

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของถั่วเหลือง

ถั่วเหลือง (soybean) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Glycine max* (L.) Merrill ชื่อสามัญของถั่วเหลืองมีหลายชื่อด้วยกันเช่น soybean , chinese pea , soja bean เป็นต้น ถั่วเหลืองพันธุ์ปลูกมีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน มีจำนวนโครโมโซม $2n = 40$ ถั่วเหลืองสามารถจำแนกทางพฤกษศาสตร์ได้ดังนี้

Kingdom	Plant kingdom
Subkingdom	Cormobionta
Division	Spermatophyta
Subdivision	Angiospermae
Class	Dicotyledoneae
Subclass	Archichlamydae
Order	Polypetalae
Suborder	Leguminosinae
Family	Leguminosae
Subfamily	Papilionoideae
Tribe	Phaseoleae
Subtribe	Glycininae
Genus	<i>Glycine</i>
Subgenus	<i>Soja</i>
Species	<i>max</i>

ราก ถั่วเหลืองมีระบบรากแก้ว (tap root system) รากแขนงซึ่งเจริญออกจากรากแก้วเจริญไปตามแนวนานกับผิวดินมีความยาวประมาณ 40-75 เซนติเมตร รากแก้วเจริญลึกลงไปในแนวดิ่ง โดยสามารถเจริญได้ถึง 150 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับดินและสภาพแวดล้อม โดยทั่วไปรากถั่วเหลืองจะเจริญเติบโตเป็นกระจุกอยู่ในระดับความลึกประมาณ 15 เซนติเมตร รากขนอ่อน (root hair) จะเกิดขึ้นที่ปลายสุดของราก ซึ่งมีบทบาทอย่างมากในการดูดซับธาตุอาหาร น้ำ และมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างปมของเชื้อไรโซเบียม

ลำต้น ความสูงของลำต้นเป็นลักษณะทางพันธุกรรม พันธุ์ที่ปลูกทั่วๆ ไปมีรูปแบบการเจริญทางความสูง (stem termination) 3 ประเภท คือ การเจริญแบบทอดยอด ไม่ทอดยอด และกิ่งทอดยอด ลำต้นถั่วเหลืองพันธุ์การค้าจะตั้งตรงเป็นทรงพุ่มสูงประมาณ 50-70 เซนติเมตร การแตกกิ่งแขนงและจำนวนข้อปล้องจะมีมากหรือน้อยขึ้นกับพันธุ์ ลำต้นของถั่วเหลืองมีลักษณะกลมหรือมีเหลี่ยมเล็กน้อย มีขนปกคลุมทั่วไปยกเว้นที่ใบเลี้ยงและกลีบดอก ความหนาแน่นของขนปกคลุม สีขน ความยาวและรูปร่างของขนจะแตกต่างกันตามพันธุ์

ใบ เป็นใบประกอบมีใบย่อย 3 ใบ (trifoliate leaves) แต่ใบเลี้ยงและใบจริงคู่แรกจะเป็นใบเดี่ยวเกิดตรงกันข้าม จำนวนใบย่อยอาจมีมากกว่า 3 ใบขึ้นอยู่กับลักษณะพันธุ์ รูปร่างใบมีหลายแบบ เช่น ใบแคบ ใบค่อนข้างกลมรี เป็นต้น โคนก้านใบมีหูใบ (stipule) 1 คู่ ที่บริเวณโคนก้านใบรวมมี pulvinus ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนไหวของใบ ในระหว่างมุมใบจะพบตาซึ่งต่อไปจะเจริญเป็นกิ่ง ใบจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองเมื่อฝักเริ่มแก่และจะร่วงหล่นจากต้นเมื่อฝักแก่เต็มที่ มีบางพันธุ์เท่านั้นที่ใบไม่ร่วงจากลำต้นเมื่อฝักแก่เต็มที่

ดอก ช่อดอกเป็นแบบ raceme ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศประกอบด้วยส่วนต่างๆ คือ กลีบเลี้ยง กลีบดอกที่ประกอบด้วย standard wing 2 อัน และ keel 2 อัน ซึ่งแยกกันอยู่อย่างอิสระ เกสรตัวผู้มี 9 อันที่เชื่อมติดกันและมี 1 อันที่แยกอิสระ เกสรตัวเมีย 1 อัน ซึ่งมี 1-4 ovule ก้านเกสรตัวเมียมีขนปกคลุมและโค้งงอไปทางด้านหลัง มีปลาย stigma โป่งเป็นทรงกลมจำนวน ovules จะควบคุมจำนวนเมล็ดต่อฝัก ถั่วเหลืองชนิดทอดยอดจะไม่มีดอกที่ปลายยอด แต่มีที่ตาข้าง ส่วนถั่วเหลืองไม่ทอดยอดจะมีดอกทุกส่วนและที่ปลายยอดดอกจะมีขนาดใหญ่ที่สุด

ฝัก ฝักจะเกิดเป็นกลุ่มอาจมีลักษณะตรงหรือโค้งงอเล็กน้อยมีความยาว 2-7 เซนติเมตร เมื่อแก่จะมีสีเหลือง ดำ หรือน้ำตาลแตกต่างกันตามพันธุ์ ภายในจะมีเมล็ด 1-5 เมล็ด แต่โดยมากมี 3 เมล็ดบางพันธุ์เมื่อฝักแก่อาจจะแตก (shattering) ตามรอยแตกทำให้เมล็ดร่วงผลผลิตลดลงแต่ถั่วเหลืองพันธุ์ใหม่ๆ มักปรับปรุงพันธุ์ให้ฝักไม่แตกหรือฝักแตกน้อย (พีระศักดิ์ ศรีนิเวศน์. 2542 ; อารีย์ วรรณวุฒิ. 2544)

ความมีชีวิตหรือความงอกและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในระหว่างการพัฒนาของเมล็ดและเพิ่มสูงสุดเมื่อเมล็ดสุกแก่ทางสรีรวิทยา (physiological maturity, PM) (Delouche. 1975) ที่ระยะสุกแก่นี้เมล็ดจะเป็นอิสระจากต้นแม่นั่นคือ ธาตุอาหารจากต้นแม่จะไม่ถูกส่งไปยังเมล็ดอีกต่อไป ถึงแม้ว่าระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาจะเป็นระยะที่เมล็ดมีคุณภาพสูงสุด การเก็บเกี่ยวก็ไม่สามารถทำได้เพราะความชื้นของเมล็ดยังคงสูงอยู่มากจึงต้องทิ้งให้เมล็ดอยู่บนต้นแม่จนกระทั่งความชื้นเมล็ดลดลงเหลือประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ ระยะนี้เรียกว่า ระยะสุกแก่ที่เก็บเกี่ยวได้ (harvest maturity, HM) ระยะสุกแก่จาก PM ถึง HM อาจใช้ระยะเวลาไม่กี่วันจนถึง 3 อาทิตย์ (Tekrony *et al.* 1980)

คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในระหว่าง PM ถึง HM อาจลดลงทั้งนี้เนื่องจากความรุนแรงของสภาพลมฟ้าอากาศเป็นสำคัญ นอกจากนี้ลักษณะทางพันธุกรรมและลักษณะทางกายภาพของเมล็ด บางลักษณะเช่น ขนาด น้ำหนัก สีเมล็ดและเปอร์เซ็นต์เชื้อหุ้มเมล็ด เป็นต้น ก็ล้วนแล้วแต่มีความสัมพันธ์กับคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ทั้งสิ้น (วันชัย จันทรประเสริฐและคณะ. 2539 ; Edwards and Hartwig. 1997)

2.2 การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

ระยะสมบูรณ์สูงสุดของเมล็ดนั้นอยู่ในระยะที่เมล็ดยังอยู่บนต้นแม่ เป็นระยะที่เมล็ดพัฒนามาจนกระทั่งมีน้ำหนักแห้งของเมล็ดสูงสุดซึ่งเรียกว่า การสุกแก่ทางสรีรวิทยาที่ระยะนี้เมล็ดจะมีความงอกและความแข็งแรงสูงสุด ขณะเดียวกันกระบวนการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (seed deterioration) ก็จะเริ่มเกิดขึ้นด้วย วันชัย จันทรประเสริฐ (2537) ได้อธิบายไว้ว่า การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์นี้จะดำเนินเรื่อยไปจนกระทั่งเมล็ดตาย ลักษณะของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์มี 3 ประการดังนี้

1. การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติไม่สามารถป้องกันหรือหยุดยั้งได้ แต่ถ้าหากมีวิธีการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ที่ดีอาจทำให้การเสื่อมเกิดขึ้นช้าลงได้
2. การเสื่อมของเมล็ดพันธุ์ไม่สามารถคืนกลับได้กล่าวคือเมื่อเมล็ดพันธุ์มีการเสื่อมคุณภาพเกิดขึ้นแล้วเมล็ดนั้นจะไม่สามารถกลับมาเป็นเมล็ดพันธุ์ที่ดีสมบูรณ์แข็งแรงดังเดิมได้อีก
3. การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์แตกต่างกันไปตามประชากรเมล็ดกล่าวคือเมล็ดพันธุ์พืชแต่ละชนิด แต่ละพันธุ์ แต่ละกอง หรือแต่ละเมล็ดก็มีอัตราการเสื่อมแตกต่างกันออกไป

การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เกิดขึ้นเนื่องจากสาเหตุหลัก 2 ประการ คือ เนื้อเยื่อเสื่อมสภาพไปตามอายุ และมีการเข้าทำลายของเชื้อจุลินทรีย์ แมลง หรือสัตว์อื่นๆ (McGee. 1983) นอกจากนี้ จวงจันทร ดวงพัตรา (2523) ยังกล่าวว่า ปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์มี 2 ปัจจัยสำคัญคือ ปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอก ปัจจัยภายในเกี่ยวข้องกับทางด้านพันธุกรรมและองค์ประกอบทางเคมีภายในเมล็ด ส่วนปัจจัยภายนอกเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมขณะที่พืชเจริญเติบโตหรือในระหว่างสุกแก่ วิธีการเก็บเกี่ยวตลอดจนการปรับปรุงสภาพการเก็บรักษาเป็นสำคัญ

2.3 ปัจจัยภายในที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

Nangju (1977) รายงานว่า ถั่วเหลืองต่างพันธุ์กันปลูกในสภาพแวดล้อมเดียวกันได้รับการดูแลรักษาเหมือนกัน จะให้เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพแตกต่างกันได้ ทั้งนี้เนื่องจากในขณะที่ยังเมล็ดกำลัง

พัฒนาและสุกแก่อยู่นั้น เมล็ดถั่วเหลืองต่างพันธุ์กันมีความแตกต่างกันในแง่ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมส่งผลให้เมล็ดที่เก็บเกี่ยวมีคุณภาพแตกต่างกันไป รวมถึงความสามารถในการเก็บรักษา หรือมีอัตราการเสื่อมคุณภาพที่แตกต่างกันอันเนื่องมาจากลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันนั้นย่อมมีความต่างกันทางด้านกายวิภาคและองค์ประกอบทางเคมีอายุการเก็บรักษาจึงแตกต่างกัน (วันชัย จันทรประเสริฐ. 2537)

ศูนย์วิจัยพืชไร่เชียงใหม่ (2539) ทำการทดลองการเก็บรักษาเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองไว้ในสภาพอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 เดือน พบว่า สายพันธุ์ SSR8305-3 มีความงอกสูงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่พันธุ์สุโขทัย 1 และเชียงใหม่ 60 มีความงอกเพียง 58 เปอร์เซ็นต์ และ 74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อมีการตรวจสอบความงอกของเมล็ดพันธุ์ที่มีอายุการเก็บรักษา 6 เดือน โดยวิธีการเร่งอายุ พบว่า สายพันธุ์ SSR8305-3 ยังคงมีความงอกสูงถึง 88 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานสามารถใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ได้ ในขณะที่เมล็ดพันธุ์สุโขทัย 1 และเชียงใหม่ 60 ซึ่งมีความงอกเพียง 52 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นไม่สามารถใช้เป็นเมล็ดพันธุ์ได้

นอกจากความผันแปรทางพันธุกรรมแล้ว นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้พบว่า คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองยังมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางกายภาพของเมล็ดพันธุ์อีกด้วย Dassou and Kueneman (1984) รายงานว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีสีดำมีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพมากกว่าพันธุ์ที่มีเมล็ดสีเหลือง จึงทำให้เมล็ดพันธุ์มีความงอกและอายุการเก็บรักษาสูงกว่า นอกจากนี้เมล็ดพันธุ์สีดำแล้วเมล็ดพันธุ์ที่มีสีเขียวก็มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพมากกว่าเมล็ดพันธุ์ที่มีสีเหลืองอีกด้วย (Horlings *et al.* 1994) Kuo (1989) ได้เสนอว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดสูงจะสามารถชะลอการซึมผ่านการเข้าออกของน้ำทำให้การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร้ออกซิเจนช้า นอกจากนี้การมีสารยับยั้งอยู่ที่ฝักถั่วเหลืองอาจทำให้น้ำไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปยังเมล็ดพันธุ์จึงอาจส่งผลให้เมล็ดพันธุ์มีความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร้ออกซิเจน (Krul. 1978)

Andrews (1981) ศึกษาความหนาของเยื่อหุ้มเมล็ดพบว่า ปริมาณ wax และ cutin สะสมอยู่ที่ผิวเยื่อหุ้มเมล็ดมีผลดีทำให้ปริมาณรู (pores) ที่เยื่อหุ้มเมล็ดน้อยลง ในขณะที่ Kulik and Yaklich (1991) พบว่า ลักษณะขนาด รูปร่าง และจำนวนรู แตกต่างกันระหว่างพันธุ์ถั่วเหลืองต่างๆ และยังพบขนาดของไมโครโพล์แตกต่างกันไปตามพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์ Williams ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีปัญหาเกี่ยวกับคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ มีรูที่เยื่อหุ้มเมล็ดและไมโครโพล์มีขนาดใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์อื่นๆ ซึ่งสนับสนุนรายงานของ สมศักดิ์ ศรีสมบุญ และคณะ (2534) รายงานว่า พันธุ์เชียงใหม่ 60 เป็นพันธุ์ลูกที่คัดเลือกได้จากการผสมระหว่างพันธุ์ Williams และพันธุ์ สจ.4 ดังนั้นลักษณะคุณภาพเมล็ดต่ำของพันธุ์เชียงใหม่ 60 น่าจะมาจากพันธุ์ Williams นอกจากนี้วันชัย จันทรประเสริฐ และคณะ (2540) รายงานว่า เปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดมีความสัมพันธ์กับขนาดเมล็ด โดยเมล็ดที่มีขนาดเล็กจะมีเปอร์เซ็นต์เยื่อหุ้มเมล็ดสูงกว่าเมล็ดขนาดใหญ่

ใหญ่ Hill *et al.* (1986) ได้เสนอว่า เมล็ดขนาดเล็กจะมีปริมาณเมล็ดแข็ง (hard seed) สูงกว่าเมล็ดขนาดใหญ่ Horlings *et al.* (1991) แสดงให้เห็นว่า การเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองมีความสัมพันธ์กับขนาดเมล็ด และความสามารถของเชื้อหุ้มเมล็ดที่ยอมให้น้ำซึมผ่านได้ โดยพบว่า เมล็ดขนาดใหญ่จะมีความงอกลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาตั้งแต่ระยะ R7 ถึงระยะที่เก็บเกี่ยวได้ (HM) มีรายงานเพิ่มเติมจาก วันชัย จันทร์ประเสริฐ และคณะ (2540) พบความสัมพันธ์ระหว่างค่า eccentricity กับคุณภาพเมล็ดพันธุ์ถั่วคือ เมล็ดถั่วเหลืองที่มีรูปร่างเมล็ดรี เป็นเมล็ดที่มีคุณภาพในด้านความงอกและความแข็งแรงสูงกว่าเมล็ดที่มีลักษณะกลม ลักษณะทางกายภาพของเมล็ดดังกล่าวนี้ถูกควบคุมด้วยลักษณะทางพันธุกรรมทั้งสิ้น

นอกจากนี้ยังมีปัจจัยภายในทางด้านอื่นๆ ได้แก่ องค์ประกอบทางชีวเคมีภายในเมล็ดก็มีผลต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เช่นกัน เนื่องจากเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองเป็นเนื้อเยื่อที่มีชีวิตและมีการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีหลายอย่างเกิดขึ้นในเมล็ดพันธุ์ขณะที่การเสื่อมคุณภาพได้เริ่มต้นขึ้น (Delouche and Baskin, 1973) ซึ่งในบรรดาการเปลี่ยนแปลงนี้นักวิทยาศาสตร์หลายท่านเชื่อว่าการเสื่อมสภาพของเมมเบรนเป็นสาเหตุสำคัญที่เกิดขึ้นก่อนที่จะมีการเปลี่ยนแปลงในความงอกและความแข็งแรง (Buchvarov and Gantcheff, 1984 ; Ferguson *et al.* 1990) เมมเบรนมีบทบาทสำคัญยิ่งในการป้องกันสารต่างๆ ในองค์ประกอบของเซลล์ไม่ให้รั่วไหลออกมาปะปนกัน นอกจากนี้เอนไซม์ในวิถีเมแทบอลิซึม (metabolic pathway) อาจมีความสัมพันธ์หรือดำเนินกิจกรรมอยู่ในโครงสร้างของเมมเบรน (Halmer and Bewley, 1984) เมื่อเมมเบรนได้รับความเสียหายอาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิซึม ซึ่งจะนำไปสู่การสูญเสียความมีชีวิตและความแข็งแรงของเมล็ดพันธุ์ในที่สุด (Delouche and Baskin, 1973)

นอกจากนี้ยังมีนักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้เสนอกระบวนการหรือปรากฏการณ์ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ได้แก่ ความเสียหายของ DNA (Chea and Osbosne, 1978) การสูญเสียเอนไซม์ (Woodstock, 1973) การสะสมสารพิษ (Harrington, 1973) ระบบการหายใจเสียหาย (Leopold and Musgrave, 1980) ระบบการสังเคราะห์โปรตีนเสียหาย (Blowers *et al.* 1980) และ lipid peroxidation ซึ่งทำให้เมมเบรนเปลี่ยนแปลง (Kalpana and Madhava Rao, 1995 ; Mcdonald, 1990)

ปัจจุบันเชื่อกันว่า lipid peroxidation เป็นสาเหตุสำคัญของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ โดยก่อเกิดความเสียหายแก่เซลล์ในลักษณะต่างๆ ได้แก่ ไมโทคอนเดรียเสียหาย กลไกการสังเคราะห์เอนไซม์เสื่อม เมมเบรนและ nuclear membrane เสียหาย การที่ระบบเมมเบรนของเซลล์ได้รับความเสียหายได้ง่ายก็เพราะเมมเบรนนั้นประกอบไปด้วยส่วนของไขมันที่ไม่อิ่มตัวสูง จึงทำให้เกิดความเสียหายจาก peroxidation ได้ง่าย (Harrington, 1973 ; Ferguson *et al.* 1990) การเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันดังกล่าวทำให้โครงสร้างต่างๆ ของเมมเบรนไม่สามารถกลับคืนมา

ในลักษณะเดิมทำให้เกิดการรั่วไหลของสารอินทรีย์ต่างๆ ออกจากเมล็ดพันธุ์ (Parrish and Leopold, 1978)

Sakunmarak (1992) ทำการศึกษาในเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองพบการแยกตัวของผนังเมมเบรนออกมาจากผนังเซลล์วอลล์ในเซลล์ของเนื้อเยื่อชั้นโปรคอร์ทเอกซ์ (procotical tissue) ของรากอ่อนของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง และยังพบการรวมตัวกันของเม็ดโปรตีน (protein body) ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นความเสียหายที่เกิดจากการย่อยทำลายของเอนไซม์ (hydrolytic damage) ในขณะที่การเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระนั้นมีความสัมพันธ์กับการลดลงของเปอร์เซ็นต์ความงอกของเมล็ดพันธุ์เนื่องจากกรดไขมันอิสระจะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้โครงสร้างของไมโทคอนเดรียผิดปกติซึ่งกระทบกระเทือนต่อการหายใจของเซลล์ (Priestley, 1985)

การเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์และองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์เสียหาย มีผลทำให้นิวเคลียสที่อยู่ภายในถูกทำลายไปด้วย เมื่อ DNA เกิดการเสื่อมสภาพไปจะมีผลทำให้การถอดรหัสของแมนเซนเจอร์อาร์เอ็นเอผิดปกติ (Ghosh and Choudhuri, 1984) โดยเมล็ดพันธุ์ที่เสื่อมคุณภาพนั้นเซลล์จะขาดกลไกในการทำหน้าที่แปลรหัสของแมนเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (mRNA translation) ไปเป็นโปรตีน เนื่องจากเมล็ดไม่สามารถที่จะสร้าง ATP และ GTP ขึ้นมาในระดับที่เหมาะสมได้ (Bryan and Osborne, 1973 ; Peumans and Carlier, 1981 ; Grilli, 1982) จากการศึกษาในข้างต้นทำให้เป็นที่เข้าใจว่าการเสื่อมสภาพของเมมเบรนน่าจะเป็นสาเหตุเบื้องต้นที่ทำให้เกิดการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง (Delouche and Baskin, 1973)

2.4 ปัจจัยภายนอกที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์

เมล็ดพันธุ์ที่ผลิตในเขตร้อนมักจะมีคุณภาพต่ำ (Paschal and Ellis, 1978) ทั้งนี้เนื่องจากความไม่เหมาะสมของสภาพอากาศเช่น การมีฝนตกบ่อยครั้งหรือตกครั้งละนานๆ ประกอบกับการมีอุณหภูมิ และความชื้นของอากาศสูง ลักษณะสภาพแวดล้อมเช่นนี้ไม่เอื้ออำนวยต่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ให้มีคุณภาพดีและต่อการเก็บรักษา (Delouche *et al.* 1973) จึงทำให้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองสูญเสียความงอกไปอย่างรวดเร็วภายใน 2-3 เดือน จนไม่มีคุณค่าพอที่จะใช้ปลูก Harris *et al.* (1965) พบว่า อุณหภูมิที่สูงในช่วง 45 วันหลังปลูกถั่วเหลืองโดยเฉพาะในระยะที่เมล็ดกำลังพัฒนาทำให้เมล็ดพันธุ์มีความงอกและความแข็งแรงต่ำ และการมีสภาพอุณหภูมิสูงและอากาศที่แห้งแล้งที่เกิดขึ้นในระหว่างการสุกแก่ของเมล็ดเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เมล็ดมีความงอกต่ำ โดยจะพบเมล็ดเขียว เมล็ดเหี่ยวแห้ง และเมล็ดเน่าเป็นจำนวนมาก

ในทำนองเดียวกัน Hor (1977) รายงานว่า การปลูกพืชไร่ในบริเวณที่มีความชื้นในอากาศสูง เมื่อเมล็ดสุกแก่แล้วปล่อยทิ้งไว้ในแปลงนาน ทำให้เมล็ดมีความชื้นสูง 18-35 เปอร์เซ็นต์ หากไม่รีบลดความชื้นในเมล็ดจะทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง

ที่ถูกฝนก่อนการเก็บเกี่ยวหรือในขณะที่เก็บเกี่ยวจะได้รับความเสียหายทั้งทางด้านกายภาพและคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ โดยลักษณะทางกายภาพพบว่า เมล็ดที่ถูกฝนมีการดูดน้ำอย่างรวดเร็วและจะคายน้ำออกสู่บรรยากาศเมื่ออากาศแห้ง ทำให้เมล็ดเหี่ยวแห้งและมีรอยแตกร้าวที่เยื่อหุ้มเมล็ด ส่งผลต่อคุณภาพของเมล็ดพันธุ์คือ มีความงอกลดลง (Hor. 1977) ซึ่งสอดคล้องกับ ธนินาฏ สมบัติศิริ และคณะ (2521) ซึ่งรายงานไว้ว่า ความงอกมาตรฐานและความงอกในไร่ของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลือง สจ.4 ที่เปียกฝนในขณะที่เก็บเกี่ยวต่ำกว่าเมล็ดพันธุ์ที่ไม่เปียกฝน โดยเฉพาะความงอกในไร่จะแตกต่างกันมาก เมล็ดพันธุ์ที่เปียกฝนจะมีความงอกมาตรฐานและความงอกในไร่เป็น 29.5 และ 49.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนเมล็ดพันธุ์ที่ไม่เปียกฝนจะมีความงอก 93 และ 64 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลของการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่มีต่อการเก็บรักษานั้น รัชณี คงคำ และคณะ (2521) พบว่า อัตราการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เปียกฝนจะลดลงเร็วกว่าเมล็ดพันธุ์ที่ไม่เปียกฝน

Bhatia *et al.* (1993) ได้รายงาน ถึงผลกระทบของการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ (field weathering) ที่มีต่อถั่วเหลืองพันธุ์พื้นเมืองว่าเกิดจากการมีฝนตกลงมามากในระหว่างการสุกแก่ก่อนการเก็บเกี่ยว ทำให้เมล็ดพันธุ์สูญเสียความมีชีวิตและเกิดการเข้าทำลายของเชื้อราชนิดต่างๆ (Mallick and Nadi. 1979) สภาพดังกล่าวทำให้เมล็ดพันธุ์เกิดการเสื่อมทางสรีรวิทยาเช่น การลดลงของกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารโมเลกุลขนาดใหญ่ และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เนื้อเยื่อใหม่รวมถึงการมีอัตราการหายใจลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า มีการรั่วไหลของสารออกจากภายในเซลล์ (leachate) ของเมล็ดพันธุ์ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเสื่อมของผนังเมมเบรน การเปลี่ยนแปลงอีกประการหนึ่งคือการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลมาจากการเข้าทำลายของเชื้อรา (Delouche and Baskins. 1973)

Ching and Schoolcraft (1968) พบว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่เก็บเกี่ยวล่าช้าจะให้จำนวนต้นที่งอกในไร่ (field emergence) ต่ำ เมื่อนำเมล็ดพันธุ์ที่มีความงอกต่ำไปตรวจสอบทางเคมีพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ protease phytase และ phosphatase ลดลง เมล็ดพันธุ์จะสูญเสีย membrane permeability ทำให้แป้ง น้ำตาล และกรดอะมิโนที่อยู่ในเมล็ดรั่วไหลออกมามาก แสดงว่าเมล็ดพันธุ์ที่มีการเก็บเกี่ยวล่าช้ามีการเสื่อมคุณภาพมากกว่าเมล็ดพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวในระยะเวลาที่เหมาะสม (Buxton *et al.* 1978) นอกจากนี้ยังพบว่าเมล็ดพันธุ์ที่เก็บเกี่ยวล่าช้ามีเมล็ดที่เหี่ยวแห้งมากและเมื่อนำเมล็ดไปตรวจสอบความงอกพบว่าต้นกล้ามีส่วนยอดและรากไม่สมบูรณ์ (Mondraon and Potts. 1974) Kueneman (1982) กล่าวว่า การผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองในช่วงที่มีอากาศร้อนและความชื้นของอากาศสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระหว่างการสุกแก่ของเมล็ดมีผลทำให้คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ลดลง โดย สอดคล้องกับ Green *et al.* (1965) ซึ่งรายงานไว้ว่า เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่สุกแก่เมื่ออากาศร้อนและแห้งสิ้นสุดลงจะมีความงอกและความแข็งแรงสูงกว่าเมล็ดพันธุ์ที่สุกแก่ในระหว่างอากาศร้อนและแห้ง Tekrony *et al.* (1980) สรุปว่า คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองขึ้นอยู่กับปัจจัยของ

สิ่งแวดล้อมในระหว่างการพัฒนา ระหว่างการสุกแก่และในระหว่างที่เมล็ดสุกแก่แล้วแต่ยังไม่ได้เก็บเกี่ยว ดังนั้นฤดูปลูกจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ การเลือกฤดูปลูกที่สภาพอากาศมีความรุนแรงน้อยหรือปลูกั่วเหลืองให้ล่าช้าออกไปหรือใช้พันธุ์ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพในสภาพไร่ (Kueneman, 1982) อาจจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถจะประสบผลสำเร็จในการผลิตเมล็ดพันธุ์ั่วเหลืองของประเทศในเขตร้อนได้

2.5 เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Marker)

ปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุลเป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาที่เกี่ยวกับความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากให้ความละเอียดในการจำแนกมากกว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยเป็นการศึกษาลึกลงไปในระดับโมเลกุลและ DNA ซึ่งเป็นตัวการในการควบคุมลักษณะต่างๆ ที่แท้จริง เครื่องหมาย (marker) ที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์หรือความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปจะเป็นลักษณะหรือ DNA ที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงหรือมีพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) สูง มีรูปแบบการถ่ายทอดสู่รุ่นต่อไป และสามารถตรวจสอบหรือติดตามได้ง่าย (อมรา คัมภีรานนท์, 2542) โดยสามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆ ดังนี้

2.5.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological Marker)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถศึกษาได้โดยง่ายเป็นที่สังเกตเห็นได้ชัดและถ่ายทอดทางพันธุกรรมตามหลักเมนเดล เช่นการจำแนกความแตกต่างจากลักษณะภายนอกที่ปรากฏเช่น ลักษณะดอก สีของกลีบดอก และสีของเปลือกหุ้มเมล็ด เป็นต้น ลักษณะเหล่านี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด (species) ซึ่งเป็นการสะท้อนให้ทราบถึงองค์ประกอบทางจีโนไทป์ (genotype) ที่ควบคุมลักษณะนั้น อย่างไรก็ตามลักษณะสัณฐานวิทยาบางอย่างก็ไม่ได้มีสาเหตุมาจากพันธุกรรมเพียงอย่างเดียวแต่อาจมีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อม จึงยากที่จะใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นเครื่องชี้แนะความแตกต่างทางพันธุกรรมในประชากรธรรมชาติ ประกอบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สะท้อนความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในประชากรเป็นเพียงส่วนหนึ่งของจีโนม (genome) ในพืชแต่ละชนิดเท่านั้น (วิสุทธิ ไข่ม้วน, 2536) ลักษณะทางสัณฐานวิทยานี้ได้มีการใช้ประเมินลักษณะทางพันธุกรรมกันอย่างกว้างขวางในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเช่น แผลงวันผลไม้ ข้าวโพด และมะเขือเทศ (Powell, 1992 ; Stuber, 1992 ; Tanksley *et al.* 1989) อย่างไรก็ตามเครื่องหมายชนิดนี้ให้ข้อมูลไม่มากนักและมีความผิดพลาดเกิดขึ้นเนื่องจากฟีโนไทป์ (phenotype) ที่เหมือนกันอาจเกิดจากจีโนไทป์ที่แตกต่างกันหรืออาจมีอิทธิพลจากปฏิกิริยาร่วมของยีนก็ได้ ปัจจุบันนักวิจัยจึงนิยมใช้เครื่องหมายอื่นๆ มาร่วมในการประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิต

2.5.2 เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular Marker)

เป็นการศึกษาในระดับโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตซึ่งแบ่งเป็น 2 ระดับ คือ เครื่องหมายโปรตีน และเครื่องหมาย DNA

2.5.2.1 เครื่องหมายโปรตีน (Protein Marker) เป็นการวิเคราะห์ผลผลิตของโปรตีนเช่น allozyme และ isozyme โดยศึกษาถึงผลผลิตของยีน รูปแบบและหน้าที่ของเอนไซม์ต่างๆ ตรวจสอบได้หลายตำแหน่งและสามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ แต่ไม่สามารถตรวจสอบครอบคลุมทั่วทั้งจีโนม เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้เฉพาะส่วนที่มีการแสดงออกเท่านั้น เครื่องหมายโปรตีนสามารถนำไปใช้ในการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของพืช (Burdon and Robert. 1995) การจัดหมวดหมู่พืช การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์พืช และงานปรับปรุงพันธุ์พืช (เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. 2531) ข้อดีของเครื่องหมายโปรตีนคือเป็นวิธีที่ติดตามได้ง่าย รวดเร็ว และเสียค่าใช้จ่ายต่ำ แต่ข้อจำกัดของวิธีนี้คือจำนวนยีนที่ตรวจสอบได้มีไม่มากและต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษาจึงต้องเลือกเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ การเปรียบเทียบตัวอย่างต้องใช้เนื้อเยื่อชนิดเดียวกันและเจริญอยู่ในระยะเดียวกันเท่านั้น (ชวนพิศ อรุณรังสิกุล. 2538)

2.5.2.2 เครื่องหมาย DNA (DNA Marker) เป็นตำแหน่ง DNA บนโครโมโซมในนิวเคลียสหรือนอกนิวเคลียสในคลอโรพลาสต์หรือไมโทคอนเดรียที่อาจเกิดความแปรปรวนภายในโมเลกุลของ DNA และมีความหลากหลายที่สามารถตรวจสอบได้โดยแบ่งการตรวจสอบออกเป็น 2 วิธีคือ 1) วิธีไฮบริไดเซชัน (hybridization) เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของตำแหน่งจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) โดยอาศัยการจับอย่างจำเพาะระหว่างโพรบ (probe) ซึ่งอาจเป็นยีนหรือชิ้นส่วนของ DNA ที่สนใจกับ DNA เป้าหมายในจีโนมได้แก่เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RFLP (restriction fragment length polymorphism) เป็นต้น 2) วิธี PCR (polymerase chain reaction) โดยเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณใดๆ ที่สนใจ โดยอาจเพิ่มปริมาณ DNA ที่ตำแหน่งเดียวหรือเพิ่มปริมาณ DNA พร้อมกันหลายตำแหน่งก็ได้ซึ่งเป็นวิธีที่ได้สะดวกและรวดเร็วเช่น RAPD (random amplified polymorphic DNA) , SSR (simple sequence repeat) และ AFLP (amplified fragment length polymorphism) เป็นต้น (สุรินทร์ ปิยะโชคนากุล. 2543) ซึ่งเครื่องหมาย DNA แต่ละชนิดมีหลักการที่แตกต่างกันดังนี้

1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายในขนาดของ DNA ที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยใช้เทคนิค Southern hybridization เอนไซม์ตัดจำเพาะจะตัด DNA ที่ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ถ้า DNA ที่นำมาศึกษามาจากแหล่งต่างๆ กันและมี

ลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไปหรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่ง เมื่อนำมาตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันจะได้ขนาดและจำนวนชิ้น DNA ที่แตกต่างจากเดิม (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2543) เทคนิค RFLP เป็นวิธีการศึกษาที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบหาความแตกต่างที่ผันแปรทางพันธุกรรมในประชากรธรรมชาติและสามารถตรวจสอบความแตกต่างแปรผันของชิ้นส่วน DNA ที่อยู่ในนิวเคลียส (nuclear DNA) และที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) (วิสุทธิ ไบไม้. 2536) แต่การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ต้องการ DNA ในปริมาณที่มากและมีคุณภาพดีอีก ทั้งยังใช้เวลาตรวจสอบนาน วิธีการยุ่งยากและค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงนำเทคนิค PCR ที่มีประสิทธิภาพมากกว่ามาใช้ประโยชน์

2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นโดย K. Mullis ในปี ค.ศ. 1985 เป็นปฏิกิริยาที่เพิ่มปริมาณของ DNA ในส่วนที่ต้องการให้ได้ปริมาณที่เพิ่มขึ้นหลายเท่าตัวในเวลาอันสั้น องค์ประกอบสำคัญของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 1) DNA ต้นแบบซึ่งไม่จำเป็นต้องเป็น DNA ที่บริสุทธิ์มากนักแต่ต้องมี DNA ในส่วนที่ต้องการรวมอยู่ด้วย 2) ไพรมเมอร์เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับ DNA ต้นแบบในบริเวณที่ต้องการบน DNA ทั้ง 2 สาย 3) เอนไซม์ DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานในอุณหภูมิสูงๆ ได้เช่น เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* 4) คีอ็อกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP, dGTP, dTTP, dCTP เพื่อสังเคราะห์ DNA ต่อจากไพรมเมอร์ (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2545) นอกจากนี้แมกนีเซียมคลอไรด์ก็เป็นสิ่งสำคัญในปฏิกิริยา PCR เนื่องจากพบว่าการจำลองตัวเองของสิ่งมีชีวิตจะมีแมกนีเซียมเป็นองค์ประกอบด้วยโดยอาจเกี่ยวข้องกับการปรับสภาวะต่างๆ

ในปฏิกิริยา PCR แต่ละระบบประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ 1) การทำให้ DNA ต้นแบบเสียสภาพแยกออกเป็นสายเดี่ยว (denaturation) โดยใช้อุณหภูมิสูงกว่า 90 °C 2) การลดอุณหภูมิลงให้พอเหมาะเพื่อให้ DNA สายเดี่ยวจับกับไพรมเมอร์ (annealing) โดยทั่วไปใช้ อุณหภูมิ 40-60 °C ทั้งนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมจะพิจารณาจากลำดับเบสและจำนวนเบสของไพรมเมอร์ 3) ขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA ต่อจากไพรมเมอร์ (extension) โดยปรับอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase หลังจากปฏิกิริยา PCR DNA เป้าหมายจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น 2^n เท่า โดย n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา เทคนิคนี้สามารถเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายจากปริมาณเพียงเล็กน้อยที่ปะปนกับ DNA อื่นๆ ให้มีปริมาณเป็นล้านเท่าในเวลาอันรวดเร็วและสามารถตรวจสอบได้ทันทีโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสและย้อมด้วย ethidium bromide (สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2540)

3. SSR (Simple Sequence Repeat หรือ Microsatellite)

เป็นส่วนของ DNA ที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 2-5 ตัวซ้ำๆ ที่กระจายทั่วไปบนจีโนมของยูคาริโอตพบประมาณ 10^4 - 10^5 ตำแหน่ง มีขนาดแตกต่างกันและมีความหลากหลายสูงมากตัวอย่างเช่น DNA ที่มีลำดับเบส ATATATAT เป็นต้น dinucleotide (AT) มี 4 ซ้ำ อาจเรียกลำดับเบสชุดซ้ำๆ กันนี้ว่า microsatellite หรือ SSR หรือ short tandem repeat ตรวจสอบโดยพื้นฐานการทำ PCR ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ 2 ชนิด ที่เข้ากันได้กับตำแหน่งรอบข้างของบริเวณที่มีลำดับเบสซ้ำๆ DNA ตรวจสอบที่ได้ โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสซึ่งจำนวนซ้ำอาจจะต่างกันในแต่ละชนิด SSR เป็น codominant marker (McCouch *et al.* 1997) สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต (homozygote) และ เฮเทอโรไซโกต (heterozygote) ได้ดังนั้นจึงเป็นเครื่องหมาย DNA ที่ดีสำหรับวิเคราะห์จีโนมแต่ข้อจำกัดของ SSR คือ ต้องมีการโคลนและการหาลำดับเบสเพื่อพัฒนาไพรเมอร์จำเพาะตำแหน่งก่อนซึ่งทำได้ยุ่งยาก

4. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD เป็นเทคนิคที่ดัดแปลงมาจากเทคนิค PCR ทำได้โดยการสุ่มไพรเมอร์ที่เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) สายสั้นๆ เพียงหนึ่งไพรเมอร์มาเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค PCR ไพรเมอร์สายสั้นจะเกาะกับ DNA บนโครโมโซมหลายตำแหน่งและเพิ่มจำนวน DNA แม่แบบที่ซับซ้อน ชิ้นส่วนของ DNA ที่ได้จากการทำ PCR เกิดขึ้นเนื่องจากไพรเมอร์เกาะกับ DNA แม่แบบในทิศทางตรงกันข้ามและห่างกันในระยะหนึ่งที่ทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนได้ โดยอาศัยเทคนิค PCR Williams *et al.* (1990) สรุปส่วนประกอบสำคัญในปฏิกิริยา PCR คือการใช้ไพรเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ 8-10 นิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์ที่ใช้ควรจะมีเบส G และ C อย่างน้อย 40 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.1 และ 0.2 mM ความเข้มข้นที่ต่างจากนี้จะไม่เหมาะสมกับปฏิกิริยามีผลทำให้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณของ DNA ได้ ความเข้มข้นของแม่พิมพ์ DNA ก็มีความสำคัญมากซึ่ง DNA ควรจะมีปริมาณระหว่าง 5-500 ng จะสามารถเพิ่มปริมาณได้ดีและความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 100 ng ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์มีผลในปฏิกิริยาช่วยป้องกันความผิดพลาดในการจับกันของไพรเมอร์และ DNA แม่แบบ dNTPs (deoxyribonucleotide triphosphates) ทำหน้าที่เป็นซับสเตรท (substrate) ในปฏิกิริยาและความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 100 mM ซึ่งจะสัมพันธ์กับการใช้แมกนีเซียมคลอไรด์ด้วย (Erich, 1989) ถ้าใช้ dNTPs ความเข้มข้นสูงก็ต้องใช้แมกนีเซียมคลอไรด์สูงด้วย การศึกษาโดยเทคนิค RAPD นิยมใช้ *Taq* polymerase ที่แยกได้จาก *Thermus aquaticus* (Williams *et al.* 1993) ที่ทนทานความร้อนสูงได้ส่วนใหญ่จะใช้ *Taq* polymerase ปริมาณ 1.5-2.0 ยูนิต ต่อ 25 μ l

โปรแกรมที่ใช้สำหรับทำ PCR ด้วยเทคนิค RAPD มีมากมายหลายแบบ ซึ่งจะต่างกันที่อุณหภูมิแล้วแต่สิ่งที่จะนำมาศึกษา (Lowe *et al.* 1996 ; Phongdara *et al.* 1999)

เช่นการศึกษาในถั่วเหลืองใช้รอบการทำ PCR 45 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วย 94 °C นาน 1 นาที 36 °C นาน 1 นาที 72 °C นาน 2 นาที และอีก 1 รอบที่ 72 °C นาน 6 นาที จากนั้นเก็บไว้ที่ 4°C จนถึงการวิเคราะห์ โดยการนำมาแยกขนาดของชิ้น DNA ที่สังเคราะห์ได้ใน agarose gel แล้วย้อมด้วย ethidium bromide (Caetano-Anolles *et al.* 1991) ความแตกต่างของแถบ DNA หรือพอลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่างเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ไพรเมอร์จะเข้าไปเกาะเช่น เกิดการแทรกชิ้นส่วน DNA ในระหว่าง 2 ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะทำให้ทั้งสองโมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณ DNA ได้ การหายไปหนึ่งตำแหน่งหรือสองตำแหน่งของชิ้น DNA ที่เป็นที่ยึดเกาะของไพรเมอร์ การแทนที่หรือการเปลี่ยนแปลงเบสบริเวณที่เป็นที่ยึดเกาะของไพรเมอร์ทำให้ไพรเมอร์เกาะกับ DNA เป้าหมายไม่ได้จึงไม่เกิดแถบ DNA (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545) ชิ้น DNA ขนาดต่างๆ ที่สามารถตรวจสอบได้แสดงออกถึง 1 ตำแหน่ง (locus) ในจีโนมและแต่ละตำแหน่งมีเพียง 2 อัลลีล (allele) คือมีแถบ DNA (present allele) และไม่มีแถบ DNA (absent allele) (Waugh and Powell. 1992)

เทคนิค RAPD นี้มีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางผลที่ได้มีความน่าเชื่อถือและสามารถหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่นำมาวิเคราะห์ได้ RAPD เป็นวิธีการหนึ่งในการจำแนกจีโนไทป์ วิเคราะห์พันธุ์ประวัติ วิเคราะห์ประชากร ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและทำแผนที่ยีนโดยการตรวจสอบได้ง่ายและรวดเร็ว (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545 ; Williams *et al.* 1990) แต่มีข้อเสียคือ การทดลองซ้ำที่บางครั้งได้ผลต่างจากเดิมปัญหานี้เกิดจากตัวแปรพื้นฐานต่างๆ เช่น คุณภาพของ DNA ที่ใช้เป็นต้นแบบโดย DNA ที่บริสุทธิ์จะให้ผลที่ดีกว่า (Weeden *et al.* 1992) เป็นต้น จึงต้องควบคุมสภาพการทดลองให้คงที่ นอกจากนี้แถบ DNA ที่เกิดจาก RAPD ยังแสดงการข่ม (dominant) ต่อการไม่เกิดแถบ DNA ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง homozygous dominant และ heterozygous dominant ได้ (Waugh and Powell. 1992)

5. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

เทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่ถูกพัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ. 1995 (Vos *et al.* 1995) ซึ่งใช้สำหรับการสร้างลายพิมพ์ DNA ที่ช่วยในการแสดงถึงความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิต จึงถูกใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกหรือหาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต โดยการตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ที่มีความถี่ในการตัดต่างกันทำให้ได้ขนาดชิ้น DNA ที่มีความจำเพาะเจาะจง จากนั้นจะต่อกับ DNA สายสั้นๆ ที่เรียกว่า adapter เข้าที่ปลายทั้งสองด้านของชิ้น DNA ดังกล่าว แล้วเพิ่มปริมาณชิ้น DNA เหล่านี้ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีเบสคู่สมกับ adapter และเพิ่มเบสเข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์อีก 1-3 เบส ชิ้นส่วน DNA ที่เพิ่มปริมาณได้จะมีขนาดต่างกันตามขนาดที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3' ของ ไพรเมอร์ มีผลต่อ

ความซับซ้อนของชิ้น DNA ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยา PCR เพราะเบสที่เข้าไปมีวัตถุประสงค์เพื่อทำให้เกิดความจำเพาะเจาะจงต่อชิ้น DNA ที่ได้รับการคัดเลือก จำนวนชิ้น DNA ที่สามารถเพิ่มปริมาณได้อยู่ในช่วงระหว่าง 50-150 ชิ้น ที่มีขนาดของชิ้นแตกต่างกัน (Glenn, 1997) จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel บันทึกผลโดยดูจากการเกิดจำนวนแถบ DNA ที่มีหลายรูปแบบซึ่งลายพิมพ์ DNA ที่เกิดจากความแตกต่างนี้เป็นผลมาจากการเกิดมิวเตชันที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ทั้งสองชนิด (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) ขั้นตอนในการทำ AFLP สามารถแบ่งเป็นขั้นตอนหลักๆ ได้ 3 ขั้นตอนดังนี้

5.1 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อปลายทั้งสองด้วย adapter ในขั้นตอนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะนี้จะใช้เอนไซม์สองชนิดที่มีตำแหน่งจดจำต่างกันมาตัดสาย DNA เอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ *EcoRI* ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส และ *MseI* มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส นอกจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่กล่าวมาแล้วยังอาจใช้เอนไซม์ชนิดอื่นได้อีกด้วยเช่น *TaqI* ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส เท่ากับ *MseI* (Vos *et al.* 1995) และ *PstI* (Massawe, 2002) เมื่อตัดออกมาแล้วจะได้ชิ้น DNA ที่มีขนาดเล็ก เหมาะสำหรับการทำปฏิกิริยาสังเคราะห์ DNA โดยชิ้น DNA ที่ได้นั้นควรมีขนาดไม่เกิน 1 กิโลเบส เพื่อจะได้สามารถเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจน เมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing polyacrylamide gel จากนั้นจึงนำชิ้น DNA ที่ได้มาเชื่อมต่อดัวย adapter ที่ปลายทั้งสองด้านเพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเข้ามาจับได้ในปฏิกิริยาสังเคราะห์ DNA

5.2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ DNA ในขั้นตอนการสังเคราะห์ DNA นี้จะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนย่อย คือ pre-selective amplification และ selective amplification

1. pre-selective amplification เป็นการเพิ่ม DNA ต้นแบบให้มีปริมาณมากขึ้นและช่วยให้เกิดการคัดเลือกชิ้นส่วน DNA ให้ถูกต้อง ขั้นตอน pre-selective amplification นิยมใช้เมื่อต้องการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีจีโนมขนาดใหญ่และต้องใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' มากกว่า 2 เบส ในขั้นตอน selective amplification ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ส่วนมากเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 เบส เข้าที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ ทำให้มีผลต่อจำนวนแถบ DNA ที่ตรวจสอบ โดยพบว่าการใช้ไพรเมอร์ที่ไม่มีการเพิ่มเบสจะได้จำนวนแถบ DNA มากกว่าการใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 เบส (Mackill *et al.* 1996)

2. selective amplification เป็นขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ DNA ให้มากขึ้นพร้อมๆ กับการคัดเลือกชนิดของนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ DNA จากชิ้นแรกเป็นแม่แบบแล้วใช้ไพรเมอร์ที่มีนิวคลีโอไทด์เพิ่มที่ปลาย 3' เป็นตัวคัดเลือก ซึ่งอาจไม่ใช้ก็ได้ในกรณีที่จีโนมขนาดเล็กเช่น พลาสมิด และคอสมิด เป็นต้น แต่ถ้ามีจีโนมขนาดใหญ่ขึ้นมาเล็กน้อยก็อาจใช้เบสคัดเลือกเพียงแค่ 2 เบสก็ได้ (Caetano-Anolles *et al.* 1997) ซึ่งในขั้นตอนนี้มีความสำคัญมาก เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่ทำให้เกิดลายพิมพ์ DNA และเป็นตัวกำหนดแถบ DNA ที่เกิดขึ้นทั้งหมดซึ่งแถบ DNA ที่พบหลังจากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วควรมีประมาณ 50-100 แถบ และในขั้นตอนนี้บางครั้งยัง

อาจใช้สารที่ไม่ใช่กัมมันตรังสีบริเวณไพรเมอร์เพื่ออำนวยความสะดวกการตรวจสอบโดยใช้คอมพิวเตอร์ (Vrielling *et al.* 1997)

5.3 การแยกชิ้นส่วน DNA ใน denaturing polyacrylamide gel ผลผลิตที่ได้จากการสังเคราะห์ DNA ในขั้นตอนที่ 2 สามารถนำมาแยกให้เห็นความแตกต่างกันได้ ใน denaturing polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้นประมาณ 5-6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลผลิตที่ได้จะออกมาในรูปแบบของ DNA (DNA patterns) ที่มีความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างหรือพันธุ์

ข้อดีของเทคนิค AFLP คือ สามารถทำซ้ำปฏิกิริยาแล้วให้ผลเหมือนเดิม และการวิเคราะห์ AFLP ไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสเป้าหมายจึงช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ได้มาก เนื่องจากการหาลำดับเบสต้องใช้ต้นทุนสูงมาก การหาเครื่องหมาย DNA โดยเทคนิค AFLP ได้เครื่องหมาย DNA ที่แสดงความแตกต่างโดยเฉลี่ยสูงกว่าเทคนิคอื่นๆ จึงเหมาะต่อการทำ diversity หรือการทำ DNA fingerprint (Vos *et al.* 1995)

2.6 การประยุกต์ใช้เครื่องหมาย RAPD ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

Chowdhury *et al.* (2000) ใช้เทคนิค RAPD มาจำแนกความแตกต่างของถั่วเหลืองฝักสดจำนวน 24 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 50 ชนิด และสามารถเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมได้ 16 ชนิด สำหรับสร้าง DNA ที่มีความหลากหลายทั้งหมด 126 แถบ ทำให้จัดจำแนกพันธุ์ออกเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งความสัมพันธ์ที่ได้นี้สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกพ่อและแม่เพื่อใช้ในการผลิตลูกผสมต่อไปได้ ในทำนองเดียวกับ Yamamoto *et al.* (1994) ใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) และกะหล่ำ (*Lactuca sativa* L.) จากการใช้ไพรเมอร์ 21 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ 13 ชนิดให้แถบ DNA ที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึมในข้าว 50 เปอร์เซ็นต์ และในกะหล่ำ 47 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างแผนภูมิทางพันธุกรรมและลายพิมพ์ DNA ได้ ซึ่งชิ้นส่วน DNA ที่เป็นผลผลิตจากเทคนิค RAPD บางส่วนจะจำเพาะต่อบางพันธุ์สามารถใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในการคัดเลือกพันธุ์ต่อไป

Lin *et al.* (1996) ใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกพันธุ์ถั่วเหลืองพบว่า 35 เปอร์เซ็นต์ ของแถบ DNA ที่ได้จากไพรเมอร์ที่ใช้ 14 ชนิด ให้แถบ DNA ที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึม 1-2 แถบต่อไพรเมอร์ ที่มีความแตกต่างกันในระหว่างพันธุ์ถั่วเหลืองที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างของถั่วเหลืองแต่ละพันธุ์ได้เช่นเดียวกับ Thseng *et al.* (1999) ใช้ลักษณะ DNA polymorphism ที่ได้จากเทคนิค RAPD แยกความแตกต่างระหว่าง *Glycine formosana* ในไต้หวัน และ *Glycine soja* ในจีน เกาหลี และญี่ปุ่น โดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ ทั้งหมด 25 ชนิด พบว่า ไพรเมอร์ 21 ชนิด สามารถเกิดแถบ DNA ทั้งหมด 132 แถบ และมี ไพรเมอร์ 14 ชนิด ซึ่งให้แถบ DNA 84 แถบ ที่แสดงให้เห็นว่า *G. formosana* มีลักษณะที่

แตกต่างกับ *G.soja* ในจีนและเกาหลี และ *G.formosana* จัดอยู่ในกลุ่มที่คล้ายคลึงกับสายพันธุ์ในประเทศไทย

Brown-Guedira *et al.* (2000) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองซึ่งเป็นพันธุ์บรรพบุรุษในอเมริกาเหนือจำนวน 14 พันธุ์ และสายพันธุ์ทดสอบจำนวน 87 สายพันธุ์ โดยใช้ RAPD primer 109 ชนิด พบค่า genetic distance อยู่ระหว่าง 0.08-0.76 และกลุ่มของถั่วเหลืองพันธุ์ทดสอบมาจากกลุ่มหลักๆ ของพันธุ์บรรพบุรุษซึ่งข้อมูลที่ได้มีความสัมพันธ์กับประวัติการผสมพันธุ์ Kim (1997) ได้จำแนกความสัมพันธ์ของถั่วเหลือง 56 พันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค RAPD โดยการจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจัดจำแนกพันธุ์ ถั่วเหลืองออกเป็น 7 กลุ่ม ซึ่งสายพันธุ์จากประเทศเกาหลีสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 1 กลุ่มที่แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ แต่เมื่อใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกพบว่าจาก RAPD primer 81 ชนิด สามารถจัดกลุ่มทางลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกันได้ 6 กลุ่ม ซึ่งพบว่าการจัดกลุ่มโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค RAPD มีความแตกต่างกันเล็กน้อย

Skroch *et al.* (1992) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในถั่ว (common bean) 285 สายพันธุ์จากแหล่งต่างๆ ที่มีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัดด้วย RAPD primer 88 ชนิด พบว่าสามารถจัดแบ่งได้เป็น 2 พวก ตามศูนย์กลางความหลากหลาย (center of diversity) คือ Andean และ Mesoamerican ยังมีนักวิจัยอีกหลายกลุ่มรายงานถึงการใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกพันธุ์ถั่วเหลือง (Thompson and Nelson, 1998 ; Baranek *et al.* 2002 ; Chowdhury *et al.* 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานในพืชอื่นอีกหลายชนิดเช่น การจำแนกข้าวสาลีสองกลุ่มที่เกิดจากสายพันธุ์เดียวกันโดยกลุ่มแรกเป็นข้าวที่ไม่เกิดการกลายพันธุ์ ส่วนกลุ่มที่สองเป็นกลุ่มที่เกิดการกลายพันธุ์เนื่องจากการเคลื่อนย้ายตำแหน่งของยีน (translocation) พบว่า การใช้เทคนิค RAPD ใช้จำแนกข้าวทั้งสองกลุ่มได้เป็นอย่างดี (Songtao *et al.* 1993)

ในขณะที่ Fritz *et al.* (1995) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลดูการกระจายตัวและ recombination ของชิ้นส่วนโครโมโซมในข้าวสาลี (common wheat, *Triticum aestivum* L., $2n=42$, จีโนม A B D, allohexaploid กับ *T.tuashii*, $2n=14$, จีโนม D) โดยพิจารณาจากโปรตีนชนิดหนึ่งกับ RFLP primer 25 ชนิด และ RAPD primer 8 ชนิด ทำการวิเคราะห์ linkage และระยะทางระหว่างยีนโดยใช้โปรแกรม MAPMAKER และ GMENDEL พบว่า จีโนม D ใน common wheat มีพอลิมอร์ฟิซึมต่ำแต่ระดับพอลิมอร์ฟิซึมระหว่าง *T.tuashii* กับ *T. aestivum* สูงแสดงว่ามีความแตกต่างที่ระดับนิวคลีโอไทด์ในข้าวสาลีที่ต่าง species กัน ส่วน recombination ของจีโนม D ระหว่าง *T.tuashii* กับ *T.aestivum* เกิดขึ้นได้ระดับหนึ่ง

Mastsumoto *et al.* (1996) ใช้เทคนิค RAPD จำแนกพันธุ์กุหลาบโดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด พบว่า พันธุ์ 'Rote Rose' และ 'Roultle' ถูกจำแนกโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเพียงชนิดเดียวในขณะที่พันธุ์ 'Pareo' จำแนกได้โดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด Burgher *et al.* (2002) ศึกษาบลูเบอร์รี่

26 สายพันธุ์ จากภูมิประเทศ 4 แบบ พบความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่ได้จากภูมิประเทศที่มีลักษณะเหมือนกันสรุปได้ว่า RAPD สามารถใช้ประโยชน์ในการจัดจำแนกพันธุ์จากแหล่งต่างๆ ได้ดี

Bogani *et al.* (1994) จำแนกความแตกต่างของมะกอกโอลีฟ 11 พันธุ์ปลูก โดยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ 5 ชนิด ทุกไพรเมอร์สามารถเพิ่มจำนวนได้ในแต่ละพันธุ์และสามารถทำให้เกิดแถบ DNA ได้ตั้งแต่ 1-14 แถบ โดยในไพรเมอร์ที่มีลำดับ GC 70 เปอร์เซ็นต์ เกิดแถบได้ 8-14 แถบ ต่อมา Fabbri *et al.* (1995) ศึกษามะกอกโอลีฟ 17 พันธุ์ ที่มีถิ่นกำเนิดในแถบเมดิเตอร์เรเนียน โดยใช้เทคนิค RAPD ในการวิเคราะห์ พบว่า มีความแตกต่างในมะกอกกลุ่มที่นำมาศึกษาจากการวิเคราะห์ความเหมือนระหว่างพันธุ์และแบ่งกลุ่มมะกอกโอลีฟ พบว่าสามารถแบ่งมะกอกโอลีฟ ออกเป็นสองกลุ่มที่สำคัญคือ กลุ่มที่ 1 เป็นมะกอกโอลีฟที่มีผลขนาดเล็กซึ่งมีความสำคัญต่อการผลิตน้ำมันและอีกกลุ่มเป็นพันธุ์ที่มีผลขนาดใหญ่

Koller *et al.* (1993) ศึกษาการใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกแอปเปิ้ลจำนวน 11 พันธุ์ พบว่า แถบ DNA ที่เกิดขึ้นจะมีรูปร่างที่แตกต่างกันออกไปในพันธุ์แอปเปิ้ลทั้ง 11 พันธุ์ ซึ่งคุณภาพของ DNA ที่สกัดได้มีผลต่อความชัดเจนของแถบ DNA ที่ได้จากการทำ RAPD และสามารถหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อประโยชน์ในการจำแนกพันธุ์แอปเปิ้ลซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว สอดคล้องกับ Marmey *et al.* (1994) ใช้เทคนิค RAPD ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมันสำปะหลังจากละตินอเมริกาและแอฟริกาได้สามารถจัดกลุ่มมันสำปะหลังออกเป็น 3 กลุ่ม โดยมีความแตกต่างภายในชนิดและบางพันธุ์เป็นพันธุ์เดียวกัน

นอกจากนี้เทคนิค RAPD ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการจัดจำแนกพืชพันธุ์ลูกผสมเนื่องจากมีความเหมาะสมในการจำแนกพันธุ์ลูกผสมเพราะเป็นการตรวจสอบโดยดูจากจีโนไทป์หรือระดับของ DNA นั้นเอง ปัจจุบันนี้ได้มีรายงานการวิจัยออกมามากมายเช่น Defilippis *et al.* (1996) ใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกลูกผสมของยาสูบพบว่า ไพรเมอร์ 4 ชนิด ที่ทำให้เกิดแถบ DNA จำนวน 69 แถบ และพบว่า มีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.21-0.82 ในทำนองเดียวกันกับ Chen *et al.* (1998) ใช้เทคนิค RAPD และ inter-simple sequence repeat (ISSR) จำแนกสายพันธุ์ลูกผสมของ antherculture ของ *Linum usitatissimum* L. ซึ่งเทคนิค ISSR นั้นพบว่า ไพรเมอร์ 1 ชนิด ส่วนเทคนิค RAPD พบไพรเมอร์ 3 ชนิด ที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า รูปแบบของแถบ DNA เหมือนกับการจำแนกโดยใช้แคลสสิกอีกด้วย Bommineni *et al.* (1997) จำแนกสายพันธุ์ลูกผสมของ *Trinopyrum junceiforme* พบไพรเมอร์ 6 ชนิด ที่สามารถทำให้เกิดพอลิมอร์ฟิซึมระหว่างสายพันธุ์ ในทำนองเดียวกันกับการทดลองของ Lua *et al.* (2002) ใช้เทคนิค RAPD จำแนกสายพันธุ์ลูกผสมของ *Vitis quinquangularis* และ *V. vinifera* พบไพรเมอร์ 39 ชนิด เกิดแถบ DNA ทั้งหมด 234 แถบ และสามารถแบ่งลูกผสมออกเป็น 3 กลุ่มได้

Zhang *et al.* (1997) ทำแผนที่ยีนแก้ความเป็นหมัน (*Rf-3*) ของ A line ที่มี cytoplasmic male sterility (CMS) แบบ W type ซึ่งนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการผลิตข้าวลูกผสมในประเทศ

จีนจากประชากร F_2 ของพันธุ์ Thenshan 97A กับ NIL (IR24) พบว่า RAPD primer 3 ชนิด คือ OPK 05-800, OPU 10-1100 และ OPW 01-350 อยู่ใกล้ชิดกับยีน *Rf-3* ในขณะที่ Sane *et al.* (1997) ใช้เครื่องหมายเชิงโมเลกุล RAPD ศึกษาถึงความแตกต่างของ CMS ในข้าวลูกผสม A line 2 สายพันธุ์ คือ IR58025A และ IR62829A แต่พบว่า A line ของทั้งสองสายพันธุ์มี CMS เป็นแบบ W type เหมือนกัน

Hartl *et al.* (1995) ศึกษาตำแหน่งของยีนต้านทานโรคราแป้ง (powdery mildew resistance gene) ในข้าวสาลีพันธุ์ที่ใกล้ชิดกัน โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 20 ชนิด และใช้เทคนิค RFLP ร่วมเปรียบเทียบกับ RAPD พบว่าไพรเมอร์ OPH 11 ให้แถบ DNA ขนาด 1.9 กิโลเบสที่ถูกใช้เป็น RFLP probe ในการติดตามยีนต้านทานโรคราแป้ง Schachermayr *et al.* (1994) รายงานการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ต้านทานและพันธุ์ไม่ต้านทานโรคราสนิมในข้าวสาลีโดยใช้เทคนิค RAPD และสามารถหาตำแหน่งยีนต้านทานโรคราสนิมที่ใบ (*Lr9*) ว่ามีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างยาวของโครโมโซม 6B

ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยทั่วไปจะต้องมีประชากรที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดยการผสมระหว่างพ่อและแม่ที่มีลักษณะที่ต้องการ ตามด้วยการคัดเลือกลูกแต่ละต้นที่มีการกระจายตัวในรุ่นต่อๆ มาการใช้ประโยชน์จากเครื่องหมาย DNA โดยการใช้เครื่องหมายเชิงโมเลกุลต่างๆ ในการปรับปรุงพันธุ์พืชทำให้สามารถคัดเลือกลักษณะที่ต้องการได้ตั้งแต่ในช่วงระยะเวลาดันๆ จัดว่าเป็น marker assisted selection เพื่อลดจำนวนประชากรที่ต้องคัดเลือกให้น้อยลง นับเป็นความก้าวหน้าและเพิ่มประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์พืชซึ่งเทคนิค RAPD นับว่าเป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สะดวก รวดเร็วและให้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือได้ระดับหนึ่งที่มีผู้นำมาศึกษาความหลากหลายทางโมเลกุลเพื่อเป็นพื้นฐานทางพันธุกรรมในพืชและสิ่งมีชีวิตต่างๆ

2.7 การประยุกต์ใช้เทคนิค AFLP ในการปรับปรุงพันธุ์พืช

การปรับปรุงพันธุ์พืชด้วยเทคนิค AFLP ได้ถูกนำมาใช้ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic distance analysis) การพิสูจน์พันธุ์ (variety identification) การหาเครื่องหมายที่อยู่ใกล้กับยีน และการใช้เครื่องหมาย AFLP ตรวจสอบลูกผสมต่างๆ การศึกษาจีโนมไทป์โดยใช้เครื่องหมาย DNA เป็นวิธีที่น่าเชื่อถือที่สุด สำหรับการพิสูจน์สายพันธุ์หรือพันธุ์พืช

Maughan *et al.* (1996) ได้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมถั่วเหลืองพันธุ์ปลูก (*G. max*) และพันธุ์ป่า (*G. soja*) ด้วยเทคนิค AFLP จำนวน 23 ตัวอย่าง คือ พันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศ 16 ตัวอย่างพันธุ์ที่ใช้ปลูกในประเทศ 6 ตัวอย่าง และพันธุ์ที่มียีนต้านทาน 4 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ 15 คู่ไพรเมอร์ ได้แถบ DNA 759 แถบ ซึ่งมีขนาด 35-400 คู่เบส พบว่า 19-86 แถบให้ความแตกต่างในระหว่าง 2 species 37 แถบ ให้ความแตกต่างภายในกลุ่มถั่วเหลืองพันธุ์ปลูกและ

147 แถบ ให้ความแตกต่างในถั่วเหลืองพันธุ์ป่า ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าถั่วเหลืองพันธุ์ป่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าถั่วเหลืองพันธุ์ปลูก ส่วนพันธุ์ด้านทานไวรัสทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด

Ude *et al.* (2003) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในถั่วเหลืองโดยเทคนิค AFLP ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาประกอบด้วยสายพันธุ์บรรพบุรุษจากอเมริกาเหนือ 35 พันธุ์ พันธุ์ปลูกในอเมริกาเหนือ 66 พันธุ์ พันธุ์จากประเทศจีน 59 พันธุ์ และจากประเทศญี่ปุ่น 30 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ไพรเมอร์ พบว่าได้แถบ DNA ที่แสดงความแตกต่างจำนวน 90 แถบ จาก 332 แถบ จากการคำนวณค่า PICs (polymorphic information contents) พบว่า มี 53 แถบ ที่มีค่าสูงกว่า 0.3 เมื่อจัดกลุ่มพันธุ์ ถั่วเหลืองพบว่า สามารถจัดกลุ่มได้ตามแหล่งกำเนิด โดยพันธุ์บรรพบุรุษของอเมริกาเหนืออยู่ครอบคลุมทั้ง 3 กลุ่ม ซึ่งพันธุ์ญี่ปุ่นเป็นพันธุ์ที่มาจากพันธุ์บรรพบุรุษและพันธุ์ปลูกในอเมริกาเหนือมากกว่าพันธุ์ที่มาจากประเทศจีน ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้เป็นประโยชน์ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ถั่วเหลืองในอเมริกาเหนือ

ในทำนองเดียวกัน Massawe *et al.* (2002) รายงานการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน bambara groundnut (*Vigna subterranean* (L.) Verdc) ซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่วที่นิยมปลูกในแอฟริกาจำนวน 16 พันธุ์ โดยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 7 คู่ไพรเมอร์ ได้ 504 แถบ อยู่ในช่วง 50-400 คู่เบส โดยเฉลี่ย 72 แถบ ต่อคู่ไพรเมอร์ และพบแถบ DNA ที่แสดงความแตกต่าง (polymorphic markers) เฉลี่ย 84 เบอร์เซ็นต์ การจัดกลุ่มโดย UPGMA (unweighted pair group method with arithonetic average) แบ่งพืชตระกูลถั่วนี้ได้ออกเป็น 3 กลุ่ม สอดคล้องกับแหล่งกำเนิดพันธุ์ Hongtrakul *et al.* (1997) สร้างลายพิมพ์ DNA ของดอกทานตะวันเพื่อที่จะหาการกระจายตัว พบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ สามารถทำให้เกิดแถบ DNA ได้มากถึง 359 แถบ หรือประมาณ 50 แถบ DNA ต่อคู่ไพรเมอร์ ซึ่งเมื่อนำมาคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) พบว่า อยู่ในช่วง 0.70-0.96 และมีค่าพอลิมอร์ฟิซึม อยู่ระหว่าง 7-24 เบอร์เซ็นต์ รวมทั้งสามารถจัดกลุ่มดอกทานตะวันที่ศึกษานี้ออกเป็น 2 กลุ่ม สอดคล้องกับการศึกษาของ Federici *et al.* (2001) นำเทคนิค AFLP มาใช้ศึกษาการกระจายตัวทางพันธุกรรมของข้าวป่าที่มีลักษณะเหมือนกับข้าวปลูก โดยใช้ข้าวทั้งหมด 32 ชนิด แบ่งเป็นข้าวป่า 26 ชนิด ข้าวปลูก 6 ชนิด พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มประชากรได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของข้าวป่าทั้งหมด ส่วนในกลุ่มที่ 3 เป็นการผสมกันระหว่างข้าวปลูกและข้าวป่าซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกัน

Dehaan *et al.* (2003) ศึกษาการกระจายตัวทางพันธุกรรมของ Bundleflower ซึ่งเป็นพืชที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้จำนวน 50 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ไพรเมอร์ พบว่า สามารถเกิดแถบ DNA ได้ทั้งหมด 222 แถบ เป็นแถบที่แสดงพอลิมอร์ฟิซึมจำนวน 159 แถบ และเมื่อจัดกลุ่มโดยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพืชที่อยู่ในแถบอเมริกาเหนือและกลาง กลุ่มที่ 2 เป็นพืชที่อยู่ในแถบอเมริกาใต้ซึ่งสามารถเห็นความแตกต่างได้

อย่างชัดเจน เมื่อมีการเปรียบเทียบการใช้เครื่องหมายเชิงโมเลกุลชนิดต่างๆ เช่น RFLP, RAPD, AFLP และ SSR เป็นต้น โดยนักวิจัยหลายคณะในพืชต่างๆ พบว่า AFLP เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด

Powell *et al.* (1996) วิเคราะห์แหล่งพันธุกรรมของถั่วเหลืองโดยเปรียบเทียบเทคนิค RFLP, RAPD, AFLP และ SSR โดยวัดจากความสามารถของเครื่องหมายและจากจำนวน loci ที่วิเคราะห์ได้ในการทดลองครั้งหนึ่งๆ (multiplex ratio) พบว่า เทคนิค SSR มี expected heterozygosity สูงที่สุด ในขณะที่ AFLP มี multiplex ratio สูงสุด ส่วนการประเมินความสัมพันธ์เพื่อการคาดคะเนความเหมือนกันทางพันธุกรรมนั้น ถ้าหากเกี่ยวข้องกับพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่า RFLP, AFLP และ SSR จะแสดงความสัมพันธ์ได้สูง ถ้าเปรียบเทียบเฉพาะ *G. max* ด้วยกันเองเท่านั้น RAPD และ AFLP จะให้ความสัมพันธ์ได้มากกว่าเครื่องหมายอื่นๆ เช่นเดียวกับการทดลองของ Lin *et al.* (1996) เปรียบเทียบการทำแผนที่ DNA ของถั่วเหลืองโดยเทคนิค RFLP, RAPD, AFLP และ SSR พบว่า เทคนิค AFLP เป็นเทคนิคที่เหมาะสมที่สุดในการทำแผนที่ DNA เนื่องจากให้เครื่องหมายจำนวนมากและให้พอลิมอร์ฟิซึมมากกว่าเทคนิคอื่นๆ

Maheswaran *et al.* (1997) ศึกษาการกระจายและการถ่ายทอดของเครื่องหมาย AFLP กับประชากร double haploid ในข้าวที่ได้จากการผสมระหว่างข้าว Indica พันธุ์ IR64 กับ ข้าว Japonica พันธุ์ Azucena โดยใช้ไพรเมอร์ 20 คู่ไพรเมอร์ พบว่าเครื่องหมาย AFLP มีการกระจายตัวอยู่บนโครโมโซมทั้ง 12 แท่ง การกระจายตัวของเครื่องหมาย AFLP เป็นไปตามกฎของเมนเดล (1:1) เมื่อเปรียบเทียบเครื่องหมาย AFLP กับ RFLP ที่ได้จากประชากรเดียวกัน ในขณะที่ Huang *et al.* (1994) พบว่าเครื่องหมาย AFLP ให้พอลิมอร์ฟิซึมสูงกว่าและเสนอว่าเครื่องหมาย AFLP มีประสิทธิภาพมากกว่าเครื่องหมาย RFLP ในการวิเคราะห์ linkage ในข้าวโดยมีอัตราการเกิดสูงกว่าบริเวณที่มีเครื่องหมาย RFLP จะมีเครื่องหมาย AFLP แต่บริเวณที่มีเครื่องหมาย AFLP อาจจะไม่มีความหมาย RFLP อยู่เลย นอกจากนี้การใช้เทคนิค AFLP สามารถให้ผลรวดเร็วกว่า RFLP อีกด้วย

Sharma *et al.* (1996) ใช้เครื่องหมายโมเลกุล 2 ชนิด คือ AFLP และ RAPD มาใช้จำแนกถั่ว lentil จำนวน 54 พันธุ์ ทำการทดสอบเปรียบเทียบกันระหว่างเทคนิค AFLP และ RAPD พบว่าเทคนิค AFLP เมื่อใช้ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์ ระหว่าง *Pst*I-primer และ *Mse*I-primer สามารถจัดจำแนกถั่วบางพันธุ์ซึ่งเทคนิค RAPD ไม่สามารถจัดจำแนกได้ Lavee *et al.* (1999) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของมะกอกโอลิฟที่ปลูกทางแถบตะวันออกของเมดิเตอร์เรเนียน โดยเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค AFLP และ RAPD ในการทดสอบนั้น พบว่า เทคนิค RAPD ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของต้นมะกอกโอลิฟที่มีรูปร่างภายนอกที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยได้ แต่เมื่อใช้เทคนิค AFLP ในการจำแนกพบว่าสามารถแยกความแตกต่างของลักษณะดังกล่าวได้

นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้ใช้เทคนิค AFLP ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อการจำแนกยีนที่ต้านทานต่อลักษณะต่างๆ การติดตามยีนที่สนใจตลอดจนการวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA เพื่อจัดกลุ่มพันธุ์พืช Thomas *et al.* (1995) จำแนกเครื่องหมายเชิงโมเลกุลของยีนต้านทาน (*Cf-9*) ต่อ *Cladosporium fulvum* โดยการใช้ AFLP วิเคราะห์ประชากร F_2 ที่ได้จากการผสมระหว่าง *Lycopersicon esculentum* (*Cf-9*) x *L. pennellii* พบว่ามี 3 แถบ ซึ่งแยกตัวไปด้วยกันเสมอ (co-segregate) กับ ยีน *Cf-9* โดยที่ 2 แถบ จะมีตำแหน่งอยู่คนละข้างของยีน *Cf-9* และมีช่วงระยะห่างกัน 15.5 กิโลเบส นอกจากนี้ยังได้ใช้วิธี AFLP เพื่อแยกยีน *Rcr-1* และ *Rcr-2* ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับยีนต้านทาน *Cf-9* ด้วย Deta Vina *et al.* (1996) ติดตามลักษณะต้านทานต่อโรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* ในข้าว จาก recombinant inbred line (RIL276) จากกลุ่มผสม CO39/Moroberekan จากลูก F_2 ที่ได้ พบว่ามีอัตราส่วนการกระจายตัวเป็น 3:1 ซึ่งให้เห็นว่า RIL 276 มียีนเกี่ยวกับความต้านทานต่อโรคไหม้จากเชื้อราดังกล่าว จากการศึกษาด้วยวิธี STS-PCR, RFLP และ AFLP พบว่าเครื่องหมาย AFLP 92S07/92F37 และ 92S07/92G12 อยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานต่อโรคไหม้ดังกล่าว

Cervera *et al.* (1996) ใช้เครื่องหมาย AFLP ในการจำแนกลักษณะที่ต้านทานโรคราสนิมที่เกิดจาก *Melampsora larici-populina* ใน *populus* โดยใช้ลูกผสมที่ได้จากการผสมระหว่างเพศเมียที่ต้านทาน (*Populus deltoides*) กับเพศผู้ที่ไม่ต้านทาน (*P. nigra*) พบว่า ลักษณะต้านทานดังกล่าวถูกควบคุมด้วยยีนเด่น คือ *Mer* ที่ต้านทานต่อ *M. larici-populina* 3 สายพันธุ์ คือ E1, E2 และ E3 พบว่ามี 3 แถบ ซึ่งอยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานนี้ Gregorio (1997) ตรวจหายีนที่ต้านทานต่อความเค็มในข้าวด้วยใช้เทคนิค AFLP โดยใช้ประชากร RIL, F_8 ของ IR66946 จากกลุ่มผสม IR29 (ไม่ทนทานต่อความเค็ม) x Pokkali (ทนทานต่อความเค็ม) รายงานว่า major gene สำหรับลักษณะทนทานต่อความเค็มอยู่ระหว่าง AFLP marker P3/M9-8 และ P1/M9-3 บนโครโมโซมที่ 1 ระยะ 14.7 cM และ 18.6 cM (centrimorgan) ตามลำดับ

Lu *et al.* (1999) ศึกษาหายีนที่ต้านทานต่อหนอนทำลายรากในต้นพืช โดยใช้เทคนิค AFLP ในการตรวจสอบพบพอลิมอร์ฟิซึมที่ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อหนอนกินรากและเมื่อนำยีนมาโคลนพบว่า สามารถแยกจีโนไทป์ที่แสดง homozygous resistant, heterozygous resistant และ homozygous susceptible ได้ ในทำนองเดียวกับ Najimi *et al.* (2002) ได้ศึกษาหายีนที่ต้านทานแมลงกินข้าวสาลี (*Hs1* และ *H22*) ซึ่งในการทดลองใช้ไพรเมอร์จำนวน 24 คู่ไพรเมอร์ ให้แถบ DNA ทั้งหมด 4200 แถบ เฉลี่ย 100 แถบ DNA ต่อ คู่ไพรเมอร์ และมีแถบ DNA ที่เป็นให้พอลิมอร์ฟิซึม สำหรับยีนที่ต้องการจำนวน 28 แถบ ซึ่งเป็น *H5* จำนวน 13 แถบ และ *H22* จำนวน 15 แถบ ในขณะที่ Altinkul *et al.* (2003) ใช้เทคนิค AFLP ในการจำแนกข้าวบาร์เลย์ที่ต้านทานต่อน้ำท่วมขัง โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 40 คู่ไพรเมอร์ ตรวจสอบในรุ่นที่ 2 เพื่อจำแนกต้นที่มีความต้านทานและไม่ต้านทานออกจากกัน

2.8 การวิเคราะห์แบบ Bulk Segregant Analysis

การวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis (BSA) หมายถึง การรวมกลุ่ม DNA (pooled DNA) จากประชากรที่มีการกระจายตัวที่เกิดจากการผสมเดี่ยวของสายพันธุ์ที่เป็น homozygous เป็นวิธีการใช้เครื่องหมาย DNA ที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนที่สนใจหรือใกล้กับบริเวณจีโนมที่สนใจ สามารถทำได้สะดวก รวดเร็ว ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายกว่าการศึกษาจากประชากรที่ขนาดใหญ่ หลักการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis คือ การรวมกลุ่ม DNA ที่มีอัลลีลตรงกันหรือมีลักษณะตรงกันไว้ด้วยกันเช่น ลักษณะที่ต้านทานและไม่ต้านทานต่อโรค เป็นต้น (Michelmore *et al.* 1991) ซึ่งลักษณะการสร้างกลุ่ม DNA สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1. การสร้างกลุ่ม DNA จากข้อมูลทางฟีโนไทป์เช่น การทดลองของ Michelmore *et al.* (1991) ได้รวมกลุ่ม DNA จากข้อมูลฟีโนไทป์ของผักกาดหอมโดยกลุ่มหนึ่งแสดงลักษณะทนทานต่อโรคราน้ำค้าง ส่วนอีกกลุ่มหนึ่งอ่อนแอต่อโรคราน้ำค้าง เช่นเดียวกับ Wang and Paterson (1994) สร้างกลุ่ม DNA จากข้อมูลฟีโนไทป์ โดยการศึกษาข้อมูลจากประชากรมะเขือเทศที่มีการกระจายตัว 4 ประชากร คือ ประชากรผสมกลับ (backcross) ประชากรลูกชั่วที่ 2 (F_2) ประชากร recombination inbred line (RIL) และ ประชากร double haploid (DH) พบว่า ประชากร RIL หรือ DH เหมาะสมที่ใช้ในการสร้างกลุ่ม DNA มากที่สุด เนื่องจากประชากรอยู่ในสภาพ homozygous โอกาสที่แต่ละกลุ่ม DNA จะปนเปื้อนเนื่องมาจากพันธุกรรมแบบ heterozygous มีต่ำกว่าประชากรชั่วที่ 2 และประชากรผสมกลับ ซึ่งทั้งสองประชากรนี้จะมีจีโนไทป์อยู่ในสภาพ heterozygous ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ประชากรผสมกลับจะมีความเหมาะสมในการใช้สร้างกลุ่ม DNA มากกว่าประชากรลูกชั่วที่ 2

2. การสร้างกลุ่ม DNA จากข้อมูลทางจีโนไทป์โดยใช้เครื่องหมาย DNA คัดเลือกจีโนไทป์ที่ต้องการ ตัวอย่างเช่น Giovannoni *et al.* (1991) ใช้เครื่องหมาย RFLP “TG532” และ “CT168” คัดเลือกสายพันธุ์มะเขือเทศชั่วที่ 2 ที่เกิดจากการผสมระหว่าง *L. esculentum* กับ *L. pennellii* โดยกลุ่มหนึ่งมีจีโนไทป์เป็นแบบ homozygous กับ *L. esculentum* และอีกกลุ่มหนึ่งมีจีโนไทป์เป็นแบบ homozygous กับ *L. pennellii* แล้วรวม DNA ในแต่ละกลุ่มเป็นกลุ่ม A และ B ตามลำดับ

Giovannoni *et al.* (1991) สามารถคัดเลือกเครื่องหมาย RAPD ที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนควบคุมการหลุดร่วงของผล (joinless) และยีนควบคุมไม่ให้ผลสุก (non-ripening) ในมะเขือเทศ โดยใช้เครื่องหมาย RAPD คัดเลือกบริเวณเป้าหมายบนโครโมโซมแท่งที่ 11 ที่มียีนที่ควบคุมการหลุดร่วงของผลและบริเวณเป้าหมายบนโครโมโซมแท่งที่ 10 ซึ่งมียีนควบคุมการสุกของผล การสร้างกลุ่ม DNA ที่มีจีโนไทป์อยู่ในสภาพ homozygous แต่มีอัลลีลตรงกันข้ามทั้งสองบริเวณ พบว่า มี RAPD primer 2 ชนิด คือ “38J” และ “148J” วางตัวอยู่ใกล้กับยีนบนบริเวณแท่งที่ 11 และ RAPD primer

อีก 1 ชนิด คือ “307N” วางตัวอยู่ใกล้กับยีนบนโครโมโซมแท่งที่ 10 ในทำนองเดียวกับ Monna *et al.* (1995) หาเครื่องหมาย RAPD ที่วางตัวอยู่ใกล้กับบริเวณเป้าหมายซึ่งมียีนควบคุมการตอบสนองต่อช่วงแสงของข้าว โดยใช้ประชากรที่มีการทำแผนที่ยีนไว้แล้ววิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis โดยสร้างกลุ่ม DNA จากประชากรชั่วที่ 2 โดยใช้เครื่องหมาย RAPD สร้าง graphical genotype เพื่อเลือกช่วงบริเวณเป้าหมายบนโครโมโซมแท่งที่ 6 ได้ RAPD primer 14 ชนิด ที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนเป้าหมาย ทำการโคลนและหาลำดับเบสของเครื่องหมาย RAPD ทั้ง 14 ชนิด เพื่อเป็น sequence tagged site และการสร้าง physical maps ต่อไป

Boury *et al.* (1995) รายงานการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis มีประสิทธิภาพในการศึกษาควบคุมลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait loci ; QTL) ที่ควบคุมเพียงลักษณะเดียว โดยการศึกษา QTL ที่ควบคุมปริมาณ anthocyanin ในกะหล่ำ สร้างกลุ่ม DNA 2 กลุ่ม กลุ่มหนึ่งสกัด DNA จากต้นที่มีระดับ anthocyanin สูง ส่วนอีกกลุ่มสกัด DNA จากต้นที่มีระดับ anthocyanin ต่ำ ซึ่งสามารถเห็นความแตกต่างระหว่างสีของทั้งสองกลุ่มได้อย่างชัดเจน พบว่ามี 4 QTL ที่ควบคุมระดับ anthocyanin ในประชากรที่ศึกษา ในขณะที่ Chagu *et al.* (1996) จำแนกเครื่องหมาย RAPD ที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนที่ต้านทานไวรัส spotted wilt (Sw-5) ในมะเขือเทศ โดยการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis พบว่า RAPD 4 markers ที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีนต้านทานโรค ซึ่งครอบคลุมระยะทางทั้งหมด 10.5 cM ในปีต่อมา Chagu *et al.* (1997) ศึกษาหาเครื่องหมาย RAPD ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีน QTL ที่ควบคุมความทนทานต่อโรคใบหยิกเนื่องจากไวรัสในมะเขือเทศโดยการวิเคราะห์ร่วมกับ bulk segregant analysis พบว่า RAPD primer 4 ชนิด ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีน QTL และครอบคลุมระยะทางทั้งหมด 17.3 cM มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 6 ซึ่ง RAPD primer ทั้ง 4 ชนิด นี้สามารถอธิบายความต้านทานได้ 27.7 เปอร์เซ็นต์

Fang *et al.* (1998) หาเครื่องหมาย RAPD ที่วางตัวอยู่ใกล้กับยีนต้านทานโรคไวรัส (Ctv) ในพืชตระกูลส้ม โดยการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis พบเครื่องหมาย RAPD กระเจียวตัวร่วมกับยีน Ctv โดยที่ C19 และ AD08 วางตัวบนทั้งสองด้านของยีน มีระยะทาง 0.5 และ 0.8 cM ตามลำดับ และสามารถทำ BAC library เพื่อเคลื่อนที่เข้าไปหายีนได้โดยตรง Tan *et al.* (1998) ศึกษาหาเครื่องหมาย RFLP ที่วางตัวอยู่ใกล้ชิดกับยีน *Rf* ซึ่งเป็นยีนช่วยแก้ไขความเป็นหมันในข้าว โดยรวบรวม DNA แต่ละสายพันธุ์ที่มีจีโนมไทป์เหมือนกันไว้ด้วยกัน พบว่า ยีน *Rf* มีตำแหน่งอยู่บริเวณกลางแขนข้างยาวของโครโมโซมแท่งที่ 10 Marziani *et al.* (1999) ใช้เทคนิค bulk segregant analysis ในการแยกเพศของหน่อไม้ฝรั่งโดยสร้างประชากรที่แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ เพศผู้และเพศเมีย จากการคัดเลือกไมโครสปอร์ที่เป็น X และ Y ออกแล้วเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็นลูก double haploid XX และ YY ทำการวิเคราะห์ด้วย RAPD พบว่า ไพรมเมอร์ OF13 สามารถจำแนกเพศของหน่อไม้ฝรั่งได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคนิค RAPD ร่วมกับ bulk segregant analysis เพื่อติดตามยีนที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคใบจุดที่เกิดจากเชื้อ *Spilotea oleaginea* ในมะกอกโอลิฟ

โดยใช้ RAPD primer 100 ชนิด กับ DNA กลุ่มด้านทานและกลุ่มไม่ด้านทาน โดยแถบหนึ่งมีความยาวประมาณ 700 คู่เบส เป็นแถบที่ได้จากกลุ่มที่ไม่ด้านทานและอีกแถบหนึ่งมีขนาดประมาณ 780 คู่เบส ซึ่งได้จากกลุ่มด้านทานโรค (Mekuria *et al.* 2001)

Beltan *et al.* (2002) ศึกษาการทำแผนที่ยีนของ common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) ให้สมบูรณ์มากขึ้นโดยเทคนิค RAPD ร่วมกับการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis ในการระบุหาเครื่องหมายที่ระบุ 5 ลักษณะ คือ dark green savoy leaf (dgs), blue flower (blu), silery green pod (arg), yellow wax pod (y) และ flat pod ซึ่งเป็นการกลายที่เกิดจากธรรมชาติผลที่ได้พบว่าเครื่องหมายของทั้ง 5 ยีนนี้สามารถบรรจุลงในแผนที่ยีนเดิมได้และสามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของลักษณะต่างๆ ได้ นอกจากนี้ Subudhi *et al.* (2003) ใช้เทคนิค RAPD ร่วมกับการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis พบเครื่องหมาย RAPD primer 5 ชนิด ที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะการเป็นหมันของเกสรตัวผู้ เนื่องจากความไวต่ออุณหภูมิของข้าว (thermosensitive genetic male sterility) คือ OPF18, OPF19, OPC1, OPL3 และ OPAA7

Cervera *et al.* (1996) ทำการศึกษาในพืช *Populus* ที่ด้านทาน *Melampsora laricipopulina* ด้วยเทคนิค AFLP ร่วมกับการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis พบว่า สามารถหาเครื่องหมาย DNA ได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น จากการวิเคราะห์ DNA fragment จำนวน 11,500 fragment จากการใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 144 ชนิด โดยมี 3 fragment ที่ link กับ *Mer* locus ซึ่งเป็นประโยชน์ในการสร้างความต้านทาน Lanceras (2000) ทำการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis เพื่อหาเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวอยู่ชิดกับ QTL ที่ควบคุมปริมาณอะไมเลสในเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 โดยพบ QTL หนึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 3 และอีก QTL หนึ่งอยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 6

Alec *et al.* (2000) ค้นพบเครื่องหมาย AFLP ที่วางตัวใกล้ชิดกับยีน *Rsv4* ที่ควบคุมลักษณะด้านทานต่อโรค mosaic virus ในถั่วเหลืองโดยการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis ซึ่งเครื่องหมายนี้มีระยะห่างจากยีน *Rsv4* ประมาณ 4.8 cM นอกจากนี้ Dong *et al.* (2000) ใช้วิธีการ AFLP ในการทดลองพบว่า มี 4 แถบ ที่แสดงความแตกต่างระหว่าง bulk fertile , bulk sterile และพ่อแม่ โดยเครื่องหมาย E5/M12-600 มีระยะห่างจาก *tgms-vn1* gene ประมาณ 3.3 cM ส่วนอีก 3 เครื่องหมาย ที่เหลืออยู่ห่างจาก *tgms-vn1* gene มากกว่า 20 cM จึงนำ AFLP fragment E5/M12-600 มาหาลำดับเบสเพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมาย PCR สำหรับนำมาเป็นประโยชน์เป็น marker assisted selection ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ข้าวลูกผสมต่อไป

วารุณี โสมนัส (2544) ทำการศึกษาหาตำแหน่งของยีนที่ควบคุมความทนทานต่อการขาดธาตุเหล็กในถั่วเขียว โดยการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis พบว่า สามารถคัดเลือกเครื่องหมาย AFLP ที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ทนทานและอ่อนแอได้ ทั้งหมด 8 เครื่องหมาย ซึ่งอยู่บนกลุ่ม linkage เดียวกัน เครื่องหมาย AFLP คือ CGT/CTG และ CAG/TAC2

ซึ่งครอบคลุมถึง QTL หลักที่ควบคุมลักษณะคลอโรซิสโดยมีระยะห่างจากยีน 2.9 และ 3.0 cM ตามลำดับ

การหาเครื่องหมาย DNA ได้กลายเป็นเครื่องมือสำคัญในการศึกษาพันธุกรรมพืชไม่ว่าจะเป็นการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตหรือการสร้างประชากรที่มีลักษณะตามความต้องการ เช่น ลักษณะต้านทานโรคหรือลักษณะต้านทานแมลงหรือลักษณะใดๆ ก็ตามที่มีความสำคัญทางการเกษตรเพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลที่วางตัวอยู่ชิดกับยีนที่ควบคุมลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลร่วมกับการวิเคราะห์แบบ bulk segregant analysis ที่ได้พัฒนาขึ้นมาช่วยในการคัดเลือกเครื่องหมาย DNA นั้น ซึ่งน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกพืชที่มีลักษณะที่ต้องการในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป