บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลิ้นจี่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Litchi chinensis* Sonn. เป็นพืชในตระกูล Nephelium วงศ์ Sapindaceae ซึ่งเป็นไม้ผลตระกูลเดียวกันกับเงาะและลำไย (สมศักดิ์, 2527 ; สุภมนตรี, 2531) ลิ้นจี่มีชื่อสามัญเรียกหลายชื่อ เช่น Lichee Laichi Leechee Lychee Litchi Litchee แต่ชื่อสามัญที่นิยมเรียกกันมาก คือ Litchi และ Lychee (เกียรติเกษตรและคณะ, 2530) ลิ้นจี่เป็นไม้ผลยืนต้น มีใบสีเขียวตลอดทั้งปี ประเทศไทยมีการปลูกมากทางภาคเหนือ ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ และภาคกลาง ได้แก่ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลิ้นจี่

เกียรติเกษตรและคณะ (2530) ได้กล่าวถึงลักษณะทั่วไปของลิ้นจี่ไว้ดังนี้

ต้น : ลิ้นจี่เป็นไม้ยืนต้นเขตกึ่งร้อน มีความสูงประมาณ 10 - 12 m. ซึ่งจัดได้ว่าเป็นไม้ผลขนาดใหญ่ ลำต้นแข็งแรง แตกกิ่งก้านสาขากว้าง กิ่งขนาดใหญ่ เป็นไม้ผลไม่ผลัดใบ ทรงพุ่มค่อนข้างทึบ ลำต้นหนา ตั้งตรง เปลือกลำต้นมีสีน้ำตาลปนเทา เรียบและขรุขระตามชนิดของพันธุ์ การเจริญเติบโตช้า แต่สม่ำเสมอดี

ใบ : ลิ้นจี่มีใบชนิดใบประกอบ (compound leaves) มีใบตั้งแต่ 2 - 10 คู่ จัดเรียงแบบ opposite หรือ shightly oblique รูปทรงของใบเป็นรูปหอกหรือรี ๆ โดยที่โคนใบและปลายใบค่อนข้างแหลม ผิวใบด้านบนมีสีเขียวเข้มเป็นมันวาวสะท้อนแสง ด้านใต้ใบมีสีเขียวปนเทา ขนาดของใบย่อยยาวประมาณ 7.5 - 20 cm. กว้าง 2.5 - 6 cm. ใบอ่อนที่แตกใหม่มีสีน้ำตาลแดง

ดอก : ลิ้นจี่มีดอกเป็นช่อสีเหลืองปนเขียวอ่อน เกิดที่ปลายกิ่งหรือปลายยอด ความยาวของช่อดอกตั้งแต่ 10 - 40 cm. ช่อดอกเป็นแบบ panicle ประกอบด้วยช่อดอกย่อยประมาณ 10 ช่อ หรือมากกว่า ก้านดอกยาวประมาณ 1.5 cm. ดอกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 3 - 6 cm. ลักษณะคล้ายถ้วย มีกลีบดอกชั้นนอก 4 - 7 กลีบ แต่ไม่มีกลีบดอกซ้อนอยู่ด้านใน ดอกมีกลิ่นหอมอ่อน ๆ เกสรตัวผู้มี 5 - 8 อัน ประกอบด้วยก้านเกสรตัวผู้และอับเรณู ถัดจากนั้นเป็นเกสรตัวเมีย ที่ยอดเกสรตัวเมียเป็นรอยหยัก ในช่อดอกเดียวกันมีดอก 3 ชนิด ได้แก่

ดอกตัวผู้ : เป็นดอกชนิดที่รังไข่ไม่พัฒนา ไม่มีก้านชูเกสรตัวเมียและยอดเกสรตัวเมีย ไข่ล้อมรอบด้วยเกสรตัวผู้ 4 -12 อัน ก้านชูเกสรตัวผู้เต็มไปด้วยขนขนาดยาว 6 mm. เมื่ออับเรณู

แก่จัดจะแตกตามแนวยาว รูปร่างละอองเกสรเป็นแบบกรวยรีปลายตัดมุมทู่ บริเวณฐานของดอกมีต่อมน้ำหวานที่ยังพัฒนาไม่เต็มที่

ดอกตัวเมีย : เป็นดอกชนิดที่เกสรตัวเมียมีการพัฒนาอย่างสมบูรณ์ รังไข่มี 2 - 4 carpels แต่ละ carpel มีไข่อ่อน 1 ใบ รังไข่มีลักษณะยาว ก้านชูเกสรตัวเมียค่อนข้างสั้น ยอดเกสรตัวเมียแยกเป็น 2 แฉก บริเวณฐานของรังไข่มีต่อมน้ำหวานทำหน้าที่ดึงดูดแมลง เกสรตัวเมียของดอกชนิดนี้ถูกล้อมรอบด้วยเกสรตัวผู้ 5 - 8 อัน มีก้านชูเกสรสั้นประมาณ 1.5 mm. อับละอองเรณูปกติจะไม่แตก และพบละอองเกสรตัวผู้ที่มีชีวิตอยู่น้อยมาก โดยทั่วไปหลังการผสมเกสรของดอกชนิดนี้มีไข่อ่อนเพียง 1 ใบ เท่านั้นที่จะพัฒนาไปเป็นผลสมบูรณ์ ส่วนที่เหลือจะแห้งฝ่อไป แต่บางครั้งพบว่าไข่ทั้ง 2 ใบ พัฒนาพร้อมกันเกิดเป็นผลแฝด

ดอกกระเทย : เป็นดอกที่มีก้านชูเกสรตัวเมีย และปลายเกสรตัวเมียรวมทั้งต่อมน้ำหวานพัฒนาไม่สมบูรณ์ เกสรตัวเมียล้อมรอบด้วยเกสรตัวผู้ 6 - 10 อัน ในดอกชนิดนี้ไม่พบการถ่ายละอองเกสร เนื่องจากปลายยอดเกสรตัวเมียไม่เปิด (สัณห์, 2538)

ในช่อดอกเดียวกันการเกิดดอกทั้ง 3 ชนิดนี้จะไล่เรียงกันเป็นลำดับ และดอกทั้ง 3 ชนิดจะบานไม่พร้อมกัน คือดอกตัวผู้จะบานก่อน 2 - 3 วัน จากนั้นดอกตัวเมียและดอกกระเทยจึงจะบาน ดังนั้นในการผสมพันธุ์จึงต้องอาศัยการผสมข้ามดอก ข้ามช่อ และยังต้องพึ่งพาผึ้งและแมลงต่าง ๆ ในการผสมเกสร

ผล : ลิ้นจี่ออกผลเป็นพวงห้อย โดยในแต่ละช่ออาจมีผลตั้งแต่ 2 - 30 ผล ลักษณะผลคล้ายรูปไข่ หรือกลม หรือคล้ายรูปหัวใจ แล้วแต่ชนิดพันธุ์ มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 - 4 cm. เปลือกของผลขรุขระเป็นหนามเล็ก ๆ ผลอ่อนมีสีเขียว แต่เมื่อแก่จะเปลี่ยนไปหลายสีขึ้นกับลักษณะประจำพันธุ์นั้น ๆ แต่โดยทั่วไปสีผลของลิ้นจี่จะเป็นสีชมพูปนขาว ชมพูปนแดง แดงสด หรือแดงคล้ำไปจนถึงสีน้ำตาลเข้ม เปลือกค่อนข้างเปราะ ปอกง่าย

เนื้อ : เกิดจากเนื้อเยื่อเจริญของเมล็ดและเยื่อหุ้มรังไข่ชั้นนอก เนื้อลิ้นจี่มีสีขาว ขาวขุ่น หรือขาวนวล แล้วแต่ชนิดพันธุ์ เนื้อจะหุ้มเมล็ดอยู่ ล่อนไม่ติดเมล็ด มีทั้งเนื้อหนาและบาง อาจแห้งกรอบหรือฉ่ำน้ำ รสชาติขึ้นอยู่กับชนิดพันธุ์ และการบำรุงรักษา มีทั้งรสชาติหวานหอม หวานอมเปรี้ยว เปรี้ยว หรือหวานอมฝาด

เมล็ด : ลิ้นจี่มีเมล็ดกลมรี หรือรูปไข่ สีน้ำตาลดำเป็นมัน ในผลหนึ่งจะมีเพียง 1 เมล็ด แต่มีอยู่บ้างที่เมล็ดลีบ โดยเฉพาะลิ้นจี่พันธุ์ค่อมพบได้บ่อยมาก และมักพบว่าผลลิ้นจี่ที่ไม่มีเมล็ดนั้นผลจะเล็กมาก

พันธุ์ลิ้นจี่

Subhadrabandhu (1990) ได้แบ่งกลุ่มพันธุ์ลิ้นจี่ในประเทศไทยตามลักษณะการตอบสนองต่ออุณหภูมิ เป็น 2 กลุ่มพันธุ์ คือ

1. พันธุ์ที่ไม่ต้องการช่วงอุณหภูมิต่ำ หรือต้องการเพียงเล็กน้อยเพื่อการออกดอก บางครั้งจัดเป็นลิ้นจี่ที่ลุ่มหรือลิ้นจี่เขตร้อน (lowland or tropical or water lychee) สามารถเจริญเติบโตได้ดีและมีการปลูกเป็นการค้าในเขตที่ลุ่มภาคกลางของประเทศ ปัจจุบันพื้นที่ปลูกที่ใหญ่ที่สุด คือ อำเภออัมพวา และบางคณฑี จังหวัดสมุทรสงคราม ชื่อพันธุ์และลักษณะประจำพันธุ์บางพันธุ์ของลิ้นจี่กลุ่มนี้ ได้แสดงในตาราง 1

2. พันธุ์ที่ต้องการอุณหภูมิต่ำช่วงเวลาหนึ่งเพื่อการออกดอก จัดเป็นลิ้นจี่ที่ดอน หรือลิ้นจี่เขตกึ่งร้อน (subtropical, mountain lychee) สามารถเจริญเติบโตได้ดีและมีการปลูกเป็นการค้าในเขตภาคเหนือของประเทศ ซึ่งมีภูมิอากาศแบบกึ่งร้อน พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่ คือจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ และบางพื้นที่ในจังหวัดเพชรบูรณ์ น่าน และแพร่ พันธุ์ลิ้นจี่กลุ่มนี้แพร่กระจายเข้ามาในประเทศไทยหลังพันธุ์ลิ้นจี่กลุ่มแรก ลักษณะประจำพันธุ์บางพันธุ์ ได้แสดงในตาราง 2

นอกจากจะแบ่งพันธุ์ลิ้นจี่ออกเป็น 2 กลุ่มดังกล่าวแล้ว ในส่วนของลิ้นจี่ที่นิยมปลูกในภาคเหนือ อาจแบ่งเป็นพันธุ์เบา ได้แก่ กิมจี้ ฮงฮวย ฯลฯ พันธุ์กลาง ได้แก่ กวางเจา เซ็น ฯลฯ พันธุ์หนัก ได้แก่ กิมเจ็ง เป็นต้น และยังมีกลุ่มพันธุ์อื่นที่ปลูกกันแต่ไม่มากนัก คือพันธุ์เมล็ดลีบ (บุญรอด, 2531)

ลิ้นจี่หลายพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทยเป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ โดยนำมาปลูกในกรุงเทพมหานครก่อน แล้วจึงขยายไปยังต่างจังหวัด ซึ่งอาจนำเข้ามาซ้ำกับพันธุ์ที่มีอยู่แล้วก็ได้ และยังมีพันธุ์ที่เพาะจากเมล็ดของลิ้นจี่พันธุ์ดีที่ชาวสวนพัฒนาขึ้นมาอีกหลายพันธุ์ เป็นที่น่าสังเกตว่าพันธุ์ของลิ้นจี่มีมากมายและมาจากหลายแหล่งจึงมีความสับสนในเรื่องลักษณะประจำพันธุ์และชื่อพันธุ์ เช่น พันธุ์ฮงฮวย พันธุ์หมอหม่อง พันธุ์สันทราย ทั้ง 3 พันธุ์มีลักษณะคล้ายกันมากและน่าจะเป็นพันธุ์เดียวกัน ส่วนพันธุ์จักรพรรดิ์นั้นมีรายงานว่าในแต่ละสวนมีลักษณะแตกต่างกันจึงน่าจะเป็นคนละพันธุ์ นอกจากนี้มีลิ้นจี่บางพันธุ์ที่เพาะจากเมล็ดแล้วตั้งชื่อใหม่ และยังไม่ได้ตั้งชื่ออีกมาก การตั้งชื่อพันธุ์และการแยกลักษณะพันธุ์จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ดูจากสีของใบ สีและลักษณะของผล รวมถึงลักษณะช่อดอก (พิชัย, 2510 และ ผลประสิทธิ์, 2512 อ้างโดย บุญรอด, 2531) ซึ่งอาจทำให้เกิดความสับสนในเรื่องลักษณะพันธุ์และชื่อพันธุ์ดังกล่าว ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงนำเอาเทคนิค RAPD มาช่วยวิเคราะห์ความแตกต่างทางลายพิมพ์ DNA เพื่อจำแนกพันธุ์ของลิ้นจี่

ตาราง 1 ลักษณะประจำพันธุ์ของลิ้นจี่ที่ปลูกทางภาคกลางของประเทศไทย (Subhadrabandhu, 1990)

ชื่อพันธุ์	อายุการเก็บเกี่ยว	น้ำหนักผลเฉลี่ย (g.)	สีของผลเมื่อแก่	คุณภาพผล*	ข้อสังเกตุ
ค่อม	กลาง	20	แดงเข้ม	ดี	รสหวาน มีกลิ่นหอม
กะโหลกใบยาว	กลาง	15	แดงส้ม	ปานกลาง	รสหวานอมเปรี้ยว
สาแหรกทอง	กลาง	20	แดงส้ม	ดี	เนื้อแน่น
ลำเภาแก้ว	หนัก	25	แดงชมพู	ดีมาก	รสหวาน ผลใหญ่ เนื้อหนา
กระโถนท้องพระโรง	หนัก	25	แดงส้ม	ปานกลาง	รสหวานและฝาดเล็กน้อย เนื้อผลไม่แฉะ
แห้วจีน	เบา	20	แดงเข้ม	ดี	เนื้อผลหนาและแน่น
จีน	เบา	20	แดงสด	ดี	เนื้อผลหนาและแห้ง รสหวานหอม
ไทยใหญ่	เบา	15	แดงส้ม	ปานกลาง	รสหวานเนื้อผลหนา
ไทย	เบา	15	แดงเข้ม	ปานกลาง	เหมาะสำหรับทำลิ้นจี่กระป๋อง
เขียวหวาน	เบา	15	แดงส้ม	ปานกลาง	เหมาะสำหรับทำลิ้นจี่กระป๋อง
ช่อระกำ	เบา	15	แดงส้ม	ปานกลาง	เนื้อผลหนาและแฉะ

* เกณฑ์เฉลี่ยคุณภาพของผลตามความต้องการของตลาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตาราง 2 ลักษณะประจำพันธุ์ของลิ้นจี่ที่ปลูกทางภาคเหนือของประเทศไทย (Subhadrabandhu, 1990)

ชื่อพันธุ์	เวลาการออกดอก	เวลาการเก็บเกี่ยว	น้ำหนักผลเฉลี่ย (g.)	สีของผลเมื่อแก่	ข้อสังเกต
ฮงฮวย	กลางเดือนกุมภาพันธ์	ต้นเดือนพฤษภาคม	25 - 33	ชมพูเหลือง	เจริญเติบโตปกติ
โอเฮี๊ยะ	กลางเดือนมกราคม	ปลายเดือนพฤษภาคม	20 - 25	แดง	ติดผลน้อย
กิมเจ็ง	ปลายเดือนกุมภาพันธ์	กลางเดือนมิถุนายน	20 - 25	แดงสด	ต้องการช่วงหนาวเย็นยาวนาน
กิมจี้	กลางเดือนธันวาคม	กลางเดือนเมษายน	20 - 25	แดงชมพู	พันธุ์เบา
จักรพรรดิ์	กลางเดือนกุมภาพันธ์	ปลายเดือนกรกฎาคม	40 - 50	แดง	ผลใหญ่มาก
กวางเจา	ต้นเดือนมีนาคม	ต้นเดือนมิถุนายน	35 - 40	แดงเข้ม	มักพบผลที่มีเมล็ดลีบ
Brewster	กลางเดือนกุมภาพันธ์	ปลายเดือนพฤษภาคม	20 - 25	แดงเข้ม	ต้องการช่วงหนาวเย็นยาวนาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD เป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยา Polymerase Chian Reaction (PCR) โดยอาศัยการจับของ primer แบบสุ่ม (random primer) ในการเพิ่มขยาย deoxyribonucleic acid (DNA) ให้มีปริมาณมาก RAPD ใช้หลักการที่ว่า DNA ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันในการเรียงลำดับของเบส (base) ได้แก่ adenosine (A) thymine (T) guanine (G) และ cytosine (C) จึงทำการสุ่มเอาตัวแทนบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนสาย DNA มาเพิ่มปริมาณเช่นเดียวกับขบวนการ DNA replication ภายในเซลล์ (วัชรี และมนตรี, 2536) จากนั้นนำ DNA ที่เพิ่มปริมาณแล้วมาแยกโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) และนำแผ่น gel มาตรวจสอบความแตกต่างของแบบแผนลายพิมพ์ DNA (DNA fingerprint) ดังนั้นสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสต่างกันย่อมมีแบบแผนลายพิมพ์ DNA แตกต่างกัน และสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันควรจะมีแบบแผนลายพิมพ์ DNA คล้ายคลึงกัน

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR เป็นปฏิกิริยาการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของ DNA เป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลอง ซึ่งมีองค์ประกอบและขั้นตอนของปฏิกิริยาดังนี้ (วัชรีและมนตรี, 2536 ; วีระพงศ์ , 2539 ; Newton and Graham, 1994)

องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR

1. DNA ต้นแบบ (template DNA) ได้แก่ DNA ของพืช โดยจะใช้ในปริมาณต่ำมาก ประมาณ 10 - 25 ng.

2. primer เป็น DNA สายสั้น ๆ ที่นำมาจับคู่แบบสุ่มกับ DNA ต้นแบบ ในกรณีของเทคนิค RAPD จะใช้ primer เพียงสายเดียวต่อ 1 ปฏิกิริยา

primer คือ oligonucleotide สายสั้น ๆ สายเดียวที่สังเคราะห์ขึ้นประกอบด้วยเบสจำนวนน้อย ในกรณีของเทคนิค RAPD จะมีเบสเพียง 10 ตัว (10 - mers) ใช้เป็นตัวติดตามแบบสุ่มเพื่อเข้าคู่กับ DNA ต้นแบบของพืช ดังนั้น primer จึงถูกออกแบบให้มีความหลากหลายชนิดตามการเรียงลำดับเบส ตามความเข้มข้นของเปอร์เซ็นต์ guanine รวมกับ cytosine

3. เอนไซม์ Tag DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการเติม dNTPs ต่อจาก primer เพื่อให้เกิดสาย DNA ตลอดแนวของ DNA ต้นแบบ ซึ่งเริ่มทำงานในช่วง extention

4. นิวคลีโอไทด์ (nucleotides) 4 ชนิด คือ dATP dCTP dGTP และ dTTP หรือเรียกโดยรวมว่า dNTPs คือหน่วยย่อยของกรดนิวคลีอิกที่ใช้เติมให้เป็น DNA สายใหม่

5. ส่วนประกอบอื่น ๆ ได้แก่ $MgCl_2$ และ reaction buffer

ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR

ปฏิกิริยาการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของ DNA จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลาย ๆ รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. ขั้นตอน *denaturation* : เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของ DNA ต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90 - 95 °C

2. ขั้นตอน primer annealing : เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ 36 - 60°C เพื่อให้ primer สามารถจับกับ DNA ต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม (A จับคู่กับ T และ C จับคู่กับ G)

3. ขั้นตอน *extention* : เป็นขั้นตอนการสร้าง DNA สายใหม่ต่อเนื่องจากจุดที่ primer เข้าไปจับกับ DNA ต้นแบบในทิศทางจาก 5' ไป 3' โดยอาศัยเอนไซม์ thermostable DNA polymerase เช่น Tag DNA polymerase อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้จะอยู่ในช่วง 70 - 75 °C และมี Mg^{2+} เป็น cofactor ของปฏิกิริยา

การสังเคราะห์ DNA จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอนซ้ำกันเป็นจำนวน 30 - 40 รอบ ทำให้ได้ DNA สายใหม่ ซึ่งเรียกว่า amplified หรือ PCR product จำนวนมาก ลักษณะการเพิ่ม PCR product จะเป็นแบบ exponential โดยหลังจากการทำ PCR จำนวน n รอบ PCR product ที่เกิดขึ้นตามทฤษฎีจะเท่ากับ 2^n ถ้าการทำ PCR มีประสิทธิภาพการผลิต 100 %

ข้อพิจารณาในการปรับสภาพที่เหมาะสมสำหรับการทำ PCR

เนื่องจากปฏิกิริยา PCR ถูกนำมาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยสาขาต่างๆ จึงเป็นการยากที่จะมีสูตรสำเร็จของวิธีการทำ PCR เพียงสูตรเดียวที่สามารถนำไปใช้ครอบคลุมการทำ PCR ในงานทุกรูปแบบได้ ดังนั้นเมื่อเริ่มต้นทำ PCR สำหรับการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่ง จึงจำเป็นต้องมีการปรับสภาพให้เหมาะสมสำหรับงานนั้น ๆ เพื่อให้ประสิทธิภาพของการทำ PCR เกิดขึ้นสูงสุด การทำ PCR โดยปราศจากการปรับสภาพให้เหมาะสมอาจก่อให้เกิดปัญหาต่าง ๆ ขึ้น เช่น ไม่เกิด PCR product หรือเกิดน้อย การเกิด PCR product ที่ไม่จำเพาะ การเกิด primer - dimer เป็นต้น

วีระพงศ์ (2539) กล่าวถึงปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำ PCR และต้องปรับให้มีความเหมาะสม ดังนี้คือ

1. primer

สิ่งสำคัญที่สุดเกี่ยวกับ primer คือการเลือกใช้ primer ที่เหมาะสม ซึ่งมีหลักเกณฑ์ ดังนี้

1.1 primer ควรมีขนาดความยาวประมาณ 10 - 30 นิวคลีโอไทด์ และประกอบด้วย guanine กับ cytosine ประมาณ 50 - 60 %

1.2 primer ควรมีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับทางปลาย 3' ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของ DNA ต้นแบบ และลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวควรมีความจำเพาะซึ่งไม่พบในบริเวณอื่น ๆ ของสาย DNA ต้นแบบ

1.3 การเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงบริเวณปลาย 3' ของ primer ไม่ควรจะเป็นคู่สมกัน เพื่อป้องกันการเกิด primer - dimer

1.4 ค่า Tm (melting temperature) ของแต่ละ primer ควรใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 55 - 80 °C ซึ่งค่า Tm สามารถคำนวณโดยใช้สูตร คือ 2 °C สำหรับ A หรือ T และ 4 °C สำหรับ G หรือ C [Tm = (number of A+T) x 2 °C + (number of G+T) x 4 °C] (Newton and Graham, 1994)

ในการทำ PCR นอกจากการคัดเลือก primer ที่เหมาะสมแล้ว ความเข้มข้นของ primer ก็เป็นสิ่งสำคัญเช่นกัน ความเข้มข้นของ primer ที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 0.1 - 0.5 μM ถ้าปริมาณ primer มากเกินไปจะทำให้โอกาสการจับคู่ผิดพลาด (mispriming) เพิ่มขึ้นเป็นผลให้ PCR product ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นมากมาย และยังเพิ่มโอกาสการเกิด primer - dimer ให้สูงขึ้นเป็นผลให้ได้ PCR product ที่ต้องการลดลง

2. ความเข้มข้นของ Tag DNA polymerase

ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Tag DNA polymerase จะอยู่ในช่วง 1.0 - 2.5 units ต่อ 100 μl. การใช้เอนไซม์ในปริมาณสูงเกินไปจะก่อให้เกิด PCR product ที่ไม่จำเพาะขึ้น

3. ความเข้มข้นของ magnesium ion (Mg^{2+})

Mg^{2+} จัดเป็นอิออนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในปฏิกิริยา PCR เนื่องจากมีผลต่อ primer annealing และความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์ (enzyme fidelity) ถ้าความเข้มข้นของ Mg^{2+} มากเกินไป จะก่อให้เกิด PCR product ที่ไม่จำเพาะขึ้น แต่ถ้าความเข้มข้นของ Mg^{2+} น้อยเกินไปจะทำให้ได้ PCR product ลดลง โดยทั่วไปในปฏิกิริยา PCR ใช้ dNTPs แต่ละชนิดในความเข้มข้น 200 μM ความเข้มข้นของ Mg^{2+} ที่ใช้จะอยู่ในช่วง 0.5 - 2.5 mM แต่ถ้ามีการใช้ปริมาณที่สูงกว่านี้ ต้องปรับความเข้มข้นของ Mg^{2+} ให้สูงขึ้น เนื่องจาก dNTPs สามารถจับ

กับ Mg^{2+} ดังนั้นถ้ามีปริมาณ dNTPs มากเกินไปมันจะไปจับกับ Mg^{2+} ในปริมาณที่มากจนทำให้ Mg^{2+} ในรูปอิสระมีไม่เพียงพอสำหรับใช้ในปฏิกิริยา PCR

4. deoxynucleotide triphosphate (dNTPs)

dNTPs ที่ใช้ในงาน PCR จะต้องมี pH เท่ากับ 7.0 ส่วนความเข้มข้นของ dNTPs แต่ละชนิดอยู่ในช่วง 50 - 200 µM ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยา PCR อย่างจำเพาะ ตลอดจนได้ PCR product ในปริมาณสูง

5. buffer สำหรับปฏิกิริยา PCR

buffer มาตรฐานที่นิยมใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ 10 - 50 mM Tris - HCl pH 8.3 - 8.8 และมี KCl ที่ความเข้มข้นประมาณ 50 mM รวมอยู่ด้วย KCl ทำหน้าที่ในการเร่งการเกิด primer annealing แต่ถ้าความเข้มข้นของ KCl มากเกินไป จะไปลดประสิทธิภาพการทำงานของ Tag DNA polymerase

6. annealing

การเลือกอุณหภูมิและระยะเวลาในขั้นตอน annealing ขึ้นอยู่กับลำดับเบส ความยาว และความเข้มข้นของ primer ที่ใช้ ตามทฤษฎีอุณหภูมิที่ควรใช้คือ อุณหภูมิที่ต่ำกว่าค่า Tm ของ primer ลงไป 5 °C และโดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้จะอยู่ในช่วง 50 - 55 °C ยกเว้นในปฏิกิริยาของเทคนิค RAPD ที่ใช้ primer ขนาด 10 mers จะใช้อุณหภูมิประมาณ 37 °C ซึ่งเป็นช่วงที่ทำให้เกิด PCR product ในปริมาณสูง และเนื่องจาก Tag DNA polymerase สามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิ ประมาณ 20 - 85 °C แต่อุณหภูมิที่ใช้ไม่ควรต่ำเกินไปเพราะแม้ว่า annealing จะเกิดได้ดี แต่จะก่อให้เกิดการจับคู่ผิดพลาดของ primer ได้

7. extension

เวลาที่ใช้ในการสร้าง DNA สายใหม่ในขั้นตอนนี้จะขึ้นกับความยาว ความเข้มข้น และลำดับเบสของ DNA เป้าหมาย สำหรับอุณหภูมิที่ใช้โดยทั่วไปจะใช้อุณหภูมิ 72 °C เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ Tag DNA polymerase จากการศึกษาพบว่าที่อุณหภูมิ 72 °C อัตราการสร้างสาย DNA จะอยู่ในช่วง 35 - 100 นิวคลีโอไทด์ต่อวินาที ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของ DNA เป้าหมาย ความเข้มข้นของเกลือ และ pH ของ buffer ที่ใช้ ดังนั้นการใช้เวลาในขั้นตอนนี้ 1 นาที ที่ 72 °C จึงเพียงพอสำหรับการทำ PCR ซึ่งเป็น PCR product ชนิดยาว 2 กิโลเบส (kb.) อย่างไรก็ดีการเพิ่มเวลา extension จะมีประโยชน์ในรอบแรก ๆ ของการทำ PCR ในกรณีที่ปริมาณของ DNA เป้าหมายมีอยู่น้อย และในรอบหลัง ๆ เมื่อมีความเข้มข้นของ PCR product สูงกว่าความเข้มข้นของเอนไซม์มาก ๆ

8. denaturation

การตั้งอุณหภูมิต่ำหรือเวลาสั้นเกินไปจะทำให้ DNA เป้าหมายมีการแยกสายไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้ปริมาณ PCR product ที่ควรจะได้ลดลง แต่ถ้าตั้งอุณหภูมิสูงหรือเวลานานเกินไปจะทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพเร็วโดยเปล่าประโยชน์ ส่วนใหญ่ที่อุณหภูมิ 94 - 95 °C ประมาณ 30 วินาที จะเป็นช่วงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในขั้นตอน denaturation แต่ถ้า DNA เป้าหมายมี GC content สูงมาก ๆ อาจต้องใช้อุณหภูมิสูงขึ้น

9. ปัจจัยอื่น ๆ

ปัจจัยอื่นที่มีผลกระทบต่อการทดลอง เช่น ความสะอาดของเครื่องแก้วและภาชนะต่าง ๆ ที่ใช้ในงาน PCR ควรล้างให้สะอาดปราศจากสารซักฟอก (detergent) น้ำที่ใช้ควรมีความบริสุทธิ์สูงและปราศจากเอนไซม์ nuclease ต่าง ๆ เป็นต้น

การตรวจสอบผล DNA ด้วยเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis)

gel electrophoresis เป็นวิธีการที่จัดได้ว่ามีประสิทธิภาพสูงและใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษากรดนิวคลีอิกทั้งในแง่การแยกขนาดหรือการศึกษาปริมาณ โครงสร้าง และคุณสมบัติบางอย่าง โดยใช้ปริมาณกรดนิวคลีอิกเพียงเล็กน้อย

หลักการ : เนื่องจากกรดนิวคลีอิกมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต (PO_4^-) ทำให้มีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปสู่ขั้วบวก จากหลักการดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการแยกหรือวิเคราะห์กรดนิวคลีอิก โดยเฉพาะ DNA ภายใต้สนามไฟฟ้า โดยผ่านตัวกลาง คือ gel ที่ใช้กันทั่วไป คือ agarose gel และ polyacrylamide gel โดยที่ agarose gel ที่มีความเข้มข้นต่ำมีความสามารถแยก DNA ที่มีขนาดใหญ่กว่า 500 คู่เบส (bp.) ในขณะที่ agarose gel ที่มีความเข้มข้นสูงและ polyacrylamide gel ส่วนใหญ่จะใช้ในการศึกษา DNA ที่มีขนาดเล็กกว่า 500 bp. (วาสนา, 2539)

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่าน gel ของ DNA

วาสนา (2537) กล่าวถึงปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่าน gel ของ DNA ดังนี้คือ

1. ขนาดโมเลกุลของ DNA (molecular size of the DNA)

DNA ขนาดใหญ่จะผ่าน gel ได้ช้ากว่า DNA ขนาดเล็ก ดังนั้นในเวลาเท่ากัน และสภาวะเดียวกัน DNA ขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางสั้นกว่า DNA ขนาดเล็ก

2. รูปร่างของ DNA (conformation of the DNA)

ในกรณีของ plasmid DNA สามารถขดพันตัวเอง (supercoiled DNA) เพื่อให้มีความเสถียรมากที่สุด แต่เมื่อใดที่เกลียวคู่ของ DNA สายคู่เส้นใดเส้นหนึ่งขาดตรงตำแหน่งพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ เกิดช่องขึ้นเรียกว่า nick จะทำให้ขด DNA คลายออก DNA จะอยู่ในสภาพเป็นวง (circular DNA) และถ้าเกลียวคู่ของ DNA ขาดออกจากกันทั้งสองเส้น DNA จะกลายเป็นเส้นตรง (linear DNA) DNA ที่มีรูปร่างต่างกันแม้จะมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน ภายใต้สภาวะเดียวกันจะเคลื่อนที่ผ่าน gel ด้วยความเร็วต่างกัน DNA ที่มีลักษณะขดพันตัวเองจะเคลื่อนที่ได้เร็วที่สุด รองลงมาคือ DNA ที่เป็นเส้นตรงและที่ช้าที่สุด คือ DNA ที่อยู่ในสภาพเป็นวง (โชคชัย, 2532)

3. ความเข้มข้นของ gel (gel concentration : pore size of the gel)

gel ที่มีความเข้มข้นสูงจะมีช่องว่างระหว่างโมเลกุล (pore) น้อย ทำให้ DNA เคลื่อนที่ผ่านได้ช้ากว่า gel ที่มีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้น gel ที่มีความเข้มข้นสูงจึงเหมาะที่จะใช้แยก DNA ที่มีขนาดเล็ก ในขณะที่ gel ที่มีความเข้มข้นต่ำเหมาะที่จะใช้แยก DNA ที่มีขนาดใหญ่ และเมื่อค่าความเข้มข้นของ agarose gel คงที่ ระยะทางที่ DNA สามารถเคลื่อนที่ผ่าน gel จะแปรผกผันกับขนาดของ DNA

4. electrophoresis buffer

buffer ที่ใช้ในกระบวนการอิเลคโตรโฟรีซีสมีผลต่อการเคลื่อนที่ของ DNA ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ buffer (buffering capacity) แต่ละชนิด การใช้ buffer ที่มีความเข้มข้นสูง (กรณีเกิดการผิดพลาดใช้ 10x buffer แทน) จะทำให้การนำไฟฟ้าสูงขึ้น และที่แรงดันไฟฟ้า (voltage) คงที่ ความต้านทานไฟฟ้า (resistance) ลดลง กระแสไฟฟ้า (current) จะเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดความร้อนมากขึ้น ดังนั้นการเลือกใช้ buffer ที่มีความเข้มข้นเหมาะสมจึงมีความสำคัญเพราะเป็นการกำหนดกำลังไฟฟ้าที่ใช้ในการทำอิเลคโตรโฟรีซีส ถ้าสูงเกินไปจะทำให้เกิดความร้อนสูงขึ้นจนอาจทำให้ DNA เสียสภาพ ในทางตรงกันข้าม ถ้าใช้ต่ำเกินไป จะสามารถขจัดปัญหาการเกิดความร้อนสูงได้ แต่ผลการแยกแถบ DNA จะไม่ดี เนื่องจากเวลาในการทำอิเลคโตรโฟรีซีสจะนานขึ้น และเกิดการแพร่ของ DNA (อาภัสสรา, 2537)

5. กระแสไฟฟ้า

โดยทั่วไปในการทำอิเลคโตรโฟรีซีสมักทำในสภาวะแรงดันไฟฟ้าคงที่ ดังนั้นค่าแรงดันไฟฟ้า จึงมีผลต่อการเคลื่อนที่ของ DNA โดยมีค่าความต้านทานของตัวกลาง (gel และ buffer) มาเกี่ยวข้องด้วย จากสมการ Ohm's law ; V=IR เมื่อ V คือค่าแรงดันไฟฟ้า หรือ voltage (volts), I คือกระแสไฟฟ้า หรือ current (milliamps) และ R คือค่าความต้านทาน หรือ resistance

(Ohms) ของตัวกลางในสนามไฟฟ้านั้น ดังนั้นจากสมการเมื่อผ่านแรงดันไฟฟ้าจำนวนหนึ่งเข้าไปในวงจร จะส่งผลให้กระแสไฟฟ้าเข้าไปในตัวกลางนั้น แล้วแรงดันไฟฟ้าเมื่อผ่านตัวกลางจะมีค่าเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับความต้านทานของตัวกลางนั้น ทำให้เกิดกระแสไฟฟ้า ซึ่งผลักดันให้ DNA เกิดการเคลื่อนที่ขึ้น ทั้งนี้ความต้านทานของตัวกลางจะแปรผกผันกับความหนาของตัวกลาง ตลอดจนปริมาณประจุใน buffer โดยทั่วไปเมื่อใช้ค่าแรงดันไฟฟ้าที่พอเหมาะ ความเร็วในการเคลื่อนที่ของ linear DNA จะแปรผันโดยตรงกับปริมาณแรงดันไฟฟ้า (voltage เพิ่มขึ้น DNA เคลื่อนที่เร็วขึ้น) แต่ทว่าเมื่อใดที่ค่าแรงดันไฟฟ้าสูงเกินไป DNA ที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ไม่สม่ำเสมอ ทำให้ความสามารถในการแยก DNA fragment ลดลง

การทำ agarose gel electrophoresis เริ่มจากการเตรียมแผ่น agarose gel ให้มีความเข้มข้นเท่าใดขึ้นอยู่กับขนาดของ DNA ที่จะศึกษา โดยผสมผง agarose กับ buffer ให้เข้ากัน นำไปต้มให้ละลาย หลังจากนั้นเท gel แล้วเสียบแผ่น comb ลงไป ปล่อยให้ gel แข็งตัวก่อนนำไปทำอิเลคโตรโฟรีซีสต่อไป สำหรับความหนาของแผ่น gel โดยทั่วไปจะใช้แผ่น gel หนา 5 mm. ถ้าแผ่น gel หนาเกินไปจะทำให้ผลการแยก DNA fragment ไม่ดีเท่าที่ควร แต่ถ้าใช้แผ่น gel ที่บางกว่า 3 mm. แผ่น gel ก็จะแตกหักง่าย

ก่อนที่จะนำ DNA ที่เพิ่มปริมาณแล้วไปทำอิเลคโตรโฟรีซีส จะต้องผสม DNA กับสารละลายที่มีความหนาแน่น (density) มากกว่า buffer สารนั้นเรียกว่า loading buffer หรือ loading dye ซึ่งเป็นสารที่มีสีของ bromophenol blue ซึ่งใช้เป็นสัญญาณบอกถึงระยะทางที่ DNA เคลื่อนที่ไป

หลังจากทำอิเลคโตรโฟรีซีสเรียบร้อยแล้วจะตรวจดูและถ่ายภาพ DNA วิธีง่ายที่สุดทำโดยการย้อม DNA fragment ด้วย ethidium bromide ซึ่งเป็นสารที่มีโครงร่างแบน (planer) สามารถแทรกเข้าไประหว่างเบสของ DNA เมื่อกระตุ้นด้วยแสง UV ที่ความยาวคลื่นประมาณ 300 nm. จะปล่อยแสง fluorescent ออกมาให้มองเห็นได้ ในการตรวจดูแถบ DNA จะต้องทำในห้องมืดหรือใช้อุปกรณ์ที่กันไม่ให้แสงสว่างหรือแสงแดดไปบดบังแสง fluorescent จากแถบ DNA และผู้ตรวจจะต้องสวมแว่นตาป้องกันอันตรายจากแสง UV ทุกครั้ง

ปัญหา สาเหตุ และการแก้ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการทำ agarose gel electrophoresis

1. DNA ในแต่ละช่อง gel (well) เคลื่อนที่ไม่เท่ากันทำให้มองเห็นเป็นรูปโค้ง อาจเกิด จากปริมาณ salt (NaCl , CsCl) ในตัวอย่าง DNA มากเกินไป หรือเกิดความร้อนมากเกินไป หรือปริมาณ glycerol / sucrose ในตัวอย่าง DNA มากไป ซึ่งอาจแก้ไขโดยใช้ ficoll แทน

2. สีไม่เคลื่อนที่ออกจาก well อาจเกิดจาก DNA ไม่บริสุทธิ์ หรือ ได้ผ่านขบวนการ alkaline detergent extraction ทำให้ bromophenol blue ซึ่งไม่ทนด่างเสียสภาพได้

3. DNA ไม่เคลื่อนที่ไปพร้อมกัน อาจเกิดจากการใช้ voltage สูงเกินไป ทำให้เกิดความร้อน

4. DNA fragment แยกจากกันได้ไม่ดี ควรปรับความเข้มข้นของ gel ถ้าต้องการแยก DNA ขนาดใหญ่ ให้ลดความเข้มข้นลง ในทางตรงข้ามถ้าต้องการแยก DNA ขนาดเล็กให้เพิ่มความเข้มข้นขึ้น

5. ผลที่มองเห็นเป็นปื้น (smearing) อาจเกิดจากการใช้ sample DNA ที่เข้มข้นมากเกินไป แก้ไขได้โดยทำอิเลคโตรโฟรีซีสให้ช้าลง หรืออีกกรณีหนึ่งอาจเกิดจาก sample มี protein หรือ RNA ปนเปื้อน แก้ไขได้โดยใช้ RNase enzyme หรือ extract DNA อีกครั้ง

6. พบการเรืองแสงที่ background มักเกิดกับการแยก plasmid DNA ขนาดเล็ก สาเหตุเกิดจากการปนเปื้อนของ RNA แก้ไขโดยปล่อยให้สีตกจาก gel เพราะ RNA จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสี

7. มองไม่เห็นแถบ DNA เนื่องจากสีของ bromophenol blue สามารถดูดกลืนแสง fluorescent จาก DNA ที่มี ethidium bromide สอดแทรกอยู่ได้ ดังนั้นถ้ามี DNA ปริมาณน้อย และถ้า DNA เคลื่อนที่พร้อมสี อาจจะมองไม่เห็นแถบ DNA ทั้งนี้สามารถแก้ไขโดยทำอิเลคโตรโฟรีซีสโดยใช้ loading buffer ที่ไม่มีสี หรือใช้ปริมาณน้อยลง

8. แถบ DNA เคลื่อนที่ไม่เหมือนรูปแบบเดิม ซึ่งการเปลี่ยน electrophoresis buffer หรือความแตกต่างระหว่าง agarose ที่ผลิตแต่ละครั้ง อาจทำให้เกิดเหตุการณ์นี้ได้ (วาสนา, 2539)

เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ในการตรวจแยกสายพันธุ์พืช

การศึกษาทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลต่าง ๆ สามารถนำมาใช้ประโยชน์กับงานด้านการจำแนกพันธุ์พืชมากขึ้น ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีภายในต้นพืชเป็นสิ่งที่แสดงวิวัฒนาการของพืชได้ดีที่สุด (Abbott, 1986) พืชต่างพันธุ์กันอาจมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันได้ แต่ในทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลพืชจะมีความแตกต่างกัน การประเมินความแตกต่างของพันธุ์พืชจึงต้องหาความแตกต่างทางชีวเคมีและชีวโมเลกุล (Larsen, 1969) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชที่ปรากฏออกมาเป็นผลเนื่องมาจากพันธุกรรมของพืช แต่พืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) แตกต่างกันอาจแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกันได้ (Gottlieb, 1977)

ปัจจุบันการศึกษาพันธุกรรมพืชในระดับ DNA ได้แพร่หลายมากขึ้น เนื่องจากให้ผลที่แม่นยำโดยเฉพาะเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs) ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้ผลดีในการแยกความแตกต่างของพืชหลายชนิดที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนกัน เช่น การศึกษาใน sweet corn (Gerdes and Tracy, 1994) *Populus tremuloides* และ *P. grandidentata* (Liu and Furnier, 1993) *Musa* spp. (Gawel and Jarret,1991) และพืชสกุล *Vigna* (Fatokun *et al.*, 1993) นอกจากนี้ RFLPs ยังสามารถบ่งบอกและกำหนดตำแหน่ง quantitative trait loci ที่เกี่ยวข้องกับ cooked - kernel elongation ในประชากรข้าวรุ่น F3 ที่ได้จากการผสมข้ามพันธุ์ (Ahn *et al.*, 1993) แต่ในทางปฏิบัติยุ่งยากซับซ้อนเพราะต้องผ่านขบวนการ southern blot และต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี (วัชรีและมนตรี, 2536) ดังนั้นเพื่อลดขั้นตอน ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่าย จึงมีการนำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ไปปรับใช้เป็นเทคนิค RAPD ซึ่งเทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น สนับสนุนการปรับปรุงพันธุ์ การตรวจสอบความแตกต่างของพันธุ์ (cultivars) พืช การจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิด (species) พืช การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชเมื่อมีการผสมข้ามระหว่างชนิดพืช และใช้ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช เป็นต้น (ภาณี, 2536)

ภาณี (2536) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อตรวจแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชผักตระกูลกะหล่ำ หาความสัมพันธ์ของลูกผสมระหว่างชนิดพืช รวมถึงการศึกษาความแตกต่างของพันธุ์ลูกผสมกับพันธุ์พ่อ - แม่ของผักกาดขาวปลี โดยใช้ primer 60 ชนิด พบว่ามี primer 4 ชนิด ที่แสดงความแตกต่างของลูกผสมชั่วที่ 1 จากพันธุ์พ่อ - แม่ และแสดงความเกี่ยวเนื่องอย่างชัดเจน ผลที่ได้ดังกล่าวแสดงออกในทุกครั้งของซ้ำการทดลอง เนื่องจากพ่อ - แม่ที่ใช้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก ดังนั้นจึงพบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ใน primer เพียง 4 ชนิดเท่านั้น นอกจากนี้ยังใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของพืชตระกูล

กะหล่ำ หาความสัมพันธ์ของลูกผสมระหว่างชนิดพืช และหาความสัมพันธ์ของลูกผสมในพืชชนิดเดียวกันได้อย่างชัดเจน

นิตศรี และคณะ (2537) ได้ใช้เทคนิค RAPD เพื่อจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของหญ้าแฝก 10 พันธุ์ โดยอาศัยแบบแผนลายพิมพ์ DNA ของหญ้าแฝกแต่ละพันธุ์ไปเปรียบเทียบความเหมือน และความแตกต่างทางพันธุกรรม ผลการทดลองพบว่า สามารถแยกความแตกต่างและความสัมพันธ์ของหญ้าแฝกแต่ละพันธุ์ได้อย่างชัดเจน

สมศักดิ์ และคณะ (2538) ตรวจสอบความสัมพันธ์ของข้าวพันธุ์ปลูกและพันธุ์ป่าในสกุล *Oryza* 5 ชนิด จำนวน 16 พันธุ์ โดยใช้ primer 48 ชนิด เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA พบว่ามี 7 ชนิด ที่ทำให้เกิดแถบ DNA ที่มีความแตกต่างกัน 68 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1700 - 3000 bp. เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างแถบ DNA ที่ได้ สามารถแบ่งข้าวที่ใช้ตรวจสอบออกเป็น 4 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มมีลักษณะสอดคล้องกับองค์ประกอบของ genome ในข้าวแต่ละชนิด

นวลน้อย (2539) ศึกษาความแตกต่างของกวาว 5 ชนิด โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าจากการใช้ primer 30 ชนิด มี primer เพียง 4 ชนิด (PK14 PW14 PA05 PAH17) ทำให้เกิดแบบแผนลายพิมพ์ DNA ที่สามารถนำมาพิจารณาเพื่อแยกความแตกต่างของกวาวทั้ง 5 ชนิดได้ และพบว่าในแต่ละตัวอย่างของพืชทดลองจะมีแบบแผนลายพิมพ์ DNA เฉพาะในแต่ละ primer

Dallas (1988) รายงานว่าพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) ที่เกิดจากการผสมกันเอง (self pollination) ภายในพันธุ์เดียวกัน จะมีแบบแผนลายพิมพ์ DNA ที่เหมือนกัน และแตกต่างไปจากพันธุ์ที่ได้จากการผสมของข้าวที่ต่างพันธุ์กัน

Hu and Quiros (1991) ได้จำแนกความแตกต่างของพืชระหว่างบร็อคโคลี่ 14 พันธุ์ และกะหล่ำดอก 12 พันธุ์ โดยเทคนิค RAPD พบว่า primer 4 ชนิด ที่สามารถสร้าง DNA fragment ขนาด 300 - 2600 bp. จากแบบแผนลายพิมพ์ DNA สามารถบอกได้ว่าพืชทั้ง 2 ชนิด แตกต่างกันอย่างชัดเจน และพบว่าต้นกล้าที่ได้จากบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์เดียวกันมีความแตกต่างของแบบแผนลายพิมพ์ DNA น้อยกว่าต้นกล้าที่ได้จากต่างบริษัทกัน

Shimada *et al.* (1993) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างลูกผสม F1 กับพ่อ - แม่ของ Mume (*Prunus mume* Sieb. et Zuce.) พบว่าแบบแผนลายพิมพ์ DNA ของลูกผสม F1 มีความเกี่ยวเนื่องกับพ่อ - แม่ โดยแถบ DNA บางส่วนจะได้รับการสืบทอดจากพ่อบางส่วนได้รับจากแม่ และแบบแผนลายพิมพ์ DNA ของ Mume แต่ละพันธุ์ หรือในลูกผสมแต่ละต้นจะมีลักษณะเฉพาะตัวที่แตกต่างกัน

Schnell and Knight (1993) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อวิเคราะห์พันธุกรรมของมะม่วง (*Mangifera* sp.) 9 species ซึ่งแบ่งเป็น 2 subgeneras คือ *Mangifera* 4 ตัวอย่าง และ *Limus* 5 ตัวอย่าง พบว่ามะม่วงแต่ละ species มีความแตกต่างกัน ซึ่งผลวิเคราะห์สอดคล้องกับการจำแนกพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ใช้ลักษณะของใบ ดอก ผล

Adam *et al.* (1993) ทำการเปรียบเทียบพันธุกรรมของ *Juniperus excelsa* และ *J. procera* จากประเทศซาอุดิอาระเบีย *J. excelsa* จากกรีก และ *J. procera* จากเอธิโอเปีย โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่า แบบแผนลายพิมพ์ DNA ของ junipers จากแต่ละประเทศมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน

Lui and Furnier (1993) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) ของ *Populus tremuloides* และ *P. grandidentata* โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่า *P. tremuloides* มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายใน species มากกว่า *P. grandidentata*

Joshi and Nguyen (1993) ใช้เทคนิค RAPD เพื่อศึกษาพันธุกรรมของข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) จำนวน 15 พันธุ์ โดยใช้ primer 40 ชนิด พบว่า 80 % ของ primers ที่ใช้สามารถทำให้เกิด polymorphisms และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ผล แสดงออกในรูป dendrogram เพื่อบ่งบอกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic relationships) ของข้าวสาลีได้

Wilkie *et al.* (1993) จำแนกพันธุ์ของ *Allium* จำนวน 7 พันธุ์ โดยใช้ primer 20 ชนิด พบว่ามี primer 7 ชนิด ทำให้เกิด polymorphisms และสามารถใช้ในการจำแนกพันธุ์ของ *Allium* ได้

Foolad *et al.* (1993) ได้นำเทคนิค RAPD มาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ลูกผสมของมะเขือเทศ และเมื่อเปรียบเทียบแบบแผนลายพิมพ์ DNA พบว่าสามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ลูกผสมของมะเขือเทศในชนิดเดียวกันได้

Castiglione *et al.* (1993) ใช้ primer 18 ชนิด ในเทคนิค RAPD เพื่อบ่งบอกความแตกต่างในระดับ clone ของ poplar ใน genus *Populus* พบว่ามี primer 4 ชนิด สามารถทำให้เกิดแถบ DNA ที่แตกต่างกัน 120 แถบ และ 92 % ของทั้งหมดเกิด polymorphisms ที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างของ poplar แต่ละ clone ได้

Benito *et al.* (1993) รายงานว่าเทคนิค RAPD สามารถจำแนกความแตกต่างของพืชทั้งระหว่างชนิดและภายในชนิดเดียวกันได้ โดยใช้ DNA ปริมาณน้อยจาก endosperm หรือจากใบของพืช

Mailer *et al.* (1994) ทำการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืช โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่า *Brassica napus* L. กลุ่มที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์รุ่นเดียวกัน จะแสดงลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน และจะแตกต่างจากกลุ่มที่ปรับปรุงพันธุ์ต่างรุ่นกัน

Schnell *et al.* (1994) ศึกษาความสัมพันธ์ของพันธุ์มะม่วง (*Mangifera indica* L.) 25 พันธุ์ พบว่ามะม่วงพันธุ์ Haden มีแบบแผนลายพิมพ์ DNA คล้ายคลึงอยู่ระหว่างพันธุ์ Turpentine และ Mulgoba ซึ่งสันนิษฐานว่าพันธุ์ Haden เป็นลูกผสมจาก Mulgoba กับ Turpentine ส่วนพันธุ์อื่น ๆ มีแบบแผนลายพิมพ์ DNA คล้ายกับพันธุ์ Haden หรือ Mulgoba มากกว่าพันธุ์ Turpentine ซึ่งเชื่อว่าน่าจะเป็นพันธุ์ที่เป็น half - sib ของ Mulgoba

Wang *et al.* (1994) รายงานว่า RAPD เป็นเทคนิคที่เหมาะสมและสะดวกที่จะใช้ในการพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์พ่อ - แม่กับลูกผสม F1 โดยใช้ศึกษาในข้าว (*Oryza sativa* L.) พบว่าลูกผสม F1 จะมีแถบ DNA ทั้งที่ได้รับจากพ่อและจากแม่ นอกจากนี้ยังพิสูจน์ให้เห็นความแตกต่างระหว่างพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ด้วย

Yu and Nguyen (1994) ใช้เทคนิค RAPD ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) ของพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) ผลจาก agarose gel electrophoresis พบว่าระหว่างข้าวใน subspecies *Japonica* กับ *Indica* เกิด polymorphisms มากกว่าพันธุ์ upland และ lowland ซึ่งอยู่ใน subspecies เดียวกัน

Ko *et al.* (1994) วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของพันธุ์ข้าวจากออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น ฟิลิปปินส์ และไต้หวัน รวม 37 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าพันธุ์ข้าวจากออสเตรเลียและสหรัฐอเมริกามีความใกล้ชิดกันมากที่สุด โดยมีแบบแผนลายพิมพ์ DNA คล้ายคลึงกันถึง 88 - 97 % ส่วนพันธุ์ข้าวจากญี่ปุ่นและฟิลิปปินส์มีความแตกต่างกัน และต่างจากพันธุ์จากออสเตรเลียและสหรัฐอเมริกาอย่างชัดเจน

Shatters *et al.* (1995) รายงานว่าการใช้เทคนิค RAPD ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของแบบแผนลายพิมพ์ DNA ถั่วเหลือง (*Glycine max* L.) ที่สกัดจากเมล็ดที่ได้รับอิทธิพลสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน เช่น ได้รับอุณหภูมิและความชื้นที่แตกต่างกัน จะมีแบบแผนลายพิมพ์ DNA ที่แตกต่างกัน (polymorphisms)

Kobayashi *et al.* (1995) รายงานการใช้เทคนิค RAPD ในการจำแนกพันธุ์ของ evergreen azalea โดยใช้ primer ทั้งหมด 100 ชนิด พบว่า มี primer เพียง 10 ชนิด ที่ให้แบบแผนลายพิมพ์ DNA ที่แตกต่างกัน และจากการใช้ primer PK19 หรือ PK20 สามารถแยก

ความแตกต่างระหว่าง evergreen azalea ในกลุ่ม Edo - Kirishima 9 พันธุ์ และกลุ่ม Kurume azalea 14 พันธุ์ได้อย่างชัดเจน

Kamalay and Carey (1995) ได้ใช้เทคนิค RAPD เพื่อช่วยคัดเลือกพันธุ์ของ American elm (*Ulmus americana* L.) ผลการศึกษาพบว่า แบบแผนลายพิมพ์ DNA ของ American elm มีความเฉพาะเจาะจง เป็นไปตามกฎการถ่ายทอดยีนจากพ่อแม่ไปสู่ลูกหลานของเมนเดล แม้จะใช้ DNA ที่สกัดจากส่วนของพืชที่แตกต่างกัน หรือใช้เทคนิคการสกัด DNA บางขั้นตอนต่างกันก็ตาม

จะเห็นว่าเทคนิค RAPD เป็นวิธีการที่ง่ายและสะดวกสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกและวิเคราะห์พันธุกรรมของพืชได้ดี แม้ว่าจะมีปัญหาเกี่ยวกับความสม่ำเสมอจากผลของการทำปฏิกิริยา แต่การทดลองส่วนใหญ่ก็ยืนยันได้ว่าแบบแผนลายพิมพ์ DNA ที่ได้จากเทคนิค RAPD จะมีความเฉพาะตัวในพืชแต่ละชนิด และ/หรือ พันธุ์

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University