บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

สภาวะที่เหมาะสมในการเกิด PCR product และไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้จากการศึกษาเบื้องต้น (ไม่ได้แสดงข้อมูล) โดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอของกล้วยไม้ 4 สกุล คือ สกุลแวนด้า (*Vanda*), สกุลช้าง (*Rhynchostylis*), สกุลหวาย (*Dendrobium*) และสกุลกล้วยไม้ดิน (*Spathoglottis*) สกุลละ 1 ตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีกับไพรเมอร์ 60 ชนิด คือ OPAK01 ถึง 20, OPD01 ถึง 20 และ OPF01 ถึง 20 พบว่ามีไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างได้ 24 ชนิด คือ OPAK01, OPAK05, OPAK06, OPAK10, OPAK11, OPAK17, OPAK20, OPD05, OPD10, OPD11, OPD16, OPD17, OPD18, OPD19, OPD20, OPF03, OPF07, OPF08, OPF10, OPF11, OPF12, OPF13, OPF16 และ OPF17 จากนั้นจึงคัดเลือกสภาวะและไพรเมอร์สำหรับศึกษาแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และแถบเครื่องหมายดีเอ็นเอในกล้วยไม้สกุลช้างทั้งในกลุ่มเขาแกะ และกลุ่มช้าง

แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายในกลุ่มกล้วยไม้เขาแกะ (*Rhynchostylis coelestis* Rchbf.)

การใช้เทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกลุ่มกล้วยไม้เขาแกะและชี้บ่งแถบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะสีของดอก คือ กลุ่มกล้วยไม้เขาแกะธรรมดาที่มีลักษณะพื้นดอกสีขาวปลายกลีบ และปากมีสีม่วง และกลุ่มกล้วยไม้เขาแกะเผือกที่มีลักษณะของดอก และปากสีขาวล้วน จากการใช้ไพรเมอร์ 15 ชนิด สุ่มจับกับดีเอ็นเอต้นแบบปรากฏลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นแบบ polymorphic band ในทุกไพรเมอร์ แสดงผลด้วยเดนโดรแกรม พิจารณาไพรเมอร์ได้ 3 กลุ่ม คือ

1) กลุ่มที่แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอไม่ชัดเจน เป็นปื้นไม่สามารถแยกแถบแต่ละแถบออกจากกัน ได้แก่ ไพรเมอร์ OPD18 อาจเกิดจากการที่ไพรเมอร์มีลำดับเบสไม่เหมาะสม คือจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ไม่ดี จึงไม่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวต่อออกไปได้ หรือภายในดีเอ็นเอต้นแบบนั้นมีลำดับเบสคู่สมกับไพรเมอร์จำนวนมาก ทำให้ไพรเมอร์เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายตำแหน่ง เกิด PCR product ที่มีขนาดแตกต่างกันจำนวนมาก แต่มีปริมาณน้อย หรืออาจเนื่องจากเงื่อนไขของสภาวะการทำปฏิกิริยาไม่เหมาะสมกับไพรเมอร์ชนิดนี้จึงทำให้เกิด PCR product เป็นปื้นขึ้น (สุรินทร์, 2545ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2) กลุ่มที่แสดงฉายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ชัดเจน แต่ไม่เหมาะสมต่อการนำมาจัดกลุ่มทางพันธุกรรม ได้แก่ กลุ่มที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมมาก เป็นกลุ่มไพรเมอร์ที่เข้าไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มีความหลากหลายในจีโนมได้ polymorphic band จำนวนมาก จึงทำให้เปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันทางพันธุกรรมต่ำ แม้จะเป็นกลุ่มกล้วยไม้เขาแกะธรรมดา หรือกลุ่มกล้วยไม้เขาแกะเผือกเหมือนกัน ได้แก่ OPAK05, OPAK06, OPD19, OPD20, OPF03, OPF11 และ OPF17 ส่วน OPD17 นั้นเกิด polymorphic band เพียงเล็กน้อย อาจเนื่องจากไพรเมอร์เข้าไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่ไม่แตกต่างกันในจีโนม หรือ PCR product จากต่างบริเวณในจีโนมมีขนาดเท่ากัน กล้วยไม้ทั้ง 2 กลุ่มอาจมีลักษณะทางพันธุกรรมที่คล้ายกัน มีลักษณะการเจริญเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันมาก ยกเว้นลักษณะสีของดอกที่ปรากฏออกมาแตกต่างกัน โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตรงควัตถุ (pigment) ทำงานแตกต่างกัน ซึ่งอาจเกิดการขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้นของลำดับนิวคลีโอไทด์ ทำให้สีของดอกต่างกัน หรือโปรโมเตอร์ที่ควบคุมการทำงานของยีนต่างกัน นอกจากนั้นแล้วการใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาวน้อยเพียง 10 mers ทำให้ไม่จำเพาะเจาะจงกับลักษณะสีของดอก เนื่องจากไพรเมอร์สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายตำแหน่ง ซึ่งอาจปรับการทดลองโดยเพิ่มความยาวของไพรเมอร์ Yamagishi *et al.* (2002) ได้ศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอในลูกผสมของลิลี่ กลุ่ม Asiatic 2 พันธุ์ คือ Montreux และ Connecticut King โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาวหลากหลาย คือ 10, 12, 15 และ 20 เบส พบว่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยาอาร์เอพีดีเพิ่มขึ้นตามความยาวของไพรเมอร์ โดยการเพิ่มความยาวของไพรเมอร์ทำให้เกิด polymorphic band เพิ่มขึ้น และเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้นั้นมีความคงตัว สามารถทำซ้ำได้ และยังถ่ายทอดไปสู่ลูกผสมรุ่นที่ 1 ได้

3) กลุ่มที่แสดงฉายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ชัดเจน สามารถนำมาจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

ก. กลุ่มที่แสดงเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะสีของดอก ได้แก่ ไพรเมอร์ OPAK01, OPAK11, OPF10 และ OPF12 มีลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เป็นแถบหลักคม และเห็นได้ชัดเจน เมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ซ้ำในทุกตัวอย่าง แถบที่ได้ส่วนใหญ่ยังคงปรากฏเช่นเดิม แม้ว่าจะไม่ครบ ความไม่สม่ำเสมอนี้อาจมีผลจากความเปลี่ยนแปลงในหลอดทดลอง เช่น มีการปนเปื้อน หรือการเสื่อมสภาพขององค์ประกอบพีซีอาร์ และปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นมีความไวสูงมาก เมื่อทำซ้ำจึงไม่เหมือนเดิมทุกประการ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ปรากฏมีดังนี้

จากไพรเมอร์ OPAK01 พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ $OPAK01_{883.85\text{-}908.44}$ ประมาณ 70% เฉพาะในกลุ่มเขาแกะธรรมดา แต่ไม่พบในกลุ่มเขาแกะเผือก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากไพรเมอร์ OPAK11 พบแถบดีเอ็นเอ $OPAK11_{615\text{-}651.42}$ ที่เกิดในทุกตัวอย่าง แต่ในกล้วยไม้กลุ่มเขาแกะธรรมดามีลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ขนาดใหญ่กว่า และชัดเจนกว่าในกลุ่มเขาแกะเผือก อาจใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้

ไพรเมอร์ OPF10 พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ $OPF10_{911.68\text{-}936.08}$ ประมาณ 50% เฉพาะในกลุ่มเขาแกะธรรมดา แต่ไม่พบในกลุ่มเขาแกะเผือก

ไพรเมอร์ OPF12 พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ $OPF12_{1000\text{-}1011.22}$ ประมาณ 50% เฉพาะในกลุ่มเขาแกะเผือก แต่ไม่พบในกลุ่มเขาแกะธรรมดา

ข. กลุ่มที่ไม่แสดงเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะสีของดอก ได้แก่ ไพรเมอร์ OPD16 และ OPF16 ดังนี้

ไพรเมอร์ OPD16 สามารถแยกได้ 2 กลุ่ม ที่ความเหมือนทางพันธุกรรม 66% โดยภายในกลุ่มเขาแกะเผือกมีความเหมือนทางพันธุกรรม 80% แต่มีเขาแกะธรรมดาปนอยู่ 1 ตัวอย่าง และภายในกลุ่มเขาแกะธรรมดามีความเหมือนทางพันธุกรรม 85%

ไพรเมอร์ OPF16 ภายในกลุ่มเขาแกะเผือกมีความเหมือนทางพันธุกรรมมากกว่าภายในกลุ่มเขาแกะธรรมดา ตัวอย่างเขาแกะเผือกทั้งหมดมีความเหมือนทางพันธุกรรมที่ 78% โดยมีเขาแกะธรรมดาปนอยู่ 2 ตัวอย่าง อาจเพราะมีพันธุกรรมในส่วนที่ไพรเมอร์เข้าไปจับเหมือนกัน ส่วนภายในกลุ่มเขาแกะธรรมดามีความหลากหลายมากกว่าทางพันธุกรรมกลุ่มเขาแกะเผือก และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนในกลุ่มย่อย 67-80%

อย่างไรก็ตามไม่มีแถบดีเอ็นเอแถบใดแถบหนึ่งชัดเจนเพียงพอที่จะพัฒนานำไปใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ แม้ว่า $OPD16_{520.75\text{-}516.53}$ ปรากฏในทุกตัวอย่างของเขาแกะธรรมดา แต่แถบมีลักษณะเบาบางไม่คมชัด และ $OPF16_{502.22}$ พบเฉพาะในกลุ่มเขาแกะธรรมดาเท่านั้น แต่พบเพียง 30% ของกลุ่มตัวอย่าง จึงไม่มีความเชื่อถือเพียงพอที่จะใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ แม้จะมีแถบดีเอ็นเอที่คมชัดก็ตาม

แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายในกลุ่มกล้วยไม้ช้าง (*Rhynchostylis gigantea* Ridl.)

การใช้เทคนิคอาร์เอพีดี เพื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม และเครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะของกล้วยไม้กลุ่มช้างที่สัมพันธ์กับลักษณะสีของดอก 4 กลุ่ม คือ กลุ่มกล้วยไม้ช้างแดงมีกลีบดอกและปากมีสีแดงอมม่วง กลุ่มกล้วยไม้ช้างเผือกมีกลีบดอกและปากมีสีขาวล้วน กลุ่มกล้วยไม้ช้างกระมีกลีบดอกพื้นสีขาว มีจุดสีแดงอมม่วงค่อนข้างสม่ำเสมอกระจายทั้งดอก และกลุ่มกล้วยไม้ช้างประหลาดกลีบดอกมีจุดกระเพียงเล็กน้อยเกือบเป็นช้างเผือก หรือมีจุดกระมากมายเป็นปื้นโต ๆ จนบางต้นเกือบเป็นช้างแดง จากการใช้ไพรเมอร์ 14 ชนิด เข้าสุ่มจับกับดีเอ็นเอ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ต้นแบบของกลุ่มกล้วยไม้ช้างแดง ช้างเผือก ช้างกระ และช้างเผือก ส่วนใหญ่ปรากฏลักษณะของลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นแบบ polymorphic band แสดงผลด้วยเดนโดรแกรม พิจารณาได้ 3 กลุ่ม คือ

1) กลุ่มที่ไม่สามารถเกิด PCR product ได้แก่ ไพรเมอร์ OPAK17 อาจเกิดจากไพรเมอร์ไม่มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ หรือช่วง primer annealing ไม่เหมาะสมกับไพรเมอร์ ดีเอ็นเอไม่แยกเป็นเส้นเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ หรืออาจมีสารยับยั้งปฏิกิริยาปนเปื้อนในหลอดทดลอง ซึ่งพีซีอาร์เป็นปฏิกิริยาที่มีความไวสูงมาก ถ้าองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาไม่สะอาดเพียงเล็กน้อยก็ไม่สามารถเกิด PCR product ได้ หรือเกิดปฏิกิริยาได้ไม่เต็มที่ (สุรินทร์, 2545ข)

2) กลุ่มที่แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ชัดเจน แต่ไม่เหมาะสมต่อการนำมาจัดกลุ่มทางพันธุกรรมตามลักษณะสีของดอก ได้แก่ กลุ่มที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมมาก พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันทางพันธุกรรมต่ำ เป็นกลุ่มไพรเมอร์ที่เข้าไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มีความหลากหลายในจีโนม จึงทำให้ได้ polymorphic band จำนวนมาก แม้จะเป็นกลุ่มกล้วยไม้ช้างแดง ช้างเผือก ช้างกระ หรือช้างประหลาดเหมือนกัน ได้แก่ OPAK06 และ OPD18 ส่น OPAK01, OPAK20, OPD11, OPD20 และ OPF13 นั้นเกิด polymorphic band เพียงเล็กน้อย เนื่องจากไพรเมอร์เข้าไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่มีลำดับเบส หรือขนาดของดีเอ็นเอต้นแบบไม่แตกต่างกันในจีโนม จึงทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่ามีการกระจายตัวของแถบดีเอ็นเอที่พบในช้างประหลาดในกลุ่มตัวอย่างช้างแดงและช้างกระ เนื่องมาจากกล้วยไม้กลุ่มช้างประหลาดนั้น เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างกลุ่มช้างแดงและช้างกระ (อานนท์, 2547) เหตุผลส่วนหนึ่งของความยากในการจำแนกกลุ่มนั้นมาจากธรรมชาติของพืช โดยกล้วยไม้เป็นพืชที่มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูงมาก สามารถผสมพันธุ์กันได้ในสกุลเดียวกัน หรือข้ามสกุลก็ได้ คือ จัดเป็นพวก highly heterozygous (ณัฐา, 2545) ซึ่งต้นกล้วยไม้ที่ใช้ในการศึกษานั้นมีแหล่งที่มาต่างกัน และล้วนเป็นต้นที่เกิดจากเมล็ด ดังนั้นจึงเป็นการยากที่จะแยกกลุ่มกล้วยไม้ช้างออกจากกัน ซึ่งการสุ่มตัวอย่าง และความสม่ำเสมอของประชากรเป็นปัจจัยสำคัญในการตรวจสอบ

3) กลุ่มที่แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ชัดเจน สามารถนำมาจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ตามลักษณะสีของดอก แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

ก. กลุ่มที่แสดงเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะสีของดอก ได้แก่ ไพรเมอร์ OPAK10, OPD05, OPD10 และ OPF07 มีลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่เป็นแถบหลักคม แม้ว่าเมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ซ้ำ PCR product อาจปรากฏไม่เหมือนเดิมในทุกตัวอย่าง แต่เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พบนี้ส่วนใหญ่ยังคงปรากฏเช่นเดิม ความไม่สม่ำเสมอในการทำปฏิกิริยาอาจมีผลจากการเกิดความเปลี่ยนแปลงในหลอดทดลอง เช่น มีการปนเปื้อน หรือการเสื่อมสภาพขององค์ประกอบพีซีอาร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

และปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นมีความไวสูงมาก เมื่อทำซ้ำจึงไม่เหมือนเดิมทุกประการ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ปรากฏมีดังนี้

ไพรเมอร์ OPAK10 พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ $OPAK10_{730.61-751.76}$ ในกลุ่มช้างแดง 1 ตัวอย่าง กลุ่มช้างเผือกทุกตัวอย่าง และกลุ่มช้างประหลาด 3 ตัวอย่าง แต่ไม่พบในกลุ่มช้างกระ อาจนำมาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับตรวจสอบ หรือจำแนกช้างกระได้

ไพรเมอร์ OPD05 พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ $OPD05_{514.14-517.73}$ ในกลุ่มช้างแดง 4 ตัวอย่าง และกลุ่มช้างประหลาด 1 ตัวอย่าง แต่ไม่พบในกลุ่มช้างเผือก และช้างกระ อาจนำมาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับจำแนกช้างแดง จากช้างเผือก และช้างกระ ส่วนการพบโพลีมอร์ฟิซึมของแถบเครื่องหมายในกลุ่มช้างประหลาด อาจเนื่องจากช้างประหลาดเกิดจากช้างแดงผสมกับช้างกระรูปแบบของการมี หรือไม่มีแถบดีเอ็นเอจึงขึ้นกับพันธุกรรมที่ได้รับจากพ่อ และแม่

ไพรเมอร์ OPD10 พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ $OPD10_{1057.37-1069.23}$ ในกลุ่มช้างเผือกทุกตัวอย่าง ช้างกระ 1 ตัวอย่าง และช้างประหลาด 4 ตัวอย่าง แต่ไม่พบในกลุ่มช้างแดง อาจนำมาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับจำแนกช้างแดงออกจากช้างกระ ช้างเผือก และช้างประหลาดได้

ไพรเมอร์ OPF07 พบเครื่องหมายดีเอ็นเอ $OPF07_{784.12-809.97}$ ในกลุ่มช้างเผือก 3 ตัวอย่าง ในกลุ่มช้างกระ และกลุ่มช้างประหลาดทุกตัวอย่าง แต่ไม่พบในกลุ่มช้างแดง ซึ่งอาจนำมาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับตรวจสอบ หรือจำแนกช้างแดงจากกลุ่มอื่นได้

ข. กลุ่มที่ไม่แสดงเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะสีของดอก ได้แก่ ไพรเมอร์ OPF10 สามารถจำแนกกลุ่มตัวอย่างช้างแดงออกจากกลุ่มอื่นได้ และมีความเหมือนทางพันธุกรรมภายในกลุ่มที่ระดับ 37% ภายในกลุ่มช้างกระมีความเหมือนทางพันธุกรรมประมาณ 34% โดยมีช้างเผือกปน 1 ตัวอย่าง และสามารถแยกจากกลุ่มอื่น ๆ ได้ โดยมีความเหมือนทางพันธุกรรมกับกลุ่มตัวอย่างอื่น ๆ เพียง 8% ซึ่ง ไพรเมอร์ OPF10 ไม่เหมาะสมในการจัดกลุ่มช้างเผือก และช้างประหลาด เนื่องจากแถบดีเอ็นเอมีการกระจายตัวมาก จำแนกได้ไม่ชัดเจน

อย่างไรก็ตามแถบดีเอ็นเอที่ได้นั้นไม่ชัดเจนเพียงพอที่จะพัฒนาไปใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอจำเพาะกลุ่มได้ อาจเนื่องจากลักษณะสีของดอกนั้นมีการกระจายตัวมาก แม้แต่ในกลุ่มเดียวกันยังมีความหลากหลาย เช่น กลุ่มช้างแดง มีดอกสีแดงอมม่วงที่มีสีเข้มต่างกัน ในกลุ่มช้างกระความเข้มของจุดสีแดงอมม่วง หรือความถี่ของจุดไม่สม่ำเสมอ โดยเฉพาะในกลุ่มช้างประหลาดมีความหลากหลายของจุดสีแดงอมม่วงบนกลีบดอกมาก

จากการทดลอง พบว่าเมื่อทำซ้ำ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ศึกษาแถบหลักบางแถบนั้นปรากฏไม่เหมือนเดิม บางแถบหายไป หรือเกิดได้ไม่คมชัดเช่นเดิม แม้ว่าเทคนิคนี้จะทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลมาก แต่เมื่อนำมาทำซ้ำจะปรากฏแถบดีเอ็นเอไม่เหมือนเดิม เนื่องจาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาร์เอพีดีนั้นมีความไวมากต้องควบคุมสภาวะต่าง ๆ ให้คงที่ซึ่ง Daude *et al.* (1997) อ้างโดย ศิริลักษณ์ (2547) กล่าวไว้ว่า ในการเกิดซ้ำของลายพิมพ์ดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับคุณภาพของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยดีเอ็นเอที่มีเกลือ หรือ lipopolysaccharides ปะปนอยู่จะมีผลกระทบต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำให้ความสามารถในการเกิดซ้ำของ PCR product และความถูกต้องแน่นอนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอลดลง สุรินทร์ (2540) ยังกล่าวไว้ว่า แถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิคอาร์เอพีดีจะแสดงการข่ม (dominance) ต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์แบบ homozygous dominant และ heterozygous ได้

การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลช้างในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถจัดกลุ่มหาความสัมพันธ์ตามลักษณะฟีโนไทป์ที่สนใจได้อย่างชัดเจน และแน่นอน อาจเนื่องจากการปรากฏลักษณะสีของดอกกล้วยไม้นั้นถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนมากในลักษณะที่สัมพันธ์เชื่อมโยงกันเป็นลำดับ และเป็นที่ทราบกันดีว่ากล้วยไม้มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง เช่นเดียวกับการทดลองของสุภัทรา (2547) และศิริวรรณ (2547) ที่ยังไม่สามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของว่านสี่ทิศที่มีกลีบดอกสีต่าง ๆ ด้วยเครื่องหมายอาร์เอพีดี แต่สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทดลองต่อไปได้

ผลการทดลองได้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีศักยภาพแสดงความสัมพันธ์กับลักษณะสีของดอกกล้วยไม้กลุ่มเขาแกะ ได้แก่ $OPAK01_{883.85\text{-}908.44}$, $OPAK11_{615\text{-}651.42}$, $OPF10_{911.68\text{-}936.08}$ และ $OPF12_{1000\text{-}1011.22}$ สามารถจำแนกกลุ่มเขาแกะเผือกออกจากกลุ่มเขาแกะธรรมดาได้ และในกล้วยไม้กลุ่มช้าง ได้แก่ $OPAK10_{730.61\text{-}751.76}$ สามารถจำแนกกลุ่มช้างกระออกจากกลุ่มอื่นได้, $OPD05_{514.14\text{-}517.73}$ สามารถจำแนกช้างแดง จากช้างเผือก และช้างกระ และดูความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของช้างประหลาดที่ได้รับจากช้างแดง และช้างกระ, $OPD10_{1057.37\text{-}1069.23}$ สามารถจำแนกช้างเผือก และช้างประหลาดออกจากช้างแดงได้ และ $OPF07_{784.12\text{-}809.97}$ สามารถจำแนกช้างแดงจากกลุ่มอื่นได้ เช่นเดียวกับ Iqbal *et al.* (1995) สามารถระบุเครื่องหมายดีเอ็นเอร่วมของ rhododendron 4 ชนิดที่เหมือนกัน ได้แก่ *Rhododendron* Anna Baldsiefens, *R. arborescens, R. atlanticum* และ *R. poukhanense* คือ $OPL07_{660}$ ส่วนเครื่องหมายดีเอ็นเอ $OPL03_{900}$ เป็นเครื่องหมายจำเพาะสำหรับ *Rhododendron* Anna Baldsiefens เท่านั้น

เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้นี้ยังต้องนำไปผ่านกระบวนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ติดฉลาก และอื่น ๆ เพื่อนำไปตรวจสอบ และพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ เพื่อจดสิทธิบัตรทางการค้า หรือในงานปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้

ในการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรม และหาแถบเครื่องหมายดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มกล้วยไม้เขาแกะ และกลุ่มกล้วยไม้ช้าง อาจใช้เทคนิคอาร์เอพีดี ซึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สามารถแสดงผลได้ในระดับหนึ่ง หากต้องการบ่งชี้ในระดับที่สูงกว่านี้เพื่อให้โพลีมอร์ฟีซึมจำนวนมาก และทำซ้ำได้มาก อาจใช้เทคนิคอื่น เช่น Restriction Frangment Length Polymorphism (RFLP) หรือ Amplified Frangment Length Polymorphism (AFLP) อย่างไรก็ตามเทคนิคเหล่านี้มีความซับซ้อนยุ่งยาก ต้องใช้ความชำนาญสูง และค่าใช้จ่ายสูงกว่าเทคนิคอาร์เอพีดี ดังนั้นเทคนิคอาร์เอพีดีจึงเป็นที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบทั้งจีโนมของพืช สามารถประเมินการกระจายตัวทางพันธุกรรมของพืชที่ต้องการศึกษา และยังสามารถตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ หรือการปลอมปนพันธุ์ ตลอดจนนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากไม่มีอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องในการคัดเลือกพันธุ์พืช (พรพันธุ์, 2538)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved