การตรวจเอกสาร

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง *(Doritis)* เป็นกล้วยไม้ที่มีการกระจายพันธุ์อยู่ในพม่า ไทย ลาว กัมพูชา มาเลเซีย และอินโดนีเซีย เป็นกล้วยไม้ที่ไม่แตกกอ ชอบขึ้นอยู่ตามพื้นดินและแอ่งหินที่มีอินทรียวัตถุทับถมกันหนาๆ ใบแบนสีเขียวหรือสีเขียวอมม่วง ช่อดอกตั้ง ก้านช่อยาวประมาณ 1-2 ฟุต ดอกมีสีแดงอมม่วง โดยมีตั้งแต่สีชีดๆไปจนถึงสีเข้ม ลักษณะการบานของดอกจะทยอยบานกันขึ้นไป คือ ก้านช่อยืดยาวออกไปเรื่อยๆ เมื่อดอกบนบาน ดอกล่างค่อยๆโรยไปแต่มีดอกติดช่อหลายดอก (สำอาง, 2548) ประเทศไทยเป็นแหล่งกำเนิดทางธรรมชาติของกล้วยไม้สกุลนี้ ซึ่งประกอบด้วย กล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima*) พบในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima var. buyssoniana*) เป็นสายพันธุ์ย่อย (variety) มีดอกใหญ่กว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งทั่วไป พบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย โดยเฉพาะบริเวณจังหวัดอุบลราชธานี และจังหวัด ศรีสะเกษ และมีอีกชนิดหนึ่งซึ่งพบมากทางภาคใต้ของไทย คือ กล้วยไม้ม้าบิน (*Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis*) โดยทั้งสามพันธุ์นี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและความโดดเด่นของดอกที่แตกต่างกัน (ระพี, 2530) คือ กล้วยไม้ม้าวิ่งดอกมีขนาดเล็ก กลีบดอกลู่ไปทางด้านหลัง ทำให้เห็นเส้าเกสรได้ชัดเจน สีของกลีบดอกมีความหลากหลายมีตั้งแต่สีขาวไปถึงสีม่วงเข้ม ส่วนกล้วยไม้แดงอุบลดอกจะมีขนาดใหญ่กว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งเกือบเท่าตัว ลักษณะดอกผึ่ง สีของดอกมีตั้งแต่สีม่วงอ่อนไปจนถึงสีม่วงเข้ม และกล้วยไม้ม้าบิน ลักษณะของกลีบดอกชั้นในมีความสวยงาม และมีลักษณะคล้ายปีก กล้วยไม้ในสกุลม้าวิ่งส่วนใหญ่นิยมนำไปผสมกับสกุลฟาเลนอปซิส ได้สกุลใหม่ว่า โดไรเตนอปซิส (*Doritaenopsis*) นอกจากนี้ยังมีการนำไปผสมกับสกุลอื่นอีก เช่น สกุลเข็ม แวนด้า และช้าง เป็นต้น

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง

กล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง (*Doritis*) เป็นกล้วยไม้สกุลเล็กๆ และมีเพียงไม่กี่ชนิดในโลก จัดเป็นกลุ่มที่มีการเจริญเติบโตทางยอด (monopodial) มักขึ้นเป็นกอใหญ่บนลานหิน ซอกผาหิน หรือลานดินกว้างบนเขาสูง ที่ค่อนข้างแห้งแล้ง หรือผิวดินร่วนในบริเวณที่มีต้นไม้เตี้ยๆและโปร่ง บังร่มเล็กน้อย ลำต้นรูปทรงกระบอกสูงประมาณ 5-12 เซนติเมตร มีหลายข้อ ใบเป็นรูปรี ขอบขนาดกว้าง 2-4 เซนติเมตร ยาว 7-12 เซนติเมตร ออกที่ข้อ มีหลายใบ เรียงสลับระนาบเดียว ใบหนาและค่อนข้างแข็ง ใบอ่อนพับออกตามยาว มีอายุหลายฤดู กาบใบติดคาต้น มีสีเขียวถึงสีแดงคล้ำ ดอกมีลักษณะเป็นช่อยาวและตั้งตรง ก้านช่อดอกยาว 20-50 เซนติเมตร แต่ละช่อประกอบด้วยดอกย่อยจำนวนมาก เรียงเวียน กลีบเลี้ยง และกลีบดอกเป็นสีม่วงอ่อน หรือสีม่วงแดง ใบประดับไม่หลุดร่วง ช่อดอกก้านดอก และรังไข่เกลี้ยง กลีบเลี้ยงและกลีบดอกแยกเป็นอิสระ กลีบเลี้ยงจะลู่ไปทางด้านหลัง ทำให้เวลาดอกบานแล้วดูคล้ายหัวม้ากำลังวิ่งตะบึง จึงถูกเรียกชื่อตามลักษณะดังกล่าวว่า “ม้าวิ่ง” กลีบ

ปากเป็นสีขาวแซมขึ้นจากโคนกลีบ บางชนิด พันธุ์สีจะแตกต่างกันเห็นได้ชัดเจน มีด้วยกันหลายสี เช่น สีขาว สีเหลือง สีแดง และ สีม่วง (ระพี, 2517)

กล้วยไม้ม้าวิ่ง (*Doritis pulcherrima* LIDL.) เป็นกล้วยไม้สกุลม้าวิ่งมีจำนวนโครโมโซม 2n (2n=2x=38) มีใบยาวประมาณ 6 – 12 เซนติเมตร และกว้างประมาณ 2- 5 เซนติเมตรใบค่อนข้างหนา อวบน้ำในสภาพแหล่งกำเนิดที่ค่อนข้างแห้งแล้ง รูปทรงใบจะค่อนข้างป้อม สีของใบมีทั้งสีเขียวและสีเขียวอมม่วงคล้ำ ทรงต้นเตี้ย มีใบติดที่ต้นประมาณ 1-3 คู่ ช่อดอกเรียวและตั้ง ก้านช่อยาวประมาณ 20-30 เซนติเมตร และส่วนที่มีดอกติดยาวประมาณ 10 เซนติเมตร กลีบดอกทั้งกลีบนอกและกลีบใน สีม่วงชมพูอ่อนๆไปจนถึงสีแดงสด โคนกลีบนอกคู่ล่างทั้งคู่เชื่อมติดอยู่กับฐานของเส้าเกสรประกอบเป็นเดือยดอก ส่วนของเดือยดอกนี้ยาวประมาณ 1 เซนติเมตรโคนปากแคบ มีติ่งเรียวยาวตั้งขึ้นหนึ่งคู่ติดอยู่ใกล้โคนปาก ตรงปลายติ่งมีสีเหลือง ระหว่างกลางของโคนติ่งทั้งคู่มีลิ้นแบนขนาดเล็กมาก แนบติดอยู่กับพื้นของโคนปาก หูปากทั้งสองข้างตั้งขึ้นส่วนแผ่นปากแข็ง เหยียดออกมาทางด้านหน้าของดอก ปลายงอนเล็กน้อย ฤดูดอกบานระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายน กล้วยไม้ม้าวิ่งนี้พบขึ้นอยู่บนพื้นดินทราย ในบริเวณที่ค่อนข้างแห้งแล้งและมีผิวดินร่วนในบริเวณที่มีต้นไม้เตี้ยๆและโปร่ง บังร่มเล็กน้อยเช่นตามพุ่มไม้ หรือกอไผ่ แหล่งกำเนิดธรรมชาติแผ่กระจายอย่างกว้างขวาง ทางภาคใต้บริเวณจังหวัดสงขลาลงไปในแดนประเทศมาเลเซีย พันธุ์ที่พบในแหล่งดังกล่าวมีสีของดอกผิดเพี้ยนกันตั้งแต่สีม่วงชมพูเข้มไปจนถึงสีอ่อนมากและสีขาวขึ้นปะปนกันอยู่ (ระพี, 2517)

กล้วยไม้แดงอุบล (*Doritis pulcherrima* var *buyssonana*) เป็นกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง *(Doritis)* มีจำนวนโครโมโซม 4n (2n=4x=38) มีขนาดดอกใหญ่กว่าสายพันธุ์อื่นในสกุลเดียวกัน ทนต่อความแห้งแล้ง ปลูกเลี้ยงง่าย ก้านช่อดอกยาว จึงมีผู้นำไปผสมข้ามกับกล้วยไม้สกุลอื่นที่มีการเจริญเติบโตและรูปทรงอยู่ในประเภท Monopodium ลักษณะหลักทั่วๆไปของต้น ใบ ดอก และช่อดอกเหมือนกันกับม้าวิ่ง แต่ส่วนต่างๆเหล่านี้มีขนาดใหญ่กว่าส่วนต่างๆของม้าวิ่ง ใบยาวได้ถึง 20 เซนติเมตร สีของใบมีสีเขียวหรือสีเขียวอมม่วงคล้ำ มีจุดเล็กละเอียดสีม่วงคล้ำ หรือสีเขียวแก่กระจายอยู่ทั่วๆไปบนพื้นของใบ ปลายใบเรียวแหลมกว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งเล็กน้อย ดอกสีม่วงชมพูอ่อนๆไปจนถึงสีม่วงชมพูเข้ม ขนาดดอกโตกว่าม้าวิ่งประมาณเกือบเท่าตัว ฤดูดอกบานระหว่างกลางถึงปลายฤดูฝน หรือระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนพฤศจิกายน การกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติหรืออยู่ในภูมิประเทศบริเวณเดียวกันโดยเฉพาะ คือบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เช่น จังหวัดอุบลราชธานี อุดรธานี หนองคาย และอีกบางจังหวัดแถบเทือกเขาถูพานอยู่ตามพื้นดินโขดหิน ในป่าโปร่ง (ระพี, 2517) แต่จะพบมากโดยเฉพาะในบริเวณจังหวัดอุบลราชธานี (ไพบูลย์, 2521; ศรีประไพ และคณะ, 2543)

กล้วยไม้ม้าบิน (*Doritis pulcherrima* var. *chumpornensis*) เป็นกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง *(Doritis)* มีจำนวนโครโมโซม 2n (2n=2x=38) ที่มีการกระจายพันธุ์ทางภาคใต้ ตั้งแต่จังหวัดชุมพรลงไป แต่เดิมนั้นพบได้ตามป่าชายทะเลที่เป็นพื้นทรายตั้งแต่จังหวัดชุมพรลงไปในภาคใต้ แต่ปัจจุบันกล้วยไม้ม้าบินในธรรมชาตินั้นยิ่งหาได้ยากขึ้นทุกวัน ซึ่งเนื่องมาจากการบุกรุก หรือรวมไปถึงการพัฒนาพื้นที่ป่าชายทะเลของมนุษย์นั่นเอง เคยมีข้อมูลหนึ่งกล่าวไว้ว่าสนามบินภูเก็ตในปัจจุบันนี้ ก็คือแหล่งกระจายพันธุ์แหล่งใหญ่แหล่งหนึ่งของม้าบินในอดีต (http://www.bloggang.com/viewblog.php)

ในสภาพธรรมชาติพบว่าปริมาณของกล้วยไม้แดงอุบลได้ลดลงมาก เนื่องจากเป็นอาหารของโคที่ชาวบ้านนำมาเลี้ยง ประกอบกับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปอาจทำให้ไม่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติ การเก็บรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้แดงอุบล และการศึกษาการขยายพันธุ์ จะเป็นแนวทางในการอนุรักษ์และขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมาก และเป็นประโยชน์ต่อการส่งเสริมการปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ประจำถิ่นของจังหวัดอุบลราชธานี (ศรีประไพ และคณะ, 2543)

การศึกษาทางด้านเซลล์พันธุศาสตร์ของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง โดยการตรวจนับโครโมโซมจากปลายรากของกล้วยไม้แดงอุบล พบว่ามีจำนวนโครโมโซม 2n = 76 (กาญจนา และคณะ, 2551) และจากรายงานการศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลม้าวิ่ง 3 สายพันธุ์ คือกล้วยไม้แดงอุบล กล้วยไม้ม้าวิ่ง และกล้วยไม้ม้าบิน พบว่ามีจำนวน 2n = 76, 2n = 38 และ 2n = 38 ตามลำดับ (กาญจนา, 2552) ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาของ Tanaka และ Kamemoto (1984) ที่พบว่ากล้วยไม้แดงอุบลจะมีจำนวนโครโมโซมมากกว่ากล้วยไม้ม้าวิ่งเกือบเท่าตัว สันนิษฐานว่ากล้วยไม้แดงอุบลซึ่งเป็นเททระพลอยด์อาจจะเกิดมาจากกล้วยไม้ม้าวิ่งเป็นพันธุ์พื้นฐาน สุมนทิพย์ (2550) ศึกษาการการชักนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยใช้สารโคลชิซีนในกล้วยไม้ม้าวิ่ง พบว่า เมื่อได้รับสารโคลชิซินที่ความเข้มข้น 0.05% ระยะเวลา 3 วัน จำนวนโครโมโซมจะเพิ่มขึ้นจาก 2n=2x=38 เป็น 2n=4x=76 และ 2n=8x=152 ใบของกล้วยไม้ม้าวิ่งโพลีพลอยด์มีลักษณะใบหนา และสีเขียวเข้ม ปริมาณคลอโรฟิลล์ และขนาดเซลล์คุมเพิ่มขึ้น แต่มีจำนวนเซลล์คุมต่อพื้นที่น้อยกว่ากล้วยไม้ม้าวิ่ง ดิพลอยด์

ทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม กล้วยไม้นับเป็นพืชหนึ่งที่มีความหลากหลายทั้งทางด้านรูปร่าง ขนาดลำต้น และใบ ส่วนของดอกก็มีความหลากหลายในด้านขนาด รูปร่าง สีสัน จำนวนดอก และการจัดเรียงตัวของดอกในช่อ กล้วยไม้สามารถผสมพันธุ์ข้ามชนิด และข้ามสกุลได้อย่างกว้างขวาง ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มความหลากหลายในด้านลูกผสมอีกมากมาย (ฐนิตา, 2550) จากความหลากหลายในลักษณะดังกล่าว ทำให้บ่งชี้ชนิดหรือพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอาจทำได้ยาก ยกเว้นในระยะที่มีดอก และระยะการเจริญเติบโตทางด้านลำต้น (ศิริลักษณ์ และคณะ, 2548) ดังนั้นการจำแนกหรือบ่งชี้สายพันธุ์ และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ โดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอจึงมีความจำเป็น เนื่องจากเป็นการบ่งชี้ความแตกต่างในระดับจีโนม ซึ่งสภาพแวดล้อมไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลักษณะดังกล่าว

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม หมายถึงความแตกต่างซึ่งมีลักษณะที่หลากหลายของสิ่งมีชีวิต ตั้งแต่ระดับเซลล์ ระดับประชากร ไปจนถึงระบบนิเวศน์ขนาดใหญ่ขึ้นไป ความหลากหลายทางพันธุกรรมเกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งเป็นกลไกที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ หน่วยพันธุกรรมหรือยีนทุกตำแหน่ง และลำดับนิวคลีโอไทด์ทุกๆบริเวณ มีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ได้ (สิรินุช, 2540) แม้ว่าโมเลกุลของดีเอ็นเอมีความสามารถที่จะจำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูก และคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง (สุรินทร์, 2545) ปัจจัยที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์นั้นยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่นอน แต่สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 สาเหตุใหญ่ คือ ปัจจัยภายใน ได้แก่ องค์ประกอบทางพันธุกรรมและสภาพแวดล้อมทางสรีรวิทยา และปัจจัยภายนอกได้แก่ อาหาร อุณหภูมิ รังสี หรือ สิ่งก่อกลายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (สิรินุช, 2540) ประชากรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงจะสามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ โดยประชากรส่วนหนึ่งอาจล้มตาย ในขณะที่อีกส่วนหนึ่งสามารถปรับตัวให้อยู่รอดได้ และสามารถสืบทอดเผ่าพันธุ์ได้ต่อไป ความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถศึกษาได้ทั้งในระดับสัณฐานวิทยา ซึ่งเป็นการศึกษาเบื้องต้น และในระดับโมเลกุล ได้แก่ การศึกษาโปรตีนและดีเอ็นเอ โดยเฉพาะการศึกษาโดยใช้ดีเอ็นเอที่ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลาย และมีการพัฒนาต่อเนื่องตลอดมา (Frankkham et al., 2002)

เครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic marker)

เครื่องหมายทางพันธุกรรม หมายถึง ลักษณะหรือตัวบ่งชี้ที่มีความจำเพาะเจาะจง สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรม และสามารถถ่ายทอดลักษณะนั้นๆไปยังรุ่นลูกได้ (สุรีพร, 2546) เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่นิยมใช้ในการบ่งชี้ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological markers) เครื่องหมายทางชีวเคมี (biochemical markers) และเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ (molecular or DNA markers)

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker)

เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่บ่งชี้ลักษณะทางสรีรวิทยา คือ ลักษณะที่ปรากฏโดยทั่วไปที่สามารถสังเกตได้ เป็นการบ่งบอกความแตกต่างโดยใช้วิธีการเปรียบเทียบลักษณะภายนอก ได้แก่ การใช้ลักษณะรูปพรรณสัณฐานพืชที่มีความแตกต่างกันมาใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ เช่น ลักษณะใบ ลำต้น และ ดอก ซึ่งทำได้ง่ายและสะดวก แต่การใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาในการจำแนกนั้นมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น การแสดงออกของลักษณะต่างๆ เป็นผลเนื่องมาจากพันธุกรรม และบางลักษณะมักผันแปรไปตามอิทธิพลของสภาพแวดล้อม และผลจากอิทธิพลร่วมจากปฏิกิริยาระหว่าง

สภาพแวดล้อมกับสารพันธุกรรมเข้ามาเกี่ยวข้อง ทำให้การบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุกรรมคลาดเคลื่อนได้

2. เครื่องหมายโปรตีน (Protein marker)

เครื่องหมายโปรตีน เช่น ไอโซไซม์ (isozyme) เข้ามาช่วยในการบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์พืช (varietals identification) โดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของพืชมาตรวจสอบ แต่มีข้อจำกัดที่สำคัญคือ จำนวนยีนที่ใช้ตรวจสอบยังมีไม่มากนัก และยีนที่นำมาศึกษาต้องมีการแสดงออก (gene expression) ด้วยการตรวจสอบจึงจำเป็นต้องเลือกเนื้อเยื่อพืชและระยะการเจริญเติบโตที่เหมาะสมโดยคำนึงถึงการแสดงออกของยีนที่ต้องการตรวจสอบ นอกจากนั้นผลการตรวจสอบยังขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมอีกด้วย ทำให้โอกาสการตรวจพบความแตกต่างในระดับโปรตีนมีค่าต่ำกว่าที่เป็นจริง

3. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่ง สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งหนึ่งบนโครโมโซม หรือดีเอ็นเอในออร์แกแนลล์ (mitochondrial DNA หรือ chloroplast DNA) การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยเทคนิคทางอณูวิทยาซึ่งเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” (DNA fingerprinting) ซึ่งหมายถึงแบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ สามารถนำมาตรวจสอบความแตกต่าง หรือโพลีมอร์ฟิซึมของสิ่งมีชีวิต หรือสายพันธุ์พืชที่ต้องการตรวจสอบได้ (สุรินทร์, 2545; สุรีพร, 2546)

ปัจจุบันมีการพัฒนาและนำเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ มาใช้เป็นเครื่องมือ (tools) ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม หรือใช้ตรวจสอบความแตกต่างของพันธุ์พืชกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งพบว่ามีความถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็วกว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากเป็นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงไม่มีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องการแสดงออกของลักษณะเป็นผลมาจากยีนหรือจีโนไทป์โดยตรง ตัวอย่างของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีการนำมาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืช สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ “Hybridization based marker”ได้แก่ อาร์เอฟแอลพี (RFLP: Restriction fragment length polymorphisms) และ “PCR based marker” ได้แก่ อาร์เอพีดี (RAPD: Random amplified polymorphic DNAs), เอเอฟแอลพี (AFLP: Amplified fragment length polymorphisms) และ เอสเอสอาร์ (SSR: Simple sequence repeat) หรือ ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) เป็นต้น (สุรีพร, 2546)

ในบรรดาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีการนำมาใช้ในการศึกษาในระดับชีวโมเลกุลเพื่อปรับปรุงพันธุ์นั้น พบว่า อาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี เป็นเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม เนื่องจากอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่ง่าย รวดเร็ว และมีค่าใช้จ่ายน้อย ส่วนเทคนิคเอเอฟแอลพีเป็นเทคนิคที่ให้เครื่องหมายจำนวนมาก (high throughput marker) และครอบคลุมทั้งจีโนม

เครื่องหมายอาร์เอพีดี (Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD)

อาร์เอพีดี (RAPD) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นเพื่อใช้ตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัวแบบสุ่ม หรือเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า พีซีอาร์ (PCR) (William et al., 1990; Welsh และ McClean, 1990) โดยอาศัยหลักการ คือ ในสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอของพืชจะมีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่มีเบส 4 ชนิด เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ Adenine (A), Thymine (T), Guanine (G) และ Cytosine (C) โดย A จะจับคู่หรือมีเบสคู่สมกับ T และ C จะจับคู่กับ G การเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่มีลำดับเบสแตกต่างกันมีผลทำให้พืชมีความแตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อนำดีเอ็นเอของพืชที่ต้องการตรวจสอบความแตกต่างมาเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยการสุ่มจับดีเอ็นเอของตัวอย่างพืชจะใช้ไพรเมอร์ (primer) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่มีเบสเรียงกันประมาณ 8-10 เบส เป็นตัวสุ่มจับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชที่ต้องการตรวจสอบความแตกต่าง หากพืชมีพันธุกรรมต่างกันจะพบว่าชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ก็จะขนาดแตกต่างกัน เมื่อนำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาแยกให้เห็นความแตกต่างในอะกาโรสเจล (agarose gel) โดยกระบวนการอิเล็คโตรโฟรีซีส (electrophoresis) ก็จะได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของพืชนั้นๆ อาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่ซับซ้อน และค่าใช้จ่ายต่ำ ดังนั้นจึงมีผู้นิยมนำมาใช้ในการศึกษาเทคนิคอาร์เอพีดีมาใช้ในการจำแนกพันธุ์พืช และศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมอย่างกว้างขวาง

เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (Amplified Fragment Length Polymorphisms; AFLP)

เอเอฟแอลพี (AFLP) เป็นเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างแบบหนึ่งที่ใช้หลักการของพีซีอาร์ (PCR-based marker) พื้นฐานของเอแอฟแอลพี คือการตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว (Polymerase chain reaction, PCR) ดังนั้นเอเอฟแอลพีจึงรวมจุดเด่นหรือความน่าเชื่อถือของเทคนิค อาร์เอฟแอลพี (RFLP) และประสิทธิภาพของปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว (PCR) เข้าด้วยกัน (Vos et al., 1995) ลักษณะเด่นของเครื่องหมายเอเอฟแอลพี คือ จำนวนเครื่องหมายที่มีอย่างมากมาย (abundance) และครอบคลุมทั้งจีโนม ในปฏิกิริยาหนึ่งๆ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (multilocus) พร้อมๆ กัน ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยาจำนวนน้อย

เมื่อทำการตรวจสอบซ้ำจะให้ผลเหมือนเดิม (reproducibility) ไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ ดังนั้นจึงสามารถทำได้อย่างกว้างขวาง แต่ต้องคำนึงถึงค่าใช้จ่ายในการดำเนินการค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการทำพีซีอาร์ทั่วๆ ไป และการเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองชนิด ตลอดจนการกำหนดจำนวนและชนิดของเบสคัดเลือกของเอเอฟแอลพีไพรเมอร์ (AFLP primer) นั้นพบว่าจะมีผลต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเลือกให้มีการเพิ่มปริมาณ ดังนั้นเพื่อให้ได้ข้อมูลเพียงพอโดยไม่ต้องทำการทดลองหลายครั้งจะต้องคำนึงถึงขนาดของจีโนมของพืชที่จะทำการศึกษาด้วย (สุรินทร์, 2543; สุรีพร, 2546)

งานวิจัยที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี

เครื่องหมายอาร์เอพีดีสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในสร้างแผนที่ทางพันธุกรรม (Genetic mapping) (Arcade et al., 2000) การศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในพืชได้อย่างกว้างขวาง (Chung et al., 2006) เนื่องจากเป็นเครื่องหมายที่มีวิธีการไม่ยุ่งยาก ซับซ้อน สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบค่อนข้างต่ำ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ก็มีไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ (Gimenes et al., 2000) สำหรับในกล้วยไม้ได้มีรายงานการใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดีในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลต่างๆ เช่น รองเท้านารี (พรรณี และเกษม, 2548; Chung et al., 2006; Li, et al., 2002) สกุลหวาย (ศิริลักษณ์ และคณะ, 2548) สกุลฟาแลนนอฟซีส (Goh et al., 2548) และสกุลซิมบิเดียม (Dong-mei et al., 2007; Choi et al., 2006; Obara-Okeyo and Kako, 1998) เป็นต้น โดยพรรณี และเกษม (2548) ได้ศึกษาการใช้เทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อศึกษาพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีในภาคใต้ สามสายพันธุ์ คือกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ เหลืองตรัง และขาวสตูล โดยสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีด้วยสารละลาย CTAB buffer และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างสุ่มโดยใช้ไพรเมอร์ 9 ชนิด คือ OPA-02, OPA-04, OPA-07, OPA-07, OPA-18, OPA-19, OPA-20 และ OPH-04 พบว่าไพรเมอร์เหล่านี้สามารถให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หลากหลาย ชัดเจน และเกิดซ้ำได้ เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของ Dice เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิดและแต่ละกลุ่ม พบว่ากล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองตรังมีความใกล้ชิดกับกล้วยไม้รองเท้านารีขาวสตูลมากกว่ากล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของกล้วยไม้รองเท้านารี แสดงว่าเทคนิค RAPD-PCR สามารถใช้แถบดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายระดับโมเลกุลในการศึกษาพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีได้

ศิริลักษณ์ และคณะ (2548) ศึกษาการเปรียบเทียบแผนไอโซไซม์และเครื่องหมายอาร์เอพีดีเพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเอื้องสายสามสี 1 ต้น และเอื้องสายแข็ง 3 ต้น โดยวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (Cluster analysis) โดยใช้โปรแกรม UPGMA ในกล้วยไม้หวาย 2 ชนิด ที่มี

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน โดยใช้ข้อมูลจากแบบแผนไอโซไซม์เปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า Dendrogram ที่ได้จากการวิเคราะห์แบบแผนไอโซไซม์ทั้งหมด 8 ระบบ สามารถจำแนกเอื้องสายสามสีออกจากเอื้องสายแข็งได้ แต่ไม่สามารถจำแนกเอื้องสายแข็งออกจากกันได้ ส่วนการจัดกลุ่มที่ได้จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้อาร์เอพีดีไพรเมอร์ 8 ชนิด สามารถจำแนกได้ทั้งระดับชนิดในเอื้องสายสามสี และเอื้องสายแข็ง และระดับสายต้นในเอื้องสายแข็งได้

Goh et al. (2005) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ genus *Phalaenopsis* จำนวน 149 accessions จาก 46 species และ genus *Paraphalaenopsis* จำนวน 4 species โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี จากการคัดเลือกไพรเมอร์ทั้งหมด 20 ไพรเมอร์ พบว่ามี 6 ไพรเมอร์ ที่แสดงความแตกต่างของดีเอ็นเอที่ชัดเจนและสร้างเครื่องหมายโมเลกุลอาร์เอพีดี ได้จำนวน 123 เครื่องหมาย จากนั้นนำไปวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distances) และจัดกลุ่มได้เป็น 7 กลุ่มใหญ่ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Ph. dowerygensis* ที่น่าจะเป็นลูกผสมของ *Ph. gigantea* และ *Ph. kunstleri* หรือ *Ph. cocchlearis* แต่เมื่อทำการวิเคราะห์อาร์เอพีดี แล้ว พบว่าไม่ใช่ลูกผสม แต่อาจเป็นลูกผสมกลับ (BC_1 หรือ BC_2) ระหว่าง *Ph. Gigantean* และ *Fuscatae* แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายอาร์เอพีดี สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์และความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ได้

Chung et al. (2006) ศึกษาความสัมพันธ์และความแตกต่างทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ 2 genus คือ *genus Paphiopedilum* จำนวน 21 species และ *Phragmepedium* จำนวน 13 varieties โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า ค่าความเหมือนกันทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ 2 genus มีค่าตั้งแต่ 0.629 ระหว่าง *P.kolosand* และ *Paphiopedilum koloparkingii* ถึง 0.882 ระหว่าง *P. koloparkingii* และ *Phragmepedium* 'Hanne Popow'. จากการวิเคราะห์ผลที่ได้จากแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกัน พบว่า สามารถแยกกล้วยไม้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 มีสมาชิกจำนวน 28 species ซึ่งประกอบด้วย *Paphiopedilum* ทั้งหมดและ genus *Phragmepedium* จำนวน 8 species กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย genus *Phragmepedium* จำนวน 6 species .ทั้งสองกลุ่มนี้ยังสามารถแยกเป็น 2 กลุ่มย่อยได้อีก ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *Paphiopedilum* และ *Phragmepedium* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการจำแนกความแตกต่างโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายอาร์เอพีดีสามารถใช้ในการศึกษาวิวัฒนาการ และความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมของ genus *Paphiopedilum* และ genus *Phragmepedium* ได้

Choi et al. (2006) ได้ศึกษาความหลากหลายความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการภายในกล้วยไม้สกุล *Cymbidiums* จากประเทศเกาหลี จำนวน 21ชนิด ด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี จากการคัดเลือกไพรเมอร์อาร์เอพีดีทั้งหมด 100 ไพรเมอร์ พบว่ามีเพียง

21 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ชัดเจน และได้จำนวนเครื่องหมายอาร์เอพีดีทั้งหมด 588 เครื่องหมาย คิดเป็น 95 % จากทั้งหมด 617 เครื่องหมาย จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความเหมือนกันทางพันธุกรรม (Genetic similarity) ด้วยวิธีของ Nei และ Li พบว่ามีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.50 ถึง 0.93 โดย *C. ensifolium* และ *C. marginatum* มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากที่สุด (0.93) ซึ่ง *C. aloifolium* และ *C. kanlan* มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมต่ำสุด (0.50) เมื่อนำมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์โดยวิธี UPGMA (unweighted pair group method on the basis of arithmetic averages) สามารถจัดกลุ่มของกล้วยไม้ *Cymbidiums* ได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มเล็ก ประกอบด้วยกล้วยไม้ *Cymbidiums* จำนวน 3 พันธุ์ และกลุ่มใหญ่ประกอบด้วยกล้วยไม้ *Cymbidiums* จำนวน 18 พันธุ์ ซึ่งสามารถแบ่งแยกออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 5 กลุ่มย่อย จากข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ของกล้วยไม้ *Cymbidiums* ต่อไป

Dong-mei et al. (2007) วิเคราะห์เชื้อพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลูกผสมสายพันธ์ *Cymbidium* จำนวน 48 ชนิด จากประเทศญี่ปุ่น เกาหลี จีน และอเมริกา และ *Cymbidium* พื้นเมืองจำนวน 2 ชนิด โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี จากการคัดเลือกไพรเมอร์ทั้งหมด 100 ไพรเมอร์ พบว่า มีจำนวน 20 ไพรเมอร์ ที่สามารถให้แถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ชัดได้ทั้งหมด 258 เครื่องหมาย และได้ดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphism) ทั้งหมด 253 เครื่องหมาย เฉลี่ย 12.6 เครื่องหมายต่อไพรเมอร์ คิดเป็น 98.1% แถบดีเอ็นแอที่ได้มีขนาดประมาณ 250-3500 คู่เบส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความเหมือนกันทางพันธุกรรม (Genetic similarity) ด้วยวิธีของ Dice พบว่ามีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.364 ถึง 0.817 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.581 แล้วนำข้อมูลมาจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี UPGMA พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 5 กลุ่ม ซึ่งการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมนี้จะมีความสัมพันธ์กับบริเวณแหล่งกำเนิด สีดอก ชนิดของการแตกกิ่ง และลำดับเครือญาติ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเครื่องหมายที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างลูกผสมสายพันธ์ *Cymbidium* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Obara-Okeyo and Kako (1998) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกสายพันธุ์ของกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* จำนวน 36 สายพันธุ์จากประเทศญี่ปุ่นและที่ยังไม่สามารถระบุได้อีก 4 ชนิด โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี จากการคัดเลือกไพรเมอร์ทั้งหมด 60 ไพรเมอร์ พบว่ามี 15 ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอได้ชัดเจนได้แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic bands) ทั้งหมด 132 แถบ คิดเป็น 78 % จำนวนเครื่องหมายที่ได้มีตั้งแต่ 3-14 เครื่องหมาย เฉลี่ย 10 เครื่องหมายต่อไพรเมอร์ แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 240 ถึง 2000 คู่เบส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปประเมินค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) พบว่า ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่าตั้งแต่ 0.08 ถึง 0.50 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.29 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากการจัดกลุ่ม

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ทำให้ทราบรูปแบบทางพันธุกรรมที่ผสมภายในสายพันธุ์ (siblings) และเป็นกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* ที่ผสมจากพ่อแม่เดียวกัน ดังนั้นจึงทราบข้อมูลของพ่อแม่ และได้ข้อมูลของไอโซไซม์ที่น่าเชื่อถือ เป็นไปได้ที่จะใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ของกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* ได้ต่อไป

Li et al. (2002) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารี *Paphiopedilum micranthum* ที่ใกล้สูญพันธุ์ ที่มีการกระจายพันธุ์ในประเทศจีน โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 12 ไพรเมอร์สามารถให้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic bands) จำนวน 131 แถบ แถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 200 – 1400 คู่เบส ได้เครื่องหมายอาร์เอพีดี เฉลี่ยจำนวน 10.9 แถบต่อไพรเมอร์ จากข้อมูลที่ได้ พบว่าค่า percentage of polymorphic bands (P) มีค่าเท่ากับ 73.3 % เมื่อพิจารณาความหลากหลายของประชากร พบว่า ค่า P มีค่าอยู่ระหว่าง 28.4 % - 58.2% โดยค่านี้สอดคล้องกับค่า expected heterozygosity (H) และค่า Shannon index (I) ในทิศทางเดียวกัน จากการใช้โปรแกรม AMOVA คำนวณค่า genetic differentiation ระหว่างประชากรพบว่า ระหว่างประชากรของ *Paphiopedilum micranthum* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $p < 0.001$ มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในประชากรสูงถึง 79.69% ในขณะที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรมีค่าเท่ากับ 20.31%

งานวิจัยที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

เครื่องหมายเอเอฟแอลพี สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ (identification) การบอกระดับความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของแต่ละประชากร (genetic diversity) สร้างแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic linkage map) การหาตำแหน่งยีน (gene mapping) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือก (marker assisted selection) (Semagn et al., 2006) และสามารถนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชได้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถให้เครื่องหมายมากมาย (abundance) และครอบคลุมทั้งจีโนม ในปฏิกิริยาหนึ่งๆ สามารถตรวจสอบ ดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (multilocus) พร้อมๆ กัน ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นในการทำปฏิกิริยาจำนวนน้อย เมื่อทำการตรวจสอบซ้ำจะให้ผลเหมือนเดิม (reproducibility) ไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ ดังนั้นจึงสามารถทำได้อย่างกว้างขวาง จากข้อดีของเทคนิคเอเอฟแอลพีได้มีการนำไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในกล้วยไม้สกุลต่างๆอย่างกว้างขวาง เช่น สกุลรองเท้านารี (จักรพันธ์, 2549) สกุลแวนด้า (Chen et al., 1998) สกุล *Phragmepedium* (Manuel et al., 2007; Salas et al., 2007) เป็นต้น

จักรพันธ์ (2549) ได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paphiopedilum exul* (Ridl.) Rolfe) ซึ่งมีการกระจายพันธุ์อยู่บริเวณภาคใต้ของประเทศไทย โดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี โดยรวบรวมกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่จาก 6 แหล่ง ในบริเวณจังหวัดตรัง กระบี่ และพังงา จากการคัดเลือกไพรเมอร์เอเอฟแอลพี จำนวน 64 คู่ไพรเมอร์

พบว่ามีเพียง 13 คู่ไพรเมอร์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ชัดเจนและให้จำนวนเครื่องหมายมาก ได้เครื่องหมาย เอเอฟแอลพี 126 เครื่องหมาย เฉลี่ย 9.63 เครื่องหมายต่อคู่ไพรเมอร์ แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance)โดยใช้วิธีของ Nei พบว่า ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.26 ถึง 0.33 แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่งที่นำมาศึกษานี้มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง แล้วนำข้อมูลมาจัดกลุ่มโดยใช้วิธี UPGMA พบว่า สามารถแยกกลุ่มกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ที่เก็บรวบรวมจาก 6 แหล่งได้อย่างชัดเจน ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ใช้เป็นแนวทางในการอนุรักษ์ และปรับปรุงพันธุ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ต่อไปในอนาคต

Chen et al. (1998) ใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีเพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ของกล้วยไม้ลูกผสมกลุ่ม Vandaceous ประกอบด้วย *Aranda* Christine จำนวน 2 สายพันธุ์ และ *Mokara* Willie How จำนวน 5 สายพันธุ์ พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมาะสมเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *Eco*RI ที่มีเบสคัดเลือก 4 เบส (*Eco*RI+4) ร่วมกับไพรเมอร์ *Mse*I ซึ่งมีเบสคัดเลือก 3 เบส (*Mse*I+3) โดยรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถทำซ้ำแล้วได้ผลดังเดิม นอกจากนี้การใช้ชิ้นส่วนของต้นกล้วยไม้ที่แตกต่างกันเช่นใบกับดอก และดอกที่มีระยะการพัฒนาที่แตกต่างกันนำมาสกัดดีเอ็นเอแล้ววิเคราะห์เอเอฟแอลพี ทำให้เกิดรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน ในด้านความผันแปรทางพันธุกรรมพบว่ามีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดโพลีมอฟิซึมมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบระหว่างสายพันธุ์ภายในกลุ่มเครือญาติที่มาจากคู่ผสมเดียวกันได้แก่ *Aranda* Christine จำนวน 2 สายพันธุ์ และ *Mokara* Willie How จำนวน 5 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบระหว่างสายพันธุ์ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากการเกิด somatic mutation จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ *Aranda* Christine จำนวน 2 สายพันธุ์ และ *Mokara* Chark Kuan จำนวน 4 สายพันธุ์ พบว่าเกิดโพลิเมอร์ฟิซึมเพียง 0.3-0.7 เปอร์เซ็นต์

Salas et al. (2007) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ *Phragmepedium* species (Orchidaceae) โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยใช้ไพรเมอร์เอเอฟแอลพี (*Eco*RI+3 และ *Mse*I+3) จำนวน 18 คู่ ได้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 732 แถบ จากการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ Peruvian จำนวน 8 ชนิด (species) ใน genus *Phragmepedium* ด้วยการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี และ phenetic พบว่า สามารถจัดกลุ่มได้เป็นสี่กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มแรกประกอบด้วยกล้วยไม้ *Himantopetalum* จำนวน 2 ชนิด คือ *P. pearcei* และ *P. richteri* และกล้วยไม้ *Lorifolia* อีกหนึ่งชนิด คือ *P. boissierianum* กลุ่มที่สองประกอบด้วยกล้วยไม้ *Micropetalum* จำนวน 2 ชนิด คือ *P. besseae* และ *P. schlimii* กลุ่มที่สาม ประกอบด้วยกล้วยไม้ *Schluckebieria* จำนวนหนึ่งชนิด คือ *P. kovachii* และกลุ่มที่สี่ประกอบด้วยกล้วยไม้ *Phragmepedium* จำนวน 2 ชนิด คือ *P. caudatum* และ *P. wallisii* จาก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 10 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 247725
เลขเรียกหนังสือ

การศึกษาแสดงให้เห็นประสิทธิภาพของเครื่องหมายเอเอฟแอลพีในการจำแนกหมวดหมู่ของ genus *Phragmepedium* ได้อย่างสมบูรณ์

นอกจากนี้ยังมีการรายงานการนำเทคนิคเอเอฟแอลพีมาใช้ในการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชชนิดอื่นอีกมากมาย เช่น Ashraf et al. (2005) ได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของ Egypian date (*Phoenix dactylifera* L.) จำนวน 47 ตัวอย่าง จากประเทศอียิปต์และอีก 2 ตัวอย่างจากประเทศสหรัฐอเมริกาโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพี จากการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์เอเอฟแอลพี (*Eco*RI +3 และ *Mse*I+3) พบว่า ได้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีทั้งหมด 350 เครื่องหมาย และเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง (polymorphism) จำนวน 233 เครื่องหมาย คิดเป็น 66.6 % เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Jaccard พบว่า ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของ Egypian date มีค่าระหว่าง 91-94 % แล้วนำมาจัดกลุ่มทางพันธุกรรม พบว่า สามารถจัดกลุ่มของ Egypian date ได้เป็น 6 กลุ่มโดยภายในกลุ่มจะมีชื่อที่คล้ายกัน และมีอีกสองตัวอย่างที่ไม่สามารถจัดเข้ากับกลุ่มใดได้เลย ตัวอย่างที่นำมาศึกษานี้น่าจะปลูกจากต้นกล้ามากกว่าการใช้ส่วนของโคลนในการขยายพันธุ์

นฤมล และธีระชัย (2551) ศึกษาการจำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนัง ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่า ไพรเมอร์เอเอฟแอลพี (*Eco*RI +3 และ *Mse*I+3) ที่ใช้ทั้งหมดจำนวน 64 คู่ สามารถให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันระหว่างน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนัง รวมทั้งสิ้น 8 แถบ ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องหมายเอเอฟแอลพีในการจำแนกน้อยหน่าพันธุ์เนื้อและพันธุ์หนังออกจากกันได้ นอกจากนั้นยังได้พัฒนาเครื่องหมายสการ์ จากเครื่องหมายเอเอฟแอลพี 4 ชนิดซึ่งพบว่าเครื่องหมายสการ์ที่จำเพาะกับน้อยหน่าพันธุ์เนื้อเพียงอย่างเดียว

รัฐพล และคณะ (2549) ตรวจสอบพันธุ์ขององุ่นไม่มีเมล็ดบางพันธุ์ โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี จากการตรวจสอบพันธุ์องุ่นรับประทานสดชนิดไม่มีเมล็ด ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกันมากจำนวน 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกมีผลสีเหลืองอมเขียว ได้แก่ พันธุ์ Baby Grape, Loose Perlette และ Perlette ส่วนในกลุ่มที่สองมีผลสีดำอมม่วง ได้แก่ พันธุ์ Marroo Seedless และ Black Opal ซึ่งปลูกอยู่ในแปลงรวบรวมพันธุ์องุ่นของสถานีวิจัยกาญจนบุรี จังหวัดกาญจนบุรี โดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาความต้านทานต่อโรค และลักษณะทาง phenology รวมทั้งสิ้น 74 ลักษณะร่วมกับการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์ในการตรวจสอบจำนวน 64 คู่ จากการศึกษาพบว่าองุ่นพันธุ์ Baby Grape, Loose Perlette และ Perlette มีลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันหลายประการ อีกทั้งยังมีรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันด้วย ซึ่งตรวจสอบได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ACC/M-CAC และ E-AAC/M-CAG ส่วนองุ่นพันธุ์ Marroo Seedless และ Black Opal นั้น มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันมาก เมื่อตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอนเอก็ไม่พบความแตกต่าง เครื่องหมายเอเอฟแอลพีสามารถตรวจสอบความแตกต่างของ

องุ่นพันธุ์ Baby Grape, Loose Perlette และ Perlette ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน

เสริมสกุล และคณะ (2549) ศึกษาลักษณะพันธุ์กระชายดำโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลเอเอฟแอลพีที่ได้รวบรวมพันธุ์จากแหล่งปลูกการค้าในจังหวัดเลย พิษณุโลก และเพชรบูรณ์จำนวน 12 สายพันธุ์มาทดลองปลูกที่สถานีทดลองเกษตรที่สูง อ.ภูเรือ จ.เลย จากการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี พบว่า มีไพรเมอร์เอเอฟแอลพี (*Eco*RI +3 และ *Mse*I+3) จำนวน 34 คู่ที่ได้จากการคัดเลือก ซึ่งสามารถสร้างแถบเครื่องหมายแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์กระชายดำทั้ง 12 สายพันธุ์ได้จำนวน 147 แถบเครื่องหมาย เมื่อจัดกลุ่มความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมด้วยวิธี UPGMA แล้วสร้าง dendrogram พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มกระชายดำออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม ใบเขียว และใบแดง และยังสามารถแบ่งแยกย่อยได้อีก 6 กลุ่ม โดยพบความสัมพันธ์ที่ดีระหว่างแถบเครื่องหมายของพันธุ์กระชายดำกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ ก้านใบ และเหง้า โดยเฉพาะสีเนื้อในเหง้ากระชายดำ องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันหอมระเหยจากเหง้ากระชายดำ องค์ประกอบทางเคมีของสารประกอบกุล่มฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ทั้งหมด และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดเอทานอลจากเหง้ากระชายดำ

งานวิจัยการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช

ปัจจุบันการนำเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอมาใช้ในการจำแนก และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งพืช และสัตว์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องหลายชนิด ดังนั้นการเลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม มีข้อควรพิจารณา ได้แก่ ประสิทธิภาพของเครื่องหมายแต่ละชนิด และความยากง่ายของแต่ละเทคนิค (ตารางที่1) งบประมาณในการวิจัย เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆในห้องปฏิบัติการ ตลอดจนความรู้ความชำนาญของบุคลากรด้วย เป็นต้น

Goulao et al. (2001) ได้เปรียบเทียบการใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี ในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์แอปเปิ้ล (*Mulus domestica* Borkh.) จำนวน 41 สายพันธุ์ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแอปเปิ้ลโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดีสามารถคัดเลือกไพรเมอร์อาร์เอพีดีที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ชัดเจน จำนวน 35 ไพรเมอร์ได้เครื่องหมายอาร์เอพีดีทั้งหมด 362 เครื่องหมาย มีเครื่องหมายที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ (polymorphic band) จำนวน 208 เครื่องหมาย แต่ละไพรเมอร์ให้เครื่องหมายอาร์เอพีดีที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์มีตั้งแต่ 2 ถึง 9 เครื่องหมาย โดยเฉลี่ย 6 เครื่องหมายต่อไพรเมอร์ ค่า multiplex ratio (จำนวนของ polymorphic marker ที่ได้ในหนึ่งปฏิกิริยา) มีค่าเท่ากับ 7.7 แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างมีขนาดตั้งแต่ 300 – 1800 คู่เบส ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทาง

พันธุกรรมของแอปเปิ้ลโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี จากการใช้ไพรเมอร์เอเอฟแอลพีจำนวน 8 คู่ไพรเมอร์ (*Eco*RI+3 และ*Mse*I+3) พบว่า ได้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic band) จำนวน 218 เครื่องหมาย โดยแต่ละคู่ไพรเมอร์ได้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีที่แสดงความแตกต่างตั้งแต่ 17 ถึง 37 เครื่องหมาย โดยเฉลี่ย 27.3 เครื่องหมายต่อคู่ไพรเมอร์ ซึ่งเทคนิคเอเอฟแอลพีได้จำนวนเครื่องหมายต่อไพรเมอร์สูงกว่าเทคนิคอาร์เอพีดีถึง 4 เท่า โดยแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างมีขนาดตั้งแต่ 100- 1000 คู่เบส ค่า multiplex ratio มีค่าเท่ากับ 36 ซึ่งสูงกว่าเครื่องหมายอาร์เอพีดี 5 เท่า จากการตรวจสอบความเชื่อมั่นในการจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ค่า cophenetic correlation coefficient ที่ได้จากเครื่องหมายอาร์เอพีดี และเครื่องหมายเอเอฟแอลพี พบว่าค่า cophenetic correlation coefficient มีค่าเท่ากับ (r) 0.942 และ (r) 0.934 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าทั้งสองเครื่องหมายมีการจัดกลุ่มได้ดีมาก และมีความเหมาะสม เมื่อนำข้อมูลของทั้งสองเครื่องหมายมารวมกัน (combining RAPD and AFLP data) พบว่า ค่า cophenetic correlation coefficient มีค่าสูง (r = 0.945) สอดคล้องกับข้อมูลที่ได้จากการใช้เพียงเครื่องหมายอาร์เอพีดี หรือเครื่องหมายเอเอฟแอลพีชนิดเดียว ผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกันระหว่าง ค่าความเหมือนกันทางพันธุกรรมที่ได้จากการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี และเครื่องหมายเอเอฟแอลพี การศึกษาโดยใช้เทคนิคทั้งสองสามารถจัดกลุ่มของแอปเปิ้ลได้ชัดเจน ซึ่งจะใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์ของแอปเปิ้ลต่อไป ดังนั้นการเลือกใช้เทคนิคอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพีในการทดสอบ และเปรียบเทียบในจีโนม เพื่อศึกษาระดับความหลากหลายของความใกล้ชิดทางพันธุกรรม การกลายพันธุ์ และสายพันธุ์ที่ไม่ทราบแหล่งกำเนิด ยังปฏิบัติได้อย่างกว้างขวาง ในการเลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลทั้งสองในการวิเคราะห์ และตรวจสอบ polymorphisms จะเป็นการยืนยันได้ในเบื้องต้น

Puecher et al. (2001) ตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของประชากรหญ้า *Bromus catharticcus* และสายพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี จากการประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้งสองประชากร พบว่าทั้งสองประชากรมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน เมื่อนำตัวอย่างของแต่ละประชากรไปตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี และเอเอฟแอลพี จากการคัดเลือกไพรเมอร์อาร์เอพีดี จำนวน 65 ไพรเมอร์ พบว่ามีจำนวน 34 ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ชัดเจน ได้เครื่องหมายอาร์เอพีดีทั้งหมด 276 เครื่องหมาย เฉลี่ย 8.1 เครื่องหมายต่อไพรเมอร์ได้โดยแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างมีขนาดตั้งแต่ 0.35-1.6 กิโลเบส การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี โดยใช้ไพรเมอร์เอเอฟแอลพี จำนวน 9 คู่ไพรเมอร์ (*Eco*RI +3 และ*Mse*I+3) พบว่าได้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic band) จำนวน 714 เครื่องหมาย เฉลี่ย 79.3 เครื่องหมายต่อคู่ไพรเมอร์ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธีของ Jaccard พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมของเครื่องหมายอาร์เอพีดี และเครื่องหมายเอเอฟแอล มีค่า

สูงกว่า 94 % และ 98% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าหญ้า *Bromus catharticcus* มีความผันแปรทางพันธุกรรมต่ำ เนื่องมีฐานพันธุกรรมแคบ การใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในการวิเคราะห์ความแตกต่างของหญ้า *Bromus catharticcus* จึงสอดคล้องกับการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการตรวจสอบความต่าง เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกคู่ผสมในโครงการปรับปรุงพันธุ์หญ้าอาหารสัตว์ต่อไป และเทคนิคเอเอฟแอลพีมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ polymorphism มากกว่าเทคนิคอาร์เอพีดี โดยพิจารณาจากจำนวน polymorphic bands ต่อหนึ่งปฏิกิริยา ซึ่งเทคนิคเอเอฟแอลมีจำนวน polymorphic bands ต่อหนึ่งปฏิกิริยา สูงกว่าเทคนิคอาร์เอพีดีถึง 3 เท่า ส่วนเทคนิคอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่ง่าย ค่าใช้จ่ายน้อย ทั้งสองเครื่องหมายจึงมีความเหมาะสมในการประเมินความผันแปรพันธุกรรมได้เหมือนกัน

Divakaran (2006) รายงานการตรวจสอบการผสมข้ามชนิด และการตรวจสอบลูกผสมของวานิลา ซึ่งเป็นพืชพื้นเมืองของประเทศเม็กซิโก และอเมริกากลาง โดยใช้เครื่องหมายอาร์เอพีดี และเครื่องหมายเอเอฟแอลพี วานิลาเป็นพืชที่มีการขยายพันธุ์โดยใช้โคลน มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมน้อย ในการศึกษานี้จะเพิ่มความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยการผสมระหว่างข้ามชนิด เพื่อให้ลูกผสมทนทานต่อเชื้อรา Fusarium การผลิตลูกผสมประสบความสำเร็จ และลูกผสมที่ได้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา และรูปแบบโมเลกุลดีเอ็นเอคล้ายคลึงกับสายพันธุ์พ่อแม่ จากการประเมินโดยใช้เครื่องหมายเอเอฟแอลพีที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 319 เครื่องหมาย และเครื่องหมายอาร์เอพีดี 83 เครื่องหมาย ซึ่งข้อมูลจากเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอบ่งชี้ได้ว่ามีความคล้ายคลึงกันระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ (parent) ลูกที่ได้จากการผสมตัวเอง (selfed progenies) และลูกผสมระหว่างชนิด (interspecific hybrid) และลูกผสมทั้งหมดที่ได้จากการปลูกทดสอบเปรียบเทียบกับตัวแปรของแต่ละตัวอย่าง ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ในวานิลาได้ ข้อมูลของเครื่องหมายอาร์เอพีดี และเครื่องหมายเอเอฟแอลพีทั้งคู่ให้ผลสอดคล้องกับลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยา สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการประเมินความผันแปรจีโนไทป์ของลูกผสมที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติของลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างชนิด (interspecific hybrid) และลูกผสมระหว่าง *V.planiforai* และ *V.aphylla* ได้อย่างถูกต้อง

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบลักษณะและคุณสมบัติด้านเทคนิคอาร์เอพีดี และเทคนิคเอเอฟแอลพี

Character	RAPD	AFLP
หลักการ	DNA amplification with random primers	Endonuclease restriction, adapter ligation, PCR
จำนวนของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น	สูงมาก	สูงมาก
ข้อมูล polymorphism	ปานกลาง	ปานกลาง
แบบของการข่ม	Dominant	Dominant
การปรับเพื่อวิเคราะห์อัตโนมัติ	ง่าย	ปานกลาง
ปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการ	10-25 ng	1-2 µg
ข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย	ไม่ต้องการ	ไม่ต้องการ
การใช้สารกัมมันตรังสีในการตรวจสอบ	ไม่ใช้	ใช้หรือไม่ก็ได้
ค่าใช้จ่าย	ต่ำ	ปานกลาง
ความยากง่ายในการใช้	ง่าย	ยากถึงยากปานกลาง

(ที่มา: ดัดแปลงจาก Morgan, 1994)