บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ลำไยเป็นพืชในวงศ์ Sapindaceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Dimocarpus longan* Lour. (เกศิณี, 2528; รวี, 2540) นอกจากนี้ยังมีชื่อพ้องคือ *Euphoria longana* Lam. (สมศักดิ์, 2527; เกศิณี, 2528) *Nephelium longana* Cambess. (สมศักดิ์, 2527; พิชัย, 2531) และ *Dimocarpus longana* Lour. (Subhadrabandhu, 1990) มีชื่อสามัญเป็นภาษาอังกฤษว่า longan, longyen หรือ lonkeng

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลำไย

ลำไยเป็นไม้ผลยืนต้นที่มีลักษณะใกล้เคียงกับลิ้นจี่ และเงาะ โดยมีลักษณะทั่วๆ ไป (Subhadrabandhu, 1990) ดังมีรายงานดังนี้

ลำต้น : มีขนาดปานกลางถึงใหญ่ ถ้าเป็นลำต้นที่เกิดจากเมล็ดจะมีลำต้นขึ้นตรง เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ มีทรงพุ่มสูงประมาณ 10-12 เมตร และถ้าเป็นลำต้นที่เกิดจากกิ่งตอน และไม่ได้รับการตกแต่งในขณะที่ต้นยังเล็ก มักแตกลำต้นหลายต้น ซึ่งไม่ค่อยเหยียดตรง ลักษณะเปลือกลำต้นขรุขระ มีสีเทาหรือสีเทาปนน้ำตาลแตกเป็นสะเก็ด

กิ่งก้าน : จะแตกออกรอบๆ ต้น โดยต้นที่ปลูกจากเมล็ดจะแตกกิ่งล่างสูงสุดจากพื้นดินประมาณ 2-4 เมตร และต้นที่ได้จากกิ่งตอนจะแตกกิ่งล่างสุดต่ำกว่า คือ ประมาณ 1-2 เมตร

ใบ : เป็นใบประกอบ ก้านใบรวมยาวประมาณ 15-30 เซนติเมตร มีใบย่อย 2-5 คู่ อาจมีการเรียงตัวแบบสลับหรือตรงข้ามกัน ใบแต่ละใบกว้าง 3-6 เซนติเมตร ยาว 7-15 เซนติเมตร รูปร่างของใบมีลักษณะต่างกันตั้งแต่ใบรูปรี รูปหอกปลายทู่ ปลายเรียวแหลม ด้านบนใบมีสีเขียวเข้มเป็นมัน ความกว้างและความยาวของใบขึ้นกับพันธุ์ลำไย

ช่อดอก : เกิดเป็นช่อ ตามปลายกิ่งด้านนอกของทรงพุ่ม ช่อดอกมีขนาดใหญ่ รูปทรงกรวย ดอกมีขนาดเล็ก สีขาวนวล ช่อหนึ่งๆ อาจประกอบด้วยดอกตัวผู้ ดอกตัวเมีย และดอกสมบูรณ์เพศ ซึ่งดอกตัวผู้จะอยู่ด้านโคนช่อ และจะบานก่อนดอกตัวเมีย

ดอกตัวผู้ : แต่ละดอกมีเกสรตัวผู้ 8 อัน หรือน้อยกว่า เรียงตัวแถวเดียวบนจานรองดอก เกสรตัวผู้ มีขนประกอบด้วยอับละอองที่มี 2 ช่อง

ดอกตัวเมีย : แต่ละดอกประกอบด้วย 2 รังไข่ บนจานรองดอก ผิวภายนอกของรังไข่ถูกปกคลุมด้วยขนสั้นๆ จะมีเพียง 1 รังไข่เท่านั้นที่จะเจริญไปเป็นผลส่วนอีกหนึ่งอันจะแห้งเหี่ยวไป

บางครั้งอาจจะพบว่ามีทั้ง 2 รังไข่ที่จะเจริญไปเป็นผล ซึ่งพบน้อยมาก ในดอกตัวเมียอาจพบเกสรตัวผู้ กรณีนี้เกสรตัวผู้จะลดรูป โดยก้านชูเกสรที่สั้นจำนวน 8 อัน จึงควรเรียกดอกชนิดนี้ว่า ดอกสมบูรณ์เพศ ดอกชนิดนี้ ละอองเกสรเป็นหมันและแห้งหลังจากดอกบาน ดอกที่มีละอองเกสรที่มีชีวิตเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ดอกตัวผู้มีการบานคาบเกี่ยวกันกับดอกสมบูรณ์เพศบนต้น เนื่องจากช่อดอกทั้งหมดมีการพัฒนาในเวลาที่ต่างกัน ซึ่งอาจใช้เวลา 4-6 สัปดาห์ ขึ้นกับพันธุ์ การถ่ายละอองเกสรเกิดเวลา 8.00-14.00 นาฬิกา อับละอองเกสรเริ่มแตกเวลา 12.00-17.00 นาฬิกา การติดผลเกิดในดอกตัวเมียที่บานเวลาเดียวกับดอกตัวผู้ ดอกตัวเมียที่บานก่อนหรือหลังดอกตัวผู้ จะมีโอกาสติดผลน้อย

ผล : หลังจากดอกได้รับการผสมพันธุ์แล้ว จะเจริญไปเป็นผลใช้เวลา 5-7 เดือน ขึ้นอยู่กับพันธุ์และสภาพภูมิอากาศ ในต้นที่แข็งแรง ช่อดอกหนึ่งช่ออาจมีถึง 80 ผล ลักษณะของผลมีทั้งทรงกลม และเบี้ยว ขนาดของผลและเมล็ดแตกต่างกันตามพันธุ์ แต่ละผลมีน้ำหนักแตกต่างกันจาก 5-20 กรัม คุณภาพผลที่ดีจะอยู่ในช่วง 10-18 กรัม เปลือกสีน้ำตาลปนเหลือง หรือน้ำตาลปนแดง หรือเขียวปนน้ำตาล ทั้งนี้ขึ้นกับพันธุ์ลำไย เนื้อลำไยมีสีขาวลักษณะคล้ายวุ้น รสหวาน กลิ่นหอม มีน้ำหนัก 75% ของน้ำหนักผล เมล็ดเดี่ยวสีน้ำตาลดำเป็นมันเรียบ เมล็ดลำไยจึงถูกเรียกว่า dragon's eye ผลหนึ่งผลมีเพียงเมล็ด 1 เมล็ด

ลำไยในประเทศไทย แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ลำไยเครือ และลำไยต้น

1. ลำไยเครือ หรือลำไยเถา (semi – vine longan ; *Euphoria scandens* Winit Kerr) มีการเจริญเติบโตกึ่งเลื้อยคล้ายกับต้นเฟื่องฟ้า ผลมีขนาดเล็ก เมล็ดใหญ่ ปกติพบในภาคตะวันออกของประเทศไทย เช่น จังหวัดชลบุรี ส่วนใหญ่ใช้เป็นไม้ประดับ

2. ลำไยต้น (bush longan or longan tree) สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 3 ชนิด คือ

2.1 ลำไยดั้งเดิม (indigenous longan) พบในป่า ต้นมีขนาดใหญ่ ผลมีขนาดเล็ก เนื้อผลบาง อาจมีประโยชน์ด้านงานผสมพันธุ์

2.2 ลำไยพันธุ์พื้นเมือง (native longan or common longan) ในบางพื้นที่ของประเทศไทยเรียกว่า ลำไยกระดูก พบทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศ เช่น เชียงใหม่ ลำพูน หนองคาย และอุบลราชธานี เป็นต้น กิ่งและลำต้นมีเปลือกไม้มาก ลำต้นชะลูดตั้งตรง สามารถเจริญเติบโตเป็นไม้ใหญ่ได้ ให้ผลผลิตมาก แต่ผลมีขนาดเล็ก เมล็ดใหญ่ และมีเนื้อผลน้อย คุณภาพผลต่ำ มีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ 13.75%

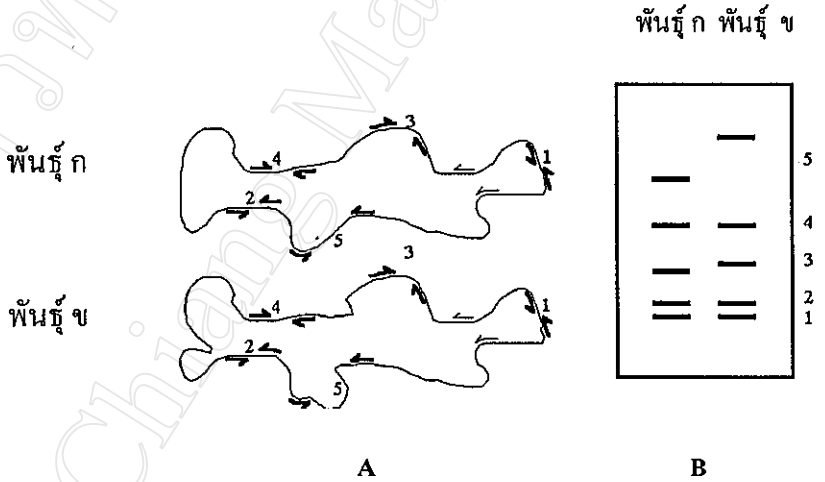
2.3 ลำไยกระโหลก (commercial longan) คือลำไยที่ปลูกเป็นการค้าซึ่งได้รับความนิยมมากที่สุดและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากผลมีขนาดใหญ่ เนื้อมาก เมล็ดเล็ก มีพันธุ์การค้าที่ปลูกมากมายในประเทศไทย

การจำแนกพันธุ์พืชโดย Molecular Markers

การศึกษาพันธุกรรมของพืชในระดับดีเอ็นเอมีความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากพันธุกรรมของพืชเป็นตัวกำหนดลักษณะสัณฐานวิทยาหรือลักษณะที่ปรากฏออกมาของพืช และลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันจึงอาจแสดงลักษณะสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันได้ (Gottieb, 1977) หลายปีก่อนมีการศึกษาเทคนิควิธีการทางวิทยาศาสตร์ที่จะนำมาใช้ประโยชน์กับงานด้านจำแนกพันธุ์พืช วิธีการทางชีวเคมีที่เรียกว่าอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยสกัดและศึกษาชนิดของเอนไซม์ในพืชที่เรียกว่าไอโซไซม์ (Pasteur *et al.*, 1988 ; จริงแท้, 2531 ; ปนัดดา, 2541) อีกวิธีการหนึ่งคือเทคนิคทางเซลล์พันธุศาสตร์ โดยศึกษาจำนวน ลักษณะ และพฤติกรรมของโครโมโซม (กฤษฎา, 2519) จากการจำแนกพันธุ์ลำไยโดยใช้วิธีทางเซลล์พันธุศาสตร์ พบว่าลำไยมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 2n = 30 (ปนัดดา, 2541) และได้มีการพัฒนาวิธีการต่างๆ เพื่อนำมาใช้ศึกษาในพืชมากยิ่งขึ้น คือการนำ molecular markers มาตรวจสอบดูได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ซึ่งมีความหลากหลายสูงมากในพืช สามารถจำแนกความแตกต่างลักษณะสัณฐานวิทยาและชนิดได้โดยให้ผลที่ถูกต้อง รวดเร็วและแม่นยำ การตรวจสอบโดยใช้ DNA fingerprinting มีหลายวิธีการ ตัวอย่างเช่น เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Botstein *et al.*, 1980) มีการศึกษาโดยเทคนิค RFLP กันอย่างกว้างขวางกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด การทำแผนที่ทางพันธุกรรมของข้าว (Nagamura *et al.*, 1997) การทำ DNA fingerprinting ในข้าวโพด (Bernado, 1994) ข้าวฟ่าง (Xu *et al.*, 1994) แต่ในทางปฏิบัติยุ่งยากซับซ้อน ใช้เวลานาน ดีเอ็นเอที่ใช้มีปริมาณมากและคุณภาพดีมีความเข้มข้นสูง ดังนั้นเพื่อเป็นการลดขั้นตอน ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายลง จึงมีการนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) มาปรับใช้เป็นเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Saiki *et al.*, 1988) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น ใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยเพื่อลดระยะเวลาในการทำงาน ภาณี (2536) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อแยกความแตกต่างของพืชตระกูลกะหล่ำ ตรวจดูความสัมพันธ์ของลูกผสมระหว่างชนิด และตรวจแยกความแตกต่างของลูกผสมกับสายพันธุ์ที่เป็นพ่อแม่ พบว่า สามารถนำวิธีการ RAPD ไปประยุกต์ใช้เพื่อลดระยะเวลาการทำงานในการปรับปรุงพันธุ์ได้

เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD เป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยา Polymerase Chian Reaction (PCR) โดยอาศัยการสุ่มจับของไพรเมอร์ (random primer หรือ arbitrary primer) เพื่อเพิ่มปริมาณ deoxyribonucleic acid (DNA) และใช้หลักการที่ว่าดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันในการเรียงลำดับของเบส (base) ได้แก่ adenosine (A), thymine (T), guanine (G), และ cytosine (C) ที่มีการสุ่มเอาตัวแทนบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนสายดีเอ็นเอ มาเพิ่มปริมาณเช่นเดียวกับขบวนการ DNA replication ภายในเซลล์ (วัชรี และมนตรี, 2536) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณแล้วมาแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส (electrophoresis) และนำแผ่น gel มาตรวจสอบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ดังนั้นสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสต่างกันย่อมมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกัน และสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันมากจะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอคล้ายคลึงกัน ซึ่งในเทคนิค RAPD โดยทั่วๆ ไป จะใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ประมาณ 35-42°C แต่ใน HAT-RAPD จะมีอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 46-62°C เทคนิคนี้ให้ high resolution, reproducibility, และ polymorphism (Anuntalabhochai, 2000)



ภาพ 1 แสดงหลักการปฏิกิริยา HAT-RAPD

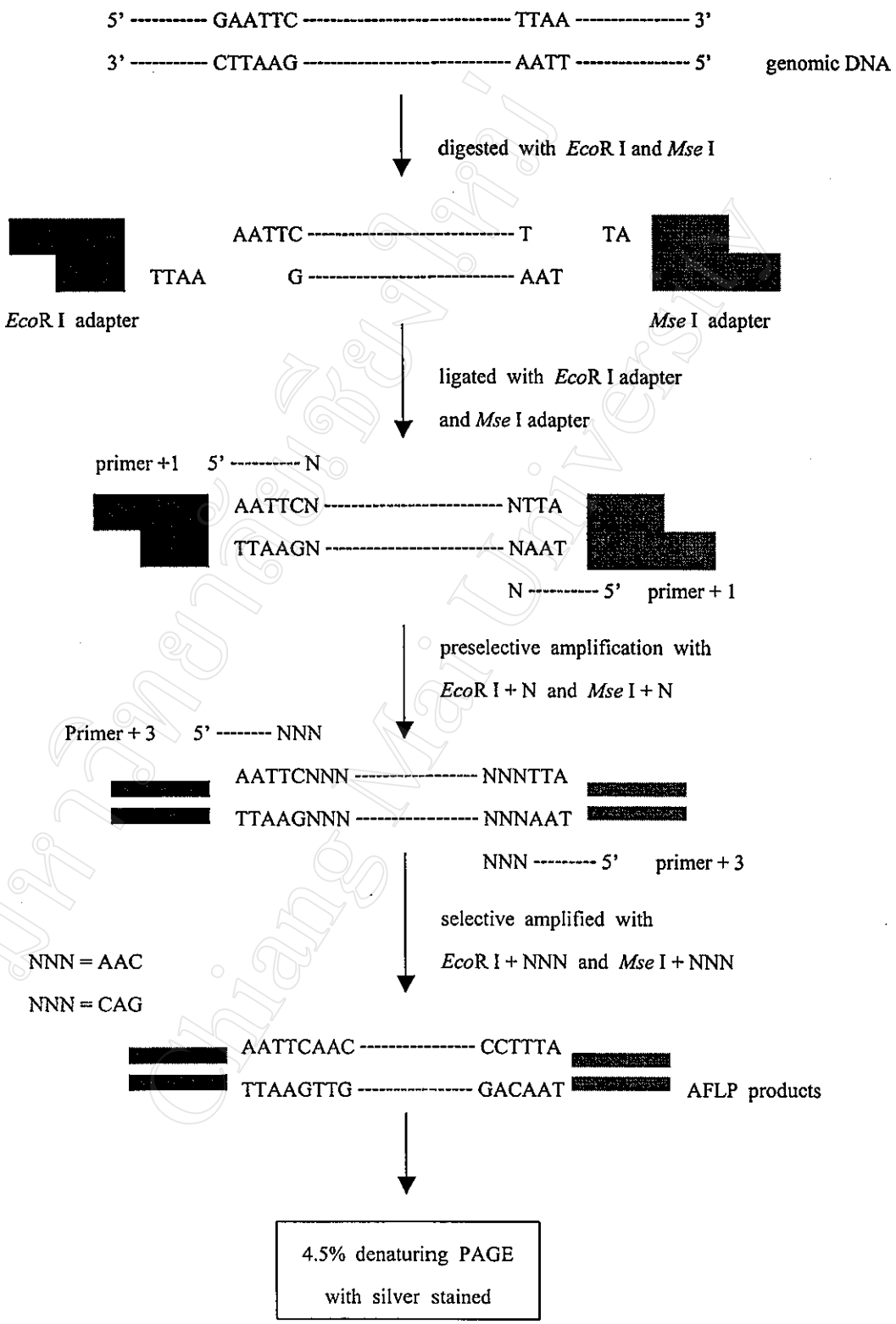
A : ภาพสมมติการเกิดการเกาะของไพรเมอร์กับตำแหน่งต่างๆ

⇆ = primer ที่เข้าไปสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA)

B : รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายหลังวิเคราะห์ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis 1, 2, 3, 4 และ 5 = แถบ (band) ที่สังเคราะห์ได้แต่มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน

เทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

AFLP เป็นเทคนิคที่ใช้การตัดด้วยเอนไซม์ (enzyme) เหมือนกับหลักการของเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) แล้วนำชิ้นส่วนที่ถูกตัดมาทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้ลำดับเบสเจาะจงกับชิ้นส่วนที่ถูกต่อเชื่อมกับ adapter ที่อยู่เฉพาะด้านของแต่ละเอนไซม์ โดยเทคนิค AFLP มีหลักการของปฏิกิริยาอยู่ 3 ขั้นตอน ตามลำดับดังนี้ ขั้นแรกคือการตัด genomic DNA ด้วย 2 เอนไซม์ คือ *EcoR*I (มีตำแหน่งที่ตัดจำเพาะ 6 เบส ; G^AATTC) และ *Mse*I (มีตำแหน่งที่ตัดจำเพาะเจาะจง 4 เบส ; T^TAA) ชิ้นส่วนที่ถูกตัดแล้วจะมีตำแหน่งลำดับเบสที่ตัดของเอนไซม์มาต่อเชื่อมกับ adapter และทำปฏิกิริยา PCR 2 ครั้ง โดยมีลำดับเบสของไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง (specific primer) กับตำแหน่งของเอนไซม์และ adapter โดยการเพิ่มจำนวนลำดับเบสของไพรเมอร์เพื่อให้มีการคัดเลือกยิ่งขึ้นในขั้นตอนของการทำ PCR ครั้งที่ 2 การทำปฏิกิริยา PCR ครั้งแรกเป็นการคัดเลือกโดยลำดับเบสที่ใช้มีจำนวน 1 ตำแหน่งเพื่อลดจำนวนลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ต้องการลง (การทำปฏิกิริยา PCR ขั้นตอนนี้เรียกว่า preamplified selective PCR หรือ PCRI) โดยลำดับเบสหนึ่งตำแหน่งนี้จะเป็นตัวกำหนดการเพิ่มลำดับเบสตำแหน่งต่อไปในการทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2 ซึ่งในขั้นตอนการทำปฏิกิริยาครั้งแรกนี้จะยังไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธีการ polyacrylamide gel electrophoresis เนื่องจากมีแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวนมากเกิดขึ้นเกินที่จะวิเคราะห์ผลได้ละเอียด การทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2 จึงมีการเพิ่มจำนวนเบสอีก 2-4 ตำแหน่งเพื่อเพิ่มการคัดเลือกให้มากยิ่งขึ้นและแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นก็จะลดจำนวนลงเพื่อสะดวกและง่าย ที่จะสามารถตรวจสอบวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีการ polyacrylamide gel electrophoresis (การทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2 นี้เรียกว่า Amplified selective PCR หรือ PCRII)



ภาพ 2 แสดงหลักการของปฏิกิริยา AFLP (Krutto, 1998)

การนำเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ไปใช้ประโยชน์

การนำเอาเทคนิค RAPD มาใช้ในการจัดจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิด (species) ของพืชในวงศ์ *Populus* โดย Castiglione *et al.* (1993) พบว่า สามารถใช้จำแนกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ poplar (*Populus* spp.) จำนวน 32 ชนิดได้ ด้วยการใช้ 4 ไพรเมอร์ เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 120 แถบ (bands) สำหรับการจำแนกความความแตกต่างระหว่างชนิดของหัวหอม (*Allium cepa*) รวมทั้งพืชในกลุ่ม Allium (Wilkie *et al.*, 1993) พบว่า ใช้ 7 ไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดความแตกต่างของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอค่อนข้างชัดเจน จึงทำให้สามารถแยกแยะความแตกต่างระหว่างชนิดของพืชในกลุ่มนี้ได้

การใช้เทคนิค RAPD มาจำแนกความแตกต่างในระหว่างชนิดของพืชอื่นๆ อีกมากมายหลายชนิด เช่น rabbiteye blueberry (Aruna *et al.*, 1995) coffee (Castillo *et al.*, 1996) melon (Silberstein *et al.*, 1999) pear (Oliveira *et al.*, 1999), cherry (Hormaza, 1999) cocoyam (Schnell *et al.*, 1999) feijoa (Dettori and Palombi, 2000) plum (Heinkel *et al.*, 2000) และ curcuma (อุไรวรรณ, 2540)

เทคนิค RAPD สามารถนำมาใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ สายพันธุ์ และในระดับสายต้น กับพืชหลายชนิด เช่น นำมาศึกษาในบรอคโคลี่ (Hu and Quiros, 1991) พบว่า มี 4 ไพรเมอร์ ได้แก่ PAO1 PAO2 PAO3 และ PAO4 สามารถบอกความแตกต่างระหว่างบรอคโคลี่ 14 สายพันธุ์ได้ การศึกษาความสัมพันธ์ของข้าวโอ๊ตป่า (*Avena sterilis* L.) 24 พันธุ์ (Heun *et al.*, 1994) พบว่า เลือกใช้ 21 ไพรเมอร์ สามารถทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 115 แถบ ส่วนการศึกษาพันธุ์ข้าวสาลี โดย Joshi and Nguyen (1993) ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ของข้าวสาลี จำนวน 15 สายพันธุ์ พบว่า มี 40 ไพรเมอร์ มีแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างจำนวน 71 แถบ การวิเคราะห์ดีเอ็นเอของ *Mangifera* spp. 9 ชนิด โดย Schnell and Knight (1993) พบว่า ได้เลือกใช้ 10 ไพรเมอร์ เกิดแถบดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างได้ถึง 109 แถบ การจำแนกสายพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) ของออสเตรเลีย 37 พันธุ์ (Ko *et al.*, 1994) โดยใช้ 22 ไพรเมอร์ ซึ่งทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 144 แถบ

การจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรม ระหว่างข้าว japonica และข้าว indica 9 ชนิด พบว่า มีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ส่วน upland rice และ lowland rice 4 ชนิด มีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Yu and Nguyen, 1994) ในรายงานปีต่อมา Cho *et al.* (1995) ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวแดงเกาหลี (Koream red rice) จำนวน 24 สายพันธุ์ พบว่า มี 20 ไพรเมอร์ สามารถจัดจำแนกความแตกต่างได้ 2 กลุ่มหลัก คือ

กลุ่มข้าวแดงที่มีเมล็ดสั้นเป็นข้าวสายพันธุ์ japonica และกลุ่มข้าวแดงที่มีเมล็ดยาว ประกอบด้วยสายพันธุ์ indica และสายพันธุ์ Tongil-type ได้เป็นอย่างดี นิตย์ศรี และคณะ (2537) ทดสอบใช้ 14 ไพรเมอร์ สังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 158 แถบ สามารถจัดจำแนกความแตกต่างด้านพันธุกรรมของหญ้าแฝก 10 สายพันธุ์ ส่วน จันทร์จีรา (2541) ได้ทดสอบใช้ 69 ไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ พบว่ามี 5 ไพรเมอร์ คือ PAK10 PAQ12 PAS10 PB18 และ PC09 ที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอเกิดขึ้นที่แตกต่างจำนวน 60 แถบ บอกความแตกต่างของลิ้นจี่ 20 สายพันธุ์ได้

การใช้เทคนิค RAPD แยกความแตกต่างหรือจำแนกในระดับสายต้น ของพืช *Populus* (Lin *et al.*, 1994) โดยใช้ในการจำแนกความแตกต่าง ของ poplar และ willow clones ด้วยการใช้ไพรเมอร์ (Deca-11 Chl-1 Chl-4 และ Chl-10) ในการจำแนก poplar โดยใช้ไพรเมอร์ M13 Universal ในการจำแนก willow clones พบว่าสามารถจำแนกได้ถูกต้องและประหยัด

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการ Marson *et al.* (1993) ได้ทำการทดลองในข้าวโพดสายพันธุ์ลูกผสม พบว่า ด้วยการใช้ 10 ไพรเมอร์ สามารถทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ซึ่งใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ B73 กับ A7 และสายพันธุ์ลูกผสมได้ เช่นเดียวกับการทดลองของ Shimada *et al.* (1993) นำวิธีการ RAPD มาใช้เป็น genetic marker ในการจำแนกความสัมพันธ์ระหว่างพ่อแม่กับพันธุ์ลูกผสม (F1 hybrid) ของ Mume (*Prunus mume* Sieb. Et Zucc.) การนำไปใช้ในการช่วยคัดเลือกพันธุ์ของ American elm (*Ulmus americana* L.) โดยการทดลองของ Kamaley and Carey (1995) พบว่า ผลการศึกษาที่ได้เป็นไปตามกฎของเมนเดลในการถ่ายทอดยีนไปสู่ลูก ดังเช่นการทดลองของ Elisiário *et al.* (1999) ที่ตรวจสอบลูกผสมเพื่อปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

การทดลองผสมข้ามของ avocado (Kobayashi *et al.*, 2000) ข้าวลูกผสม และวิวัฒนาการของข้าวในสกุล *Oryza* ในการทดลองของ Wang *et al.* (1994) นำเทคนิค RAPD ใช้เป็นเครื่องมือตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ข้าวลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อแม่ได้ สมศักดิ์ และคณะ (2538) ใช้เทคนิค RAPD มาตรวจหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของข้าวในสกุล *Oryza* 5 ชนิด จำนวน 16 สายพันธุ์ ด้วยการใช้ 7 ไพรเมอร์ ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน จำนวน 68 แถบ พบว่า สามารถแบ่งข้าวที่ศึกษาออกเป็น 4 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มมีลักษณะสอดคล้องกับองค์ประกอบของ genome ในแต่ละชนิด ตามที่มีการศึกษามาก่อนแล้ว

การนำเทคนิค RAPD มาใช้ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช โดยการทดลองของ Munthali *et al.* (1996) ตรวจสอบการเกิด somaclonal variation ของต้นกล้า sugar beet ที่ได้รับการชักนำให้เกิดเป็นต้นโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อถึงรุ่นที่ 3 พบว่า มีความถี่ของการเกิด 0.05%

การใช้เทคนิค RAPD มาจำแนกความแตกต่างของพืชชนิดเดียวกัน พันธุ์เดียวกัน แต่ปลูกในสถานที่แตกต่างกัน โดยการทดลองของ Adam *et al.* (1993) ได้นำมาศึกษา terpenoid จากต้น juniper จากเมือง Abha ของประเทศซาอุดิอาระเบีย กับ *Juniperus excelsa* จากประเทศกรีก และ *J. procera* จากเมือง Addis Ababa ประเทศเอธิโอเปีย พบว่า จำแนกความแตกต่างของ juniper จากแต่ละแหล่งได้อย่างชัดเจน ในการทดลองของ Benito *et al.* (1993) ได้จำแนกความแตกต่างของพืชจาก endosperm ของเมล็ดหรือจากชิ้นส่วนเล็กๆ ของใบ ทั้งในพืชชนิดเดียวกันหรือระหว่างชนิดกัน และในกรณีเดียวกัน Valenzuela *et al.* (1997) ศึกษามะม่วง 15 พันธุ์จากแต่ละแหล่ง และชนิดของ embryo พบว่า ด้วยการใช้ 13 ไพรเมอร์ เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 109 แถบ ทำให้การจำแนกพันธุ์เป็นไปตามพันธุ์ประวัติจากแหล่งดั้งเดิม และการจำแนกชนิดของ embryo มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมที่มีมาตั้งแต่ดั้งเดิม เทคนิค RAPD สามารถนำมาจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ และเป็นประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร (Hofstra *et al.*, 1994) จำแนกวิธีการวิเคราะห์ออกเป็น RFLP RAPD และ DNA fingerprinting สามารถใช้หาแหล่งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในอาหารได้อย่างรวดเร็ว และการใช้เทคนิค RAPD มาการจัดจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์ เช่นเชื้อรา เพื่อนำมาใช้เป็นประโยชน์กับทางด้านโรคพืชได้ โดยการทดลองของ Heidenreich *et al.* (1995) จำแนกสายพันธุ์ *Trichoderma viride* และ *Trichoderma* spp. 11 สายพันธุ์ *Trichioderma* spp. 9 สายพันธุ์ และ *Trichoderma viride* 2 สายพันธุ์

การใช้เทคนิค RAPD ที่มีการใช้ annealing ที่อุณหภูมิต่ำๆ อาจเกิดปัญหาซึ่งอาจจะเกิดจากปัจจัยอื่นๆ หลายปัจจัย ดังในการทดลองของ Golenberg *et al.* (1996) ตรวจสอบว่ามีปัจจัยอะไรที่มีผลต่อกระทบต่อผลผลิตของปฏิกิริยา PCR (PCR products) เช่น 1) ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) ซึ่งพบว่า การใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่คุณภาพไม่ดี (template DNA degradation) จะทำให้ PCR products เกิดชิ้นส่วนจำนวนมากขึ้น และสามารถเกิดแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (reproducibility) ได้เหมือนเดิมสูง 2) การจับกันเองของดีเอ็นเอต้นแบบ (reconstruction of fragment) การจับกันเองของไพรเมอร์ (primer-dimer) และ 3) dNTP ที่มีปริมาณมากเกินไปจะมีผลทำให้เกิดการแข่งขันกันจับกับ $MgCl_2$ เป็นต้น มีการทดลองศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลกระทบต่อผลผลิตของปฏิกิริยา PCR เพิ่มมากขึ้น โดยการทดลองของ Chen *et al.* (1997) กับเนื้อเยื่อจากใบและรากของถั่วเหลือง ได้แก่ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) การเปรียบเทียบการเติมและไม่ได้เติมของสาร DMSO (dimethyl sulphoxide) และ TMAC (tetramethyl-ammonium chloride) ในปฏิกิริยา PCR การตรวจสอบ oligo-primers ที่มีแหล่งผลิตของการสังเคราะห์แตกต่างกัน การเปรียบเทียบความแตกต่างของเครื่อง PCR ที่ใช้ พบว่า มีผลกระทบเพียงเล็กน้อยต่อความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากใบและราก ซึ่งมีโอกาสเกิดขึ้นเป็นบางครั้ง

ล่าสุดได้มีการดัดแปลงเทคนิค RAPD ซึ่งเดิมได้ใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 35-42°C เพิ่มขึ้นมาเป็น 46-62°C และมีชื่อเรียกว่า HAT-RAPD (High Annealing Temperature-Random Amplified Polymorphic DNA) โดยเทคนิคนี้ให้ high resolution, reproducibility, และ polymorphism (Anuntalabhochai *et al.*, 2000)

การนำเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ไปใช้ประโยชน์

ได้มีการนำเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) (Vos *et al.*, 1995) ซึ่งเป็นเทคนิคที่นำเอาหลักการจากเทคนิค RFLP มาใช้ร่วมกับการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการบอกความแตกต่างของชนิด พันธุ์พืช เช่น ในพืชหญ้าแฝก (เจนจิรา และอภิชาติ, 2540) จำแนกความแตกต่างของหญ้าแฝก 24 สายพันธุ์ ด้วยการใช้ 4 คู่ไพรเมอร์

ศึกษาเพื่อดูความหลากหลายในพันธุ์ทางการค้ากับพันธุ์ดั้งเดิมของพืชถั่วเหลือง Maughan *et al.* (1996) ได้นำไปใช้ตรวจดูความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรม และนำมาใช้เป็น genetic markers ที่จะนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป เช่นด้วยกับการทดลองของ Hongtrakul *et al.* (1997) ศึกษาในเมล็ดทานตะวันในกลุ่มสายพันธุ์ใกล้ชิดที่เมล็ดมีการสะสมน้ำมัน โดย Roa *et al.* (1997) จำแนกชนิดของพันธุ์มันสำปะหลังของพันธุ์ที่ปลูกเพื่อเป็นการค้าและพันธุ์ดั้งเดิมออกได้ตามลักษณะสัณฐานวิทยาหรือตามภูมิศาสตร์นิเวศวิทยา

ชาเป็นพืชเศรษฐกิจที่ถูกนำมาศึกษาทางพันธุกรรมโดยการใช้เทคนิค AFLP โดยการทดลองของ Paul *et al.* (1997) ตรวจสอบความหลากหลายและความแตกต่างทางพันธุกรรมในกลุ่มประชากรของชาที่มีถิ่นกำเนิดต่างสถานที่ ในทำนองเดียวกับ Schut *et al.* (1997) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ของข้าวบาร์เลย์ ซึ่งก็เปรียบเทียบกับทั้งข้อมูลทางประวัติพันธุ์ และลักษณะทางสัณฐานวิทยา ในกรณีการทดลองของ Chen *et al.* (1999) ศึกษาในกล้วยไม้ Vanda โดยได้ตรวจสอบความแตกต่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากต่างเนื้อเยื่อคือ ใบ ดอก และดอกที่เก็บในเวลาที่แตกต่างกัน พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น อีกส่วนของการทดลองคือศึกษาความหลากหลายในกลุ่มพันธุ์ สำหรับตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของมังคุดซึ่งเป็นพืชในสกุล *Garcinia* และพืชสกุลใกล้เคียง รวม 24 ตัวอย่าง (สุรินทร์ และคณะ, 2542) พบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกลุ่มมังคุดมีความคล้ายคลึงกันมาก ส่วนต่างชนิดและสกุลใกล้เคียงมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันอย่างชัดเจน ในทำนองเดียวกับการทดลองของ เฉลิมพล และจุลภาค (2543) ซึ่งศึกษาพันธุกรรมของมะม่วงมหาชนกและมะม่วงพันธุ์ต่างๆ ที่สวนประพัฒน์ สิทธิสังข์

การใช้เทคนิค AFLP ใช้ศึกษาแผนที่พันธุกรรมเพื่อนำไปใช้ศึกษาวิวัฒนาการ โครงสร้างของ genome จำแนกลักษณะเอกลักษณ์จำเพาะ การถ่ายทอดลักษณะพืช เช่น มะนาว (Wang *et al.*,

1997) ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากเมล็ดพันธุ์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อพื้นที่แห้งแล้ง ตรวจสอบการเกิด DNA methylation ในข้าวสาลี ซึ่งการเกิด DNA methylation จะทำให้เกิดความแปรปรวนเกิดขึ้นในพืชทุกชนิด (Barrett *et al.*, 1998) ในปีต่อๆมามีการทดลองของ Hayes and Maroof (2000) ใช้เทคนิค AFLP มาใช้พัฒนาเป็น genetic markers เพื่อใช้ในแผนที่ยีนต้านทานโรคไวรัสของถั่วเหลือง

การตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่าง *Setaria italica* และ *S. viridis* (Ennequin *et al.*, 2000) โดยศึกษาความหลากหลายทางด้านพันธุกรรม และภูมิศาสตร์ที่มีอิทธิพลต่อการเกิดความแปรปรวนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Schmidt and Jensen (2000) พบว่า การสืบทอดทางพันธุกรรมของ *Pedicularis palustris* มีความสัมพันธ์ขึ้นกับอิทธิพลของขนาดประชากร ความแปรปรวนทางพันธุกรรม การจัดการคุณภาพถิ่นที่อยู่อาศัยที่มีการถ่ายทอดสืบต่อกันมา เพิ่มขึ้นมาอีกด้วย การนำเอาเทคนิค AFLP ใช้ตรวจสอบกับการขยายพันธุ์ทางเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของกล้วย (Echeverria *et al.*, 2001) พบกว่า มีการกลายพันธุ์ (somaclonal variation) ได้ในอัตราที่สูง

การนำเทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellites ไปใช้ประโยชน์

โดยเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการนำเอาเทคนิค Simple Sequence Repeat (SSR) หรือ microsatellites (Tautz, 1989) ที่นิยมมาประยุกต์ใช้ในหลายๆ สิ่งมีชีวิต ไม่ว่าจะเป็นจุลินทรีย์ สัตว์ คน พืช (Weising *et al.*, 1995) นำมาใช้เกี่ยวกับพืชส่วนใหญ่จะถูกปรับใช้ตรวจสอบพันธุกรรม ความหลากหลายทางพันธุกรรมพืช แผนที่ยีน และศึกษาความแปรปรวนทางด้านพันธุกรรมของพืช เช่น ในข้าวฟ่าง ที่ถูกปลูกต่างสภาพแวดล้อมทางด้านภูมิศาสตร์ (Taramino *et al.*, 1997) ในข้าวสาลี โดยการทดลองของ Bebeli *et al.* (1997) ได้ศึกษาใน hexaploid (AABBDD) และ tetraploid (AABB) ในข้าว Uozu *et al.* (1997) ศึกษาความแปรปรวนของขนาดของ gemome (genome size) และสัณฐานวิทยาของโครโมโซม (chromosome morphology) ในมะม่วง โดยการทดลองของ Eiadthong *et al.* (1999) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในมะม่วง 22 สายพันธุ์ และในพืชอ้อย (sugarcane) Cordeiro *et al.* (2000) ได้ศึกษาดูความหลากหลายในระหว่างลูกผสมที่มีความซับซ้อน *S. spontaneum* (2n=40-128) และ *S. officinarum* (2n=60 หรือ 80) ซึ่งเทคนิคนี้นำมาช่วยประโยชน์มาก ในระดับเมล็ดพันธุ์เพื่อการตรวจพันธุกรรม การจำแนกพันธุ์ และการปรับปรุงพ่อแม่พันธุ์

การเปรียบเทียบแต่ละ Molecular Markers

ทุกเทคนิคที่กล่าวมาเป็นบางส่วนใน molecular markers ที่นำไปใช้เป็นวิธีการเพื่อจำแนกและบอกความแตกต่างของพันธุ์พืช แต่มีการทดลองอีกมากมายที่นำเอาหลายๆ เทคนิคมาวิเคราะห์เปรียบเทียบเพื่อการยืนยันและแสดงความสอดคล้องของผลการทดลองไป เช่น การทดลองของ Sharma *et al.* (1996) ได้นำเทคนิค 2 ชนิด คือ AFLP และ RAPD มาศึกษาวิวัฒนาการความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของถั่วแขก (Lenus) 6 กลุ่มประชากร พบว่า ทั้ง 2 วิธีการสามารถนำมาใช้เป็น genetic markers ที่จะมาวิเคราะห์โครงสร้างเพื่อทำแผนที่ทางพันธุกรรม และนำไปใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ต่อไปในกลุ่มของถั่วแขกต่อไปได้

การใช้เทคนิคทั้ง AFLP RAPD และ microsatellite (SSR) เป็น genetic markers เพื่อนำไปใช้ในโครงสร้างแผนที่ยีนของข้าวด้วยการทดลองของ Mackill *et al.* (1996) ต่อมา Maheswaran *et al.* (1997) ได้นำเทคนิค RAPD และ AFLP มาศึกษาในข้าวพันธุ์ IR64 (2n) เพื่อตรวจสอบการกระจายของ markers ในแผนที่ยีนทั้ง 12 โครโมโซม การตรวจสอบความแตกต่างที่เกิดในเชื้อพันธุ์พืช (germplasm evaluation) โดย Russell *et al.* (1997) ใช้เทคนิค RFLP RAPD AFLP และ SSR ตรวจสอบทาง genetic relationships ในกลุ่มข้าวบาร์เลย์ 18 พันธุ์ เทียบกับประวัติพันธุ์พืช การทำแผนที่ยีนของพืช Brassica เพื่อใช้ในการบ่งบอกตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับยีนต้านทานการเกิด clubroot ที่เกิดจากเชื้อ *Plalmodiphora brassicae* ในประชากรของ *Brassica oleracea* ที่เป็น doubled haploid โดยใช้เทคนิค RFLP และ AFLP มาใช้โดย Voorrips *et al.* (1997)

การปรับปรุงพันธุ์พืชยูคาลิปตัส โดย Gaiotto *et al.* (1997) ใช้เทคนิค RAPD และ AFLP มาประเมินการอัตราการเกิดผสมข้ามที่มีลักษณะเด่นก่อนผสมและหลังการผสม ส่งผลให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในตระกูลของยูคาลิปตัส การทดลองของ Krutto (1998) ใช้เทคนิค SSR RAPD และ AFLP มาเป็นประโยชน์กับการพัฒนาการควบคุมคุณภาพเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดในข้าวสาลี Martin *et al.* (1999) ได้นำเทคนิค RFLP, AFLP และ SSR มาศึกษา genetic similarity เพื่อนำไปใช้ตรวจความแปรปรวนในรุ่นลูก โดยการทดลองของ Arcade *et al.* (2000) ใช้เทคนิค RAPD AFLP และ ISSR ศึกษาดู genetic mapping ในพืช European และ Japanese larch เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์และเป็นข้อมูลในการปรับปรุงป่าไม้

ศึกษาแผนที่ทางพันธุกรรมของ maritime pine เพื่อดูการกระจายของ markers ในรุ่นลูกด้วยการใช้เทคนิค protein RAPD และ AFLP โดยการทดลองของ Costa *et al.* (2000) การศึกษาเพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่า ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP และ SSR พบว่ามีความสอดคล้องกัน มีความสัมพันธ์ทาง phenotic และการกระจายของประชากร

ที่ได้สอดคล้องกับข้อมูลทาง RFLP ที่มีการรายงานมาก่อนแล้ว ข้อมูลทั้งหมดที่ได้นำไปศึกษา genetic-diversity เพื่อนำไปแก้ไขการเก็บรวบรวมพันธุ์ โดยการทดลองของ Teulat *et al.* (2000)

พืชไม้ยืนต้นตระกูลมะเดื่อ (fig) โดย Cabrita *et al.* (2001) ศึกษาความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมและความสัมพันธ์ในระดับสายต้น (clone) ด้วยเทคนิค isozyme RAPD และ AFLP

การนำเอา molecular markers มาใช้ได้ให้ประโยชน์อย่างมากมาย เช่น การตรวจดูความหลากหลาย ความสัมพันธ์ใกล้ชิดวิวัฒนาการในแต่ละชนิด พันธุ์ การจำแนกและบอกความแตกต่างสายพันธุ์พืช หรือสายต้น (clone) การตรวจสอบความแปรปรวนในรุ่นลูก การทำเครื่องหมายในแผนที่ยีน การหาตำแหน่งของยีนต้านทานโรค การควบคุมคุณภาพ การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น และที่สำคัญการใช้ Molecular Markers เหล่านี้จะช่วยสนับสนุนงานอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐาน และใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชอีกหลายๆ ชนิดที่มีประโยชน์ต่อไป

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University