บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

กล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก (*Spathoglottis* spp.) จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae วงศ์ย่อย Epidendroideae เผ่า Arethuseae เผ่าย่อย Bletiinae (Beaman *et al.*, 2001) ชื่อสกุล *Spathoglottis* ตั้งขึ้นเมื่อปี ค.ศ. 1825 โดย Carl Ludwig Von Blume ชื่อสกุลมีรากศัพท์มาจากภาษากรีก 2 คำ คือ คำว่า *spathe* แปลว่า ช้อน และ *glotta* แปลว่า ลิ้น หมายถึงรูปทรงของกลีบปากมีลักษณะคล้ายลิ้น (สลิล, 2549) เป็นกล้วยไม้อีกสกุลที่นิยมปลูกเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย กล้วยไม้สกุลนี้มีจำนวนมากกว่า 40 ชนิด (species) มีการเจริญเติบโตแบบ sympodial ถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีการแพร่กระจายตั้งแต่ทางตอนเหนือของอินเดีย ศรีลังกา ทางตอนใต้ของจีน มาเลเซีย ไทย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย ปาปัวนิวกินี ออสเตรเลีย และหมู่เกาะแปซิฟิก กล้วยไม้สกุลนี้มีความสำคัญในประเทศไทยและเป็นที่รู้จักในวงการกล้วยไม้ทั่วโลก

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำลูกกล้วย เป็นรูปไข่ หรือรีแกมรูปไข่ สีเขียวอ่อนหรือเข้ม เจริญเป็นกลุ่มแน่นอย่างไม่เป็นระเบียบ ขนาด 2-3 × 3 - 5 ซม. มีแนวปล้องชัดเจน

ใบ ใบยาวเรียวแหลมคล้ายหอกและปลายใบพับลง อาจมีความยาวได้ถึง 1 เมตร กว้าง 3-6 ซม. และมีรอยจีบหลายรอยขนานเรียงถี่กันจากโคนถึงปลายใบคล้ายต้นอ่อนของพวกปาล์ม

ช่อดอก ช่อดอกเป็นแบบ raceme เกิดบริเวณโคนลำลูกกล้วย เป็นช่อตั้งตรงสูง 60-100 ซม. ก้านช่อดอกมีลักษณะกลมแข็ง ดอกเกิดที่ปลายช่อค่อนข้างแน่น ทยอยบานเป็นเวลานาน โดยมีจำนวน 5-25 ดอกต่อช่อ

ดอก กลีบดอกมีขนาดเท่าๆกัน มีสีขาว สีเหลือง สีแดง จนถึงสีม่วง (สลิล, 2549) กลีบเลี้ยงแยกออกจากกันอย่างอิสระ มีขนาดเท่ากัน กลีบปากอยู่ด้านล่าง ไม่มีเดือย เคลื่อนไหวไม่ได้ แผ่นกลีบปากมี 3 แฉกเด่นชัด ปลายกลีบปากผายออก กลีบปากส่วนกลางรูปคล้ายช้อน โคนกลีบปากแคบ สองข้างโคนกลีบมีเขี้ยวเล็กแหลม และส่วนบนโคนปากมีปุ่มสองปุ่มอยู่คู่กัน เส้าเกสรผอมยาวและโค้ง

บริเวณโคนแคบ ส่วนปลายขยายใหญ่ โคนเส้าเกสรไม่มีฐาน เกสรเพศผู้มี 2 ชุด ชุดละ 4 เม็ด ก้านดอกยาว 3-4 ซม. ขนาดดอก 2-4 ซม. สามารถออกดอกได้ตลอดทั้งปี ดอกทยอยบานพร้อมกันเป็นชุดๆ และบานติดต่อกันได้นาน 3-6 เดือน แล้วแต่ชนิดพันธุ์ (ระพี, 2516; อบฉันท์, 2549)

ภาพที่ 1 ดอกกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก

กล้วยไม้เอื้องดินใบหมากที่ใช้ในงานวิจัย

1. *Spathoglottis plicata* Blume. มีชื่อเรียกในประเทศไทยหลายชื่อ เช่น ว่านจุก ม่วงพิศมร เอื้องดิน หรือกระเทียมป่า ลักษณะหัวเป็นรูปไข่ ขนาด 3-5 × 2-3 ซม. มีแนวปล้องที่ชัดเจน ส่วนบนของหัวมีโคนกาบใบหุ้มใบเป็นแถบยาวตั้งแต่ 1 ม. ขึ้นไป กว้าง 2-6 ซม. แผ่นใบค่อนข้างบางแต่แข็ง ดอกเกิดที่ปลายช่อค่อนข้างแน่น ทยอยบานเป็นเวลานาน ก้านดอกยาว 3-4 ซม. มีใบประดับสีม่วงรองรับ ขนาดดอก 2-4 ซม. กลีบปากสั้น และผอม แต่สีเข้มกว่ากลีบอื่น มีสีหลากหลายตั้งแต่ สีม่วง ม่วงอ่อน ชมพู ไปจนถึงสีขาว เป็นกล้วยไม้ที่ไม่ทิ้งใบ และสร้างหัวใหม่ออกไปเรื่อยๆ มีดอกเกือบตลอดปี พบขึ้นตามดินร่วนและที่มีความชุ่มชื้นตามป่าโปร่ง ทางภาคตะวันออกเฉียงใต้และภาคใต้ ของประเทศไทย (อบฉันท์, 2549)
2. *Spathoglottis affinis* de Vriese ชื่อเรียกในประเทศไทย คือ หัวข้าวเหนียว เหลืองพิศมร หรือตาลเดี่ยว หัวมีลักษณะแป้นมีรูปร่างที่ไม่แน่นอน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-3 ซม. ผิวเรียบมีเยื่อบางใสคลุม ใบเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับ มีลักษณะเป็นรอยพับจีบตามความยาวของใบ ช่อดอกเกิดจากตาข้าง ยาว 20-40 ซม. ก้านช่อกลมผอมแต่แข็งแรง มีใบประดับเล็ก ๆ ติดเป็นระยะ ดอกในช่อโปร่งเกิดจากกลางช่อขึ้นไป ก้านดอกยาว 2-3 ซม. ขนาดดอก 2.5-3 ซม. กลีบสีเหลือง หรือมีขีดสีม่วงที่โคนกลีบกลาง กลีบปากตรงส่วนโคนมีรอยคอด มีตุ่มเนื้อเยื่อ รูปเกือบกลม 2 ตุ่ม ผลแห้งรูปขอบขนาน ในฤดูแล้งจะพักตัวเหลือแต่หัว ในฤดูฝนจะสร้างใบ และดอก มีลักษณะคล้ายเอื้องดินลาว (*S. pubescens* Lindl.) มาก ออกดอกในเดือนตุลาคม ถึง พฤศจิกายน แหล่งที่พบในประเทศไทย ตามป่าโปร่ง หรือชายป่าตามลานหินที่มีน้ำซับเกือบทุกภาคของประเทศไทยยกเว้นภาคกลาง (อบฉันท์, 2549)
3. *Spathoglottis petri* ใบมีลักษณะเป็นแถบยาว 2-3 ใบ ขนาด 30-70 × 2.5-8 ซม. ช่อดอกยาวได้ถึง 70 ซม. ดอกเกิดที่ปลายช่อดอก ออกดอกได้มากที่สุดถึง 20 ดอก ซึ่งดอกมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 ซม. มีสีม่วงอ่อน ชมพู ถึง บานเย็น สามารถเจริญเติบโตได้ตามทุ่งหญ้าเปิด หรือสนามหญ้า พบได้ทางมหาสมุทรแปซิฟิกตอนใต้ ประเทศออสเตรเลีย และนิวซีแลนด์ (La Croix, 2008)

การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก (ระพี, 2516)

เนื่องจากกล้วยไม้เป็นพืชวงศ์ใหญ่มีทั้งชนิดที่เป็นกล้วยไม้ดินและกล้วยไม้อากาศจึงนับได้ว่า เป็นพืชที่มีขอบเขตอยู่ระหว่างสภาพพื้นดินกับสภาพบนหิน หรือบนต้นไม้ ดังนั้น กล้วยไม้ที่ขึ้นอยู่กับพื้นดิน จึงมีความโน้มเอียงไปในทางที่ต้องการอากาศมากกว่าต้นไม้ที่อาศัยพื้นดินทั่วๆไป ผู้ปลูกกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก จึงต้องมีความประณีตละเอียดลออในการเตรียมเครื่องปลูกที่โปร่งกว่าดินธรรมดา

ฤดูปลูก

กล้วยไม้สกุลนี้มีการเจริญเติบโตแบบ sympodial มีวงจรชีวิตแห่งการเจริญเติบโตสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลในรอบปี การขยายพันธุ์โดยการแบ่งกอ ควรตัดแบ่งแยกในฤดูที่กล้วยไม้เริ่มมีการแตกหน่อมากที่สุด ซึ่งแสดงว่า สภาพแวดล้อมธรรมชาติในขณะนี้ เหมาะแก่การแตกหน่อ และควรสังเกตลำหน้าลำหลัง กอที่มีลำหน้าควรเหลือไว้ไม่น้อยกว่า 3 ลำ ควรปล่อยให้หน่อซึ่งแตกใหม่เจริญเป็นหัว และเริ่มมีรากอ่อนๆโผล่มาให้เห็นเล็กน้อย ซึ่งสภาพเช่นนี้จะถึงประมาณต้นฤดูฝน จึงจะยกออกจากกระถางเดิมไปปลูกในกระถางใหม่ได้

ภาชนะปลูก

กล้วยไม้สกุลนี้เป็นกล้วยไม้ซึ่งตามธรรมชาติขึ้นอยู่กับพื้นดิน ดังนั้นภาชนะปลูกอาจพิจารณาใช้สิ่งใดก็ได้ เช่น กระถางดินเผา กระถางซีเมนต์ หรือ กระถางเคลือบ เป็นต้น หากเป็นต้นที่แข็งแรง สมบูรณ์ ขนาดใกล้ออกดอก อาจปลูกลงแปลงได้ แต่ถ้าเป็นลูกผสมต้นขนาดเล็ก ลูกผสมที่ผสมขึ้นใหม่ หรือพันธุ์แปลกๆ หายากมีปริมาณน้อย หรือเลี้ยงค่อนข้างยาก ควรปลูกลงกระถางเพื่อให้ปลอดภัยจากโรคและแมลง และได้รับการเอาใจใส่เป็นพิเศษ

โรงเรือน

เรือนเลี้ยงกล้วยไม้สกุลนี้อาจแตกต่างได้บ้างตามสภาพแวดล้อม หากเป็นสภาพทางภาคใต้ของประเทศไทย ซึ่งมีฤดูการชุ่มชื้นยาวนาน อาจไม่ต้องมีการบังร่มเงามากนัก ยิ่งเป็นพันธุ์ที่เลี้ยงง่าย ปลูกลงแปลง หรืออยู่ใกล้บริเวณที่มีไอชื้นและเย็นจากต้นไม้ใหญ่ อาจปลูกกลางแจ้งให้ได้รับแสงแดดเต็มที่ จะเจริญงอกงามให้ดอกดีมาก แต่ถ้าเป็นบริเวณซึ่งมีภูมิประเทศร้อน ค่อนข้างแห้งแล้ง หรือมีฤดูฝนไม่ยาวนาน อาจจะต้องทำหลังคาระแนงบังร่มให้บ้าง ถ้าเป็นต้นขนาดเล็กหรือลำหลังของต้นพันธุ์ดีซึ่งแยกจากต้นเดิม ต้นที่กำลังฟื้นตัว หรือเป็นต้นที่เลี้ยงค่อนข้างยาก อาจจะต้องทำโรงเรือน ปรับระแนงหลังคาให้แสงละเอียดและร่มเย็นพอสมควร หากเป็นต้นขนาดที่ไม่แข็งแรงมากนักหรือต้นขนาดเล็ก อาจต้องพิจารณาทำหลังคากระจกใสบังฝนไว้ภายในโรงเรือน สำหรับการเก็บกล้วยไม้ไว้ในโรงเรือนนั้น เนื่องจากเป็นกล้วยไม้ดิน กระถางและเครื่องปลูกย่อมมี

น้ำหนักมากพอสมควร การตั้งโต๊ะนับว่าเหมาะสมที่สุด และควรทำโต๊ะเตี้ยๆ เพื่อให้การปฏิบัติรักษาสามารถกระทำได้สะดวกและทั่วถึง

เครื่องปลูก

การเตรียมเครื่องปลูก จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ เช่น ความโปร่งตัวระบายน้ำได้ดี อุ้มความชื้นไว้ได้เหมาะสม มีอาหารพืชพอสมควร และมีสภาพที่อำนวยให้รากเจริญงอกงามได้สะดวก หากใช้กระถาง ควรจัดขนาดของกระถางให้เหมาะสมกับขนาดต้น ไม่ควรใช้กระถางขนาดใหญ่เกินไป เพราะจะทำให้เครื่องปลูกชื้นเกินไป ควรใช้เครื่องปลูกที่โปร่งมีสภาพอำนวยให้แก่การระบายน้ำได้ดี ใส่รองก้นกระถางชั้นล่าง เช่น อิฐมอญทุบและใช้ตะแกรงลวดตาข่ายร่อนเอาเฉพาะก้อนที่มีขนาดเสมอกัน ส่วนเครื่องปลูกชั้นถัดขึ้นมา จะพิจารณาใช้อิฐหรืออิฐผสมถ่านขนาดเล็ก ซึ่งผ่านการร่อนด้วยตะแกรงมาแล้ว ส่วนชั้นบนนั้นมีการใช้ใบไม้ผุ ใบไม้แห้งสับหรือบดให้เป็นชิ้นเล็กๆผสมกับขี้วัวหรืออิฐ เป็นต้น

การขยายพันธุ์กล้วยไม้

การขยายพันธุ์กล้วยไม้สามารถแบ่งออกได้ 2 วิธี คือ

1. การขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ คือ การขยายพันธุ์ด้วยการผสมเกสร ซึ่งมีการพัฒนาในรังไข่ไปเป็นผล ในกล้วยไม้เรียกว่า ฝัก แล้วจึงนำเมล็ดที่อยู่ในฝักของกล้วยไม้มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เพื่อให้งอกเป็นต้นกล้วยไม้ต่อไป แม้ว่าการเพาะเมล็ดจะทำให้ได้ต้นกล้วยไม้ขึ้นมาใหม่ และมีจำนวนมากก็ตาม แต่ผลของการเพาะเมล็ดยังแสดงลักษณะต่างๆ ที่ผิดเพี้ยนไปจากต้นแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์ ต้นกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเมล็ดอาจมีลักษณะที่แตกต่างหรือผิดแปลกไปในทางที่ดีกว่าหรือไม่ก็ได้ เช่นการผสมเกสรระหว่างกล้วยไม้พันธุ์แท้จะได้ลูกผสมที่มีลักษณะเหมือนเดิมและการผสมเกสรระหว่างกล้วยไม้พันธุ์ลูกผสมจะได้ลูกผสมที่มีลักษณะต่างๆตามความซับซ้อนของยีนพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ (สุชาดา, 2547)
2. การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ คือ การนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของกล้วยไม้ที่ไม่ใช่ฝักไปขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มปริมาณ ผลดีของการขยายพันธุ์โดยวิธีนี้ คือ จะได้ต้นใหม่ที่ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม พันธุ์เดิม และมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนเดิม ซึ่งเป็นข้อดีสำหรับการขยายพันธุ์กล้วยไม้ที่มีลักษณะดีอยู่แล้ว เช่นการตัดยอดของกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตแบบ monopodial การตัดแยกลำหน้า ลำหลัง และ กิ่งตะเกียงของกล้วยไม้ที่มีการเจริญเติบโตแบบ sympodial (สุชาดา, 2547) ส่วนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดยนำตายอด และตาข้างมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์เหลว วิธีการนี้เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า การปั่นตา (ดรรชิต, 2547)

การปรับปรุงพันธุ์

การปรับปรุงพันธุ์พืชแบบมาตรฐาน (conventional breeding) เป็นการคัดเลือกเมล็ดจากต้นพืชที่มีลักษณะที่ดีที่สุดที่ต้องการ นำเมล็ดมาปลูกและเก็บเกี่ยวในรุ่นต่อไป แต่วิธีการนี้เป็นการคัดเลือกพันธุ์ที่ช้า และลักษณะส่วนใหญ่มักได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมและระยะการเจริญเติบโตของพืช การพัฒนาการคัดเลือกพืชโดยใช้เครื่องมือระดับโมเลกุล (molecular technique) ซึ่งไม่ได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมและระยะการเจริญเติบโตของพืช จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์มากมายเพื่อช่วยย่นระยะเวลาหารคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์พืช นอกจากนั้นแล้วพืชที่ได้รับการคัดเลือกยังนำมาทดสอบปลูกในพื้นที่ที่ไม่ต้องการพื้นที่มากอีกด้วย งานระดับโมเลกุลจะช่วยคัดเลือกพันธุ์ชนิดที่มีองค์ประกอบของยีนที่เหมาะที่สุดในการแสดงออกให้ได้ผลผลิตตามต้องการ (อมรา, 2546; อรรัตน์, 2548)

ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid)

ดีเอ็นเอเป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในรูปของยีนซึ่งควบคุมกิจกรรมภายในเซลล์ รวมทั้งการถ่ายทอดข้อมูลจากเซลล์หนึ่งไปเซลล์หนึ่ง การเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันทำให้เกิดความหลากหลาย และ สร้างความแตกต่างในพืชแต่ละชนิด (สุรีพร, 2546)

เครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker)

เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker technique) เป็นเครื่องหมายที่ใช้ในการตรวจสอบหรือบอกตำแหน่งโมเลกุลภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตซึ่งไม่ได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อม และระยะการเจริญเติบโตของพืช จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์มากมายในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น การจัดจำแนกพืชและการศึกษาความหลากหลายของพืช (อรรัตน์, 2548) เครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้กันทั่วไปมี 2 ชนิดคือ โปรตีน (ในรูปไอโซไซม์) และกรดนิวคลีอิค (ในรูปของดีเอ็นเอ) (สุคนทิพย์, 2546)

1. เครื่องหมายโปรตีน (protein marker)

การตรวจสอบโดยแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วย้อมแถบโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม ข้อดี คือสามารถตรวจได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูง แต่มี

ข้อจำกัด คือจำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังมีไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน จึงต้องเลือกเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ผลที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสิ่งแวดล้อม

ไอโซไซม์ หรือ ไอโซเอนไซม์ จัดเป็นตัวระบุตำแหน่งชนิด co-dominant markerใช้ในระยะแรกของงานวิจัยเพื่อจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ การใช้เทคนิคนี้ยังพบข้อจำกัดในการตรวจสอบเพื่อจำแนกพันธุ์และลูกที่เกิดจากการผสมข้าม (Gallacher *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังพบด้วยว่าเครื่องหมายไอโซไซม์ ไม่เป็นโพลีมอร์ฟีซึมและมักให้ผลแตกต่างกันในห้องปฏิบัติการที่แตกต่างกัน (Glaszmann *et al.*, 1988) การแปลผลทางพันธุกรรมของข้อมูลที่ได้จากการทำไอโซไซม์ในพืชที่เป็น highly polyploid บ่อยครั้งมีความซับซ้อน จึงไม่สามารถที่จะแปลผลความผันแปรที่มีอยู่มากนี้ได้ ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการใช้ไอโซไซม์ในการตรวจสอบระหว่างพันธุ์

2. เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอมีวัตถุประสงค์เพื่อบ่งชี้ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) การตรวจสอบพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบในระดับโปรตีน เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บได้นานกว่า สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่เก็บไว้เป็นเวลานานได้ เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบจากเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโตหรือสภาพทางสรีรวิทยาที่ต่างกันได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีน มีหรือไม่มีการแสดงออก จึงตรวจสอบได้โดยไม่จำกัด ครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่หลากหลาย ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายทำได้อย่างกว้างขวางประยุกต์ใช้ในงานด้านต่างๆ ได้ไม่จำกัด (สุรินทร์, 2545)

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ เครื่องหมาย RAPD (William *et al.*, 1990) เครื่องหมาย AFLP (Vos *et al.*, 1995) และ เครื่องหมาย Microsatellite หรือ SSR เป็นต้น (สุรีพร, 2546)

การค้นหายีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันด้วยเทคนิค differential display

ดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ (Differential display reverse transcription PCR, DDRT-PCR) เป็นเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุลที่มีศักยภาพสูงในการค้นหายีนที่แสดงออกแตกต่างกันโดยสามารถใช้ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างเซลล์หรือเนื้อเยื่อ (Liang and Pardee, 1992) ประกอบด้วยขั้นตอนของการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอจากเอ็มอาร์เอ็นเอโดยใช้ anchored primer และเอนไซม์ reverse transcriptase ตามด้วยการคัดกรองแถบซีดีเอ็นเอด้วย random arbitrary primer ซึ่ง

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ดังกล่าวถูกนำไปแยกความแตกต่างโดย polyacrylamide gel electrophoresis (ภาพที่ 2) และตัดแถบที่น่าสนใจเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

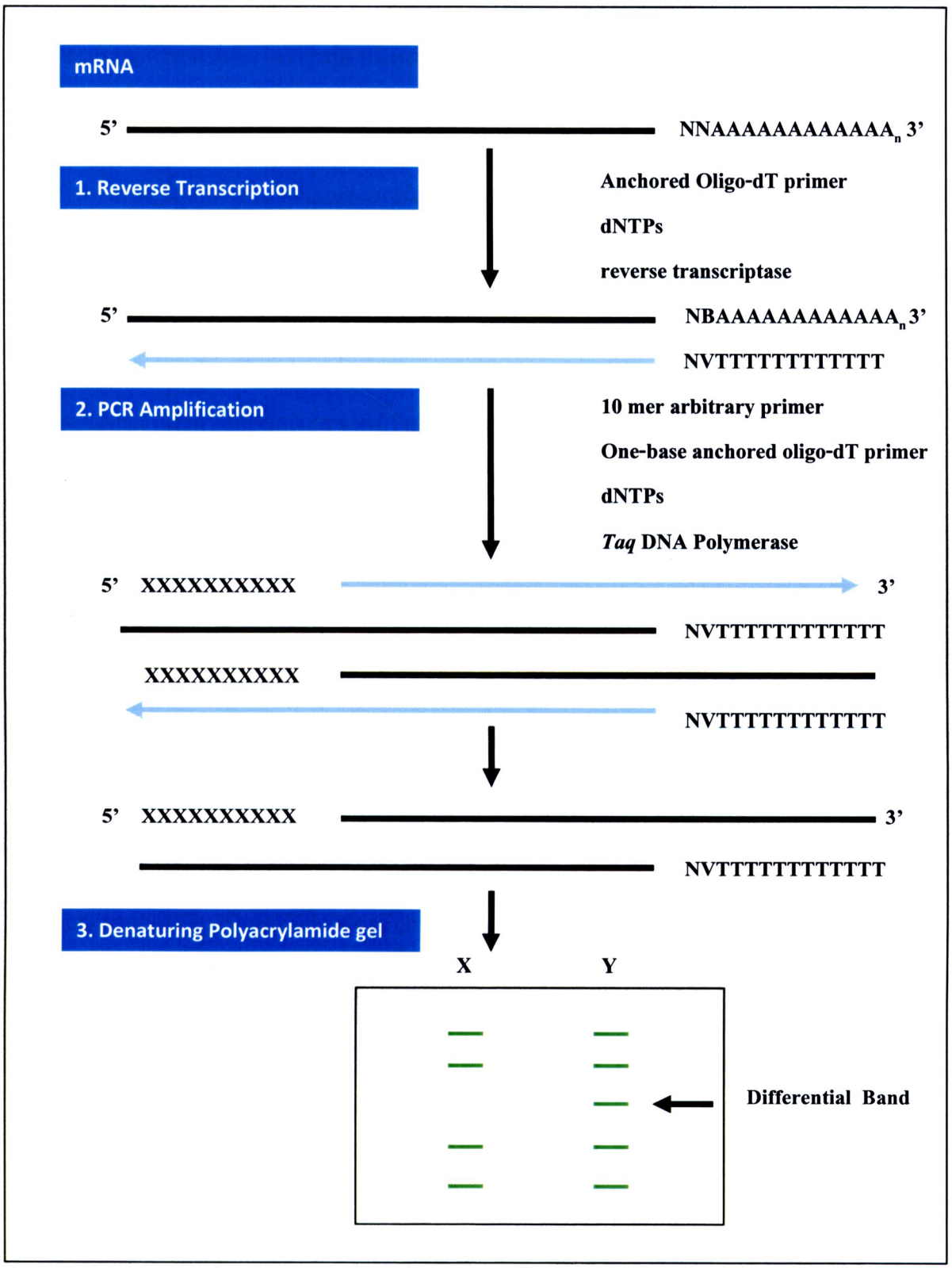
รายงานการวิจัยเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้เทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์

เทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ สามารถใช้ในการจำแนกการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันได้ทั้งใน พืช สัตว์ แมลง และจุลินทรีย์ และเป็นที่นิยมเนื่องจากสามารถปฏิบัติงานได้ง่ายและได้ผลดี (Chen *et al.*, 2004) มีการนำเทคนิคดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในพืชเพื่อตรวจหายีนที่ควบคุมหรือเกี่ยวข้องกับลักษณะทางสรีรวิทยาเช่น

Ogihara *et al.* (1998) ศึกษาการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อการสร้างรวงของข้าวสาลี โดยสกัดอาร์เอ็นเอจากรวงข้าวสาลี ใบแก่ เกสรเพศผู้ เกสรเพศเมีย รังไข่ และราก คัดเลือกไพรเมอร์แบบสุ่ม 76 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 13 ชนิด ที่ให้แถบที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อรวงข้าวสาลี จึงได้โคลนแถบเหล่านี้และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน *LEAFY* และ *APETALA1* ใน *Arabidopsis* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่อเจริญ และยังคล้ายกับยีน *UFO* ซึ่งเป็นยีนที่จำเพาะต่อการสร้างดอกใน *Arabidopsis*

นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์เพื่อศึกษายีน *CONSTANS* (*CO*) ซึ่งรวมถึงยีน *PnCO* ที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อการชักนำการออกดอกใน *Pharbitis nil* ผลการศึกษาพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *PnCO* ถูกกระตุ้นด้วยช่วงแสง โดยระดับของ *PnCO* จะสูงเมื่อมีช่วงกลางคืนมากกว่า 14 ชม. แต่ระดับของ *PnCO* จะลดต่ำลงเมื่อช่วงมืดน้อยกว่า 12 ชม. (Liu *et al.*, 2002)

เทคนิคนี้ยังสามารถใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนภายใต้สภาวะเครียด โดย Park *et al.* (2003) ได้คัดแยกซีดีเอ็นเอเพื่อศึกษายีนที่จำเพาะต่อการตอบสนองต่อความเครียดจากการขาดน้ำในพริก ซึ่งผลการศึกษาพบการแสดงออกของยีน *Ca-LEAL1* ที่ทำหน้าที่ตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดจากการขาดน้ำและความเค็ม รวมถึงกลไกการตอบสนองเมื่อเกิดบาดแผล



ภาพที่ 2 ไดอะแกรม เทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ (ดัดแปลงจาก : Liang *et al.*, 2006)

ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน pyruvate decarboxylase ในสตรอเบอร์รี่ 2 พันธุ์ ช่วงระยะการเจริญเติบโต การสุก หลังการเก็บเกี่ยว และภายใต้ความเครียด พบว่าสตรอเบอร์รี่มีการแสดงออกของยีนต่างไปจากพืชชั้นสูงอื่น คือยีน *Fapdc1* และ *Fapdc3* และได้เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนทั้งสองโดย Northern blot และ RT-PCR ผลการทดลองพบว่ามีการแสดงออกของยีนทั้งสอง ที่แตกต่างกันในระยะการเจริญเติบโต และระหว่างกระบวนการสุกของผล แต่ยีนทั้งสองมีการแสดงออกที่เหมือนกันในการตอบสนองต่อความเครียด และในระยะหลังการเก็บเกี่ยว (Moyano, 2003)

มีการใช้เทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ศึกษายีนจำเพาะที่ตอบสนองต่อการขาดน้ำในรากถั่ว (*Phaseolus vulgaris* L.) โดย Torres *et al.* (2006) ได้สกัดอาร์เอ็นเอจากปลายรากถั่วที่ปลูกในสภาพ aeroponic แล้วทำให้เกิดสภาวะขาดน้ำ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่อยู่ในสภาวะขาดน้ำ ผลการทดลองพบแถบซีดีเอ็นเอที่น่าสนใจจากการทำดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ถึง 1200 แถบ ซึ่ง 8.7% ของแถบที่พบเป็นแถบที่เกิดจากตัวอย่างที่ถูกกระตุ้นโดยการขาดน้ำ การโคลนแถบซีดีเอ็นเอจำนวน 42 แถบ และเลือกมา 20 โคลนเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิธีการ northern analysis พบว่า 16 โคลนมีการแสดงออกของยีนที่ควบคุมโดย ABA ก่อนการขาดน้ำ และอีก 4 โคลนพบยีนที่ตอบสนองต่อการขาดน้ำ ซึ่งคาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อการขาดน้ำในรากถั่ว

Tessitori *et al.* (2007) ได้ใช้เทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในใบส้ม (*Citrus medica*) ที่ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อ *Citrus viroids III* (CVd - III) พบยีนที่ตรวจสอบได้ทั้งหมด 18 ยีน โดย 13 ยีน มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อถูกเข้าทำลายโดยไวรอยด์ ในขณะที่อีก 5 ยีน มีการแสดงออกที่ลดลง โดยยีนที่แสดงออกลดลงนั้นส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อความเครียด การส่งสัญญาณ การขนส่งกรดอะมิโน และการสร้างผนังเซลล์ ส่วนยีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการกดการทำงานของ RNA silencing (RGS) gene และเป็น transcription factors ในการส่งสัญญาณกระตุ้นเมื่อเกิดความเครียด

ชนกขวัญและคณะ (2550) ได้ศึกษาการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารออกฤทธิ์ในรากและใบของหนอนตายหยาก โดยวิธีดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ ด้วยการสกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนรากและใบ จากนั้นใช้อาร์เอ็นเอเป็น template ในการสร้างสายซีดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ กับไพรเมอร์ 2 ชุดคือ anchored primer จำนวน 10 ชนิด (A1 - A10) และ arbitrary primer จำนวน 26 ชนิด (ZP1 - ZP26) พบว่ามีคู่ไพรเมอร์ 2 กลุ่มคือ A1 A4 A7 คู่กับ ZP6 และ A1 A4 A7 คู่กับ ZP8 พบแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะกับปลายรากและใบ จากนั้นเลือกแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างรากและใบจำนวน 3

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 12 มี.ค. 2556
เลขทะเบียน 209119
เลขเรียกหนังสือ

แถบ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี directed-PCR พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากทั้ง 3 แถบไม่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนใดในฐานข้อมูล GenBank

การใช้ประโยชน์ของเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในไม้ดอกชนิดต่างๆ เช่น ในกล้วยไม้ Yu and Goh (2000) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในระหว่างออกดอกของลูกผสม *Dendrobium* Madame Thong-in เพื่อจำแนกยีนที่แสดงออกในเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดในระหว่างการเปลี่ยนแปลงระยะการเจริญเติบโตทางใบไปเป็นระยะสืบพันธุ์ ได้โคลนของซีดีเอ็นเอมาทั้งหมด 53 โคลนที่แสดงออกในเนื้อเยื่อเจริญปลายยอด และอีก 16 โคลนที่แสดงออกในเนื้อเยื่อที่กำลังพัฒนาไปเป็นปลายยอด เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามี 5 โคลนที่เป็น transcription factors ของ MADS-box gene of the AGL2 subfamily และ class 1 knox gene

นอกจากนั้นแล้วการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ต่างกันในดอกตูมของกล้วยไม้ *Calanthe discolor* และ *C. sieboldii* เพื่อศึกษายีน non-redundant differentially expressed genes (DEGs) ทั้ง 66 ชนิด ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกในระหว่างการพัฒนาของดอก และสัมพันธ์กับลักษณะของดอก Calanthe ผลการทดลองพบยีน 26 และ 40 DEGs มีการแสดงออกใน *C. discolor* และ *C. sieboldii* ตามลำดับ ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการชักนำการส่งสัญญาณ metabolic parthway และการส่งสัญญาณฮอร์โมน ข้อมูลเหล่านี้ช่วยให้เราเข้าใจกลไกการพัฒนาดอก และมีประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ Calanthe ต่อไป (Park *et al.*, 2009)

การแสดงออกของยีนที่ต่างกันในดอกเบญจมาศภายใต้ความเครียดจากเสียง โดยเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 6 แถบ ขนาดตั้งแต่ 200-600 bp และมี 3 แถบ ได้แก่ SA3 SG7-1 และ CA2 ที่ให้ผลบวกในการทำ Northern blot ขนาด 270 580 และ 370 bp ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าแถบ SA3 และ SG7-1 มีการแสดงออกเด่นชัดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยคลื่นเสียง แต่แถบ SG7-1 มีการแสดงออกที่มากกว่า ส่วนแถบ CA2 ถูกยับยั้งโดยคลื่นเสียงไม่ให้แสดงออก สรุปได้ว่า การแสดงออกของยีนถูกกระตุ้นหรือยับยั้งได้ด้วยเสียง (Hongbo *et al.*, 2008)

การใช้เทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ในการศึกษาในพืชอื่นๆ เช่น การศึกษาแผนที่กายภาพพันธุกรรมที่ควบคุมขนาดของรากและการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถชอนไชของรากข้าวบนโครโมโซมแท่งที่ 4 โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดอาร์เอฟแอลพีร่วมกับเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ ซึ่งผลการวิจัยนี้ทำให้เกิดความเข้าใจยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตของรากข้าวมากยิ่งขึ้น (วราพงษ์, 2551) รวมถึงการศึกษาการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันที่สัมพันธ์กับการต้านทานโรค yellow rust ในข้าวสาลีโดยใช้เทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ โดยได้ปลูกเชื้อของโรค yellow rust 2 สายพันธุ์คือ *Puccinia striiformis f. sp. tritici* ชนิดที่มีพิษและไม่มีพิษ ทำการ

ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยดูจากแถบที่แตกต่าง จากเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ พบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันทั้งหมด 33 ยีน และนำมาศึกษาเชิงคุณภาพด้วย qRT-PCR พบแถบที่มีผลต่อการชักนำการแสดงออกของโรค ส่วนอีก 1 แถบยังไม่พบข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI จึงคาดว่าจะเป็นการค้นพบลำดับเบสใหม่ในข้าวสาลี จากข้อมูลที่ได้พบยีนที่เกี่ยวข้องคือ cyclophilin like protein และ ubiquitin-conjugating enzyme (E2) หรือ Rad6 ซึ่งยีนนี้มีการแสดงออกในกระบวนการ ubiquitinylation ใน programmed cell death ซึ่งแสดงออกต้านทานต่อโรค yellow rust (Bozkurt *et al.*, 2007)