บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์

การผสมพันธุ์ข้ามชนิดภายในหมู่ *Formosae* สามารถติดฝักและให้ลูกผสมได้ ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดลองของ Wilfret and Kamemoto (1969) ที่ไม่พบการติดฝักเลย อาจเนื่องมาจากการเลือกใช้ชนิดของกล้วยไม้ไม่เหมือนกัน โดยคู่ผสมที่นำมาผสมและให้ลูกผสมได้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ D037 (เอื้องคำปากไก่) × D022 (เอื้องเงิน) และ เอื้องคำปากไก่ × D034 (เอื้องตาเหิน)

ส่วนในหมู่ *Dendrobium* การผสมพันธุ์ข้ามชนิดภายในหมู่เดียวกันเกิดขึ้นได้น้อยมาก อาจเนื่องมาจากการที่หมู่ *Dendrobium* มีจำนวนชนิดมาก และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแต่ละชนิดที่หลากหลายมากที่สุด จึงทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมมีความหลากหลายมากขึ้นตามไปด้วย ซึ่งอาจมีผลทำให้การผสมข้ามกับหมู่อื่นๆ และการผสมข้ามชนิดภายในหมู่เดียวกันนี้มีโอกาสประสบความสำเร็จน้อยลง (Seidenfaden and Smitinand, 1960)

การผสมข้ามระหว่างหมู่ *Dendrobium* กับหมู่ *Callista* ได้แก่ D030 (เอื้องพวงหยก) × D026 (เอื้องคำ), เอื้องคำ × เอื้องพวงหยก และ D031 (เอื้องเก๊ากิ่ว) × เอื้องคำ และ หมู่ *Formosae* กับหมู่ *Callista* ได้แก่ เอื้องคำ × D018 (เอื้องเงินแดง) ไม่สามารถเกิดลูกผสมได้ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองของ Wilfret and Kamemoto (1969) ที่พบว่า การผสมข้ามหมู่ระหว่าง หมู่ *Callista* กับหมู่อื่นๆ เช่น *Phalaenanthe*, *Dendrobium* และ *Formosae* มีเปอร์เซ็นต์การติดฝักที่ต่ำมาก หรืออาจพบการติดฝักได้ แต่ไม่มีเมล็ดเลย เนื่องจาก หมู่ *Callista* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางอย่าง เช่น การเจริญและแตกหน่อของลำลูกกล้วย และลักษณะของช่อดอกที่ห้อยลงมา ซึ่งแตกต่างไปจากหมู่อื่นอย่างชัดเจน โดยความแตกต่างดังกล่าวมีผลทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมของหมู่ *Callista* แตกต่างออกไปจากหมู่อื่นด้วย จึงทำให้กล้วยไม้หมู่นี้มีอัตราการผสมข้ามที่ต่ำ อย่างไรก็ตาม มีคู่ผสมหลายคู่ที่ผสมกันไม่ได้ถึงแม้ว่าเป็นการผสมภายในหมู่เดียวกัน เช่น การผสมข้ามชนิดภายในหมู่ *Formosae* คือ เอื้องเงิน × D012 (เอื้องแซะ), เอื้องเงินแดง × เอื้องคำปากไก่ และเอื้องเงิน × เอื้องตาเหิน ซึ่ง Wilfret and Kamemoto (1969) ได้กล่าวไว้ว่า ระดับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมไม่สามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงสาเหตุของการผสมไม่ติดในกล้วยไม้สกุลหวายได้เสมอไป ปัญหาสำคัญในการผสมพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายที่พบได้บ่อยคือการติดฝักยาก โดยมีสาเหตุเนื่องมาจากการผสมข้ามชนิดกันโดยที่แม่ และพ่อ มีความแตกต่างทางพันธุกรรมทั้งในด้านขนาดของโครโมโซม หรือการเข้าคู่กันไม่ได้ของโครโมโซมในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (meiosis) (Teoh,

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1989) หรือที่เรียกว่า ความเข้ากันไม่ได้ของคู่ผสม (cross incompatibility) ความเข้ากันไม่ได้ของคู่ผสมมีหลายระดับ บางครั้งอาจเกิดขึ้นทางเดียว เช่น กรณีของคู่ผสม เอื้องพวงหยก × เอื้องเก๊ากิ่ว, เอื้องพวงหยก × เอื้องเงินแดง และ เอื้องคำปากไก่ × เอื้องตาเหิน ที่สามารถผสมติด มีเมล็ด และให้ลูกผสมได้ แต่ถ้ากลับคู่ผสมให้ต้นพ่อมาเป็นต้นแม่ คือ เอื้องเก๊ากิ่ว × เอื้องพวงหยก, เอื้องเงินแดง × เอื้องพวงหยก และ เอื้องตาเหิน × เอื้องคำปากไก่ กลับไม่สามารถติดฝักได้เลย ถ้ามีความเข้ากันไม่ได้ของคู่ผสมรุนแรงมาก เป็นผลให้การผสมกลับระหว่างแม่และพ่อ หรือ พ่อและแม่ ไม่สามารถติดฝักหรือผลิตลูกผสมได้ (ดารณี และคณะ, 2519) ดังในกรณีของคู่ผสม D017 (หวายฟาแลนอปซีส) × D015 (ครั่งแสด), ครั่งแสด × หวายฟาแลนอปซีส, ครั่งแสด × เอื้องแซะ, เอื้องแซะ × ครั่งแสด, เอื้องแซะ × หวายฟาแลนอปซีส, หวายฟาแลนอปซีส × เอื้องแซะ, ครั่งแสด × เอื้องเงิน, เอื้องเงิน × ครั่งแสด, เอื้องพวงหยก × เอื้องคำ, เอื้องคำ × เอื้องพวงหยก, เอื้องเงิน × D044 (เอื้องสายสามสี), เอื้องสายสามสี × เอื้องเงิน, หวายฟาแลนอปซีส × เอื้องสายสามสี และ เอื้องสายสามสี × หวายฟาแลนอปซีส จึงเห็นได้ว่าบางต้นเป็นได้ทั้งพ่อ และแม่ บางต้นเป็นได้เพียงแม่ หรือพ่อ และบางต้นไม่สามารถใช้เป็นทั้งแม่และพ่อ การจับคู่ผสมที่ถูกต้องจึงจำเป็นต้องใช้เวลาในการศึกษา และพิจารณาถึงปัจจัยที่นำไปสู่ความเข้ากันได้ทางพันธุกรรมระหว่างแม่ และพ่อด้วย (สมศักดิ์, 2540)

นอกจากนี้ยังพบว่าคู่ผสมบางคู่สามารถติดฝักได้ แต่มีเมล็ดน้อย เช่น คู่ผสม เอื้องคำปากไก่ × เอื้องตาเหิน หรือเมล็ดมีลักษณะลีบ ไม่สามารถงอกได้ เช่น คู่ผสม เอื้องตาเหิน × เอื้องเงิน และ เอื้องเงินแดง × เอื้องเก๊ากิ่ว ซึ่งพบได้บ่อยครั้งในกรณีที่มีการผสมกล้วยไม้ต่างชนิดกัน (นพพร, 2543) หรืออาจเนื่องมาจากปัจจัยอื่นๆ ในช่วงที่มีการถ่ายละอองเกสร คือ อุณหภูมิ และความชื้นที่ไม่เหมาะสม อายุของละอองเกสรตัวผู้ และความพร้อมของยอดเกสรตัวเมีย ซึ่งเป็นรายละเอียดที่ควรมีการศึกษาต่อไป

การนำฝักที่มีเมล็ด ที่มีอายุครบ 3 เดือนจาก 5 คู่ผสม คือ เอื้องคำปากไก่ × เอื้องเงิน, เอื้องพวงหยก × เอื้องเก๊ากิ่ว, หวายฟาแลนอปซีส × เอื้องเงิน, เอื้องพวงหยก × เอื้องเงินแดง และ เอื้องคำปากไก่ × เอื้องตาเหิน มาเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อ โดยใช้อาหารวุ้นสูตร Vacin and Went (1949) เป็นเวลา 8 เดือน พบว่า ลูกผสม หวายฟาแลนอปซีส × เอื้องเงิน มีความหลากหลายของลักษณะทรงต้นและใบ อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งเป็นข้อดีของการเพาะเมล็ดกล้วยไม้ในสภาพปลอดเชื้อ ที่ช่วยให้สามารถคัดเลือกลูกผสมที่มีลักษณะเด่นในด้านการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว (อารีย์, 2541) นอกจากนี้ยังพบว่า การเจริญเติบโตของลูกผสมในแต่ละคู่มีความแตกต่างกันมาก อาจมีสาเหตุมาจากความสมบูรณ์ของเมล็ด หรือ การพัฒนาของเอ็มบริโอแตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลมาจากการเข้าคู่กันของโครโมโซมของแม่และพ่อในแต่ละคู่ผสม จึงเป็นผลทำให้จำนวนต้นของลูกผสมที่สามารถย้ายออกปลูกได้แตกต่างกัน (สมบุญ, 2544)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลังจากย้ายปลูกในสภาพโรงเรือนเป็นเวลา 6 เดือน ลูกผสม เอื้องพวงหยก × เอื้องเก๊ากิ่ว มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แตกกอดี ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ไม่เป็นโรค และไม่ทิ้งใบในช่วงฤดูหนาว ซึ่งเกิดจากการรวมตัวทางพันธุกรรมของ เอื้องพวงหยก และ เอื้องเก๊ากิ่ว ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศที่เย็น และไม่ทิ้งใบ

ลูกผสม หวายฟาแลนอปซีส × เอื้องเงิน เกิดจากการผสมของหมู่ *Phalaenanthe* และหมู่ *Formosae* มีจำนวนต้นที่ย้ายปลูกน้อยที่สุด แต่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดมากที่สุด ลูกผสมที่ได้มีลักษณะของลำต้น และใบแตกต่างกัน มีการเจริญเติบโตที่ดี ไม่เป็นโรค แตกกอช้า มีบางต้นที่ทิ้งใบในช่วงฤดูหนาว ซึ่งความแตกต่างของลักษณะการเจริญเติบโตนี้อาจเกิดจากการรวมตัวของหน่วยพันธุกรรมของแม่และพ่อที่ค่อนข้างแตกต่างกัน ลูกผสมจึงมีความหลากหลายของลักษณะทางสัณฐานวิทยามากยิ่งขึ้น

ลูกผสมของคู่ผสมที่ได้จาก เอื้องคำปากไก่ × เอื้องเงิน มีการเจริญเติบโตช้า ไม่ทนทานต่อโรค และส่วนใหญ่ทิ้งใบในช่วงฤดูหนาว เป็นผลมาจากการรวมตัวของหน่วยพันธุกรรมระหว่างแม่และพ่อที่อยู่ในหมู่ *Formosae* เหมือนกัน ซึ่งทั้งพ่อและแม่มีการเจริญเติบโตที่ช้า และทิ้งใบในช่วงฤดูหนาวเช่นเดียวกับลักษณะที่แสดงออกในลูกผสม

สำหรับลูกผสมของคู่ผสม เอื้องพวงหยก × เอื้องเงินแดง มีความอ่อนแอต่อโรค และโดนศัตรูพืชกัดกินจึงไม่สามารถเก็บข้อมูลของลูกผสมได้ ส่วนลูกผสมของคู่ผสม เอื้องคำปากไก่ × เอื้องตาเหิน ยังไม่สามารถย้ายปลูกได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของเอื้องคำปากไก่ ซึ่งเป็นกล้วยไม้ที่มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้า และสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศที่เย็นเช่นเดียวกับ เอื้องตาเหิน จึงเป็นผลทำให้ลูกผสมของคู่ผสมนี้มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าลูกผสมคู่อื่น

การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่องหมาย RAPD

การคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างแม่ พ่อ และลูกผสมได้ โดยการปรากฏ polymorphic band ของแม่และพ่อ ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม จากการใช้ไพรเมอร์ 21 หมายเลข เข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบของคู่ผสมกล้วยไม้สกุลหวาย และลูกผสม ทั้ง 5 คู่ พบว่า ในคู่ผสม หวายฟาแลนอปซีส × เอื้องเงิน สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้โดยไพรเมอร์ 7 หมายเลข คือ OPF01, 02, 03, 04, 05, 06 และ OPD 03 ในคู่ผสม เอื้องคำปากไก่ × เอื้องเงิน สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้โดยไพรเมอร์ 6 หมายเลข คือ OPF01, 02, 03, 04, 06 และ 20 ในคู่ผสม เอื้องพวงหยก × เอื้องเก๊ากิ่ว สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์ทาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธุกรรมได้โดยไพรเมอร์ 5 หมายเลข คือ OPF01, 02, 04, 05 และ 14 ในคู่ผสม เอื้องคำปากไก่ × เอื้องตาเหิน สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้โดยไพรเมอร์ 5 หมายเลข คือ OPF01, 04, 06, 14 และ OPD03 และในคู่ผสม เอื้องพวงหยก × เอื้องเงินแดง สามารถแสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้โดยไพรเมอร์ 3 หมายเลข คือ OPF01, 13 และ 14

การผสมภายในหมู่ *Formosae* คู่ผสม 2 คู่ ได้แก่ เอื้องคำปากไก่ × เอื้องเงิน และ เอื้องคำปากไก่ × เอื้องตาเหิน พบว่ามีไพรเมอร์เหมือนกัน 3 หมายเลข ที่สามารถสังเคราะห์ polymorphic band ซึ่งแสดงความแตกต่างทางพันธุกรรมในแต่ละคู่ผสมได้ คือ ไพรเมอร์ OPF01 จำนวน 2 และ 8 แถบ ตามลำดับ ไพรเมอร์ OPF04 จำนวน 4 และ 6 แถบ ตามลำดับ และไพรเมอร์ OPF06 จำนวน 10 และ 7 แถบ ตามลำดับ และพบว่าไพรเมอร์ทั้ง 3 หมายเลขนี้ยังสามารถใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของคู่ผสมระหว่างหมู่ *Phalaenanthe* และหมู่ *Formosae* ได้โดยการสังเคราะห์ polymorphic band ในคู่ผสม หวายฟ่าแลนอปซีส × เอื้องเงิน จำนวน 5, 12 และ 9 แถบ เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF01, 04 และ 06 ตามลำดับ สำหรับไพรเมอร์ OPF14 สามารถสังเคราะห์ polymorphic band ที่ใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมในคู่ผสมจากหมู่ *Dendrobium* คือ เอื้องพวงหยก × เอื้องเก๊ากิ่ว ได้จำนวน 9 แถบ และไพรเมอร์หมายเลขนี้ยังสามารถใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของคู่ผสมระหว่างหมู่ *Dendrobium* และหมู่ *Formosae* ได้จากการสังเคราะห์ polymorphic band ในคู่ผสม เอื้องพวงหยก × เอื้องเงินแดง ได้จำนวน 10 แถบ

จากผลการปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอของคู่ผสมทั้ง 5 คู่ พบว่ามีไพรเมอร์ 1 หมายเลขที่สามารถใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมในกล้วยไม้ที่ใช้ในการศึกษาได้ คือ OPF01 ถึงแม้จะเป็นกล้วยไม้ที่อยู่ในหมู่เดียวกันก็ตาม ซึ่งแสดงให้เห็นถึงพันธุกรรมที่เป็นเอกลักษณ์ของตัวเอง สามารถให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้ (Karp *et al.*, 1996; Skepner and Krane, 1998; Ranamukhaarachchi *et al.*, 2001) ในการจัดกลุ่มกล้วยไม้ได้มีการนำลักษณะทางสัณฐานวิทยามาเป็นหลักการ และใช้ถิ่นกำเนิดมาเป็นข้อพิจารณาในการจัดกลุ่ม (Baker *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตาม การศึกษาพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอครั้งนี้พบว่า ถึงแม้ว่าเป็นคู่ผสมที่เกิดจากการผสมข้ามชนิดภายในหมู่เดียวกัน เช่น คู่ผสม เอื้องพวงหยก × เอื้องเก๊ากิ่ว จากหมู่ *Dendrobium* แต่การปรากฏของลายพิมพ์ดีเอ็นเอกลับมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยผลดังกล่าวนี้อาจเกิดจากการที่ เอื้องพวงหยก และ เอื้องเก๊ากิ่ว มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของลำลูกกล้วย ลักษณะการเกิดช่อดอก ลักษณะของดอก ตลอดจนสีของกลีบดอก ค่อนข้างแตกต่างกันมาก (ณัฐา, 2545) ซึ่งถ้าหากความแตกต่างทางสัณฐานวิทยายิ่งมีมากย่อมส่งผลให้มีลักษณะทางพันธุกรรมมีความแตกต่างกันมากขึ้นด้วย พืชจึงแสดงแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอออกมาแตกต่างกันได้ชัดเจน (สมวงษ์, 2543)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถนำมาใช้เป็นหลักฐานในการบอกความเหมือนหรือความแตกต่างกันระหว่างชนิดของกล้วยไม้สกุลหวายได้ ดังเห็นได้จากผลการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่าง แม่ และพ่อ ที่สามารถให้ลูกผสมได้ทั้ง 5 คู่ในข้างต้น ข้อมูลของลายพิมพ์ดีเอ็นเอยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ แม่ พ่อ และลูกผสมได้จากความสัมพันธ์ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (จุลภาค, 2543) เนื่องจากลูกผสมเป็นผลมาจากการรวมหน่วยพันธุกรรมจาก แม่ และพ่อ อย่างละครึ่ง (อัญชลี, 2546) การปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ได้รับมาจาก แม่ และพ่ออย่างละครึ่งพบได้ในคู่ผสม หวายฟาแลนอปซีส × เอื้องเงิน จากลูกผสมต้นที่ 1 และ 2 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF03 ลูกผสมต้นที่ 1 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF05 ลูกผสมต้นที่ 1, 2 และ 5 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF06 และลูกผสมต้นที่ 1 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPD03 ในคู่ผสม เอื้องคำปากไก่ × เอื้องเงิน จากลูกผสมต้นที่ 1 และ 2 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF01 ลูกผสมต้นที่ 2 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF03 และลูกผสมต้นที่ 4 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF06 และในคู่ผสม เอื้องพวงหยก × เอื้องเก๊ากิ่ว จากลูกผสมต้นที่ 2-4 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF02 และลูกผสมต้นที่ 3 และ 4 เมื่อใช้ ไพรเมอร์ OPF14 ซึ่งเหมือนกับรายงานในกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* (Chen *et al.*, 2001) ลูกผสมระหว่าง *Brassica oleracea* (L.) กับ *Camelina sativa* (L.) Carntz (Hansen, 1998) และหน่อไม้ฝรั่ง (Caporali *et al.*, 1996) นอกจากนี้ การปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้รับมาจาก แม่ และพ่ออย่างละครึ่งของคู่ผสม D017 × D022 ยังสอดคล้องกับงานทดลองของ Benedetti *et al.* (1998) ที่พบว่าเทคนิค RAPD สามารถใช้ยืนยันถึงความเป็นลูกผสมข้ามหมู่ใน *Alstroemeria* ได้

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพ่ออย่างน้อย 1 แถบ และปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกับแม่มากกว่าพ่อ ได้แก่ คู่ผสม หวายฟาแลนอปซีส × เอื้องเงิน จากลูกผสมต้นที่ 3–5 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF03 ลูกผสมต้นที่ 2-5 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF04 ลูกผสมต้นที่ 3 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF06 และลูกผสมต้นที่ 2–5 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPD03 ในคู่ผสม เอื้องคำปากไก่ × เอื้องเงิน จากลูกผสมต้นที่ 5 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF02 ลูกผสมต้นที่ 1, 2 และ 5 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF06 ในคู่ผสม เอื้องพวงหยก × เอื้องเก๊ากิ่ว จากลูกผสมต้นที่ 2 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF01 และลูกผสมต้นที่ 1-4 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF05 และในคู่ผสม เอื้องคำปากไก่ × เอื้องตาเหิน จากลูกผสมทั้ง 3 ต้น เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF04, 06 และ 14 เช่นเดียวกับที่พบในลูกผสมของ *Anthurium* ในงานทดลองของ Ranamukhaarachchi *et al.* (2001)

ในทางตรงกันข้าม การปรากฏของลายพิมพ์ดีเอ็นเอในลูกผสมที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนกับแม่อย่างน้อย 1 แถบ และปรากฏแถบดีเอ็นเอเหมือนกับพ่อมากกว่าแม่ ได้แก่ คู่ผสม หวายฟาแลนอปซีส × เอื้องเงิน จากลูกผสมต้นที่ 4 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF02 ลูกผสมต้นที่ 1, 2 และ 4 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF04 ลูกผสมต้นที่ 2-5 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF05 และลูกผสมต้นที่ 4 เมื่อใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ไพรเมอร์ OPF06 ในคู่ผสม เอื้องคำปากไก่ × เอื้องเงิน จากลูกผสมต้นที่ 1, 2 และ 4 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF02 และลูกผสมต้นที่ 1, 3, 4 และ 5 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF03 และลูกผสมต้นที่ 2, 3 และ 5 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF06 และในคู่ผสม เอื้องพวงหยก × เอื้องเก๊ากิ่ว จากลูกผสมต้นที่ 1, 2 และ 5 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF14 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Renou *et al.* (1997) ที่พบการปรากฏของลายพิมพ์ดีเอ็นเอลักษณะเดียวกันนี้ในลูกผสมของ *Pelargonium* โดย Ranamukhaarachchi *et al.* (2001) และ Renou *et al.* (1997) ได้สรุปผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกันว่า การที่ลูกผสมได้รับเครื่องหมายดีเอ็นเอมาจากแม่ หรือ พ่อ จำนวนหลายแถบ ย่อมแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกับแม่ หรือ พ่อ นั้นๆ ด้วย

สำหรับการปรากฏแถบดีเอ็นเอจากพ่อเพียงอย่างเดียวในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมทั้ง 5 ต้นของคู่ผสม หวายฟาแลนอปซีส × เอื้องเงิน เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF01 ลูกผสมต้นที่ 1, 2, 3 และ 5 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF02 ลูกผสมต้นที่ 3 ในคู่ผสม เอื้องคำปากไก่ × เอื้องเงิน เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF02 และลูกผสมต้นที่ 1, 4 และ 5 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF20 ในทางตรงกันข้าม พบการปรากฏแถบดีเอ็นเอจากแม่เพียงอย่างเดียวใน ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมต้นที่ 4 ของคู่ผสม เอื้องคำปากไก่ × เอื้องเงิน เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF01 และลูกผสมทั้ง 5 ต้น เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF04 ลูกผสมต้นที่ 1, 3, 4 และ 5 ของคู่ผสม เอื้องพวงหยก × เอื้องเก๊ากิ่ว เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF01 ลูกผสมต้นที่ 1 และ 5 เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF02 ลูกผสมทั้ง 5 ต้น เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF04 และลูกผสมต้นที่ 5 ของคู่ผสม เอื้องคำปากไก่ × เอื้องตาเหิน เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF05 และลูกผสมทั้ง 3 ต้นเมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF01 และ OPD03 และจากลูกผสมต้นทั้ง 5 ต้น ของคู่ผสม เอื้องพวงหยก × เอื้องพวงหยก เมื่อใช้ไพรเมอร์ทั้ง 3 หมายเลข คือ OPF01, 13 และ 14 ซึ่งสอดคล้องกับที่รายงานไว้ในลิลี่ (*Lilium*) ที่พบการปรากฏแถบดีเอ็นเอจากแม่เพียงอย่างเดียวในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม (Wiejacha *et al.*, 2001)

ในบางกรณีลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมบางต้น พบการปรากฏของ monomorphic band เพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แม่ พ่อ และลูกผสมยังคงมีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่เหมือนกันอยู่ ถึงแม้จะไม่ปรากฏ polymorphic band ที่เหมือนกับแม่และพ่อก็ตาม (วัชรี และมนตรี, 2536) และเมื่อพิจารณาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของคู่ผสมเดียวกันที่ได้จากไพรเมอร์หมายเลขอื่นพบว่ามีการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอจากแม่และพ่อ ไปอยู่ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม ดังนั้น การหาเครื่องหมายดีเอ็นเอจากเทคนิค RAPD ที่นำมาใช้ตรวจสอบลูกผสม จึงควรใช้ไพรเมอร์เพื่อจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอมากกว่า 1 หมายเลข เนื่องจากเป็นการเข้าสุ่มจับต่างบริเวณในจีโนม (genome) ของไพรเมอร์ แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏจึงไม่จำเป็นต้องมาจากบริเวณเดียวกัน

นอกจากนี้ ในผลการทดลองครั้งนี้ยังพบว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมบางต้นในบางคู่ผสม พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ไม่มีอยู่ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของแม่และพ่ออยู่ด้วย ได้แก่ คู่ผสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หวายฟาแลนอปซีส × เอื้องเงิน ในลูกผสมต้นที่ 1, 2 และ 3 จำนวน 1 แถบ เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF03 ในลูกผสมต้นที่ 3 และ 5 จำนวน 2 แถบ เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF04 ในลูกผสมต้นที่ 1, 2, 3 และ 5 จำนวน 2 แถบ เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF06 และในลูกผสมต้นที่ 2 จำนวน 1 แถบ เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPD03 ส่วนคู่ผสม เอื้องพวงหยก × เอื้องเก๊ากิ่ว พบในลูกผสมต้นที่ 1, 3 และ 4 จำนวน 1 แถบ เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF01 และในลูกผสมต้นที่ 2 และ 4 จำนวน 1 แถบ เมื่อใช้ไพรเมอร์ OPF05 โดยสาเหตุของการเกิดแถบใหม่เช่นนี้อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรม ซึ่งมีผลทำให้รูปร่างของโครโมโซม ตลอดจนการเรียงตัวของลำดับเบสในบริเวณนั้นเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งความเป็นไปได้ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส คือ ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการจำลองตัวเองของโครโมโซม (duplication) การสูญหาย หรือ เปลี่ยนตำแหน่งของหน่วยพันธุกรรม ซึ่งพบได้บ่อยในพวกที่เป็น heterozygous (White, 1973) นอกจากนี้ การเกิด recombination ระหว่างดีเอ็นเอ 2 เส้นที่มีโมเลกุลต่างกัน ยังมีผลทำให้การจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในเส้นดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไปด้วย เมื่อไพรเมอร์เข้าสุ่มจับแล้วสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นนี้ขึ้นมา จึงปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอขนาดใหม่ (Brown, 1990)

อย่างไรก็ตาม การเกิด polymorphism ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD บางครั้งอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอสายเดี่ยว การขาดหายไป (deletions) ของลำดับเบสในไพรเมอร์ การสอดแทรก (insertions) ที่ไปเพิ่มโอกาสในการแยกออกจากกันของลำดับเบสในไพรเมอร์ และการสอดแทรก หรือ การขาดหายไปเพียงเล็กน้อยที่มีผลทำให้ขนาดของผลผลิตพีซีอาร์เปลี่ยนแปลงไป (Sharma and Sumitra, 2002) และ สมวงษ์ (2543) ได้ให้เหตุผลอีกว่า ไพรเมอร์ที่ใช้เป็นรหัสเริ่มต้นมีขนาดสั้นเพียง 10 เบส จึงสามารถเข้าคู่กับเส้นดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายตำแหน่ง โดยสุ่มแบบจำเพาะเจาะจงน้อย (low specific priming) แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณนั้น ความแตกต่างของสายดีเอ็นเอเริ่มต้นจึงก่อให้เกิดความแตกต่างทั้งในด้านของความสามารถในการเกิดการจำลองตัว และขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกจำลองตัวขึ้นมา เป็นผลทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอหลากหลายรูปแบบ และองค์ประกอบทางพันธุกรรมของกล้วยไม้จัดเป็นพวก highly heterozygous (ณัฐา, 2545) จึงเป็นสาเหตุทำให้แถบดีเอ็นเอในแม่หรือพ่อบางแถบไม่ปรากฏอยู่ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม ดังที่เกิดขึ้นในหลายไพรเมอร์ของผลการทดลอง สำหรับการดัดแปลงเงื่อนไขของปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบว่า มีผลต่อผลผลิตพีซีอาร์ด้วย โดยเฉพาะในช่วง annealing temperature โดย Anuntalabhochai *et al.* (2000) ได้รายงานว่า การใช้อุณหภูมิในขั้นตอน primer annealing ที่ 46-62 องศาเซลเซียส เกิดการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และมีความคมชัดสูงกว่าการใช้อุณหภูมิที่ 34-37 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตาม หากใช้อุณหภูมิในช่วง annealing ที่สูงเกินไป อาจเกิดแถบดีเอ็นเอที่เป็น non-specific (non-specific band) ขึ้นได้ นอกจากนี้ การเพิ่มจำนวนรอบของการทำพีซีอาร์ พบว่า มีผลต่อการเพิ่มของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลผลิตพีซีอาร์ด้วย ทั้งนี้ ควรปรับจำนวนรอบให้เหมาะสมกับอุณหภูมิในแต่ละช่วง เนื่องจากการใช้จำนวนรอบมากเกินไป (มากกว่า 40 รอบ) อาจก่อให้เกิด non-specific band จาก plateau effect ได้ (วีระพงศ์, 2536)

สำหรับปัญหาในการไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของเอื้องเงินแดงนั้น อาจมีสาเหตุมาจากการที่ปฏิกิริยาในการทำพีซีอาร์เกิดการปนเปื้อน เนื่องจากพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่มีความไวสูงมาก ถ้าองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาไม่สะอาดเพียงเล็กน้อย ทำให้ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวนของผลผลิตพีซีอาร์ได้ (วีระพงศ์, 2536) แต่ปัญหาในปฏิกิริยาของคู่ผสมนี้ อาจไม่ได้มีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนภายในหลอดส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) เนื่องจากการไม่ปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอเกิดเฉพาะในเอื้องเงินแดงเท่านั้น ดังนั้น การปนเปื้อนจึงอาจเกิดขึ้นจากการที่ดีเอ็นเอต้นแบบของเอื้องเงินแดงไม่สะอาด หรือ สารละลายดีเอ็นเอต้นแบบมีความเข้มข้นของ EDTA ที่สูงเกินไป ซึ่ง EDTA ที่มีคุณสมบัติเป็น chelating agent สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ $MgCl_2$ ซึ่งเป็น cofactor ของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จึงมีผลทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ ผลผลิตพีซีอาร์จึงไม่เกิดขึ้น โดยกรณีแบบนี้สามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มปริมาณ $MgCl_2$ ในปฏิกิริยาให้มากขึ้น แต่ควรอยู่ในปริมาณที่เหมาะสม (Erlich, 1989)

อย่างไรก็ตาม ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากพืชต้นเดียวกัน ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์หมายเลขเดียวกัน แม้ไม่ได้เป็นการทำพีซีอาร์ครั้งเดียวกัน แต่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ปรากฏควรเกิดซ้ำได้ ดังที่เห็นจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเอื้องพวงหยก ที่ได้จากไพรเมอร์ OPF01 และ OPF13 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Anuntalabhochai *et al.* (2000) ที่ได้ทำการทดลองในลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) ซึ่งเมื่อพิจารณาการปรากฏของแถบดีเอ็นเอแต่ละตำแหน่งจาก DNA marker ที่เหมือนกัน สามารถนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำพีซีอาร์ในแต่ละครั้งมาเปรียบเทียบกันได้ แต่การปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเอื้องพวงหยก ที่ได้จากไพรเมอร์ OPF14 มีแถบดีเอ็นเอบางแถบไม่สามารถเกิดซ้ำได้ ซึ่ง Daude *et al.* (1997) กล่าวไว้ว่า คุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบมีผลอย่างมากต่อความสามารถในการเกิดซ้ำได้ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (reproducibility) จากการเปรียบเทียบตัวอย่างดีเอ็นเอของพืชต้นเดียวกัน พบว่าการสกัดดีเอ็นเอในแต่ละครั้งมีผลต่อคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยดีเอ็นเอที่มีพวกเกลือ หรือ lipopolysaccharides ปะปนอยู่ มีผลกระทบต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ทำให้ reproducibility และความถูกต้องแน่นอนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอลดลง ดังนั้น ในการสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างพืชเดียวกันจึงควรทำในสภาพที่เหมือนกันให้มากที่สุด เพื่อให้คุณภาพดีเอ็นเอมีความใกล้เคียงกัน

นอกจากนี้ พบว่า การปรากฏลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสม เอื้องคำปากไก่ × เอื้องตาเหิน ทั้ง 3 ต้น ไม่ค่อยมี polymorphism กัน เนื่องมาจากขนาดของ PCR product ไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเกิดจาก เอื้องคำปากไก่ และ เอื้องตาเหิน มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก หรือมีความแตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของยีนเพียงไม่กี่ตำแหน่ง ลูกผสมจึงได้รับลักษณะทางพันธุกรรมเหล่านั้นมาด้วย ทำให้โอกาสที่จะพบไพรเมอร์ที่แสดง polymorphism เป็นไปได้น้อยมาก จึงต้องใช้ไพรเมอร์จำนวนมาก เพื่อหาไพรเมอร์ที่สามารถให้ PCR product ที่แสดงแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphism ให้ได้มากที่สุด (พรพันธ์, 2538)

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแม่ พ่อ และลูกผสมในครั้งนี้ไม่ได้ทำควบคู่ไปกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากกล้วยไม้ลูกผสมมีการเจริญเติบโตที่ช้า และขณะนี้ลำต้นยังมีขนาดเล็กอยู่จึงต้องใช้ระยะเวลาในการศึกษาต่อไป และจากผลการศึกษาในครั้งนี้ เห็นได้ว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูกผสมส่วนใหญ่มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่สามารถบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากแม่และพ่อไปสู่ลูกผสมได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดอื่น ได้แก่ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) อาจบ่งชี้ถึงความสัมพันธ์ดังกล่าวได้ในระดับที่สูงกว่า เนื่องจาก AFLP เป็นเทคนิคที่สามารถให้ polymorphism จำนวนมาก มีความสามารถในการทำซ้ำที่สูง และให้ multiplex ratio จากจำนวนของ genetic loci ในระดับที่สูง จึงเหมาะสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่ข้อเสียของเทคนิค AFLP คือ มีขั้นตอนการทำที่ซับซ้อน ต้องอาศัยความชำนาญ และระบบการวิเคราะห์ผลต้องใช้สารเคมีที่มีราคาแพง (สมวงษ์, 2543) ส่วน RAPD มีขั้นตอนการทำที่ไม่ยุ่งยาก ได้ผลรวดเร็ว สะดวก ประหยัดเวลา และเสียค่าใช้จ่ายในการทำการทดลองน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ AFLP ดังนั้น RAPD จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในงานทางด้านจำแนกสายพันธุ์ การคัดเลือกพันธุ์ การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ ตลอดจนงานทางด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชอย่างแพร่หลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved