคะแนน การให้คะแนนหรือตรวจดูแถบดีเอ็นเอนี้อาจดูด้วยสายตาหรือใช้เครื่องอ่านก็ได้ เปรียบเทียบความเหมือนของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละคู่โดยใช้ค่า similarity index (S) ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$S = 2 \times N_{ab} / (n_a + n_b)$$

เมื่อ na และ nb แทนจำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่พบในตัวอย่าง a และ b ตามลำดับ

Nab คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันทั้ง 2 ตัวอย่าง

โดย S จะมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดย 0 คือ ตัวอย่างทั้งสองไม่พบแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน และ S = 1 คือ ตัวอย่างทั้งสองมีแถบดีเอ็นเอเหมือนกันทั้งหมด นอกจากการคำนวณค่า S แล้ว สามารถศึกษาความสัมพันธ์ของแต่ละตัวอย่างโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ยกตัวอย่างเช่น PAUP (phylogenetic analysis using parsimony) UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average) เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved