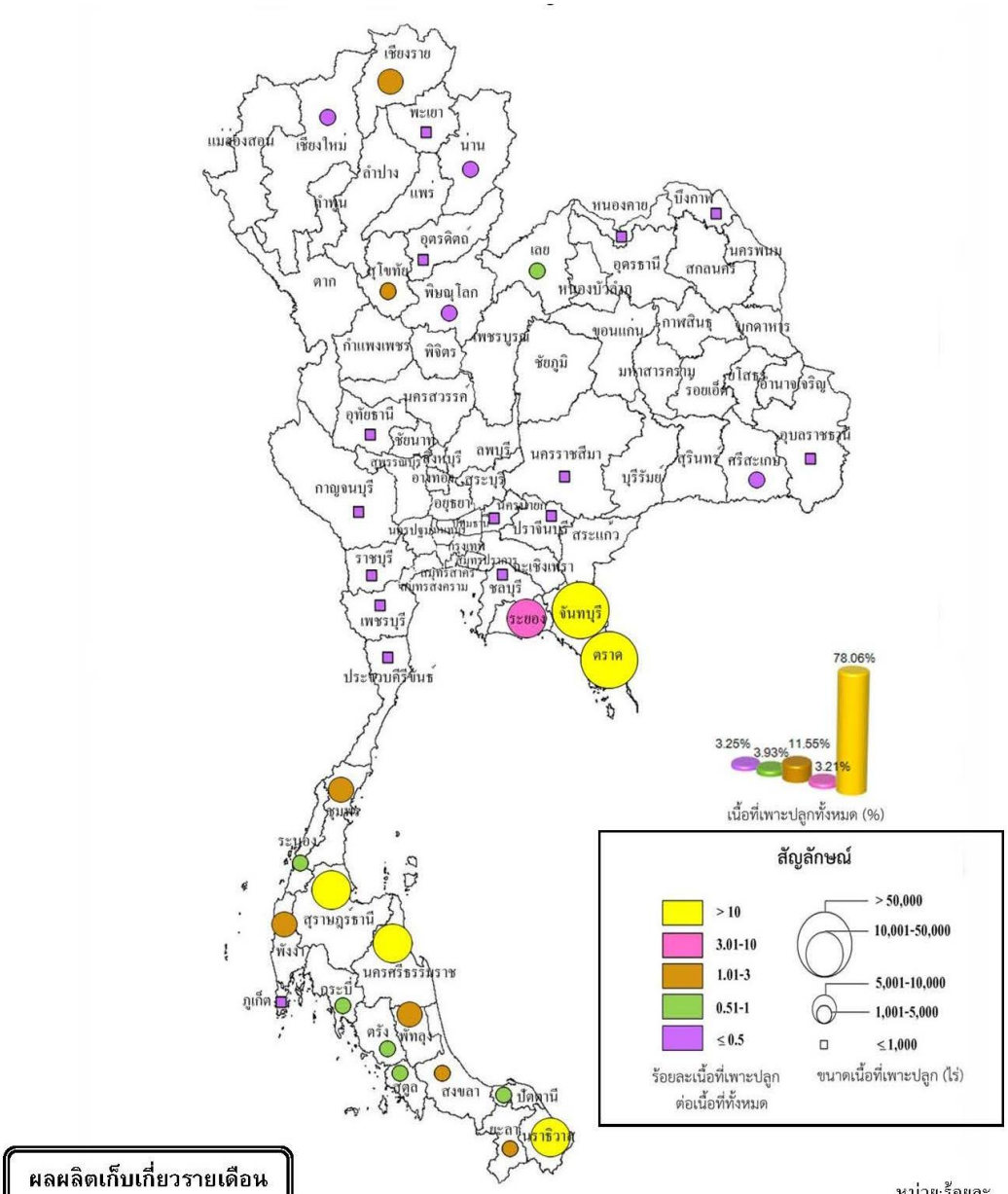
บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การบ่งชี้สายพันธุ์เงาะในพื้นที่วังสวนบ้านแก้ว มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมีเนื้อหาที่สำคัญและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องสำหรับใช้เป็นข้อมูลประกอบการดำเนินงานวิจัย ดังนี้

ลักษณะทั่วไปของเงาะ

เงาะเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย มีการปลูกกันอย่างแพร่หลายทั้งในภาคตะวันออกและภาคใต้ โดยจังหวัดที่มีพื้นที่การปลูกมาก ได้แก่ ระยอง จันทบุรี ชุมพร สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช ผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 518,377, 438,588 และ 486,928 ตัน ตามลำดับ ปริมาณการบริโภคเงาะภายในประเทศ คิดเป็นร้อยละ 94.85 ของผลผลิตทั้งหมด มีมูลค่าการส่งออกเงาะและผลิตภัณฑ์ปีละประมาณ 318 ล้านบาท ไปยังประเทศจีน สิงคโปร์ มาเลเซีย อเมริกา และเกาหลีใต้ (ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี กรมวิชาการเกษตร, 2553; สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) จากข้อมูลของศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2559) แสดงพื้นที่ปลูกเงาะของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2558 มีพื้นที่ประมาณ 293,018 ไร่ มีเนื้อที่ที่ให้ผลผลิตแล้วในปี พ.ศ.2559 ประมาณ 270,618 ไร่ คิดเป็นผลผลิต 221,815 ตัน ได้ผลผลิตต่อเนื้อที่ที่ให้ผล จำนวน 1,139 กิโลกรัม (ภาพที่ 2.1)

ไม้ในวงศ์ (Sapindaceae) นี้เป็นไม้ที่ชอบอากาศร้อนและชื้น มีฝนตกชุกและพบมากที่สุดในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เจริญเติบโตได้ดีในสภาพอุณหภูมิระหว่าง 22-35 องศาเซลเซียส มีปริมาณน้ำฝน 2,000-3,000 มิลลิเมตร/ปี มีการกระจายตัวของฝนสม่ำเสมอ สภาพพื้นที่มีความชื้นสูง 75-85% แต่ต้องการสภาพแห้งแล้งก่อนออกดอกติดต่อกัน 21-30 วัน แหล่งปลูกไม่ควรสูงจากระดับน้ำทะเลเกิน 650 เมตร ไม่ชอบสภาพพื้นที่หนาวเย็น เงาะชอบดินร่วนเหนียว มีความอุดมสมบูรณ์สูง ความลึกของหน้าดินไม่ควรน้อยกว่า 1 เมตร ค่าความเป็นกรด-เป็นด่างของดิน 5.0-6.5 มีการระบายน้ำดี เงาะมีอายุนานหลายปี ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มปลูกจนเริ่มให้ผลผลิตมีอายุตั้งแต่ 4 ปีขึ้นไป สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตั้งแต่ออกดอกจนผลแก่ใช้เวลาประมาณ 130-160 วัน และเงาะสามารถนำมาทำประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น รับประทานผลสด ทำเงาะแช่น้ำเชื่อมบรรจุกระป๋อง ทำแยม ไขของเงาะสามารถนำมาทำเป็นสบู่และเทียนไข นอกจากนี้รากและเปลือกของเงาะยังสามารถนำมาทำยาสมุนไพรได้ด้วย (ศูนย์ข้อมูลผลไม้, ม.ป.ป.)



ผลผลิตเก็บเกี่ยวรายเดือน

หน่วย:ร้อยละ

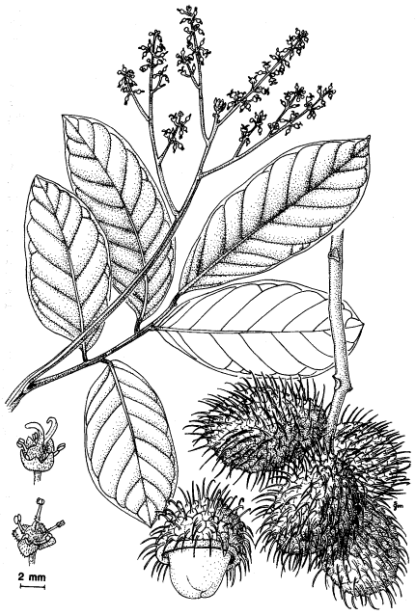
ปี 2555												แหล่งผลิต 5 อันดับแรก
ม.ค	ก.พ	มี.ค	เม.ย	พ.ค	มิ.ย	ก.ค	ส.ค	ก.ย	ต.ค	พ.ย	ธ.ค	
0.13	0.03	0.02	6.28	28.34	39.68	7.79	12.18	3.48	1.21	0.71	0.15	จันทบุรี ตราด นครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี นราธิวาส

ช่วงเดือนที่เก็บเกี่ยวผลผลิต

ช่วงเดือนที่เก็บเกี่ยวผลผลิตมาก

ภาพที่ 2.1 แผนที่แสดงแหล่งเพาะปลูกเงาะของประเทศไทย
ที่มา: ศูนย์ข้อมูลผลไม้ (ม.ป.ป.)

เงาะมีชื่อสามัญว่า Rambutan จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Sapindaceae จัดอยู่ในสกุล (Genus) *Nephelium* และชนิด (Species) *N. lappacium* เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ มีความสูงประมาณ 15 – 25 เมตร มีกิ่งก้านสาขามาก ใบเป็นแบบใบประกอบ มีจำนวน 2-4 คู่ต่อก้านใบดอกเกิดเป็นช่อ (Panicle) ที่ปลายกิ่งและซอกใบเป็นดอกขนาดเล็กมาก ผลเงาะเป็นทรงกลมติดกันเป็นช่อมีจำนวน 10-18 ผลต่อหนึ่งช่อ รอบ ๆ ผลมีขนที่ยาวแต่นุ่ม (Spinterns) สีของขนแตกต่างตามสายพันธุ์ เช่น สีแดง ชมพูหรือเหลือง ซึ่งลักษณะช่อดอก ดอก และผลเงาะ แสดงดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 ลักษณะช่อดอก ดอกและผลเงาะ
ที่มา: Nakasone and Paull (1998)

เงาะในประเทศไทยมีหลายสายพันธุ์ สามารถแยกเป็น 3 ประเภท คือ พันธุ์ดั้งเดิม เช่น พันธุ์อากร สีนาก เจ๊ะหมง เปเรก นังเบอร์ลี ตาวี ฯลฯ พันธุ์ปรับปรุง เช่น พลิ้ว 1 พลิ้ว 2 และพันธุ์ที่นิยมปลูกเพื่อบริโภค เช่น พันธุ์โรงเรียน พันธุ์สีชมพู พันธุ์สีทอง เป็นต้น (ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี กรมวิชาการเกษตร, 2553)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของเงาะ

นฤมล มานิพพาน (2549) อธิบายลักษณะทั่วไปของเงาะ การปลูก และการขยายพันธุ์ของเงาะไว้ดังนี้

ราก เงาะมีระบบของรากเป็นแบบรากแก้วงอกขึ้นมาจากเมล็ด ทำหน้าที่ช่วยยึดลำต้นให้แข็งแรง รากแขนงที่แตกตัวจากรากแก้ว เป็นรากเจริญที่แผ่ไปในแนวราบแบบกระจายรอบ ๆ

ลำต้น และรากฝอยที่แตกตัวจากรากแขนงอีกทีจะทำหน้าที่ดูดซับน้ำและทำการลำเลียงอาหารไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืชเพื่อการเจริญเติบโต

ลำต้น เงาะมีลำต้นขนาดกลาง มีความสูงประมาณ 4-5 เมตร มีการแตกกิ่งก้านสาขาย่อยจำนวนมาก เปลือกมีสีเทาอมน้ำตาลเข้ม กิ่งมีขนาดเล็กสีน้ำตาลอมแดงคล้ำ และมีรอยเหี่ยวละเอียดรอบ ๆ ต้น

ใบ เงาะมีจำนวนใบย่อยประมาณ 2-4 คู่ ก้านใบมีขนาดใหญ่ ลักษณะกลม สีน้ำตาลอมแดง ฐานก้านใบหนา ในใบอ่อนจะมีขน รูปร่างเป็นรูปไข่หัวกลับ ฐานแหลม ปลายมน ขอบใบเรียบ สีเขียวอมเหลือง มีเส้นกลางใบขนาดใหญ่ สามารถมองเห็นได้ชัดเจนทั้งด้านหน้าและด้านหลังใบ มีจำนวนประมาณ 6-15 คู่ ใต้ใบมีลักษณะเป็นคลื่นเล็กน้อย

ดอก เงาะจะเกิดดอกเป็นช่อบริเวณปลายกิ่งและตามซอกใบ ลักษณะช่อดอกจะตั้งตรงและแตกแขนง ในแต่ละต้นจะมีช่อดอกหลายประเภท ทั้งดอกที่สมบูรณ์เพศและดอกไม่สมบูรณ์เพศ เช่น ช่อดอกตัวผู้หรือช่อดอกไม่สมบูรณ์เพศจะมีลักษณะของช่อค่อนข้างยาว รูปทรงกรวย มีกลีบดอก 5 กลีบ แต่ละกลับจะไม่ติดกัน มีเกสรตัวผู้ 5 ตัว แต่ละตัวเรียงตัวสลับกับกลีบดอก ตรงกลางจะเป็นแกนยื่นออกมาลักษณะคล้ายเกสรตัวเมียที่ไม่สมบูรณ์ ดอกบานจะมีสีขาวทั้งต้น ส่วนละอองเกสรจะแตกตัวออกและปล่อยละอองเกสรสีเหลืองออกมา ส่วนช่อดอกสมบูรณ์เพศจะมีเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน ลักษณะของดอกจะเป็นช่อสั้นกว่าช่อดอกตัวผู้ประมาณครึ่งหนึ่ง มีกลีบดอกประมาณ 4-6 กลีบ มีเกสรตัวผู้ 5 ตัว ตรงกลางดอกเป็นเกสรตัวเมียซึ่งประกอบด้วยรังไข่ 2 อัน ก้านเกสรตัวเมีย 1 ก้าน ส่วนปลายก้านยื่นโค้งออกมา 2 แฉก มีขนเล็ก ๆ สีน้ำตาลปกคลุมอยู่ ก้านเกสรตัวเมียเกิดขึ้นบริเวณที่รับรังไข่ทั้งสองเชื่อมตัวติดกัน เมื่อทำการผสมแล้วรังไข่จะเจริญเติบโตเพียงตัวเดียว

ผล เงาะจะเกิดในช่อเดียวกันหลาย ๆ ผล ติดอยู่บนก้านช่อดอก ลักษณะค่อนข้างกลม สีแดงและมีขนขึ้นปกคลุมทั่วผล มีทั้งขนสั้นและยาวแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ บางสายพันธุ์มีสีแดงปนเหลือง ความยาวประมาณ 3.5-8 เซนติเมตร กว้างประมาณ 2-5 เซนติเมตร เนื้อมีลักษณะใสอ่อนนุ่ม สีขาวอมเหลือง

เมล็ด เงาะมีลักษณะเป็นรูปแบนยาวรี หรือกลมเป็นรูปไข่ ผิวด้านนอกจะห่อหุ้มด้วยผิวเปลือกบาง ๆ สีน้ำตาลอ่อน

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ชนิดและสายพันธุ์

เงาะที่พบในประเทศไทยมีมากกว่า 10 สายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ที่ปลูกเพื่อการค้าในปัจจุบันได้แก่ พันธุ์โรงเรียนและพันธุ์สีชมพู สายพันธุ์ที่ไม่ค่อยเป็นที่รู้จักหรือนิยมเพาะปลูก เช่น พันธุ์สีทอง เจ๊ะมง น้ำตาลกรวด บางยี่ขัน ซาลังงอ อากร สีนาก สีชาด ปีนัง ตาวี เป็นต้น ซึ่งลักษณะของแต่เงาะแต่ละพันธุ์ (นฤมล มานิพพาน, 2549) มีดังนี้

1. พันธุ์โรงเรียน เป็นสายพันธุ์ที่นำมาจากประเทศมาเลเซีย โดยนายเค หว่อง ซึ่งเป็นเจ้าของเหมืองแร่อยู่ในอำเภอบ้านนาสาร จังหวัดสุราษฎร์ธานี นำมาปลูกไว้ในบริเวณบ้านเพื่อ

รับประทาน ประมาณ 5-6 ต้น ต่อมานายเค หว่อง ได้ขายที่ดินทำเหมืองแร่นั้นให้รัฐบาล เมื่อปี พ.ศ. 2497 และรัฐบาลได้ใช้ที่ดินนี้สร้างโรงเรียนบ้านนาสารขึ้น โดยมีต้นเงาะที่นายเค หว่อง ปลูกไว้อยู่ในที่ดินของโรงเรียนบ้านนาสารนั้นด้วย ต่อมาครูแย้ม พวงพันธุ์ ได้ทำการทาบกิ่งและตอนกิ่งจากต้นเงาะขายให้ชาวบ้านน้ำไปปลูก ชาวบ้านเลยตั้งชื่อว่า เงาะพันธุ์โรงเรียน ตามสถานที่ที่ได้พันธุ์มา เนื่องจากเงาะโรงเรียนมีรสชาติหวานและกรอบดี จึงมีผู้นำไปปลูกตามจังหวัดต่าง ๆ เช่น จังหวัดชุมพร นครศรีธรรมราช จันทบุรี และระยอง เป็นต้น

เงาะสายพันธุ์นี้จะมีลักษณะทรงพุ่มค่อนข้างเลื้อย มีใบลักษณะเล็กและกลมอยู่ประมาณ 3-4 คู่ ก้านใบสั้น ปลายใบงอเล็กน้อย เปลือกผลอ่อนมีสีเหลืองอมชมพู และเมื่อแก่จะมีสีแดงจัด โคนขนอ่อนมีสีเขียวอ่อนและจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อโคนแก่จัด ปลายขนมีสีเขียวอ่อน เนื้อสีขาวขุ่นปนเหลือง เนื้อมีลักษณะย่นเล็กน้อย รสชาติหวาน เนื้อกรอบและล่อนออกจากเมล็ด เปลือกเมล็ดบางไม่แข็ง เมล็ดแบนยาวรูปไข่ มีความสามารถตอบสนองต่อปุ๋ยได้ดี แต่มักจะพบปัญหา คือ เมื่อขาดน้ำในช่วงผลอ่อน ผลจะแตกหรือร่วงหล่นได้มากกว่าเงาะพันธุ์สีชมพู

2. พันธุ์บางยี่ขัน เป็นเงาะพันธุ์ดั้งเดิมทางภาคกลาง เพาะปลูกง่าย ลักษณะทรงพุ่มใหญ่สูง กิ่งเหนียว ผลมีขนาดกลาง สีแดงอมเหลือง เนื้อหนาไม่ล่อน รสชาติหวานอมเปรี้ยว

ความเป็นมาของการปลูกเงาะพันธุ์บางยี่ขันในจันทบุรี เริ่มขึ้นเมื่อประมาณกว่า 80 ปีที่ผ่านมา โดยชาวสวนจันทบุรีนำกิ่งตอนและเมล็ดของเงาะบางยี่ขันจากกรุงเทพฯ มาปลูกที่จันทบุรี โดยที่ตำบลเกวียนหัก อำเภอขลุง มีชาวสวนไปพบเงาะต้นหนึ่งที่งอกออกมาจากเมล็ดเงาะบางยี่ขัน เมื่อสังเกตดูก็เห็นว่ามีลักษณะต่างออกไปจากเงาะบางยี่ขัน คือเป็นเงาะที่มีสีชมพูสด สวยงาม เนื้อมีรสหวานกรอบ และร่อนจากเมล็ดดีมาก ซึ่งในสมัยนั้นชาวบ้านเขาเรียกเงาะที่กลายพันธุ์มาจากเงาะบางยี่ขันว่า “เงาะพันธุ์หมาจู” เนื่องจากมีขนยาวสวยงามคล้ายหมาจู และมีผลเป็นสีชมพูเข้ม

ดร.ชัยวัฒน์ มครเพศ จากคณะวิชาพืชศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลวิทยาเขตจันทบุรี ซึ่งเป็นหนึ่งในผู้ร่วมโครงการอนุรักษ์เงาะสีชมพู ได้เล่าถึงความเป็นมาของชื่อเงาะพันธุ์หมาจู จากนั้นก็ได้อธิบายต่อว่า จากเดิมที่เงาะพันธุ์หมาจูปลูกกันที่อำเภอขลุง ก็ได้มีการปลูกเพิ่มมากขึ้นแพร่หลายไปทั่วจังหวัดจันทบุรี พร้อมกันนี้ชาวสวนก็ได้เรียกชื่อเงาะพันธุ์นี้เสียใหม่ตามลักษณะสีสันของผลเงาะว่า “เงาะพันธุ์สีชมพู” หรือ “เงาะสีชมพู”หรือ “เงาะสี” ในภาษาชาวบ้าน (MGR Online, 2547)

3. พันธุ์สีชมพู เงาะสายพันธุ์นี้มีลักษณะทรงพุ่มค่อนข้างทึบ ใบยาวและหนากว่าเงาะพันธุ์โรงเรียน สีของใบจะเข้มน้อยกว่าขอบใบและมีลักษณะห่อเข้าหากันเล็กน้อย ผลดกและมีขนยาว เมื่อผลสุกจะมีสีชมพู เปลือกหนา รสชาติหวาน เนื้อล่อนออกจากเมล็ด เป็นพันธุ์ที่ปลูกง่าย มีการเจริญเติบโตดี ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพดินฟ้าอากาศ แต่ปัญหาที่พบ คือ ผลมักบอบช้ำง่าย ไม่ทนทานต่อการขนส่ง

4. พันธุ์สีทอง เงาะสายพันธุ์นี้ทรงพุ่มจะมีการแตกตัวดี ลำต้นเกลี้ยง ใบยาวและใหญ่เมื่อต้นสมบูรณ์เต็มที่ ใบจะใหญ่และหนาขึ้น สามารถทนต่อโรคได้ดี ผลมีขนาดใหญ่และยาว ขนจะมีลักษณะแข็ง เมื่อผลเงาะสุกขนจะมีสีแดงเข้มขึ้น และเมื่อผลสุกงอม โคนขนจะมีสีแดง ปลายขนมีสีเขียวอ่อน เนื้อสีขาวค่อนข้างใส เนื้อล่อนออกจากเมล็ดแต่ไม่หมด เพราะจะมีเนื้อติดอยู่บ้างเล็กน้อย

รสชาติหวานอมเปรี้ยว แต่ถ้าทิ้งไว้ประมาณ 1-2 คืน รสชาติจะหวานแหลมและมีกลิ่นหอม เมล็ดค่อนข้างแบนสีเขียวขาวปนน้ำตาล ปัญหาที่พบ คือ เมื่อขาดน้ำในช่วงฤดูร้อนผลจะแตกตัวได้ยาก

5. พันธุ์น้ำตาลกรวด เงาะสายพันธุ์นี้จะมีลักษณะของต้นค่อนข้างเตี้ย มีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า ทรงพุ่มเตี้ยกว่าพันธุ์โรงเรียนและพันธุ์สีทอง ใบมีขนาดกลาง ปลายใบค่อนข้างมนและมีสีเขียวเข้มเป็นมัน ลักษณะคล้ายกับเงาะโรงเรียน ผลที่เริ่มสุก เปลือกของผลจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเข้ม ปลายขนสีเขียวอ่อนอมเหลือง เมื่อผลสุกโคนขนจะขยายห่างกัน และขนมีลักษณะแข็ง เปลือกหนา ขั้วผลใหญ่ เนื้อสีขาวขุ่น มีรอยย่นเป็นเส้นและมีรอยบุ๋มเป็นทางพาดยาวตามความยาวของผล รสชาติหวานแหลม มีกลิ่นหอม เนื้อกรอบและล่อนออกจากเมล็ด เปลือกติดเนื้อค่อนข้างมาก เมล็ดค่อนข้างกว้างและมีสีขาวอมเหลืองคล้ายงาช้าง

6. พันธุ์เจ๊ะมง เงาะสายพันธุ์นี้จะมีลักษณะของใบขนาดปานกลาง ปลายใบงอเล็กน้อย ผลมีสีแดงสด รสชาติหวานกรอบ เนื้อไม่แฉะ นิยมเพาะปลูกมากทางภาคใต้ เช่น จังหวัดสงขลา ปัตตานี และนราธิวาส ปัญหาที่พบ คือ เป็นพันธุ์ที่เพาะปลูกได้ยากและให้ผลไม่ดก

สภาพดินฟ้าอากาศที่เหมาะสมกับการปลูกเงาะ

นฤมล มานิพพาน (2549) อธิบายถึงสภาพแวดล้อมมีผลอย่างมากต่อการเจริญเติบโตและคุณภาพของเงาะ การปลูกเงาะเพื่อการค้าและให้ได้กำไรดี สามารถทำได้ในบางเขตที่มีสภาพดินฟ้าอากาศที่เหมาะสมเท่านั้น ดังนั้นในการตัดสินใจปลูกเงาะเพื่อการค้าหรือปลูกจำนวนมากควรคำนึงถึงลักษณะสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมดังนี้

1. สภาพพื้นที่ที่เหมาะแก่การเพาะปลูกควรเป็นพื้นที่ที่มีระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลไม่เกิน 650 เมตร พื้นที่นั้นจะต้องไม่มีน้ำท่วมขัง มีความลาดเอียงของพื้นที่ประมาณร้อยละ 1-3 แต่ไม่ควรเกินร้อยละ 15 และควรจะอยู่ใกล้บริเวณที่มีแห่งน้ำที่เพียงพอแก่การเพาะปลูกเงาะได้

2. ลักษณะดินที่เหมาะแก่การปลูกเงาะควรเป็นดินร่วนปนทรายที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง มีการระบายน้ำได้ดี หน้าดินควรลึกมากกว่า 1 เมตร มีค่าความเป็นกรด-ด่าง ประมาณ 5.5-6.5

3. สภาพภูมิอากาศควรมีอุณหภูมิในพื้นที่ที่เพาะปลูกอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส เงาะจึงจะเจริญเติบโตดี มีปริมาณน้ำผลมากกว่า 1,500 มิลลิเมตรต่อปี และมีความชื้นในอากาศสูง

4. แหล่งน้ำถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญต่อการทำการเพาะปลูกพืชทุกชนิดรวมถึงเงาะด้วย พื้นที่ที่เพาะปลูกควรมีน้ำให้เพียงพอตลอดปี เป็นแหล่งน้ำสะอาดปราศจากสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ที่มีพิษปนเปื้อน และมีค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำประมาณ 6.0-7.5

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

เทคนิคทางชีวโมเลกุล

การศึกษาทางชีวโมเลกุลเป็นการศึกษาเพื่อเข้าใจกลไกพื้นฐานของการทำงานของเซลล์ เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอหรือโปรตีน มีขั้นตอนการศึกษาคล้ายคลึงกันโดยวิธีการพื้นฐานเริ่มจากการค้นหาข้อมูลที่จำเป็น ทั้งข้อมูลของลำดับเบสในส่วนที่สนใจ และวัตถุประสงค์ในการศึกษาเพื่อเลือกใช้วิธีในการวิเคราะห์ให้เหมาะสม ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการศึกษายีนในปัจจุบันมีด้วยกันหลายวิธีขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษา เริ่มตั้งแต่การศึกษาข้อมูลของยีนที่สนใจเบื้องต้น

ทั้งเรื่องของลำดับเบสและข้อมูลที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มจำนวนในขั้นตอนของการทำพีซีอาร์ ซึ่งอาจใช้เทคนิคการโคลนเข้าร่วมด้วยในการหาลำดับเบสของยีนที่สนใจเพื่อตรวจสอบความถูกต้องของยีนที่ศึกษา โดยขั้นตอนของเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษามีรายละเอียดดังนี้ คือ

1. การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นและค้นข้อมูลเพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

การหาข้อมูลของยีนในปัจจุบันนี้มีการใช้คอมพิวเตอร์เข้ามาช่วยโดยการค้นหาข้อมูลผ่านทางฐานข้อมูลออนไลน์ เช่น

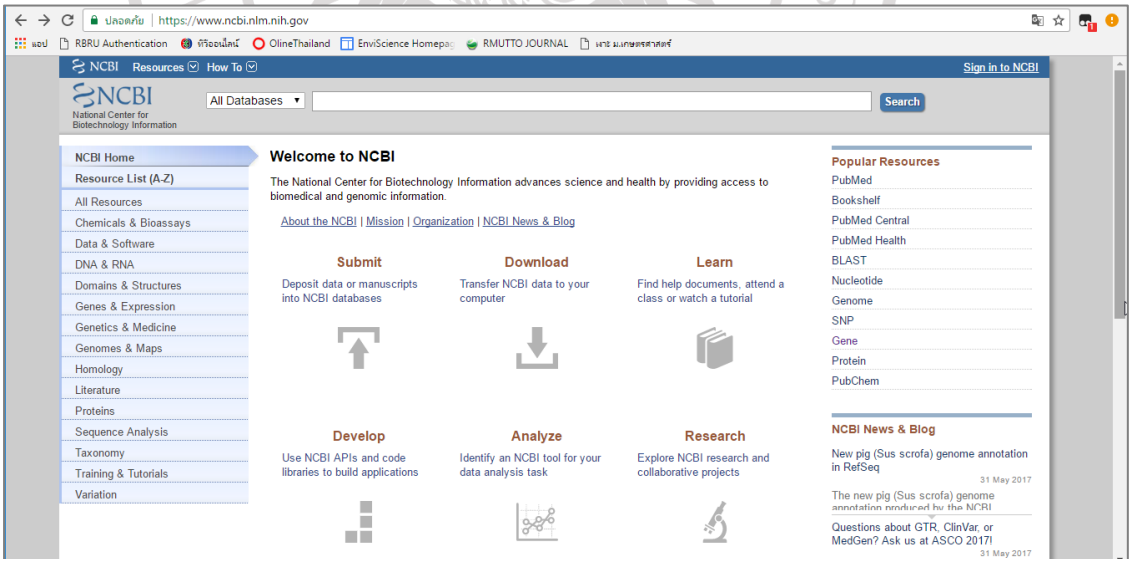
GENBANK http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

EMBL http://www.embl-heidelberg.de/

DDBJ http://www.ddbj.nig.ac.jp/

ซึ่งทั้ง 3 ฐานข้อมูล เป็นฐานข้อมูลที่มักมีการอ้างอิงถึงเสมอ ตั้งอยู่ตามแหล่งข้อมูลสำคัญของโลก (สหรัฐอเมริกา อังกฤษ และญี่ปุ่น) แต่จะมีการแลกเปลี่ยนข้อมูลลำดับเบสระหว่าง 3 ฐานข้อมูลเป็นประจำ ดังนั้น ไม่ว่าจะติดต่อกับฐานข้อมูลใดจะได้ข้อมูลเดียวกันและทันสมัยตลอดเวลาวันต่อวัน

ฐานข้อมูลอณูชีววิทยาพื้นฐานจะมีข้อมูลประกอบการศึกษาอณูชีววิทยาโดยทั่วไป ได้แก่ ชนิดของยีน ชื่อเจ้าของข้อมูล ชื่อบทความ วารสารที่ตีพิมพ์ ชื่อสิ่งมีชีวิตที่เป็นแหล่งของจีโนม ลำดับนิวคลีโอไทด์ โปรตีน ชีวโมเลกุลต่าง ๆ เพื่อใช้รองรับการศึกษาเพิ่มเติม ตลอดจนโปรแกรมที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมต่าง ๆ (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 หน้าเว็บไซต์ของฐานข้อมูลออนไลน์ของ GENBANK (https://www.ncbi.nlm.nih.gov)
ที่มา: National Center for Biotechnology Information (NCBI)

2. การออกแบบไพรเมอร์ (Primer Design)

ไพรเมอร์เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ มีความยาวประมาณ 18-25 เบส จำนวน 2 สาย สายหนึ่ง เรียก ไพรเมอร์เอฟ (Forward primer) อีกสายหนึ่งเรียก ไพรเมอร์อาร์ (Reverse Primer) แต่ละสายจะมีลำดับเบสที่เข้าคู่ (Complementary) กับลำดับเบสด้านปลาย 3’ ของสาย DNA แม่แบบแต่ละสาย และสามารถจับกับสาย DNA แม่แบบได้ โดยจับที่ตำแหน่งที่อยู่ขนาบข้างกับส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยและสสวท., 2548)

วัชรี อัตถทิพพหลคุณ และมนตรี อัตถทิพพหลคุณ (2536) กล่าวถึงวิธีการพิจารณาคัดเลือกหรือการออกแบบไพรเมอร์ที่สำคัญ คือ

1. ควรเลือกไพรเมอร์ที่มีปริมาณ GC ใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มขยายและควรมีปริมาณ GC อยู่ระหว่าง 50-60%

2. หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่มี Secondary Structure โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ปลาย 3’ (3’-end) ของไพรเมอร์ การตรวจสอบโครงสร้างของลำดับเบสทำได้โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์

3. ตรวจสอบการเรียงลำดับเบสของแต่ละไพรเมอร์ไม่ให้มีความเป็นคู่สมกัน (complementary) โดยเฉพาะต้องไม่มี 3’- Overlaps ในคู่ไพรเมอร์ ซึ่งจะช่วยลดอัตราการเกิด Primer-Dimer

4. ตามหลักเกณฑ์ควรกำหนดให้มีความยาวระหว่าง 18-28 นิวคลีโอไทด์ และมีการเรียงลำดับเบสเป็นเบสคู่สมกับ 3’-end ของแม่พิมพ์

5. มี Tm (Melting Temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 55-80 องศาเซลเซียส

6. ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่พอเหมาะควรอยู่ระหว่าง 0.1-0.5 โมล่าร์ หากใช้ความเข้มข้นสูงเกินไปจะส่งเสริมให้เกิดการจับคู่ผิดพลาด (Mispriming) และมีการสะสมของผลิตผลที่ไม่จำเพาะ (Nonspecific Product) มากขึ้น อีกทั้งยังช่วยเพิ่มโอกาสการเกิด Primer-Dimer ซึ่งเป็น Template-Independent Artifact ทั้งผลิตผลที่ไม่จำเพาะ รวมถึง Primer-Dimer ต่างแย่งใช้ส่วนประกอบในหลอดทำปฏิกิริยา ทั้งเอนไซม์ dNTPs และไพรเมอร์ ทำให้ได้ผลผลิตที่ต้องการลดลง

ปัจจุบันมีโปรแกรมที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์จำนวนมาก เช่น Primer3 ซึ่งจะช่วยคัดเลือกบริเวณของลำดับเบสที่เหมาะสมที่ใส่เข้าไปในตัวโปรแกรมออกมาเป็นลำดับเบสของไพรเมอร์ให้เลือก จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้สังเคราะห์ด้วยเครื่อง DNA Synthesizer หรือส่งให้บริษัทที่รับทำไพรเมอร์สร้างไพรเมอร์ออกมาเพื่อทดลองใช้ ซึ่งหากว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบไปยังจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างไม่จำเพาะ สามารถใช้เทคนิคการโคลนเข้ามาช่วยเพื่อใช้หาลำดับเบสของชิ้นส่วนผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์คู่ที่ออกแบบไปแล้วนั้นมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ ซึ่งจะถือได้ว่าเป็นไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบจากชิ้นส่วนผลิตผลพีซีอาร์นี้จะมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายมาก เนื่องจากเป็นการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษาโดยตรง

3. การสกัดดีเอ็นเอจากพืช

สุรินทร์ ปิยะโชคณากูล (2552) กล่าวถึงกระบวนการสกัดดีเอ็นเอให้ได้คุณภาพดีและมีปริมาณมากนั้น ขึ้นอยู่กับคุณภาพของเนื้อเยื่อที่ใช้ ถ้าเป็นไปได้ควรใช้เนื้อเยื่อสดและนำมาสกัดทันที แต่ถ้าจำเป็นต้องเก็บตัวอย่างไว้เป็นเวลานานควรเก็บรักษาอย่างถูกต้องเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี

ที่สุด สำหรับพืช ฤดูกาลในการเก็บตัวอย่างมีผลต่อคุณภาพดีเอ็นเอเช่นกัน เนื่องจากมีการสะสมสารต่าง ๆ ภายในพืช เช่น พอลิแซกคาไรด์ และพอลิฟีนอล ซึ่งมีปริมาณที่แตกต่างกันไปตามฤดูกาล สารทั้งสองชนิดดังกล่าวสามารถทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีสีน้ำตาล หรือทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอแตกหักและมีผลยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์หลายชนิด สามารถแก้ไขโดยใส่สารที่ดูดซับพอลิฟีนอลในบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ เช่น BSA (Bovine Serum Albumin) PVP (Polyvinyl Pyrrolidone) ที่ความเข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์

ส่วนของพืชที่นิยมใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ คือ ใบอ่อน เพราะมีเส้นใยน้อย ทำให้เซลล์แตกและปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาได้ง่าย ในกรณีที่เก็บตัวอย่างพืชเป็นเมล็ดจะนำเมล็ดมาเพาะและสกัดดีเอ็นเอจากต้นกล้า ถ้าเก็บตัวอย่างพืชสดและยังไม่ได้นำมาสกัดดีเอ็นเอทันที (หลายชั่วโมงจนเป็นวัน) ควรเก็บตัวอย่างในถุงพลาสติก พรมน้ำให้มีความชื้นพอประมาณ รัดถุงด้วยยางวง แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นหรือกล่องใส่น้ำแข็ง การเก็บควรเก็บพืชเป็นกิ่งขนาดพอเหมาะ ไม่ควรเด็ดใบออกเป็นใบเดี่ยว วิธีนี้จะช่วยเก็บรักษาตัวอย่างพืชไว้ได้นานเท่าใดขึ้นอยู่กับชนิดและเนื้อเยื่อของพืชด้วย ถ้าต้องการเก็บเป็นเวลานาน ควรเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส โดยนำเนื้อเยื่อพืชมาเก็บทันทีหรือนำมาจุ่มไนโตรเจนเหลวเพื่อให้แข็งตัวทันทีก่อน แล้วจึงเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส ไม่ควรเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ในกรณีนี้ควรเก็บพืชเป็นใบเดี่ยว ไม่ควรเก็บเป็นกิ่ง เนื่องจากสะดวกต่อการแบ่งตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอในเวลาที่ต้องการ ถ้าไม่มีตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ให้นำเนื้อเยื่อมาทำ Freeze Dry (หรือ Lyophilization) ซึ่งสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องในสภาพที่ไม่มีความชื้นได้นานเป็นปี

ในกรณีที่ต้องการเก็บตัวอย่างพืชในที่ห่างไกล และไม่มีอุปกรณ์เพียงพอที่จะสกัดดีเอ็นเอทันที ไม่สามารถแช่แข็งหรือ Freeze Dry ได้ วิธีที่เหมาะสม คือ ทำให้แห้งโดยเร็วด้วยซิลิกาเจล (Silica Gel) ซึ่งมีส่วนประกอบเพียงซิลิกาเจล ถุงกันน้ำ และหลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร ทำโดยเก็บใบอ่อนพืช ประมาณ 3 กรัมต่อ 1 หลอด เติมซิลิกาเจลที่แห้งลงไปจนเต็มหลอด ปิดฝาให้แน่น จากนั้นเปลี่ยนซิลิกาเจลใหม่ทุก 6 ชั่วโมง หลังจากเปลี่ยนซิลิกาเจลครั้งที่ 2 ใบควรจะแห้ง ไม่มีความชื้นแล้ว อาจเก็บไว้ในหลอดเดิมโดยเติมซิลิกาเจลเพียง 1 ใน 3 ของหลอด สามารถเก็บได้หลายเดือน

3.1 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

สุรินทร์ ปิยะโชคณากูล (2552) กล่าวถึงการตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอทำได้พร้อมกัน โดยมีวิธีทั่วไป 2 วิธี คือ การวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) หรือวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับเอธิเดียมโบรไมด์หลังจากแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏราไพพรรณี

3.1.1 วิธีการวัดการดูดกลืนแสง

การดูดกลืนแสงเกิดจากเบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกที่สามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร (ส่วนโปรตีนจะดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่นประมาณ 280 นาโนเมตร) ดังนั้นจึงใช้หาปริมาณของกรดนิวคลีอีกได้ โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถดูดแสงได้ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ที่ 260 นาโนเมตร (A_{260} หรือ OD_{260}) เท่ากับ 1 ส่วนสารละลายอาร์เอ็นเอหรือโอลิโกนิวคลิโอไทด์ที่ดูดแสงได้ OD_{260} = 1 จะมีความเข้มข้น 40 และ 33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีนี้จะใช้ได้ดีในกรณีที่สารละลายดีเอ็นเอค่อนข้างบริสุทธิ์ ไม่มีอาร์เอ็นเอหรือโอลิโกนิวคลิโอไทด์เจือปน และต้องมีปริมาณมากพอที่จะอ่านค่า OD ได้ ซึ่งอยู่ในระดับไมโครกรัม ปริมาณที่วัดได้นี้จะให้ค่าที่แน่นอนและยังตรวจสอบคุณภาพได้ด้วย โดยสารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่าอัตราส่วนระหว่าง OD_{260} / OD_{280} มีค่าประมาณ 1.7 – 1.8 ถ้าได้ค่ามาก แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอเจือปน และหากได้ค่าต่ำ แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอล วิธีปฏิบัติ คือ นำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาเจือจาง แล้ววัดค่า OD_{260} และ OD_{280} จากนั้นคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นที่ถูกต้อง

3.1.2 วิธีการวัดการเรืองแสงร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์

วิธีการวัดการเรืองแสง ทำโดยนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปส่องแสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง โดยความเข้มข้นของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้วจะสามารถบอกปริมาณของดีเอ็นเอตัวอย่างโดยประมาณได้ โดยปริมาณที่ตรวจสอบได้เป็นระดับนาโนกรัม ดังนั้น กรณีที่ปริมาณดีเอ็นเอมีน้อย ไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้จะนิยมใช้วิธีนี้ นอกจากนี้การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสยังสามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอได้ด้วยว่าหากมีการปนเปื้อนจากอาร์เอ็นเอหรือไม่ ซึ่งจะเห็นเป็นปื้นขึ้นบนแผ่นเจลภายหลังย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และสามารถบอกได้ว่าดีเอ็นเอมีขนาดโมเลกุลใหญ่ขนาดไหน มีการแตกหักของโมเลกุลมากเพียงใด วิธีปฏิบัติทำโดยหยอดดีเอ็นเอที่เตรียมได้ปริมาตรแน่นอนลงในแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ทำอิเล็กโทรโฟรีซีสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดและปริมาณหลาย ๆ ความเข้มข้น เมื่อสิ้นสุดการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแล้ว จึงย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปส่องผ่านด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและเปรียบเทียบการเรืองแสงของแถบ ดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.2 การเก็บรักษาดีเอ็นเอ (DNA Storage)

สารละลายดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้นมาก หรือที่สกัดได้เริ่มต้น (Stock) ควรเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หรือถ้าต้องการเก็บไว้เป็นเวลานาน ควรเก็บที่ -70 องศาเซลเซียส หรือ -80 องศาเซลเซียส ส่วนสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการหยิบใช้บ่อยครั้ง (Working Solution) ให้เก็บไว้ที่ -4 องศาเซลเซียส ควรแบ่งสารละลายดีเอ็นเอแยกเก็บไว้ในตู้เย็น 2 แห่ง เพื่อป้องกันเหตุการณ์ที่ไม่คาดคิด เช่น การปนเปื้อนดีเอ็นเออื่นในขณะที่มีการเปิดใช้งานบ่อย ๆ หรือการแตกหักของดีเอ็นเอจากสภาพการทำให้สารละลายดีเอ็นเอที่แข็งตัวละลาย และลดเวลาที่สารละลายดีเอ็นเออยู่ที่อุณหภูมิห้องให้น้อยที่สุด (สุรินทร์ ปิยะโชคณากูล, 2552)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

4. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

พีซีอาร์หรือปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส เป็นเทคนิคพื้นฐานทางอณูชีววิทยาที่นำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหรือ ดีเอ็นเอในหลอดทดลองจากปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่แบบ (DNA Template) จำนวนเพียงเล็กน้อย จนได้ผลผลิตเป็นพันล้านโมเลกุล ซึ่งปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วยสารตั้งต้นที่สำคัญ (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยและสสวท., 2548) ดังนี้

1. ดีเอ็นเอแม่แบบ หรือดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA Template) เป็นดีเอ็นเอที่สกัดได้มาจากเซลล์ที่มีนิวเคลียสของมนุษย์ สัตว์ พืช หรือสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ

2. ดีเอ็นเอสายเริ่มต้นขนาดสั้น ๆ เรียกว่า ไพรเมอร์ (Primer) มีความยาวประมาณ 18-25 เบส จำนวน 2 สาย สายหนึ่ง เรียก ไพรเมอร์เอฟ (Forward Primer) อีกสายหนึ่ง เรียก ไพรเมอร์อาร์ (Reverse Primer) แต่ละสายจะมีลำดับเบสที่เข้าคู่ (Complementary) กับลำดับเบสด้านปลาย 3' ของสายดีเอ็นเอแม่แบบแต่ละสาย และสามารถจับกับสายดีเอ็นเอแม่แบบได้โดยจับที่ตำแหน่งที่อยู่ขนาบข้าง (Flanking Region) กับส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอสายเริ่มต้นหรือไพรเมอร์นี้ได้มาจากการสังเคราะห์ด้วยเครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA Synthesizer)

3. นิวคลีโอไทด์หรือเบส มี 4 ชนิด ได้แก่ อะดินีน (Adenine, A) กัวนีน (Guanine, G) ไซโตซีน (Cytosine, C) และไธมีน (Thymine, T) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของโครงสร้างดีเอ็นเอ

4. เอนไซม์ DNA polymerase ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ เอนไซม์นี้มีหลายชนิด ซึ่งที่นิยมใช้กันทั่วไปเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย ชื่อ เทอร์มัส อควาติคัส (*Thermus aquaticus*) หรือเรียกเอนไซม์นี้ว่า *Taq* DNA polymerase แบคทีเรียชนิดนี้อาศัยในน้ำพุร้อน มีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 95 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ ประมาณ 72 องศาเซลเซียส

5. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เป็นสารเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ DNA polymerase

6. บัฟเฟอร์ (Buffer) เป็นสารที่ทำให้สภาพของสารในหลอดทดลองมีสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา

7. น้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งใช้ผสมกับสารตั้งต้นดังกล่าวทั้งหมด

4.1 ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

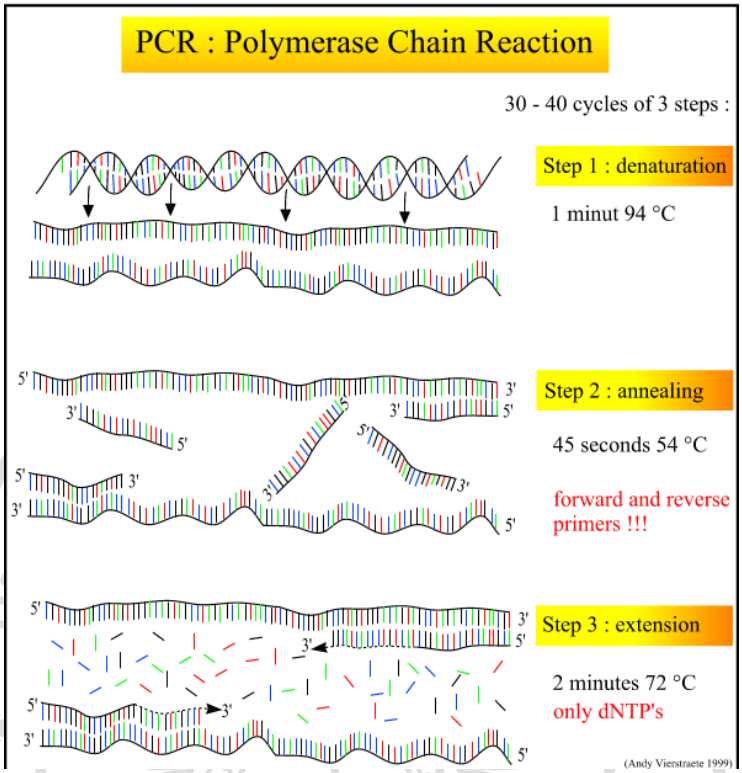
ปฏิกิริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก (ภาพที่ 2.4) คือ

1. การแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (Denaturation) โดยใช้อุณหภูมิสูง 94-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที เพื่อให้ดีเอ็นเอคลายเกลียวคู่ออกจากกันเป็นสายเดี่ยวและทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

2. การจับของสายไพรเมอร์ (Primer Annealing) โดยใช้อุณหภูมิ 50-56 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-60 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับกันดีเอ็นเอแม่แบบในบริเวณที่ลำดับเบสเข้าคู่กัน

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏราไพพรรณี

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการต่อสายไพรเมอร์ (Primer Extension) โดยใช้อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 30-120 วินาที ขึ้นอยู่กับความยาวของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวน ขั้นตอนนี้เอนไซม์ (DNA polymerase) จะทำหน้าที่นำเบส (A, T, C, G) ที่เข้าคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบมาต่อเข้าที่ปลายสายไพรเมอร์ทั้งสองเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่



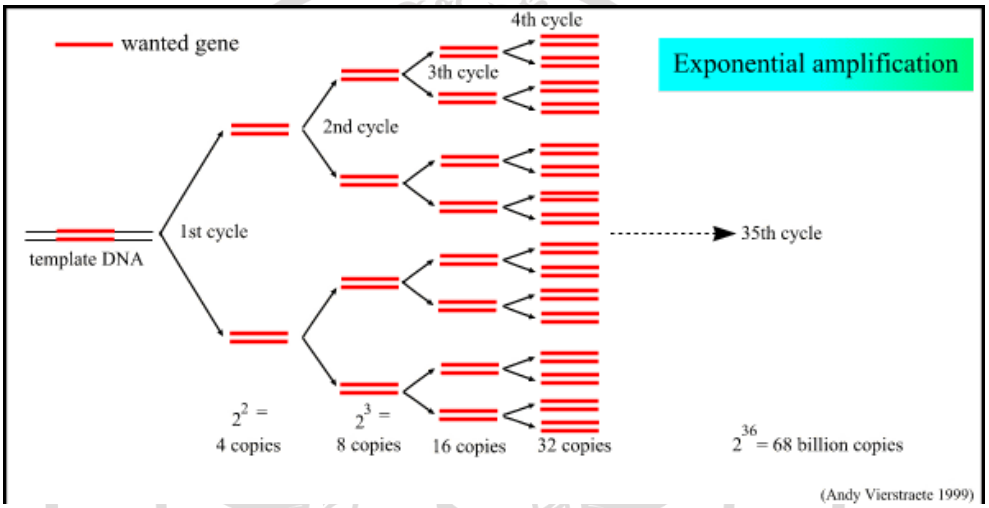
ภาพที่ 2.4 ขั้นตอนของการทำพีซีอาร์ในหนึ่งรอบปฏิกิริยา
ที่มา: UCSF (2006)

ปฏิกิริยาทั้ง 3 ขั้นตอนหลักรวมเรียกว่า 1 รอบพีซีอาร์ (PCR Cycle) เกิดขึ้นโดยนำหลอดทดลองที่มีส่วนผสมดังกล่าวข้างต้นเข้า “เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ” (ภาพที่ 2.5) ซึ่งเป็นเครื่องที่เปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสูง-ต่ำได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งกำหนดจำนวนรอบและเวลาสำหรับปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนได้อย่างอัตโนมัติ

ภาพที่ 2.5 ลักษณะของเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA อัตโนมัติที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ

ลิขสิทธิ์ของมหา ไพพรรณี

ปฏิกิริยาพีซีอาร์จะเกิดขึ้นซ้ำ ๆ ประมาณ 25-40 รอบ โดยสายดีเอ็นเอสังเคราะห์ขึ้นในแต่ละรอบจะถูกใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ในรอบต่อ ๆ ไปจนสิ้นสุดปฏิกิริยา ดังนั้น ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จึงเพิ่มเป็นทวีคูณ เรียกการเพิ่มจำนวนแบบนี้ว่า “Exponential Amplification” (ภาพที่ 2.6) ซึ่งคำนวณได้เท่ากับ 2^n (n คือ จำนวนรอบที่ทำปฏิกิริยา) (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทยและสสวท., 2548)



ภาพที่ 2.6 การสังเคราะห์เพิ่มจำนวนแบบทวีคูณ (Exponential Amplification)
ที่มา: UCSF (2006)

4.2 การตรวจสอบผลผลิตจากพีซีอาร์

ผลผลิตดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR Product) สามารถทำได้หลายวิธี แต่เทคนิคที่นิยมใช้ คือ วิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (Gel Electrophoresis) ซึ่งสุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2552) กล่าวถึงเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ว่าเป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย ซึ่งตัวกลางที่นิยมใช้ คือ วุ้นอะกาโรส (Agarose Gel) หรือวุ้นโพลีอะครีลาไมด์ (Polyacrylamide Gel) สารที่ประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้าและตัวกลางที่ใช้ด้วย

โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอ (หรืออาร์เอ็นอ) จึงมีประจุเป็นลบที่ pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ ดั้งนั้นจะพบว่าประจุต่อมวลโมเลกุลของดีเอ็นเอทุกขนาดมีค่าเท่ากัน ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอจึงขึ้นอยู่กับขนาดเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอนเอด้วยดังนี้

1. ขนาดของโมเลกุล ดีเอ็นที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลแบบเส้นตรง (Linear) เกลียวคู่จะเคลื่อนที่ได้ระยะทางที่

แปรผกผันกับขนาดโมเลกุล ถ้านำระยะทางที่โมเลกุลเคลื่อนที่ (Mobility) มาเขียนกราฟคู่กับค่า Log ของโมเลกุล (Molecular Weight) จะได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นตรงอยู่ช่วงหนึ่ง ดั้งนั้นถ้าต้องการทราบขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอสามารถทำได้โดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดแล้ว นำมาเขียนกราฟระหว่าระยะทางที่เคลื่อนที่และ Log ของน้ำหนักโมเลกุลเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน ทั้งนี้จะต้องเปรียบเทียบในการทำอิเล็กโทรไฟรีซิสครั้งเดียวกันเท่านั้น เนื่องจากเป็นค่าแบบสัมพัทธ์

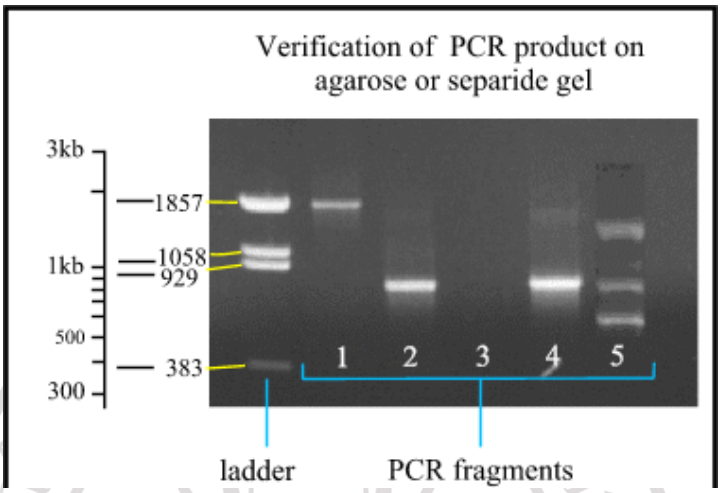
2. รูปแบบของดีเอ็นเอ (Configuration) กรณีที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันนั้นดีเอ็นเอที่มีรูปร่างเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อนจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดซึงจะพบรูปแบบทั้ง 3 ของดีเอ็นเอได้ในการสกัดพลาสติด

3. เปอร์เซ็นต์ของชนิดเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซ็นต์เจล โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรดนิวคลีอิกหรือโพลีอะครีลาไมด์เจลและอะกาโรสเจล โดยโพลีอะครีลาไมด์เจลใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก ระหว่าง 6-1,000 คู่เบส ส่วนอะกาโรสเจล ใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ประมาณ 100-50,000 คู่เบส

4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (Voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสนี้ ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไปดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้เร็ว แต่การแยกตัวจะไม่ดีแต่ถ้าต่ำดีเอ็นเอเคลื่อนที่ช้าการแยกตัวได้ดีแต่แถบดีเอ็นเอจะไม่ชัด เพราะเกิดการแพร่ของดีเอ็นเอ

5. บัฟเฟอร์ที่ใช้ ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิด คือ TAE (Tris-Acetate) TBE (Tris-Borate) และ TPE (Tris-Phosphate) ซึ่งแต่ละชนิดมีข้อดีข้อเสียต่างกัน TBE นิยมใช้ที่ความเข้มข้น 0.5 เท่า ใช้แยกดีเอ็นเอได้ดี มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แต่สามารถเกิดปฏิกิริยากับอะกาโรสเจลได้ จึงไม่เหมาะในการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก TAE ใช้ได้ทั่วไปและใช้ได้ดีในกรณีที่ต้องการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก แต่มีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ต่ำ จึงไม่ควรใช้ในกรณีที่ทำอิเล็กโทรโฟรีซีสเป็นเวลานานมาก ส่วน TPE มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แยกดีเอ็นเอได้เร็ว แต่ไม่เหมาะถ้าต้องการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลและตกตะกอนด้วยเอทานอล เพราะจะเกิดการตกตะกอนของฟอสเฟตด้วย ดังนั้นการเลือกใช้บัฟเฟอร์แต่ละชนิดจึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดลอง

การทำอิเล็กโทรโฟรีซีสเพื่อแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นนั้น สามารถแยกได้ทั้งโมเลกุลที่อยู่ในสภาพธรรมชาติ (Native Form) หรือโมเลกุลที่เสียสภาพ (Denature) ในกรณีของดีเอ็นเอ คือ เป็นแบบเกลียวคู่หรือสายเดี่ยว ซึ่งขึ้นอยู่กับเทคนิคหรือวัตถุประสงค์ที่ต้องการภายหลังการแยกขนาดโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแล้วจะทราบหรือเห็นแถบดีเอ็นเอได้ต้องมีวิธีการนำแผ่นวุ้นนี้ไปย้อมด้วยสีย้อมดีเอ็นเอ เช่น เอทธิเดียมโบรไมด์ (Ethidiumbromide) ซึ่งมีโมเลกุลที่สามารถสอดแทรก (Intercalation) เข้าไปในช่องว่างระหว่างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และมีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงอุลตร้าไวโอเลต (UV Transilluminator) จะปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอสีส้ม ซึ่งทำให้ทราบขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการได้โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Marker) จากนั้นบันทึกภาพด้วยกล้องโพลารอยด์หรือด้วยเครื่องบันทึกภาพอัตโนมัติ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) (ภาพที่ 2.7)



ภาพที่ 2.7 การตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์
ที่มา: UCSF (2006)

อย่างไรก็ตามเอทธิเดียมโบรไมด์จัดเป็นสารก่อมะเร็ง และสามารถทำให้เกิดการขาดของพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ หรือเกิดไทมีนไดเมอร์ (Thymine Dimer) ในโมเลกุลดีเอ็นเอ จึงไม่เหมาะถ้าต้องการแยกดีเอ็นเอบริสุทธิ์จากเจลไปใช่ต่อ จึงมีการใช้วิธีอื่นเข้ามาทดแทน เช่น การใช้สารกัมมันตรังสี หรือการใช้สีเรืองแสง (Fluorescent Dye) ติดฉลากกับดีเอ็นเอก่อนนำไปแยกด้วยอิเล็กโทรโฟรีซีส เมื่อจบกระบวนการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแล้วสามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยกัมมันตรังสีโดยนำไปทำออโตเรดิโอกราฟ (Autoradiograph) ส่วนดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสีเรืองแสงตรวจสอบได้โดยใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (Automated Sequencer) ซึ่งสามารถตรวจได้ขณะที่กำลังแยกดีเอ็นเอขณะทำอิเล็กโทรโฟรีซีสได้เลย (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552)

5. การหาลำดับเบส (DNA sequencing)

การหาลำดับเบสมีประโยชน์ต่อการเปรียบเทียบสิ่งมีชีวิตในระดับโมเลกุล สามารถเปรียบเทียบความใกล้ได้ การจัดหมวดหมู่ของกลุ่มสิ่งมีชีวิตและตามวิวัฒนาการ สามารถนำข้อมูลไปวิเคราะห์โครงสร้างยีน การทำนายโปรตีนและเอนไซม์ ตลอดจนเข้าใจกลไกการแสดงออกของยีนจากการวิเคราะห์โปโมเตอร์ของยีนและการขนส่งยีนสู่ออร์แกเนลต่าง ๆ จากลำดับเบสของนิวคลิโอไทด์ (วิสาตรี คงสุนทร, 2546)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ขั้นตอนการหาลำดับนิวคลิโอไทด์ของดีเอ็นเอในปัจจุบันเป็นวิธีที่พัฒนาโดย Fred Sanger และคณะ โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวของอณูที่ต้องการหาลำดับเบสเป็นแม่พิมพ์ในการจำลองสายคู่สมในหลอดแก้วและให้การจำลองสิ้นสุดที่นิวคลิโอไทด์ที่กำหนด วิธีการ คือ ขั้นแรกใส่ไพรเมอร์สั้น ๆ ลงไปเพื่อให้จับคู่กับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ จากนั้นแยกดีเอ็นเอแม่พิมพ์นี้ไปใส่ในหลอดแก้ว 4 หลอด เพื่อทำปฏิกิริยาจำลองตัวเอง โดยในแต่ละหลอดจะเติมเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรสและติดดีออกซีไรโบนิวคลิโอไซด์ไตรฟอสเฟตทั้ง 4 ชนิด (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) ในปริมาณที่มากพอ นอกจากนี้ในแต่ละหลอดจะเติมไดดีออกซีไรโบนิวคลิโอไทด์ (Dideoxy-ribonucleotide)

ปริมาณเล็กน้อยลงไปหนึ่งชนิดที่ไม่ซ้ำกัน เช่น หลอดแรกเติม ddGTP หลอดที่สองเติม ddATP หลอดที่สามเติม ddCTP และหลอดที่สี่เติม ddTTP ไดดิออกซีนิวคลิโอไทด์ที่เติมลงไปจะทำหน้าที่เป็นนิวคลิโอไทด์จบการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (Chain Terminator) เนื่องจากปกติดีเอ็นเอโพลีเมอเรสต้องการปลาย 3'-OH ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ แต่ไดดิออกซีนิวคลิโอไทด์มี 3'-H แทน 3'-OH ดังนั้น ถ้าดีเอ็นเอโพลีเมอเรสดึง ddXTP เข้ามาแทน dXTP (X แทนเบส) การสังเคราะห์จะหยุดเนื่องจากไม่มีปลาย 3'-OH ให้เอนไซม์จับ เช่น หลอดที่เติม ddATP การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่สมจะหยุดที่ตำแหน่งตรงกับไทมิดีนในสายแม่พิมพ์ เมื่อปล่อยให้ปฏิกิริยาสังเคราะห์เกิดต่อไปเรื่อย ๆ ภายในหลอดจะมีดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ใหม่มีความยาวแตกต่างกันและเป็นปลาย A เหมือนกัน เนื่องจากการสังเคราะห์มีโอกาสหยุดที่ทุกตำแหน่งของ A หลอดอื่น ๆ จะเกิดปฏิกิริยาทำนองเดียวกัน เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ภายในแต่ละหลอดจะมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่าง ๆ ที่ปลายจบที่เบสเดียวกัน จากนั้นแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ออกจากสายแม่พิมพ์โดยทำให้เสียสภาพ (Denaturation) นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาแต่ละหลอดไปแยกด้วยเจลอิเล็คโตรโฟรีซิส โดยแยกเป็น 4 ช่อง ช่องละหนึ่งหลอด จากตัวอย่างที่กล่าวมาหลอดแรกจะอยู่ในช่องที่ 1 หลอดที่สองช่องที่ 2 หลอดที่สามช่อง 3 และหลอดที่สี่ช่อง 4 ผลจากอิเล็คโตรโฟรีซิสจะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในแต่ละช่องกระจายบนแผ่นเจลตามลำดับความยาว ชิ้นที่สั้นที่สุดจะอยู่ไกลที่สุด ลำดับนิวคลิโอไทด์ในดีเอ็นเอสามารถอ่านได้โดยตรงจากแผ่นเจลโดยเริ่มจากล่างสุดขึ้นมา ตามลำดับ

ในปัจจุบันมีการใช้เครื่องมีที่เรียกว่า เครื่องออโตเมท (Automated Machines) ซึ่งสามารถหาลำดับ (Sequence) ได้หลายแสนนิวคลิโอไทด์ต่อวัน วิธีการโดยการติดฉลากไดดิออกซีนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิดด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ต่าง ๆ กัน ดังนั้นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปลายจบในแต่ละเบส จะมีสีที่แตกต่างกัน ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ทั้งหมดเกิดในหลอดเดียวกันและแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยอิเล็กโตรโฟริซิสช่องเดียว ภายในเครื่องจะมีเครื่องมืออ่านสีฟลูออเรสเซนต์จากแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลตามลำดับ และแปลผลออกมาเป็น A หรือ C หรือ T หรือ G ตามสีที่ติดฉลากไว้ ข้อมูลที่ได้จะวิเคราะห์ออกมาเป็นลำดับนิวคลิโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ วิธีนี้สะดวกและถูกต้องแม่นยำสูง (หัทยา กาวีวงศ์, 2548) สามารถหาลำดับเบสของตัวอย่างได้จำนวนมากในคราวเดียวกัน

6. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Marker) ในการบ่งชี้ชนิดของสิ่งมีชีวิต

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึง ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายติดตามหน่วยพันธุกรรมหรือยีนของสิ่งมีชีวิตที่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์และมีความแตกต่าง (Polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ จึงทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอมีหลายประเภท เช่น RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), STS (Sequence Tagged Sites), SSR (Simple Sequence Repeats), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) หรือ Microsatellites และ SNP (Single Nucleotide

Polymorphisms) เป็นต้น (จุฑาพร แสงประจักษ์, 2551) การเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละประเภทดังสรุปไว้ในตารางที่ 2.1

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSR และ AFLP เป็นที่ได้รับความนิยมใช้กันมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว แม่นยำ และใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณน้อย ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RFLP ได้รับการพัฒนามานาน และเป็นประโยชน์ในการสร้างแผนที่ยีนของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ มีความแม่นยำ ความคงตัวสูง แต่วิธีการต้องใช้ดีเอ็นเอต้นแบบปริมาณมาก และมีความยุ่งยากในทางปฏิบัติ มีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและลักษณะของสายพันธุ์ วิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและระบุสายพันธุ์ ประเมินระยะห่างทางพันธุกรรมของประชากรที่เป็นสายพันธุ์แท้และลูกผสม บ่งชี้ตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณ (Quantitative Trait Loci, QTL) และช่วยคัดเลือกสายพันธุ์ เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอประเภทต่าง ๆ

คุณลักษณะ	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	SNP
ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ต่อปฏิกิริยา	10	0.02	0.5-1.0	0.05	0.05
คุณภาพดีเอ็นเอ (DNA Quality)	สูง	สูง	ปานกลาง	ปานกลาง	สูง
การใช้ปฏิกิริยา PCR	ไม่ต้องใช้	ต้องใช้	ต้องใช้	ต้องใช้	ต้องใช้
จำนวนความแตกต่างกันของดีเอ็นเอ (Polymorphic Loci)	1.0-3.0	1.5-50	20-100	1.0-3.0	1.0
ความยากง่ายในการวิเคราะห์	ยาก	ง่าย	ง่าย	ง่าย	ง่าย
ความคงตัว (Reproducibility)	สูง	ต่ำ	สูง	สูง	สูง
ค่าใช้จ่ายในการพัฒนาเครื่องหมาย	ต่ำ	ต่ำ	ปานกลาง	สูง	สูง
ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ตัวอย่าง	สูง	ต่ำ	ปานกลาง	ต่ำ	ต่ำ

ที่มา: Korzun (2002)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกพจน์ บุญรักษา (2546) เปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอในพืชวงศ์ขิงจำนวน 5 ชนิด โดยใช้วิธีสกัด2 วิธีคือ วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี CTAB และวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Plant Extraction Buffer พบว่า วิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Plant Extraction Buffer ให้ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอมากกว่า และคุณภาพที่ดีกว่าการสกัดดีเอ็นเอโดยการใช้ CTAB

ชาญวุฒิ หาญเวช (2550) ศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อพื้นที่การปลูกเงาะ พบว่า พันธุ์เงาะที่นิยมปลูกเพื่อทำการค้า ได้แก่ เงาะพันธุ์โรงเรียนและพันธุ์สีชมพู ซึ่งปลูกมากในแถบภาคตะวันออกและภาคใต้ ในภาคตะวันออกมีพื้นที่เพาะปลูกประมาณร้อยละ 55 และให้ผลผลิตประมาณร้อยละ 63 ผลผลิตจะออกสู่ตลาดในช่วงเดือนมิถุนายน–กรกฎาคม ส่วนภาคใต้มีพื้นที่เพาะปลูกประมาณร้อยละ 44 ให้ผลผลิตร้อยละ 36 ผลผลิตส่วนใหญ่จะออกสู่ท้องตลาดเดือนสิงหาคม โดยจังหวัดที่มีผลผลิต 5

อันดับแรก คือ จันทบุรี ตราด สุราษฎร์ธานี ชุมพร และนครศรีธรรมราช ซึ่งพื้นที่เพาะปลูกเงาะมีปริมาณเพิ่มขึ้นและลดลงสลับกันไป โดยเริ่มทยอยลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2544 เป็นต้นมา อาจเป็นผลเนื่องจากต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้น ช่วงฤดูกาลผลิตสั้น ผลผลิตออกมามากในช่วงเวลาสั้นและพร้อมกัน เงาะมีอายุการเก็บรักษาสั้น สภาพภูมิอากาศไม่เอื้ออำนวยและความไม่แน่นอนในเรื่องของราคา ส่วนในเรื่องตลาดต่างประเทศยังมีข้อจำกัดในเรื่องคุณภาพที่ยังไม่ได้มาตรฐานการส่งออก

จุฑาพร แสงประจักษ์ (2551) ศึกษาการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์พืช พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด RFLP ได้รับการพัฒนาและเป็นพื้นฐานในงานปรับปรุงพันธุ์พืชต่าง ๆ และมีการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ต้องอาศัยเทคนิค PCR ได้แก่ RAPD AFLP และ SSR โดยปัจจุบัน SSR และ AFLP เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้รับความนิยมและมีการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อช่วยในงานปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างมาก เช่น การประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ การคัดเลือกสายพันธุ์พ่อและแม่ และการค้นหาหรือการสร้างแผนที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สำคัญทางการเกษตร เช่น ความต้านทานโรคต่าง ๆ และความทนทานต่อสภาวะเครียดต่าง ๆ การเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละชนิด

ฤทัยชนก กิตติวโรดม (2554) ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) ในการตรวจสอบพันธุ์ทุเรียน จำนวน 45 ตัวอย่าง จาก 42 สายพันธุ์ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกได้เป็น 6 กลุ่ม จำนวน 29 ตัวอย่าง จาก 26 สายพันธุ์ ไม่สามารถจำแนกได้อีก 16 ตัวอย่าง เนื่องจากไม่ออกดอกและไม่ให้ผลผลิต แต่การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP สามารถจำแนกพันธุ์ทุเรียนได้ทั้ง 45 ตัวอย่าง แบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม ซึ่งแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแต่ละพันธุ์โดยที่ไม่ต้องรอให้ออกดอกและติดผล

Roopkham et al. (2011) ศึกษาการจัดชนิดของจีโนมกล้วยแบงได้ 4 ชนิดคือจีโนม A, B, S และ T ด้วยวิธีการใหม่และมีประสิทธิภาพอย่าง Suppression Subtractive Hybridization (SSH) มาใชในการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอในกล้วยปลูกหรือกล้วยกินได้ โดยมีการใช้ไพรเมอรที่จำเพาะต่อจีโนมต่าง ๆ และตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ซึ่งเทคนิค SSH เป็นเทคนิคที่สามารถใชบ่งชี้สิ่งมีชีวิตที่มีความใกลชิดกันไดเป็นอย่างดี

นิลวรรณ ลีอังกูรเสถียร และคณะ (2558) ศึกษาลักษณะประจำพันธุ์ของเงาะ 14 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์โรงเรียน สีชมพู สีทอง น้ำตาลกรวด บางยี่ขัน และเจ๊ะมง และพันธุ์ลูกผสมพลิ้ว 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี ระหว่างปี พ.ศ.2554-2558 ศึกษาทั้งลักษณะทางปริมาณและคุณภาพ พบว่า ลักษณะรูปร่างใบของเงาะทุกพันธุ์เป็นแบบ Elliptic ส่วนปลายใบเป็นแบบ Acuminate และ Acute ฐานใบเป็นแบบ Cuneate และ Acute ลักษณะทรงผลแบบ Globose Ovoid และ Oblong สีผิวผลอยู่ในกลุ่มสีเหลืองส้ม และสีส้ม ส่วนลักษณะสีขนอยู่ในกลุ่มสีแดงชมพู ยกเว้นพันธุ์น้ำตาลกรวดที่มีผิวผลสีเหลือง ลักษณะเมล็ดเป็น Obovoid และ Obovoid Elongate การทดสอบพันธุ์เงาะในภาคเหนือ จ.เชียงราย พบว่าเงาะพันธุ์สีทองมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด รองลงมา คือ พันธุ์โรงเรียน และแดงจันทบูร ส่วนพันธุ์พลิ้ว3 มีอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่ำสุด