บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

1. ถิ่นกำเนิดและการแพร่กระจายของงา

งามีชื่อวิทยาศาสตร์เป็นภาษาละตินว่า *Sesamum indicum* Linn. เป็นพืชในวงศ์ Pedaliaceae ซึ่งประกอบด้วย 16 genera จะมีด้วยกัน 36 species งาพันธุ์ปลูกมีจำนวนโครโมโซม 2n = 2x = 26 (Nimmakayala *et al.*, 2006)

มีหลักฐานว่างามีถิ่นกำเนิดในประเทศเอธิโอเปีย ทวีปอาฟริกา และแพร่กระจายไปยังอินเดียและจีน มีการปลูกงาในประเทศอินเดียมาหลายพันปี ก่อนที่พ่อค้าชาวอาหรับและเมดิเตอร์เรเนียนจะนำงาไปปลูกในประเทศแถบอาหรับและยุโรป โดยเฉพาะในแถบเมดิเตอร์เรเนียน มีผู้พบหลักฐานว่าชาว บาบิโลน ในประเทศโซมาเลียมีการปลูกงามานานกว่า 3,350 ปี ก่อนคริสตกาล และใช้น้ำมันงาสำหรับทำยาและอาหารดังมีบันทึกไว้ใน Medical. Papyrus of Thebes ทหารโรมันนำงาไปปลูกในประเทศอิตาลีในคริสต์ศตวรรษที่ 1 แต่ปรากฏว่าสภาพภูมิอากาศไม่เหมาะสมกับการปลูก ในช่วงปลายศตวรรษที่ 17 และ 18 มีการนำเมล็ดงาเข้ามาปลูกในประเทศสหรัฐอเมริกาโดยทาสชาวอาฟริกันเป็นผู้นำเข้ามา และในปัจจุบันบางพื้นที่ทางตอนใต้ของประเทศสหรัฐอเมริกา งาก็ยังเป็นที่รู้จักกันในชื่อ บีน (benne) ซึ่งเป็นชื่อในภาษาอาฟริกัน ชาวอารยันนำงาจากประเทศอินเดียไปปลูกในเกาะสุมาตราในอินโดนีเซียและในประเทศจีน จากนั้นงาได้แพร่กระจายไปยังญี่ปุ่น โดยมีพระและพ่อค้าเป็นผู้นำเข้าไป (นฤทัย และคณะ 2541)

ชื่อภาษาสันสกฤตของเมล็ดงาและน้ำมันงาคือ tila แปลว่าน้ำมัน แต่อาจเรียกชื่ออื่นแตกต่างกันไปในบางท้องที่ เช่น งาเมล็ดสีขาวเรียก “tilli” เมล็ดสีดำเรียกว่า “till” พันธุ์งาที่มีอายุสั้นเรียกว่า “tal” ส่วนภาษาอินเดียสมัยใหม่เรียกงาว่า gingeli และ gingelly ชาวโปรตุเกสได้นำงามาจากบราซิลมีชื่อเรียกว่า Gegelium ซึ่งเป็นชื่อที่คล้ายกับชาวอินเดียเรียกว่างาที่มาจากหมู่เกาะอินเดีย ในประเทศจีนสมัยโบราณงากับ linseed มีการเรียกชื่อสับสนกันมาก คือเรียกต้นงาว่า “tzu-ma” น้ำมันงาเรียก “izu-ma-yu” หรือ “hsiang-ya” แป้งงาผสมน้ำเรียกว่า “tzu-ma-ching” งาเป็นที่รู้จักในประเทศแถบเอเชียภายใต้ชื่ออื่น ๆอีก เช่น benne seed sesamum และ ajonjoli เมล็ดงาเป็นเมล็ดพืชที่มีขนาดเล็ก มีรูปร่างค่อนข้างรี เป็นรูปไข่ เมื่อนำไปอบหรือคั่วให้สุกจะมีรสมันหอมอร่อยเมล็ดมีไขมันประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ และมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย 2 ชนิดที่มักไม่พบในน้ำมันพืชอื่น เมล็ดงามีหลายสีตั้งแต่ขาวครีมไปจนถึงแดง น้ำตาลแดง น้ำตาลและดำ

2. การจัดจำแนกประเภทของงา

การจำแนกงาออกจากพืชอื่น ๆ ตามหลักอนุกรมวิธานของงาเป็นดังนี้

Class Magnoliopsida

Subclass Asteridae

Order Scrophulariales

Family Pedaliaceae

Genus Sesamum

2.1 จัดจำแนกโดยใช้จำนวนโครโมโซม

การจัดจำแนกโดยใช้จำนวนโครโมโซม จัดจำแนกได้เป็น 3 พวก (Kalamani,2006)

2.1.1 กลุ่มที่ 1 มีจำนวนโครโมโซม 2n = 26 ได้แก่ *S. indicum S. alatum S. africanum S. auriculatum S. brasiliense S. edule S. hopkinsii S. javanicum S. lamiifolium S. luteum S. occidentale S. oleiferum S. orientale S. somalense Anthadenia sesamoides Dysosmon amoenum Volkameria sesamoides*

2.1.2 กลุ่มที่ 2 มีจำนวนโครโมโซม 2n = 32 ได้แก่ *S. laciniatum S. latifolium*

2.1.3 กลุ่มที่ 3 มีจำนวนโครโมโซม 2n = 64 ได้แก่ *S. radiatum S. caillei. S. foetidum S. mombazense S. occidentale S. talbotii Wernham S. thonneri*

2.2 จัดจำแนกงาในโดยใช้สีของเปลือกเมล็ด

ในประเทศไทยจะมีการจัดแบ่งงาตามสีของเปลือกหุ้มเมล็ดที่ใช้ปลูกสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม (สุทธินี, 2533)

2.2.1 งาดำเมล็ดใหญ่ มีลักษณะฝัก 4 กลีบ (carpel) 8 พู (locule) เป็นส่วนใหญ่ค่อนข้างดำสนิท อายุ 90-100 วัน

2.2.2 งาแดง ขนาดเมล็ดเล็กกว่ากลุ่มแรกเล็กน้อย สีดำไม่สนิทจะมีสีน้ำตาลปนแดงอยู่ ลักษณะต้นจะแตกกิ่งก้านมาก ฝักมีลักษณะ 2 กลีบ 4 พู เป็นส่วนใหญ่

2.2.3 งาขาวเมล็ดเล็ก เป็นพันธุ์ที่ไวต่อช่วงแสง ปลูกได้ดีในช่วงปลายฤดูฝน ต้นและใบจะใหญ่ ฝักและเมล็ดเล็ก

2.2.4 งาขาวเมล็ดปานกลาง ลักษณะต้นกล้าคล้ายกลุ่มที่ 2 ลักษณะฝัก 2 กลีบ 4 พู อายุ 80-90 วัน

3. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา (morphological data)

ในการจำแนกลักษณะเพื่อศึกษาความหลายทางพันธุกรรม โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา เป็นการเปรียบเทียบความแตกต่างจากลักษณะภายนอก เช่น ลักษณะใบ สีดอก รูปร่างเมล็ดและผล เป็นต้น ในการตรวจสอบความแตกต่างของพืชแบบนี้ค่อนข้างมีความง่ายและสะดวก แต่ในธรรมชาติแล้วพืชที่อยู่ในสกุล (genus) และชนิด (species) เดียวกันแต่ต่างพันธุ์ (cultivar) มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาก อาจทำให้เกิดความยุ่งยากในการระบุชนิดพืชได้จนไม่สามารถจำแนกพืชเหล่านั้นออกจากกันได้ทำให้เป็นอุปสรรคในการศึกษาได้ นอกจากนั้นสุรีพรและดรุณี (2545) รายงานว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืช ไม่สามารถใช้บอกความแตกต่างของพันธุ์พืชในลักษณะคุณภาพได้ เช่นปริมาณน้ำมัน ปริมาณโปรตีนหรือลักษณะการทนทานต่อโรคและแมลง หรือสารเคมีกำจัดวัชพืช แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาโดยวิธีนี้มีข้อด้อยคือลักษณะทางสัณฐานวิทยามักจะแปรปรวนตามสภาพอากาศและปัจจัยทางภูมิศาสตร์ (Bruschi *et al.*, 2003)

4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของงา

4.1 ราก (root)

งามีระบบรากแบบ tap root system รากที่หาอาหาร (feeding root) จะสานกันแน่นทึบบริเวณผิวดิน ขนาด รูปร่างและความยาวของรากจะแปรผันไปตามชนิดของงาและสภาพดินฟ้าอากาศ งาชนิดที่ไม่แตกกิ่ง (unbranched type) จะมีรากน้อยกว่าพวกแตกกิ่ง (branched type) งาเมื่อปลูกในเขตร้อนชื้นจะมีอัตราส่วนระหว่างรากและลำต้น (root/shoot ratio) สูงกว่าเมื่อปลูกในเขตแห้งแล้ง นอกจากนี้ยังพบว่างาพันธุ์ที่ให้อัตราส่วนระหว่างราก และลำต้นมากจะให้เปอร์เซ็นต์น้ำมันในเมล็ดสูงกว่าพันธุ์ที่ให้อัตราส่วนระหว่างรากและลำต้นน้อย

4.2 ลำต้น (stems)

งามีลำต้นตั้งไม่มีแก่นสูง 40-200 เซนติเมตร ละต้นเป็นเหลี่ยมและเป็นร่องตามความยาวของต้น อาจมีขนเล็กน้อยหรือหนาแน่นขึ้นอยู่กับพันธุ์ สีของลำต้นมีสีเขียวและอาจมีสีปนม่วงบ้าง แต่ส่วนใหญ่จะมีสีเขียวเข้ม ต้นมีทั้งชนิดที่แตกกิ่ง (branched type) และไม่แตกกิ่ง (unbranched type)

4.3 ใบ (leaves)

ใบมีก้านใบ (petiole) ยาวประมาณ 5 เซนติเมตร ใบอาจจะอยู่ตรงกันข้ามหรือเรียงสลับบนลำต้น หรือในต้นเดียวกันใบที่อยู่ส่วนล่างอาจจะอยู่ตรงกันข้ามและส่วนบนจะเรียงตัวแบบสลับ ใบมีขนทั้งหน้าใบและหลังใบ ใบมีรูปร่างต่างๆ กัน ตั้งแต่ยาวเป็นรูปหอกหรือกลมรี ยาว 3-17 เซนติเมตร กว้าง 1-7 เซนติเมตร สีของใบมีตั้งแต่สีเขียวจางถึงสีเขียวเข้ม บางพันธุ์มีสีเหลือง ความอุดมสมบูรณ์ของดินมีอิทธิพลต่อสีและปริมาณขนของใบ บางพันธุ์ถ้าปลูกในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง ใบจะมีสีน้ำเงินและมีขนค่อนข้างมาก

4.4 ดอก (flowers)

ดอกเกิดในซอกใบ (leaf axil) ในแต่ละซอกใบมี 1-7 ดอกแล้วแต่พันธุ์ ก้านดอก (peduncle) สั้นยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร ที่ฐานดอกทั้งสองข้างมี extra floral nectary สีเหลือง หรือสีดำ ดอกมี bract ยาว 1 เซนติเมตร calyx ยาว 6-8 มิลลิเมตร กลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นท่อยาว (corolla tube) คล้ายระฆังยาวประมาณ 3 เซนติเมตร ปลายดอกแยกออกเป็น 5 กลีบ กลีบล่างตรงกลางยาวที่สุด มีลักษณะเหมือนลิ้นยื่นออกมา ขอบกลีบดอกหยัก กลีบดอกมีสีชมพูขาวอมม่วงหรือเหลือง ภายในดอกมี stamen 4 อัน ยาว 1.5-2 เซนติเมตร 2 อัน สั้น 1.0-1.1 เซนติเมตร 2 อัน style ยาว 1.5-2 เซนติเมตร 1 อัน ปลาย stigma แยกเป็น 2 แฉก (bifid)

4.5 ผล (fruits)

ผลเป็นแบบกระเปาะหรือฝัก (capsules) รูปร่างและขนาดของฝักจะแปรผันไปตามพันธุ์ มีตั้งแต่รูปทรงแบนและทรงกระบอก ยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ฝักจะวางเฉียงกับลำต้นหรือกิ่ง ฝักมีร่องตามความยาวของฝักและมีขนปกคลุม ปลายฝักมีจะงอยปาก (beak) แหลม เมื่อฝักแก่ปลายฝักจะแตกเกิดรู เมล็ดร่วงออกได้ การแตกของผลจะแตกตามยาว จากด้านปลายสู่ฐาน ซึ่งควบคุมโดย mesocarp รังไข่ (ovary) ประกอบไปด้วย 2-4 carpels มีตั้งแต่ 4-12 locules การแก่ของผลจะแก่จากส่วนโคนต้นไปหาส่วนยอด

4.6 เมล็ด (seed)

เมล็ดมีขนาดเล็กเรียงซ้อนกันอยู่ในฝัก น้ำหนัก 1,000 เมล็ด อยู่ระหว่าง 2-4 กรัม เปลือกของเมล็ดแต่ละพันธุ์มีสีแตกต่างกัน เช่น ขาว เหลือง เทา แดง น้ำตาล ดำ และทอง เป็นต้น ปริมาณน้ำมัน (oil content) อยู่ระหว่าง 35-57 เปอร์เซ็นต์ เมล็ดที่มีสีจางจะมีเปอร์เซ็นต์น้ำมันสูงกว่าเมล็ดสีเข้ม

5. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย DNA (DNA marker)

การศึกษาพันธุ์พืชด้วยลายพิมพ์ DNA นั้นมีความจำเป็น (Smith and Smith, 1992) เนื่องจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชยังมีข้อจำกัดในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ เนื่องจากลักษณะดังกล่าวแปรผันไปตามสภาพแวดล้อมและมี polymorphic ต่ำ จึงไม่เพียงพอสำหรับแยกความแตกต่างของพันธุ์พืชหลาย ๆชนิด อีกทั้งลักษณะทาง phenotype มักได้รับอิทธิพลของปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมกับสิ่งแวดล้อม (GxE) ทำให้ผลการตรวจสอบที่ได้มีความแปรปรวนหรือมีความผิดพลาดอยู่บ้าง (Ceatano-Anolles *et al.*, 1991; Nybom, 1994; พรพันธ์, 2538)

เครื่องหมาย DNA (DNA Marker) เป็นชิ้นส่วนของ DNA ของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ หรือต่างชนิด ที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่าง DNA เครื่องหมายด้วยกันหรือระหว่างเครื่องหมาย DNA กับลักษณะที่แสดงออก เครื่องหมาย DNA มีหลายชนิดเช่น RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (amplified fragment length polymorphic) RAPD (ramdom amplified polymorphic DNA) และ Microsatellites หรือ simple sequence repeat (SSR) เป็นต้น

การสร้างลายพิมพ์ DNA ของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งนั้น ต้องการหาเครื่องหมาย DNA ที่ใช้ในการสร้าง โดยทั่วไปแล้ว เครื่องหมาย DNA ที่ใช้ในการทำลายพิมพ์ DNA สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วนกลุ่ม คือ (สมวงษ์, ม.ป.ป.)

ก. เครื่องหมาย DNA ที่ไม่จำเพาะเจาะจง คือ สามารถใช้เครื่องหมาย DNA ชนิดนี้สร้างลายพิมพ์ DNA ของพืชชนิดใดชนิดหนึ่ง ซึ่งเครื่องหมายDNAเหล่านั้นมีลักษณะเป็นแบบ universal เป็นเครื่องหมาย DNA ที่ไม่จำเพาะเจาะจง เช่น RAPD, AFLP

ข. เครื่องหมาย DNA ที่จำเพาะเจาะจง คือ ต้องมีการพัฒนาเครื่องหมาย DNA ขึ้นสำหรับทำลายพิมพ์ DNA ของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งโดยเฉพาะ จึงมีความแม่นยำสูงมาก แต่ใช้ทุนสูงในการพัฒนาเครื่องหมายDNAที่จำเพาะ ตัวอย่างเครื่องหมาย DNA ชนิดนี้ เช่น RFLP, SSR

6. Polymerase Chain Reaction : PCR (ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส)

เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA เฉพาะบริเวณที่ต้องการที่ปรากฏอยู่ใน genome ให้มีจำนวนมากขึ้นกว่าเดิมหลายล้านเท่าในหลอดทดลอง โดยอาศัยหลักการเดียวกันกับการเกิด DNA replication ภายในเซลล์ เทคนิค PCR คิดค้นโดย Kary Mullis ในบริษัทซีตัส (Cetus Corporation) สหรัฐอเมริกา และถูกตีพิมพ์ในวารสาร Science ครั้งแรกในเดือนธันวาคม ปี 1983 (ประพนธ์และรัชนา, 2534)

6.1 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR

ปฏิกิริยา PCR มีองค์ประกอบหลายชนิดดังนี้

6.1.1 DNAต้นแบบ (Template DNA) คือเส้น DNA ที่มีบริเวณส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณอยู่ DNA ที่สร้างขึ้นมาใหม่จะจำลองตัวตาม DNA ต้นแบบนี้ ซึ่งได้มาจากการสกัดจากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชที่ยังอ่อนอยู่

6.1.2 Primer (ไพรเมอร์) เป็น DNA สายสั้นๆ ที่สังเคราะห์ขึ้น ในกรณี RAPD primer มี ความยาวประมาณ 10 นิวคลีโอไทด์ต่อกัน เพื่อจะใช้เป็นตัวสุ่มจับกับ DNA ต้นแบบตรงตำแหน่งที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน ความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.1-0.5 ไมโครโมลาร์ ถ้าปริมาณ primer มากเกินไปจะทำให้โอกาสการจับคู่ผิดพลาด (mispriming) เพิ่มขึ้น เป็นผลให้เกิดผลผลิต PCR (PCR products) ที่ไม่จำเพาะขึ้นมากมาย และยังเพิ่มโอกาสการเกิด primer dimer ให้สูงขึ้น เป็นผลให้ได้ผลผลิต PCR ที่ต้องการลดลง (วัชรีและมนตรี, 2536)

6.1.3 Deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTPT ใช้ในการเติมสาย DNA เพื่อให้เกิด DNA สายใหม่ ความเข้มข้นของ dNTPs แต่ละชนิดจะอยู่ในช่วง 50-200 ไมโครโมลลาร์ ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยา PCR อย่างจำเพาะถูกต้อง การใช้ปริมาณ dNTPs ที่มีความเข้มข้นมากเกินไป อาจก่อให้เกิด mispriming ของ primer และ misincorporation ของ dNTPs (Saiki, 1989)

6.1.4 เอนไซม์ *Taq* polymerase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยให้มีการต่อเชื่อม primer ด้วย dNTPs เพื่อให้เกิด DNA สายใหม่ตลอดแนวของ DNA ต้นแบบ ช่วงความเข้มข้นที่

เหมาะสมของ *Taq* DNA polymerase จะอยู่ในช่วง 1.0-2.5 ยูนิต (units) ต่อ 100 ไมโครลิตร ซึ่งการให้เอนไซม์ในปริมาณที่สูงเกินไป จะก่อให้เกิดผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะขึ้นได้ *Taq* polymerase มีคุณสมบัติพิเศษคือสามารถทนความร้อนสูง (93-95 องศาเซลเซียส) ได้ primer ถ้ามีความเข้มข้นของ KCl_2 มากเกินไป จะไปลดประสิทธิภาพการทำงานของเอมไซม์ *Taq* DNA polymerase (Saiki and Gelfand, 1989)

6.1.5 buffer มาตรฐานสำหรับปฏิกิริยา PCR ที่นิยมใช้ทั่วไป คือ tris-HCl pH 8.3-8.8 และมี KCl ที่ความเข้มข้นประมาณ 50 มิลลิโมลาร์ รวมอยู่ด้วย เนื่องจาก KCl ทำหน้าที่ในการเร่งการเกิด primer annealing แต่ถ้ามีความเข้มข้นของ KCl มากเกินไป จะไปลดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

6.1.6 $MgCl_2$ มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในปฏิกิริยา PCR เนื่องจาก Mg^{2+} มีผลต่อ primer annealing และความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์ (enzyme fidelity) ถ้าความเข้มข้นของ Mg^{2+} น้อยเกินไป จะทำให้ผลผลิต PCR ที่ได้ลดลง โดยทั่วไปปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ dNTPs แต่ละชนิดในความเข้มข้น 200 ไมโครโมล ความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่ใช้จะอยู่ในช่วง 0.5-2.5 มิลลิโมลาร์ แต่ถ้ามีการใช้ dNTPs ในปริมาณที่สูงกว่านี้ ต้องปรับความเข้มข้นของ Mg^{2+} ให้สูงขึ้นด้วย เนื่องจาก dNTPs สามารถจับกับ Mg^{2+} ดังนั้นถ้ามีปริมาณ dNTPs มากไป จะไปจับกับ Mg^{2+} จนทำให้เหลือ Mg^{2+} ในรูปอิสระไม่เพียงพอสำหรับให้ในปฏิกิริยา (Saiki, 1989)

ในปฏิกิริยา PCR มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องปรับสภาวะขององค์ประกอบต่างๆ ที่มีผลต่อปฏิกิริยาให้มีความเหมาะสม เพื่อให้ประสิทธิภาพของการทำ PCR เกิดขึ้นได้สูงสุด

6.2 ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR

ปฏิกิริยา PCR จะมีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA อย่างต่อเนื่องเป็นซ้ำๆกัน โดยแต่ละรอบจะมี 3 ขั้นตอนด้วยกัน denaturation, primer annealing และ primer extension (จริยา, 2540 ; ประพนธ์และรัชนา, 2534)

ขั้นตอน denaturation เป็นขั้นตอนที่มีการแยกสายคู่ของ DNA ที่ต้องการศึกษาเป็นสายเดี่ยว (single strands) ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นการทำลายพันธะไฮโดรเจนที่ยึด DNA สองสายไว้ด้วยกัน ทำให้ DNA ต้นแบบ (template) ที่เป็นเกลียวคู่ (double stranded DNA) แยกออกจากกันกลายเป็นสายเดี่ยวอยู่เป็นอิสระ ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ในการเกิด DNA replication

ขั้นตอน primer annealing เป็นขั้นตอนที่ primer เข้าไปจับ (anneal) กับสาย DNA ต้นแบบ (template) สายเดี่ยว ตรงบริเวณคู่สมกัน เมื่อทำการลดอุณหภูมิลงต่ำประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของ primer

ขั้นตอน primer extension เป็นขั้นตอนที่สังเคราะห์ DNA สายใหม่ให้สมบูรณ์ ต่อเนื่องจากจุดที่ primer เข้าไปจับกับ DNA ต้นแบบ สร้างต่อออกไปจาก primer ในทิศทาง 5'→3' ของ primer โดยมีเอนไซม์ DNA polymerase และ deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) เป็นตัวทำให้มีการต่อเชื่อม primer อุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 70-75 องศาเซลเซียส

หลังจากเสร็จสิ้นทั้งสามขั้นตอนถือเป็นหนึ่งรอบของปฏิกิริยาเพื่อให้ได้ชิ้นส่วน DNA ที่ต้องการมากพอ จึงจำเป็นมีการทำซ้ำในขั้นตอนที่หนึ่งถึงสาม ปฏิกิริยานี้ถึงเรียกว่า Polymerase Chain Reaction

6.3 ข้อดีของ PCR

DNA ที่สนใจศึกษา (target DNA) ไม่จำเป็นต้องบริสุทธิ์หรือมีปริมาณมาก สามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้น 30-40 รอบ จะได้ DNA ที่ต้องการ มีปริมาณ 1-10 ล้านเท่า นอกจากนั้นยังสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ตั้งแต่ DNA ที่มีความยาว 50 คู่เบสไปถึง DNA ที่มีความยาวมากกว่า 20,000 คู่เบสได้ PCR เป็นปฏิกิริยาในหลอดทดลอง ในการเพิ่มปริมาณจึงไม่จำเป็นต้องเลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย ไม่ต้องใช้เครื่องมีราคาแพงสามารถทำได้ง่าย โดยใช้ water bath ด้วยวิธีธรรมดาได้ และสามารถตรวจผลได้โดยตรงโดยไม่ต้องใช้สารกัมมันตรังสี ซึ่งสามารถตรวจผลได้ด้วยการทำ agarose gel electrophoresis

จุดเด่นของ RAPD คือเป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็ว (Gepts, 1993) ได้มีการนำเครื่องหมายโมเลกุล RAPD มาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชหลายชนิด เช่น *Brassica* (Demeke *et al.*, 1992; Jain *et al.*, 1994), พืชตระกูลมะเขือเทศ (Williams and St. Clair, 1993), ข้าว (Yu and Nguyen, 1994; Mackill, 1995), *Triticum* (Vierling and Nguyen, 1992; Chandrashekhar and Nguyen, 1993), กาแฟ (Orozco-Castillo *et al.*, 1994), *Medicago* L. (Yu and Pauls, 1993), *Carica* L. (Stiles *et al.*, 1993) และ กล้วย (Kaemmer *et al.*, 1992)

6.4 ข้อจำกัดของ PCR

ปฏิกิริยา PCR ซึ่งใช้ primer ต้องทราบลำดับเบสของ DNA ขนาบข้างของยีนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ต้องสังเคราะห์ primer ให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ในการศึกษาแต่ละเรื่อง นอกจากนี้ปฏิกิริยา PCR เป็นเทคนิคที่มีความไวอย่างยิ่งต่อ DNA ที่แปลกปลอม

7. การประยุกต์ใช้ PCR ในเทคนิคต่าง ๆ

7.1 RAPD

RAPD (random amplified polymorphic DNA) เป็นการวิเคราะห์ DNA ที่อาศัยเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ในหลอดทดลอง โดยใช้ primer เพียงชนิดเดียวเข้าไปสุ่มเกาะกับ DNA ต้นแบบบนตำแหน่งที่มีลำดับเบสคู่สมกัน (complementary) เพื่อเป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการสังเคราะห์ DNA (Williams *et al.*, 1990) และสามารถเพิ่มปริมาณ DNA เป็นจำนวนล้าน ๆ เท่าในหลอดทดลอง (in vitro) ได้

primer ที่ใช้เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR สำหรับวิเคราะห์ RAPD เป็น primer ที่มีขนาด 8-10 เบส และต้องมีส่วนประกอบของ G+C ค่อนข้างสูงประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์ (ต่ำสุด 50 เปอร์เซ็นต์) การจับเกาะของ primer เป็นการสุ่มเกาะกับ DNA ต้นแบบมีการสุ่มหาลำดับเบสเป้าหมาย (target sequence) ที่กระจายอยู่ในจีโนม DNA ที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ โดย DNA ต้นแบบทั้งสองสายที่เป็นคู่กันต้องมีตำแหน่งของลำดับเบสที่เป็นแบบ inverted sequence ซึ่งเป็นบริเวณที่เปิดโอกาสให้ primer เข้าจับเกาะได้ 2 ตำแหน่งบน DNA ต้นแบบทั้ง

สองสาย ในทิศทางกลับกัน (inverted orientation) ทำให้ DNA แต่ละชิ้นสามารถเพิ่มปริมาณได้ แต่อย่างไรก็ตามชิ้น DNA ที่เพิ่มปริมาณได้ต้องมีขนาด 200 - 3,000 bp เนื่องจากข้อจำกัดของเอ็นไซน์ *Taq* DNA polymerase ที่สามารถนำเอานิวคลีโอไทด์แต่ละตัวมาต่อกันได้ยาวไม่เกิน 3,000 bp (Tingey and Tufo 1993; *Yu et al.*, 1993)

การจับกัน (annealing) ระหว่าง primer กับลำดับเบสเป้าหมายนี้มี 2 กรณี คือ จับกันได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (100 เปอร์เซ็นต์ homology) และจับได้บางส่วน (mismatched annealing of primer to partially complementary sequence within total DNA) ส่วนการตรวจผลทำได้โดยแยกขนาด DNAที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธีอีเล็กโทรโฟริซีส (electrophoresis) และตรวจแถบ DNA โดยการย้อมด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ซึ่งจะปรากฏแถบ DNA (DNA band) ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (Ultraviolet, UV) ทำให้สามารถตรวจสอบลายพิมพ์ DNA ของพืชได้

ชิ้นส่วนของ DNA นั้นไม่สามารถทราบลำดับเบสได้เลย (anonymous DNA sequence) การปรากฏ (presence) และการไม่ปรากฏ (absence) ของชิ้นส่วน DNA หรือ band นั้น สามารถเปรียบเทียบระหว่างสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการศึกษา ซึ่งอาจเป็นสปีชีส์เดียวกันจากคนละประชากรได้ จำนวนของแถบ DNA ที่เพิ่มปริมาณได้ขึ้นอยู่กับชนิดของ primer และ DNA ที่ใช้เป็นต้นแบบ ถ้าใช้ primer ชนิดเดียวกันแต่ใช้ DNA ต้นแบบที่แตกต่างกัน แบบแผนของ DNA ที่ได้จะมีความแตกต่างกัน จึงทำให้สามารถจำแนกพืช หรือสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมออกจากกันได้ (Tingey and Tufo 1993 อ้างโดย Yu *et al.*, 1993) ข้อมูลที่ได้สามารถประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมได้

การศึกษา polymorphism ในสิ่งมีชีวิตโดยการใช้เทคนิค RAPD เกิดขึ้นได้ดังนี้ (ปรีชา, 2540) เมื่อ annealing site 2 จุด มีระยะห่างกันพอสมควรจะได้ชิ้น DNA ที่ได้จากเทคนิค PCR มีขนาดใหญ่พอสมควร ถ้า DNA บางส่วนขาดหายไป ซึ่งเป็นบริเวณที่ primer จับ อาจพบว่าไม่มี band เกิดขึ้น นั่นหมายความว่าการ amplification ล้มเหลวโดยสิ้นเชิง กรณีนี้เกิดขึ้นเนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทป์ไปจากเดิม การแทรกเข้ามา (insertion) หรือการขาดหายไป (deletion) ของชิ้น DNA มีขนาดเล็กหรือใหญ่ขึ้นอยู่กับลำดับแต่ในทางปฏิบัติจะสังเกตเห็นได้ยาก

RAPD เป็นเทคนิคที่สะดวกและรวดเร็ว ในการปฏิบัติใช้เวลาน้อย นอกจากนั้นยังใช้ปริมาณ DNA ตัวอย่างน้อยมากคือ 10-400 นาโนกรัม เท่านั้นและไม่จำเป็นต้องทราบลำดับของเบสบน DNA ต้นแบบอีกด้วย ซึ่งสามารถใช้กับนิวคลีโอไทด์ที่มีปริมาณ GT ค่อนข้างสูงประมาณ 60-70 เปอร์เซ็นต์ (ต่ำสุด 50 เปอร์เซ็นต์) มีระดับ polymorphism สูง เทคนิคนี้สามารถศึกษากับตัวอย่างพืชคราวละมาก ๆได้ นอกจากนั้นไม่มีการใช้สารกัมมันตรังสี จึงทำให้ผู้ปฏิบัติงานไม่ได้รับอันตรายจากสารกัมมันตรังสีและยังใช้ทุนต่ำกว่าเทคนิคอื่น

RAPD เป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด dominant markers การแยกพืชที่มียีโนไทป์ที่เป็น AA กับ Aa ไม่สามารถทำได้เพราะชิ้น DNA ที่ได้จากพืชต้น AA และ Aa จะได้แถบของ DNA ที่มีขนาดเท่ากัน และไม่สามารถคำนวณหาค่า allele frequencies ได้ เนื่องจากชิ้น DNA ที่ได้จากพืชต้น AA และ Aa จะได้แถบของ DNA ที่มีขนาดเท่ากัน แต่ทั้งสองยีโนไทป์นี้สามารถ

แยกออกจากต้นพืช aa ได้ ซึ่งต้นพืช aa จะไม่มีชิ้น DNA ที่เกิดจากการทำ PCR ในการเกิดแถบของ DNA จะมีความไวต่อปัจจัยภายนอกมาก ในการทำการทดลองซ้ำอาจให้ผลที่คลาดเคลื่อนไป ดังนั้นการตรวจสอบทุกครั้งจำเป็นต้องควบคุมปัจจัยต่างๆ ให้คงเดิมเสมอ มี repeatability ค่อนข้างต่ำ ทำให้รูปแบบ DNA (RAPD banding pattern) ที่ได้จากการใช้ primer หนึ่งๆ ไม่มีความสม่ำเสมอ

7.2 AFLP

AFLP (amplified fragment length polymorphism) เป็นเครื่องหมาย DNA ที่ใช้หลักของ PCR ในการตรวจหาความแตกต่างของชิ้น DNA ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วนำมาเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR เป็นการประยุกต์รวมระหว่างวิธี RFLP และวิธี PCR หมายถึงความหลากหลายของชิ้น DNA ที่ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และแสดงผลโดยการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ที่ถูกย่อยเหล่านั้น (สมวงษ์, ม.ป.ป.)

AFLP เป็นเครื่องหมาย DNA ชนิดหนึ่งที่ได้มาจากการเลือกเพิ่มปริมาณ ชิ้นส่วน DNA ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเทคนิคเริ่มต้นโดยการตัด genomic DNA ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดที่มีความถี่ในการตัดต่างกัน ชนิดหนึ่งมีความสามารถในการตัด genomic DNA ในระดับต่ำ (rare cutter) เช่น *EcoRI* (6 base cutter) และอีกชนิดหนึ่งตัดด้วยความถี่สูงกว่า (frequent cutter) เช่น *Mse*I (4 base cutter) จากนั้น ต่อ adaptor (ชิ้นส่วน DNA สั้นๆ) สองชนิด เข้าที่ปลายทั้งสองด้านของชิ้น DNA (restriction fragment) แล้วเพิ่มปริมาณของชิ้น DNA เหล่านั้นมา ซึ่งชิ้น DNA ที่เพิ่มปริมาณขึ้นได้จะมีขนาดของ fragment ต่างๆ กันตามขนาดที่ได้จากการตัดด้วยเอ็นไซม์ในขั้นตอนแรก ทั้งนี้ adaptor ที่ใช้จะมีลำดับเบสที่จำเพาะกับ primer นี้มีผลต่อ multiplex ratio (จำนวนของ genetic loci ต่างๆ ที่สามารถวิเคราะห์ได้ในต่อครั้งในการทำการทดลอง) ของการวิเคราะห์ อันเนื่องมาจากระดับความแตกต่างของการคัดเลือก ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณ (PCR) ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสูตร 4^{2n} โดยให้ n = จำนวนของเบสคัดเลือก

AFLP สามารถให้ polymorphism ในจำนวนที่สูง เหมาะสำหรับการศึกษาความหลากหลายหรือการทำ DNA finger printing โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสมาก่อน เป็น PCR-based technique ซึ่งประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย แต่ค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการทำ PCR โดยทั่วๆ ไป เพราะมีขั้นตอนในการทำที่ซับซ้อนกว่า ต้องอาศัยความชำนาญ และระบบการวิเคราะห์ผลที่ต้องใช้สารเคมีราคาแพง แต่สามารถให้ multiplex ratio ในระดับสูง ในการเลือกใช้คู่เอ็นไซม์ สำหรับเตรียม restriction fragment และการเลือกคู่ primer ในการ amplify ให้ได้เหมาะสมและได้ข้อมูลพอเพียงในแต่ละการศึกษานั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา ซึ่งอาจจะต้องทำการทดลองมากครั้งเพื่อให้ได้ตามต้องการ ความสามารถในการทำซ้ำได้ของเทคนิค AFLP ถึงแม้ว่าจะได้รับการยืนยันว่า มีความสามารถในการทำซ้ำได้สูง ซึ่งจะมากกว่า RAPD แต่ก็มีหลายการศึกษาที่ให้ข้อสังเกตถึงความสามารถในการทำซ้ำ ขึ้นอยู่กับชนิดของ AFLP เช่น การอ่านผล DNA band อาจได้ผลไม่เหมือนกันในการอ่านของแต่ละคน ซึ่งขึ้นอยู่กับความชัดเจนของแถบ DNA band เป็นสำคัญ และขั้นตอนของการเตรียม genomic DNA อาจมีผลต่อ banding pattern ความไม่สมบูรณ์ของการ digestion อันเป็น

ผลมาจาก DNA ที่คุณภาพต่ำ หรือความด้อยประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ นอกจากนั้นยังมีปัญหาเกี่ยวกับข้อมูล Dominance AFLP marker เหมือนกับ RAPD ที่ polymorphism ส่วนใหญ่จะเป็นลักษณะ dominant ซึ่งมาจากผลของ band ที่อ่านได้เป็น presence และ absence ในแต่ละ loci บางครั้ง พบ loci ที่ปรากฏเป็น co-dominant แต่จำนวนมีน้อยมากหรืออาจจะมีมากกว่าที่เห็น แต่ไม่สามารถบ่งบอกได้อย่างชัดเจน เนื่องจากความซับซ้อนของ banding pattern homology ปัญหาข้อนี้เกิดขึ้นมาจากการที่ไม่สามารถบอกได้ว่า band ที่เคลื่อนที่มาอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกันบนเจลเป็น band เดียวกัน หรือมาจาก loci เดียวกันบน genome (homologous) หรือไม่ เนื่องจาก primer ของ AFLP ไม่ได้ออกแบบโดยทราบ sequence มาก่อน fragment ที่ amplify ได้นั้น มีความจำเพาะกับ selective based เท่านั้น sequence ข้างใน จึงอาจมีความแตกต่างกัน ชิ้นที่มีขนาดเท่ากัน จึงไม่จำเป็นต้องเหมือนกัน ซึ่งอาจจะมาจากต่างตำแหน่ง genome ก็ได้ ผลจากการศึกษาหลายๆงานทดลองพบว่าส่วนใหญ่แล้ว band ที่เคลื่อนที่มาอยู่ที่ตำแหน่งเดียวกัน (co-migration band) เหล่านั้นจะเป็น homologous band

7.3 Microsatellites

Microsatellites หรือ Simple Sequence Repeat (SSR) จีโนมของสิ่งมีชีวิตจะมีบริเวณ intron ส่วนใหญ่จะมี DNA ที่มีละดับเบสที่ซ้ำกับเป็นช่วงๆ และเบสที่ซ้ำนี้จะอยู่ติดกัน เรียกว่า tandem repeat ในแต่ละสิ่งมีชีวิตจะมีเบสชนิดนี้แตกต่างกัน เช่นจะมีการซ้ำกันของเบสที่เป็น GA หรือ AT เป็นต้น ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน แม้จะมีรูปแบบการซ้ำกันของเบสเป็นชนิดเดียวกันแต่จะมีจำนวนซ้ำของ tandem repeat ไม่เท่ากัน จึงได้นำมาออกแบบ primer ที่เป็น SSR ขึ้นมาใช้ โดยเป็นการออกแบบให้เป็น primer ชนิด loci specific primer ซึ่งทำการออกแบบในบริเวณสองข้างของ tandem repeat ได้เป็น forward primer และ reverse primer ที่มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 20 เบส ส่วนความยาวของแต่ละ tandem repeat จะประมาณ 2-4 เบส เมื่อทำ PCR แล้วได้ผลเป็น DNA ที่มี polymorphism ที่เกิดจากจำนวนซ้ำของ tandem repeat ที่ไม่เท่ากันนั่นเอง

SSR เป็นเครื่องหมาย DNA ชนิด co-dominant ที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง heterozygous กับ homozygous เป็นเครื่องหมาย DNA ที่มี repeatability สูง นอกจากนั้นยังให้ polymorphisms สูง แต่ในการศึกษาโดยใช้ SSR นั้นค่อนข้างใช้ต้นทุนสูง เนื่องจากว่าจะต้องทราบลำดับเบสก่อนที่จะ ออกแบบ primer ได้ (จิรวัฒน์, 2546)

8. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช

8.1 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชโดยใช้เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา

Semagn *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาความแปรปรวนของ *Phytolacca dodecandra* ทั้งหมด 48 ตัวอย่างจากที่ต่างๆ จำนวน 17 accession ใน Ethiopia ที่อยู่ตามความสูงจาก 1,600 ถึง 3,000 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล ทำการศึกษาโดยบันทึกลักษณะทั้งหมด 16 ลักษณะ โดยเป็นลักษณะทางปริมาณ 13 ลักษณะ และลักษณะทางคุณภาพ 3 ลักษณะ โดย

ลักษณะคุณภาพจัดจำแนกตามขนใบประกอบด้วย กลุ่ม glabrous (ไม่มีขนใบ) slightly pubescent (ขนใบกระจัดกระจาย) และ pubescent (ขนใบหนาแน่น) นอกจากนั้นยังจำแนกตามความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 3 ระดับ คือ lowland (1,600-2100 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล) central highland lowland (2101-2500 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล) highland lowland (2501-3000 เมตรเหนือระดับน้ำทะเล) พบว่าสามารถจัดกลุ่มออกได้เป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่ม glabrous สามารถแยกออกจากกลุ่มได้อย่างชัดเจน

Cui *et al.* (2001) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองจากประเทศจีนและ สหรัฐอเมริกา โดยได้ทดสอบ 72 accession ซึ่งมาจากประเทศจีน 47 accession และมาจากสหรัฐอเมริกา 25 accession จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยา 25 ลักษณะ พบว่าถั่วเหลืองจากประเทศจีนมีความแปรปรวนมากกว่าที่รวบรวมจากสหรัฐอเมริกา ถั่วเหลืองจากสหรัฐอเมริกามีฐานพันธุกรรมมาจากประเทศจีน

De Haan *et al.* (2003) ได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของ Illinois bundleflower (*Desmanthus illinoiensis*) ซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่วที่ใช้ประโยชน์จากเมล็ด และเป็นพืชอาหารสัตว์ ศึกษา 20 accession ซึ่งทุก accession เป็นพันธุ์ป่า ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาทั้งหมด 58 ลักษณะ ทำcluster analysis โดยใช้วิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS พบว่า พืชทั้ง 20 accession สามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม

Casas *et al.* (1999) ได้ศึกษาความแปรปรวนของลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Stenocereus stellatus* จำนวน 324 accession จาก 19 เมืองโดยแบ่งเป็น พืชป่า พืชที่เลี้ยงในหลอดทดลอง และพืชปลูก เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของทั้ง 3 กลุ่ม และมีการนำข้อมูลจากตัวอย่างซึ่งรวบรวมมาจาก 19 เมืองมาตรวจสอบความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยวิธี cluster analysis สร้าง dendrogram โดยใช้ UPGMA พบว่าสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ และแบ่งกลุ่มได้ 3 กลุ่มย่อย โดยแยกเป็นกลุ่มพันธุ์ป่า กลุ่มที่เลี้ยงในหลอดทดลองและกลุ่มพันธุ์ปลูกของเมืองต่างๆ

Sapir *et al.* (2002) ศึกษาความแปรปรวนของดอก iris ซึ่งรวบรวมจากดินแดนประเทศอิสราเอล จอร์แดน ปาเลสน์ และคาบสมุทรไซไนของประเทศอิยิปต์ ประเมินใน 42 ประชากร จาก 9 species เก็บข้อมูล 16 ลักษณะ ความสัมพันธ์จากการวิเคราะห์ Cluster analysis พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มแรก เกี่ยวกับ *I. petrana* Dinsmore และ *I. mariae* W. Barbey ซึ่งประกอบด้วยประชากรส่วนใหญ่เป็นกลุ่มดอกสีเข้ม กลุ่มที่ 2 ประชากรทั้งหมดเป็นกลุ่มดอกสีจาง และมีดอกสีเข้มปนอยู่บ้างบางสายพันธุ์

Beuningen and Busch (1997) ศึกษาการจัดหมวดหมู่ของความหลากหลายพันธุกรรมในแหล่งพันธุ์ที่สำคัญทั้งแหล่งพันธุ์จากนักปรับปรุงพันธุ์และแหล่งพันธุ์ที่ได้เก็บรักษาไว้ เพื่อศึกษาการจัดกลุ่มข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) 289 พันธุ์ โดยประเมินจากลักษณะสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณ 35 ลักษณะ ปลูก 3 สภาพแวดล้อม (ในแปลงทดลอง 2 สภาพและในเรือนทดลองอีก 1 สภาพ) เมื่อทำ Cluster analysis พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 17 กลุ่ม ซึ่งกลุ่มที่แบ่งได้นั้นมีความสัมพันธ์กับแหล่งกำเนิด

8.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชโดยใช้เครื่องหมาย DNA

Loeffler *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ใบของพืช *T. latifolia* ซึ่งเป็นพืชในท้องถิ่นของเกาะฮาวาย ที่ใช้ประโยชน์จากเส้นใย ทำการสกัด DNA จาก 35 ตัวอย่าง ใช้ primer ทั้งหมด 48 ชนิด แต่มีเพียง 23 ชนิดที่เห็นความแตกต่างสูง จึงได้นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาความหลากหลายซึ่งสามารถจัดกลุ่มของ *T.latifolia* ได้ทั้งหมด 3 กลุ่มที่ชัดเจนได้

Rajaseger *et al.* (1997) ได้ศึกษาชนิดของเนื้อเยื่อที่นำมาสกัด DNA และศึกษาความหลากหลายของ genus *Ixora* ทั้งหมด 22 ชนิด เมื่อนำรูปแบบของแถบ DNA จากการทำ PCR มาศึกษาพบว่าสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม และยังทดสอบและจำแนกพืชชนิดอื่น (out groups) ได้ด้วย พบว่าพืชชนิดอื่นแยกกลุ่มจาก *Ixora* ทั้งสองกลุ่มอย่างชัดเจน

Pojanagaroon and Tonpayom (2002) ทำการศึกษาลักษณะพันธุ์มะกอก (olive) โดยใช้เทคนิค RAPD โดยรวบรวมพันธุ์จากประเทศ สเปน อิตาลี และอิสราเอล จำนวน 18 พันธุ์มาทดสอบ แหล่งของ DNA ได้จากใบอ่อน ซึ่งสกัดโดยวิธี CTAB ใช้ primer ทั้งหมด 40 primer พบว่ามี 16 primer สามารถสร้างแถบเครื่องหมายแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของมะกอกทั้ง 18 พันธุ์ ได้ 128 แถบเครื่องหมาย เมื่อทำการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมโดยการสร้าง dendrogram พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มมะกอกออกได้เป็น 8 กลุ่ม โดยพบความสัมพันธ์กับลักษณะการใช้ประโยชน์ของผลและยังพบความสัมพันธ์กับประเทศแหล่งกำเนิดด้วย

ธีระชัยและนฤมล (2543) ได้ใช้เทคนิค RAPD ตรวจสอบพันธุ์พริกในประเทศไทย จากการเก็บตัวอย่างพริก 14 พันธุ์ มาตรวจสอบกับ primer 72 ชนิด พบว่า primer 70 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณDNAของพริกทั้งหมด และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์และแบ่งกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่ม ที่ได้สอดคล้องกับรูปร่างลักษณะและประวัติความเป็นมาของพริกแต่ละพันธุ์ นอกจากนั้นพบว่าในแต่ละพันธุ์สามารถแยกความแตกต่างได้โดยใช้primerเพียงชนิดเดียว แต่อย่างไรก็ตามในการตรวจสอบพันธุ์ที่ถูกต้องนั้นควรจะใช้ primer หลายชนิด

Okoli *et al.* (1997) ได้ทำการวิเคราะห์ RAPD ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน purple และ yellow nutsedge ทั้ง purple และ yellow nutsedge เป็นวัชพืชที่มีความอ่อนแอต่อเชื้อ *Puccinia canaliculata* จึงสามารถใช้เชื้อดังกล่าวควบคุมวัชพืชชนิดนี้ ได้ทำการวิเคราะห์จากความแปรปรวนระหว่างตัวอย่างทั้ง 2 species ที่ถูกเก็บรวบรวมมาจาก สภาพพื้นที่ที่แตกต่างกัน โดยนำหัวของ purple และ yellow nutsedge มาปลูกและเก็บใบอ่อนและใบแก่มาสกัด DNA โดยใช้วิธี CTAB นำ DNA ที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเทคนิค RAPD ใช้ purple และ yellow nutsedge จำนวน 7 ตัวอย่างในแต่ละ species พบว่า purple nutsedge ไม่แตกต่างกันในกลุ่มเพราะในกลุ่มนี้มีการขยายพันธุ์โดยใช้ clone เป็นส่วนมาก ส่วนในกลุ่ม yellow nutsedge มีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก เนื่องจากในกลุ่มนี้มีการขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด ทำให้มีโอกาสในการผสมเกสรและการกระจายทางพันธุกรรมไปได้มาก จากงานทดลองใช้ในการอธิบายถึงการแพร่กระจายของวัชพืชชนิด purple และ yellow nutsedge ทำให้สามารถควบคุมวัชพืชกลุ่มนี้โดยอาศัย bioherbicide ได้

Prathepha (1999) ทำการศึกษาตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมระดับ DNA ของข้าวหอมพื้นเมือง โดยทำการรวบรวมข้าวจำนวน 9 พันธุ์จาก 5 จังหวัดในภาค

ตะวันออกเฉียงเหนือ เมื่อใช้เทคนิค RAPD และใช้ primer ทั้งหมด 6 ชนิด พบว่าจำนวนแถบ DNA ที่เกิดขึ้นทั้งหมดรวม 42 แถบ มีขนาดตั้งแต่ 341-1400 คู่เบส และ DNAที่แสดงความแตกต่างระหว่างจีโนมของข้าวทั้ง 9 พันธุ์ มีจำนวน 23 แถบ และจากการประเมินระดับความหลากหลายของ DNA พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.01-0.64 ซึ่งเป็นระดับความหลากหลายของ DNA ที่มีความแปรปรวนมาก ข้าวทั้ง 9 พันธุ์นี้มีฐานพันธุกรรมที่กว้าง

Liu (1997) ได้ทำการศึกษาความหลากหลาย ของ *Stylosanthes scabra* ที่ได้จากการเก็บมาจากแหล่งต่างๆ จำนวน 100 ตัวอย่าง ตามลักษณะทางภูมิศาสตร์ที่ ATFGRC, CSIRO Tropical Agriculture โดยเก็บเมล็ดมาเพาะ 3-5 เมล็ด เมื่อต้นอ่อนงอก 3-5 วัน นำมาสกัด DNA ได้ใช้ primer ทั้งหมด 28 ชนิด ได้แถบ DNA ทั้งหมด 142 แถบสามารถแบ่งกลุ่มได้ 5 กลุ่ม ในการศึกษา *Stylosanthes scabra* ที่เป็นพืชอาหารสัตว์ เพื่อเป็นข้อมูลใช้ในทาง genetic ถ้ามีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์สูงก็ใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เป็นแหล่งของลักษณะทางพันธุกรรมที่เราต้องการได้

8.3 การเปรียบเทียบเครื่องหมายสัณฐานวิทยากับเครื่องหมาย DNA ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช

Bruschi *et al.* (2003) ใช้ลักษณะสัณฐานวิทยากับเครื่องหมาย DNA ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Quercus petraea* โดยทำการเก็บตัวอย่างจาก 5 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ด้วยกันคือ ในอิตาลี 3 ตัวอย่าง (TT,Tatti MR,Monterufoli; MC, Monte Corona) ตอนเหนือของ Apennines 1 ตัวอย่าง (CR, Carrega) และตอนใต้ของภูเขา Disjunct Modonie (PSM, Piano Costantino) โดยที่ TT, MR และ MC ได้มีพันธุ์ปนระหว่าง *Q. petraea* กับ *Q. pubescens* อยู่ด้วย โดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน 48 ลักษณะและ SSR โดยใช้ 6 primer จากนิเคลียสจีโนม และอีก 3 primer จากพลาสมิดจีโนม พบว่าในการศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถแยกพันธุ์ปนระหว่าง *Q. petraea* ออกจาก *Q. pubescens* ได้ แสดงให้เห็นได้ว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถแยกความแตกต่างในระดับของ inter- และ intrapopulation ได้ การศึกษาในระดับ DNA ทั้ง 5 ตัวอย่างพบว่า ได้ 81 alleles จากเทคนิค SSR ที่ใช้ primer ที่มาจากนิวเคลียส 6 ชนิด นอกจากนั้นยังรายงานว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความแปรปรวนไปตามสภาพแวดล้อม เช่น ความแปรปรวนของ latitude ความสูงของระดับน้ำทะเล และค่าสหสัมพันธ์ระหว่างการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการใช้ SSR แล้วพบว่ามีความสัมพันธ์กันน้อยมาก ($r = -0.0589$)

Hansen *et al.* (2000) ได้ศึกษาทดสอบสมมุติฐานในการกำหนด taxonomy และความสัมพันธ์ในพืชกลุ่ม *Potentilla* โดยศึกษาระดับโมเลกุลร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา จาก 21 ประชากร วิเคราะห์โดยใช้ RAPD และลักษณะสัณฐานวิทยา 64 ลักษณะ จากการวิเคราะห์ RAPD พบว่าจาก 60 primer และอีก 33 primer ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ของ *Potentilla* ได้เลย มีเพียง 27 primer ที่สามารถแยกความแตกต่าง และสามารถเกิดแถบ DNA ที่ให้ความแตกต่างกัน 35 แถบ สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่มอย่างชัดเจน เช่นเดียวกันกับการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาก็สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่มเช่นกัน เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา taxonomy จากโมเลกุลร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาให้ระดับของ taxonomy ที่ต่ำ

Beyene *et al.* (2005) ได้เปรียบเทียบวิธีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อใช้ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์พืช ในข้าวโพด 62 accession ที่ปลูกในเอธิโอเปีย โดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาของข้าวโพดทั้ง 62 accession และประเมินความสัมพันธ์ระหว่าง distances ของ phenotypic กับ genetic และทำการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยากับลายพิมพ์ DNA พบว่า จากการศึกษา distribution ของ dissimilarity coefficients ซึ่งค่า dissimilarity coefficients ของลักษณะสัณฐานวิทยามีค่าอยู่ระหว่าง 0.1-0.68 ซึ่งมีค่าค่อนข้างต่ำกว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบกับที่ศึกษาจากข้อมูลโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์อยู่ระหว่าง 0.27-0.63 กับ AFLP ที่มี range อยู่ระหว่าง 0.32-0.69

Maric *et al.* (2004) ที่ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวสาลีจากนักปรับปรุงพันธ์ 2 กลุ่ม ซึ่งปลูกในประเทศโครเอเชีย โดยให้ลักษณะสัณฐานวิทยากับการจดบันทึกแบบสืบประวัติ (pedigree) 12 ลักษณะและเครื่องหมาย DNA ชนิด RAPD จากการศึกษาพบว่า มีสหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางสัณฐานวิทยากับการวิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมาย DNA ค่อนข้างต่ำ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยสองวิธีนี้มีประสิทธิภาพไม่เท่ากัน เนื่องจากสภาพแวดล้อมมีผลต่อข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

Liliana *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาโดยแยกความแตกต่างขององุ่นโดยประเมินจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมขององุ่นซึ่งประกอบด้วย Criollas 9 พันธุ์ สายพันธุ์ยุโรป 6 พันธุ์และสายพันธุ์อเมริกา 1 พันธุ์ และทำการเปรียบเทียบกับ AFLP ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยใช้ 53 ลักษณะ สามารถจัดกลุ่มได้เป็น A, B และ C ในกลุ่มสายพันธุ์สายพันธุ์ยุโรป และ Criollas มีความเหมือนกัน 40 และ 45 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้มีความเหมือนกัน 37 เปอร์เซ็นต์และยังพบว่า Criolla Grande และ Cereza มีความเหมือนกันสูงถึง 73 เปอร์เซ็นต์ ส่วน SO4 ที่มาจากสหรัฐอเมริกากับ Criolla Cereza จะมีความสัมพันธ์กันน้อย (SMC=0.085) ในการวิเคราะห์ AFLP โดยใช้ Dice's ได้สหสัมพันธ์เป็น 0.74 ความเหมือนกันของ *T. Riojano* กับ *T. Mendocino* และ Mendocino กับ Moscatel Amarillo ค่อนข้างสูงเป็น 93 เปอร์เซ็นต์ (DC: 0.93) และ เป็น 95 เปอร์เซ็นต์ (DC: 0.95) ตามลำดับ สามารถจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่ม คือ A, B, C และ D เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่าง AFLP และข้อมูลทางสัณฐานวิทยาโดยใช้ Mantel test พบว่า มีความสัมพันธ์กันน้อยมาก ($r = 0.33$, $P = 0.9741$) เนื่องจากว่าลักษณะที่แสดงออกมานั้นเกิดจากสภาพ แวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง

Tatineni *et al.* (1996) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฝ้ายที่ได้จากการ ผสมพันธุ์ระหว่าง *Gossypium hirsutum* และ *G. barbadense* L. โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 19 ลักษณะและ RAPD เมื่อนำมาวิเคราะห์พบว่า RAPD มี 53 primer จาก 80 primer ที่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สังเคราะห์แถบ DNA ได้ 135 แถบ การศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและ RAPD สามารถบอกความแตกต่างของพืชที่ทำการศึกษาได้เป็น 2 กลุ่มตามตัวอย่างที่ศึกษา และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ $r = 0.63$