บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

เอื้องแซะ เอื้องแซะหอม หรือ เอื้องแซะหลวง (*Dendrobium scabrilingue* Lindl.) เป็นพืชที่จัดอยู่ในตระกูล Orchidaceae สกุล *Dendrobium* section : *Nigrohirsutae* มีลักษณะประจำคือ มีขนสีน้ำตาลหรือสีดำขึ้นอยู่ตามกาบใบ (leaf sheath) (ระพี, 2516)

เอื้องแซะเป็นกล้วยไม้ที่มีลำลูกกล้วยสูงประมาณ 10-20 เซนติเมตร โคนลำเรียว ส่วนกลางและปลายลำอ้วน สีเหลืองทอง มีร่องตามความยาวของลำ ใบยาวประมาณ 8 เซนติเมตร กว้างประมาณ 1.5 เซนติเมตร สีเขียวอมเหลืองเล็กน้อย หรือ สีเขียวอ่อน ปลายใบเว้าเฉียงๆ กาบใบมีขนสีดำ รวมทั้งใต้แผ่นใบก็มีขนอย่างบางๆ ลำแก่ทิ้งใบ (ระพี, 2516) โดยปกติแล้วเอื้องแซะจะเกิดลำใหม่ปีละ 2 ลำ ซึ่งเป็นลำที่ให้ดอก ใบจะร่วงหมดหลังดอกบาน เอื้องแซะออกดอกช่อละ 2 ดอก ช่อแรกจะออกจากตาที่ปลายลำและทยอยผลิดอกจากตาของข้อล่างที่ถัดลงไป อาจผลิดอกออกทีละช่อหรือบานพร้อมกันหลายช่อในแต่ละลำ ส่วนมากออกดอกลำละ 3 - 4 ช่อ แต่บางต้นออกดอกได้มากถึง 8 ช่อ ยิ่งลำสูงและสมบูรณ์มากยิ่งมีดอกมาก ดอกของเอื้องแซะในแต่ละช่อบานเป็นเวลา 5 - 7 วัน ดังนั้นเอื้องแซะกอใหญ่จึงมีดอกบานหอมเป็นเวลากว่า 2 เดือน (จิตราพรรณ, 2539) ที่โคนของช่อดอกจะมีปลอกยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ปลอกมีขนสีดำ ดอกมีกลิ่นหอม กลีบดอกสีขาวเป็นมัน ปากมีสามแฉกเห็นได้ชัดเจน หูปากทั้งสองข้างตั้ง ปลายแหลม พื้นสีขาว มีเส้นสีเขียวขนานกันถี่ๆ เฉียงขึ้นหาปลายแหลม (ระพี, 2516) แผ่นปากจะมีสีเขียวอ่อนแล้วเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อบานได้ 3 - 4 วัน และเป็นสีเหลืองอมส้มเมื่อดอกใกล้โรย แต่พบบางต้นที่แผ่นปากมีสีส้มอมแดงเมื่อดอกบาน (จิตราพรรณ, 2539) ดอกมีขนาด 2 - 3 เซนติเมตร กลีบดอกกว้าง 0.05 - 0.60 เซนติเมตร ยาว 1.40 - 1.50 เซนติเมตร กลีบด้านข้างค่อนข้างโค้ง ยาว 2.00 – 2.20 เซนติเมตร ความกว้างพอๆ กับกลีบอื่นๆ ดอกเอื้องแซะดูคล้ายห้อยหัว หรือ บานคว่ำลง ดอกเริ่มบานตั้งแต่ราวเดือน พฤศจิกายน แต่ไม่มีมากนัก จากนั้นจะผลิดอกเรื่อยๆ ไปจนถึงราวเดือนเมษายน (ระพี, 2536)

2. เซลล์พันธุศาสตร์

Kaememoto and Sagarik (1967) (อ้างโดย ระพี, 2516) ได้ทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมของกล้วยไม้สกุลหวายที่มีแหล่งกำเนิดในประเทศไทยบางชนิด พบว่าเอื้องแซะมีจำนวนโครโมโซมดิพพลอย (2n) = 38

3. การเจริญเติบโตและการกระจายพันธุ์

เอื้องแซะเป็นกล้วยไม้ประเภทที่มีลักษณะการเจริญเติบโตแบบซิมโพเดียล (sympodial) คือ เป็นกล้วยไม้ที่มีลำลูกกล้วยเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะแตกหน่อเป็นลำต้นใหม่และเป็นกอ (บรรณ, 2534) เอื้องแซะมักขึ้นเกาะตามกิ่งไม้ต่อๆ กันไปเป็นทางยาว ตามกิ่งไม้เหล่านี้มักมีมอสหรือไลเคน ขึ้นเกาะ แสดงถึงความชื้นและเย็นจัดของอากาศที่เอื้องแซะชอบ (ระพี, 2536) จึงมักพบเอื้องแซะแพร่กระจายพันธุ์ในป่าแถบแม่สะเรียง แม่แจ่ม ดอยอินทนนท์ และ ดอยสุเทพ ซึ่งมีความสูงมากกว่า 1,300 เมตร เหนือระดับน้ำทะเล ทางเหนือของขุนแม่สุรินทร์ อุ้มผาง แม่ฮ่องสอน ภูเมือง เขาใหญ่ เขาเขียว และ ตราด นอกจากนี้ยังพบแพร่กระจายพันธุ์แถบประเทศพม่า และ ลาว ด้วย (Seidenfaden, 1985)

4. การตรวจแยกสายพันธุ์พืชโดยการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์

ไอโซไซม์ คือ เอนไซม์ชนิดเดียวกันที่มียีน (gene) ต้นแบบมากกว่าหนึ่งยีน ทำให้มีโมเลกุลที่ต่างกัน เนื่องจากการเรียงตัวของ subunit ที่ต่างกัน หรือ เอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่ต่างรูป ทำให้ได้เอนไซม์ที่มีองค์ประกอบต่างกัน คุณสมบัติทางไฟฟ้าและโครงสร้างจะต่างกัน แต่มีปฏิกิริยาทางเคมีแบบเดียวกัน เอนไซม์ต่างๆ สามารถสกัดได้จากส่วนต่างๆ ของพืช และแยกออกจากกันได้โดยอาศัยเทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) ซึ่งสามารถตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายต้น (clone) ของพืชชนิดเดียวกัน หรือ จำแนกพันธุ์ได้จากรูปแบบไอโซไซม์ ทั้งนี้เอนไซม์หลายชนิดที่ถูกสร้างขึ้นแล้วอาจเกิดกระบวนการทางเคมีบางอย่างเช่น methylation หรือ phosphorylation ทำให้เอนไซม์ถูกเปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะ side chain ของกรดอะมิโนในโมเลกุลของเอนไซม์ระหว่างการเจริญเติบโตหรือกระบวนการต่างๆ ทางชีวเคมีได้ ดังนั้นการศึกษาเทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซีสเพื่อการจำแนกพันธุ์โดยใช้รูปแบบไอโซไซม์จำเป็นต้องคำนึงถึงประเภทของเอนไซม์ที่จะใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) (ชวนพิศ, 2538)

เอนไซม์สามารถแยกเป็น 2 กลุ่ม คือ specific enzyme ได้แก่ amylase (AMY) malate dehydrogenase (MDH) alcohol dehydrogenase (ADH) และphosphoglucomutase

(PGM) และnon- specific enzyme ได้แก่ esterase (EST) peroxidase (PER) catalase (CAT) acid phosphatase (ACP) และalkaline phosphatase (ALP) (ชวนพิศ, 2538)

ไอโซไซม์มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับผลิตภัณฑ์ของยีน (Soost and Torres, 1981) และการเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ในสนามไฟฟ้าจะมีความแตกต่างกันตามขนาดและรูปร่างของโมเลกุลเอนไซม์ ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีสำหรับความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ (Shannon, 1968) และหากมีการแสดงออกร่วมกันและไม่มีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม ไอโซไซม์จะเป็นวิธีที่นำมาใช้สำหรับการพิสูจน์ (identification) สายพันธุ์ได้ดีถ้ามีความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์อย่างเพียงพอ ซึ่งได้นำมาใช้ในการพิสูจน์สายพันธุ์ของพืชหลายชนิด เช่น แอปเปิล *Malus* × *domestica* Borkh (Weeden and Lamb, 1985) สับปะรด *Ananas comosus* L. (DeWald *et al.*, 1988) purple loosestrife species *Lythrum salicaria* L. และ *Lythrum virgatum* L. (Strefeler *et al.*, 1996) เป็นต้น นอกจากนี้ได้นำไอโซไซม์มาใช้ในพืชตามวัตถุประสงค์ต่างๆ กัน รวมทั้งการจัดอนุกรมวิธาน (taxonomic) และ การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Hirai *et al.*, 1986, Isshiki *et al.*, 1992, Rahman and Nito, 1994, Torres *et al.*, 1982) สำหรับกล้วยไม้ได้มีผู้นำไอโซไซม์มาใช้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิด (Schlegel *et al.*, 1989) ความแปรปรวนของยีนและการกระจายของยีนในประชากร (Rossi *et al.*, 1992) และเนื่องจากกล้วยไม้เป็นพืชที่มีการเจริญเติบโตช้าและใช้ส่วนของลำต้นในการขยายพันธุ์ ซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดพลาดได้ เนื่องจากการตรวจสอบต้องรอจนกว่ากล้วยไม้จะออกดอก และการใช้ลักษณะทางสัณฐานก่อนการออกดอกมาตรวจสอบพันธุ์พืชถูกจำกัดด้วยสภาพแวดล้อม เพราะสภาพแวดล้อมมีผลต่อการแสดงออกทางฟีโนไทป์ (phenotype) ดังนั้นเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับการตรวจพิสูจน์สายพันธุ์ในระยะการเจริญเติบโตทางลำต้น (vegetative stage) จึงมีความสำคัญมาก (Du Puy and Cribb, 1988)

ในปี 1990 Park *et al.* ได้วิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ acid phosphatase esterase และ aspartase aminotransferase ในกล้วยไม้ *Cymbidium goeringii* ของประเทศเกาหลีทั้งหมด 12 แหล่ง รวม 286 ตัวอย่าง โดยใช้ starch gel electrophoresis ผลปรากฏว่า ไอโซไซม์ทั้งสามชนิดให้แถบปฏิกิริยาที่เป็น polymorphic และ ความถี่ของการเกิดแถบไอโซไซม์ระหว่างประชากรมีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่า ประชากรของ *Cymbidium goeringii* มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเกิดขึ้นทั้งภายในและระหว่างประชากร ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากกระบวนการผสมข้ามและปัจจัยทางนิเวศน์วิทยา (ecological factor) ต่อมา Obara – Okeyo *et al.* (1997) ได้วิเคราะห์ความแปรปรวนของไอโซไซม์ในระบบเอนไซม์ 8 ชนิด โดยใช้ starch gel electrophoresis ในกล้วยไม้ *Cymbidium* (Swartz.) 70 พันธุ์ พบว่า ระบบเอนไซม์ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ aspartate

aminotransferase (AAT) leucine aminopeptidase (LAP) malate dehydrogenase (MDH) alcohol dehydrogenase (ADH) phosphogucomutase (PGM) glucose phosphate isomerase (GPI) triosephosphate isomerase (TPI) และ shikimate dehydrogenase (SKDH) ให้ลักษณะของแถบที่เป็น polymorphic และสามารถแสดงความแตกต่างระหว่าง *Cymbidium* 68 พันธุ์ได้ ยกเว้นระหว่างพันธุ์ Golden Star 'Kumamoto' กับ Golden Star 'Sunrise' นอกจากนี้ยังพบว่า ไม่มีพันธุ์ใดที่แสดงรูปแบบของไอโซไซม์ที่จำเพาะ แต่ในระบบ TPI มีหนึ่งรูปแบบที่เป็น "diagnostic" pattern สำหรับอัตราการกระจายของยีนเมื่อมีการผสมข้าม พบว่า LAP-1 ถูกถ่ายทอดไปได้ง่าย และ ถูกควบคุมโดยยีนอย่างน้อย 2 อัลลีล และในปี 1998 ได้ทดลองใช้ระบบเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AAT) glucose phosphate isomerase (GPI) malate dehydrogenase (MDH) glucose-6-phosphatedehydrogenase (G6PDH) phosphoglucomutase (PGM) leucine aminopeptidase (LAP) esterase (EST) และ alkaline phosphatase (AP) ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างกล้วยไม้ *Cymbidium* Swartz. 12 ชนิด (species) พบว่า ระบบเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ malate dehydrogenase (MDH) และ glucose phosphate isomerase (GPI) สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดได้ และ เมื่อทำการประเมินความสัมพันธ์ทาง phylogenetic พบว่า ข้อมูลที่แสดงความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมสามารถบ่งชี้ความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่าง *Cymbidium* 12 ชนิด และ ข้อมูลทางไอโซไซม์สามารถนำมาวิเคราะห์เพื่อจำแนกชนิดของ *Cymbidium* ได้ ซึ่งได้จัดพวกที่ขึ้นบนพื้นดิน (terrestrial) ได้แก่ *Cymbidium goeringii* (Rchb.f.) Rchb.f. *Cymbidium ensifolium*(L.) Swartz. และ *Cymbidium sinenes* (Jackson) ไว้ใน subgenus *Jensoa* (Rafin.) Seth & Cribb. เนื่องจากกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด นี้มีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมาก และในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ใบที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่และมีความสมบูรณ์ซึ่งเป็นใบที่สามจากปลายยอดของต้นที่ได้เพาะเลี้ยงไว้ในโรงเรือน (greenhouse) มาเป็นตัวอย่างในการสกัดเอนไซม์ เนื่องจากได้ทำการศึกษาเบื้องต้นโดยใช้ ใบ ปลายราก และ ดอก มาเป็นแหล่งของตัวอย่าง พบว่า ไอโซไซม์ที่สกัดได้จาก ปลายราก และ ดอก ไม่มีคุณภาพและ ย้อมสี (staining) ไม่ค่อยติด

นอกจากนี้ Smitamana and Kuntapanom (1996) ได้ทำการศึกษาในกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย คือ *Dendrobium scabrilingue Den. bellatulum Den. christyanum Den. crepidatum Den. lituiflorum Den. pulchellum Den. moschatum* และ *Den. infundibulum* โดยการสกัดโปรตีนจากปลายยอดและวิเคราะห์รูปแบบพื้นฐานของไอโซไซม์บางชนิดโดยใช้ polyacrylamide gel electrophoresis (Biorad, Mini Protein II) พบว่า ไอโซไซม์ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ esterase (EST) glutamate oxaloacetate transminase (GOT) shikimate

dehydrogenase (SKD) malate dehydrogenase (MDH) และ Leucine aminopeptidase (LAP) สามารถบ่งบอกความแตกต่างระหว่างชนิดของกล้วยไม้ดังกล่าวได้ และในปี 1997 ได้ศึกษาเพิ่มเติมใน *Dendrobium scabrilingue* และ *Den. bellatulum* พบว่า EST GOT SKD และ MDH สามารถแยกความแตกต่างได้ ต่อมา ประทุมพร (2542) ได้ศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ในกล้วยไม้สกุลหวายชนิดช้างน้าว ที่รวบรวมมาจาก 5 แหล่ง ได้แก่ อ. เชียงดาว อ. แม่แจ่ม อ. พร้าว จ. เชียงใหม่ และ จ. ลำปาง รวมทั้งจากประเทศพม่า จำนวนรวม 40 ตัวอย่าง วิเคราะห์เอนไซม์ 9 ชนิด คือ EST LAP SKD MDH GLD G6PDH ME SOD และ HPD โดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis พบว่า เอนไซม์แต่ละชนิดแสดงแถบสีหลายรูปแบบ ค่าเฉลี่ยของความถี่ของรูปแบบเอนไซม์ และค่าสัมประสิทธิ์ของความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมสามารถใช้อธิบายระดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม รวมทั้งมีศักยภาพในการใช้เป็นเครื่องมือสนับสนุนงานด้านอนุกรมวิธาน

McKee (1973) (อ้างโดย กัญจนา, 2539) กล่าวว่า การใช้เทคนิคทางอิเลคโตรโฟรีซีสในการจำแนกสายพันธุ์โดยการใช้ระบบของเอนไซม์ (isozyme system) นั้น ถ้าหากทำหลายระบบจะทำให้การระบุและจำแนกสายพันธุ์มีผลการวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ซึ่งการใช้ระบบของเอนไซม์เพียง 2-3 ชนิดจะเพียงพอถ้าจำนวนสายพันธุ์ที่ต้องการทดสอบไม่มากนัก แต่ถ้ามีจำนวนมากจะเพิ่มจำนวนระบบไอโซไซม์ในการศึกษามากขึ้นหรือใช้ลักษณะอื่นๆ มาช่วยในการตัดสินใจด้วย

Grossi *et al.* (1997) ศึกษา polymorphism ของไอโซไซม์ในพันธุ์ต่างๆของกุหลาบป่าเพื่อตรวจสอบอัตราการเกิด และ ความคงที่ของ polymorphism (Nielsen, 1985; Triest, 1992) โดยวิเคราะห์จากระบบเอนไซม์ 3 ระบบ คือ esterase (EST) leucine aminopeptidase (LAP) และ superoxide dismutase (SOD) พบว่า ให้จำนวนแถบของเอนไซม์ 9 7 และ 9 แถบตามลำดับ และระดับ polymorphism ถูกจำกัดด้วย สภาพแวดล้อม เมื่อคำนวณการกระจายของแถบไอโซไซม์ด้วย Jaccard distance สามารถนำมาพิสูจน์ในกลุ่มพันธุ์ของกุหลาบป่าที่เก็บรวบรวมไว้ นอกจากนี้ได้มีการนำ polymorphism ของไอโซไซม์ มาใช้ในการศึกษาพืชหลายๆ ชนิดที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับกุหลาบ เช่น *Malus domestica* (Menendez *et al.*, 1986) *Prunus domestica* (Groh *et al.*, 1994) และ พวกไม้ดอกไม้ประดับ (Tzuri *et al.*, 1991) เช่น *Camellia japonica* (Wendel and Parks, 1983) *Dianthus caryophyllus* (Messeguer and Arus, 1985)

Garkava *et al.* (2000) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง 4 taxa ในสกุล *Chaenomeles* (Rosaceae) โดยการวิเคราะห์จากระบบไอโซไซม์ที่เป็น polymorphic 6 ระบบ ผลปรากฏว่า รูปแบบของแถบไอโซไซม์สามารถนำมาเป็นเครื่องหมาย (markers) ได้ทั้งหมด 108

เครื่องหมาย และเมื่อวิเคราะห์ cluster เพื่อจัดกลุ่มของ taxa พบว่า *C. japonica* มีความสัมพันธ์กับ *C. cathayensis* น้อยที่สุด ขณะที่ *C. speciosa* และ hybrid taxon *C.* × *superba* มีความสัมพันธ์อยู่ระหว่าง *C. japonica* กับ *C. cathayensis* ซึ่ง *C. cathayensis* มีความแปรปรวนของไอโซไซม์ในระดับที่ต่ำ อย่างไรก็ตามข้อมูลทางไอโซไซม์มีประสิทธิภาพน้อยสำหรับการจัดกลุ่มภายในชนิด (intraspecific) ของพืชที่มีจีโนไทป์ขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิด

ผลจากการศึกษาทดลองในพืชหลายชนิด Brown (1978) (อ้างโดย กัญจนา, 2539) พบว่าพันธุ์พืชที่มีแหล่งกำเนิดเดียวกันจะมีความผันแปรด้านไอโซไซม์น้อย ซึ่งอาจหมายความว่า ค่าความผันแปรด้านไอโซไซม์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความหลากหลายของสภาพภูมิอากาศ

การศึกษาของ Gonzalez – Candelas and Montolio (2000) ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนของไอโซไซม์ในประชากรของ *Hippocrepis valentina* (Leguminosae) ซึ่งเป็นพืชที่ขึ้นอยู่ตามธรรมชาติแถบชายฝั่งเมดิเตอร์เรเนียนทางตะวันออกของประเทศสเปน โดยอาศัยการเกิดแถบสี 15 ตำแหน่ง จากการทำ starch gel electrophoresis พบว่า ความแปรปรวนของพืชชนิดนี้อยู่ในระดับปกติ และ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับรูปแบบความแปรปรวนทางพันธุกรรมของ *H. balerica* และ *H. grossi* พบว่า *H. valentina* ไม่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับ *H. balerica* จากนั้นได้วิเคราะห์ระดับประชากร พบว่า มีความแปรปรวนระหว่างประชากร โดยประชากรที่อยู่ภายใน zone ภูมิศาสตร์เดียวกันมีความแปรปรวนสูงกว่าประชากรที่อยู่ระหว่าง zone

5. การตรวจวิเคราะห์พันธุ์พืชโดยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การตรวจพิสูจน์พันธุ์พืชโดยวิธีการทางด้านลายพิมพ์ของอณูโมเลกุล(molecular fingerprinting)เป็นสิ่งที่จำเป็น (Smith and Smith, 1992) เนื่องจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานและสรีระของพืชยังมีปัญหาในการจำแนกความแตกต่างของพันธุ์ เพราะลักษณะดังกล่าวสามารถผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมและในระบบไอโซไซม์มีจำนวน polymorphic จำกัด จึงไม่เพียงพอสำหรับการแยกความแตกต่างของพันธุ์ในพืชหลายๆ ชนิด อีกทั้งลักษณะทางฟีโนไทป์ส่วนใหญ่มีการพัฒนาอยู่ภายใต้อิทธิพลของปฏิกิริยาระหว่างจีโนไทป์กับสภาพแวดล้อม ทำให้ผลการตรวจสอบที่ได้รับมีความแปรปรวนหรือมีความผิดพลาดอยู่บ้าง (Caetano – Anolles *et al.*, 1991; Nybom, 1994; พรพันธ์, 2538) อีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการตรวจพิสูจน์พันธุ์พืชและการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม คือ การใช้เครื่องหมายทางชีวเคมี (biochemical markers) เช่น flavonoids (Asen, 1979; Stewart *et al.*, 1979b) และ anthocyanins (Stewart *et al.*, 1979a) แต่การแสดงออกทางชีวเคมีเหล่านี้ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของพืชและสภาพแวดล้อม ในที่สุดได้มีการพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรมโดยใช้ดีเอ็นเอ ได้แก่ restriction fragment length polymorphisms (RFLP)

และ random amplified polymorphic DNAs (RAPD) ในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์พืช ซึ่งเป็นวิธีการหรือเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและให้ผลถูกต้องแม่นยำ น่าเชื่อถือ การใช้ RFLP markers ประสบผลสำเร็จสำหรับตรวจพิสูจน์พันธุ์ของพืชหลายๆ ชนิด (Bowers *et al.*, 1993; Hubbard *et al.*,1992; Lavi *et al.*, 1991; Nybom *et al.*, 1989) แต่ยังเป็นวิธีการที่เสียค่าใช้จ่ายสูง เครื่องมือและอุปกรณ์ในการปฏิบัติงานต้องมีเพียงพอ (พรพันธ์, 2538) สำหรับ RAPD markers มีรายงานครั้งแรกว่าเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดย Williams *et al.* (1990) และ Welsh and McClelland (1990) เทคนิคนี้มีการเรียกชื่อแบบอื่นได้อีก คือ AP – PCR หรือ arbitrarily primed polymerase chain reaction (Welsh and McClelland, 1990) DAF หรือ DNA amplification fingerprinting (Caetano – Anolles *et al.*, 1991) และ MAAP หรือ multiple arbitrarily amplicon profiling แต่ละเทคนิคที่เรียกนี้มีข้อแตกต่างกันบ้างในด้านขนาดของ primer ที่ใช้ แต่โดยหลักการไม่แตกต่างกัน คือ ใช้ primer ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวใน polymerase chain reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม (สุรินทร์, 2540) จึงมีการนำ RAPD markers มาใช้ในการตรวจพิสูจน์พันธุ์พืช และ จุลินทรีย์มากมาย

พรพันธ์(2538)ได้รายงานประโยชน์ของการใช้เทคนิค RAPDในการจำแนกพันธุ์พืชไว้ดังนี้

1. สะดวก รวดเร็ว โดยสามารถสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของพืช ผลการตรวจสอบสามารถทราบผลได้ทันที ในขณะที่การใช้วิธีการปลูกทดสอบในแปลงปลูกอาจจะต้องรอจนกว่าพืชนั้นๆ เจริญเติบโตเต็มที่เสียก่อน
2. สภาพแวดล้อม ไม่มีอิทธิพลต่อดีเอ็นเอของพืช ในขณะที่สภาพแวดล้อมจะมีอิทธิพลอย่างมากต่อการใช้เอนไซม์ หรือ โปรตีนตรวจสอบ
3. วิธีการตรวจสอบไม่ยุ่งยากซับซ้อน การวิเคราะห์ผลพิจารณาจากการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ และสามารถทำการตรวจสอบได้อย่างไม่จำกัด เพียงแต่เปลี่ยน primer โดยที่ส่วนประกอบหรือสภาพแวดล้อมอื่นๆ ของการทดลองจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงเลย
4. ใช้ตัวอย่างพืชที่จะนำมาตรวจสอบปริมาณน้อยมาก โดยเฉพาะพืชผสมตัวเองถ้าพืชนั้นมีความสม่ำเสมออยู่แล้ว ใช้ใบอ่อนเพียง 2-3 ใบก็เพียงพอที่จะนำมาสกัดดีเอ็นเอ ส่วนพืชที่ผสมข้ามการสุ่มตัวอย่างและความสม่ำเสมอของประชากรเป็นปัจจัยสำคัญในการตรวจสอบควรสุ่มตัวอย่างให้มากพอที่จะเป็นตัวแทนของประชากรทั้งหมด
5. เป็นวิธีการทางชีววิธี ที่ไม่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี จึงค่อนข้างจะปลอดภัย สำหรับผู้ปฏิบัติงาน เพียงแค่คอยระวังสารเคมีบางอย่างที่เป็นอันตรายเท่านั้น
6. ไม่จำเป็นต้องใช้ probes ที่เฉพาะเจาะจงของแต่ละพืช เพียงแต่ใช้ primer ซึ่งสามารถนำมาใช้ได้กับพืชทุกชนิด

7. สามารถตรวจสอบได้ทั้งจีโนมของพืชซึ่งมีระดับของ polymorphism สูง และทำให้สามารถประเมินการกระจายตัวทางพันธุกรรมของพืชที่นำมาศึกษาได้ อีกทั้งสามารถนำมาตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ หรือ การปลอมปนของพันธุ์ ตลอดจนนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น การหาเครื่องหมายที่ควบคุมลักษณะที่พืชต้องการ ทำให้ขจัดอิทธิพลของสภาพแวดล้อมออกไปได้ในการคัดเลือกพันธุ์พืช
8. ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบค่อนข้างต่ำ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ ก็มีไม่มากนักเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ

และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ เทคนิค RFLP พบว่า เครื่องมือที่จำเป็นต้องใช้ในเทคนิค RAPD มีราคาไม่แพง ไม่มีการใช้ radioisotopes ปริมาณของดีเอ็นเอที่นำมาใช้น้อยกว่า (Weeden, 1991; Williams *et al.*, 1990) และ มีความเหมาะสมในการศึกษาตัวอย่างที่มีจำนวนมาก (Thormann and Osborn, 1992) ด้วยเหตุนี้ การวิเคราะห์ RAPD จึงสามารถนำมาใช้ตรวจพิสูจน์และจำแนกพืชที่มี polymorphism สูง ได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ

จากการศึกษาความเหมาะสมของการวิเคราะห์ RAPD สำหรับตรวจพิสูจน์พันธุ์ และสายพันธุ์ของดอกไม้ป่า *Ozothamnus diosmifolius* (Vent.) DC. [syn. *Helichrysum diosmifolius* (Vent.) Sweet] ที่มีอยู่ในประเทศออสเตรียเลีย โดยใช้ primer ที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะ (arbitrary primer) 19 ชนิด พบว่า 16 ชนิด เกิด polymorphism ในอัตราที่สูง คิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ของ primer ทั้งหมด และให้ แถบที่เป็น polymorhic 166 แถบ และมี primer หลายชนิด (เช่น OPD – 03 และ OPM – 07) สามารถแยกความแตกต่างของจีโนไทป์ในพืชชนิดนี้ได้ (Ko *et al.*, 1996)

Ling *et al.* (1997) ได้นำเทคนิค RAPD มาใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอที่แยกได้จากเนื้อเยื่อของใบคริสต์มาส (*Euphorbia pulcherima* Wild ex Motzsch) ที่เป็นพันธุ์การค้า 9 พันธุ์ พบว่า การ amplified เกิดขึ้นใน primers 57 ชนิด จากที่นำมาทดสอบทั้งหมด 60 ชนิด คิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ และ มี 9 ชนิด ที่เกิด polymorphism ระหว่างพันธุ์สูง คือ ให้จำนวนแถบ RAPD ทั้งหมด 48 แถบ โดยแสดงแถบที่เป็น polymorphic 33 แถบ คิดเป็น 69 เปอร์เซนต์ และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างคริสต์มาสทั้ง 9 พันธุ์ได้จากดีเอ็นเอ 7 แถบ ที่เกิดจาก primer OPB 7 และ OPC 13 เมื่อทำการวิเคราะห์ UPGMA cluster สามารถแบ่งคริสต์มาสออกเป็น 2 กลุ่ม

Torres *et al.* (1993) ทำการตรวจพิสูจน์กุหลาบ (*Rosa* spp.) 5 พันธุ์ โดยใช้ RAPD marker พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ทั้งหมดด้วย primer 8 ชนิด ซึ่งให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และในงานปรับปรุงพันธุ์ของกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* โดย Chen *et al.* (1995)ได้นำ DNA amplification fingerprinting (DAF) มาใช้ในการตรวจพิสูจน์ความแตกต่าง

ของชนิด(varieties)ในกล้วยไม้สกุลนี้ โดยทำการแยกดีเอ็นเอจากส่วนของใบเพียงเล็กน้อย พบว่ารูปแบบของ DAF สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดของพืชที่มีฐานทางพันธุกรรมที่เหมือนกันได้ถ้าใช้ primer ที่เหมาะสม และ รูปแบบ DAF สามารถใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อการจดสิทธิบัตรพันธุ์พืชที่ถูกต้องของ *Phalaenopsis* ชนิดใหม่ๆ ที่ได้จาก Taiwan Sugar Corporation และจากการผสมข้ามระหว่างชนิดที่มีกลีบดอกสีขาว คือ *Phalaenopsis equestris* กับ *Doritis pulcherrima* ซึ่งมีกลีบดอกสีแดง ได้ลูกรุ่นที่ 1 (F_1) จากนั้นนำทั้งพ่อ แม่ และ F_1 มาตรวจสอบด้วยการทำ PCR โดยใช้ 360 primes เพื่อวิเคราะห์รูปแบบของ DAF ผลปรากฏว่า 8 primers ของ *Phalaenopsis equestris* และ 7 primers ของ *Doritis pulcherrima* แสดงแถบของดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic ที่จำเพาะในพ่อ หรือ แม่ ที่มีกลีบดอกสีแดง กับ F_1 แต่ไม่จำเพาะต่อ พ่อ หรือ แม่ที่มีกลีบดอกสีขาว แสดงว่าเครื่องหมายทางโมเลกุลนี้สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกรุ่นลูกที่อยู่ในระยะที่เป็นต้นอ่อนและเป็นต้นที่จะให้ดอกสีแดง

ในปี 1996 Lu *et al.* ได้ตรวจพิสูจน์ต้นตอท้อ 18 พันธุ์ ด้วย RAPD markers โดยใช้ primer ที่มีขนาดของนิวคลีโอไทด์ 10 เมอร์ (mer) ผลปรากฏว่า จาก primer ที่นำมาทดสอบทั้งหมด 80 ชนิด มี 20 ชนิด ให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 40 แถบ และมี 6 ชนิด ที่สามารถใช้ตรวจพิสูจน์ต้นตอท้อทั้ง 18 พันธุ์ได้ และเมื่อทำการวิเคราะห์ cluster จากแถบดีเอ็นเอดังกล่าว สามารถสร้าง dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้สอดคล้องกับพันธุประวัติ ซึ่งแยกต้นตอของท้อออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะของความต้านทาน และ อ่อนแอ ต่อไส้เดือนฝอยรากปม

และในปี 1997 Lo'pez – Valenzuela *et al.*ทำการตรวจพิสูจน์มะม่วง (*Mangifera indica* L.) 15 พันธุ์ จากต้นอ่อน (embryo type) โดยใช้ RAPD markers ที่ได้จากการใช้ arbitrary primer ที่มีขนาด 10 mer พบว่า primer ที่นำมาทดสอบทั้งหมด 40 ชนิด มี 13 ชนิด ที่สามารถ amplified กับ ส่วนของดีเอ็นเอ ได้ 19 แถบ และนำมาเป็นเครื่องหมายแสดงความจำเพาะเจาะจงต่อมะม่วงบางพันธุ์ และ เมื่อทำการวิเคราะห์ cluster จาก RAPD markers เพื่อสร้าง dendrogram แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของมะม่วง 15 พันธุ์ พบว่า 'Manila' และ 'Carabao' มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุดซึ่งสอดคล้องกับพันธุประวัติ และ สามารถแยกจีโนไทป์ของมะม่วงออกเป็น 4 กลุ่ม ตามภูมิศาสตร์ที่เป็นแหล่งกำเนิด

Sosinski and Douches (1996) ตรวจสอบดีเอ็นเอของมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) ที่ปลูกในอเมริกาเหนือ 46 พันธุ์ โดยใช้ arbitrary primer 16 ชนิด ที่มีขนาดของนิวคลีโอไทด์ 10 mers ในการทำ PCR ซึ่งเป็นเทคนิค RAPD ที่มีประสิทธิภาพในการจำแนกพันธุ์ทั้งที่ได้จากการผสมข้าม และ จากความแปรปรวนของสายต้น ผลปรากฏว่า primers 16 ชนิด เกิด 43 polymorphism ตามการปรากฏและ ไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน และสามารถแยก

ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของมันฝรั่งทั้งหมดโดยใช้ primer อย่างน้อย 10 ชนิด ซึ่งในการตรวจสอบพันธุ์ของมันฝรั่งด้วย PCR amplication นี้ไม่มีผลกระทบจากแหล่งของเนื้อเยื่อ (ใบ และ หัว) ที่นำมาสกัดดีเอ็นเอ

Weir *et al.* (1997) ได้นำ RAPD marker polymorphism มาใช้ในการแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ สายต้น และ ต้นกล้า ของ saskatoon (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) ซึ่งเป็นไม้ผลที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางตะวันตกของประเทศแคนาดา พบว่า primers 8 ชนิด ที่มีขนาดของนิวคลีไทด์ 9 เบส สามารถ amplified กับส่วนของดีเอ็นเอ แล้วให้แถบดีเอ็นเอทั้งหมด 98 แถบ โดยแสดงแถบที่เป็น polymophic 29 แถบ ซึ่งสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่าง saskatoon ทั้ง 16 พันธุ์ที่นำมาทดสอบ แต่ไม่สามารถนำมาตรวจสอบ สายพันธุ์ Thiessen ที่นำมาจาก 5 แหล่งได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเกิดความแปรปรวนของต้นกล้าที่ได้จากการผสมตัวเองของ สายพันธุ์ Thiessen ส่วนตัวอย่างของ สายพันธุ์ Regent และ Parkhill ที่นำมาจาก 2 แหล่ง ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ แสดงว่าเกิดความผิดพลาดในการติดฉลาก

นอกจากการศึกษาเพื่อการตรวจพิสูจน์และแสดงความแตกต่างระหว่างพืชทั้งในระดับชนิด พันธุ์ หรือ สายต้น แล้วยังมีการศึกษาเพื่อแสดงความแปรปรวนและความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชหลายๆ ชนิด จากการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของเบญจมาศ (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) โดย Wolff and Perters – Van Rijn (1993) พบว่า เบญจมาศมีความแปรปรวนระหว่างพันธุ์สูงและสามารถแยกความแตกต่างได้โดยการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 2 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่า ความแปรปรวนระหว่างชนิดของเบญจมาศอยู่ในระดับที่สูงด้วย

Luro *et al.*(1995) ได้นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA amplified fingerprinting) มาตรวจสอบหาจุดกำเนิดของพันธุกรรมและวิเคราะห์ความหลากหลายในส้มพันธุ์ต่างๆ โดยใช้นิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่มีลำดับของเบสซ้ำๆ กัน 3 ชนิด ได้แก่ (GTG) ×5 (TCC) ×5 และ (GACA) ×4 ทำหน้าที่เป็น single primer ใน PCR สำหรับเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่อยู่ในจีโนมทั้งหมด ผลปรากฏว่า เทคนิคดังกล่าวสามารถแยกความแตกต่างของต้นกล้าที่ได้จาก zygotic กับ nucellar ในรุ่นลูกของ Volkamer lemon (*Citrus volkamerana* Ten. & Pasq.) และสามารถแสดงความแตกต่างระหว่าง 10 สายพันธุ์ของ *Citrus reticulata* Blanco ได้ และในปีเดียวกัน Wachira *et al.* (1995) ได้ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของชา (*Camellia sinensis*) ซึ่งเป็นพืชยืนต้นประเภทเครื่องดื่มที่มีแหล่งกำเนิดอยู่ทางเอเชียใต้ และในหลายๆ ประเทศได้มีการนำไปเพาะปลูกโดยที่ประเทศเหล่านี้ยังไม่มีแบบแผนในการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้นำเทคนิค RAPD มาตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางอนุกรมวิธานของชา 38 สายต้น ที่อยู่ใน 3 ชนิด คือ *assamica* *sinensis* และ

assamica ssp. *lasiocalyx* ทำการตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมระหว่างชนิด (species) โดยแบ่งเป็นระหว่างประชากร และ ภายในประชากรเดียวกัน พบว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของความแปรปรวนถูกตรวจพบในประชากรเดียวกัน และการวิเคราะห์จากแถบของดีเอ็นเอ สามารถแยกประชากรออกเป็น 3 กลุ่ม สอดคล้องกับอนุกรมวิธาน และ พันธุประวัติของชาบางสายต้น และการวิเคราะห์ RAPD สามารถแยกความแตกต่างของชาทั้ง 38 สายต้นได้ ขณะที่ไม่สามารถแยกได้โดยลักษณะทางสัณฐานและฟีโนไทป์

Al – Zahim *et al.* (1997) ได้นำการวิเคราะห์ RAPD มาตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในพันธุ์ของกระเทียม (*Allium sativum* L.) ที่มีการเรียกชื่อของพันธุ์แตกต่างกัน และตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ปลูกหลายๆ ชนิด กับ พันธุ์ *A. longicuspis* ซึ่งเป็นพันธุ์ป่า (wild progenitor) โดยนำกระเทียม 27 พันธุ์ มาวิเคราะห์ โดยใช้ primers 26 ชนิด พบว่า ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 292 แถบ ซึ่งแสดง polymorphic 63 แถบ คิดเป็น 21 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการวิเคราะห์ cluster สามารถแบ่งกลุ่มตามความแปรปรวนทางสัณฐานได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีรูปแบบเป็น bolting กับกลุ่มที่เป็น non- bolting และ พบว่า *A. longicuspis* อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *A. satium* var. *ophioscorodon* แสดงว่า มีความสัมพันธ์กันในทางอนุกรมวิธานที่ใกล้ชิดกันมาก

สำหรับข้อจำกัดของเทคนิค RAPD คือ ความไวในการตรวจวิเคราะห์ (sensitivity) และสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาและการแยกอิเลคโตรโฟรีซีสซึ่งอาจจะไม่แน่นอนแปรผันตามการทดลองแต่ละครั้ง หรือ แต่ละห้องปฏิบัติการ ทำให้การแปรผลเป็นไปได้ยากโดยเฉพาะเมื่อต้องการเปรียบเทียบแต่ละ strain ในแต่ละการทดลอง หรือ แต่ละห้องปฏิบัติการ ส่วนความแม่นยำในการตรวจสอบสามารถทำให้เพิ่มขึ้นได้ด้วยวิธีการย้อม silver stain (สุรศักดิ์, 2540) จากการศึกษาสภาวะในการทำปฏิกิริยาที่อาจจะมีอิทธิพลต่อการวิเคราะห์ RAPD ในเบญจมาศโดย Wolff *et al.*(1993) พบว่า ชนิดของ polymerase (polymerase brand) ชนิดของ thermal cycle อุณหภูมิในช่วง annealing (annealing temperature) และ primer เป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเกิด PCR – product และ รูปแบบของ RAPD และในปี 1995 Sugawara and Oowada ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิด polymerase chain reaction สำหรับแยกความแตกต่างของ citrus chimerase โดยการทดสอบ primer ที่สามารถนำมาทำซ้ำแล้วให้แถบของดีเอ็นเอคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง และสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ ซึ่งจากการศึกษา พบว่า primer ที่มีขนาดของนิวคลีโอไทด์ 12 mers สามารถนำมาตรวจพิสูจน์ 4 citrus chimerase ที่ทดสอบโดยใช้เทคนิค RAPD ได้

นอกจากนี้ ปัญหาที่มีผลต่อการวิเคราะห์ RAPD คือ ความแปรปรวนในแหล่งของเนื้อเยื่อพืช ขั้นตอนในการแยกดีเอ็นเอ และ สภาวะของ PCR ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงลักษณะฟีโนไทป์ของ RAPD ทำให้มีผลต่อความแม่นยำในการวิเคราะห์ RAPD (Weeden *et al.*, 1992) เนื่องจาก

ความสามารถของ PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากดีเอ็นเอต้นแบบที่มีเพียงเล็กน้อยได้ ทำให้การปนเปื้อนเป็นปัญหาในการวิเคราะห์ RAPD การปนเปื้อนสามารถเกิดขึ้นได้จากตัวอย่างของเนื้อเยื่อ (การปนเปื้อนภายในประชากร) หรือ เชื้อจุลินทรีย์ที่เข้าทำลายพืช ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อรูปแบบของแถบ RAPD คือ อายุของเนื้อเยื่อที่นำมาศึกษา การปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์หรือการปนเปื้อนภายในประชากร และ การใช้สาร (reagent) ในการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่ง Staub *et al.*(1996) ได้ศึกษาอิทธิพลของอายุเนื้อเยื่อของพืช การเข้าทำลายของเชื้อโรค การปนเปื้อนของประชากร และ สภาวะของ polymerase chain reaction ที่มีผลต่อการวิเคราะห์ RAPD ในแตงกวา ซึ่งปรากฏว่า ดีเอ็นเอที่แยกจากเนื้อเยื่อที่อ่อนและไม่มีเชื้อโรคเข้าทำลายให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง ส่วนพืชที่ถูกเข้าทำลาย (infected) ด้วย *Sphaerotheca fuliginea* Svhl. (ex fr.) Poll. แสดงความแปรปรวนในรูปแบบของแถบ PAPD เมื่อเปรียบเทียบกับพืชปกติ และในเชิงพาณิชย์ สารเคมีพวก 10× reaction buffer $MgCl_2$ stock solution และ Taq DNA polymerase มีความแตกต่างกัน ซึ่งจะมีผลต่อรูปแบบของแถบ RAPD และ การวิเคราะห์ผล ดังนั้นความถูกต้องและแม่นยำของผลการวิเคราะห์ RAPD จำเป็นต้องใช้ปฏิกิริยาที่เหมาะสม และ จำเพาะเจาะจงต่อสารเคมีที่นำมาทำ PCR

รายงานการแยกความแตกต่างของพืชโดยการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ร่วมกับ RAPD marker พบจากการศึกษาของ Maass and Klaas (1995) ซึ่งได้วิเคราะห์กระเทียม 300 accession ที่เก็บรวบรวมมาจากประเทศต่างๆ ที่อยู่ในแถบเอเชียกลางด้วยไอโซไซม์ 12 ชนิด ผลปรากฏว่าให้แถบทั้งหมด 22 ตำแหน่ง มีลักษณะเป็น polymorphic 10 ตำแหน่ง และในการวิเคราะห์ 48 accession ของกระเทียมดังกล่าวด้วย RAPD โดยใช้ 15 arbitrary oligonucleotide primer ผลปรากฏว่า ให้แถบที่เป็น polymorphic ทั้งหมด 125 แถบ และในปี 1997 Selkirk *et al.* ได้ทำการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรของมอส *Sarconeurum glaciale* 66 isolate ที่เก็บรวบรวมมาจาก Ross Island Southern Victoria Land และ Vestfold Hills ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ในทวีปแอนตรากติก โดยใช้เทคนิคไอโซไซม์และRAPD พบว่า การแสดงความแปรปรวนระหว่างประชากรสามารถวิเคราะห์ได้จากรูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์เพียงหนึ่งชนิด และ RAPD ได้แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างที่มาจาก Vestfold Hills มีระดับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความแปรปรวนทางพันธุกรรมทั้งภายในและระหว่างตัวอย่าง สูงกว่า ตัวอย่างที่มีแหล่งกำเนิดใน Ross Sea และ dendrogram ที่สร้างจากแถบ RAPD ได้จัดตัวอย่างจาก Ross Island และ Southern Victoria Land เป็นหนึ่งประชากร แยกจาก Vestfold Hills ซึ่งการแบ่งแยก และ ความแปรปรวนของประชากรอาจมีสาเหตุมาจากภายในทวีปเกิดการอพยพย้ายถิ่นฐาน

ใน *Hydrilla veriticillata* ซึ่งเป็นหญ้าที่พบในแหล่งน้ำจืดทั่วโลก มีรายงานพบครั้งแรกที่ประเทศนิวซีแลนด์ ปี 1963 และปัจจุบันพบอยู่ในทะเลสาบ 4 แห่ง ที่มีจุดกำเนิดจากอ่าว Hawke (Hawke's Bay) Hofstra *et al.* (2000) ได้ทำการวิเคราะห์ไอโซไซม์จากระบบเอนไซม์ 6 ระบบ คือ MDH PGM PGD GPI AAT และ IDH พบว่า เอนไซม์ทั้ง 6 ระบบ แสดงระดับและรูปแบบของความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรของ *H. veriticillata* ที่มีอยู่ในประเทศนิวซีแลนด์ และสามารถนำมาวิเคราะห์ตัวอย่างของ *H. veriticillata* ที่เป็น monoecious และ dioecious ที่พบในประเทศออสเตรเลีย และ อเมริกา และพบว่า เอนไซม์ MDH PGM GPI และ AAT แสดง polymorphic ระหว่างตัวอย่างที่ได้จากประเทศต่างๆ เมื่อนำรูปแบบไอโซไซม์ของประชากร *H. veriticillata* ที่พบในประเทศนิวซีแลนด์มาเปรียบเทียบกับที่พบในประเทศอื่น พบว่า *H. veriticillata* น่าจะมีแหล่งกำเนิดอยู่ที่นิวซีแลนด์ และเมื่อนำ RAPD มาตรวจสอบในตัวอย่างเดียวกันโดยใช้ 14 random primers พบว่า ประชากร *H. veriticillata* ทั้ง 4 แหล่งในนิวซีแลนด์ แสดงจีโนไทป์ที่เป็น dominant 1 จีโนไทป์ จากการวิเคราะห์ทั้งรูปแบบไอโซไซม์ และ RAPD พบว่า *H. veriticillata* ในนิวซีแลนด์ มีความคล้ายคลึงกับ *H. veriticillata* ในออสเตรเลียมากกว่า ในอเมริกา ดังนั้น *H. veriticillata* ในออสเตรเลียน่าจะมีแหล่งกำเนิดมาจากนิวซีแลนด์