บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

บทบาทของข้าวพื้นเมืองในประเทศไทย

ประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นใกล้เส้นศูนย์สูตร และเนื่องจากบริเวณประเทศไทยมีการทำนาข้าวมาแล้วกว่า 5,000 ปี จึงทำให้ประเทศไทยมีความหลากหลายของชนิดข้าว และพันธุ์ข้าวสูง โดยเฉพาะข้าวพื้นเมืองเป็นข้าวที่มีความสำคัญ และมีการปลูกนิยมอย่างต่อเนื่องในประเทศไทยซึ่งสามารถจำแนกการปลูกตามระบบนิเวศน์ ได้แก่ ข้าวไร่ เป็นข้าวที่ปลูกในสภาพอาศัยน้ำฝนตามธรรมชาติภายในสภาพไร่หรือดอน ไม่มีการทำคันนา และไม่มีน้ำขังหน้าดิน พันธุ์ข้าวที่ปลูกส่วนใหญ่จะเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ค่อนข้างทนต่อความแห้งแล้ง และมีความแปรผันสูง เช่น ข้าวดอแก้ว ฮ้าวแดง หอมอ้นเหลืองเบา ลายเห็น และกำดาดไร่ เป็นต้น ข้าวนาวน เป็นข้าวที่ปลูกโดยทั่วไปบริเวณน้ำขังหรือเก็บกักน้ำได้ในกระทงนา การปลูกข้าวสวนนี้จะใช้ข้าวพันธุ์ปรับปรุงเป็นส่วนใหญ่ แต่มีการใช้ข้าวพันธุ์พื้นเมืองอยู่บางอย่าง เช่น ข้าวนางมล ขาวปากหม้อ ขาวกอเดียว เล็บนก และลูกแดง เป็นต้น และสุดท้ายข้าวขึ้นน้ำหรือข้าวฟางลอย เป็นข้าวที่ปลูกโดยไม่มีกระทงนากั้นมีระดับน้ำที่สูงสุดประมาณ 1 – 4 เมตร พันธุ์ข้าวที่ใช้ปลูกส่วนใหญ่เป็นข้าวพันธุ์พื้นเมือง และข้าวพันธุ์ปรับปรุงที่ได้จากการคัดเลือกพันธุ์พื้นเมือง เช่น ข้าวนางเขียว ปิ่นแก้ว และเล็บมือนาง เป็นต้น (สงกรานต์, 2537)

ความหมาย และลักษณะที่สำคัญของพืชพันธุ์พื้นเมืองท้องถิ่น

พืชพันธุ์พื้นเมืองท้องถิ่น (landraces, local, traditional, folk or farmer varieties) เป็นพืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแบบ heterogeneous มีรูปร่างลักษณะภายนอกที่เห็นได้ชัดเจนและได้สามารถจำแนกออกจากกันได้โดยอาศัยลักษณะเฉพาะทางภายนอก และชาวนามีชื่อเรียกพันธุ์ของตนเองโดยเฉพาะ พันธุ์พื้นเมืองจะมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเกษตรแบบดั้งเดิม และพันธุ์พื้นเมืองที่แตกต่างกันจะปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมท้องถิ่นได้แตกต่างกันด้วย เช่นการปรับตัวในสภาพดินที่ต่างกัน มีระยะเวลาสุกแก่ ความสูง ฤดูการเพาะปลูก โรคแมลง และลักษณะอื่นๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

แตกต่างกัน (Harlan, 1992) ซึ่งชาวนาจะตั้งชื่อพันธุ์แตกต่างกันไปตามลักษณะเด่นที่เห็น บางครั้งชื่อพันธุ์ที่ชาวนาตั้งขึ้นต่างกันพบว่าเป็นพันธุ์เดียวกัน ในทางตรงกันข้ามชื่อพันธุ์เดียวกันอาจเป็นคนละพันธุ์ (Watabe, 1967) และจากความหลากหลายของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยคาดว่าน่าจะมีพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทยมากกว่านี้ เพราะยังมีพันธุ์ข้าวพื้นเมืองอีกมากที่ยังไม่ได้มีการศึกษาหรือรวบรวมพันธุ์ไว้ พันธุ์ข้าวพื้นเมืองของไทยจะมีการตั้งชื่อพันธุ์ตามความพอใจของเจ้าของ จะตั้งตามสถานที่ที่พบหรือที่เก็บมา ตามลักษณะรูปพรรณสัณฐานที่พบ โดยไม่มีการประเมินคุณลักษณะประจำพันธุ์ทางด้านวิชาการมาก่อน ดังนั้นจึงมีโอกาสที่จะเป็นพันธุ์ที่ซ้ำกันได้ (ฉวีวรรณ, 2543) เช่นในภาคเหนือของไทยพันธุ์ข้าวพื้นเมืองที่ปลูกมีชื่อเรียกแตกต่างกันอย่างมากมาย เช่นข้าวแก้วขี้แฮะ (สูงแต่ต้นแข็งไม่ล้ม) ข้าวลังเก๋า ข้าวมะตาล (เหนียวติดรวงไม่หล่นแต่ข้าวสารเมล็ดใหญ่ รสชาติอร่อย) ข้าวมะน่ำ ข้าวลายน้อย ข้าวน่ำฝาง ข้าวผาหมี (ข้าวดอก) ข้าวควายหาย (รสชาติอร่อย) ข้าวดอกดู่ (ข้าวหอม) ข้าวช้างดอ ข้าวซิวตอง (ข้าวแดงหอม รสชาติอร่อย) ซึ่งความหลากหลายของชื่อพันธุ์ดั้งเดิมเหล่านี้ หมายถึงความหลากหลายของลักษณะประจำพันธุ์อย่างมากมาย ปัจจุบันข้าวพันธุ์พื้นเมืองได้สูญหายไปมาก เพราะเกษตรกรนิยมปลูกข้าวพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงทำให้พื้นที่ปลูกข้าวพันธุ์ลดลง ความแตกต่างของพันธุ์ข้าวลดลง ซึ่งทำให้ความหลากหลายของพันธุ์ข้าวลดลงด้วย ความหลากหลายของพันธุ์ข้าวพื้นเมืองเป็นแหล่งพันธุกรรมที่สำคัญในการสร้างและพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ ดังนั้นจึงต้องมีการเก็บรวบรวมและอนุรักษ์พันธุ์พื้นเมืองไว้ก่อนที่พันธุกรรมจะสูญหายไป (ดำเนิน, 2543)

ข้าวเหนียวดำพันธุ์พื้นเมือง และความสำคัญ

ข้าวเหนียวดำ หรือที่เรียกภาษาพื้นเมืองของทางเหนือว่า ข้าวก่ำ เป็นการเรียกตามลักษณะสีของเมล็ดที่มีสีม่วงดำหรือแดงก่ำ นิยมปลูกมากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย นอกจากนี้ข้าวเหนียวดำมีลักษณะเป็นข้าวพันธุ์ไวแสงและเป็นข้าวเหนียวปลูกได้เฉพาะนาปี นอกจากนี้ข้าวเหนียวดำพันธุ์พื้นเมืองยังมีความสามารถในการทนแล้ง ต้านทานต่อเพลี้ยจักจั่นสีเขียว (วิไลลักษณ์, 2541)ซึ่งลักษณะเฉพาะที่แตกต่างไปจากข้าวทั่วไปที่เห็นได้อย่างชัดเจนคือการปรากฏของสีม่วงบนส่วนต่างๆ ของต้น เช่น กาบใบ แผ่นใบ กลีบดอก เปลือกเมล็ด และเยื่อหุ้มเมล็ดเป็นต้น ซึ่งคุณค่าทางอาหารของข้าวเหนียวก่ำ ประกอบด้วยปริมาณโปรตีน ไขมัน ฟอสฟอรัส โปตัสเซียม และแคลเซียม ทั้งในส่วนของเปลือก และข้าวกล้อง พบว่าโดยส่วนใหญ่แล้วกลุ่มข้าวเหนียวก่ำมีปริมาณธาตุอาหารทั้ง 5 ชนิดในข้าวกล้องสูงกว่ากลุ่มข้าวขาว ซึ่งข้าวเหนียวก่ำมีโปรตีนโดยรวมสูงกว่าข้าวขาว (ดำเนินและศันสนีย์, 2543) นอกจากนี้ยังพบรงควัตถุสีม่วง (anthocyanin)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่พบในข้าวก่ำนั้น เป็นโครงสร้างพื้นฐานของ anthocyanins และ anthocyanidins ซึ่งเป็นมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (anthioxidant) โดยเฉพาะในข้าวก่ำที่เก็บรวบรวมไว้ ในหน่วยวิจัยข้าวก่ำ สาขาวิชาพืชไร่ ภาควิชาพืชศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่นั้น จากการศึกษาของ (จักรกฤษณ์, 2550) พบว่าข้าวก่ำที่เก็บรวบรวมไว้นั้นมีปริมาณของ anthocyanin สูงถึง 265.01 mg/100g grain และการถ่ายทอดรงควัตถุ anthocyanin ไปยังข้าวพันธุ์อื่นนั้น สามารถทำได้ง่าย เนื่องจากลักษณะของสีม่วงที่ปรากฏบนส่วนต่างๆ ของข้าวก่ำนั้น ถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนน้อยคู่และมีลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นแบบคุณภาพ (สุณิสา, 2542) แอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นรงควัตถุที่สำคัญในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ ที่ทำให้เกิดสีแดงจนถึงสีม่วงหรือสีน้ำเงิน ซึ่งทำให้เกิดสีที่ปรากฏบนส่วนต่างๆของต้นข้าวเหนียวดำส่วนใหญ่จะพบรงควัตถุ และให้สีในส่วนของลำต้น ใบ และเกือบทุกส่วนของช่อดอก

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) คือความแตกต่างของสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ที่มีอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งจะมีหน่วยพันธุกรรมหรือยีน (gene) รูปแบบต่างๆ ที่แตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด รวมถึงความแปรปรวน (variance) ระหว่างพันธุ์ (between varieties) หรือภายในประชากรของพันธุ์ (within population) ซึ่งลักษณะแตกต่างทาง phenotype ที่เกิดจากยีน ควบคุมต่างกันทำให้เกิดความแตกต่างของพันธุกรรม (genotype) ความแตกต่างเหล่านี้หากมีปริมาณมากเรียกว่าเป็นความหลากหลายทางพันธุกรรม และจะเพิ่มขึ้นหากมีการแตกต่างของลักษณะการผสมพันธุ์ และการแพร่กระจายของสายพันธุ์นั้นๆ (Oka, 1991) ความหลากหลายทางพันธุกรรม สามารถประเมินได้จากความแตกต่างทางลักษณะสัณฐาน และสรีระ (morphological) ความแตกต่างทางชีวเคมี (biochemical) และความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอ (molecular) (Chawla, 2000) และด้วยความก้าวหน้าทาง molecular genetic ในปัจจุบันทำให้สามารถวัดความหลากหลายได้ถึงในระดับยีน การวัดความหลากหลายของยีนทั้ง DNA sequences และ DNA markers ทั้งภายในและระหว่างประชากรนั้น ช่วยให้เข้าใจโครงสร้างและ dynamics ของความหลากหลายด้วย (Rerkasem and Rerkasem, 2002) ซึ่งในข้าวนั้นเทคนิคในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมนั้นมีมากมายทั้งทาง morphological characterization, biological characterization และ molecular makers (Brush, 2003)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในการศึกษาของวิชุตา (2551) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวไร่พันธุ์พื้นเมืองของชาวเขาเผ่าอาข่าที่ บ้านอะโยะใหม่ อ.แม่ฟ้าหลวง จ.เชียงราย จำนวน 15 ประชากร พบความหลากหลายในลักษณะต่างๆเช่น ลักษณะของสีปล้อง สีข้อต่อใบ สีเขี้ยวกันแมลง สียอดเกสรตัวเมีย สียอดดอก ทรงกอ อายุดอก อายุเก็บเกี่ยว และใช้เทคนิค microsatellite จำนวน 4 ตำแหน่ง พบความหลากหลายทั้งภายใน และระหว่างประชากร โดยความแปรปรวนของประชากรทั้งหมดเกิดจากความแปรปรวนจากประชากรมากว่าภายในประชากร และภายในชื่อพันธุ์เดียวกัน จักรกฤษ์ (2550) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของคุณภาพเมล็ดในข้าวเหนียวก่ำพันธุ์พื้นเมือง จำนวน 19 พันธุ์ พบว่าปริมาณไซยานิติน 3-กลูโคไซด์ ในข้าวก่ำแต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกันทั้งภายในและระหว่างประชากร ส่วนปริมาณอะไมโลส และกรดอะมิโน และพบลักษณะของสีเปลือกเมล็ดที่พบจะมีสีฟางและม่วง ลักษณะสีม่วงที่ปรากฏจะมีความเข้มที่ต่างกัน ซึ่งมีความแตกต่างไปแต่ละพันธุ์ Khampheng (2003) ได้ศึกษาความหลากหลายของข้าวพันธุ์พื้นเมืองใน 3 หมู่บ้านของจังหวัดหัวพันสาธารณรัฐประชาชนลาว พบพันธุ์ข้าวที่ปลูกใน 3 หมู่บ้านรวม 19 พันธุ์ พบว่ามีความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาทั้งภายในประชากรและระหว่างประชากร การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช จากลักษณะภายนอกที่มองเห็นทำให้เข้าใจถึงความหลากหลายของพืชในระดับแปลงเกษตรกรได้อย่างรวดเร็ว และควรทำการยืนยันว่าลักษณะความหลากหลายที่พบจะมีการสืบทอดสู่ชั่วต่อไปได้ (progeny test) และวิเคราะห์พันธุกรรมระดับโมเลกุลซึ่งจะบอกได้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มองไม่เห็น

การใช้เครื่องหมายโมเลกุล microsatellites ในการศึกษาความหลากหลายในข้าว

Microsatellites หรือ simple sequence repeat (SSR) เป็นการซ้ำกันของลำดับเบสช่วงสั้นๆ เพียง 1-4 คู่เบสหรือไม่เกิน 10 คู่เบส ส่วนที่ซ้ำกันจะเกิดกระจายทั่วจีโนมของพืช ในพืชแต่ละพันธุ์จะพบการซ้ำที่ไม่เท่ากันซึ่งสามารถใช้บอกความแตกต่างของพันธุ์พืชได้ microsatellites จะให้ข้อมูลความแตกต่างระหว่างพันธุ์ ความหลากหลายของอัลลีลสูง (high informative, high polymorphism and high level of allelic diversity) ในข้าวนั้นมี microsatellites อยู่เป็นจำนวนมากและจะพบกระจายอยู่ทั่วจีโนม (McCouch *et al*., 1997) จึงถูกใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาความหลากหลายของข้าว Zhang *et al*. (2002) ได้ใช้เทคนิค microsatellites ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ของข้าวพันธุ์พื้นเมืองระหว่าง *Oryza sativa* L. ssp *indica* และ *japonica* จำนวน 113 ตัวอย่าง ที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ ในมลฑลยูนานของประเทศจีน พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *japonica* สูงกว่า *indica* และทางตะวันออกเฉียงใต้ของยูนานมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด และต่ำที่สุดในทางตะวันออกเฉียงเหนือของยูนาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Bajracharya *et al.* (2005) ได้ใช้เทคนิค microsatellites ร่วมกับการเก็บรวบรวมลักษณะทางพืชไร่ที่สำคัญ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมือง ที่ปลูกที่ Jumla ของเนปาลซึ่งเป็นพื้นที่สูง (high altitude) ที่มีชื่อพันธุ์และลักษณะ phenotype ต่างกัน โดยพบว่าข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ทำการศึกษามีความหลากหลายของลักษณะสัณฐานวิทยาที่ต่ำ และมีฐานพันธุกรรมที่แคบ และในการศึกษาของ พจนีย์ (2549) ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพื้นเมืองที่มีชื่อเหมือนกันคือพันธุ์เหมยนอง ที่มาจากท้องถิ่นเดียวกัน และต่างท้องถิ่นจำนวน 83 ตัวอย่างโดยใช้เทคนิค microsatellites ร่วมกับการประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าข้าวพื้นเมืองพันธุ์เหมยนองมีความหลากหลายทั้งภายใน และระหว่างประชากรในแต่ละท้องถิ่นโดยพบความแตกต่างทั้งในลักษณะทางสัณฐานวิทยาไปจนถึงในระดับโมเลกุล และในการศึกษาของทรายแก้ว (2547) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวพันธุ์พื้นเมืองกะเหรี่ยง ของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่จำนวน 22 พันธุ์ โดยการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร และระหว่างประชากรในลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา โดยพบความหลากหลายในข้าวที่มีชื่อเหมือนกันจนไปถึงในระดับโมเลกุล และBounphanousay (2007) ได้ทำการศึกษาการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวเหนียวดำของประเทศ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว จำนวน 53 พันธุ์ ได้ทำการศึกษาประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค microsatellites จำนวน 24 คู่ไพรเมอร์ สามารถพบอัลลีลทั้งหมด 75 อัลลีล จำนวนอัลลีลของกลุ่มพันธุ์ข้าวเหนียวดำนี้มีค่าระหว่าง 2 ถึง 7 อัลลีลต่อโลกัสโดยมีค่าเฉลี่ย 3.13 อัลลีล และสามารถจัดกลุ่มข้าวเหนียวดำได้เป็น 3 กลุ่มโดยกลุ่มที่ 1 เป็นชนิด *tropical japonica* กลุ่มที่ 2 เป็นชนิด *indica* ที่กระจายตัวในแถบภาคกลางของประเทศลาว และกลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่มีจำนวนพันธุ์มาก เป็นชนิด *indica* ซึ่งเป็นกลุ่มพันธุ์ที่กระจายตัวอยู่ทั่วประเทศ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณยีนหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอเฉพาะบริเวณที่ต้องการศึกษาให้มีมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลองในเวลาอันสั้น ซึ่งเป็นการจำลองตัวเองของสายดีเอ็นเอใสภาพธรรมชาติ ทางด้านพันธุศาสตร์พืชและสัตว์ต่างๆ มีการนำเทคนิค PCR มาเป็นเครื่องมือที่สำหรับวิเคราะห์ศึกษาด้านการปรับปรุงพันธุ์โดยการพัฒนา molecular marker การศึกษารูปแบบของ DNA fingerprint แบบต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพื่อให้ทราบถึงลักษณะทางพันธุกรรม ใช้ประโยชน์ในการจำแนกอนุกรมวิทาน และศึกษาวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship) (อังสนา, 2547)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction) หรือ พีซีอาร์ เป็น เทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่น โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน สามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจโดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์ หรือนำไปโคลน การทำพีซีอาร์คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอนเอโพลีเมอเรสซ้ำกันหลายๆ รอบเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ

การทำพีซีอาร์ ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจทราบลำดับเบสทั้งหมดหรือ ทราบเฉพาะส่วนปลายก็ได้ เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพร์เมอร์มาใช้ในการปฏิกิริยาที่ไป บริเวณหรือส่วนดีเอ็นเอที่เกิดจากการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณมากขึ้น จะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลาย 5’ ของไพร์เมอร์หนึ่งจนถึงปลาย 5’ ของไพร์เมอร์อีกชนิดหนึ่งนั้นเอง

ไพร์เมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทม์ความยาวประมาณ 20-35 เบส วิธีทำคือ สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ นำมาใส่รวมกับไพร์เมอร์ บัฟเฟอร์ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟส (dNTP) ทั้ง 45 ชนิด ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกเป็นสายเดี่ยว (de-naturation) โดยใช้ความร้อนแล้วลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ไพร์เมอร์มีเบสเป็นคู่กันกับส่วนปลายของชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) ขั้นสุดท้าย จึงเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส พร้อมทั้งใส่เอนไซม์ลงในปฏิกิริยา เอนไซม์จะทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพร์เมอร์ (Primer extension) โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาเป้าหมายดำเนินไปจนครบ 3 ขั้นตอน โมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มเป็นสองเท่า เช่น จากเดิมมี 1 โมเลกุล เป็น 2 4 8,... เท่าไปเรื่อยๆ จนถึง 2n เท่าเมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ในแต่ละรอบ (cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอน Denaturation

เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 ° C ถ้าใช้อุณหภูมิต่ำ และหรือสั้นเกินไป จะทำให้การแยกสายแม่พิมพ์ไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ประสิทธิภาพการทำ พีซีอาร์ ลดลง โดยทั่วไปการ denature ที่ 94 - 95°C เป็นเวลา 20 วินาที ก็เพียงพอสำหรับการแยกสายแม่พิมพ์อย่างสมบูรณ์ แต่ในทางปฏิบัติจริงๆ เวลาที่ใช้อาจปรับเปลี่ยน ตามความเหมาะสมขึ้นกับลักษณะความซับซ้อน (complexity) ของแม่พิมพ์ลักษณะและขนาดของหลอดพีซีอาร์ ปริมาตรของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ชนิดของเครื่อง thermocycler ที่ใช้ ในกรณีแม่พิมพ์ที่มี GC content สูง อาจต้องใช้เวลา denature นานขึ้น หรือใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้น การเติม glycerol ลงไป เพื่อกันการระเหยของน้ำ พยายามหลีกเลี่ยงการใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปหรือนานเกินไป เนื่องจากจะทำให้ activity ของ polymerase ลดลง

2. ขั้นตอน Annealing

เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50 - 55°C เพื่อให้ ไพร์เมอร์ สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยว ตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม ขั้นตอนนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพ และความจำเพาะในการทำพีซีอาร์โดยทั่วๆ ไปสามารถทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยการหาค่า Tm ของ ไพร์เมอร์ โดยการใช้ software หรือสูตรคำนวณ ได้ดังนี้ Tm = 4 (G+C) + 2(A+T) ซึ่งจะได้ค่า Tm อย่างคร่าวๆ จากนั้นเปรียบเทียบการทำพีซีอาร์ โดยใช้อุณหภูมิขั้นตอน annealing ที่ต่างกันประมาณ 2°C หลายๆ อุณหภูมิ โดยใช้ค่า Tm - 5°C เป็นอุณหภูมิหลัก การใช้อุณหภูมิต่ำเกินไป ทำให้การ annealing อย่างไม่จำเพาะเกิดขึ้นอย่างมากมาย แต่ถ้าใช้อุณหภูมิสูงเกินไป การ annealing จะเกิดขึ้นน้อยหรือไม่มีเลย

3. ขั้นตอน Primer extension

เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจากไพร์เมอร์ในทิศทาง 5′ ไป 3′ อุณหภูมิขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70 - 75°C ช่วงเวลาที่ใช้ขึ้นกับความยาว และความเข้มข้นของสายแม่พิมพ์รวมทั้งอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาด้วย การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 20 – 30 รอบ ทำให้ได้ PCR product หรือ amplified product เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก

การเปลี่ยนแปลงของ allele frequency

สำหรับ ปัจจัยต่างๆ ที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ allele frequency ในประชากรสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ปัจจัยหลักๆ ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม หรือการกลายพันธุ์ (mutation) การคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรม (selection) การเปลี่ยนแปลงแบบไร้ทิศทางของลักษณะทางพันธุกรรมในประชากร (genetic drift) และการถ่ายเทลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างประชากร (gene flow)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม หรือการกลายพันธุ์ เป็นกระบวนการที่ก่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรโดยการสร้าง อัลลีลใหม่ในประชากร หรือเพิ่มอัลลีล frequency ของอัลลีลหนึ่งในประชากร กระบวนการนี้นับได้ว่าเป็นปัจจัยเบื้องต้นของกระบวนการอื่นๆ ที่จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่ของลักษณะทางพันธุกรรมในประชากร และอาจส่งผลให้เกิดวิวัฒนาการในสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้ โดยมากกระบวนการนี้มักเกิดขึ้นแบบ random ลักษณะของการกลายพันธุ์ หากลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้จากการกลายพันธุ์มีลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิต (increase fitness) ลักษณะทางพันธุกรรมนั้นก็จะถูกคัดเลือกไว้ในประชากรและถูกถ่ายทอดสู่ประชากร รุ่นถัดไป ซึ่งจะเป็นการเพิ่มความถี่ของลักษณะทางพันธุกรรมที่ถูกคัดเลือกไว้ แต่หากลักษณะทางพันธุกรรมที่ได้มีลักษณะที่เป็นโทษต่อสิ่งมีชีวิต (decrease fitness) เช่น การกลายพันธุ์ของยีนที่ทำให้เกิดโรคต่างๆ ลักษณะทางพันธุกรรมนั้นก็มักจะถูกคัดทิ้งจากประชากรและไม่ให้มีการถ่ายทอด สู่ประชากรรุ่นถัดไป ซึ่งจะเป็นการลดความถี่ของลักษณะทางพันธุกรรมที่ถูกคัดทิ้งนั่นเอง กระบวนการคัดเลือกหรือคัดทิ้งเหล่านี้ก็คือกระบวนการคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรม (selection) จะสังเกตได้ว่าทั้งการกลายพันธุ์ และการคัดเลือกลักษณะทางพันธุกรรมส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของความถี่ของลักษณะทางพันธุกรรมหนึ่งๆ อย่างมีทิศทาง สามารถทำนายได้ค่อนข้างแม่นยำคือถ้าไม่เพิ่ม ก็จะลดความถี่ของลักษณะทางพันธุกรรมที่สนใจ

การเปลี่ยนแปลงของความถี่ของลักษณะทางพันธุกรรมในธรรมชาติ เกิดขึ้นแบบไร้ทิศทาง (random) การเปลี่ยนแปลงแบบนี้มักพบในประชากรที่มีขนาดเล็ก โดยเกิดจากความผิดพลาดในการสุ่มเลือกลักษณะทางพันธุกรรมในประชากร ผลที่ได้อาจทำให้เกิดการเพิ่มความถี่ของลักษณะทางพันธุกรรมที่เป็นโทษ หรือการลดความถี่ของลักษณะทางพันธุกรรมที่เป็นประโยชน์ต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมี ชีวิตในประชากรนั้นๆ การจะทำนายว่าความถี่ของลักษณะทางพันธุกรรมหนึ่งๆ ในประชากรที่การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมถูกควบคุมโดยอิทธิพลของ การเปลี่ยนแปลงแบบไร้ทิศทางของลักษณะทางพันธุกรรมในประชากร นี้จะเพิ่มหรือลด จะคิดออกมาในรูปแบบของความน่าจะเป็น (probability) แต่ผลระยะยาวของ การเปลี่ยนแปลงแบบไร้ทิศทางของลักษณะทางพันธุกรรมในประชากร นั้นค่อนข้างแน่นอน คือจะลดความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างสมาชิกในประชากรหนึ่งๆ แต่จะเพิ่มความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ซึ่งก็เป็นหนทางหนึ่งที่ทำให้เกิดวิวัฒนาการในสิ่งมีชีวิตต่างๆ ได้เช่นกัน การจะสมดุลความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของสิ่งมีชีวิตเดียวกัน สามารถทำได้โดยการถ่ายเทลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างประชากร การถ่ายเทนี้เกิดจากการอพยพของสมาชิกของประชากรจากที่หนึ่งไปสู่อีกที่หนึ่ง โดยที่สมาชิกเหล่านี้สามารถอยู่รอดและถ่ายทอดลักษณะทาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธุกรรมของตนเองไป สู่ประชากรรุ่นถัดไปในที่ใหม่ได้ ดังนั้น ผลของการถ่ายเทลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจะเป็นไปในทิศทางตรงกันข้าม กับการเปลี่ยนแปลงแบบไร้ทิศทางของลักษณะทางพันธุกรรมในประชากร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved