บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลีลาวดี

ลีลาวดี (*Plumeria* spp.) เป็นไม้ยืนต้นที่อยู่ในวงศ์ตีนเป็ด (Apocynaceae) มีชื่อสามัญเรียกในภาษาอังกฤษแตกต่างกันไป เช่น Frangipani, Pagoda tree และ Temple tree ส่วนในภาษาไทยนิยมเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละท้องถิ่น เช่น ลั่นทม จำปา จงป่า (กาญจนบุรี) จำปาลาว (ภาคเหนือ) จำปาขาว (ภาคอีสาน) จำปาขอม (ภาคใต้) ไม้จีน (ยะลา) มอยอ (นราธิวาส) จำไป (เขมร) เป็นต้น ถิ่นกำเนิดอยู่ในอเมริกากลาง เม็กซิโก แคริบเบียน และอเมริกาใต้ ถูกนำเข้ามาในดินแดนแถบนี้เมื่อประมาณ 500 ปีก่อนโดยนักเดินเรือชาวสเปนหรือโปรตุเกส ลีลาวดีในไทยเดิมทีเป็นไม้ที่นำเข้ามาจากเขมร ซึ่งมีชื่อเดิมว่า “ต้นขอม” เล่ากันว่ามีการนำเข้ามาปลูกในไทยเมื่อครั้งไปตีนครธม จนได้รับชัยชนะ แล้วได้มีการนำต้นไม้ชนิดนี้เข้ามาปลูก และเรียกชื่อเป็นที่ระลึกว่า “ลั่นธม” โดยคำว่าลั่นนั้นแปลว่า ตีฆ้อง ลั่นฆ้อง ลั่นกลอง ส่วนคำว่าธมนั้นมาจากคำว่า “นครธม” จึงเป็นที่มาของชื่อลั่นธม และเพี้ยนกลายมาเป็น “ลั่นทม” แต่คำว่าลั่นทม คล้องกับระทม ซึ่งแปลว่า เศร้าโศก ทุกข์ใจ จึงได้มีการเรียกชื่อเสียใหม่ให้เป็นมงคลว่า “ลีลาวดี” ในปัจจุบัน ซึ่งหลังจากที่ลั่นทมได้ถูกเปลี่ยนชื่อมาเป็น “ลีลาวดี” ซึ่งเป็นชื่อที่เป็นสิริมงคลแล้ว จึงมีคนหันมานิยมปลูกต้นลีลาวดีเพื่อตกแต่งสวนในบ้านกันอย่างแพร่หลาย รวมถึงการนำไปประดับตกแต่งตามถนน สวนสาธารณะ สปา รีสอร์ท โรงแรม สถานที่ราชการและเอกชนเกือบทุกแห่ง เนื่องจากลีลาวดีเป็นไม้ขนาดกลาง มีทรงต้นแตกกิ่งก้านสวยงาม ขนาดของดอกกำลังพอดี มีหลายสี และที่สำคัญมีกลิ่นหอมเป็นพิเศษ นอกจากนี้ลีลาวดีเป็นพืชที่ปลูกง่าย โตเร็ว เนื่องจากทั้งต้นและกิ่งก้านมีลักษณะอวบน้ำ จึงสามารถขึ้นในที่แห้งแล้งได้เป็นอย่างดี การดูแลรักษาไม่ยุ่งยาก

1.1 การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ของลีลาวดี

ลีลาวดีสามารถจัดลำดับชั้นทางวิทยาศาสตร์ได้ดังต่อไปนี้

Kingdom Plantae

Subkingdom Tracheobionta

Superdivision Spermatophyta

Division Magnoliophyta

Class Magnoliopsida

Subclass Asteridae

Order Gentianales

Family Apocynaceae

Genus *Plumeria* L.

สำหรับ species ของลีลาวดี มีอยู่ด้วยกันหลาย species เช่น *Plumeria alba* L., *Plumeria obtusa* L. และ *Plumeria rubra* L. เป็นต้น (Natural Resources Conservation Service [USDA], 2018)

ภาพที่ 2.1 ตัวอย่างลีลาวดี species *Plumeria obtusa* L. หรือพันธุ์ขาวพวง

1.2 ลักษณะโดยทั่วไป

ลีลาวดีเป็นไม้ยืนต้น มีขนาดตั้งแต่พุ่มเตี้ยแคระสูงประมาณ 0.9-1.2 เมตร จนถึงต้นที่สูงมาก อาจสูงถึง 12 เมตร ลำต้นแตกกิ่งก้านสาขาและพุ่มใบสวยงาม มีน้ำยางสีขาวข้น เป็นไม้ผลัดที่สลัดใบในฤดูแล้งก่อนที่จะผลิดอกและผลิใบรุ่นใหม่ กิ่งที่ยังไม่แก่มีสีเขียว อ่อนนุ่ม ดูเกือบจะอวบน้ำ กิ่งแก่มีสีเทามีรอยตะปุ่มตะป่ำ กิ่งไม่สามารถทานน้ำหนักได้ กิ่งเปราะ เปลือกลำต้นหนา ต้นที่โตเต็มที่แล้วจะพัฒนาจนกระทั่งมีความแข็งแรงมากขึ้น

ใบ เป็นใบเดี่ยว มีการเรียงตัวแบบสลับและหนาแน่นใกล้ปลายกิ่ง มีลักษณะแตกต่างกันไปทั้งรูปร่าง ขนาด สี และความหนาแน่น โดยทั่วไป ใบจะหนา เหนียวแข็ง และมีสีตั้งแต่สีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม มีเส้นกลางใบแตกสาขาออกไปคล้ายขนนก ขนาดใบแตกต่างกัน

ช่อดอก ดอกจะผลิออกมาจากปลายยอดเหนือใบ เห็นเป็นช่อดอกใหญ่สวยงาม แต่ก็มีบางชนิดที่ออกช่อดอกระหว่างใบ หรือใต้ใบ บางชนิดห้อยลงบางชนิดตั้งขึ้น ในหนึ่งช่อจะมีดอกบานพร้อมกัน 10-30 ดอก บางต้นที่มีความสมบูรณ์เต็มที่อาจมีดอกมากกว่า 100 ดอก ต่อ 1 ช่อ ออกดอกประมาณเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน บางพันธุ์สามารถออกดอกได้ตลอดทั้งปี

ดอก โดยทั่วไปจะมีขนาดใหญ่ถึงกลาง ยกเว้นบางพันธุ์ที่มีขนาดเล็ก กลีบดอกมี 5 กลีบ เกสรตัวผู้ เกสรตัวเมีย อยู่ลึกเข้าไปข้างใน ดอกมีลักษณะคล้ายท่อ ทำให้มองไม่เห็นเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย โดยจะมีเกสรตัวผู้ 5 อัน อยู่ที่โคนก้านดอก ส่วนเกสรตัวเมียอยู่ลึกลงไปในก้านดอก เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียบานไม่พร้อมกัน ยากต่อการผสมตัวเอง

ฝัก มีลักษณะคล้ายกับฝักต้นชวนชม ฝักอ่อนสีจะมีสีเขียวเมื่อแก่ฝักจะมีสีแดงถึงดำ

1.3 การขยายพันธุ์

ทำได้หลายวิธี ได้แก่

1. การเพาะเมล็ด จะใช้ฝักที่แก่จัด ส่วนใหญ่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งเมล็ดลีลาวดีงอกได้ง่าย แต่ละฝักของลีลาวดีจะได้ต้นกล้าประมาณ 50-100 ต้น สามารถเพาะในกระถางเพาะได้เลย ข้อดีของการเพาะเมล็ดลีลาวดี คือ จะได้ต้นที่กลายพันธุ์หรือต้นลีลาวดีแคระ ด่าง

2. การปักชำ เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็วในการขยายพันธุ์ต้นลีลาวดี และยังเป็นวิธีรักษาพันธุ์เดิมเอาไว้

3. การเปลี่ยนยอด จะใช้ในกรณีที่ได้พันธุ์ดีแล้วนำมาเปลี่ยนยอดบนต้นตอที่เพาะกล้าไว้แล้วอาจจะเสียบข้างหรือผ่าเป็นลิ่ม วิธีนี้ต้องป้องกันไม่ให้น้ำเข้า ไม่เช่นนั้นแผลจะเน่า

4. การติดตา ใช้ในกรณีที่ได้ตามีไม่มากนัก เป็นการขยายพันธุ์แบบประหยัด กิ่งหนึ่งสามารถขยายพันธุ์ได้เป็นจำนวนมาก

1.4 ประโยชน์ของลีลาวดี

ลีลาวดีมีประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. ใช้ในการจัดสวน ตกแต่งภูมิทัศน์ พันธุ์ที่ครองความนิยมอยู่คือ พันธุ์ขาวพวง ที่เป็นพันธุ์ดั้งเดิม ที่ส่งกลิ่นหอมเฉพาะตัว ทั้งยังสามารถออกดอกตลอดปี

2. สรรพคุณด้านเป็นยาสมุนไพรของส่วนต่าง ๆ ของลีลาวดี ได้แก่

ต้น ใช้ปรุงเป็นยารักษาโรคลำไส้พิการของม้า

ใบ ใช้ใบแห้งชงน้ำร้อนดื่มรักษาโรคหอบหืด ใบสดลนไฟประคบร้อนแก้ปวด บวม

เปลือกราก ใช้เป็นยารักษาโรคหนองใน ยาถ่าย แก้โรคไขข้ออักเสบ ขับลม

เปลือกต้น ใช้ต้มเป็นยาถ่าย ขับระดู แก้ไข้ แก้โรคโกโนเรีย หรือผสมกับน้ำมันมะพร้าว ข้าวมัน เนย เป็นยาแก้ท้องเดิน ยาถ่าย ขับปัสสาวะ

ดอก ใช้ทำธูป ใช้ผสมกับพลูเป็นยาแก้ไข้ แก้ไข้มาลาเรีย

เนื้อไม้ ใช้เป็นยาแก้ไอ ยาถ่าย ขับพยาธิ

ยางจากต้น ใช้เป็นยาถ่าย รักษาโรคไขข้ออักเสบ ใช้ผสมกับไม้จันทน์และการบูร เป็นยาแก้คัน แก้ปวดฟัน (สุภาวดี ง้อเหรียญ, 2552)

2. ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) หมายถึง ความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สิ่งมีชีวิตได้รับการถ่ายทอดมาจากรุ่นพ่อแม่และส่งต่อไปยังรุ่นลูกหลาน ความแตกต่างผันแปรทางพันธุกรรมในแต่ละหน่วยชีวิตนั้นมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (mutation) ซึ่งอาจเกิดขึ้นในระดับยีนหรือในระดับโครโมโซม รวมถึงอาจจะเกิดจากกลไกที่เรียกว่า crossing over ที่เกิดขึ้นในขณะที่มีการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ สำหรับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เป็นผลทำให้ยีนสลับที่รวมตัวกันใหม่ (recombination) ซึ่งจะถูกถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานต่อ ๆ ไปในประชากร ความหลากหลายในพันธุกรรมอาจมองไม่เห็นชัดนัก แต่ความจริงคือในทุกสายพันธุ์ไม่ได้มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ ความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดใด ๆ เป็นผลมาจากกระบวนวิวัฒนาการ ถ้าปราศจากความหลากหลายทางพันธุกรรม สิ่งมีชีวิตอาจจะไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของโลกที่ผันแปรไปเรื่อย ๆ และไม่สามารถพัฒนาความต้านทานต่อโรคใหม่ ๆ ได้ ความอยู่รอดของสายพันธุ์จึงตกอยู่ในความเสี่ยงหากในประชากรของสายพันธุ์นั้นไม่มีความแตกต่างหลากหลายทางพันธุกรรม การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การศึกษาโดยอาศัยความแตกต่างของสัณฐานวิทยา เช่น สีใบ สีดอก และลักษณะใบ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาดังกล่าวยังมีข้อจำกัดหลายประการโดยเฉพาะหากพืชเหล่านั้นมีลักษณะใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้จึงเป็นอีกวิธีที่ทำให้การประเมินลักษณะทางพันธุกรรมของพืชมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เครื่องหมายโมเลกุลเมื่อนำมาประเมินในดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแล้วจะได้ผลลัพธ์ออกมาเป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint)

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอถูกค้นพบครั้งแรกโดย Jeffreys และคณะ จากมหาวิทยาลัย Leicester ประเทศอังกฤษ ใน ค.ศ. 1985 โดยได้พัฒนาวิธีแสดงความแตกต่างของส่วนที่เป็นดีเอ็นเอโดยนำเอาดีเอ็นเอนี้มาย่อยเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วทำให้แต่ละชิ้นเคลื่อนที่แยกออกจากกันด้วยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า และถ่ายรูปแถบที่แสดงการเรียงตัวของส่วนย่อย ๆ ของดีเอ็นเอเหล่านั้น ภาพที่ได้เป็นขีดหลาย ๆ ขีดเรียงต่อกันเป็นแนวโดยมีระยะห่างแตกต่างกันลักษณะเหมือนแถบรหัสแท่ง (bar code) ที่ใช้ในการกำหนดชนิดสินค้าในปัจจุบัน รูปแบบเฉพาะของแถบที่เกิดขึ้นจากการแยกส่วนของ

ดีเอ็นเอของแต่ละสิ่งมีชีวิตนี้รู้จักกันในชื่อของ “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” ในปัจจุบันเทคนิคนี้ถูกพัฒนามากจนทำให้การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอมีความสะดวกรวดเร็ว สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานหลายด้าน เช่น การพิสูจน์ความสัมพันธ์ทางสายเลือด ใช้ในการพิสูจน์หลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์ และการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดหรือแต่ละตัวในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีความแตกต่างกัน จึงสามารถใช้ลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอจำแนกความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อจำแนกพันธุ์ได้ถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น โดยการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นวิธีการที่ทำให้เกิดแบบแผนหรือลายพิมพ์ของดีเอ็นเอที่จำเพาะสามารถตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อม ๆ กันเกิดลายพิมพ์ที่จำเพาะ (Jeffreys, Wilson & Thein, 1985, pp. 76-79)

3. เครื่องหมายโมเลกุล (molecular markers)

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมต้องอาศัยเครื่องหมายโมเลกุลเป็นตัวช่วย ซึ่งเครื่องหมายโมเลกุล หมายถึง การใช้ดีเอ็นเอหรือยีนเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบ polymorphism ของสิ่งมีชีวิต เพื่อใช้ตรวจสอบหรือจำแนกความแตกต่างระหว่างจีโนมเพื่อบ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิตตัวหนึ่งสายพันธุ์หนึ่งชนิดหนึ่งหรือต่างชนิด (Crooijmans, van Oers, Strijk, van der Poel & Groenen, 1996, pp. 746-754) การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความผันแปรทางพันธุกรรมหรือเกิด polymorphism ของลำดับเบสในโมเลกุลดีเอ็นเอ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545, หน้า 22-38) ซึ่งสาเหตุการเกิด polymorphism มีหลายประการได้แก่

1. การเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายไปของจุดตัดเอนไซม์ตัดจำเพาะ
2. การเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายไปของตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าคู่ในปฏิกิริยา PCR
3. การเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายไปของชิ้นดีเอ็นเอระหว่างตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าคู่ในปฏิกิริยา PCR
4. การเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายไปของชิ้นดีเอ็นเอระหว่างจุดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
5. จำนวนชุดซ้ำที่แตกต่างกันระหว่างจุดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
6. จำนวนชุดซ้ำที่แตกต่างกันระหว่างตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าคู่ในปฏิกิริยา PCR
7. ความผันแปรของลำดับเบสที่ไม่ใช่ตำแหน่งของจุดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหรือตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าคู่ในปฏิกิริยา วิธีการตรวจสอบ polymorphism ของดีเอ็นเอทำได้โดยการหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) หรือตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล

เครื่องหมายโมเลกุลเป็นเครื่องหมายที่ใช้ตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอหรือยีน เป็นโมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีความเสถียร สามารถเก็บไว้ได้นาน เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่อยู่ในเซลล์

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี

เกือบทุกเซลล์ ตรวจสอบได้ทุกระยะของการเจริญเติบโตไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีน หรือเป็นลักษณะที่แสดงออกหรือไม่แสดงออกก็ได้ สามารถตรวจสอบได้โดยไม่จำกัดครอบคลุมทั้งจีโนมดีเอ็นเอ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ดีคือจะต้องเป็นรูปแบบของดีเอ็นเอที่มี polymorphism สูง และมีรูปแบบของการถ่ายทอดสู่รุ่นต่อไปอย่างง่าย (อมรา คัมภิรานนท์, 2546, หน้า 188-225) ปัจจุบันเครื่องหมายโมเลกุลได้ถูกนำมาใช้ศึกษาความแตกต่างและศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นการศึกษาลึกลงไปในระดับโมเลกุล เครื่องหมายโมเลกุลมีหลายชนิดทั้งที่เป็น dominant marker ได้แก่ random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP) และ inter-simple sequence repeat (ISSR) เป็นต้น ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่ใช้ศึกษาโดยไม่มีความจำเป็นต้องรู้ข้อมูลของจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มาก่อนและศึกษาได้ครั้งละหลายตำแหน่ง (multilocus detection) และ co-dominant marker ได้แก่ restriction fragment length polymorphisms (RFLP), simple sequence repeats (SSR) หรือ microsatellites และ single strand conformational polymorphisms (SSCP) ซึ่งจำเป็นต้องมีข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ มาพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยจะมีความจำเพาะกับตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งในจีโนม

4. เครื่องหมาย RAPD

เครื่องหมาย RAPD ย่อมาจาก random amplified polymorphic DNA เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (dominant marker) ส่วนที่เพิ่มปริมาณได้กระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม เทคนิคนี้เริ่มต้นใช้โดย William และคณะ เมื่อปี 1990 (William, Kubelik, Livak, Rafalski & Tingey, 1990, pp. 6231-6235) ทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบมาทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณ และแยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้โดยไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาดสั้นเพียง 10 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งจะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่เป็นเบสคู่สมกัน ถ้าตำแหน่งใดมีไพรเมอร์จับตัวกับดีเอ็นเอต้นแบบ 2 ทิศทางแบบที่ปลาย 3' เข้าหากันและอยู่ห่างกันไม่มากนัก จะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนนั้นได้แบบทวีคูณ หลังจากนั้นนำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันหรือแตกต่างกันก็ได้ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, หน้า 73) ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ หรือ polymorphism ที่เกิดขึ้นระหว่างแต่ละตัวอย่างอาจจะเกิดจาก

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี

1. มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่มาสอดแทรกในระหว่างตำแหน่ง 2 ตำแหน่ง ที่ไพรเมอร์เกาะ ทำให้ไพรเมอร์ทั้งสองโมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

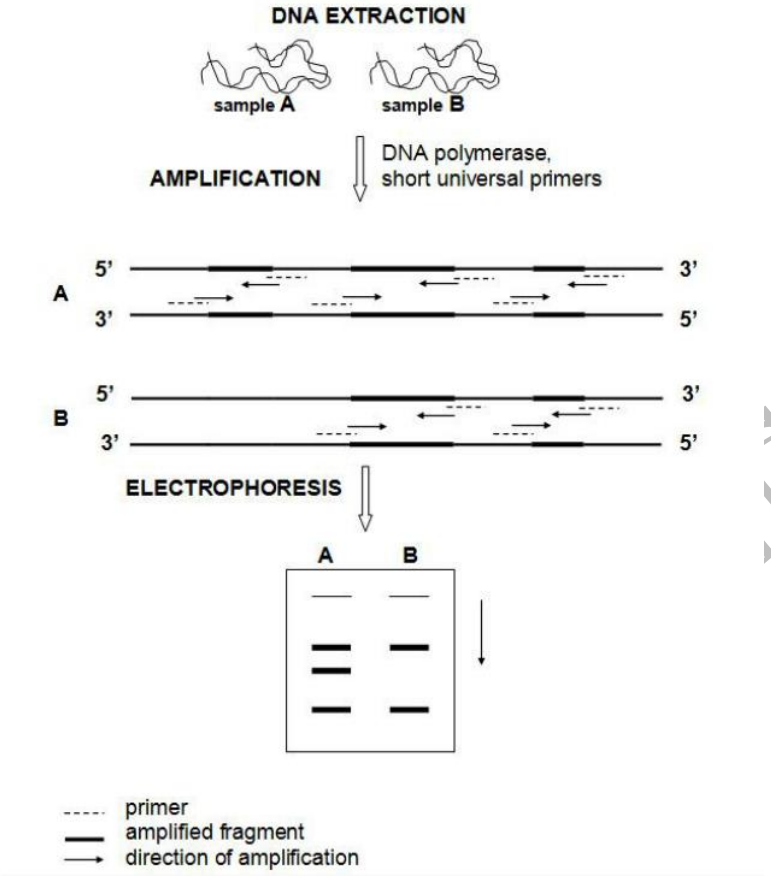
2. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอส่วนที่เป็นที่เกาะกับไพรเมอร์หายไปหนึ่งตำแหน่งหรือทั้ง 2 ตำแหน่ง ทำให้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอจากบริเวณดังกล่าว

3. มีการแทนที่หรือเปลี่ยนแปลงเบสบริเวณที่เป็นที่เกาะของไพรเมอร์ ทำให้ไพรเมอร์เกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายไม่ได้ จึงไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ

4. มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็กสอดแทรกเข้ามาหรือหายไป ทำให้ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเปลี่ยนแปลงไป

อย่างไรก็ตาม polymorphism ของ RAPD มักเกิดขึ้นในลักษณะการมีและไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ มากกว่าการเปลี่ยนขนาดของแถบดีเอ็นเอ จากแถบดีเอ็นเอที่ได้สามารถใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่าง และบอกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างตัวอย่างได้ด้วย โดยการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการบ่งบอกชนิดของสายพันธุ์ได้

เครื่องหมาย RAPD ถูกนำมาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างกว้างขวาง เนื่องจากวิธีการไม่ยุ่งยากซับซ้อน สามารถทำได้ง่าย สะดวก และรวดเร็ว ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบค่อนข้างต่ำ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้มีไม่มากเมื่อเทียบกับวิธีอื่น ๆ (สุรีพร เกตุงาม, 2546, หน้า 44) นอกจากนั้นยังมีการนำเครื่องหมาย RAPD มาใช้ในการศึกษาทางพันธุกรรมในพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ศรินทร แก่นแก้ว (2553, หน้า 1-66) ได้นำเทคนิค RAPD มาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของพืชสกุลมะม่วงพื้นเมืองทางภาคใต้ของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างมาจำนวน 70 ตัวอย่าง ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ พบว่า สามารถจัดกลุ่มได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมาย RAPD จำนวน 12 เครื่องหมาย พบค่าดัชนีความใกล้ชิดอยู่ระหว่าง 0.423-0.970 และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.623 จากเดนโดรแกรมสามารถจัดกลุ่มมะม่วงออกเป็น 5 กลุ่ม Zhuang, Chen, Staub & Qian (2004, pp. 167-172) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์แตงกวาโดยใช้เครื่องหมาย RAPD โดยใช้แตงกวา 22 ตัวอย่าง มาทดสอบในเครื่องหมาย RAPD จำนวน 398 เครื่องหมาย และเครื่องหมาย SSR จำนวน 109 เครื่องหมาย ผลปรากฏว่า สามารถแยกแตงกวาได้ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยมีค่าความห่างทางพันธุกรรมคือ 0.94 นอกจากนี้ Tiwari & Shrivastav (2016, pp. 126-130) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของเครื่องหมาย RAPD ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในโสมอินเดีย โดยใช้โสมอินเดียจำนวน 11 ตัวอย่าง มาทดสอบในเครื่องหมาย RAPD จำนวน 4 เครื่องหมาย พบค่า PIC มีค่าอยู่ระหว่าง 0.4405-0.4983 โดยมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรมมีค่าอยู่ระหว่าง 0.46-0.95



ภาพที่ 2.2 ขั้นตอนของเทคนิค RAPD

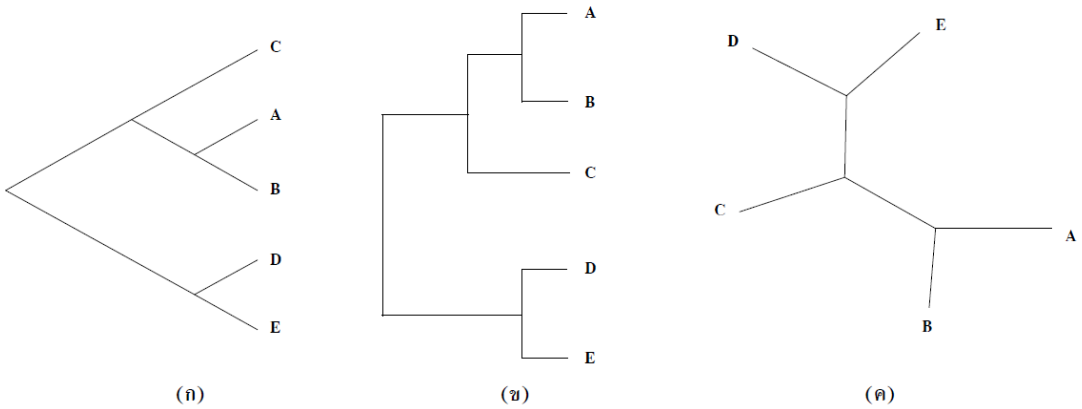
(Pasqualone, 2013, p. 85)

5. phylogenetics

phylogenetics หรือ phylogeny หรือ evolutionary tree เป็นการศึกษาประวัติหรือวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยใช้แผนภาพคล้ายต้นไม้ (phylogenetic tree) กิ่งที่แยกแต่ละกิ่งแสดงการแยกตัวออกจากกัน โดยมีสมมติฐานหลักว่า สิ่งมีชีวิตที่มีข้อมูลทางโมเลกุลเหมือนกัน (homologous) มีบรรพบุรุษร่วมกัน แล้วค่อย ๆ เปลี่ยนแปลงไปตามกาลเวลา จึงมีการแยกออกจากกันครั้งละ 2 กิ่ง แต่ละจุดที่แยกออกจากกันเกิดได้อย่างอิสระ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, หน้า 182) ในอดีตการสร้าง phylogenetic tree มักสร้างจากข้อมูลของลักษณะปรากฏ หรือ phenotypic data แต่ลักษณะปรากฏหลาย ๆ ลักษณะมีอิทธิพลเนื่องจากสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องกับการแสดงออกด้วย ดังนั้นการใช้ข้อมูลดังกล่าวในการสร้าง tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิต จึงมีความคลาดเคลื่อนค่อนข้างสูง ดังนั้นในปัจจุบันจึงนิยมใช้ข้อมูลจากลำดับของดีเอ็นเอในการศึกษาความสัมพันธ์ phylogenetic tree มีอยู่ด้วยกัน 2 แบบ ได้แก่

1. rooted phylogenetic tree เป็น tree แบบที่มีราก มี node ที่เป็นจุดเริ่มต้นหรือราก ที่ทุกกิ่งจะแยกออกมา สามารถบอกได้ว่าจุดไหนเป็นบรรพบุรุษและจุดไหนเป็นลูกหลานที่สืบทอดมา

2. unrooted phylogenetic tree เป็น tree แบบที่ไม่มีราก ไม่มีจุดเริ่มต้น ไม่สามารถระบุได้ว่า taxon ใดมีวิวัฒนาการมายาวนานกว่า จุดไหนเป็นบรรพบุรุษ และจุดไหนเป็นลูกหลาน ไม่สามารถบอกได้ว่า taxon ที่อยู่ใกล้ชิดกันมีความสัมพันธ์กันมากกว่า เพราะไม่ทราบว่าจุดเริ่มต้นของวิวัฒนาการอยู่ที่ตำแหน่งใด (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, หน้า 183)



ภาพที่ 2.3 องค์ประกอบที่สำคัญของ phylogenetic tree ในรูป ก และ ข เป็น tree แบบชนิดมีราก โดยรูป ข tree อยู่ในลักษณะเส้นนอน และเส้นตั้ง ส่วนรูป ค เป็นแบบไม่มีราก ทั้งสาม tree นี้มีโทโพโลยี เหมือนกัน A-E คือ taxa โดย A, B แยกมาจาก node หนึ่ง และ D, E จากอีก node หนึ่ง และ taxa A, B, C อยู่ใน clade หนึ่งส่วน taxa D, E อยู่อีก clade หนึ่งต่าง clade กัน

(สมชาย แสงอำนาจเดช, 2008, หน้า 182)

มหาวิทยาลัย

5.1 การสร้าง tree

ในกรณีนี้อธิบายเฉพาะการสร้าง tree ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ โดยใช้วิธีการอาศัยระยะความห่างไกลกัน (distance-based method) การสร้าง tree โดยวิธีนี้เริ่มจากการเปลี่ยนข้อมูลทางโมเลกุลให้เป็นค่า distance ก่อน โดยคำนวณค่า distance ระหว่างแต่ละตัวอย่างเป็นคู่ ๆ นำมาทำเป็นเมทริกซ์ (matrix) แล้วจึงสร้าง tree ค่า distance คำนวณมาจากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอหรือโปรตีน ที่ได้จากการตรวจสอบด้วยเครื่องหมายแบบต่าง ๆ

การเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่าง นิยมใช้ระบบตัวเลข 1 และ 0 โดยตัวเลข 1 แสดงการมีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง 0 แสดงการไม่มีแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกันนั้น ซึ่งใช้ได้ทั้งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตรวจสอบครั้งละ 1 ตำแหน่ง และหลายตำแหน่ง

การคำนวณค่า distance มีหลายวิธี เริ่มแรกจะคำนวณค่าความเหมือนทางพันธุกรรม genetic similarity (GS) หรือ similarity coefficient (S) ก่อน แล้วจึงคำนวณค่า genetic distance (GD) จาก GD = 1-GS การคำนวณค่า GS มีได้หลายวิธี แต่ที่ในงานวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีของ Jaccard (Nei & Li, 1979, pp. 5269-5273) ซึ่งให้ความสำคัญเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกัน แต่ให้ความสำคัญกับเหตุการณ์ทั้ง 3 แบบ (a, b, c) เท่ากัน ตามสูตร

$$GS = \frac{a}{a + b + c}$$

โดยที่ a คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบเหมือนกันในตัวอย่างที่ 1 และ 2 (1-1)

b คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างที่ 1 แต่ไม่พบในตัวอย่างที่ 2 (1-0)

c คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่พบในตัวอย่างที่ 2 แต่ไม่พบในตัวอย่างที่ 1 (0-1)

เมื่อได้ค่า GS แล้ว จึงคำนวณค่า distance เพื่อนำมาใช้สร้าง tree ด้วยวิธี UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic average) การสร้าง tree จะจับคู่ taxon หรือตัวอย่างที่มีค่า distance น้อยที่สุดก่อน โดย node คือจุดกึ่งกลางระหว่าง distance ของ 2 taxon ลดขนาดของเมทริกซ์ลง โดยให้กลุ่มที่จัดแล้วเป็น taxon เดียวกัน คำนวณ distance ระหว่าง taxon ใหม่กับ taxon ที่เหลือ สร้างเมทริกซ์ใหม่ที่ลดจำนวน taxon ลง จับคู่กลุ่มใหม่ที่มีค่า distance น้อยที่สุด ทำซ้ำไปเรื่อย ๆ จนครบทุกคู่ ก็จะได้ phylogenetic tree ที่สมบูรณ์ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, หน้า 186-189)

5.2 การทดสอบความเชื่อมั่นของ tree

การทดสอบความเชื่อมั่นของ tree ใช้วิธีการสุ่มข้อมูลซ้ำ (resampling) จากข้อมูลเริ่มต้นหลาย ๆ ครั้ง เช่นการทำ bootstrap โดยการสุ่มตัวอย่างจากข้อมูลเดิม การสุ่มอาจมีการตัดข้อมูลบางส่วนออก และข้อมูลที่เหลือบางส่วนอาจนำมาพิจารณามากกว่า 1 ครั้ง สร้าง tree ขึ้นใหม่ทุกครั้งที่มีการสุ่ม ดูความซ้ำและความแข็งแรงของ tree เปรียบเทียบกัน จะทำให้มีความมั่นใจมากขึ้น ตัวเลขแสดงผลที่ได้จากการทำ bootstrap จะอยู่บนกิ่งของ tree กิ่งใดมีค่าสูง (80-100%) แสดงว่าการจัดกลุ่มของ taxon ที่อยู่รวมกันในกลุ่มนั้นมีความน่าเชื่อถือหรือความเป็นไปได้สูง ถ้าค่า bootstrap ของกิ่งใดมีค่าต่ำ (เช่น ต่ำกว่า 50%) แสดงว่าการจัดกลุ่มของ taxon ที่อยู่รวมกันในกลุ่มนั้นอาจยังไม่ถูกต้อง หรือมีข้อมูลไม่เพียงพอ ควรศึกษาเพิ่มเติมหรือหาข้อมูลอื่นมาประกอบ (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2552, หน้า 196)

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี

6. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

6.1 งานวิจัยเกี่ยวกับลีลาวดีในประเทศไทย

ในประเทศไทยการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ลีลาวดี (*Plumeria* spp.) มากที่สุดคือ การศึกษาในพืชวงศ์ตีนเป็ดหรือวงศ์ลีลาวดี (Apocynaceae) โดยนฤมล ธนานันต์, ศรัญลักษณ์ นาคขาว และธีระชัย ธนานันต์ (2554, หน้า 1-8) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโมกและพุด จำนวน 12 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมาย RAPD ผลการศึกษาพบว่า สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดได้ด้วยแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ นอกจากนั้นยังพบไพรเมอร์ที่สามารถจำแนกโมกและพุดทั้ง 12 ตัวอย่าง ได้ด้วยไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถจำแนกโมกและพุดได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม

นอกจากนั้นจะเป็นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชวงศ์ตีนเป็ดหรือวงศ์ลีลาวดี (Apocynaceae) เช่น พิณชนก มะลิมาตร, ปิยะพร แสนสุข และอุษา ทองไพโรจน์ (2556, หน้า 683-691) ได้ศึกษาสัณฐานวิทยาของต่อมโคนกลีบเลี้ยง (colleter) ของพืชวงศ์ลีลาวดี (Apocynaceae) จำนวน 22 ชนิด พบว่าสัณฐานวิทยาของต่อมโคนกลีบเลี้ยงมีรูปร่าง 4 แบบ ได้แก่ รูปร่างคล้ายซี่ฟัน รูปร่างสามเหลี่ยมกว้าง รูปร่างคล้ายขนครุย และรูปร่างขนาดใหญ่ยืดยาว ตำแหน่งของต่อมโคนกลีบเลี้ยง จำแนกเป็น 5 แบบ ได้แก่ ติดข้างเดียวของกลีบเลี้ยง ติดทั้ง 2 ข้างของกลีบเลี้ยง เรียงเป็นแถวบริเวณโคนกลีบเลี้ยง ติดสลับกับกลีบเลี้ยง และเรียงเป็นกลุ่มตรงกลางโคนกลีบเลี้ยง จากผลการศึกษาสัณฐานวิทยาของต่อมโคนกลีบเลี้ยงเป็นลักษณะสำคัญที่สามารถนำมาใช้ในการระบุชนิดพืชวงศ์ Apocynaceae ได้ นอกจากนี้ ปริญญา สุกแก้วมณี (2548) ยังได้ศึกษาสัณฐานวิทยาละอองเรณูของพรรณไม้วงศ์ลีลาวดีในมหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี ผลการศึกษาพบว่าละอองเรณูของพืชชนิดเดียวกันอาจจะมีลักษณะสัณฐานวิทยาต่างกัน ทั้งขนาด รูปร่าง ลวดลายของผนัง มีความผันแปรจากข้อมูลที่นักเรณูวิทยาเคยศึกษามาแล้วในบางชนิด เป็นลักษณะของความผันแปรซึ่งอาจมีปัจจัยที่เข้ามามีผลหรือเกี่ยวข้องคือ อายุ จำนวนชุดโครโมโซมที่แตกต่างกัน (ploidy) ความยาวของตาดอก (flower bud) เทคนิคการเตรียมละอองเรณู เพราะฉะนั้นการใช้ข้อมูลสัณฐานวิทยาของละอองเรณูเพียงอย่างเดียวไม่สามารถจำแนกพรรณไม้ออกเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจน หรือจำแนกได้เฉพาะพืชบางกลุ่มเท่านั้น ดังนั้นควรมีการใช้ข้อมูลลักษณะอื่น ๆ ร่วมกับลักษณะสัณฐานวิทยาละอองเรณูเพื่อที่จะสามารถนำมาใช้ในการจำแนกพืชได้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

นอกจากทางด้านสัณฐานวิทยาแล้วยังมีการศึกษาทางด้านสารสกัดที่ได้จากพืชวงศ์นี้อีกด้วย เช่น นันทิตา วงศ์หวุน (2558, หน้า 1-145) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดจากพืชในวงศ์ลั่นทมบางชนิด ผลการศึกษาพบว่า ตัวอย่างพืชสมุนไพรบางชนิดในวงศ์ลั่นทม คือ โมกราชินี โมกมันชวนชม ลีลาวดี ที่เก็บส่วนต่าง ๆ ของตัวอย่าง ได้แก่ ราก ลำต้น เปลือกลำต้น และใบ มีสารออกฤทธิ์

มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

ที่สามารถต้านการเจริญของเชื้อจุลชีพ 9 ชนิด ที่ใช้ในการทดลอง ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อรา แต่ประสิทธิภาพการต้านเชื้อของตัวอย่างแตกต่างกัน ดังนั้น สารสกัดจากพืชสมุนไพรนี้ จึงมีความน่าสนใจในการนำไปศึกษาต่อทางด้านโครงสร้างและคุณสมบัติของสารที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหยาบเพื่อเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้แทนสารเคมีที่ได้จากการสังเคราะห์ต่อไป

6.2 งานวิจัยเกี่ยวกับลีลาวดีในต่างประเทศ

Meerow, Criley & Schnell (2006, p. 1001) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของพืชสายพันธุ์ลีลาวดี โดยใช้ลีลาวดีสายพันธุ์ *Plumeria rubra* จำนวน 83 ตัวอย่าง มาทดสอบกับเครื่องหมาย SSR จำนวน 21 เครื่องหมาย ผลการทดสอบพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มลีลาวดีได้ทั้งหมด 5 กลุ่ม และมีลักษณะที่แตกต่างกันในระหว่าง 5 กลุ่มนี้ และผลการทดลองทำให้ทราบว่าสายพันธุ์ลีลาวดีมีการผสมพันธุ์กันอย่างกว้างขวาง และมีการเรียกชื่อที่ต่างกันไปถึงแม้จะมี genotype เดียวกันก็ตาม

Perez (2015) ได้ทำการใช้ intergenic spacer (IGS) regions จำนวน 6 ตำแหน่ง ทดสอบกับลีลาวดีจำนวน 5 สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน เพื่อหา IGS ตำแหน่งที่เหมาะสมในการแยกสายพันธุ์ลีลาวดีและประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลีลาวดี ผลจาก phylogenetic tree พบว่า IGS จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ psbD-trnT และ trnQ-rps16 มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ลีลาวดีได้ ผลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงสายพันธุ์ลีลาวดีที่ดีกว่าเดิมได้ในอนาคต

Leilei, Xiaoxue, Jie & Xinjun (2018) ได้ใช้ DNA barcoding และ HPLC specific chromatogram มาใช้ในการระบุชนิดของลีลาวดีจำนวน 3 ชนิด ผลการศึกษาพบว่า DNA barcoding ที่ตำแหน่ง psbA-trnH เป็นเครื่องมือที่ดีและเชื่อถือได้ในการนำมาใช้ระบุชนิดของดอกลีลาวดีทั้ง 3 ชนิด แต่ HPLC specific chromatogram เพียงวิธีเดียวไม่สามารถนำมาใช้ระบุชนิดของดอกลีลาวดีได้ ดังนั้น DNA barcoding จึงเป็นวิธีที่เหมาะสม เพราะมีความเสถียร แม่นยำ และไม่ได้รับผลกระทบจากระยะการเจริญเติบโตและความแตกต่างของเนื้อเยื่อของพืช หรือสภาวะแวดล้อมภายนอก