การตรวจเอกสาร

พืชในวงศ์กล้วยไม้ที่ปรากฏอยู่ในโลกนี้มีจำนวนทั้งสิ้นไม่น้อยกว่า 796 สกุล 19,000 ชนิด ในประเทศไทยมีกล้วยไม้พันธุ์พื้นเมือง 167 สกุล ประมาณ 1,140 ชนิด เนื่องจากพืชในวงศ์กล้วยไม้มีความหลากหลายและมีจำนวนสมาชิกมาก จึงมีการจำแนกกล้วยไม้ออกเป็นวงศ์ย่อย (subfamily) ซึ่งจำแนกได้เป็น 6 วงศ์ย่อยได้แก่ Apostasioideae, Neottioideae, Orchidioideae, Epidendroideae, Vandoideae และสุดท้ายซึ่งเป็นวงศ์ย่อยของกล้วยไม้รองเท้านารีคือ Cypripedioideae สมาชิกที่อยู่ในสกุลนี้จะเป็นกล้วยไม้ดินรวมทั้งกล้วยไม้รองเท้านารีด้วย มีลักษณะเด่นประจำวงศ์ย่อยคือ กลีบเลี้ยงด้านข้างเชื่อมติดกันเป็นอันเดียว กลีบปากเป็นถุงคล้ายหัวรองเท้า และมีเกสรเพศผู้สองอันอยู่ทางด้านข้างของเกสรเพศผู้ที่เป็นหมันซึ่งมีลักษณะเป็นแผ่นละอองเรณูเหนียวจับเป็นกลุ่ม โดยส่วนใหญ่แล้วเป็นกล้วยไม้ดินที่มีอายุยืนนานหลายปี และไม่ทิ้งใบ (อบฉันท์, 2543) กล้วยไม้รองเท้านารีหรือที่ภาษาอังกฤษเรียกว่า Lady's Slipper นั้น มีถิ่นกำเนิดทั้งในเขตร้อนและเขตหนาวของโลก เท่าที่พบแล้วทั่วโลกมี 4 สกุล 125 ชนิดคือ สกุล *Cypripedium* มี 35 ชนิด สกุล *Paphiopedilum* มี 66 ชนิด สกุล *Phragmipedium* มี 20 ชนิด และสกุล *Selennipedium* มี 4 ชนิด สังเกตจากชื่อของทั้ง 4 สกุลนั้น มีคำลงท้ายว่า "pedilum" หรือ "pedium" ซึ่งมาจากคำในภาษากรีกว่า "pedilon" แปลว่า "รองเท้าแตะ" ประเทศไทยพบเฉพาะกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* เท่านั้น โดยเท่าที่พบแล้วมีทั้งหมด 17 ชนิดจากจำนวนไม่น้อยกว่า 66 ชนิด ชื่อสกุล *Paphiopedilum* มาจากภาษากรีก 2 คำคือ "Paphos" ที่เป็นชื่อเกาะในทะเลอีเจียนอันเป็นที่ตั้งวิหารของเทพธิดาแอโฟรไดที หรือวีนัส กับคำว่า "pedilon" กล้วยไม้รองเท้านารีสกุลนี้จึงมีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า Venus' Slipper (อุไร, 2545) ในการศึกษาครั้งนี้คำว่า "กล้วยไม้รองเท้านารี" จะหมายถึงเฉพาะแต่กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* เท่านั้น

กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ที่ได้รับความสนใจในการนำมาปลูกเลี้ยง เนื่องจากเป็นพืชที่มีความสวยงามทั้งดอกและใบ เวลาออกดอกจะบานทนมาก ได้มีการปรับปรุงพันธุ์ คัดเลือกพันธุ์ และขยายพันธุ์เพื่อการค้ากันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ ในบางชนิดหรือบางต้นที่มีลักษณะดีเด่นจะมีการซื้อขายกันในราคาที่สูงมาก (อบฉันท์, 2543) ตลาดของกล้วยไม้รองเท้านารีที่สำคัญได้แก่ประเทศสหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่น กับบางประเทศในยุโรปและเอเชีย ทำให้ประเทศไทยกลายเป็นแหล่งส่งออกกล้วยไม้รองเท้านารีที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก จึงถือได้ว่ากล้วยไม้รองเท้านารีเป็นพืชสกุลหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยทั้งในรูปแบบของไม้กระถางและไม้ตัดดอก (อุไร, 2545)

จากความนิยมปลูกเลี้ยงกล้วยไม้รองเท้านารี ซึ่งบางส่วนยังคงได้มาจากการลักลอบเก็บจากป่าธรรมชาติ ขณะเดียวกันปัญหาการทำลายป่าไม้ ได้ส่งผลกระทบโดยตรงต่อสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมของกล้วยไม้รองเท้านารี เป็นสาเหตุที่ทำให้กล้วยไม้รองเท้านารีในธรรมชาติลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ปัจจุบันกล้วยไม้รองเท้านารีถูกจัดให้เป็นพืชที่มีสถานภาพใกล้สูญพันธุ์ของโลก โดยถูกจัดอยู่ในบัญชีแนบท้ายที่ 1 ของอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งสัตว์ป่าและพืชใกล้สูญพันธุ์ (CITES) ซึ่งหมายถึงชนิดพันธุ์ที่ได้มาจากป่าหรือเป็นของป่า และใกล้จะสูญพันธุ์ จึงห้ามทำการค้าโดยเด็ดขาด (ยกเว้นที่ได้จากการขยายพันธุ์เทียมหรือเพาะพันธุ์เพื่อการศึกษาและวิจัย) การนำเข้า และส่งออกซึ่งชนิดพันธุ์ในบัญชีนี้จะต้องคำนึงถึงความอยู่รอด ผลกระทบต่อจำนวนประชากรในธรรมชาติเป็นสำคัญ การส่งออกจะต้องได้รับอนุญาตให้นำเข้าจากประเทศผู้นำเข้าเสียก่อน ผู้ออกใบอนุญาตของประเทศที่ทำการส่งออกจึงจะออกใบอนุญาตเพื่อนำผ่านหรือส่งออกได้ (มานพ, 2545)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum*

กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* มีชื่อสามัญว่า Lady's Slipper หรือ Venus' Slipper ในประเทศไทยยังนิยมเรียกชื่ออื่นๆได้แก่รองเท้านาง และรองเท้าแตะนารี เนื่องจากลักษณะดอกที่มีกลีบงุ้มงอเป็นกระเป๋าคล้ายรูปรองเท้าแตะของผู้หญิง นอกจากนี้ยังมีชื่อเรียกเป็นภาษามาเลเซียว่า "บุหงากะสุต" (อุไร, 2545)

กล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* มีแหล่งกำเนิดตั้งแต่ตะวันออกของทวีปเอเชีย เช่นอินเดีย บังกลาเทศ พม่า อินโดนิเซีย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ไทย ประเทศในอินโดจีน และทางตะวันออกเฉียงใต้ของจีน (อุไร, 2545) เป็นที่น่าสังเกตว่ากล้วยไม้รองเท้านารีสกุลนี้มีการกระจายตัวเป็นแนวตั้งแต่ทางใต้ของเทือกเขาหิมาลัยไปจนถึงอินโดนิเซียและฟิลิปปินส์ซึ่งเป็นพื้นที่เขตร้อน จะแตกต่างกับกล้วยไม้รองเท้านารีสกุลอื่นซึ่งพบอยู่ในบริเวณเขตอบอุ่น (Kamemoto and Sagarik, 1975)

กล้วยไม้รองเท้านารีเป็นกล้วยไม้ประเภทฐานร่วม (sympodium) คือ เติบโตโดยแตกหน่อใหม่จากตาข้างของต้นเดิม เพื่อสร้างช่อดอก ลำต้นสั้นมาก ไม่มีลำลูกกล้วย ในธรรมชาติมักอิงอาศัยกับต้นไม้ใหญ่ บนพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเลมากๆ หรือขึ้นตามซอกผาหิน และพื้นดินที่มีซากใบไม้ผุทับถมอยู่เป็นเวลานานหลายปี (อุไร, 2545) บางชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีจะมีระบบรากแบบ

รากอากาศ (epiphytic) ซึ่งในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะชอบสภาพแวดล้อมที่หนาวเย็นและมีความชื้นสูง (Kamemoto and Sagarik, 1975) กล้วยไม้รองเท้านารีซึ่งถูกจัดจำแนกให้อยู่ในวงศ์ย่อย Cypripedioideae มีลักษณะเฉพาะเป็นเอกลักษณ์ประจำวงศ์ย่อยคือ กลีบปากมีลักษณะเป็นถุงลึก (saccate) มีอับเรณูที่ไม่เป็นหมัน 2 อัน โดยมีอับเรณูที่เป็นหมัน (staminode) ที่มีลักษณะคล้ายโล่ (shieldlike) (ครรชิต, 2541) มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์โดยทั่วไปคือ

ราก ออกจากโคนต้นแล้วแผ่กระจายในแนวราบ มีขนาดใหญ่ สีน้ำตาล และมีขนรากปกคลุมอยู่ทั่วไป

ใบ มีหลายแบบทั้งรูปขอบขนาน (oblong) รูปรี (elliptic) รูปรีแกมรูปขอบขนาน (oblong-elliptic) หรือรูปแถบ (linear) ออกสลับกันทั้งสองข้าง จำนวน 2-7 ใบต่อต้น อาจตั้งขึ้นหรือแผ่ขนานไปกับพื้นดิน แผ่นใบหนา เส้นกลางใบพับเป็นร่อง ปลายใบมนเว้าหรือแหลม มีทั้งสีเขียวเป็นมัน เป็นลายตารางหรือเป็นลายคล้ายหินอ่อน สีเขียวเข้มสลับกับสีเขียวอมเทาทั่วทั้งใบ ใต้ใบมีสีเขียวบางชนิดมีสีม่วงแดงหรือจุดเล็กๆสีม่วงแดงกระจายทั่วใบ โคนกาบใบอาจมีสีม่วงเรื่อและมีขนเล็กๆปกคลุมตามขอบใบ

ดอก ออกดอกที่ปลายยอด มีทั้งดอกเดี่ยวและเป็นช่อ ขนาดแตกต่างกันไป ก้านดอกอาจยาวหรือสั้น มีสีเขียว ม่วงแดง หรือน้ำตาลแดง และมักมีขนปกคลุม กาบรองดอกรูปไข่หรือรูปหอกเรียวแหลม ห่อหุ้มรังไข่ไว้ มีสีเขียว น้ำตาลแดง หรือม่วงแดง และมีขนนุ่มปกคลุมอยู่ทั้งสองส่วน กลีบดอกหนาเป็นมัน ด้านนอกมักมีขนนุ่มปกคลุมเช่นกัน ด้านในมีสีสันสวยงาม แบ่งเป็น

กลีบนอก หรือกลีบเลี้ยง (sepal) จะห่อหุ้มกลีบดอกชั้นในไว้ มีขนนุ่มปกคลุม แบ่งเป็น 3 กลีบ คือ กลีบนอกบนหรือหลังคา (dorsal sepal) 1 กลีบ อยู่ส่วนบนของดอกและเห็นเด่นชัด มีปลายกลีบแหลม อาจแผ่แบน ตั้งตรงหรือโค้งงุ้มมาด้านหน้า อีก 2 กลีบอยู่ด้านล่าง และมักเชื่อมติดกันเป็นแผ่นเดียวเรียกว่ากลีบนอกล่าง (ventral sepal หรือ synsepalum) ปลายกลีบนอกล่างมักแหลมชี้ลงและงุ้มน้อยกว่ากลีบนอกบน

กลีบใน หรือกลีบดอก (petal) มีกลีบใน 2 กลีบชี้ออกด้านข้างทั้ง 2 ด้าน อาจเรียกว่าหู มีขนาดและลักษณะเหมือนกัน อาจเป็นแถบ เรียวยาว กลม หรือป้อม แผ่แบน บิดเป็นคลื่น

หรืองุ้มงอ กลีบในอีกกลีบหนึ่งซึ่งอยู่ด้านล่างของดอกได้เปลี่ยนรูปเป็นถุงห้อยลงคล้ายหัวรองเท้าแตะของชาวดัตช์เรียกว่า กระเป๋า (pouch)

ดอกกล้วยไม้รองเท้านารีเป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรเพศผู้ที่สมบูรณ์ 2 แห่ง ลักษณะเป็นก้อนเหนียวสีเหลืองติดอยู่ด้านข้างทั้งสองข้างของเส้าเกสร ถัดลงมาตรงกึ่งกลางของเส้าเกสรเป็นยอดของเกสรเพศเมียซึ่งคว่ำลง ลักษณะเป็น 3 เนินติดกัน ปลายเส้าเกสรมีเกสรเพศผู้ที่ไม่สมบูรณ์ซึ่งเปลี่ยนรูปเป็นแผ่นปิดอยู่ เรียกว่า โล่ (staminode) มีรูปร่างต่างๆกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของรองเท้านารีเช่น รูปพระจันทร์เสี้ยวคว่ำ

ผล เป็นผลแบบผลแห้งแล้วแตก (capsule) ซึ่งเกิดจากการขยายตัวของก้านดอกหลังการผสมพันธุ์ เมื่อแก่มีสีน้ำตาลและแตกออกตามแนวยาว ภายในมีเมล็ดเล็กๆคล้ายฝุ่น ปลิวไปตามลมได้ง่าย

สำหรับกล้วยไม้รองเท้านารีสกุลอื่นๆคือ สกุล *Cypripedium, Phragmipedium* และสกุล *Selenipedium* มีลักษณะดอกคล้ายคลึงกันมาก คือ บริเวณกลีบดอกในด้านล่างจะงุ้มงอคล้ายกระเป๋า แต่มีลักษณะการเจริญเติบโตของต้นและใบแตกต่างกัน (อุไร, 2545)

ประเทศไทยซึ่งอยู่ในเขตร้อน พบกล้วยไม้รองเท้านารีกระจายพันธุ์อยู่เพียงสกุลเดียว คือ สกุล *Paphiopedilum* โดยเท่าที่พบแล้วในประเทศไทยมีทั้งหมด 17 ชนิด จากจำนวนทั้งหมดไม่น้อยกว่า 66 ชนิด ดังนี้

1. รองเท้านารีคางกบคอแดง (*Paphiopedilum appletonianum*)
2. รองเท้านารีม่วงสงขลา หรือรองเท้านารีคางกบภาคใต้ (*Paph. barbatum*)
3. รองเท้านารีฝาหอย (*Paph. bellatulum*)
4. รองเท้านารีคางกบ หรือรองเท้านารีไทยแลนด์ (*Paph. callosum*)
5. รองเท้านารีดอยตุง (*Paph. charlesworthii*)
6. รองเท้านารีเหลืองปราจีน หรือรองเท้านารีเหลืองกาญจน์ หรือรองเท้านารีเหลืองอุดร (*Paph. concolor*)
7. รองเท้านารีเหลืองกระบี่ (*Paph. exul*)
8. รองเท้านารีขาวชุมพร (*Paph. godefroyae*)

9. รองเท้านารีเหลืองตรัง หรือรองเท้านารีเหลืองพังงา (*Paph. godefroyae*)
10. รองเท้านารีเหลืองเลย (*Paph. hirsutissimum*)
11. รองเท้านารีอินซิกเน่ (*Paph. insigne*)
12. รองเท้านารีขาวสตูล (*Paph. niveum*)
13. รองเท้านารีเมืองกาญจน์ หรือรองเท้านารีเชียงดาว (*Paph. parishii*)
14. รองเท้านารีสุขะกูล หรือรองเท้านารีปีกแมลงปอ (*Paph. sukhakulii*)
15. รองเท้านารีอินทนนท์ (*Paph. villosum*)
16. รองเท้านารีช่องอ่างทอง (*Paph.* x Ang Thong)
17. รองเท้านารีเกาะช้าง (*Paph.* x Siamensis)

<u>การจัดจำแนกชนิดกล้วยไม้รองเท้านารีในสกุล *Paphiopedilum*</u>

ด้วยเหตุที่รองเท้านารีแต่ละชนิดที่ค้นพบ บางชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกันมากในแต่ละท้องถิ่น การจำแนกระดับสกุลจึงไม่เพียงพอในการกำหนดลักษณะรองเท้านารีให้ถูกต้องจึงมีการจำแนกสกุล *Paphiopedilum* ออกเป็นสกุลย่อย ดังนี้

1. สกุลย่อย Brachypetalum เป็นรองเท้านารีที่พบตามซอกผาหินที่เป็นหินปูน ดอกค่อนข้างเล็ก กลีบดอกรูปรีถึงค่อนข้างกลม กระเป๋ามักงุ้มลง ขอบเรียบ และมีจำนวนโครโมโซม 2n=26 สกุลย่อยนี้สามารถแบ่งเป็น 2 หมู่ (section) คือ

1.1 Brachypetalum พบในเขตร้อน บริเวณตะวันตกเฉียงใต้ของจีน ตะวันออกเฉียงเหนือของพม่า ไทย และตอนเหนือของมาเลเซีย ใบมักเป็นลายแต้มหรือจุด ดอกเล็กสีขาวหรือเหลืองนวล มีจุดประสีม่วงเข้มบนกลีบ กลีบดอกหนารูปรีกว้าง กระเป๋าเป็นรูปไข่ ได้แก่ รองเท้านารีฝาหอย รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีเหลืองตรัง และรองเท้านารีขาวสตูล

1.2 Parvisepalum พบบริเวณตะวันตกเฉียงใต้ของจีนและเวียดนาม ใบเป็นลายตารางคล้ายหินอ่อน (ยกเว้น *Paphiopedilum emersonii* มีใบสีเขียวเรียบ) มีทั้งดอกเดี่ยวและเป็นช่อดอกใหญ่ กลีบดอกรูปรีกว้างถึงกลม โล่มีทั้งรูปหัวใจ กลม และยาวเป็นร่อง อับเกสรเป็นก้อนกลม ได้แก่ *Paph. armeniacum, Paph. delenatii, Paph. malipoense, Paph. micranthum* และ *Paph. emersonii*

2. สกุลย่อย Paphiopedilum เป็นรองเท้านารีที่ดอกเดี่ยวหรือออกดอกเป็นช่อ กลีบดอกเป็นแถบ หรือเป็นรูปช้อน ซึ่งมีความยาวมากกว่าสองเท่าของความกว้างของกลีบดอก กระเป๋างุ้มลง ขอบเรียบหรือเว้าลง สกุลย่อยนี้สามารถแบ่งเป็น 5 หมู่คือ

2.1 Coryopedilum มีจำนวนโครโมโซม 2n=26 พบแถบหมู่เกาะบอร์เนียว มีใบสีเขียว ออกดอกเป็นช่อ กลีบดอกเป็นแถบยาว มักบิดเป็นเกลียว ขอบกลีบด้านบนมีไฝ และมีขนอ่อนปกคลุมที่ปลายกลีบ กระเป๋ายาวห้อยลง ด้านในขอบกลีบจะงุ้มเข้ากึ่งกลาง โล่มักเป็นรูปขอบขนาน และมีขนอ่อนปกคลุมด้านล่างได้แก่ *Paph. philippinese, Paph .randsii, Paph. sanderianum* และ *Paph. stonei* เป็นต้น

2.2 Pardalopetalum มีจำนวนโครโมโซม 2n=26 เป็นพวกพืชอิงอาศัย (epiphyte) มีใบสีเขียว ลักษณะดอกมักมีรูปร่างคล้ายกัน โดยเฉพาะโล่มักเป็นรูปหัวใจกลับ กลีบดอกเป็นแถบบิดเป็นเกลียว ขอบกลีบด้านบนมีไฝสีดำได้แก่ *Paph .haynaldianum, Paph. lowii* และ *Paph. parishii*

2.3 Cochlopetalum มีจำนวนโครโมโซม 2n=30-37 มักพบตามชายฝั่งของหมู่เกาะสุมาตราและชวา ดอกเล็ก กาบรองดอกรูปรี กลีบดอกเป็นเส้นบิดเป็นเกลียวและมีขนปกคลุม กระเป๋ามีจุดประกระจายทั่ว โล่เป็นรูปสี่เหลี่ยมและมีขนปกคลุมที่โคนได้แก่ *Paph. glaucophyllum, Paph. liemianum, Paph. primulinum, Paph. victoria-mariae* และ *Paph. victoria-regina*

2.4 Paphiopedilum มีจำนวนโครโมโซม 2n=26-30 ใบสีเขียวไม่มีลาย มีทั้งดอกเดี่ยวหรือเป็นช่อ กลีบดอกเป็นรูปช้อนบิดเป็นรูปตัวเอสและงุ้มมาด้านหน้า โล่มีทั้งรูปเหลี่ยมกึ่งกลางมีตุ่มยื่นเล็กน้อยหรือเป็นรูปพระจันทร์เสี้ยว ด้านล่างหยักเป็นซี่ฟันเล็กๆได้แก่ *Paph. hirsutissimum, Paph. barbigerum, Paph. charlesworthii, Paph. exul, Paph. gratrixianum, Paph. insigne* และ *Paph. villosum* เป็นต้น

2.5 Barbata มีจำนวนโครโมโซม 2n=28-44 มีใบเป็นลายตารางคล้ายหินอ่อน เป็นดอกเดี่ยว กลีบดอกมักมีจุดหรือไฝประปราย กระเป๋างุ้มมาด้านหน้า โล่เป็นรูปพระจันทร์เสี้ยว และหยักคล้ายกับซี่ฟันเล็กๆได้แก่ *Paph. appletonianum, Paph. argus, Paph. barbatum, Paph. callosum, Paph. hennisianum* และ *Paph. lawrenceanum* เป็นต้น (อุไร, 2545)

<u>อุไร (2545) ได้รวบรวมรายชื่อกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดแท้ทั่วโลก 66 ชนิด (เฉพาะที่ค้นพบก่อนปี พ.ศ. 2538) โดยแบ่งเป็นสกุลย่อยและหมวดหมู่ดังนี้</u>

สกุลย่อย Brachypetalum

หมู่ Brachypetalum

1. *Paphiopedilum bellatulum**
2. *Paph. concolor**
3. *Paph. godefroyae**
4. *Paph. niveum**

หมู่ Parvisepalum

5. *Paph. armeniacum*
6. *Paph. delenatii*
7. *Paph. emersonii*
8. *Paph. jackii*
9. *Paph. malipoense*
10. *Paph. micranthum*

สกุลย่อย Paphiopedilum

หมู่ Coryopedilum

11. *Paph. adductum*
12. *Paph. glanduliferum*
13. *Paph. kalopakingii*
14. *Paph. philippinense*
15. *Paph. randsii*
16. *Paph. rothschildianum*
17. *Paph. sanderianum*
18. *Paph. stonei*

19. *Paph. supardii*

หมู่ Pardalopetalum

20. *Paph. haynaldianum*
21. *Paph. lowii*
22. *Paph. parishii**

หมู่ Cochlopetalum

23. *Paph. glaucophyllum*
24. *Paph. liemianum*
25. *Paph. primulinum*
26. *Paph. victoria-mariae*
27. *Paph. victoria-regina*

หมู่ Paphiopedilum

28. *Paph. barbigerum*
29. *Paph. charlesworthii**
30. *Paph. druryi*
31. *Paph. exul**
32. *Paph. fairrieanum*
33. *Paph. gratrixianum*
34. *Paph. henryanum*
35. *Paph. hirsutissimum**
36. *Paph. insigne**
37. *Paph. spicerianum*
38. *Paph. tigrinum*
39. *Paph. villosum**

หมู่ Barbata

40. *Paph. acmodontum*

41. *Paph. appletonianum**
42. *Paph. argus*
43. *Paph. barbatum**
44. *Paph. bougainvilleanum*
45. *Paph. bullenianum*
46. *Paph. callosum**
47. *Paph. ciliolare*
48. *Paph. dayanum*
49. *Paph. fowliei*
50. *Paph. hennisianum*
51. *Paph. hookerae*
52. *Paph. javanicum*
53. *Paph. lawrenceanum*
54. *Paph. mastersianum*
55. *Paph. papuanum*
56. *Paph. purpuratum*
57. *Paph. sangii*
58. *Paph. schoseri*
59. *Paph. sukhakulii**
60. *Paph. superbiens*
61. *Paph. tonsum*
62. *Paph. urbanianum*
63. *Paph. venustum*
64. *Paph. violascens*
65. *Paph. wardii*
66. *Paph. wentworthianum*

* พบกระจายพันธุ์อยู่ในประเทศไทย

<u>สำหรับการจำแนกกล้วยไม้รองเท้านารีของไทย มีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้โดยใช้ลักษณะดอกและการเจริญเติบโตดังนี้</u>

1. การจำแนกโดยใช้ลักษณะดอกเป็นเกณฑ์ แบ่งเป็น 2 ลักษณะคือ

1.1 แบบรูปทรงกลมหรือค่อนข้างกลม มีกลีบดอกป้อม กลม และงุ้มงอมาด้านหน้า ได้แก่ กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน (รวมทั้งรองเท้านารีเหลืองอุดร และรองเท้านารีเหลืองกาญจน์) รองเท้านารีเหลืองตรัง (รวมทั้งรองเท้านารีเหลืองพังงา) รองเท้านารีขาวสตูล รองเท้านารีช่องอ่างทอง และรองเท้านารีฝาหอย

1.2 แบบกลีบดอกแคบ ได้แก่ กล้วยไม้รองเท้านารีคางกบ รองเท้านารีม่วงสงขลา (รวมทั้งรองเท้านารีไทยแลนด์) รองเท้านารีอินทนนท์ รองเท้านารีดอยตุง รองเท้านารีเมืองกาญจน์ รองเท้านารีสุขะกูล (รองเท้านารีปีกแมลงปอ) รองเท้านารีเหลืองกระบี่ และรองเท้านารีเหลืองเลย

2. การจำแนกโดยใช้ลักษณะการเจริญเติบโตเป็นเกณฑ์ แบ่งเป็น 2 ลักษณะคือ

2.1 พืชอาศัยบนหินและกึ่งดิน (lithophytic type, semi-terrestrial type) เป็นกล้วยไม้รองเท้านารีที่ขึ้นบริเวณที่เป็นหินปูน หรือตามพื้นดิน เช่น กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีน รองเท้านารีขาวสตูล และรองเท้านารีฝาหอยเป็นต้น

2.2 พืชอิงอาศัย (epiphytic type) เป็นกล้วยไม้รองเท้านารีที่เจริญเติบโตอยู่บนต้นไม้ใหญ่ ได้แก่ กล้วยไม้รองเท้านารีเมืองกาญจน์และรองเท้านารีอินทนนท์ (อุไร, 2545)

<u>กล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่, *Paphiopedilum exul* (Ridl.) Rolfe</u>

จัดอยู่ในสกุลย่อย Paphiopedilum หมู่ Paphiopedilum มีจำนวนโครโมโซม 2n=26 ถิ่นกำเนิดมีการกระจายพันธุ์แถบชายฝั่งตะวันออกและตะวันตกทางภาคใต้ของไทย เช่น จังหวัดกระบี่ พังงา ตรัง ภูเก็ต และบริเวณบางพื้นที่ในจังหวัดใกล้เคียง ซึ่งสูงจากระดับน้ำทะเลตั้งแต่ 50 เมตรขึ้นไป ลักษณะทั่วไปของรองเท้านารีเหลืองกระบี่ มีการเจริญเติบโตแบบพืชอาศัยบนดินหรือตามซอกผาหิน ชอบความชื้นสูง และแสงค่อนข้างมาก เมื่อต้นสมบูรณ์จะให้ดอกและแตกหน่อได้ดี

มีขนาดของทรงพุ่มประมาณ 30-35 เซนติเมตร ใบเป็นรูปแถบ กว้าง 3-3.5 ซม. ยาว 30-35 เซนติเมตร แผ่นใบหนาสีเขียวเป็นมัน ไม่มีลาย ดอกเป็นดอกเดี่ยว ก้านดอกสีเขียวยาว 13-15 เซนติเมตร และมีขนสั้นสีม่วงแดงปกคลุม เมื่อดอกบานเต็มที่มีขนาด 6-6.5 เซนติเมตร กลีบเป็นมันงุ้มมาด้านหน้า กลีบนอกบนมีสีขาว กึ่งกลางมีสีเหลืองอมเขียว และแต้มสีน้ำตาลเข้ม กลีบนอกล่างขนาดใกล้เคียงกับกลีบนอกบน แต่มีสีเขียว กลีบดอกสีเหลืองอมน้ำตาล กึ่งกลางกลีบมีเส้นสีน้ำตาลเรื่อ โคนกลีบมีแต้มและขนยาวสีน้ำตาลเข้มปกคลุม กระเป๋าสีเหลืองอมน้ำตาล โล่สีเหลืองรูปทรงคล้ายรูปหัวใจกลับหรือไข่กลับ ผิวขรุขระ กึ่งกลางมีติ่งเล็กๆสีเหลืองเข้ม ด้านบนหยักเป็นร่อง ด้านล่างหยักเป็นเขี้ยว (อุไร, 2545) เมื่อยอดใหม่เจริญเติบโตเต็มที่ก็จะออกดอกจากตายอดนั้น ซึ่งตรงกับช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายน ในบางครั้งแม้สามารถพบรองเท้านารีเหลืองกระบี่อยู่บนภูเขาหรือพื้นที่เดียวกันกับรองเท้านารีเหลืองตรังและรองเท้านารีขาวสตูล แต่ก็อยู่ในจุดที่มีสภาพแวดล้อมจำเพาะแตกต่างกันอย่างชัดเจนมาก โดยรองเท้านารีเหลืองกระบี่จะขึ้นอยู่บนลานกลางแจ้ง โขดหิน หรือชะง่อนหินที่อยู่บนหน้าผาที่ชันมาก ซึ่งมีแสงแดดจัด ไม่มีที่บังความแรงของน้ำฝนและกระแสลมที่แรง ในขณะที่รองเท้านารีเหลืองตรังและรองเท้านารีขาวสตูลจะขึ้นอยู่ที่ซอกหิน ข้างพุ่มไม้ หรือบริเวณที่ซ่อนเร้นจากความรุนแรงของสภาพแวดล้อม (ระพี, 2535)

<u>งานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชในวงศ์กล้วยไม้</u>

ประเดิม (2543) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีหมวด *Brachypetalum* ด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) จากการพัฒนาองค์ประกอบของสารละลายที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามเทคนิคอาร์เอพีดีสำหรับกล้วยไม้รองเท้านารีในหมวด *Brachypetalum* พบว่าส่วนประกอบที่เหมาะสมของสารละลายได้แก่ genomic DNA ความเข้มข้น 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร magnesium chloride ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ arbitrary primer ความเข้มข้น 4 ไมโครโมลาร์ dNTPs ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และ *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิตต่อปริมาตรรวมของสารละลาย 12.5 ไมโครลิตร โดยสามารถคัดเลือกไพรเมอร์ที่ทำให้เกิดความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอได้จำนวน 8 ไพรเมอร์ จากการทดสอบจำนวน 520 ไพรเมอร์ การศึกษาความสัมพันธ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 6 ชนิดๆละ 19-27 ตัวอย่าง โดยใช้แถบดีเอ็นเอจำนวน 122 แถบ พบว่ารองเท้านารีเหลืองปราจีนมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับรองเท้านารีฝาหอยมากที่สุด โดยมีดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.55 ลำดับถัดมาซึ่งมีความสัมพันธ์ห่างออกมาได้แก่ รองเท้านารีเหลืองตรัง มีดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.52 รองเท้านารีขาวสตูลมีความสัมพันธ์เป็นลำดับถัดมา มีดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.50 และถัดมา

ได้แก่รองเท้านารีช่องอ่างทอง มีดัชนีความเหมือนเท่ากับ 0.47 และรองเท้านารีขาวชุมพรมีความสัมพันธ์ห่างจากชนิดอื่นมากที่สุดคือมีดัชนีความเหมือนเพียง 0.29 นอกจากนี้ยังได้ทำการตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 6 ชนิดเพื่อเป็นตัวแทนในการจำแนก ปรากฏว่าไม่พบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์จากการใช้ไพรเมอร์ทั้ง 8 ชนิดเลย

Barkman *et al.* (1997) ศึกษาความหลากหลายของสารชีวเคมีที่ทำให้เกิดกลิ่นในกล้วยไม้สกุล *Cypripedium* โดยใช้ GC-mass spectrometry พบว่าองค์ประกอบของสารชีวเคมีที่ทำให้เกิดกลิ่นในกล้วยไม้สกุลนี้ ประกอบด้วยรูปแบบโมเลกุลที่มีความหลากหลายของสารประเภท benzenoid, terpenoid และ fatty alcohol จากการวิเคราะห์ผลโดยใช้วิธี UPGMA (unweighted pair group method arithmetic average) ทำให้ทราบรูปแบบความสัมพันธ์ในด้านความใกล้เคียงของสารชีวเคมีที่ทำให้เกิดกลิ่นในดอกกล้วยไม้สกุลนี้ โดยข้อมูลที่ได้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปประกอบการพิจารณาเพื่อทำความเข้าใจเกี่ยวกับระบบการผสมเกสรโดยแมลงพาหะ (pollinators) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดวิวัฒนาการของกล้วยไม้สกุลนี้

Chung *et al.* (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* และสกุล *Phragmipedium* โดยใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ในการศึกษาครั้งนี้เทคนิคอาร์เอพีดีสามารถแยกความแตกต่างของกล้วยไม้รองเท้านารีทั้ง 2 สกุลได้อย่างชัดเจน และผลการวิเคราะห์มีความสอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าข้อมูลความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (phylogenetic information) ที่ได้จากเทคนิคอาร์เอพีดีนี้ น่าจะสามารถนำมาใช้บ่งชี้ความสัมพันธ์ระดับชนิดภายในกล้วยไม้ทั้ง 2 สกุลนี้ได้เป็นอย่างดี

Li *et al.* (2002) ได้ใช้เทคนิคอาร์เอพีดีเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารี *Paphiopedilum micranthum* ซึ่งเป็นกล้วยไม้รองเท้านารีที่ใกล้สูญพันธุ์มีการกระจายพันธุ์อยู่ในประเทศจีน พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 12 ชนิด ทำให้เกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำนวน 131 แถบ ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 200-1400 คู่เบส มีค่าเฉลี่ยจำนวนแถบดีเอ็นเอต่อการใช้ไพรเมอร์ 1 ชนิดเท่ากับ 10.9 จากข้อมูลที่ได้พบว่าค่า percentage of polymorphic bands (*P*) มีค่าเท่ากับ 73.3% เมื่อพิจารณาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรพบว่าค่า *P* มีค่าอยู่ระหว่าง 28.4%-58.2% โดยค่านี้สอดคล้องกับค่า expected heterozygosity (*H*) และค่า Shannon index (*I*) ในทิศทางเดียวกัน จากการใช้โปรแกรม AMOVA

คำนวณค่า genetic differentiation ระหว่างประชากรพบว่าระหว่างประชากรของ *Paph. micrantrum* มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่น $p < 0.001$ มีค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในประชากรสูงถึง 79.69% ในขณะที่ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรมีค่าเท่ากับ 20.31%

Montieri *et al*. (2004) ใช้ข้อมูลยีน *LEAFY* (*LFY*) จากฐานข้อมูลต้น *Arabidopsis thaliana* ในการโคลนยีน *OrcLFY* ของกล้วยไม้ *Orchis italica* และได้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับยีนตำแหน่งเดียวกันในกล้วยไม้อีก 14 ชนิด พบว่ายีน *LFY* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการพัฒนาของดอกไม้ มีความเกี่ยวข้องต่อการเกิดวิวัฒนาการของกล้วยไม้ที่ทำการศึกษาจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ายีน *OrcLFY* สามารถใช้เป็นเครื่องมือตรวจสอบความใกล้ชิดทางพันธุกรรมและวิวัฒนาการของพืชในวงศ์กล้วยไม้ได้เป็นอย่างดี

Sharma *et al*. (2003) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ดิน *Pterostylis aff. picta* ซึ่งเป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นใกล้สูญพันธุ์ของประเทศออสเตรเลีย โดยใช้การวิเคราะห์อัลโลไซม์ (allozymic polymorphism) พบว่าค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมมีค่าสูงทั้งในระดับสปีชีส์และระดับประชากร โดยมีค่า percentage of polymorphic loci (*P*) เท่ากับ 69.47% จำนวนอัลลีลต่อตำแหน่ง (*A*) เท่ากับ 2.04 ค่า observed heterozygosity และ expected heterozygosity เท่ากับ 0.275 และ 0.284 ตามลำดับ ค่า *Gst* ของ 9 ประชากรเท่ากับ 0.05 ซึ่งบ่งบอกความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรทุกประชากรมีค่าประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ค่า gene flow เฉลี่ย(*Nm*) เท่ากับ 4.37 บ่งบอกถึงการเกิด gene flow อยู่ในระดับที่สูง จากข้อมูลที่ได้สามารถใช้ยืนยันได้ว่าสาเหตุของการลดจำนวนลงจนถึงภาวะใกล้สูญพันธุ์ของกล้วยไม้ดินชนิดนี้ไม่ได้มาจากอิทธิพลของปัจจัยทางพันธุกรรม โดยสันนิษฐานว่าการใกล้สูญพันธุ์เกิดขึ้นจากปัจจัยภายนอกอื่นๆ

Sharma *et al.* (2001) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมทั้งภายในชนิดและระหว่างชนิด ของกล้วยไม้สกุล *Pterostylis* ซึ่งเป็นกล้วยไม้เฉพาะถิ่นที่อยู่ทางตะวันตกของออสเตรเลีย โดยการวิเคราะห์อัลโลไซม์ จากกล้วยไม้ในสกุล *Pterostylis* 6 ชนิด จำนวนทั้งหมด 35 ประชากร ซึ่งประกอบด้วย *P. rogersii, P. aspera, P. angusta, P. hamiltonii, P. scabra* และ *P. aff. alata* เมื่อตรวจสอบโดยใช้เอนไซม์ 12 ชนิด จำนวน 15 ตำแหน่ง พบว่าค่า Nei's genetic distance/identity coefficient ซึ่งนำมาใช้วัดระดับความแตกต่างของประชากรและ

ระหว่างชนิดเผยให้เห็นว่าในแต่ละประชากรมีการจัดกลุ่มกันอย่างสอดคล้องกับชนิดของประชากรนั้น การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ค่า heterozygosity (He) เท่ากับ 0.23 โดยมีค่า coefficient of gene differentiation 10% (*Gst*=0.10) มีค่าเฉลี่ยของ heterozygosity เท่ากับ 0.136 และค่าเปอร์เซ็นต์ polymorphism เท่ากับ 40% ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่าพืชผสมข้ามชนิดอื่นๆ ค่า mean genetic identity coefficient ของประชากรชนิดต่างๆเท่ากับ 0.859 โดยพบว่าค่าดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นเป็น 0.877 เมื่อตัด *P. aff. alata* ออกไป บ่งบอกถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างชนิดต่างๆภายในกล้วยไม้เหล่านี้ โดยที่ *P. aff. alata* มีความแตกต่างจากกลุ่มมากที่สุด

Zettler and Hofer (1998) ทำการศึกษาวิธีเพาะขยายพันธุ์กล้วยไม้ดิน *Platanthera clavellata* โดยใช้ความสัมพันธ์แบบพึ่งพา (symbiotic) ระหว่างเชื้อรากับเมล็ดกล้วยไม้ จากการเฝ้าสังเกตและเก็บข้อมูลเป็นเวลา 1 ปี พบว่าเมล็ดกล้วยไม้ *Platanthera clavellata* มีอัตราการเจริญเติบโตที่แตกต่างเมื่อใช้เชื้อราสกุล *Epulorhiza* ต่างชนิดกัน ผลการทดลองบ่งบอกอย่างชัดเจนว่าเชื้อราที่แยกได้จากรากของกล้วยไม้ *Platanthera clavellata* โดยตรง ทำให้เกิดการตอบสนองที่ดีต่อการงอกของเมล็ดกล้วยไม้มากที่สุด การทดลองนี้สามารถใช้ยืนยันได้เป็นอย่างดีถึงความสัมพันธ์ที่เฉพาะเจาะจงระหว่างชนิดของเชื้อรากับการงอกของเมล็ดกล้วยไม้ป่าในธรรมชาติ

<u>การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต</u>

ความหลากหลายทางพันธุกรรมคือความแตกต่างซึ่งมีลักษณะที่หลากหลายของหน่วยสิ่งมีชีวิต ตั้งแต่ระดับเซลล์ ระดับประชากร ไปจนถึงระบบนิเวศน์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นไป ความหลากหลายทางพันธุกรรมเกิดขึ้นจากการกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งเป็นกลไกที่เกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ หน่วยพันธุกรรมหรือยีนทุกตำแหน่ง และลำดับนิวคลีโอไทด์ทุกๆบริเวณมีโอกาสเกิดการกลายพันธุ์ได้ และความถี่ของการกลายพันธุ์ในตำแหน่งต่างๆของจีโนมเป็นคุณสมบัติเฉพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด นอกจากนี้ยีนแต่ละยีนหรือแม้กระทั่งอัลลีล (allele) หรือรูปแบบของยีนที่ต่างกันของยีนเดียวกันก็ยังมีความถี่ของการกลายพันธุ์ที่แตกต่างกันอีกด้วย (สิรนุช, 2540) ถึงแม้ว่าโมเลกุลของดีเอ็นเอมีความสามารถที่จะจำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่โดยรายละเอียดแล้วบางครั้งก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง (สุรินทร์, 2545) ปัจจัยที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์นั้นยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่นอน แต่สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 สาเหตุกว้างๆคือ เกิดขึ้นจากปัจจัยภายในได้แก่องค์ประกอบทางพันธุกรรมกับสภาพ

ทางสรีรวิทยา และปัจจัยจากภายนอกซึ่งได้แก่อาหาร อุณหภูมิ รังสีหรือสิ่งก่อกลายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (สิรนุช, 2540)

ถ้าจะกล่าวถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความจำเป็นสำหรับประชากรในการที่จะปรับตัวไปสู่การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา ยกตัวอย่างเช่นการเปลี่ยนแปลงของสภาพดิน ฟ้าอากาศ สภาพแวดล้อมทางกายภาพและชีวภาพที่มีการเปลี่ยนแปลงไป รวมถึงการเกิดโรคระบาด ภาวะการถูกล่า และภาวการณ์แข่งขันที่เกี่ยวกับปัจจัยในการดำรงชีวิตอื่นๆ จากเหตุการณ์ดังกล่าวสิ่งมีชีวิตจำเป็นที่จะต้องปรับตัวให้ได้หรือไม่เช่นนั้นก็ต้องสูญพันธุ์ไป ประชากรที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงจะสามารถตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ โดยที่ประชากรส่วนหนึ่งอาจจะล้มตาย ในขณะที่อีกส่วนหนึ่งซึ่งมีคุณสมบัติที่ปรับตัวให้อยู่รอดได้ก็จะสืบทอดเผ่าพันธุ์ต่อไป ความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถวัดได้จากการศึกษาทางปริมาณโดยอาศัยเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) สามารถทำการศึกษาได้ทั้งในระดับสัณฐานวิทยาซึ่งเป็นการศึกษาเบื้องต้น และระดับโมเลกุลอันได้แก่การศึกษาโปรตีนและดีเอ็นเอ โดยเฉพาะการศึกษาความหลากหลายโดยใช้ดีเอ็นเอได้รับความสนใจจากนักวิจัย และมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องตลอดมา (Frankham *et al*., 2002)

<u>การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม</u>

การศึกษาเครื่องหมายหรือ marker ก็เพื่อบ่งชี้ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณและคุณภาพ อาจเป็นการจำแนกความแตกต่างระหว่างและภายในสปีชีส์ (between and within species) ระหว่างและภายในประชากร (between and within populations) หรือระหว่างแต่ละตัว (between individuals) ก็ได้ เครื่องหมายที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างนี้มี 2 ประเภทคือเครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) และเครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยาเป็นการบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตโดยการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยาหรือทางสรีรวิทยา โดยลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักจะได้รับอิทธิพลจากสภาพแวดล้อมมาเกี่ยวข้อง ทำให้การตรวจสอบผลอาจผิดพลาดได้ ส่วนเครื่องหมายทางโมเลกุลมี 2 ระดับคือ ระดับโปรตีนซึ่งเป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ และในระดับดีเอ็นเอซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545)

เครื่องหมายโปรตีน (protein marker) การตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลของโปรตีน ใช้วิธีแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม เทคนิคที่ได้รับความนิยมคือการตรวจสอบรูปแบบของเอนไซม์บางชนิดหรือไอโซไซม์ต่างๆ ข้อดีของการตรวจสอบโปรตีนคือ สามารถตรวจได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก และแถบของโปรตีนหรือไอโซไซม์นี้ยังมีการข่มร่วมกันแบบ codominant ช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้ ส่วนข้อด้อยของการตรวจสอบโปรตีนหรือไอโซไซม์คือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังมีไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษา จึงต้องเลือกเนื้อเยื่อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ผลที่ได้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะของการเจริญเติบโตและสิ่งแวดล้อมด้วย ในทางปฏิบัติยังมีข้อจำกัดอยู่มากโปรตีนและไอโซไซม์ยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัด ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้นานได้ ในแง่ของโอกาสการตรวจพบความแตกต่างในระดับโปรตีนยังมีค่าต่ำมากเมื่อเทียบกับการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากอัลลีลหรือรูปแบบของยีนที่แตกต่างกันนั้น นิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันอาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน หรือบางครั้งแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งแล้วก็ตาม อาจจะไม่มีผลต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลเมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำให้ไม่สามารถตรวจพบความแตกต่างนั้นๆได้ (สุรินทร์, 2545)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) สามารถศึกษาได้ง่ายและสะดวกกว่าเนื่องจากมีข้อจำกัดน้อยกว่าการตรวจสอบโปรตีน เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใดๆ ระยะการเจริญเติบโต หรือสภาพทางสรีรวิทยาใดก็ได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง มีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆให้เลือกนำมาประยุกต์ใช้ได้มากมาย ซึ่งสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ ทำให้สามารถศึกษาได้โดยไม่จำกัดและครอบคลุมทั้งจีโนม (สุรินทร์, 2545)

<u>เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) กับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม</u>

เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) หมายถึงดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิต เป็นได้ทั้งดีเอ็นเอที่อยู่ที่ตำแหน่งหนึ่งๆบนโครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอ

ในออร์แกเนลล์ ซึ่งได้แก่ไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) หรือคลอโรพลาสต์ดีเอ็นเอ (chloroplast DNA) ก็ได้ การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเกิดโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545)

วิธีตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) ทำได้โดยการหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) หรือตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต มีที่มาจากการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ซึ่งเป็นวิธีการที่ทำให้เกิดลายพิมพ์หรือแบบแผนของดีเอ็นเอที่จำเพาะ สามารถตรวจสอบรูปแบบความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมได้ วิธีศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมได้แก่วิธีไฮบริไดเซชั่น (hybridization) และวิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) (สุรินทร์, 2545)

1. วิธีไฮบริไดเซชั่น ได้แก่เทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) การตรวจสอบทำได้ทั้งส่วนที่เป็นยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน ดีเอ็นเอในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอยู่ในนิวเคลียสและออแกเนลล์บางชนิดได้แก่คลอโรพลาสต์ และไมโตคอนเดรีย ทำได้โดยนำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้นมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์นั้น วิธีดังกล่าวนี้ทำได้ผลดีในดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กเช่นดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์หรือไมโตคอนเดรียเท่านั้น ในกรณีที่ศึกษาอาร์เอฟแอลพีจากดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ในนิวเคลียสของยูคาริโอท จะมีวิธีการที่ซับซ้อนกว่าเนื่องจากขนาดของจีโนมที่ใหญ่กว่า เช่นเมื่อนำดีเอ็นเอจากนิวเคลียสของยูคาริโอทชนิดหนึ่งมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะตัดได้ปริมาณมากมาย เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้มาแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) และย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) จะปรากฏเป็นรอยยาวต่อเนื่อง (smear) ซึ่งไม่สามารถแยกแถบย่อยแต่ละแถบได้ การตรวจสอบนั้นจำเป็นต้องชี้เฉพาะลงไปที่ยีนหรือตำแหน่งจำเพาะบนจีโนมหรือโครโมโซม โดยใช้โพรบ (probe) ที่สามารถไฮบริไดซ์ (hybridize) ได้กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณนั้น และใช้เทคนิคการถ่ายดีเอ็นเอจากเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสลงไปบนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ แล้วนำแผ่นฟิลเตอร์นั้นมาไฮบริไดซ์กับโพรบที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารปลอดรังสีบางชนิด เพื่อหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกับโพรบที่ใช้โดยวิธี Southern blotting ข้อเสียของเทคนิคอาร์เอฟแอลพีก็คือ มีขั้นตอนที่ยุ่งยาก

มีค่าใช้จ่ายสูง จำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอปริมาณมากและคุณภาพดี นอกจากนั้นการใช้สารกัมมันตรังสีอาจจะมีอันตราย ต้องทำในพื้นที่ควบคุม และปฏิบัติงานโดยผู้มีความชำนาญ ดังนั้นจึงมีการตรวจโพลีมอร์ฟิซึมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งสามารถทำได้ง่ายและรวดเร็วกว่า (สุรินทร์, 2545)

2. วิธีเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) เป็นวิธีที่มีการประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในตำแหน่งเฉพาะหรือในบริเวณที่สนใจได้มากมาย โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบเพียงเล็กน้อย เป็นเทคนิคที่มีความรวดเร็ว มีความแม่นยำสูง และยังใช้งบประมาณไม่แพง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กว้างขวางในวิทยาศาสตร์ชีวภาพทุกแขนง หลักการสำคัญโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ในหลอดทดลองมีวิธีการโดยสรุปคือ สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ แล้วนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ 2 ชนิดที่สังเคราะห์เตรียมไว้ ไพรเมอร์แต่ละตัวซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์จะเข้าเกาะที่ด้านปลาย 3′ ของดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) โดยอาศัยความจำเพาะของลำดับเบสที่เป็นคู่สมกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ จากนั้นเอนไซม์ DNA polymerase จะทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ต่อจากทางด้านปลาย 3′ ของไพรเมอร์แต่ละชนิด การสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จึงเกิดขึ้นในทิศทางจาก 5′ ไป 3′ ไพรเมอร์ทั้งสองจะช่วยกันเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอได้เป็นจำนวนทวีคูณในแต่ละรอบของปฏิกิริยา โดยปฏิกิริยาแต่ละรอบนั้นเกิดขึ้นจากการควบคุมอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบแยกตัวออกจากกัน (denaturation temperature) ตามด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการให้ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ตามด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase (extension temperature) เมื่อเสร็จสิ้นก็จะขึ้นรอบใหม่ซึ่งเหมือนกันกับรอบเดิม เป็นแบบนี้เรื่อยไปจนครบจำนวนรอบที่ตั้งเอาไว้ เมื่อดำเนินปฏิกิริยาพีซีอาร์จบแล้ว นำผลที่ได้ไปทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสและย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ซึ่งจะสามารถตรวจสอบขนาดของผลผลิตที่ได้ว่ามีความยาวเท่าใดโดยใช้ดีเอ็นเอที่ทราบขนาดแล้วมาเปรียบเทียบ ความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเกิดจากการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายไปของส่วนของดีเอ็นเอภายในชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย ในบางกรณีแม้ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จะเท่ากันแต่ก็อาจมีความแตกต่างของเบสภายในได้ ซึ่งต้องมีวิธีตรวจสอบที่ซับซ้อนมากขึ้นต่อไปอีก (Surzycki, 2000)

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีพื้นฐานมาจากเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ถูกพัฒนาอย่างต่อเนื่องอยู่ตลอดเวลา วิธีที่รู้จักกันดีได้แก่ อาร์เอพีดี

(RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) และเอเอฟแอลพี (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism)

อาร์เอพีดี (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA) เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์อีกแบบหนึ่ง โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอในบริเวณใด (arbitrary primer) วิธีการนี้มีการเรียกชื่อแบบอื่นได้อีกเช่น Arbitrary Primed PCR (AR-PCR), DNA Amplification Fingerprinting (DAF) หรือ Multiple Arbitrary Amplicon Profiling (MAAP) ซึ่งแต่ละวิธีที่เรียกนี้มีข้อแตกต่างกันบ้างคือขนาดของไพรเมอร์ที่ใช้ แต่หลักการไม่แตกต่างกันคือใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดสั้นเพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม มีนักวิจัยบางกลุ่มใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดพร้อมกันซึ่งก็ใช้ได้เช่นเดียวกัน แต่ที่นิยมคือใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวและใช้วิธีแบบที่เรียกว่าอาร์เอพีดี โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (สุรินทร์, 2545)

ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) คือส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นเบสซ้ำขนาด 1-6 เบส โดยที่จำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งมีตั้งแต่ 2 ขึ้นไป ไม่เกิน 100 ครั้ง กระจายทั่วจีโนม จึงถูกเรียกว่าเอสเอสอาร์ (SSR; Simple Sequence Repeat) ไมโครแซทเทลไลท์ที่พบในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต (eukaryote) จะมีชื่อเรียกแตกต่างกันตามจำนวนเบสของลำดับเบสแกน (core sequence) โดย 1 เบส เรียกว่าชุดซ้ำแบบโมโนนิวคลีโอไทด์ (mononucleotide repeat) 2 เบส เรียกว่าชุดซ้ำแบบไดนิวคลีโอไทด์ (dinucleotide repeat) 3 เบส เรียกว่าชุดซ้ำแบบไตรนิวคลีโอไทด์ (trinucleotide repeat) 4 เบส เรียกว่าชุดซ้ำแบบเตรตระนิวคลีโอไทด์ (tetranucleotide repeat) (สุดาวัลย์, 2546) การศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสามารถใช้ร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ได้ โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์นั้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์ การออกแบบไพรเมอร์จะใช้ลำดับเบสที่ขนาบข้างไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (microsatellite franking region) นำมาออกแบบไพรเมอร์ วิธีนี้สามารถแสดงให้เห็นความแตกต่างของจำนวนชุดซ้ำหรืออัลลีล (allele) ที่เกิดขึ้นในแต่ละตำแหน่งไมโครแซทเทลไลท์ได้ การศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ใช้เวลาสั้นในการทำแต่ละครั้ง เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างสูงและแสดงให้เห็นสภาพข่มร่วมกัน (codominance) สามารถทำได้ง่าย ต้องการดีเอ็นเอเริ่มต้นในปริมาณที่น้อย และเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง ได้แก่การศึกษา

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ การทำแผนที่พันธุกรรมหรือแผนที่ยีน การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และการโคลนยีนเป็นต้น (ศรีจรรยา, 2546)

<u>เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism)</u>

เอเอฟแอลพีเป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) แบบหนึ่ง เทคนิคเอเอฟแอลพีพัฒนาขึ้นโดย Zabeau และ Vos นักวิจัยของบริษัท Keygene N.V. ประเทศเนเธอร์แลนด์ (Vos and Kuiper, 1997) และ (Vos *et al*., 1995) พื้นฐานของเอเอฟแอลพีคือการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้นจึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิคอาร์เอฟแอลพีและประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์เข้าด้วยกัน (สุรินทร์, 2545)

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่มาจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำได้โดยการเชื่อมต่อ adapter เข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอต่อจากตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ โดย adapter เป็นดีเอ็นเอสายคู่ชิ้นสั้นๆ ที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นปลายเหนียวเหมือนกับปลายโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ดังนั้นจึงสามารถเชื่อมต่อกับชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดไว้ได้โดยใช้ปลายเหนียว (sticky end ligation) และจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งที่จับของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ต่อไป ด้วยวิธีดังกล่าวนี้ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ก็จะสามารถเพิ่มปริมาณขึ้นได้โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับส่วนของ adapter รวมกับส่วนของเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในคราวเดียวกันมีมาก และไม่สามารถแยกจากกันหรือตรวจสอบโดยวิธีทั่วๆไปเช่นการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ดังนั้นการสังเคราะห์ไพรเมอร์ในการทำเอเอฟแอลพีจึงเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกเข้าที่ปลาย 3′ ต่อจากเบสที่ตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ เพื่อให้เลือกจับกับชิ้นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ต่อจากบริเวณตัดจำเพาะ สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์นั้นเท่านั้น ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเพียงบางส่วนและสามารถกำหนดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณได้โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปนั่นเอง ถ้าดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหรือจีโนมที่ศึกษามีส่วนประกอบของเบสทั้ง 4 ชนิด (G, A, C, T) ในสัดส่วนเท่ากัน การเพิ่มเบสเข้าที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์เพื่อคัดเลือก 1 เบส จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณเหลือเพียง 1 ใน 4 ของทั้งหมด หรือลดลงเท่ากับ $(1/4)^n$ ของทั้งหมด (n คือจำนวนเบสสำหรับคัดเลือกที่เพิ่มขึ้น) ดังนั้นจึงสามารถควบคุมให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในปริมาณที่เหมาะสมได้ ในทางปฏิบัติต้องการให้มีจำนวนชิ้นดีเอ็นเอในช่วง 50-100 แถบ ซึ่งเป็นช่วงที่สามารถตรวจสอบได้โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสใน denaturing

polyacrylamide gel ในสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดเล็กจะใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกจำนวนน้อย เพราะจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีจำนวนน้อย ในขณะที่การตรวจสอบดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใหญ่หรือมีความซับซ้อนมาก ต้องใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกจำนวนมากขึ้น เพื่อปรับจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณให้มีจำนวนพอเหมาะ แบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์คู่หนึ่งๆเรียกว่าลายพิมพ์เอเอฟแอลพี (AFLP fingerprint) ดังนั้นเทคนิคเอเอฟแอลพีจึงเป็นวิธีตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอวิธีหนึ่ง แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ของแต่ละตัวอย่างบ่งบอกถึงความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แต่โพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ของเทคนิคเอเอฟแอลพีไม่ได้เกิดจากความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอเหมือนในอาร์เอฟแอลพี จะเกิดจากการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้น (สุรินทร์, 2545)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำเอเอฟแอลพีมีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใดๆก็ได้ ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ที่เหมาะสมได้โดยปรับจำนวนเบสคัดเลือกที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์ที่ใช้ แม้ว่าวิธีการทำเอเอฟแอลพีจะค่อนข้างยุ่งยาก แต่ผลที่ได้สามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) และสามารถเลือกคู่ผสมของไพรเมอร์ได้หลายแบบ ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์คู่หนึ่งนั้นจะเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมากในเวลาเดียวกัน แบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นมาจากการเปลี่ยนแปลงเบส (point mutation) ที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ทำให้ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์หายไปหรือเกิดขึ้นใหม่ หรือการเปลี่ยนแปลงของเบสที่ตำแหน่งติดกับตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตรงส่วนที่มีการเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกของไพรเมอร์ที่ใช้ ทำให้สามารถหรือไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวแล้วแต่กรณี หรืออาจเกิดจากการมีชิ้นดีเอ็นเอสั้นๆขาดหายไป หรือสอดแทรกเข้ามาในระหว่างตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ก็ได้ ผลที่เกิดขึ้นคือการมีแถบดีเอ็นเอ หรือไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้นๆ หรือชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาดเปลี่ยนไป การถ่ายทอดลักษณะของแถบดีเอ็นเอจากการทำเอเอฟแอลพีจึงมีทั้งแบบที่แสดงลักษณะข่ม (dominance) โดยปรากฏเป็นการมีหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอ และแบบที่แสดงลักษณะข่มร่วมกัน (codominance) โดยปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกัน โดยทั่วไปจะพบเครื่องหมายเอเอฟแอลพีแบบที่เป็นลักษณะข่มมากกว่า ถึงแม้ว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีตั้งชื่อเลียนแบบจากเทคนิคอาร์เอฟแอลพี แต่โพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ไม่ได้เกิดจากความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอเหมือนในอาร์เอฟแอลพี จะเกิดจากการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้น ข้อได้เปรียบที่สำคัญของเอเอฟแอลพีคือไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของ

ดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษามาก่อน และด้วยประสิทธิภาพของเทคนิคพีซีอาร์จึงทำการศึกษาได้อย่างรวดเร็วและใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นจำนวนน้อย นอกจากนั้นในการทำปฏิกิริยาครั้งหนึ่งๆ สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่ง (multilocus) พร้อมกัน ในหนึ่งปฏิกิริยาจะให้แถบดีเอ็นเอมากกว่าอาร์เอพีดีประมาณ 4 เท่า จึงทำให้เกิดโพลีมอร์ฟิซึมได้จำนวนมาก จึงสามารถใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง หรือการศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิตได้ดี โดยสามารถใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีได้กับสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใดก็ได้ โดยการปรับจำนวนเบสที่ใช้คัดเลือกที่ส่วนปลาย 3′ ของไพรเมอร์ หรือใช้กับดีเอ็นเอที่โคลนไว้ก็ได้ แต่เทคนิคเอเอฟแอลพีก็มีข้อจำกัดในด้านค่าใช้จ่ายเริ่มต้นที่ค่อนข้างสูง วิธีการที่ทำค่อนข้างซับซ้อนเมื่อเทียบกับอาร์เอพีดีและไมโครแซทเทลไลท์ และแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่แสดงการข่มแบบ dominance ซึ่งทำให้วิเคราะห์ผลได้ยากกว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบที่เป็น codominance เช่นอาร์เอฟแอลพี และไมโครแซทเทลไลท์ (สุรินทร์, 2545)

<u>งานวิจัยที่ศึกษาโดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี</u>

Chen *et al.* (1998) ได้ใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีในการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ของกล้วยไม้ลูกผสมกลุ่ม Vandaceous ซึ่งประกอบด้วย *Aranda* Christine 2 สายพันธุ์ และ *Mokara* Willie How 5 สายพันธุ์ พบว่าเกิดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เหมาะสมเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ *Eco*RI ซึ่งมีเบสคัดเลือก 4 ตัว (*Eco*RI+4) ร่วมกับไพรเมอร์ *Mse*I ซึ่งมีเบสคัดเลือก 3 ตัว (*Mse*I+3) โดยรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นสามารถทำซ้ำแล้วได้ผลดังเดิม (reproducibility) นอกจากนี้การใช้ชิ้นส่วนของต้นกล้วยไม้ที่แตกต่างกันเช่นใบกับดอก และดอกที่มีระยะการพัฒนาที่แตกต่างกันนำมาสกัดดีเอ็นเอแล้ววิเคราะห์เอเอฟแอลพี ทำให้เกิดรูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกัน ในด้านความผันแปรทางพันธุกรรมพบว่ามีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดโพลีมอฟิซึมมากกว่า 10% เมื่อทดสอบระหว่างสายพันธุ์ภายในกลุ่มเครือญาติที่มาจากคู่ผสมเดียวกันได้แก่ *Aranda* Chistine 2 สายพันธุ์ และ *Mokara* Willie How 5 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบระหว่างสายพันธุ์ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากการเกิด somatic mutation จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ *Aranda* Christine 2 สายพันธุ์ และ *Mokara* Chark Kuan 4 สายพันธุ์ พบว่าเกิดโพลีมอร์ฟิซึมเพียง 0.3-0.7 เปอร์เซ็นต์

Despres *et al.* (2003) ศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุล *Trollius* (Ranunculaceae) ซึ่งจากการศึกษาโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาก่อนหน้านี้ พบว่าข้อมูลมีความซับซ้อนและไม่

สามารถอธิบายความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้อย่างชัดเจน จากการใช้เทคนิค เอเอฟแอลพีทำให้ได้ข้อมูลจำนวนมากถึง 247 ตำแหน่ง ในจำนวนนี้มี 185 ตำแหน่ง ที่แสดงความแตกต่างทางพันธุกรรม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างถึง 75 เปอร์เซ็นต์เมื่อทำการวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรม โดยใช้ข้อมูลที่ได้พบว่าได้ข้อมูลใหม่ๆเพิ่มเติมจำนวนมาก ทำให้ความเข้าใจในวิวัฒนาการของพืชสกุลนี้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

Rottenberg and Parker (2003) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้น *Rumex rothschildianus* (Polygonaceae) ซึ่งเป็นพืชเฉพาะถิ่นและใกล้สูญพันธุ์ของประเทศอิสราเอล โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีประเมินสถานภาพทางพันธุกรรมของประชากรที่เหลืออยู่ของพืชชนิดนี้ 2 ประชากรพบว่าค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *R. rothschildianus* มีค่า $H = 0.17$ โดยมีค่าตำแหน่งที่เกิดโพลีมอร์ฟิซึมเท่ากับ 48.9% และค่า gene flow ที่ได้ บ่งบอกว่ามีความแตกต่างระหว่างสองประชากรอยู่ในระดับปานกลาง (mean *Fst = 0.09*) จากผลการทดลองที่ได้สามารถนำไปใช้กำหนดแนวทางการจัดการเพื่อการอนุรักษ์พืชเฉพาะถิ่นซึ่งใกล้สูญพันธุ์ชนิดนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Loh *et al.* (2000) ได้พัฒนาวิธีการจำแนกกล้วยพันธุ์ปลูก 16 พันธุ์ (*Musa* cvs.) ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีโดยใช้ไพรเมอร์ 8 คู่ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเทคนิคเอเอฟแอลพี สามารถใช้จำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์กล้วยเป็นผลสำเร็จโดยใช้รูปแบบของการเกิดแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่จำเพาะ จากผลที่ได้ยังสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาตัวตรวจสอบที่จำเพาะ (specific probe) เพื่อการจำแนกพันธุ์กล้วยได้ นอกจากนี้ผลการทดลองยังสนับสนุนว่าการจัดหมวดหมู่ความสัมพันธ์ของพันธุ์กล้วย มีความจำเป็นต้องใช้ข้อมูลทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางจีโนไทป์ที่ได้จากการศึกษาโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลมาพิจารณาร่วมกันด้วย

Loh *et al.* (2000) ใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีในการศึกษาอนุกรมวิธานและการจัดจำแนกไผ่ ซึ่งเป็นพืชที่ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกได้ยาก เนื่องจากไผ่เป็นพืชที่ออกดอกไม่ต่อเนื่องหรือตามฤดูกาลเหมือนพืชส่วนใหญ่ โดยได้ศึกษาไผ่ในเผ่าย่อย Bambusinae จำนวน 4 สกุลคือ *Bambusa, Dendrocalamus, Gigantochloa* และ *Thysostachys* จำนวนรวม 15 ชนิด พบลายพิมพ์เอเอฟแอลพีที่มีความจำเพาะกับไผ่ 13 ชนิด จากไผ่ที่ใช้ศึกษาทั้งหมด 15 ชนิด จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ลายพิมพ์เอเอฟแอลพีในการจัดจำแนกไผ่ชนิดต่างๆ โดยอาศัยรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะ นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์จัดกลุ่มโดยใช้ค่าดัชนีความเหมือน

(similarity index) โดยวิธี UPGMA ยังชี้ให้เห็นว่า การจัดกลุ่มมีการกระจายตัวที่มีทั้งสอดคล้องและไม่สอดคล้องกับหลักการจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาก่อนหน้านี้ ผลการวิเคราะห์ชี้ให้เห็นว่าไผ่ 6 ชนิดในสกุล *Bambusa* ถูกแยกออกเป็น 2 กลุ่มชัดเจน ไผ่สกุล *Gigantochloa* มีการจัดกลุ่มแบบกระจายตัว ในขณะที่สกุล *Thysostachys* มีการจัดกลุ่มได้ใกล้ชิดกับสกุล *Bambusa* ผลการทดลองยังยืนยันว่ามีความเหมาะสมที่จะจัด *Bambusa lako* อยู่ในสกุล *Gigantochloa* มากกว่าอยู่ในสกุล *Bambusa* ส่วนไผ่สกุล *Dendrocalamus* โดยรวมแล้วมีการจัดกลุ่มได้ใกล้ชิดกับสกุล *Bambusa* โดยมี *Dendrocalamus giganteus* เพียงชนิดเดียวที่จัดกลุ่มแยกต่างหากจากสกุลอื่นๆทั้งหมด ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการศึกษาอนุกรมวิธานของไผ่ โดยเฉพาะในสกุล *Dendrocalamus* ยังต้องการข้อมูลสนับสนุนอีกมาก และเทคนิคเอเอฟแอลพีเป็นเครื่องมือหนึ่งที่มีความเหมาะสมในการนำมาใช้ศึกษาอนุกรมวิธานของไผ่ในเผ่าย่อยอื่นๆได้ต่อไป

Lucchini (2003) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคเอเอฟแอลพีในการตรวจสอบ paternal analysis ของนกแก้วสกุล *Ara* และสกุล *Anodorhynchus* ซึ่งเป็นนกแก้วที่ถูกคุกคามอย่างหนักและอยู่ในบัญชีรายชื่อชนิดพันธุ์ควบคุมของอนุสัญญาไซเตส ผลการทดลองพบว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีทำให้เกิดตำแหน่งที่มีความแตกต่างจำนวนมาก และในลายพิมพ์เอเอฟแอลพีบางตำแหน่งดังกล่าวมีความสอดคล้องกับกฎการกระจายตัวของเมนเดล ทำให้สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบยืนยันที่มาของนกแก้ว และตรวจสอบยืนยันการครอบครองพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์นกของนักปรับปรุงพันธุ์นกแก้ว ภายใต้การควบคุมของอนุสัญญาไซเตสได้

Honnay *et al.* (2006) ใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีเพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของต้น *Anthyllis vulneraria* ในประเทศเบลเยียม ข้อมูลที่รวบรวมได้ก่อนเริ่มงานวิจัยบ่งบอกว่าจากกิจกรรมของมนุษย์ทำให้ประชากรของต้น *Anthyllis vulneraria* ถูกแบ่งแยกมาเป็นระยะเวลานาน รวมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของดอกที่เอื้อต่อการผสมตัวเอง จากเหตุผลดังกล่าวทำให้เกิดสมมุติฐานว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชชนิดนี้อาจอยู่ในภาวะที่น่าเป็นห่วง แต่จากการศึกษาพบว่าค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรต่างๆมีค่าต่ำมาก ในขณะที่พบความแปรปรวนทางพันธุกรรมและค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในแต่ละประชากรที่สูง ทำให้สรุปผลการทดลองนี้ได้ว่า ถิ่นที่อยู่ที่ถูกแบ่งแยกไม่ได้ส่งผลกระทบในเชิงลบต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืชชนิดนี้ ซึ่งมีข้อเสนอแนะว่าอาจเป็นเพราะผลกระทบในเชิงบวกจากการทำปฏิสัตว์แบบเร่ร่อนในระยะยาว ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนเมล็ดพันธุ์อย่างต่อเนื่อง จึงช่วยลดผลกระทบจากการที่ประชากรถูกแบ่งแยกโดยพื้นที่ได้

Sensi *et al.* (2003) ได้ใช้เทคนิคเอเอฟแอลพีประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้น *Olea europaea* บางสายพันธุ์ในอิตาลี ผลการศึกษาพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมและความผันแปรทางพันธุกรรมในระดับที่น่าสนใจ ถึงแม้ว่าสายพันธุ์ทั้งหมดจะมาแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์เดียวกันก็ตาม ผลการทดลองนี้บ่งบอกว่ามีโครงสร้างทางพันธุกรรมที่ซับซ้อนมากกว่าที่ควรจะเป็นในระหว่างสายพันธุ์ปลูกของ *Olea europaea* และชี้ให้เห็นความสำคัญในการพิจารณาระดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและความแปรปรวนภายในประชากร ที่เกิดจากกระบวนการคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์ที่มาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน ผลการศึกษายังยืนยันถึงคุณสมบัติของเทคนิคเอเอฟแอลพีในการทำซ้ำแล้วให้ผลคงเดิม และเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพสูงในการแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมของต้น *Olea europaea*

<u>การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing analysis)</u>

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ถือได้ว่าเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในงานศึกษาทางด้านชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นข้อมูลที่ชัดเจนและเป็นเอกลักษณ์ จึงมีประสิทธิภาพสูงในการตอบข้อสมมุติฐาน หรือลดความคลาดเคลื่อนจากแผนการทดลองได้ (Surzycki, 2000) นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษาในงานด้านชีววิทยาโมเลกุลได้อย่างกว้างขวาง เพราะข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการศึกษาโครงสร้างของยีน การควบคุมการแสดงออกของยีน องค์ประกอบของจีโนม รวมไปถึงนำไปสู่การพบยีนใหม่ๆที่ยังไม่เคยมีใครศึกษามาก่อน (Clark, 1997)

วิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยหลักการแล้วจะใช้วิธีทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในการแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างกันเพียงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ โดยทั่วไปมีวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่สองวิธีคือ Chemical degradation method และ Chain termination method หรือ Enzymatic synthesis method ซึ่งทั้งสองวิธีนี้ถือเป็นหลักการพื้นฐานในการพัฒนาเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน (Surzycki, 2000) แต่ละวิธีมีรายละเอียดดังนี้

1. Chemical degradation method ค้นพบโดย Maxam and Gilbert (1977) ใช้สารเคมีที่มีความจำเพาะในการตัดสายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เบสชนิดต่างๆกัน วิธีนี้ที่ปลายข้างหนึ่งของดีเอ็นเอจะถูกติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี ^{32}P ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งจะเป็นนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งต่างๆ

ซึ่งถูกตัดด้วยสารเคมีที่มีความจำเพาะกับชนิดเบสของแต่ละนิวคลีโอไทด์ โดยปฏิกิริยาการตัดสายโพลีนิวคลีโอไทด์นี้ จะดำเนินการภายใต้ระยะเวลาที่จะทำให้เกิดการตัดที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้ได้ชิ้นโพลีนิวคลีโอไทด์ขนาดต่างๆไล่เรียงกัน โดยมีโอกาสที่จะพบชิ้นโพลีนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดแตกต่างกันเพียงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ในทุกๆตำแหน่งของสายโพลีนิวคลีโอไทด์นั้น ผลที่ได้จากปฏิกิริยาการตัดนี้สามารถนำมาวิเคราะห์ผลโดยใช้วิธีทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำให้ทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของสายดีเอ็นเอที่ศึกษาได้

2. Chain termination method หรือ Enzymatic synthesis method คิดค้นโดย Sanger และคณะ วิธีนี้มีบทบาทอย่างมากในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในยุคต่อๆมา เพราะเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง (Clark, 1997) เนื่องจากวิธี Chain termination method สามารถใช้ร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งมีความสะดวกและรวดเร็ว หลักการของวิธีนี้ภายใต้ปฏิกิริยาพีซีอาร์จะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งจะสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากการใช้ไพรเมอร์ที่เข้าจับกับบริเวณเฉพาะของสายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยปกติแล้วเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปจะเกิดการเข้ามาต่อของหน่วยนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด (dNTPs) เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ที่มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ แต่การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธีนี้จะทำให้เกิดการเข้าร่วมของนิวคลีโอไทด์สองประเภทคือแบบปกติ (3′ deoxynucleotide, dNTPs) และแบบอนาล็อก (2′ 3′ dideoxynucleotide, ddNTPs) จากการใช้ ddNTPs จะทำให้เกิดการสิ้นสุดปฏิกิริยาของการสังเคราะห์สายโพลีนิวคลีโอไทด์สายใหม่ตรงตำแหน่งเบสที่มี ddNTPs ไปต่อตรงตำแหน่งคู่สมจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ โดยจะเกิดขึ้นร่วมกันกับการเกิดปฏิกิริยาโดยปกติซึ่งเป็นการเข้ามาต่อของ dNTPs ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าโมเลกุลของ ddNTPs ไม่สามารถที่จะสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester) กับนิวคลีโอไทด์ลำดับต่อไปได้ เพราะตำแหน่ง 3′ ของน้ำตาลไรโบสใน ddNTPs ไม่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เหมือนกับ dNTPs โดยสรุปแล้วผลของปฏิกิริยาทั้งหมดจะทำให้เกิดการสังเคราะห์สายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดแตกต่างกันต่อเนื่อง โดยมีโอกาสที่จะพบความแตกต่างในทุกๆจำนวนหนึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sanger *et al.,* 1977)

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถศึกษาได้ในหลายตำแหน่ง ทั้งจากดีเอ็นเอในนิวเคลียส ไมโตคอนเดรีย และคลอโรพลาสต์ ถึงแม้ว่าการศึกษาในไมโตคอนเดรียและคลอโรพลาสต์จะเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายก็ตาม แต่ผลการศึกษาจากทั้ง 2 ตำแหน่งดังกล่าวยังอยู่ภายใต้อิทธิพลของพันธุกรรมที่ได้รับจากฝ่ายแม่เพียงฝ่ายเดียว (maternally inherited) ซึ่งยังคงต้องการผลสนับสนุนและยืนยันจากการศึกษาดีเอ็นเอ

ในนิวเคลียสด้วย (Lucchini, 2003) การศึกษาโดยใช้ตำแหน่งไอทีเอส (ITS, Internal Transcribed Spacer) ซึ่งเป็นส่วนของชุดยีนที่ควบคุมการสร้าง 18S-5.8S-26S RNA ในนิวเคลียส จากรายงานของ Alvarez and Wendel (2003) ระบุว่าการศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมโดยใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่าครึ่งหนึ่งนิยมใช้ตำแหน่งไอทีเอส เนื่องจากเป็นตำแหน่งที่อยู่บนนิวเคลียร์จีโนม และพบความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับที่เหมาะแก่การนำมาใช้ศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้เป็นอย่างดี สามารถนำมาใช้ศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ทั้งในระดับตระกูล (family) ระดับสกุล (genus) และระดับชนิดพันธุ์ (specie)

โปรแกรม ClustalW (version 1.82) เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อหาตำแหน่งของบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ (conserved sequence regions) โดยสามารถที่จะทำการศึกษาลำดับกรดอมิโนในโมเลกุลโปรตีนจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ด้วย โดยทั่วไปแล้วโปรแกรม ClustalW ถูกใช้ใน 2 จุดประสงค์หลักคือใช้ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสายโพลีนิวคลีโอไทด์จำนวนตั้งแต่ 2 ถึง 500 สาย และใช้ในการวิเคราะห์ phylogenetic tree ที่ใช้แสดงถึงความใกล้ชิดทางพันธุกรรม ขั้นตอนการคำนวนโดยใช้โปรแกรม ClustalW นั้นจะทำการคำนวนค่า percent identity score ซึ่งได้จากการคำนวนเปรียบเทียบสายโพลีนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ศึกษาทีละคู่จนครบทุกคู่ โดยการเปรียบเทียบจะทำเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ตรงกันแต่มีความแตกต่างกันของชนิดเบส ในขณะที่บริเวณของสายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่มีการขาดหายไปหรือถูกแทรกเข้ามาเป็นลำดับที่มากกว่า 1 ตำแหน่ง (gab positions) จะไม่ถูกนำมาคำนวนค่า percent identity score นี้ด้วย เมื่อได้ค่า percent identity score นี้แล้ว ค่านี้จะถูกนำมาแปลงเป็นค่าดัชนีความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distances) แล้วนำไปใช้วิเคราะห์ออกมาเป็น phylogenetic tree (Chenna *et al*., 2003) โดยใช้หลักการคำนวนตามวิธี Neighbour Joining method (Saitou and Nei, 1987)

<u>งานวิจัยที่ศึกษาโดยใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์</u>

Denduangboripant and Cronk (2001) ศึกษาพืชสกุล *Aeschynanthus* (Gesneriaceae) โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS2 ที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ exonuclease ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเกิดกระบวนการ rRNA processing ของยีนที่สร้าง rRNA จากการศึกษาพบว่ามีบริเวณเฉพาะที่เกิดการขาดหายไป (deletion) หรือการเข้าแทรกของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (insertion) ในสัดส่วนที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้าที่ทำการศึกษาในพืชสกุลต่างๆในตระกูล

Gesneriaceae ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งเดียวกันในสัดส่วนที่สูงเช่นเดียวกัน ทำให้เกิดข้อสังเกตว่าการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณตำแหน่งดังกล่าวเป็นลักษณะเฉพาะที่พบได้ในพืชตระกูล Gesneriaceae ผลของความผันแปรของขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่สูงนี้ทำให้การวิเคราะห์ผลโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยปกติทำได้ยากและให้ความน่าเชื่อถือต่ำ ในขณะที่การศึกษาโดยวิธี comparative secondary structure เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาใช้วิเคราะห์ผลเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เหล่านี้ได้ เมื่อทำการวิเคราะห์ผลโดยวิธี comparative secondary structure ทำให้ทราบว่าตำแหน่งที่มีความผันแปรไม่แน่นอนนั้น ไม่ได้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการ rRNA processing การทดลองนี้ทำให้เกิดความเข้าใจต่อกระบวนการเกิด rRNA processing ได้ดียิ่งขึ้น และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทดลองอื่นๆที่ไม่สามารถเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยปกติได้

Devos *et al.* (2005) ได้ใช้ internal transcribed spacers และ external transcribed spacers ของดีเอ็นเอบนนิวเคลียส เพื่อศึกษากล้วยไม้สกุล Dactylorhiza 4 ชนิดคือ *D. fuchsia, D. saccifera, D. foliosa* และ *D. maculata* จากการวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยวิธี parsimony พบว่าตัวอย่างทั้งหมดของกล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด มีการแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มโดยที่ 3 กลุ่มมีความชัดเจนได้แก่กลุ่มของ *D. saccifera, D. maculate* และ *D. foliosa* (กลุ่ม B, C และ D ตามลำดับ) ในขณะที่ *D. fuchsia* ซึ่งพบในกลุ่ม A มีการกระจายอยู่ในกลุ่มอื่นทั้ง 3 กลุ่มด้วย ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า *D. fuchsia* ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมแบบ diploid และ *D. maculata* ซึ่งมีจำนวนชุดโครโมโซมแบบ tetraploid มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดเป็นพิเศษกับ *D. foliosa* และจากข้อมูลที่มีอยู่เดิม การทดลองนี้ทำให้เกิดสมมุติฐานใหม่เพิ่มขึ้นว่า *D. foliosa* อาจจะเป็นบรรพบุรุษของ *D. maculata* ซึ่งมีความแตกต่างกันของจำนวนชุดโครโมโซม

Jobes and Thien (1997) ได้รายงานถึงการค้นพบตำแหน่งจำเพาะจำนวน 14 เบส ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ในยีน 5.8s rRNA โดยสามารถใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างพืชมีดอก พืชชั้นต่ำในกลุ่ม bryophyte พืชพวกสาหร่าย และโดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถใช้ในการแยกความแตกต่างของเชื้อราทั้งในกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคและกลุ่มที่ไม่ก่อให้เกิดโรคกับพืชได้ เนื่องจากบริเวณจำเพาะที่เป็นบริเวณอนุรักษ์จำนวน 14 เบสดังกล่าว ในเชื้อราจะมีตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Eco*RI อยู่ด้วย จากการทดลองนี้นอกจากจะทำให้ทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชกลุ่มต่างๆและเชื้อราชนิดต่างๆมากขึ้นแล้ว ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการ

แก้ปัญหาการปนเปื้อนเชื้อราระหว่างการเตรียมดีเอ็นเอเพื่อศึกษาตำแหน่งไอทีเอสของยีน 5.8s rRNA ในพืชได้

Soliva *et al.* (2001) ได้ศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุล *Ophrys* โดยใช้วิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งไอทีเอส และตำแหน่ง noncoding ของคลอโรพลาสต์ (*trnL-trnF* region) พบว่ายีนทั้ง 2 ตำแหน่งที่ทำการศึกษามีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันน้อยมาก การทดลองนี้ให้ข้อสรุปว่า ความหลากหลายในจำนวนชนิดของกล้วยไม้สกุล *Ophrys* ซึ่งประกอบไปด้วย *O. bombyliflora, O. speculum, O. tenthredinifera* และ *O. fusca-lutea* อาจมีสาเหตุมาจากการมีบรรพบุรุษต้นกำเนิดเดียวกัน ซึ่งมีการวิวัฒนาการเป็นชนิดต่างๆในภายหลัง

Tsai *et al.* (2004) ศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุล *Dendrobium* จำนวน 12 ชนิด โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งไอทีเอสของนิวเคลียจีโนม จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากกล้วยไม้ทั้ง 12 ชนิด และวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่ากล้วยไม้สกุล *Dendrobium* ชนิดแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มชัดเจนโดย *Dendrobium linawianum*, *D. moniliforme*, *D. tosaense*, *D. leptoclandum* และ *D. falconeri* ถูกจัดให้อยู่กลุ่มเดียวกันกับ *D. aurantiacum* ในขณะที่ *D. chameleon* ถูกจัดให้อยู่กลุ่มเดียวกับ *D. miyakei* โดยที่ *D. crumenatum* ถูกจัดรวมกลุ่มอยู่กับ *D. equitans* นอกจากนั้นยังพบว่า *D. furcatopedicellatum* และ *D. somai* ถูกจัดเข้ากลุ่มเดียวกันแต่ว่าแยกห่างจากกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า *D. furcatopedicellatum* และ *D. somai* สมควรที่จะถูกจัดให้อยู่ในสกุลอื่นมากกว่าที่จะอยู่ในสกุล *Dendrobium*