

การหาความสัมพันธ์ของพืชวงศ์ขิงในสกุลกระชายและสกุลที่เกี่ยวข้อง
โดยวิธีชีววิทยาระดับโมเลกุล
Molecular Phylogenetic Studies in Zingiberaceae with Particular
Reference to *Bessenbergia* Kuntz and Related Genera

โองการ วณิช่าวะ
Ongkarn Vanijajiva

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
Master of Science Thesis in Biochemistry
Prince of Songkla University
2545

210212 8.11.
ร. กอ. 2546
โกมล 210212

P59

K4 8.11. 2546



โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
c/o ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

การหาความสัมพันธ์ของพืชวงศ์ขิงในสกุลกระชายและสกุลที่เกี่ยวข้อง
โดยวิธีชีววิทยาระดับโมเลกุล

Molecular Phylogenetic Studies in Zingiberaceae with Particular
Reference to *Boesenbergia* Kuntz and Related Genera

โองการ วณิชาชีวะ

Ongkarn Vanijajiva

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biochemistry

Prince of Songkla University

2545

ชื่อวิทยานิพนธ์	การหาความสัมพันธ์ของพืชวงศ์ขิงในสกุลกระชายและสกุลที่เกี่ยวข้องโดยวิธีชีววิทยาระดับโมเลกุล
ผู้เขียน	นายโองการ วณิชชีวะ
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2544

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้หาความสัมพันธ์ของพืชวงศ์ขิง 19 ชนิด จากพืชสกุลกระชาย 11 ชนิด (*Boesenbergia*) สกุลเปราะ 6 ชนิด (*Kaempferia*) และสกุล *Scaphochlamys* 2 ชนิด โดยวิเคราะห์จากรูปแบบของไอโซไซม์ และลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี random amplified polymorphic DNA (RAPD) จากใบของพืชตัวอย่างร่วมกับการศึกษาจากลักษณะสัณฐานภายนอก การศึกษารูปแบบเอนไซม์ 9 ชนิดได้แก่ เฮอร์ออกซิเดส, ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส, กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนส, มาเลทดีไฮโดรจีเนส, ซิซิเมทดีไฮโดรจีเนส, เบต้า-เอสเทอเรส, อัลฟา-เอสเทอเรส, เอซิดฟอสฟาเทส และ อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส พบว่าเอนไซม์สี่ชนิดแรกให้รูปแบบของไอโซไซม์ที่หลากหลายสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายยืนยันการจำแนกชนิดของพืชในสกุลกระชายและสกุลใกล้เคียงได้ รูปแบบของแถบที่ได้จากเอนไซม์เหล่านี้มี 20 ตำแหน่ง การศึกษาระดับดีเอ็นเอตรวจสอบจากรูปแบบที่หลากหลายของลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD พบว่าจากการทดลองใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มที่มีดีเอ็นเอขนาด 10 เบสจำนวน 10 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 5 ชนิด (OPAM-01, OPAM-03, OPAM-12, OPB-14 และ OPZ-03) ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หลากหลาย ได้รูปแบบของแถบทั้งหมด 53 แถบ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ และลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถช่วยยืนยันการจำแนกชนิดของพืชได้ และเมื่อนำข้อมูลทั้งสองไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยใช้สัมประสิทธิ์ของ Dice เปรียบเทียบกันในแต่ละชนิด และแต่ละกลุ่ม จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาความสัมพันธ์ในรูปสายสัมพันธ์โดยวิธี UPGMA ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ พบว่าพืชในสกุลกระชายมีความใกล้ชิดกับพืชในสกุล *Scaphochlamys* มากกว่าสกุลเปราะ สอดคล้องกับการวิเคราะห์ในรูปกลุ่มของความสัมพันธ์โดยวิธี PCA

Thesis Title Molecular phylogenetic studies in Zingiberaceae with particular
reference to *Boesenbergia* Kuntz and related genera

Author Mr. Ongkarn Vanijajiva

Major Program Biochemistry

Academic year 2001

Abstract

The relationships among 19 accessions of Zingiberaceae belonging to 11 species of *Boesenbergia*, six species of *Kaempferia* and two species of *Scaphochlamys* were studied using isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles from leaf tissue samples in addition to the morphological classification. Initially, isozyme electrophoresis was used. Nine enzyme systems used were peroxidase, superoxide dismutase, glutamate dehydrogenase, malate dehydrogenase, shikimate dehydrogenase, β -esterase, α -esterase, acid phosphatase and alkaline phosphatase. The first four were found to be useful as molecular markers for characterization of *Boesenbergia* and related species. These enzymes were encoded by 20 loci. Further investigation by RAPD to determine DNA polymorphism was carried out using ten random decamer arbitrary primers. Amplification occurred in five out of ten tested primers (OPAM-01, OPAM-03, OPAM-12, OPB-14, OPZ-03). A total of 53 amplified bands were observed. Data obtained from the isozyme patterns and RAPD fingerprintings from the samples verified some doubts in morphological classification. The data were then analyzed for the Dice similarity coefficient for pairwise comparison between individual samples and the distance matrix. The dendrograms resulting from cluster analysis and UPGMA shows a higher degree of relationship between *Boesenbergia* and *Scaphochlamys* than between *Boesenbergia* and *Kaempferia*. These findings were supported by a principal component analysis (PCA).

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วัลลีย์ สุวจิตตานนท์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ สนับสนุนให้กำลังใจในการค้นคว้าวิจัย เป็นแบบอย่างที่ดีแก่ผู้วิจัยโดยตลอดรวมทั้งการเขียนวิทยานิพนธ์ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จโดยสมบูรณ์เป็นอย่างดี และขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ พวงเพ็ญ ศิริรักษ์ กรรมการที่ปรึกษาร่วมในการตรวจสอบความถูกต้องของพรรณไม้ ปลุกฝังให้ผู้วิจัยมีความรักในการทำงานทำให้งานลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมทั้งการให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. รพีพร โสคติพันธ์ กรรมการผู้แทนภาควิชาชีพเคมีและรองศาสตราจารย์ ดร. สมปอง เตชะโต กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะและคำแนะนำทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นงพร ไตว์ฉนะ และรองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธ์ ที่ให้โอกาสเข้ามาศึกษาในภาควิชานี้ รวมทั้งรองศาสตราจารย์ ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์ สำหรับคำปรึกษาตลอดจนคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในทุกด้านเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทยรหัสโครงการ BRT 543014 (TRF/BIOTEC Special Program for Research and Training grant, BRT, 543014) รวมทั้งบัณฑิตวิทยาลัยที่สนับสนุนทุนวิจัยโครงการวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดีไปตามวัตถุประสงค์

ขอขอบคุณสมาชิกห้อง PR. 422 ทุกท่าน รวมทั้งคุณจรัญ มากน้อย, ดร.ฉัตรชัย งามเรียบสกุล, คุณธีรทัศน์ สุดสาย คุณอุษาวดี เดชะ, คุณวีรพันธ์ รอดอินทร์รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ภาคชีวเคมีและชีววิทยาทุกท่าน ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งทุกความช่วยเหลือ

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องที่น่ารักทั้งสองในการเป็นกำลังใจอันสำคัญอย่างยิ่งในการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

โอองการ วณิชชาชีวะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(1)
Abstract.....	(2)
กิตติกรรมประกาศ.....	(3)
สารบัญ.....	(4)
รายการตาราง.....	(5)
รายการรูป.....	(6)
ตัวย่อและสัญลักษณ์.....	(9)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง.....	1
บทตรวจเอกสาร.....	3
วัตถุประสงค์.....	38
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	39
วัสดุ.....	39
อุปกรณ์.....	44
วิธีการ.....	45
3. ผลการทดลอง	56
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	90
5. สรุปผลการทดลอง	96
เอกสารอ้างอิง.....	98
ประวัติผู้เขียน.....	119

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. เปรียบเทียบการตรวจสอบระดับโปรตีน.....	18
2. การเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....	32
3. ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา.....	39
4. สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade).....	42
5. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาอณูชีววิทยา (molecular biology grade).....	43
6. ส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียม โพลีอะครีลาไมด์เจล.....	47
7. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา.....	53
8. สารผสมในปฏิกิริยา PCR.....	54
9. ลักษณะสัณฐานภายนอกที่ใช้วิเคราะห์.....	56
10. เมทริกซ์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของพืชและลักษณะ สัณฐานภายนอกที่ใช้พิจารณา.....	57
11. ความถี่ของตำแหน่งที่พบไอโซไซม์.....	68
12. Similarity index ของพืชตัวอย่าง 19 ชนิด จาก Dice index โดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์.....	71
13. การวิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPAM-01.....	78
14. การวิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPAM-03.....	80
15. การวิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPAM-12.....	82
16. การวิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPB-14.....	84
17. การวิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPZ-03.....	86
18. Similarity index ของพืชตัวอย่าง 19 ชนิด จาก Dice index โดยใช้ แบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....	88

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1. แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยรวมในพืชวงศ์ขิงกับพืชในกลุ่มอื่น.....	5
2. การกระจายตัวของพืชวงศ์ขิง.....	6
3. ลักษณะดอกของเผ่า Alpinieae.....	6
4. ลักษณะดอกของเผ่า Globbeae.....	6
5. ลักษณะดอกของเผ่า Zingibereae.....	7
6. ลักษณะดอกของเผ่า Hedychieae.....	7
7. <i>Boesenbergia basispicata</i> (B1).....	15
8. <i>Boesenbergia longipes</i> (B4).....	15
9. <i>Boesenbergia curtisii</i> กาบใบดำ (B2).....	15
10. <i>Boesenbergia curtisii</i> กาบใบขาว (B3).....	15
11. <i>Boesenbergia plicata</i> ดอกแดง (B5).....	15
12. <i>Boesenbergia plicata</i> ดอกเหลือง (B6).....	15
13. <i>Boesenbergia prainiana</i> (B7).....	16
14. <i>Boesenbergia pulcherrima</i> (B8).....	16
15. <i>Boesenbergia tenuispicata</i> (B9).....	16
16. <i>Boesenbergia rotunda</i> (B10).....	16
17. <i>Boesenbergia</i> aff. <i>rotunda</i> (B11).....	16
18. <i>Kaempferia angustifolia</i> (K1).....	17
19. <i>Kaempferia elegans</i> (K2).....	17
20. <i>Kaempferia galanga</i> (K3).....	17
21. <i>Kaempferia pulchra</i> (K4).....	17
22. <i>Kaempferia siamensis</i> (K5).....	17
23. <i>Kaempferia roscoeana</i> (K6).....	17

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
24. <i>Scaphochlamys biloba</i> (S1).....	17
25 <i>Scaphochlamys perakensis</i> (S2).....	17
26. การทำ Southern blotting.....	29
27. เทคนิคการทำ PCR-RFLP.....	29
28. เทคนิคการทำ AFLP.....	30
29. เทคนิคการทำ SSRs.....	30
30. แหล่งที่ทำการเก็บตัวอย่างบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย.....	40
31. ความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่างที่ใช้ศึกษาโดยอาศัยลักษณะ ลักษณะภายนอกภายนอก.....	59
32. รูปแบบของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส.....	62
33. รูปแบบของไอโซไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส.....	64
34. รูปแบบของไอโซไซม์กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส.....	65
35. รูปแบบของไอโซไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส.....	66
36. ความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่างที่ใช้ศึกษาโดยอาศัยรูปแบบไอโซไซม์.....	72
37 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ (template) ปริมาณต่างกันแล้วแยกดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส 1.8 % อะกาโรสเจล ใช้ไพรเมอร์ ชนิด OPAM-12 ดีเอ็นเอแม่แบบชนิด B10.....	74
38. แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเมื่อทดสอบด้วย MgCl ₂ ที่ความเข้มข้น ต่างกันแล้วแยกดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส 1.8 % อะกาโรสเจล ใช้ไพรเมอร์ ชนิด OPAM-12 ดีเอ็นเอแม่แบบชนิด B10.....	75
39. รูปแบบของ RAPD ของพืชที่ใช้ในการศึกษาจากไพรเมอร์ ชนิด OPAM-01 ที่แยกโดยอิเล็กโตรโฟเรซิสด้วย 1.8 % อะกาโรสเจล.....	77
40. รูปแบบของ RAPD ของพืชที่ใช้ในการศึกษาจากไพรเมอร์ ชนิด OPAM-03 ที่แยกโดยอิเล็กโตรโฟเรซิสด้วย 1.8 % อะกาโรสเจล.....	79

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
41. รูปแบบของ RAPD ของพืชที่ใช้ในการศึกษาจากไพรมเมอร์ ชนิด OPAM-12 ที่แยกโดยอิเล็กโตรโฟเรซิสด้วย 1.8 % อะกาโรสเจล.....	81
42. รูปแบบของ RAPD ของพืชที่ใช้ในการศึกษาจากไพรมเมอร์ ชนิด OPB-14 ที่แยกโดยอิเล็กโตรโฟเรซิสด้วย 1.8 % อะกาโรสเจล.....	83
43. รูปแบบของ RAPD ของพืชที่ใช้ในการศึกษาจากไพรมเมอร์ ชนิด OPZ-03 ที่แยกโดยอิเล็กโตรโฟเรซิสด้วย 1.8 % อะกาโรสเจล.....	85
44. ความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่างที่ใช้ศึกษาโดยอาศัยรูปแบบ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิค RAPD.....	89

ตัวย่อและสัญลักษณ์

ตัวย่อสำหรับพืชที่ใช้

B1	=	<i>Boesenbergia basispicata</i>
B2	=	<i>Boesenbergia curtisii</i> กาบใบดำ
B3	=	<i>Boesenbergia curtisii</i> กาบใบขาว
B4	=	<i>Boesenbergia longipes</i>
B5	=	<i>Boesenbergia plicata</i> ดอกแดง
B6	=	<i>Boesenbergia plicata</i> ดอกเหลือง
B7	=	<i>Boesenbergia prainiana</i>
B8	=	<i>Boesenbergia pulcherrima</i>
B9	=	<i>Boesenbergia tenuispicata</i>
B10	=	<i>Boesenbergia rotunda</i>
B11	=	<i>Boesenbergia</i> aff. <i>rotunda</i>
K1	=	<i>Kaempferia angustifolia</i>
K2	=	<i>Kaempferia elegans</i>
K3	=	<i>Kaempferia galanga</i>
K4	=	<i>Kaempferia pulchra</i>
K5	=	<i>Kaempferia siamensis</i>
K6	=	<i>Kaempferia roscoeana</i>
S1	=	<i>Scaphochlamys biloba</i>
S2	=	<i>Scaphochlamys perakensis</i>

ตัวย่อและสัญลักษณ์(ต่อ)

ตัวย่อสำหรับเอนไซม์

ACP	=	acid phosphatase
ALP	=	alkaline phosphatase
β -EST	=	β -esterase
α -EST	=	α -esterase
GDH	=	glutamate dehydrogenase
MDH	=	malate dehydrogenase
POX	=	peroxidase
SKD	=	shikimic dehydrogenase
SOD	=	superoxide dismutase

ตัวย่ออื่นๆ

A_{260}	=	absorption at 260 nm
A_{280}	=	absorption at 280 nm
AFLP	=	amplified fragment length polymorphism
bp	=	base pair
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	deoxyribonucleotide triphosphate
CTAB	=	cetyltrimethyl ammonium bromide
EDTA	=	ethylenediaminetetracetate
g	=	acceleration (cm/sec^2)
Kb	=	kilo base pair
MgCl_2	=	magnesium chloride
mM	=	millimolar
mg	=	milligram
ml	=	millilitre

ตัวย่อและสัญลักษณ์(ต่อ)

ng	=	nanogram
O.D.	=	optical density
°C	=	degree Celcius
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
PCA	=	principle component analysis
PCR	=	polymerase chain reaction
pH	=	-log hydrogen ion concentration
RAPD	=	random amplified polymorphic DNA
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
R _r	=	relative mobility
RNase	=	ribonuclease
rpm	=	revolutions per minute
SI	=	similarity index
SPSS	=	statistic package for the social science
SSRs	=	simple sequence repeats
UPGMA	=	unweighted pair-group method arithmetic average
UV	=	ultraviolet
μg	=	microgram
μl	=	microlitre
μM	=	micromolar
%	=	percent

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

พืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) อาจกล่าวได้ว่าเป็นพืชกลุ่มหนึ่งในประเทศไทยที่มีข้อมูลด้านความหลากหลายและการศึกษาด้านความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการน้อยมาก โดยเฉพาะในกลุ่มของสกุลกระชาย (*Boesenbergia*) สกุลเปราะ (*Kaempferia*) และสกุล *Scaphochlamys* นอกจากนี้มีความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมอย่างมากแล้ว ยังพบว่าหลายชนิดเป็นพืชเฉพาะถิ่นที่มีแหล่งกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะในภาคใต้ของประเทศไทย (Larsen *et al.*, 1999) พืชในกลุ่มดังกล่าวจัดว่ามีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกันมาก (Holttum, 1950) เป็นไปได้ว่าพืชในสกุลกระชายมีความใกล้ชิดกับพืชในสกุล *Scaphochlamys* มากกว่าสกุลเปราะ (Hussin *et al.*, 2001) แต่ยังไม่สามารถตรวจสอบความสัมพันธ์ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากสาเหตุหลายประการ กล่าวคือลักษณะของดอกที่คล้ายคลึงกันมากนั้นบอบบาง และเหี่ยวเฉาเร็วรวมทั้งมีการพักตัวในบางฤดู ทำให้ออกจากตรวจสอบได้ยากแล้วอาจต้องใช้ระยะเวลาในการติดตามตรวจสอบ พืชในกลุ่มนี้มีประโยชน์อย่างมาก ทั้งการนำมาใช้ประกอบอาหารและประโยชน์ทางการแพทย์ด้านเภสัชกรรมในการพัฒนาเป็นยา (Tuchinda *et al.*, 2002) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอย่างยิ่งที่ต้องจำแนกและยืนยันพืชในกลุ่มนี้ให้ถูกต้องเพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุด

การจำแนกและหาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในพืช อาจเปรียบเทียบจากความแตกต่างทางด้านรูปพรรณสัณฐานภายนอก (morphological markers) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันมานานและยังคงใช้ได้ผลดีในปัจจุบัน แต่อาจใช้เวลานานและบางครั้งก็เกิดความผิดพลาดได้ในบางกรณี จำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญเท่านั้นจึงจะแยกความแตกต่างได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอย่างยิ่งที่ควรนำวิธีการอื่นๆเข้ามาช่วยในการตรวจสอบเพื่อให้ได้ ข้อมูลใหม่ๆ ที่จะนำไปพัฒนาทฤษฎี และข้อมูลที่มีอยู่เกี่ยวกับการจำแนก และจัดระบบของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งรูปแบบของความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Stearns, 1992)

เครื่องหมายทางโมเลกุลเป็นเครื่องมือที่ช่วยในการจำแนกและตรวจสอบสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่ดี (Karp *et al.*, 1998) โดยวิเคราะห์แบบแผนของไอโซไซม์ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบในระดับโปรตีน เนื่องจากรูปแบบของข้อมูลที่ได้มีความหลากหลาย สามารถใช้ในการยืนยันการจำแนกและตรวจสอบหาความสัมพันธ์ทั้งในระดับประชากรและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดรวมทั้งในพืช (Van de Bank *et al.*, 2001) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของพืชวงศ์ขิง (Suvachittanont, 1991; Paisooksantivatana *et al.*, 2001) การศึกษาระดับดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค RAPD (random amplified polymorphic DNA) พบว่ารูปแบบของข้อมูลที่ได้มีความหลากหลายในพืชหลายชนิด (Ranade *et al.*, 2001) และในกลุ่มของพืชวงศ์ขิงบางชนิด (Dasuki *et al.*, 2000) ข้อมูลดังกล่าวมีข้อได้เปรียบกว่าการศึกษาด้วยวิธีการอื่นๆในระดับเดียวกัน เช่น เทคนิค RFLP (restriction fragment length polymorphism), AFLP (amplified fragment length polymorphism) และ SSRs (simple sequence repeats) (Sunnucks, 2000)

การวิเคราะห์รูปแบบของข้อมูลที่ได้ทั้งในระดับโปรตีนและระดับดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม SPSS (statistical package for the social science) ซึ่งเป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป สามารถนำมาใช้วิเคราะห์หารูปแบบความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตได้ (Backjau *et al.*, 1996) ทั้งในรูปของสายสัมพันธ์ (dendrogram) (Apavatjirut *et al.*, 1999 ; Skoula *et al.*, 1999) และกลุ่มของความสัมพันธ์ (Principal component) (Garkava *et al.*, 2000) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการช่วยยืนยันการจำแนกชนิดของพืชในกลุ่มสกุลกระชาย สกุลเปราะ และสกุล *Scaphochlamys* พร้อมทั้งเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชในกลุ่มนี้ด้วย

บทตรวจเอกสาร

1.1 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืช

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต มีการศึกษามากกว่าศตวรรษแล้ว โดยหลังจาก Darwin ค้นพบทฤษฎีของวิวัฒนาการ “Theory of evolution” ในปี ค.ศ. 1859 และพัฒนาเป็น Neo-Darwinian synthesis ในปี ค.ศ. 1930 ทำให้การศึกษารวมสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในแง่วิวัฒนาการนั้นมีการศึกษากันอย่างจริงจังมากยิ่งขึ้น (Briggs and Walters, 1997) ระยะเวลาการตรวจสอบอาศัยลักษณะลักษณะพื้นฐานภายนอกเพียงอย่างเดียว และเน้นการศึกษาในสัตว์มากกว่าในพืชเนื่องจากมีหลักฐานที่สำคัญในการเปลี่ยนแปลง ช่วงเวลาที่เรียกว่า ฟอสซิล มากกว่าในพืช Avery และคณะ (1944) พบสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นคือดีเอ็นเอ จากนั้น Watson และ Crick (1953) ค้นพบโครงสร้างของดีเอ็นเอที่เป็นกุญแจสำคัญในการส่งผ่านรหัสทางพันธุกรรมจากรุ่นหนึ่งไปยังรุ่นถัดไป ขณะเดียวกัน Smithies (1955) ค้นพบเทคนิคอิเล็กโตรโฟเรซิสซึ่งสามารถตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในระดับโปรตีนได้กระทั่ง Hennig (1966) เสนอทฤษฎี Hennigial Principal ที่แสดงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในรูปของ Phylogenetic tree หรือ Evolutionary tree ทำให้ง่ายต่อการศึกษารวมสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในเชิงวิวัฒนาการมากยิ่งขึ้น ทำให้วิธีการตรวจสอบในระดับโปรตีน และดีเอ็นเอเข้ามามีบทบาทในการศึกษาในความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตมากขึ้น (Avice, 1994)

ช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาการศึกษาหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยเฉพาะในพืชซึ่งแสดงในรูปแบบของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้นเป็นที่สนใจ และได้รับการตรวจสอบอย่างจริงจังมากยิ่งขึ้น โดยอาศัยข้อมูลจากลักษณะลักษณะพื้นฐานภายนอกทั้งทางสัณฐานวิทยา ทางกายวิภาค ควบคู่ไปกับการตรวจสอบระดับเซลล์ และ เครื่องหมายในระดับพันธุกรรม หรือเครื่องหมายในระดับโมเลกุล ซึ่งประกอบด้วยเครื่องหมายในระดับโปรตีน และระดับดีเอ็นเอ (Judd *et al.*, 1999) ปัจจุบันพบว่าเครื่องหมายในระดับโมเลกุลเหล่านี้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในการจัดสิ่งมีชีวิต สามารถนำมาหาความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของพืชได้มากยิ่งขึ้น (Sunnucks, 2000)

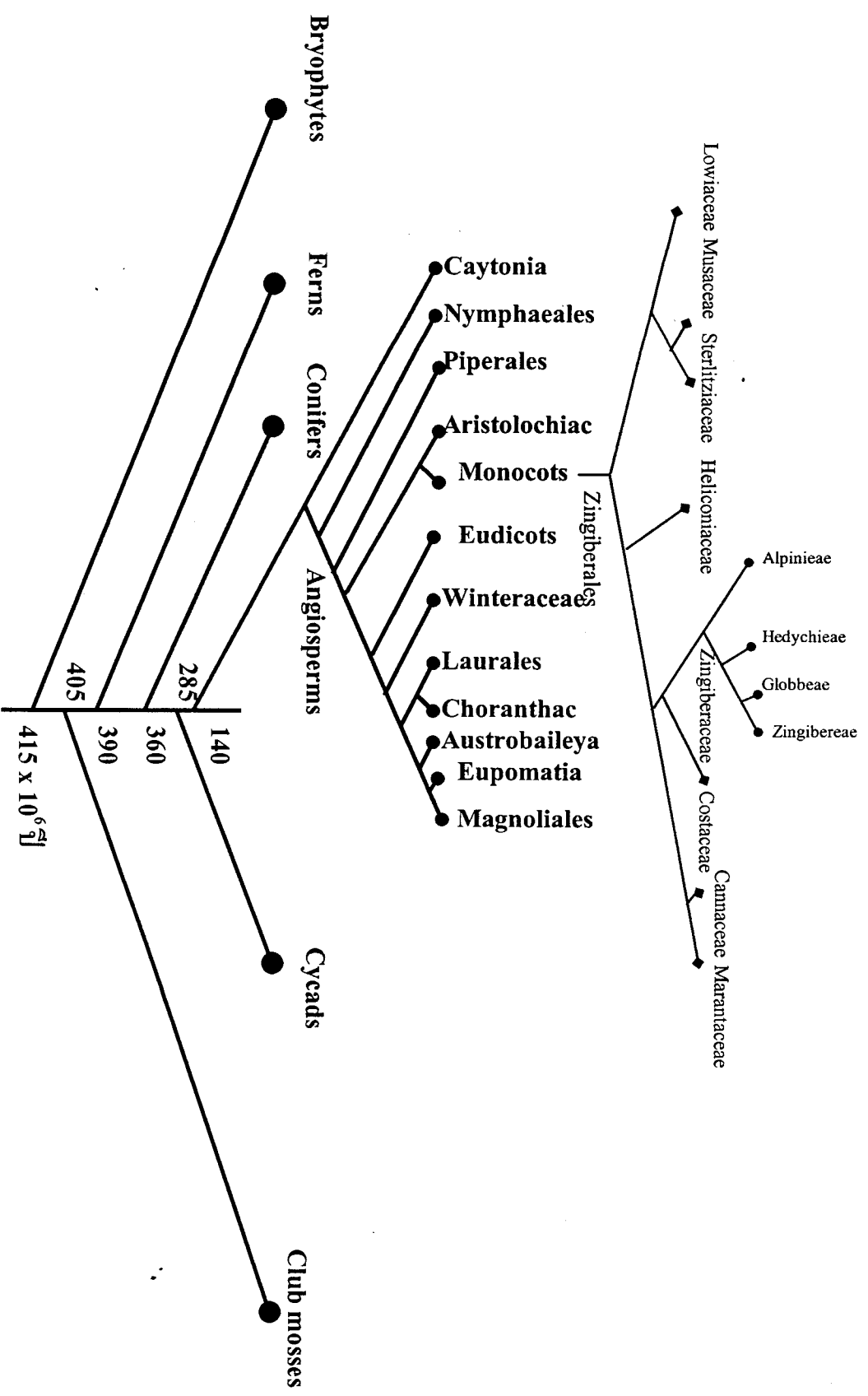
1.2 พืชวงศ์ขิง

1.2.1 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชวงศ์ขิง

พืชวงศ์ขิง (Zingiberaceae) จัดอยู่ในลำดับ (order) Zingiberales เป็นพืชอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความน่าสนใจอย่างยิ่งในเชิงวิวัฒนาการเนื่องจากเป็นพืชที่มีวิวัฒนาการสูงวงศ์หนึ่งในกลุ่มของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวซึ่งจัดว่ามีวิวัฒนาการสูงในกลุ่มของพืชดอก (Larsen *et al.*, 1998; Doyle, 1998) การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชวงศ์นี้กับพืชในวงศ์ใกล้เคียงยังมีน้อยมาก Dahlgren และ Rasmussen (1983) อาศัยลักษณะสัณฐานภายนอกจัดความสัมพันธ์ของพืชในวงศ์ขิงกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในวงศ์อื่นๆ พบว่ามีพืชวงศ์ขิงมีความใกล้ชิดกับพืชในวงศ์เอื้องหมายนา (Costaceae) มากที่สุด ต่อมา Kress (1990, 1996) ใช้ลักษณะสัณฐานภายนอกควบคุมไปกับข้อมูลในระดับโมเลกุลเพื่อจัดความสัมพันธ์ทั้งในระดับเผ่าของพืชวงศ์ขิงเองกับวงศ์ใกล้เคียง Specht และคณะ (2001) ทำการศึกษาในระดับโมเลกุลของพืชวงศ์เอื้องหมายนา พบว่าพืชวงศ์ขิงมีบรรพบุรุษร่วมพืชวงศ์เอื้องหมายนามากกว่าวงศ์อื่นๆ ในลำดับเดียวกัน ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยรวมของพืชในวงศ์ขิงกับพืชในกลุ่มอื่นแสดงไว้ดังรูปที่ 1

1.2.2 ลักษณะโดยทั่วไป

พืชวงศ์ขิงเป็นพืชล้มลุกที่มีอายุอยู่ได้หลายปี มีลำต้นใต้ดินแบบเหง้าส่วนลำต้นเหนือดินเป็นลำต้นเทียมที่เกิดจากกาบใบโอบซ้อนทับกัน ออกดอกเป็นช่อ โครงสร้างดอกประกอบด้วยกลีบเลี้ยงขนาดเล็กไม่สะดุดตา หลอมเป็นหลอด ตรงปลายแยกเป็น 2 หรือ 3 แฉก กลีบดอกหลอมเป็นหลอดเช่นเดียวกันตรงปลายแยกเป็น 3 แฉก มักเป็นกลีบเรียวยาว เกสรตัวผู้ที่ทำหน้าที่มีเพียงหนึ่งอัน เปลี่ยนรูปร่างไปคล้ายกลีบดอก เรียกว่า lateral staminodes จำนวน 2 กลีบ หรืออาจลดรูปหายไป และเปลี่ยนไปเป็นกลีบปาก (lip) มีลักษณะคล้ายกลีบดอกอีกหนึ่งกลีบ รังไข่มี 3 ห้อง หรือห้องเดียวมีต่อมน้ำหวานเกิดขึ้นเหนือรังไข่ มีเซลล์ที่มีน้ำมันหอมระเหยอยู่ทั่วไปในทุกส่วนของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเหง้าจึงทำให้พืชวงศ์ขิงมีกลิ่นเฉพาะอันเป็นลักษณะเด่นที่สามารถชี้ว่าเป็นพืชวงศ์นี้ได้โดยทันที (พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2544)



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยรวมของพืชในวงศ์ขิงข่าในกลุ่มอื่น (ตัดแปลงจาก Judd et al., 1999)

1.2.3 แหล่งที่พบและการกระจายตัว

พืชวงศ์ขิงประกอบด้วย 52 สกุล 1,500 ชนิด พบในเขตร้อน โดยเฉพาะเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบประมาณ 52 สกุล 1,400 ชนิด (Prakash and Mehrotra, 1996) มีการกระจายตัว ดังรูปที่ 2 พืชวงศ์นี้ในประเทศไทยพบ 27 สกุล 250 ชนิด (Larsen, 1999) ภาคใต้พบประมาณ 11 สกุล 44 ชนิด (พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2532)



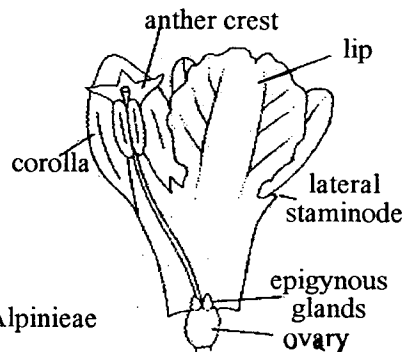
รูปที่ 2 การกระจายตัวของพืชวงศ์ขิง (Walter, 1954)

1.2.4 การจัดกลุ่มของพืชวงศ์ขิง

พืชวงศ์ขิงสามารถจำแนกแบ่งออกได้เป็น 4 เผ่า (Smith, 1981) ลักษณะของดอกแตกต่างกันตามรูปที่ 3-6 (ดัดแปลงจาก Larsen *et al.*, 1999) ดังนี้

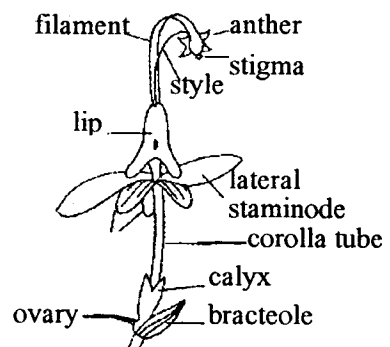
1.2.4.1 เผ่า *Alpinieae* การเรียงตัวของใบอยู่ในแนวตั้งฉากกับเหง้า lateral staminodes มีขนาดเล็กมาก หรืออาจหายไป รังไข่มี 3 ห้อง ไข่ติดกับแกนกลางรังไข่มีลักษณะดอกดังรูปที่ 3

รูปที่ 3 ลักษณะดอกของเผ่า *Alpinieae*

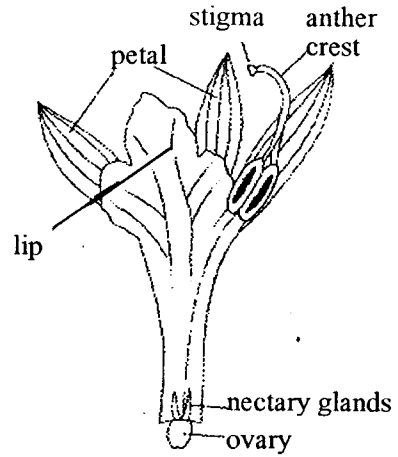


1.2.4.2. เผ่า *Globbeae* การเรียงตัวของใบยังไม่ชัดเจนว่าขนานหรือตั้งฉากกับเหง้า lateral staminodes เป็นแผ่น มีรูปร่างคล้ายกลีบดอก และไม่เชื่อมติดกับกลีบปาก ก้านเกสรตัวผู้ยาวและโค้งคล้ายคันธนู รังไข่มี 1 ห้อง ไข่ติดกับผนังรังไข่ ลักษณะดอกดังรูปที่ 4

รูปที่ 4 ลักษณะดอกของเผ่า *Globbeae*

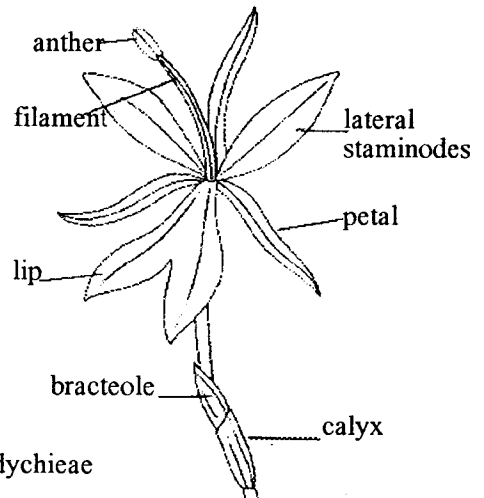


1.2.4.3. เผ่า Zingibereae ระนาบใบขนานกับแฉ่งใต้ดิน lateral staminodes มีรูปร่างคล้ายกลีบดอก และเชื่อมติดกับกลีบปากลักษณะเด่นของพืชเผ่านี้คือ รยางค์ (anther-crest) จะยืดยาวเหนืออับเรณู โคนเป็นจะงอย และโอบหุ้มก้านเกสรตัวเมียไว้ด้วย รังไข่มี 3 ห้อง ไข่ติดกับแกนกลางของรังไข่ ลักษณะดอกดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 ลักษณะดอกของเผ่า Zingibereae

1.2.4.4. เผ่า Hedychieae การเรียงตัวของใบอยู่ในแนวขนานกับเหง้า lateral staminodes มีรูปร่างคล้ายกลีบดอกไม่เชื่อมติดกับกลีบปาก รังไข่มี 3 ห้องโดยไข่ติดอยู่ที่แกนกลางของรังไข่ หรือมีห้องเดียวโดยไข่ติดอยู่ที่ตรงกลางหรือแกนกลางของรังไข่ ลักษณะดอกดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 ลักษณะดอกของเผ่า Hedychieae

1.3 ลักษณะของพืชที่ใช้ในการศึกษา

1.3.1 ลักษณะโดยทั่วไป

พืชที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ เป็นพืชในสกุลกระชาย สกุลเปราะ และสกุล *Scaphochlamys* ที่อยู่ในเผ่า Hedychieae มีลำต้นและเหง้าขนาดเล็ก จำนวนใบต่อดันไม่มากนักมีลักษณะแตกต่างกัน เช่น เหง้าใต้ดินในสกุลกระชายและสกุลเปราะจะอวบส่วนปลายมักพองออกเป็นหัว ส่วนสกุล *Scaphochlamys* ผอมยาวและเลื้อย ลักษณะของพืชในสกุลกระชายดอกจะแก่ หรือบานจากปลายช่อดอก กลีบปากไม่หยักเป็นพู หรือหยักเล็กน้อย ส่วนสกุลเปราะและ *Scaphochlamys* ดอกจะแก่หรือบานจากส่วนล่างของช่อดอก แผ่นกลีบมักแยกเป็นสองพู (พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2532) และเยื่อเหนืออับเรณูซึ่ง

ต้นตั้งแต่ หนึ่งใบหรือมากกว่าเล็กน้อยและพบในแหล่งที่คล้ายคลึงกัน เหตุที่ทำให้การจำแนกยากประการที่สองคือดอกซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการตรวจสอบจำแนกชนิดทางพฤกษศาสตร์มีลักษณะบอบบาง เชี่ยวเฉาได้ง่ายและเร็วมาก พบว่าในบางฤดูพืชในกลุ่มนี้จะมีการพักตัวโดยทิ้งใบเหลือไว้แต่เหง้าใต้ดินเท่านั้น นอกจากจะทำให้ยากต่อการตรวจสอบลักษณะทางพฤกษศาสตร์แล้วอาจต้องใช้ระยะเวลาในการติดตาม โดยต้องคอยให้ถึงอีกฤดูกาลถัดไป (พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2532) ประการที่สามพืชในกลุ่มนี้มีความแปรผันทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เช่น สีของใบและกาบใบที่มักจะพบตั้งแต่สีเขียวอ่อนจนถึงม่วงเข้มออกดำและลายบนใบที่แตกต่างกันแม้จะเป็นพืชชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าดอกมีรูปแบบของสีและการกระจายตัวของสีบนปากใบและสีของดอกต่างกัน เป็นต้น (Larsen *et al.*, 1999) แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของจำนวนโครโมโซม เช่น *Boesenbergia plicata* ที่มีทั้งดอกแดงและเหลืองพบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากันคือ $2n = 20$ และใน *B. curtisii* ที่มีกาบใบสีดำและสีขาวพบว่ามีโครโมโซม $2n = 24$ (Eksomtramage *et al.*, 1996) ดังนั้นการจำแนกพืชในกลุ่มนี้จึงนับว่ามีปัญหาอย่างมาก

1.3.5 การจำแนกทางพฤกษศาสตร์ของพืชที่ทำการศึกษา

การทดลองครั้งนี้ศึกษาในสกุลกระชาย 9 ชนิด 11 ลักษณะ สกุลเปราะ 6 ชนิด สกุล *Scaphochlamys* 2 ชนิด โดยมีลักษณะเด่นทางพฤกษศาสตร์ดังนี้

1.3.5.1 *Boesenbergia basispicata* Larsen ex Sirirugsa

(กระชายเขาหลวง) (B1)

ลักษณะโดยทั่วไป ลำต้นเหนือดิน สูงประมาณ 40-60 ซม.

ใบ มีประมาณ 3-6 ช่อดอก เกิดจากเหง้าใต้ดิน ไม่มีกาบใบหุ้ม เป็นรูปกรวย ช่อดอกหนึ่งๆมีดอกประมาณ 12 ดอก. ลักษณะดอกแสดงในรูปที่ 7 lateral staminodes สีขาวรูปหอก หรือรูปไข่ปลายมนหรือแยกเป็น 2 พูกลีบปาก ค่อนข้างกลม พองออกเป็นกระพู่ ปลายหยักแบบฟันเลื่อยไม่เป็นระเบียบ ไม่มีเยื่อเหนื่ออับเรณู ช่องรังไข่มี 3 ช่องแบบไม่สมบูรณ์ (Sirirugsa, 1992a)

1.3.5.2 *Boesenbergia longipes* (King & Prain) Schltr. (นิลภูษี) (B4)

ชื่อพ้อง *Kaempferia longipes* (King & Prain) Schum.

ลักษณะโดยทั่วไป ลำต้นเหนือดิน สูงประมาณ 50 ซม. ใบมีประมาณ 2-5 ใบ ช่อดอก เกิดตรงยอด ระหว่างกาบใบคู่บนสุด ลักษณะดอกดังรูปที่ 8 lateral staminodes มีสีขาว รูปไข่หัวกลับ ปลายแยกเป็น 2 พู บริเวณฐานค้ำนอกของแผ่นมีขนสีน้ำตาล กลีบปาก มีสีขาวบริเวณกลางแผ่นมีแต้มจุดสีแดง รูปไข่หัวกลับ โคนเป็นกระพุ้ง ปลายโค้งขึ้นเล็กน้อย ไม่มีเนื้อเยื่อเหนืออับเรณู ช่อดอก 3 ช่อ (Sirirugsa, 1992a)

1.3.5.3 *Boesenbergia curtisii* (Bak.) Schltr. (B2, B3)

ชื่อพ้อง *Gastrochilus curtisii* Bak.

ลักษณะโดยทั่วไป ลำต้นเหนือดิน สูง 40-90 ซม. ใบมีประมาณ 4-5 ใบ พืชชนิดนี้พบว่ามีกาบใบ 2 สีคือ ดำและขาว ช่อดอก ออกตรงยอดระหว่างกาบใบคู่บนสุด แกนช่อดอกสั้น กาบใบสีดำจะมีดอกประมาณ 6-10 ดอก ลักษณะดอกดังรูปที่ 9 และกาบใบสีขาวดอกจะมีประมาณ 15 ดอกขึ้นไป ลักษณะดอกดังรูปที่ 10 lateral staminodes มีสีขาว บริเวณฐานมีแต้มสีแดง กลีบปาก มีสีเหลืองอ่อน บริเวณกลางแผ่นมีสีชมพู ปลายหักเป็นพู หรือเป็นฟันเลื่อยไม่เป็นระเบียบปลายโค้งขึ้น เยื่อเหนืออับเรณูสั้น และแยกเป็นช่อดอก 3 ช่อ (Sirirugsa, 1992a)

1.3.5.4 *Boesenbergia plicata* (Ridl.) Holtt. (B5, B6)

ชื่อพ้อง *Gastrochilus plicata* Ridl.

ลักษณะโดยทั่วไป ลำต้นเหนือดิน สูง 30-50 ซม. ใบ ส่วนใหญ่พบ 3-5 ใบ ช่อดอกเกิดตรงกลางระหว่างกาบใบคู่ในสุด พืชชนิดนี้พบว่ามีดอก 2 สี กล่าวคืออีกพันธุ์หนึ่งมีดอกสีแดง ซึ่ง Holttum (1950) จัดไว้เป็น variety *lurida* ลักษณะดอกสีแดงดังรูปที่ 11 ดอกสีเหลืองรูปที่ 12 เกสร ตัวผู้ที่เป็นหมันรูปไข่หัวกลับ ปลายมนหรือหัก มีขนบนแผ่นและบริเวณขอบ กลีบปากไม่โค้งเป็นกระพุ้ง และมีสีแดงแต้มบริเวณตรงกลางแผ่นด้วย เยื่อเหนืออับเรณูสั้น ช่อดอก 3 ช่อ (Sirirugsa, 1992a)

1.3.5.5. *Boesenbergia prainiana* (King ex Bak.) Schltr.

(กะทือแดง) (B7)

ชื่อพ้อง *Kaempferia prainiana* King ex Bak.

ลักษณะโดยทั่วไป ลำต้นเหนือดิน สูง 25-40 ซม. ใบมีประมาณ 1-4 ใบ ช่อดอก เกิดจากเหง้าใต้ดิน ระหว่างกาบใบคู่ในสุด ประกอบด้วยดอกประมาณ 10 ดอก ลักษณะดอกดังรูปที่ 13 lateral staminodes มีสีขาว รูปไข่หัวกลับ กลีบปากมีสีขาว มีจุดแต้มบริเวณกลางแผ่นมีสีแดงบริเวณใกล้ฐาน โคนังออกเป็นกระพุ่ม เยื่อเหนื่ออับริเวณสั้น ช่อดอกมี 3 ช่อ (Sirirugsa, 1992a)

1.3.5.6. *Boesenbergia pulcherrima* (Wall) Kuntze. (บุษบง,ปลูด) (B8)

ชื่อพ้อง *Gastrochilus pulcherrima* Wall.

ลักษณะโดยทั่วไป ลำต้นเหนือดิน ผอมยาวสูงประมาณ 20-50 ซม. ใบมีประมาณ 5-7 ใบ ช่อดอก เกิดจากเหง้าใต้ดิน เกิดตรงกลางระหว่างกาบใบคู่ในสุด ลักษณะดอกดังรูปที่ 14 lateral staminodes มีสีขาว กลีบปากสีขาวมีจุดแต้มบริเวณกลางแผ่นมีสีแดง โคนังออกเป็นกระพุ่ม ขอบหยักเป็นฟันเลื่อยไม่เป็นระเบียบ โคนังและอ่อนปลิว เยื่อเหนื่ออับริเวณสั้น ช่อดอกมี 3 ช่อ (Sirirugsa, 1992a)

1.3.5.7. *Boesenbergia tenuispicata* K. Larsen. (B9)

ลักษณะโดยทั่วไป ลำต้นเหนือดิน ผอมยาวสูงประมาณ 20-30 ซม. ใบมีประมาณ 4-6 ใบ กาบใบ มีสีม่วง แผ่นใบ ช่อดอก เกิดจากเหง้าใต้ดิน เกิดด้านข้าง ลักษณะดอกดังรูปที่ 15 lateral staminodes และกลีบปากมีสีเหลืองส้ม โคนังออกเป็นกระพุ่ม จุดแต้มบริเวณกลางแผ่นมีสีม่วง ไม่มีเยื่อเหนื่ออับริเวณสั้น ช่อดอกมี 3 ช่อ (Larsen, 1993)

1.3.5.8. *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. (กระชาย) (B10)

ชื่อพ้อง *Boesenbergia pandurata* Roxb.

ลักษณะโดยทั่วไป ลำต้นเหนือดิน สูง 50-70 ซม. ใบมีประมาณ 3-7 ใบ ช่อดอกเกิดตรงกลางระหว่างกาบใบคู่ในสุด ประกอบด้วยดอกประมาณ 10 ดอก ลักษณะดอกดังรูปที่ 16 แกนช่อดอกสั้น lateral staminodes สีชมพู กลีบปากมีสีชมพูเข้ม ตรงบริเวณปลายกลีบแล้วค่อยๆ งามมาหาฐาน บริเวณกลางแผ่นมีจุดแต้มสีแดง โคนังออก

เป็นกระพุ่มเล็กน้อย ปลายแยกเป็น 2 พู ขอบหยักเป็นฟันเลื่อยไม่เป็นระเบียบ โคนและ
อ่อนพลีผิวเกลี้ยง เยื่อเหนื่ออับเรณูสั้น ช่องรังไข่มี 3 ช่อง (Sirirugsa, 1992a)

1.3.5.9 *Boesenbergia* aff. *rotunda* (L.) Mansf. (B11)

ลักษณะโดยทั่วไป ลำต้นเหนือดิน สูง 20-40 ซม. ใบมีประมาณ
2-7 ใบ ช่อดอก เกิดโดยตรงจากเหง้าตรงกลางระหว่างกาบใบคู่ในสุด ลักษณะดอกดั่ง
รูปที่ 17 lateral staminodes เป็นรูปไข่หัวกลับกลีบปากมีสีเหลืองแผ่นกว้างรูปไข่หัวกลับ
ผิวเกลี้ยงมีเส้นสีแดงตัดขนานทั้งสองด้าน เยื่อเหนื่ออับเรณูสั้น ช่องรังไข่มี 3 ช่อง
(Maknoi, 2001)

1.3.5.10 *Kaempferia angustifolia* Rosc.

(แผ่นหนังแห้ง, ปราบสมุทร) (K1)

ชื่อพ้อง *Kaempferia roxburhiana* Schult.

ลักษณะโดยทั่วไป เหง้า สั้น ตรงปลายมีหัวแตกออกมากมาย
ใบมีประมาณ 3-5 ใบ เรียงสลับซ้ายขวา แตกเป็นกอจากฐาน ช่อดอก ก้านช่อดอกสั้นมาก
หรือไม่มี แกนของช่อดอกไม่ยืดยาว ดอกจึงเรียงกันแน่น ถูกหุ้มด้วยกาบใบคู่ในสุด ใน
ช่อดอกหนึ่งๆ มีดอกประมาณ 10-12 ดอก ลักษณะดอกดั่งรูปที่ 18 lateral staminodes
มีสีขาว กลีบปากมีสีม่วง บริเวณตรงกลางมีสีม่วงเข้มรูปไข่หัวกลับ เยื่อเหนื่ออับเรณูรูปรี
ค่อนข้างสี่เหลี่ยม แยกเป็น 2 แฉก ตื้น มีสีขาว และบริเวณตรงกลางมีสีม่วงเข้ม
ช่องรังไข่มี 3 ช่อง (Sirirugsa, 1992b)

1.3.5.11. *Kaempferia elegans* Wall. (K2)

ชื่อพ้อง *Kaempferia crawfordii* Wall.

ลักษณะโดยทั่วไป เหง้า สูง 10-20 ซม. ใบมี 2 ใบ ตั้งขึ้น ช่อดอก
มีก้านช่อดอกยืดยาวมีขนเกิดระหว่างบริเวณกาบใบคู่ในสุด ในช่อดอกหนึ่งๆ มีดอก
หลายดอก ลักษณะดอกดั่งรูปที่ 19 lateral staminodes แผ่นกว้าง กลีบปากแยกเป็น 2 พู
รอยแยกลึกจรดฐานแต่ละพูมีลักษณะเป็นรูปไข่หัวกลับ เยื่อเหนื่ออับเรณูเป็นแผ่นรูป
หอกหัวกลับปลายแหลม ช่องรังไข่มี 3 ช่อง (Sirirugsa, 1992b)

1.3.5.12. *Kaempferia galanga* L. (เปราะหอม, ว่านหอม) (K3)

ลักษณะโดยทั่วไป เหง้า สั้น มีรากเป็นกระจุกมากมาย ใบมี 2 ใบ มักแบนราบกับพื้นหรือแผ่อยู่ในแนวนานกับพื้น ไม่มีก้านใบ ผิวใบด้านบนเกลี้ยง ผิวล่างมีขนอ่อนนุ่ม กาบใบกว้าง หนาและตรงกลางเป็นสันโค้งแบบกระดูกงูของเรือ ช่อดอกไม่มีก้าน เกิดตรงกลางในระหว่างกาบใบ มีดอกจำนวนมากลักษณะดอกคังรูปที่ 20 lateral staminodes มีสีขาวยุโรปหอกหัวกลับ กลีบปากมีสีขาวและบริเวณตรงกลางมีแต้มสีม่วงแยกเป็น 2 พู รอยแยกกลีบจรดฐาน แต่ละพูเป็นรูปไข่หัวกลับปลายหยัก เป็นพื้นเลื่อยไม่เป็นระเบียบ เยื่อเหนื่ออับเรณูแยกเป็น 2 พู มีช่องรังไข่ 3 ช่อง (Sirirugsa, 1992b)

1.3.5.13 *Kaempferia pulchra* Ridl. (เปราะป่า) (K4)

ลักษณะโดยทั่วไป เหง้า สั้น บริเวณปลายรากมีปมเกิดขึ้นมากมาย ใบมีประมาณ 1-6 ใบ ใบออกจากฐาน เรียงชิดกันมีลักษณะเป็นกอ ส่วนใหญ่ใบจะแผ่ขนานกับพื้น แผ่นใบรูปร่างแปรผันไปได้หลายแบบ มักไม่มีก้านใบ ผิวใบด้านบนเกลี้ยง ผิวล่างมีขน ช่อดอก ออกตรงกลางระหว่างกาบใบคู่ในสุด ประกอบด้วยดอก 10-12 ดอก ลักษณะดอกคังรูปที่ 21 lateral staminodes เป็นรูปไข่หัวกลับตรงฐานยึดออกเป็นก้าน กลีบปากแยกเป็น 2 พู รอยแยกกลีบจรดฐานแต่ละพูมีรูปไข่หัวกลับ เยื่อเหนื่ออับเรณูลักษณะเป็นแผ่นและมีก้าน ส่วนที่เป็นแผ่นรูปหอกหัวกลับปลายแหลม มีช่องรังไข่ 3 ช่อง (Sirirugsa, 1992b)

1.3.5.14 *Kaempferia siamensis* P. Sirirugsa. (เปราะสยาม) (K5)

ลักษณะโดยทั่วไป เหง้า สูง 2-3 ซม. ตรงปลายมีหัวแตกออกมากมาย ใบขนานกับพื้นอยู่ติดกับ ช่อดอกมีก้านช่อดอกสั้นมากหรือไม่มีแกนของช่อดอก ไม่ยืดยาว ในช่อดอกหนึ่งๆ มีดอกประมาณ 10-12 ดอกลักษณะดอกคังรูปที่ 22 lateral staminodes มีสีม่วงรูปไข่หัวกลับปลายมน กลีบปากมีสีม่วงรูปไข่หัวกลับ แผ่นปลายแยกถึงกลางแผ่นเป็น 2 พู เยื่อเหนื่ออับเรณูรูปรีขนาดไม่เท่ากันสองด้าน แยกเป็น 2 แฉก ช่องรังไข่มี 3 ช่อง (Sirirugsa, 1992b)

1.3.5.15 *Kaempferia roscoeana* Wall. (K6)

ลักษณะโดยทั่วไป เหง้า สูง 2 ซม. ตรงปลายมีหัวแตกออกมากมาย ใบมี 2 ใบ ปลายใบเรียวแหลม ช่อดอกมีก้านช่อดอกสั้นมากหรือไม่มี แกนของช่อดอกไม่ยืดยาว ดอกจึงเรียงกันแน่น ลักษณะดอกดั่งรูปที่ 23 lateral staminodes มีสีขาวยาวรูปไข่หัวกลับปลายมน กลีบปากมีสีขาวยาวและจุดแต้มสีเหลือง ปลายแยกเป็น 2 แฉกแยกเล็กน้อยถึงฐาน อับเรณู เชื้อเหนืออับเรณูรูปรีขนาดไม่เท่ากันสองด้านแยกเป็น 2 แฉก มีช่องรังไข่ 3 ช่อง (Sirirugsa, 1992b)

1.3.5.16 *Scaphochlamys biloba* (Ridl.) Holtt. (S1)

ลักษณะโดยทั่วไป เหง้า สีขาวแกมเขียว ผอมบางตรงข้อที่ชูลำต้นเหนือดินขึ้นมาใบมีเพียงใบเดียวและมีกาบสีม่วงหุ้มส่วนโคนใบประมาณ 2 กาบ ด้านบนใบสีเขียวเข้ม และมีแถบสีขาว ปากกตามยาว 2 ข้างของเส้นกลางใบอยู่ระหว่างเส้นกลางใบกับขอบใบ ด้านล่างของใบสีม่วงเข้ม ช่อดอกประกอบด้วยดอกประมาณ 10 ดอก ลักษณะดอกดั่งรูปที่ 24 ดอกเรียวยาวสลับเป็นบันไดเวียนดอกล่างบานก่อน lateral staminodes มีสีขาวยาวปลายมนขอบโค้งกลับหลัง กลีบปากมีรูปไข่หัวกลับสีขาวและมีสีเหลืองอ่อนแต้มบริเวณกลางแผ่นปลายแยกเป็น 2 พูรอยแยกเล็กน้อยตรงรอยแยกซ้อนกันเล็กน้อย เชื้อเหนืออับเรณูมีสีขาวยาวกลับไปตามหลังตั้งฉากกับอับเรณู ลักษณะเป็นแผ่นรูปสี่เหลี่ยม ปลายมนตัดหรือเว้าลงเล็กน้อย ผิวเกลี้ยง ช่องรังไข่มี 3 ช่อง (พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2532)

1.3.5.17 *Scaphochlamys perakensis* Holtt. (S2)

ลักษณะโดยทั่วไป ลำต้นเหนือดินสั้นใบมี 2 ใบ ช่อดอกออกตรงจากเหง้า ลักษณะดอกดั่งรูปที่ 25 lateral staminodes แผ่กว้างสีขาวปลายมน ขอบโค้งกลับหลัง กลีบปากเป็นรูปไข่หัวกลับแผ่นปลายแยกเป็น 2 พู มีเชื้อเหนืออับเรณูสีขาว ลักษณะเป็นแผ่นรูปสี่เหลี่ยม ปลายมนตัดหรือเว้าลงเล็กน้อย รังไข่ สีขาวผิวเกลี้ยงช่องรังไข่มี 3 ช่อง (Maknoi, 2001)



รูปที่ 7 *Boesenbergia basispicata* (B1)

รูปที่ 8 *Boesenbergia longipes* (B4)



รูปที่ 9 *Boesenbergia curtisii* (B2)

รูปที่ 10 *Boesenbergia curtisii* (B3)

กาบใบดำ

กาบใบขาว



รูปที่ 11. *Boesenbergia plicata* (B5)

รูปที่ 12 *Boesenbergia plicata* (B6)

ดอกสีแดง

ดอกสีเหลือง

1.4 การตรวจสอบในระดับโปรตีน

การศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในระดับโปรตีน อาจแบ่งการตรวจสอบได้เป็น 2 แบบได้แก่ ตรวจสอบจากโปรตีนที่ทำหน้าที่ภูมิคุ้มกัน และโปรตีนอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยวิธีแรกอาศัยหลักการการจำกันได้ระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (serological reaction) ของสิ่งมีชีวิต โดย Sarich และ Wilson (1967) ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ระหว่างมนุษย์กับลิงไม่มีหาง (apes) ว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันแต่วิธีการนี้บอกความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตได้ไม่ละเอียดมากนักเมื่อเทียบกับการตรวจสอบโดยวิธีการแยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่เรียกว่าอิเล็กโตรโฟเรซิส ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการตรวจสอบในระดับโปรตีน (ดัดแปลงจาก Avise, 1994)

	วิธีตรวจสอบจาก ภูมิคุ้มกัน	วิธีตรวจสอบจาก การแยกโดยกระแสไฟฟ้า
การระบุลักษณะทางพันธุกรรม	-	*
การมีบรรพบุรุษร่วมกัน	-	*
ความสัมพันธ์ในระดับประชากร	-	**
ความสัมพันธ์ในชนิดที่ใกล้เคียงกัน	*	**

** = ให้ข้อมูลสูง * = ให้ข้อมูลเพียงเล็กน้อย - = ไม่เหมาะสม

วิธีการนี้อาศัยความหลากหลายรูปแบบของโปรตีน ที่เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ต่างกัน เนื่องจากมีขนาด รูปร่างรวมถึงประจุภายในโมเลกุลต่างกัน ทำให้แยกโมเลกุลที่ต่างกันออกจากกันได้ โปรตีนที่แตกต่างกันนี้บางตัวอาจเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้โดยใช้สวรสที่เหมาะสม (Vallejos, 1983; Pasteur and Pasteur, 1988) ราคาไม่แพง ศึกษาได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลในระดับพันธุกรรมได้มาก จึงนิยมนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ในระดับประชากรของสิ่งมีชีวิต ทั้งในชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน (Simpson and Wither, 1986)

1.4.1 ความหมายของไอโซไซม์

Markert และ Moller (1959) ได้นำวิธีการนี้มาศึกษารูปแบบของเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด พบว่าในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ในแต่ละเนื้อเยื่อ หรือแต่ละเซลล์นั้น เอนไซม์จะมีรูปแบบที่จำเพาะ ซึ่งเป็นที่มาของคำว่าไอโซไซม์ และมีการศึกษาเปรียบเทียบไอโซไซม์ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆเรื่อยมา กระทั่งปี 1979 International Union of Biochemistry (IUB) ได้ตีพิมพ์ความหมายของไอโซไซม์ตาม Markert ว่าเป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างของโมเลกุลต่างกัน แต่เร่งปฏิกิริยาเดียวกัน มีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อหรือเซลล์ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และความแตกต่างของโมเลกุลของเอนไซม์นี้มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของไอโซไซม์หรือเอนไซม์ด้วย (Freeling, 1983) การศึกษาเรื่องของไอโซไซม์อาจบ่งชี้หรือให้ข้อมูลในระดับพันธุกรรมได้ เพราะลักษณะหรือการเกิดไอโซไซม์นั้นขึ้นอยู่กับพันธุกรรมด้วย (Buth and Murphy, 1999)

1.4.2 กลไกการกำเนิดไอโซไซม์

ไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นในธรรมชาติ อาจบอกให้ทราบถึงการควบคุมของยีนสำหรับเอนไซม์หรือไอโซไซม์ ว่ามีตำแหน่ง (locus) และลักษณะ (allele) ต่างๆ เนื่องจากสาเหตุหลักสองประการคือ ข้อมูลทางพันธุกรรม หรือ การเปลี่ยนแปลงหลังการแปลรหัสทางพันธุกรรม (Weeden and Wendel, 1989)

1.4.2.1 ระบบพันธุกรรม (genetic) ที่ทำให้เกิดไอโซไซม์ ระบบแรกคือ อัลโลไซม์ (allozyme) ซึ่งเป็นไอโซไซม์ที่ถูกควบคุมโดยยีนเพียงตำแหน่งเดียว (unilocus) แต่ให้ลักษณะของข้อมูล หรือรูปแบบที่หลากหลาย (multiple allele) (Birchler, 1983) เนื่องจากการตรวจสอบจะสนใจเพียงยีนตำแหน่งหนึ่งตำแหน่งใดเท่านั้น ทำให้ตรวจสอบได้ง่าย นำมาเปรียบเทียบวิเคราะห์หาความแตกต่างในระดับพันธุกรรมที่เกิดขึ้นได้ นอกจากนี้พบว่ารูปแบบของข้อมูลที่ได้สะดวกต่อการติดตามลักษณะหรือยีนที่สนใจไปยังรุ่นถัดไปได้และพบว่าการถ่ายทอดเป็นไปตามกฎของเมนเดล ดังนั้น อัลโลไซม์จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ (Weeden 1989; Ozaki *et al.*, 2000) ระบบถัดมาคือ multilocus I เป็นระบบที่ไอโซไซม์ถูกควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง (multilocus) ในนิวเคลียส โดยแต่ละตำแหน่งต่างก็ผลิตเอนไซม์ซึ่งเร่งปฏิกิริยาอย่างเดียวกัน ไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นโดยระบบนี้เกิดง่ายที่สุด เช่น เอนไซม์

มาเลทตีไฮโดรจีเนส (Gottlieb, 1982) ระบบที่สามคือ multilocus II เป็นระบบที่มีการควบคุมของยีนหลายตำแหน่งเหมือนระบบสอง แต่ต่างกันที่เอนไซม์เป็นโพลีเพปไทด์หลายสาย (multiple polypeptide chains) ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อย (subunits) โดยแต่ละหน่วยถูกควบคุมด้วยยีนมากกว่าหนึ่งตำแหน่ง เช่น เอนไซม์เอสเทอเรส ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (dimer) ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยถูกควบคุมโดยเอสเทอเรสยีน 4 ตำแหน่ง (Tanksley and Rick, 1980) ระบบสุดท้ายคือ unilocus-polymeric เอนไซม์ถูกควบคุมด้วยยีนเพียงตำแหน่งเดียว แต่มีหลายหน่วยย่อยและถ้ายีนตำแหน่งนี้เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือกลายพันธุ์ จะทำให้หน่วยย่อยของเอนไซม์เปลี่ยนไปด้วย เช่น เอนไซม์กลูตาเมทตีไฮโดรจีเนส (Newton, 1983)

1.4.2.2 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนภายหลังการแปลรหัสพันธุกรรมเป็นสายโพลีเพปไทด์ (post translation modifications) เกิดขึ้นกับไอโซไซม์หลายชนิด (Beevers, 1982) จากหลายสาเหตุ เช่น การเติมโมเลกุลบางชนิดภายหลังการแปลรหัส ได้แก่ ปฏิกริยาการเติมฟอสเฟต (phosphorylation) ในเอนไซม์เพื่อกระตุ้นการทำงาน มักจะเกิดขึ้นในสัตว์ ส่วนในพืชพบน้อยมาก (Rao and Randall, 1980) และการเติมคาร์โบไฮเดรต (glycosylation) เช่น ในเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เป็นต้น (Clarke and Shannon, 1976) ถัดมาเป็นการตัดออกหลังการแปลรหัส การเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเนื่องจากส่วนปลายของสายโพลีเพปไทด์หลุดหรือขาดออก เช่น เอนไซม์ในกลุ่มเพพติเดส ที่มักจะเกิดขึ้นในรูปของโปรเอนไซม์ (proenzyme) ต้องตัดบางส่วนออกจึงทำงานได้ สุดท้ายเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือโครงรูปของโปรตีนหลังการแปลรหัส ทำให้รูปร่างหรือโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป เช่น การม้วนพับของสายโพลีเพปไทด์ (post-translational conformation) ส่งผลให้การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเปลี่ยนแปลงไปได้ด้วย

1.4.3 แหล่งที่พบไอโซไซม์ในพืช

ไอโซไซม์จะพบได้ในเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของพืชไม่ว่าจะเป็นในลำต้น ใบ และราก ของพืชชนิดต่างๆ โดยส่วนใหญ่จะอยู่ในของเหลวภายในเซลล์ หรืออยู่ติดกับเยื่อเซลล์ รวมทั้งอาจพบได้ในออร์แกเนลล์ หลายชนิดภายในเซลล์ เช่น ไกลออกซิโซม (glyoxysomes) เปอร์ออกซิโซม (peroxisome) ไมโทคอนเดรีย

(mitochondria) คลอโรพลาสต์ (chloroplasts) (Tanksley, 1983) เอนไซม์ที่มาจากต่างบริเวณกันแม้จะมาจากเซลล์เดียวกัน ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างกัน รวมทั้งระยะเวลาในพัฒนาต่างกันจะให้รูปแบบที่แตกต่างกัน (Scandalios, 1974; Cronn *et al.*, 1997; Garkava *et al.*, 2000) ไอโซไซม์ในของเหลวภายในเซลล์มักมีความผันแปรมากกว่า ไอโซไซม์ในออร์แกเนลล์ (Weeden, 1983a) และไอโซไซม์ของพืชชั้นสูงค่อนข้างจะคงที่ในการวิวัฒนาการ (Weeden, 1983b; Crawford, 1990)

1.4.4 การประยุกต์ใช้กับพืช

ไอโซไซม์อิเล็กโตรโฟเรซิสเป็นวิธีที่นำมาใช้ศึกษาในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด โดยเฉพาะในพืช เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้จากเกือบทุกส่วนของพืช และรูปแบบของข้อมูลช่วยแก้ปัญหาได้หลายด้าน (Adams, 1983) ทั้งการนำมาศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อยืนยันการจำแนกในแต่ละชนิดของพืช (alpha systematic) และนำมาในการวัดความแปรผัน และหาความสัมพันธ์ในระดับประชากรทั้งชนิดเดียวกัน และต่างชนิดกัน รวมทั้งความสัมพันธ์ในรูปแบบของสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (beta systematic) (Van de Bank *et al.*, 2001) เทคนิคนี้ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับพืชตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 (McMillin, 1983) ใช้ตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมของพืชในพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ลูกผสมที่ถูกพัฒนาขึ้นในเชิงเศรษฐกิจ เช่น กลุ่มธัญพืชที่อยู่ในวงศ์หญ้า (Gramineae) ได้แก่ ข้าวฟ่าง ข้าวหอมมะลิ (Inouye and Hagiwara, 1980) ข้าวโพด (Stuber *et al.*, 1988) และข้าวบาเลย์ (Volis, *et al.*, 2001) เป็นต้น

ไอโซไซม์อิเล็กโตรโฟเรซิสยังถูกนำมาใช้ในการศึกษาจัดการโรคพืช (Burdon and Marshall, 1983) ตัวอย่างเช่น ศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบของไอโซไซม์บางชนิดในขณะที่พืชตอบสนองการติดโรค เช่น เปอร์ออกซิเดสในใบยาสูบจะมีเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อมากขึ้น และรูปแบบของไอโซไซม์จะเปลี่ยนแปลงไป (Nadolny and Sequeira, 1980) รวมทั้งนำมาใช้เปรียบเทียบรูปแบบของไอโซไซม์ที่เปลี่ยนแปลงในขณะเจริญเติบโต ซึ่งอาจเป็นเพราะรูปแบบของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปตามปัจจัยภายนอก เช่น สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป (Freeling, 1983; Simpson and Withers, 1986; Cronn *et al.*, 1997) วิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม รวมทั้งสามารถนำมาใช้ประเมินความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของพืชได้ เช่น ยางพารา (*Hevea*

brasiliensis) (Suvachittanont and Pongspaiboon, 1994) ทานตะวัน (*Helianthus annuus*) (Cronn *et al.*, 1997) พืชวงศ์กล้วยไม้ (Orchidaceae) กลุ่มรองเท้านารี (*Goodyera procera*) (Case *et al.* 1999) หน่อไม้ฝรั่ง (*Asparagus officinalis*) (Ozaki *et al.*, 2000) *Ranunculus auricomus* (Horanl *et al.*, 2001) เป็นต้น

1.4.5 การประยุกต์ใช้กับพืชวงศ์ขิง

ในกลุ่มของพืชวงศ์ขิงนั้นพบว่า Suvachittanont (1991) นำใช้ในการช่วยจำแนกยืนยันชนิดพืชในสกุลเปราะ (*Kaempferia*) 8 ชนิด โดยใช้ไอโซไซม์ 10 ชนิด พบว่ารูปแบบของไอโซไซม์ที่ได้ในพืชแต่ละชนิดแตกต่างกันโดยเฉพาะใน *Kaempferia galanga* ที่จำแนกเป็นชนิดเดียวกัน แต่มีลักษณะสัญญาณภายนอกที่แตกต่างกันพบว่ารูปแบบที่ได้แตกต่างกันเช่นกันจึงเสนอว่าน่าจะเป็นคนละชนิดกัน และพบว่าในพืชในกลุ่มนี้ไอโซไซม์ที่สกัดจากใบจะมีปริมาณและประสิทธิภาพการทำงานดีที่สุดเมื่อเทียบกับส่วนต่างๆ สำหรับพืชในกลุ่มกระเจียว และ Ibrahim (1991) นำมาหาความสัมพันธ์ในสกุลกระเจียว 5 ชนิด (*Curcuma* spp.) พบว่าไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสสามารถจำแนก *C. xanthorrhiza* และ *C. zedoaria* ได้แม้ว่าจะมีลักษณะสัญญาณภายนอกที่คล้ายกันมาก Liu (1991) ศึกษาในพืชสกุลกระเจียว 11 ชนิดพบว่าไอโซไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสและเปอร์ออกซิเดส จำแนกพืชในสกุลนี้ออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะสีของเหง้าคือ เหง้าเหลือง เขียวและขาว Shamina และคณะ (1998) ตรวจสอบประชากรของขมิ้น (*Curcuma longa*) ในประเทศอินเดีย โดยใช้ไอโซไซม์ 6 ชนิด พบว่ามีความแปรผัน 63.8-96% และเปอร์ออกซิเดสให้รูปแบบที่มีความคงที่มากที่สุด Apavatjirut และคณะ (1999) จำแนก และหาความสัมพันธ์ของพืชสกุลกระเจียว 7 ชนิดซึ่งเป็นกลุ่มที่ออกดอกก่อนฤดูกาล โดยใช้ไอโซไซม์ 21 ชนิด พบเพียง 8 ชนิดที่ให้รูปแบบที่มีความหลากหลายและมีความคงที่ในการตรวจสอบ และสามารถแยกพืชในกลุ่มนี้ออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย Paisooksantvatana และคณะ (2001) ตรวจสอบความแปรผันประชากรของพืชในสกุลกระเจียวในชนิดปทุมมา (*Curcuma alismatifolia*) ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยที่ได้จากป่าและปลูกในเชิงเกษตรกรรม จากประชากร 10 แหล่ง โดยใช้ไอโซไซม์ 7 ชนิดในการศึกษา พบว่า 5 ไอโซไซม์ที่ให้รูปแบบที่หลากหลาย Ibrahim (1996) หาความสัมพันธ์ในสกุลขิง 6 ชนิด (*Zingiber* spp.) พร้อมทั้งสกุล

กระเจียว 5 ชนิด โดยใช้ไอโซไซม์ 4 ชนิด พบว่าเฉพาะเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส และ เอสเทอเรสให้รูปแบบความหลากหลายในพืชทั้งสองกลุ่ม โดยไอโซไซม์ที่ได้จากเหง้า และใบให้รูปแบบของไอโซไซม์ต่างกัน และไอโซไซม์จากใบมีความหลากหลายมากกว่าในเหง้า Liu (1996) ศึกษาในสกุลข่า (*Alpinia* spp.) 32 ชนิด โดยใช้ไอโซไซม์ เปอร์ออกซิเดส พบว่าสามารถจำแนกพืชกลุ่มนี้ออกได้เป็น 4 สกุลย่อย Makhuvha และคณะ (1996) นำมาใช้ในการศึกษาประชากรของ *Siphonoclisus aethiopicus* ซึ่งเป็น พืชวงศ์ขิงที่พบในแถบประเทศแอฟริกา ระหว่างประชากรที่ปลูกในเชิงเกษตรกรรม และประชากรที่ได้จากป่า พบว่าให้รูปแบบที่ต่างกัน ฉัตรชัย งามเรียบสกุล (2535) ใช้ตรวจสอบพืช 7 สกุล 16 ชนิด ได้แก่สกุลกระชาย 4 ชนิด สกุลเปราะ 6 ชนิด สกุล กระเจียว 2 ชนิด พร้อมทั้ง *Curcumorpha longiflora*, *Scaphochlamys biloba* คาหลา (*Etingera elatior*) ข่า (*Alpinia zerumbet*) โดยใช้เอนไซม์ 6 ชนิดในการตรวจสอบ พบว่ารูปแบบที่ได้มีความหลากหลายสามารถช่วยยืนยันการจำแนกได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าปัจจุบันได้มีการนำไอโซไซม์มาใช้ช่วยในการศึกษาและจำแนกพืชในวงศ์ขิง กว้างขวางมากขึ้น

1.4.6 ปัญหาที่เกิดขึ้นจากการศึกษาไอโซไซม์

การประยุกต์ใช้ไอโซไซม์ในการศึกษานั้นแม้ว่าจะมีข้อดีและมีประโยชน์ มากแต่พบว่ายังมีข้อจำกัด หลายประการด้วยกัน

1.4.6.1 ข้อจำกัดด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic limitations)

การตรวจสอบโดยวิธีไอโซไซม์อิเล็กโตรโฟรีซิสนั้นให้ ข้อมูลใน 2 ลักษณะ คือ เห็นแถบ และไม่เห็นแถบ โดยลักษณะของแถบที่ได้ เรียกว่า ไซโมแกรม (zymograms) (Gottlieb, 1981) หากพืชที่ทำการศึกษาต่างกันมากแต่เมื่อนำ มาทดสอบอาจให้รูปแบบเหมือนกัน เนื่องจากบางครั้งโครงสร้างของโปรตีนต่างชนิด กัน มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนต่างกัน อาจเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้เหมือนกัน เพราะประจุและขนาดของโปรตีนเท่ากัน วิธีการนี้จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการศึกษาสิ่ง มีชีวิตหรือพืชที่มีความใกล้เคียงกัน หรือคล้ายกันมากจนมีปัญหาในการจำแนกจาก ลักษณะสัณฐานภายนอก (Nei, 1987) แต่จะไม่สามารถศึกษาได้โดยลำพัง เช่นเดียวกับ

การศึกษาในระดับโมเลกุลโดยวิธีอื่นๆ ซึ่งต้องทำการศึกษาลักษณะสัญญาณภายนอกควบคู่ไปด้วยจึงจะให้ผลรวมได้เป็นอย่างดี (Murphy *et al.*, 1996)

1.4.6.2 ข้อจำกัดจากตัวอย่าง (sample limitations)

นอกจากข้อจำกัดในการวิเคราะห์ในเรื่องของตัวอย่างทำการศึกษาที่จะต้องอยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกันแล้วยังอาจมี ข้อจำกัดที่เกิดขึ้นจากการเลือกชนิดของเอนไซม์ที่ทำการศึกษา และการเลือกชนิดของตัวอย่างหรือเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษา รวมทั้งการเก็บรักษาเอนไซม์ให้อยู่ในสถานะที่เหมาะสม

1.4.6.2.1 ชนิดของเอนไซม์ที่นำมาใช้ในการศึกษานับว่ามีความสำคัญเช่นกัน เนื่องจากรูปแบบไอโซไซม์ที่ได้เป็นผลมาจากการแสดงออกของยีนที่มีถ่ายทอดไปยังรุ่นถัดไป จึงมักนำมาใช้เป็นเครื่องมือแรกๆ ในการตรวจสอบในระดับโมเลกุล ดังนั้นในการเลือกเอนไซม์ที่นำมาใช้ศึกษาจำเป็นต้องเลือกที่มีลักษณะไอโซไซม์ที่มีความหลากหลาย (Eanes, 1999) รวมทั้งไม่เปลี่ยนแปลงตามสิ่งแวดล้อม เช่น เอนไซม์กลูตามาเทดีไฮโดรจีเนส ที่มีความคงตัวสูงในวิวัฒนาการของพืช เป็นต้น (Crawford, 1990) แต่มีเอนไซม์หลายชนิดที่เปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อม เช่น เปอร์ออกซิเดส (Siegel *et al.*, 1982) ซึ่งจำแนกและหาความสัมพันธ์ในสิ่งมีชีวิตได้ และให้ผลการศึกษาคือ (Liu, 1996) และให้รูปแบบคงที่เช่นกัน (Shamina *et al.*, 1998) ดังนั้นในการศึกษารูปแบบของไอโซไซม์จึงควรตรวจสอบความคงตัวของไอโซไซม์ชนิดนั้นๆ และควบคุมสภาวะการทดลองให้เหมาะสมเพื่อให้รูปแบบของไอโซไซม์ที่มีความหลากหลายและมีความคงที่ในการทดลอง (Buth *et al.*, 1999)

1.4.6.2.2 การเลือกเนื้อเยื่อหรือชนิดของตัวอย่างมีผลอย่างมากในการศึกษาเพราะ ไอโซไซม์ในพืชจะแตกต่างกันตามสภาวะแวดล้อมและตามช่วงเวลาหรืออายุของพืช (Bailey, 1983) ทำให้รูปแบบของไอโซไซม์ที่ได้อาจแตกต่างกัน รวมทั้งในเนื้อเยื่อหรือบริเวณที่ต่างกัน พบว่ารูปแบบของไอโซไซม์ที่ได้จะแตกต่างกันด้วย เช่น ไอโซไซม์ที่ได้จากยอด ใบ และราก ของพืชชนิดเดียวกันมีรูปแบบของไอโซไซม์ที่แตกต่างกันเป็นต้น (Garkava *et al.*, 2000) จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเลือกเนื้อเยื่อจากบริเวณเดียวกันและในช่วงอายุที่ใกล้เคียงกันเพื่อความคงที่ของรูปแบบไอโซไซม์ที่ได้ (Weeden and Wendel, 1989)

1.4.6.2.3 ในการเก็บรักษาตัวอย่างเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อรูปแบบของไอโซไซม์ เนื่องจากเอนไซม์บางชนิดอาจเสถียรภาพไปตามเวลา หากเก็บสารตัวอย่างไว้นานเกินไปอาจทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง ผลการทดลองที่ได้แตกต่างกันไป ดังนั้นการรักษาสภาพเอนไซม์ให้คงที่จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำๆ (Apavatjirut *et al.*, 1999) และควรจะรีบทำการทดลองหลังสกัดไอโซไซม์แล้ว

แม้ว่าการศึกษาไอโซไซม์จะให้ประโยชน์หลายด้านแต่ยังพบว่ามีข้อจำกัดอยู่เช่นกัน ดังนั้นหากนำวิธีการอื่นเข้ามาช่วยในการศึกษา เช่น การศึกษาในระดับดีเอ็นเอด้วยก็อาจให้ผลการศึกษาดีขึ้น

1.5 การตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ

การตรวจสอบในระดับโปรตีนมีข้อจำกัดหลายด้านดังได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 1.4 จึงใช้การตรวจสอบระดับดีเอ็นเอซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับพันธุกรรมโดยตรง เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นรหัสในการสังเคราะห์โปรตีน หรือเอนไซม์ที่จะทำให้เกิดลักษณะที่แตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดของพืชก็ได้ ไม่ขึ้นกับชนิดเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต ฤดูกาลและสภาพแวดล้อม ทั้งยังสามารถตรวจสอบได้จากส่วนของยีนที่เป็นรหัสในการสังเคราะห์โปรตีน (coding) และส่วนที่ไม่ใช่ยีน (non-coding) การตรวจสอบระดับดีเอ็นเอในพืชนั้นสามารถศึกษาจีโนม (genome) 3 แหล่งด้วยกันคือ จากคลอโรพลาสต์, ไมโทคอนเดรีย และจากนิวเคลียส (Soltis *et al.*, 1992) คลอโรพลาสต์เป็นออร์แกเนลล์ที่พบเฉพาะในพืชเท่านั้น ลักษณะของดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์มีการเรียงลำดับของเบสค่อนข้างคงที่ มีความคล้ายคลึงกันสูง จึงนิยมศึกษาเพื่อตรวจสอบความเหมือนและแตกต่างในระดับประชากร และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในพืช (Provan *et al.*, 2001) ส่วนไมโทคอนเดรียพบได้ทั้งในพืชและสัตว์มีขนาดใหญ่กว่าในคลอโรพลาสต์ และการเรียงลำดับเบสในดีเอ็นเอมีความแปรผัน แหล่งสุดท้ายคือนิวเคลียส ซึ่งมีดีเอ็นเอขนาดใหญ่และซับซ้อนมากที่สุดโดยดีเอ็นเอส่วนใหญ่ในเซลล์มีปริมาณประมาณ 90 % ของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ (Rueda *et al.*, 1998)

ความหลากหลายของดีเอ็นเอเกิดจากการเรียงตัวของเบสบนสายของดีเอ็นเอที่ต่างกันนั้น สามารถศึกษาได้จากการเรียงลำดับดีเอ็นเอแล้วเปรียบเทียบกันวิธีนี้ให้ความแม่นยำดีมากวิธีหนึ่ง แต่มีค่าใช้จ่ายสูง ใช้ระยะเวลาในการศึกษามาก มักใช้ในขั้นท้ายๆ ของการศึกษา (Judd *et al.*, 1999) ดังนั้นจำเป็นต้องใช้วิธีการที่ง่าย และรวดเร็วกว่ามาศึกษา เช่น การตรวจสอบความหลากหลายของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างโดยตรง หรือนำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มจำนวนโดยวิธี PCR แล้วตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้เอนไซม์ตัดดีเอ็นเอจำเพาะ แล้ววิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการตัด การตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้นี้เรียกว่า RFLP (restriction fragment length polymorphism) เป็นเทคนิคแรกๆ พัฒนามาจาก Jeffreys และคณะ ในปี 1985 ซึ่งตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่อาศัยความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตรงบริเวณตำแหน่งจดจำ อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์แบบแผนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่อาจทำได้ยาก

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดอาจเลือกตรวจสอบเฉพาะยีน หรือตำแหน่งที่จำเพาะ โดยใช้โพรบ (probe) ที่สามารถไฮบริไดซ์ (hybridize) ได้กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณนั้น โพรบที่ใช้จะสกัดมาจากพืชชนิดเดียวกันกับพืชที่ต้องการนำมาศึกษาหรืออาจมาจากชนิดที่ใกล้เคียงกันหรือเป็น โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ที่สังเคราะห์ขึ้นมาโดยมีเบสคู่สมกับส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการศึกษา นำมาติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี หรือสารเรืองแสงบางชนิด โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้ คือ ภายหลังกการแยกดีเอ็นเอที่ได้โดย วิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส แล้วถ่ายดีเอ็นเอจากเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสลงไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แล้วนำแผ่นเมมเบรนนั้นมาทำปฏิกิริยาที่เรียกว่า ไฮบริไดซ์กับโพรบอีกครั้ง เพื่อหาดำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกับโพรบ วิธีการนี้เรียกว่า Southern blotting ดังรูปที่ 26 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้โพรบเช่นนี้มีขั้นตอนยุ่งยากเพราะมีโพรบซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์หรือที่ได้จากการโคลนยีนและแยกให้บริสุทธิ์ แล้วจึงนำมาติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารเรืองแสง วิธีการที่ได้สะดวกและง่ายกว่านี้คือการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบอาศัยเทคนิค PCR ช่วย (Werman *et al.*, 1996)

1.5.1 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction)

PCR เป็นเทคนิคที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีเพียงเล็กน้อย ให้เพิ่มเป็นล้านเท่าในเวลาอันรวดเร็วในหลอดทดลอง โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase และตรวจสอบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นทันที โดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส (Saiki *et al.*, 1985) เทคนิคนี้ถูกพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Lawyer *et al.*, 1989) การทดลองแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอน ขั้นแรกทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ (denature) โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 °C เปลี่ยนดีเอ็นเอจากเกลียวคู่เป็นสายเดี่ยว ขั้นที่ 2 ลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วให้อยู่ที่ประมาณ 35-55 °C เพื่อให้ไพรเมอร์ซึ่งมีเบสเป็นคู่สมกับส่วนปลายของดีเอ็นเอเป้าหมายเข้ามาจับคู่กับดีเอ็นเอที่ต้องการ (annealing) ขั้นสุดท้ายเปลี่ยนอุณหภูมิให้เหมาะกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์ (primer extension) ที่อุณหภูมิประมาณ 72 °C โดยมีดีเอ็นเอเป้าหมายเดิมเป็นต้นแบบเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลของดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อทำปฏิกิริยาซ้ำกันเช่นนี้อีกหลายรอบปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นในลักษณะ 2^n เมื่อปฏิกิริยาผ่านไป n รอบ (Aert *et al.*, 1998) การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบอาศัยเทคนิค PCR มีหลายวิธีการด้วยกัน ได้แก่

1.5.1.1 การตรวจสอบโดยวิธี RFLP (restriction fragment length polymorphism)

เมื่อนำเอาเทคนิค RFLP มาใช้ร่วมกับวิธีการ PCR นี้เรียกว่า PCR-RFLP โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ ร่วมกับไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้น หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาตัดโดยเอนไซม์จำเพาะ ดังรูปที่ 27 จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ถูกตัดมาตรวจสอบเพื่อแยกขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส แม้ว่าวิธีการนี้จะให้ผลในการศึกษาที่ดีแต่ก็นับว่ายุ่งยาก ใช้เวลาในการศึกษามาก และมีราคาสูงเมื่อเทียบกับวิธีการอื่นๆ ดังตารางที่ 2 (Winter and Kahl, 1995; Edwards, 1998)

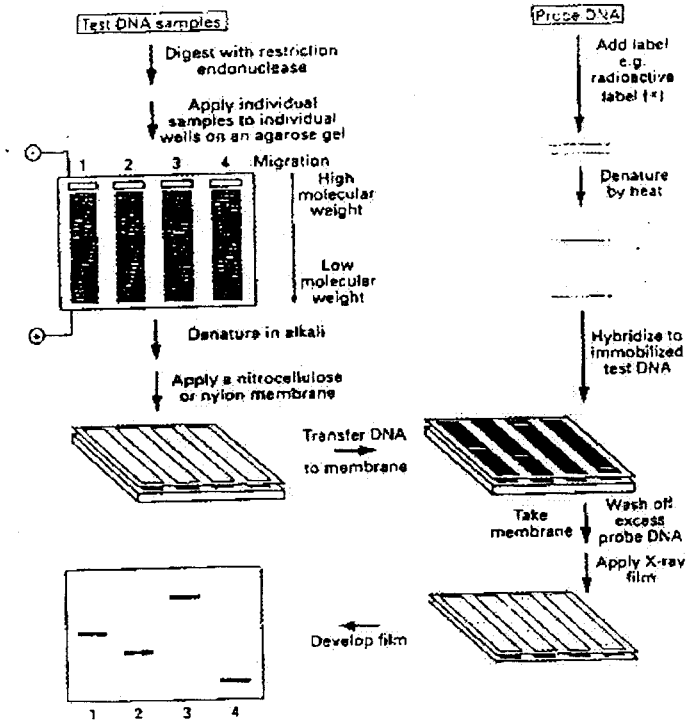
1.5.1.2 การตรวจสอบโดยวิธี AFLP (amplified fragment length polymorphism)

AFLP เป็นวิธีการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่พัฒนามาจากเทคนิค RFLP หลักการจะต่างกันโดยดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ มาตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะแล้วเชื่อม adapter เข้าไปที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อให้ไพรเมอร์มาเกาะที่ปลายทั้ง 2 ด้าน จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับเบส

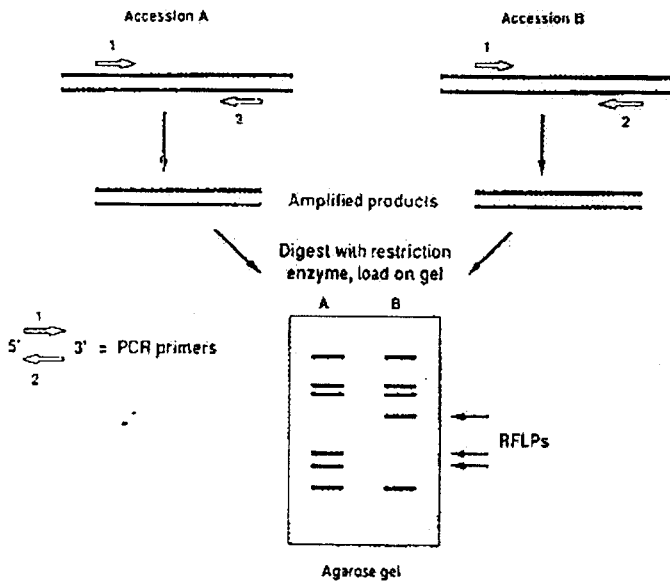
เหมือนกับส่วนของ adapter ดังรูปที่ 28 ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้นมาจะมีลำดับเบสที่เข้าคู่ หรือเป็นคู่สมกันกับไพรเมอร์ที่ใช้ จากนั้นแยกดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส และ บันทึกผล แม้ว่าวิธีการนี้จะใช้เวลาในการศึกษาน้อยและราคาไม่สูงมากนัก Russell และ คณะ (1997) พบว่าการวิเคราะห์ รูปแบบของดีเอ็นเอนั้นค่อนข้างยากและให้ความหลากหลายของดีเอ็นเอไม่มากนักเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ ดังตารางที่ 2 เนื่องจากก่อนจะนำดีเอ็นเอไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR มีการตัดจีโนม หรือดีเอ็นเอแม่แบบด้วยเอนไซม์จำเพาะ ทำให้ดีเอ็นเอมีขนาดสั้นลง และมีความจำเพาะมากขึ้น แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจึงมีความหลากหลายลดลง (Matthes *et al.*, 1998)

1.5.1.3 การตรวจสอบโดยวิธี SSRs (simple sequence repeats)

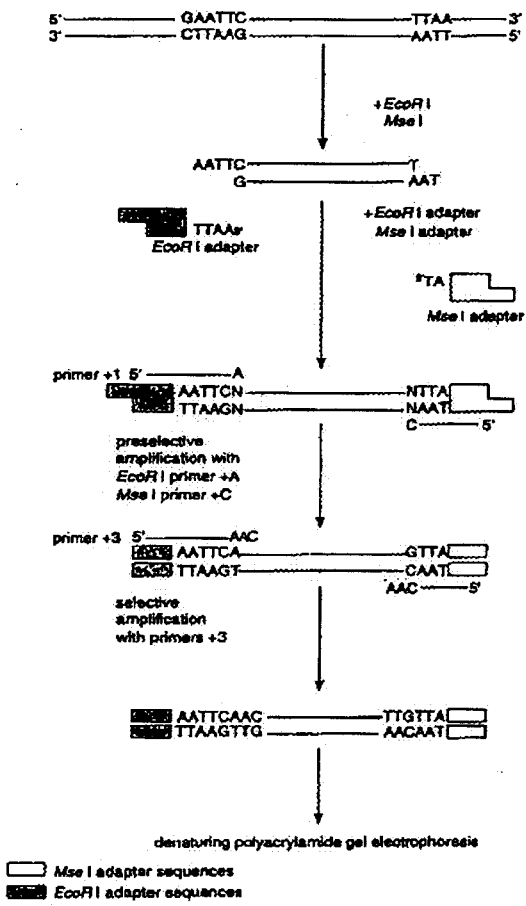
SSRs เป็นเทคนิคที่อาศัยรูปแบบของดีเอ็นเอขนาดสั้น 1-10 คู่เบสที่มีรูปแบบซ้ำๆ กันที่เรียกว่าไมโครแซตเทลไลต์ (microsatellites) ไมโครแซตเทลไลต์เป็นรูปแบบของดีเอ็นเอที่พบได้ในจีโนมของสัตว์ พืช เชื้อรา และแบคทีเรีย โดยรูปแบบของดีเอ็นเอที่พบบนไมโครแซตเทลไลต์ จะเป็นดีเอ็นเอชุดซ้ำๆ กัน ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน วิธีการตรวจสอบอาศัยไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นจากลำดับเบสที่มีรูปแบบซ้ำๆ กันบนส่วนหนึ่งของไมโครแซตเทลไลต์นี้ (SSR-anchored primer) แล้วนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่ง โดยวิธี PCR จากนั้นตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังรูปที่ 29 วิธีการนี้แม้ว่าจะให้รูปแบบความหลากหลายของดีเอ็นเอดี และรวดเร็วแต่พบว่ายังมีราคาสูงและจำเป็นต้องทราบลำดับของดีเอ็นเอในบริเวณ SSRs เพื่อนำไปสังเคราะห์เป็นไพรเมอร์ และเลือกชนิดที่เหมาะสมกับพืชที่ใช้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ดังตารางที่ 2 (Ciofi *et al.*, 1998)



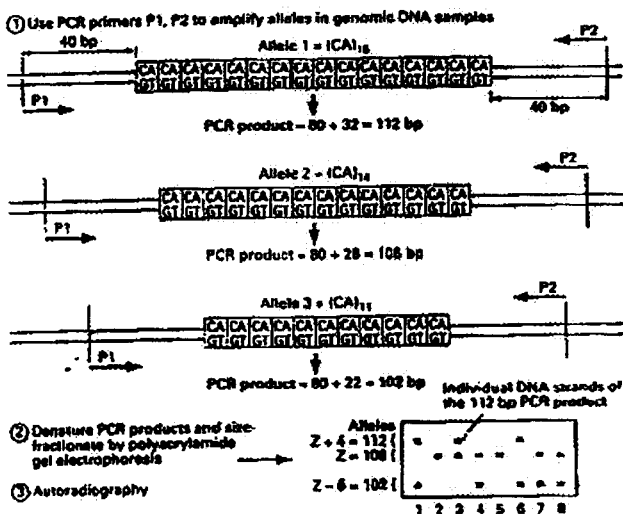
รูปที่ 26 การทำ Southern blotting (ดัดแปลงจาก Werman *et al.*, 1996)



รูปที่ 27 เทคนิคการทำ PCR-RFLP (ดัดแปลงจาก Brettschneider, 1998)



รูปที่ 28 เทคนิคการทำ AFLP (ดัดแปลงจาก Matthes *et al.*, 1998)



รูปที่ 29 เทคนิคการทำ SSRs (ดัดแปลงจาก Hammond *et al.*, 1998)

1.5.1.4 การตรวจสอบโดยวิธี RAPD(random amplified polymorphism DNA)

RAPD เป็นวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ใช้เทคนิค PCR แบบหนึ่งที่ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย ไพรเมอร์ที่ใช้ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary primer) วิธีการนี้อาจมีการเรียกชื่ออื่นได้แก่ AR-PCR (arbitrarily primed PCR) ใช้ไพรเมอร์ขนาด 20 นิวคลีโอไทด์ (Welsh and McClelland, 1990) หรือ DAF (DNA amplification fingerprinting) ใช้ไพรเมอร์ขนาด 5-8 นิวคลีโอไทด์ (Cactano-Anolles *et al.*, 1991) RAPD นิยมใช้ไพรเมอร์ขนาดสั้นขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายในบริเวณที่มีเบสคู่สมกัน (William *et al.*, 1990) โอกาสที่ลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับไพรเมอร์คือ 1 ใน 4^{10} โดยประมาณ เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอที่ได้โดยอิเล็กโตรโฟเรซิสบนอะกาโรสเจล แล้วย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Edwards, 1998) จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยวิธีการนี้ไม่ได้ขึ้นกับขนาดของจีโนม พืชที่มีจีโนมขนาดใหญ่อาจจะเกิดแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าพืชที่มีจีโนมขนาดเล็กได้ สายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างกันเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น ตำแหน่งที่ไพรเมอร์เกาะทำให้ไพรเมอร์ทั้งสองโมเลกุลอยู่ห่างกันเกินกว่าที่จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ หรือมีส่วนของดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่เป็นที่จับกับไพรเมอร์หายไปหนึ่งหรือสองตำแหน่งจึงไม่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ หรือบางครั้งหากมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสบริเวณที่เป็นที่เกาะของไพรเมอร์ โดยมีการแทนที่หรือขาดหายไป ทำให้ขนาดจำนวนของแถบดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป ความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอโดยวิธีนี้พบได้จากการมี และไม่มีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ มากกว่าการเปลี่ยนแปลงขนาดของแถบดีเอ็นเอ เทคนิค RAPD จะทำได้ง่าย รวดเร็ว มีราคาไม่สูงนัก และให้ข้อมูลมากเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ ดังตารางที่ 2 เนื่องจากข้อมูลที่ได้นี้ไม่ค่อยคงตัว จำเป็นต้องศึกษาอิทธิพลของการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆต่อผลการทดลอง จึงต้องระมัดระวัง และควบคุมสภาวะของการทดลองให้คงที่ (Saunders *et al.*, 2001)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (คัดแปลจาก Sunnucks, 2000)

	RFLP	AFLP	SSR	RAPD
Principle	PCR of simple sequence Restriction endonuclease Digest/southern blotting Hybridization	PCR of subset of restriction fragment from extended adapter primer	PCR of simple sequence repeat region	DNA amplification with random primer
Nature of polymorphism	Single base change Insertions, deletion	Single base change Insertions, deletion	Repeat length changes	Single base change Insertions, deletion
Abundance in the genome	High	High	Medium	Very High
Level of polymorphism	Medium	Medium	High	Medium
Overall variation	Low-moderate	High	High	High
DNA required	2-10 μ g	1-2 μ g	50-100ng	10-25 μ g
DNA sequence information	No	No	Yes	No
Rapid transfer to new taxa	Yes	Yes	Yes	Yes
Radioactive detection	Yes/No	No	No/Yes	No
Start-up costs	Medium/High	Medium	High	Low
Development cost	Medium	Medium	High	Low

1.5.3 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อเทคนิค RAPD

1.5.3.1 ลักษณะของดีเอ็นเอ

ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ลักษณะของ ดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษาเพื่อนำมาเป็นแม่แบบ (template) ให้ไพรเมอร์เข้าไปเกาะและเพิ่มจำนวนนั้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเออาจรบกวนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ หากดีเอ็นเอไม่สะอาดพอการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออาจไม่เกิดขึ้น Rajaseger และคณะ (1997) พบว่าพืชในเขตร้อนมีสารฟีนอลเป็นองค์ประกอบมากทำให้ตะกอนดีเอ็นเอมีสีเขียวหรือสีน้ำตาล สารประกอบเหล่านี้รบกวนการทำงานในกระบวนการ PCR ต้องสกัดดีเอ็นเอซ้ำอีกครั้ง โดยใช้ CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) เพื่อทำให้ดีเอ็นเอสะอาดมากขึ้น

1.5.3.2 ลักษณะของไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาโดยเทคนิค RAPD นับว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญมากปัจจัยหนึ่ง เพราะอาศัยไพรเมอร์ที่สุ่มเลือกให้เข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อให้สังเคราะห์ดีเอ็นเอ รูปแบบที่หลากหลายตามลักษณะของดีเอ็นเอแม่แบบ การเลือกไพรเมอร์มีความจำเป็นอย่างมาก ไพรเมอร์ที่ใช้ควรมีเบส G และ C รวมกันแล้วไม่น้อยกว่า 50 % หรือหากมีผู้ทำการศึกษาเปรียบเทียบมาบ้างแล้วในพืชใกล้เคียงก็อาจจะเลือกใช้ไพรเมอร์ที่ให้ผลดีกับพืชชนิดนั้นมาใช้ในการศึกษาได้เช่นกัน (Edward, 1998)

1.5.3.3 ความเข้มข้นของสารในปฏิกิริยา

Innis และ Gelfand (1990) พบว่า ความเข้มข้นของสารทุกชนิดในปฏิกิริยา PCR มีผลต่อรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เช่นความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่แบบในการศึกษา ปริมาณไพรเมอร์ที่ใช้หรือความเข้มข้นของเอนไซม์ DNA polymerase จะมีผลต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหากน้อยไปอาจไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และขนาดของแถบดีเอ็นเอและแถบที่เกิดขึ้นได้ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไคลอไรด์ ($MgCl_2$) มีผลต่อการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบและการทำงานของ DNA polymerase ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย ส่วน dNTPs (deoxyribonucleotide triphosphate) ซึ่งประกอบ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ต้องมีความเข้มข้นของแต่ละตัวเท่าๆกัน

และเหมาะสม การทดลองซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบต่างกันอาจส่งผลต่างกันได้ ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมกับการทดลองเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์และปฏิกิริยามีความคงตัว (Saiki *et al.*, 1990)

1.5.3.4 อุณหภูมิและจำนวนรอบในการทำ PCR

อุณหภูมิและจำนวนรอบในการศึกษาโดยใช้เทคนิค PCR ถือว่าเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญเช่นกัน Linz (1990) พบว่าอุณหภูมิมิอิทธิพลต่อรูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้ อุณหภูมิที่ใช้เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ในเทคนิค RAPD อยู่ในช่วง 35-39 °C และแต่ละอุณหภูมิจะให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน เช่นที่อุณหภูมิที่ 37, 38 และ 39 °C ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จะมีรูปแบบของแถบที่เกิดขึ้นภายหลังการแยกโดยอิเล็กโตรโฟเรซิสชัดเจนกว่าที่ 35 °C และเนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาดสั้นๆ อุณหภูมิที่ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายไม่จำเป็นต้องสูงมาก (36-37 °C) ส่วนอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพและแยกออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว และอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์จะไม่ค่อยมีผลมากนัก โดยมากมักจะใช้อุณหภูมิคงที่ที่ 95 °C และ 72 °C ส่วนจำนวนรอบนั้นมักจะทำการศึกษาที่ประมาณ 35, 40 หรือ 45 โดยจะไม่ค่อยส่งผลต่อของแถบดีเอ็นเอมากนัก แต่หากทำการทดลองนานเกินไปประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase อาจลดลงได้ (Graham, 1991) จากปัจจัยที่กล่าวมาจึงควรทำการตรวจสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมกับแต่ละการทดลองไม่ว่าจะเป็นความเข้มข้นของสารต่างๆที่ใส่ในปฏิกิริยา อุณหภูมิและจำนวนรอบที่ใช้ในการศึกษา เพื่อให้การทดลองมีประสิทธิภาพสูงสุด

1.5.4 การประยุกต์ใช้เทคนิค RAPD ในพืช

RAPD เป็นเทคนิคที่นำมาประยุกต์ใช้กับสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งในพืช และสัตว์ แม้ว่าเป็นเทคนิคที่เพิ่งพัฒนาในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา แต่ก็นิยมนำมาใช้อย่างกว้างขวางในปัจจุบัน เนื่องจากทำการศึกษาได้ง่ายและรวดเร็วให้ผลการศึกษาที่ดีและเป็นเครื่องมือแรกๆในการศึกษาในระดับพันธุศาสตร์ เนื่องจากลักษณะของข้อมูลที่ได้จะอาศัยการปรากฏให้เห็นและไม่ให้เห็นแถบของดีเอ็นเอจึงง่ายต่อการวิเคราะห์ แม้จะยังมีข้อจำกัดจากรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ไม่คงตัว (non reproducible) ในแต่ละการทดลองอยู่บ้างแต่หากควบคุมสภาวะการทดลองให้คงที่ ก็จะได้ผลการศึกษาที่ดี

(Jones *et al.*, 1998) การศึกษาในพืชนั้น เพิ่งมีการทำการศึกษาอย่างจริงจังในช่วง 5-6 ปีที่ผ่านมา โดยส่วนใหญ่มักจะใช้ตรวจสอบการผสมข้ามชนิดของพืช ในกลุ่มของธัญพืชพวกข้าว เช่น ข้าวบาเลย์, ข้าวสาลี, ข้าวหอมมะลิ และพืชอื่นๆ เช่น มันฝรั่ง มะเขือเทศ องุ่น กะหล่ำปลี เป็นต้น (Ranade *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังนำ RAPD มาใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์เชิงประชากรของพืชหลายชนิด ประเมินความหลากหลายทางด้านพันธุกรรมของพืชในวงศ์ Protaceae ชนิด *Leucadendron elimense* (Tansley and Brown, 2000) และในมะละกอ (*Carica papaya*) (Urasaki *et al.*, 2002) เป็นต้น หาคความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชในหลายกลุ่ม เช่น พืชในวงศ์ Rubiaceae, (Rajaseger *et al.*, 1997), *Dipterocarps* (Rath *et al.*, 1998) และพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น สกุลกล้วย (Musaceae) (Pillay *et al.*, 2000) สกุลกล้วยไม้ กลุ่ม Vanda (Lim *et al.*, 1999) เป็นต้น

1.5.5 การประยุกต์ใช้กับพืชในวงศ์ขิง

การประยุกต์เทคนิค RAPD กับพืชในวงศ์ขิงนั้น Rout และคณะ (1997) ตรวจสอบลักษณะพันธุกรรมของขิง (*Zingiber officinale*) จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ไพรเมอร์ 15 ชนิด พบว่ามีเพียง 3 ไพรเมอร์ ที่ให้รูปแบบที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบและการทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับการขยายพันธุ์แบบธรรมชาติ Prathepha (2000) ทำการตรวจสอบไพรเมอร์ 20 ชนิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันเพื่อค้นหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในกระเจียว (*Curcuma aeruginosa*) พบว่าไพรเมอร์ 19 ชนิดสามารถเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในกระเจียวได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถบอกความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากการแปรผันจากลักษณะทางพันธุกรรมได้ดี โดยสรุปเทคนิค RAPD มีศักยภาพในการจำแนกพืชในกลุ่มนี้ Dasuki และคณะ (2000) ใช้ RAPD ตรวจสอบพืชวงศ์ขิงใน สกุล *Alpinia*, *Curcuma*, *Costus*, *Etingera* และ *Zingiber* โดยใช้ไพรเมอร์ 40 ชนิด พบว่ามีเพียง 9 ชนิดที่ให้รูปแบบของดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายและความสัมพันธ์ตั้งแต่ 51.22%-90.32% ปัจจุบันมีการใช้เทคนิค RAPD ในพืชวงศ์ขิงเพื่อใช้ศึกษาและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของพืชในกลุ่มนี้น้อย

1.6 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์

ข้อมูลทางสัตวศาสตร์วิทยาที่ได้โดยตรงจากธรรมชาติมักจะมี ความผันแปรสูง เนื่องจากลักษณะข้อมูลจะเป็นหลายรูปแบบ (multistate characters) ได้แก่ข้อมูลที่ได้จาก วัดหรือนับจำนวน เช่น ความสูงของลำต้น ขนาดของรังไข่ จำนวนใบเป็นต้น ข้อมูลเหล่านี้ยากต่อการวิเคราะห์ ดังนั้นลักษณะข้อมูลเชิงคุณภาพ (qualitative data) วิเคราะห์ได้ง่ายกว่า นิยมนำมาหาความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน เนื่องจากข้อมูลที่ได้จะแสดงให้เห็น ในลักษณะ มี และไม่มีลักษณะที่สนใจจึงไม่ค่อยมีความแปรผันมากนัก การศึกษา ลักษณะต่างๆ ในระดับโมเลกุลจากรูปแบบของแถบของโปรตีนและดีเอ็นเอที่ได้จากการ ศึกษาตัวอย่างข้อมูลในลักษณะเช่นนี้ นอกจากจะบอกความแตกต่างระหว่างชนิดได้แล้ว ยังสามารถนำมาหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้อีกด้วย (Ludwig and Reynolds, 1988)

1.6.1 การเปรียบเทียบค่าความเหมือนและแสดงในรูปสายสัมพันธ์

การเปรียบเทียบความเหมือนจากรูปแบบของแถบข้อมูลที่ได้จะหาได้จาก Similarity index (SI) ที่นิยมได้แก่ Jaccard index ($a/a+b$) หรือ Dice index ($2a/2a+b$) เมื่อ a คือ จำนวนของแถบที่ปรากฏให้เห็น ส่วน b จำนวนของแถบที่ไม่ปรากฏให้เห็น เนื่องจากทั้ง 2 วิธีให้ค่าความเชื่อมั่นสูง แต่ Jaccard index เหมาะกับข้อมูลน้อย $n = 10$ ส่วน Dice index เหมาะกับข้อมูลขนาดใหญ่กว่า เมื่อนำความสัมพันธ์ที่ได้มาวิเคราะห์เป็นคู่ๆ (pairwise) แล้วนำมาเข้าสมการเส้นตรงและวิเคราะห์เพื่อจัดกลุ่ม (clustering analysis) หาความสัมพันธ์ในรูปของสายสัมพันธ์ (dendrogram) หรือต้นไม้ของสายสัมพันธ์ (phylogenetic tree) โดยแต่ละกิ่งจะระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตที่สนใจ เช่น พืชต่างๆ ไว้ ทำให้บอกความสัมพันธ์ของพืชแต่ละชนิดได้ (Sneath and Sokal, 1973)

1.6.2 การหาระยะทางและการจัดกลุ่ม

การหาระยะทางเพื่อจัดกลุ่มของพืชแต่ละชนิดเข้าด้วยกันเป็นวิธีแสดงความสัมพันธ์ของกลุ่มสิ่งมีชีวิตเข้าด้วยกันโดยคำนวณหาระยะทางได้แก่ Euclidean distance (ED) จากนั้นจัดกลุ่มในรูปของ Principal component analysis (PCA) บอกความใกล้ชิดของพืชในแต่ละกลุ่มได้ (Ludwig and Reynolds, 1988)

1.6.3 โปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์

SPSS (statistical package for the social science) เป็นโปรแกรมคอมพิวเตอร์วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของการเปรียบเทียบกลุ่มตัวแปรที่ใช้ศึกษาข้อมูลประเภทนี้ได้ โดยแสดงสายสัมพันธ์ในรูปแบบของ dendrogram โดยวิธี UPGMA (unweighted pair-group method algorithm) และ PCA ได้ (Backjau *et al.*, 1996) ทั้งในระดับโปรตีน (Apavatjirut *et al.*, 1999) และดีเอ็นเอ (Skoula *et al.*, 1999)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ไอโซไซม์และลายพิมพ์ดีเอ็นเอในรูปแบบของ RAPD ของพืชในวงศ์จิงบางชนิดในสกุลกระชาย สกุลเปราะและสกุล *Scaphochlamys* ว่ามีความใกล้เคียงกันหรือแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด

2. เพื่อนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษามาเป็นความรู้พื้นฐานในการยืนยันการจำแนกพืชที่สนใจ เช่น *B. curtisii*, *B. plicata* และพืชในกลุ่มนี้

3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชในกลุ่มนี้และเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆของพืชในวงศ์จิง โดยใช้ข้อมูลจากไอโซไซม์และ RAPD ที่ได้

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัสดุ

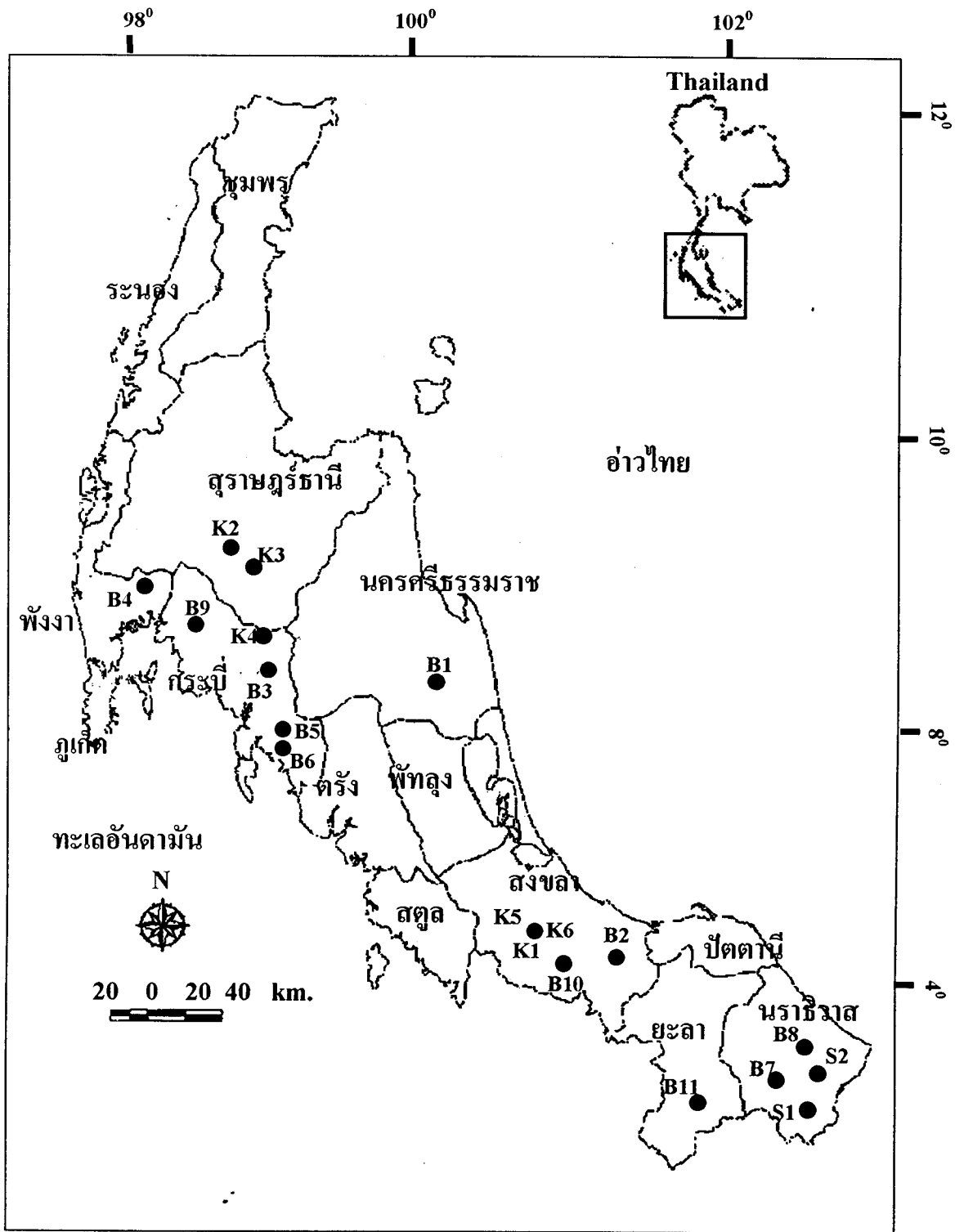
2.1.1 วัสดุพืชที่ใช้ในการศึกษา

สำรวจและเก็บตัวอย่างพันธุ์พืชที่ต้องการ ดังตารางที่ 3 จากบริเวณจังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย ดังรูปที่ 30 เหน้ง้าที่ได้นำมาปลูกในกระถางบริเวณเรือนเพาะชำ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ตารางที่ 3 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

ชนิด (Species)	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	รูปที่	หน้า
สกุลกระชาย (<i>Boesenbergia</i>) 11 ชนิด			
1. <i>B. basispicata</i> (B1)	นครศรีธรรมราช	7	15
2. <i>B. curtisii</i> (black leaf-sheath) (B2)	สงขลา	9	15
3. <i>B. curtisii</i> (white leaf-sheath) (B3)	กระบี่	10	15
4. <i>B. longipes</i> (B4)	พังงา	8	15
5. <i>B. plicata</i> (red flower) (B5)	กระบี่	11	15
6. <i>B. plicata</i> (yellow flower) (B6)	ยะลา	12	15
7. <i>B. prainiana</i> (B7)	นราธิวาส	13	16
8. <i>B. pulcherrima</i> (B8)	นราธิวาส	14	16
9. <i>B. tenuispicata</i> (B9)	กระบี่	15	16
10. <i>B. rotunda</i> (B10)	สงขลา	16	16
11. <i>B. sp.</i> (B11)	ยะลา	17	16

ชนิด (Species)	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	รูปที่	หน้า
สกุลเปราะ (Kaempferia) 6 ชนิด			
12. <i>K. angustifolia</i> (K1)	เรือนแพะชำ	18	17
13. <i>K. elegans</i> (K2)	สุราษฎร์ธานี	19	17
14. <i>K. galanga</i> (K3)	สุราษฎร์ธานี	20	17
15. <i>K. pulchra</i> (K4)	กระบี่	21	17
16. <i>K. siamensis</i> (K5)	เรือนแพะชำ	22	17
17. <i>K. roscoeana</i> (K6)	เรือนแพะชำ	23	17
สกุล <i>Scaphochlamys</i> 2 ชนิด			
18 <i>S. biloba</i> (S1)	นราธิวาส	24	17
19. <i>S. perakensis</i> (S2)	นราธิวาส	25	17



รูปที่ 30 แหล่งที่ทำการเก็บตัวอย่างบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย

2.1.2 วัสดุสารเคมี

2.1.2.1 สารเคมีที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ แสดงในตารางที่ 4
ตารางที่ 4 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

ชื่อสาร	บริษัทผู้ผลิต
Acetone	Sigma
Acrylamide	Merck
Ammonium persulphate	Carlo Erba
Benzidine	Fluka
Bis acrylamide	Merck
Bovine serum albumin	Sigma
Bromophenol Blue	Sigma
Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)	Sigma
Chloroform	J.T.Baker
DL-Dithiothreitol	Sigma
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	Fluka
[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5diphenyltetrazolium bromide] (MTT)	Sigma
Fast blue RR salt	Sigma
L-Glutamic acid	Sigma
Glycine	Fluka
HCl	Merck
H ₂ O ₂	Merck
Liquid Nitrogen	ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์
MnCl ₂	M&B
MgCl ₂	M&B

ชื่อสาร	บริษัทผู้ผลิต
Methanol	Analyticals
2-Mercaptoethanol	Merck
Na Acetate	BDH
NaH ₂ PO ₄	Ajax Chemicals
Na ₂ HPO ₄	Fluka
<i>o</i> -Dianisidine	Sigma
α -Naphthyl acetate	Sigma
β -mercaptoethanol	Sigma
β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD)	Sigma
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma
Phenazinemethosulfate (PMS)	Sigma
N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED)	Fluka
Shikimic acid	Sigma
Tris(hydroxymethyl) aminomethane	Sigma

2.1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา RAPD เป็นกรดอณูชีววิทยา แสดงในตารางที่ 5 ตารางที่ 5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาอณูชีววิทยา (molecular biology grade)

ชื่อสาร	บริษัท
1 Kb DNA ladder	Promega
Agarose	Sigma
Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)	Promega
Ethidium bromide	Sigma
Reaction buffer	Promega
Rnase A	Sigma
Taq polymerase	Promega
Primer	Promega

2.2 อุปกรณ์

1. UV-VIS Spectrophotometer ของ Shimadzu รุ่น 160 A
2. Refrigerated superspeed centrifuge ของ Beckman รุ่น JA-21
3. Micropipette ของ Eppendorf
4. Slab gel electrophoresis apparatus ของ Atto และของ Hoefer Scientific Instruments
5. Submarine electrophoresis apparatus ของ BIO-RAD
6. Centrifuge ของ Beckman รุ่น TJ-6
7. pH meter รุ่น PHM b1 ของ Radiometer Copenhagen
8. Vortex mixer ของ Scientific Industries
9. Heat block ของ Labline
10. Power supply ของ Biorad รุ่น 1000/500
11. Thermocycle ของ Hybaid thermocycler
12. กล้องถ่ายรูปของบริษัท Cannon รุ่น EOS500
13. กล้องถ่ายรูป Polaroid ของบริษัท Spectronic corporation รุ่น CH-1314
14. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น P1210 ของ Mettler
15. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น H-10 ของ Mettler

2.3 วิธีการ

2.3.1 การศึกษาด้านสัณฐานวิทยา

ทำการตรวจสอบลักษณะทางพฤกษศาสตร์จากเอกสารอ้างอิง ดัดป้ายสัญลักษณ์และบอกแหล่งที่มา ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชแต่ละชนิด บันทึกลักษณะต่างๆไว้และให้คะแนนลักษณะที่แตกต่างกัน เพื่อหาความสัมพันธ์ด้านสัณฐานวิทยา ถ้ายรูปลักษณะต้น ใบ และ ดอก ทำการอัดตัวอย่างให้แห้งพร้อมดอกดอกด้วยแอลกอฮอล์ 70%

2.3.2 การศึกษาไอโซไซม์

2.3.2.1 การเก็บตัวอย่าง

การศึกษาไอโซไซม์ในพืชทำได้จากส่วนต่างๆเช่น ใบ ลำต้น และ ราก เป็นต้น จากการศึกษาของ Suvachittanont (1991) พบว่า ในกลุ่มของพืชวงศ์จิงเอนไซม์ส่วนใหญ่จะพบมากที่ใบ ในการศึกษาครั้งนี้จึงสกัดไอโซไซม์จากใบโดยเก็บตัวอย่างจากใบอ่อนที่สมบูรณ์และเพิ่งแตกออกมีลักษณะไม่ม้วนงอจากต้นที่จะศึกษาในช่วงเข้ามา 1-2 ใบเพื่อให้ได้ตัวอย่างในการศึกษาประมาณ 1-2 กรัม

2.3.2.2 การสกัดเอนไซม์

การสกัดเอนไซม์ทำทุกๆ 3 เดือนดังนี้คือ ครั้งที่ 1 ในช่วงระหว่าง มิถุนายน 2543-สิงหาคม 2543 ครั้งที่ 2 ในช่วงระหว่าง กันยายน 2543-พฤศจิกายน 2543 ครั้งที่ 3 ในช่วง ระหว่างธันวาคม 2543-กุมภาพันธ์ 2544 ครั้งที่ 4 ในช่วงระหว่าง มีนาคม 2544-พฤษภาคม 2544 โดยนำใบพืชมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น เช็ดให้สะอาด ชั่งน้ำหนัก 2 กรัม ตัดด้วยกรรไกรที่สะอาดให้เป็นฝอยเล็กๆ ใส่ในครกบดยา ใส่ในโตรเจนเหลวขณะบดเพื่อช่วยให้เซลล์แข็งกรอบบดได้ง่ายยิ่งขึ้น และความเย็นยังช่วยรักษาสภาพของเอนไซม์ไว้ บดให้ละเอียดเติมบัฟเฟอร์สำหรับสกัดเอนไซม์ (Tris-HCl 0.1 M pH 7 ซึ่งมี 1 mM EDTA, 2 mM Dithiothreitol และ 1 mM β -Mercaptoethanol) 2 มิลลิลิตรต่อใบ 1 กรัมผสมให้เข้ากัน จากนั้นกรองด้วยผ้ากรอง 4 ชั้น นำของเหลวที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสไว้เพื่อนำมาศึกษาไอโซไซม์ต่อไป เก็บส่วนใสนี้ไว้ที่ -20°C เพื่อนำมาศึกษาได้ในภายหลังหากมีตัวอย่างมากและทำการศึกษาไม่ทัน แต่พบว่าหากศึกษาหลังจาก 1 เดือน เอนไซม์

จะเสียดสภาพทางธรรมชาติและมีประสิทธิภาพการทำงานลดลงไม่เหมาะจะนำมาทำการศึกษาต่อไปได้ จึงได้พยายามทำการศึกษาไอโซไซม์ทันทีที่เป็นส่วนใหญ่

2.3.2.3 เอนไซม์ที่เลือกศึกษา

การเลือกเอนไซม์ที่จะนำมาศึกษาวิจัยส่วนใหญ่จะตรวจสอบจากงานวิจัยที่เคยมีผู้ก่อนหน้าในกลุ่มของพืชวงศ์นี้ และคัดเลือกจากเอนไซม์ที่สามารถวิเคราะห์ผลได้ง่าย สารเคมีที่ใช้มีราคาไม่แพงมากนัก ในการทดลองนี้ได้เลือกเอนไซม์มา 9 ชนิดคือ

1. Acid phosphatase (ACP, E.C.3.1.3.2)
2. Alkaline phosphatase (ALP, E.C.3.1.3.1)
3. β -Esterase (β -EST, E.C.3.1.1-)
4. α -Esterase (α -EST, E.C.3.1.1-)
5. Glutamate dehydrogenase (GDH, E.C.1.4.1.2)
6. Malate dehydrogenase (MDH, E.C.1.1.1.37)
7. Peroxidase (POX, E.C.1.11.1.7)
8. Shikimic dehydrogenase (SKD, E.C.1.1.1.25)
9. Superoxide dismutase (SOD, E.C.1.15.1.1)

2.3.2.4 การแยกไอโซไซม์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ Polyacrylamide gel แบบ Discontinuous gel โดยมี stacking gel ประกอบด้วย Polyacrylamide 3.5% ใน Tris-HCl pH 6.8 0.125 M และ separating gel ซึ่งประกอบด้วย Polyacrylamide 7.5% ใน Tris-HCl pH 8.9 0.375 M เตรียมได้ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล

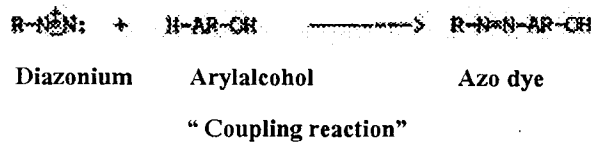
สาร	Stacking gel (ml) 3.5% Acrylamide	Running gel (ml) 7.5% Acrylamide
Acrylamide-bis solution(%)	1.25	3.75
Stacking buffer	2.50	-
Resolving buffer	-	1.875
1.5% Ammoniumpersulphate	0.50	0.75
TEMED	0.01	0.02
H ₂ O	5.75	8.65
Total volume	10.00	15.00

ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสอะคริลอะไมด์เจลแบบอเล็กโตรโฟรีซิส Vertical Slab gel ของบริษัท Atto ในเจลแต่ละช่องจะใส่โปรตีน 15 μg โดยหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดจากใบด้วยวิธีของ Lowry และคณะ (1951) ผสมตัวอย่างกับสี Bromophenol blue ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เจลแต่ละแผ่นสามารถใส่ตัวอย่างได้ 12 ช่องหรือ 12 ตัวอย่าง ทำการทดลองพร้อมกันครั้งละ 2 แผ่น ใช้ 0.025M Tris-HCl 0.192 M Glycine pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์ให้กระแสไฟฟ้าคงที่ 15 mA ผ่านจนกระทั่ง Bromophenol blue เคลื่อนที่ถึงด้านล่างของแผ่นเจล ปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ทำการย้อมเอนไซม์ในแผ่นเจลต่อไป โดยนำแผ่นเจลที่ผ่านการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสมาย้อมเอนไซม์แต่ละชนิด ทั้ง 9 ชนิด ตามวิธีของ Vallejos (1983)

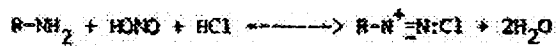
2.3.2.5 การย้อมสีไอโซไซม์

หลักการในการย้อมเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolase เช่น Alkaline phosphatase, Acid phosphatase และ Esterase จะต้องมีสารตั้งต้นของปฏิกิริยา เช่น เอสเทอร์ หรือเอไมด์ เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้น โดยมีเอนไซม์เหล่านี้เป็นตัวเร่งมีผลผลิตของปฏิกิริยาเกิดขึ้น เช่น ในการศึกษาเอนไซม์ฟอสฟาเตส จะใช้ Arylphosphate เป็นสารตั้งต้น เมื่อ Arylphosphate ถูกย่อยทำให้เกิด HPO_4 และ Aryl alcohol การย้อม

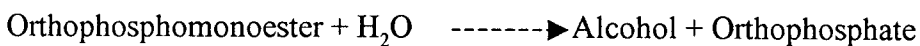
เอนไซม์ฟอสฟาเตสจะทำได้โดยให้ Aryl alcohol ทำปฏิกิริยาควบ (coupling reaction) กับ Diazonium salt เกิดเป็น Azo dye ที่มีสีขึ้นดังปฏิกิริยา



เนื่องจากเกลือ Diazonium มักไม่อยู่ตัวจึงต้องเตรียมขึ้นใหม่ๆก่อนใช้จากปฏิกิริยาดังนี้

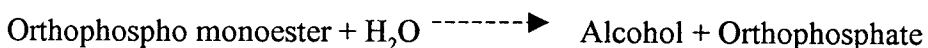


2.3.2.5.1 Acid phosphatase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา



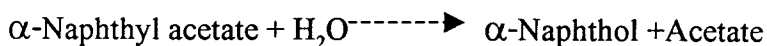
ในการย้อมเอนไซม์นี้ทำได้โดย นำเจลแซใน 50 mM Na Acetate pH 5.5 เวลาประมาณ 15 นาที เพื่อปรับ pH ให้เหมาะสมแล้ว จึงมาย้อมในสารที่เกิดจากการผสม Na Acetate 50 mM pH 5.5 ปริมาตร 100 ml MgCl_2 1 M 1 ml และ MnCl_2 1 M 1 ml Fast blue RR salt 100 mg และ α -Naphthyl acid phosphate 1% 3ml ที่เตรียมใน Acetone 50% การผสมต้องกระทำในที่มืด ทิ้งไว้ 1-7 ชม. จะเห็นแถบสีแดงหรือม่วงดำ

2.3.2.5.2 Alkaline phosphatase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา



ในการย้อมเอนไซม์นี้ใช้ส่วนผสมเช่นเดียวกับ Acid phosphatase แต่ใช้ Tris-HCl 50 mM pH 8.5 ปริมาตร 100 ml แทน Na Acetate pH 5.5 และทำการย้อมเช่นเดียวกับ Acid phosphatase

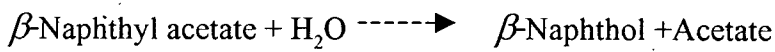
2.3.2.5.3 α -Esterase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา



ในการย้อมเอนไซม์นี้ใช้ Fast blue RR salt 0.05 g. ใน

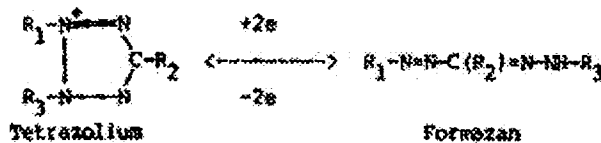
0.1 M Na phosphate buffer pH 6.2 ปริมาตร 100 ml. ผสมกับ α -Naphthyl acetate 0.03 g. ซึ่งเตรียมใน Acetone ปริมาตร 3 ml. ผสมกันเทลงบนแผ่นเจลในที่มีดเขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที

2.3.2.5.4 β -Esterase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา

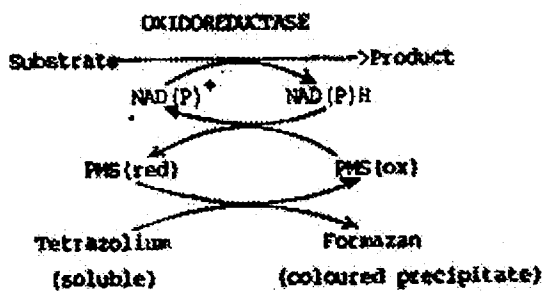


ในการย้อม β -Esterase ทำได้โดยใช้สารที่ย้อมเช่นเดียวกับการย้อม α -Esterase แต่ใช้ β -Naphthyl acetate เป็นสารตั้งต้นแทน α -Naphthyl acetate

เอนไซม์ในกลุ่ม ออกซิโดรีดักเทส ซึ่งได้แก่ Glutamate dehydrogenase, Malate dehydrogenase และ Shikimate dehydrogenase เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ส่งถ่ายอิเล็กตรอนจากสารตั้งต้น ในสภาวะรีดิวซ์ไปยังตัวกลางที่รับอิเล็กตรอนซึ่งมักจะเปลี่ยนเป็น NAD^+ หรือ NADP^+ กลายเป็น NADH หรือ NADPH แล้วไปรีดิวซ์ เตตราโซเลียม (tetrazolium) ได้เป็นฟอร์มามาเซน (formazan) ซึ่งเป็นสารประกอบวงแหวนที่มี C 1 ตัวกับ N 4 ตัวที่มีสีดังปฏิกิริยา

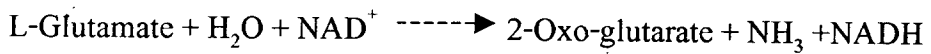


โดยสีในกลุ่มฟอร์มามาเซนซึ่งเป็นดั่งบ่งบอกประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ สีส้มแดง หรือ ม่วงดำ เป็นต้น และในปฏิกิริยาจะต้องมีตัวรับส่ง อิเล็กตรอนซึ่งส่วนใหญ่เป็น $\text{NAD(P}^+)$ และ Phenazine methosulfate (PMS) ทำงานเป็นระบบดังปฏิกิริยา



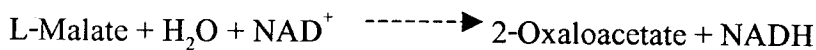
เตตราโซเลียมที่ใช้ในการติดตามปฏิกิริยา Oxidoreductase มีหลายตัวเช่น 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide (MTT), Nitro Blue Tetrazolium (NBT), Triphenyl Tetrazolium chloride (TTC)

2.3.2.5.5 Glutamate dehydrogenase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา



ในการย้อมเอนไซม์นี้ใช้ส่วนผสมซึ่งประกอบด้วย 0.2 M. Phosphate pH 9.2 16 ml. ผสมกับ L-Glutamic acid 1.3 g. และน้ำ 11 ml. NAD 1% 3 ml. และ NBT 1% 1 ml. ผสม PMS 1% 0.25 ml. ลงบนแผ่นเจลในที่มีด เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้จนมีแถบสีฟ้าน้ำเงิน

2.3.2.5.6 Malate dehydrogenase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา



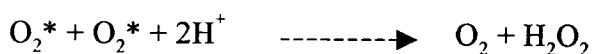
ในการย้อมเอนไซม์นี้ทำโดย ผสม 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 100 ml. 1 M DL-Malic acid pH 7.5 3 ml. และ NAD 1% 3 ml. MTT 1% 2 ml. และ PMS 1% 0.40 ml. ลงบนแผ่นเจลในที่มีด เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30-60 นาที จะเห็นแถบสีน้ำเงิน

2.3.2.5.7 Shikimate dehydrogenase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา



ในการย้อมเอนไซม์ ผสม 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 100 ml. Shikimic Acid 100 mg NADP⁺ 15 mg MTT 1% 2 ml PMS 1% 0.40 ml. เกลลงบนแผ่นเจลในที่มีด เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30-60 นาที จะเห็นแถบสีน้ำเงิน

2.3.2.5.8 Superoxide dismutase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา



การย้อม Superoxide dismutase บริเวณที่เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไม่เกิดสี (negative stain) โดยแสงไฟส่องแผ่นเจลทำให้เกิด superoxide free radicals ไปรีดิวซ์เตตราโซเลียมให้เปลี่ยนเป็น ฟอร์มาเซน สีน้ำเงิน ยกเว้นบริเวณที่มี SOD จะไม่มี superoxide เกิดขึ้น เตตราโซเลียมจึงไม่เปลี่ยนเป็นฟอร์มาเซน บริเวณนั้นจึงใสไม่มีสีในการย้อมเอนไซม์นี้ทำได้โดยแช่เจลในสารผสมซึ่งประกอบด้วย

Tris-HCl 0.2 M. pH 8 40 ml. MgCl₂ 0.5 M. 0.2 ml. NBT 1% 1 ml. และ PMS 1% 1 ml. ที่อุณหภูมิห้องใต้แสงไฟนีออน เป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง จะเกิดแถบใส ๆ บนแผ่นเจล โดยมีพื้นเป็นสีน้ำเงินฟ้า

2.3.2.5.9 Peroxidase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา



การย้อม POX ทำได้โดยอาศัยปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ aromatic amides เช่น *O*-Dianisidine เมื่อมี H₂O₂ และ POX อยู่ด้วยทำให้เกิดสีน้ำตาลส้ม ทำได้โดยนำเจลที่ได้แช่ลงใน สารละลาย 0.5 % *O*-Dianisidine ใน Methanol 10 ml. ผสมกับ 0.05 M. Na acetate buffer pH 5.5 40 ml. เขย่าเบาให้เข้ากัน เติม H₂O₂ 0.2 ml. เขย่าอีกเล็กน้อย เก็บในตู้มืด 30 นาที หรือเมื่อเห็นแถบชัด

2.3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลไอโซไซม์

เมื่อย้อมเอนไซม์ชนิดต่างๆแล้ว นำแผ่นเจลที่ได้มาบันทึกผลทันที คำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์จาก

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R}_p\text{)} = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมฟินอลบลู}}$$

เลือกแถบที่มีความคงที่และชัดเจนมาวิเคราะห์ โดยหากมีแถบปรากฏจะให้คะแนนเป็น 1 และหากไม่ปรากฏจะให้คะแนนเป็น 0 นำมาหาความสัมพันธ์เปรียบเทียบเป็นคู่ๆ (pairwise) โดยใช้ Dice similarity coefficients เป็นตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (Nei *et al.*, 1979 ; Ludwig และ Reynolds, 1988) แล้วใช้โปรแกรม SPSS version 9.01 ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ที่ได้และจัดให้อยู่ในรูปสายสัมพันธ์ โดยวิธี UPGMA (unweighted pair-group method algorithm) และรูปกลุ่มสัมพันธ์ (polar coordination) โดยวิธี Principal component analysis (PCA)

2.3.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดย RAPD

2.3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนมาตัดด้วยกรรไกรให้ได้ 0.05 กรัม และบดให้ละเอียดในครกบดยาที่สะอาด มาสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB 500 μ l บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris-HCl (pH 8) 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 0.7 M, CTAB 1.0% และ β Mercaptoethanol 0.1% อุณหภูมิ 60 °C ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml 30 นาที กลับหลอดไปมาเบาๆ 2-3 ครั้งทุกๆ 10 นาที แล้วเติม Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol อัตราส่วน 25:24:1 500 μ l กลับหลอดไปมาเบาๆประมาณ 20 ครั้ง ตั้งให้แยกชั้นแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูชั้นที่เป็นน้ำ (aqueous phase) ที่อยู่ด้านบน 500 μ l ใส่ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml เติม Rnase ความเข้มข้น 10 mg/ml 2.5 μ l ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C 30 นาที แล้วสกัดดีเอ็นเอด้วย Phenol: Chloroform และ Isoamyl alcohol ซ้ำอีกรอบ ดูชั้นที่เป็นน้ำประมาณ 300 μ l นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 0.6 volume Isopropanol (\approx 180 μ l) ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ค่อยๆ เทชั้นน้ำที่อยู่ด้านบนทิ้งไป ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล 500 μ l นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% 500 μ l ซ้ำอีกรอบ เทชั้นของของเหลวที่อยู่ด้านบนทิ้งไปอย่างระมัดระวัง ค้างหลอดบนกระดาษทิชชูจนภายในหลอดแห้งสนิท และทำให้ตะกอนแห้งยิ่งขึ้นโดยอุณหภูมิ 50 °C ประมาณ 10 นาที เก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่ -20 °C เมื่อจะใช้จึงละลายดีเอ็นเอในน้ำปราศจากเชื้อ และขจัดไอออนออกแล้ว (sterile deionized water) ปริมาตร 30 μ l

2.3.3.2 การตรวจคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอทำได้พร้อมๆกัน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 260 nm คำนวณหาปริมาณของกรดนิวคลีอิกได้ โดยสารละลายดีเอ็นเอ 50 μ g /ml มีค่าดูดกลืนแสงที่ (O.D.) 260 nm (A_{260}) เท่ากับ 1 นอกจากนี้ยังตรวจคุณภาพได้โดยเปรียบเทียบค่า O.D.₂₆₀ และ O.D.₂₈₀ สารละลายดีเอ็นเอคุณภาพดีมีโปรตีนปนเปื้อนน้อยจะมีอัตราส่วนระหว่าง

O.D.₂₆₀/O.D.₂₈₀ ประมาณ 1.7-2.0 หรือตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ตาม 2.3.3.4 ก็ได้

2.3.3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ในเบื้องต้นต้องเลือกหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชตัวอย่างเป็นแม่แบบ การศึกษานี้ได้เลือกไพรเมอร์ที่มีผู้ใช้ในการศึกษา RAPD ของพืชในกลุ่มกระเจียว (Prathepha, 2000) ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

Primer Number	Nucleotide Sequence 5' to 3'	%GC
OPAM-01	TCACGTACGG	60
OPAM-03	CTTCCCTGTG	60
OPAM-12	TCTCACCGTC	60
OPAM-18	ACGGGACTCT	60
OPB-01	GTTTCGCTCC	60
OPB-14	TCCGCTCTGG	70
OPC-01	TTCGAGCCAT	60
OPC-05	GATGACCGCC	70
OPK-05	TCTGTGAGG	60
OPZ-03	CAGCACCGCA	70

นำไพรเมอร์ในตารางนี้มาใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ซึ่งมี *Taq* polymerase เป็นเอนไซม์เชื่อมต่อในปฏิกิริยา เลือกหาสภาวะที่เหมาะสมในสังเคราะห์เพื่อให้ได้สภาพที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยตรวจสอบดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณต่างกันว่า 25 ng, 50 ng และ 100 ng ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ในปฏิกิริยาที่ 3 mM, 4mM และ 5 mM และจำนวนรอบในการทำ PCR พบสภาวะที่เหมาะสมและความเข้มข้นของสารต่างในปฏิกิริยาดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 สารผสมในปฏิกิริยา PCR

สารที่ใช้	ปริมาณ(μ l)
1. DNA (200 ng/ μ l)	0.5
2. Reaction Buffer (10X) (100 mM Tris-HCl (pH 9), 500 mM KCl, 1% Triton X-100)	2.5
3. dNTP(10 mM)	4
4. MgCl ₂ (25 mM)	5
5. primer (1 μ m)	6
6. Taq polymerase (5 Unit/ μ l)	0.5
7. น้ำกลั่น	11.5
8. mineral oil	10
ปริมาตรรวม	30

โดยมีอุณหภูมิและเวลาในการสังเคราะห์ดังนี้คือขั้นที่ 1 อุณหภูมิ 94 °C (สำหรับ denature) ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 36 °C (สำหรับ annealing) 2 นาทีที่ 72 °C (สำหรับ primer extension) ทำซ้ำ 45 รอบ ขั้นที่ 3 อุณหภูมิ 72 °C 4 นาทีเพื่อให้ primer extension สมบูรณ์ เก็บที่ 4°C เพื่อศึกษาดีเอ็นเอที่ได้โดยอิเล็กโตรโฟรีซิสต่อไป

2.3.3.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จาก PCR ในข้อ 2.3.3.3

หรือดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.3.3.1 โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลตรวจสอบการแยกดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.3.3 ในอะกาโรสเจล 1.8% ย้อมดีเอ็นเอในเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เมื่อนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตจะเกิดแถบที่เรืองแสง ส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมจากเนื้อเยื่อพืช (2.3.3.1) จะใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 %

2.3.3.5 การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

ซังอะกาโรส 0.8 กรัมหรือ 1.8 กรัม ขึ้นอยู่กับว่าจะเตรียม

0.8%หรือ 1.8 % เติม TAE 1X บัฟเฟอร์ 100 ml (Tris-base 1 M Glacial acetic acid 0.57 ml และ 0.5 M EDTA 1 ml) อุ่นให้ร้อนเขย่าเป็นครั้งคราวให้อะกาโรสละลายจนหมด ปล่อยให้เย็นลงถึง 50-55°C แล้วเทลงในถาดให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร เสียบหัวลงไปเพื่อทำให้เกิดร่องสำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆดึงหัวออก ใส่ในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟเรซิส ใส่ 1X TAE บัฟเฟอร์ให้ท่วมสูงกว่าผิวเจล 2-3 มิลลิเมตร นำสารละลายดีเอ็นเอหรือสารละลายที่ผ่านการทำ PCR จากข้อ 2.3.3.3 หรือจากพืชในข้อ 2.3.3.1 ปริมาตร 5 μ l ผสมกับ loading buffer (Bromophenol blue 0.25%, Xylene Cyanol 0.25% และ Glycerol 30% 1 μ l) แล้วใส่ในช่องของเจลที่เตรียมไว้ ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิส ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าประมาณ 10 โวลต์ต่อเซนติเมตร ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนไปจนถึงปลายเจลโดยสังเกตจากสีส้มของ Xylene Cyanol ที่ผสมใน loading buffer แล้วจึงปิดเครื่อง

2.3.3.6 การย้อมดีเอ็นเอ

นำเจลมาย้อมในเอซีเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 μ g/ml นาน 10-20 นาทีล้างเอซีเดียมโบรไมด์ออก โดยเปิดน้ำประปาให้ไหลผ่านเบาๆ ประมาณ 5-10 นาที ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต แล้วถ่ายภาพเก็บไว้ด้วยกล้องโพลาไรซ์

2.3.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล RAPD

เลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความคงที่และชัดเจนมาวิเคราะห์

หาขนาดโมเลกุลโดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ในการวิเคราะห์นั้นหากมีแถบปรากฏจะให้คะแนนเป็น 1 และหากไม่ปรากฏแถบในตัวอย่างจะให้คะแนนเป็น 0 เปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ของตัวอย่างเป็นคู่ๆ โดยใช้ Dice similarity coefficients เป็นตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาแล้วใช้โปรแกรม SPSS version 9.01 ในการวิเคราะห์ นำความสัมพันธ์ที่ได้จัดให้อยู่ในรูปสายสัมพันธ์โดยวิธี UPGMA และรูปกลุ่มสัมพันธ์ PCA เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ผลจากไอโซไซม์อิเล็กโทรโฟเรซิส

3. ผลการทดลอง

3.1 การวิเคราะห์ความแตกต่างจากลักษณะสัณฐานภายนอก

จากพืชตัวอย่าง 19 ชนิดที่เก็บจากบริเวณต่างๆ ดังตารางที่ 3 รูปที่ 30 ในช่วงเดือนพฤษภาคม-กรกฎาคม 2542 นำมาศึกษาลักษณะสัณฐานภายนอกและแยกชนิด รวมทั้งสังเกตลักษณะสัณฐานภายนอก 15 ลักษณะ (characters) โดยแบ่งการพิจารณาเป็น 2 สถานะ และใช้เลข 1 และ 0 แสดงสถานะ ดังตารางที่ 9 เปรียบเทียบและให้คะแนนลักษณะที่สนใจ โดยใช้เมทริกซ์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของพืชและลักษณะสัณฐานภายนอกที่ใช้วิเคราะห์ ดังตารางที่ 10

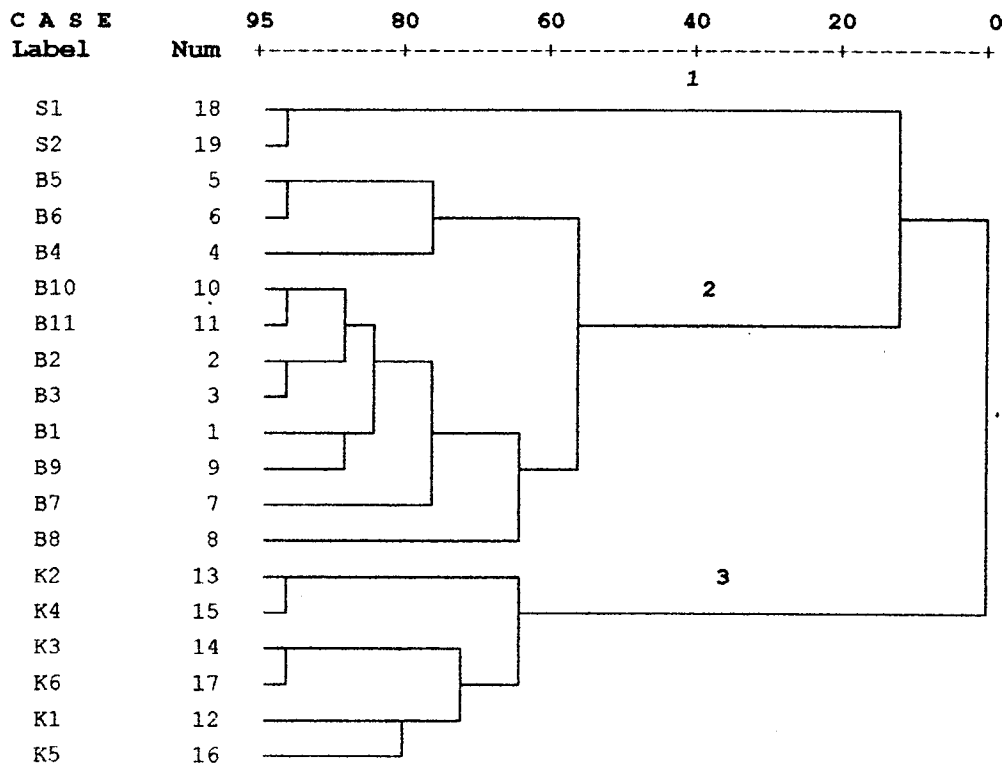
ตารางที่ 9 ลักษณะสัณฐานภายนอกที่ใช้วิเคราะห์

ลักษณะ	สถานะ	
1. เหง้าใต้ดิน	อวบ,สั้น (1)	ยืดยาว (0)
2. ลำต้นเหนือดิน	< 20 cm (1)	≥ 20 cm (0)
3. จำนวนใบ	< 5 (1)	≥ 5 (0)
4. ตำแหน่งช่อดอก	กาบใบคู่ในสุด (1)	กาบใบด้านข้าง (0)
5. ก้านช่อดอก	< 2 mm (1)	≥ 2 mm (0)
6. จำนวนดอก	< 10 (1)	≥ 10 (0)
7. กลีบปาก	กระเปาะ (1)	แผ่นแบน (0)
8. การแยกของกลีบปาก	ร่องลึก (1)	ร่องตื้น (0)
9. สีของกลีบปาก	เหลือง/แดง (1)	ขาว/ม่วง (0)
10. lateral staminodes	ขาว (1)	ม่วง (0)
11. ก้านเกสรตัวผู้	< 5 mm (1)	≥ 5 mm (0)
12. ระยางค์อับเรณู	ใหญ่ (1)	เล็ก/ลดรูป (0)
13. ก้านเกสรตัวเมีย	< 5 mm (1)	≥ 5 mm (0)
14. รังไข่	3 ห้อง (1)	< 3 ห้อง (0)
15. ผิวรังไข่	เรียบ (1)	ขรุขระ (0)

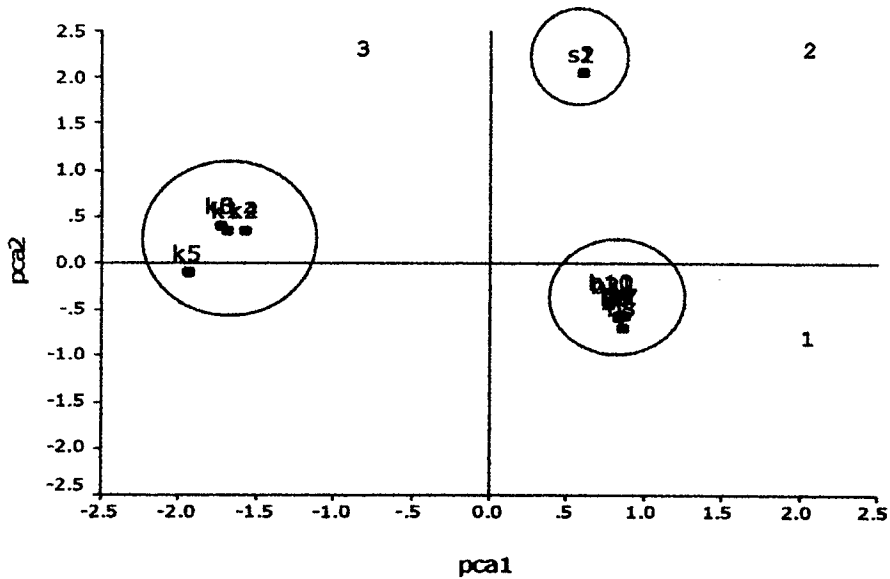
ตารางที่ 10 เมทริกซ์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของพืชและลักษณะสัญญาณ
ภายนอกที่ใช้พิจารณา (เลขแสดงสถานะอ้างอิงจากตารางที่ 9)

ชนิด	ลักษณะ														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
B1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
B2	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
B3	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1
B4	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0
B5	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
B6	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0
B7	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1
B8	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0
B9	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
B10	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
B11	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1
K1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
K2	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
K3	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
K4	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
K5	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
K6	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
S1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1
S2	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0

นำผลที่ได้จากตารางที่ 10 มาวิเคราะห์ พบว่า *B. curtisii* กาบใบดำและกาบใบขาว (B2, B3) มีลักษณะสัณฐานภายนอกเหมือนกัน เช่นเดียวกับ *B. plicata* ดอกแดงและดอกเหลือง (B5, B6) ซึ่งไม่สามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้ลักษณะสัณฐานภายนอกในการพิจารณา และเมื่อหาความสัมพันธ์โดยใช้ค่าคล้ายคลึง และนำไปคำนวณเป็น distance matrix เพื่อนำไปสร้างเป็นความสัมพันธ์ที่ได้แสดงไว้ดังรูปที่ 31 สามารถพิจารณาได้เป็นความสัมพันธ์ในรูปของสายสัมพันธ์ รูปที่ 31 ก พบว่าสามารถแยกพืชตัวอย่างออกได้เป็นสามสายสัมพันธ์ใหญ่ๆ ซึ่งในแต่ละสายสัมพันธ์จะเป็นกลุ่มของพืชในสกุลนั้นๆ พบว่าสายสัมพันธ์แรกเป็นพืชในกลุ่ม *Scaphochlamys* ซึ่งใกล้ชิดกับสายสัมพันธ์ที่สองที่เป็นพืชในกลุ่มกระชายมากกว่าสายสัมพันธ์ที่สาม ซึ่งเป็นพืชในกลุ่มเปราะ สายสัมพันธ์ของสกุลกระชายสามารถแบ่งออกได้เป็นสองสายสัมพันธ์ย่อย เช่นเดียวกับพืชในกลุ่มเปราะ และในรูปที่ 31 ข แสดงผลในรูปกลุ่มของความสัมพันธ์วิเคราะห์โดยใช้ PCA พบว่าผลที่ได้จะสอดคล้องกับสายสัมพันธ์ในรูป 31 ก โดยพืชตัวอย่างสามารถแยกออกได้เป็นสามกลุ่มแต่ละกลุ่มจะเป็นพืชแต่ละสกุล พบว่ากลุ่มของ *Scaphochlamys* ยังคงใกล้ชิดกับกลุ่มของกระชายโดยเข้ามาอยู่ในแกนด้านเดียวกับกลุ่มกระชาย ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานภายนอก พบว่าพืชในกลุ่มของ *Scaphochlamys* ใกล้ชิดกับพืชในกลุ่มกระชายมากกว่าในกลุ่มของเปราะ



ก



ข

รูปที่ 31 ความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่างที่ใช้ศึกษาโดยอาศัยลักษณะสัณฐานภายนอก

ก แสดงสายสัมพันธ์ของพืชตัวอย่างโดยวิธี UPGMA

ข แสดงกลุ่มความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่างโดยวิธี PCA

3.2 การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์

3.2.1 การสกัดไอโซไซม์

ในการสกัดไอโซไซม์เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาคั้งนี้ได้ทำการสกัดจากใบมีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง ไม่แก่เกินไปซึ่งพยายามให้อยู่ในระยะใกล้เคียงกัน โดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักของใบพืชตัวอย่าง 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร พบว่าปริมาณของโปรตีนโดยเฉลี่ยในพืชตัวอย่างแต่ละชนิดมีปริมาณสูงพอที่จะนำมาใช้ในการศึกษาไอโซไซม์ได้ ซึ่งในการศึกษาจะเจือจางให้มีโปรตีนในสารตัวอย่าง 15 μg ในแต่ละตัวอย่างสำหรับการทดลอง

3.2.2 การเก็บรักษาสารตัวอย่าง

การเก็บรักษาสารตัวอย่างที่สกัดได้เพื่อทำการศึกษาไอโซไซม์ในครั้งนี้จะเก็บเอนไซม์ไว้ที่ -20°C เนื่องจากพบว่าหลังจากนำมาข้อมเอนไซม์ชนิดต่าง โดยส่วนใหญ่รูปแบบของแถบไอโซไซม์ที่ได้จะมีความชัดเจนต่อการวิเคราะห์ การเก็บสารสกัดไว้ที่ -20°C สามารถนำมาใช้ทำการศึกษาได้ประมาณ 3 เดือน พบว่ารูปแบบของไอโซไซม์ส่วนใหญ่ค่อนข้างคงเดิมแต่ความชัดเจนลดลงเล็กน้อย และหากเก็บที่อุณหภูมิ 0°C ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับทำการศึกษาจะอยู่ที่ประมาณ 2-3 อาทิตย์ แล้วแต่ชนิดของเอนไซม์ โดยหลังจากนั้นรูปแบบของแถบที่ได้จะจางลงและบางตำแหน่งหายไป เช่น เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พบว่าแถบที่เกิดบริเวณ POX-1 จะหายไปเกือบทุกชนิดของพืชตัวอย่าง ดังนั้นในการศึกษาไอโซไซม์ในครั้งนี้จะเก็บเอนไซม์ไว้ที่ -20°C และทำการสกัดเอนไซม์ทุกๆ 3 เดือน ตลอดหนึ่งปีเพื่อตรวจสอบความคงตัวของเอนไซม์ นอกจากนี้ในการศึกษาไอโซไซม์หลังจากทำการสกัดเอนไซม์จะทำการหาปริมาณโปรตีน และแยกสารตัวอย่างไว้เป็นส่วนๆ โดยแต่ละส่วนมีความเข้มข้นประมาณ 15 μg สำหรับแต่ละการทดลอง เพื่อหลีกเลี่ยงการเสียสภาพของเอนไซม์จากการละลาย และแช่แข็งหลายครั้งซึ่งอาจทำให้ความชัดเจนของแถบลดลง การพิจารณาผลที่ได้ อาจไม่ถูกต้อง

3.2.3 การตรวจสอบไอโซไซม์ชนิดต่างๆ

การข้อมเอนไซม์ชนิดต่างๆในครั้งนี้จะเลือกเอนไซม์ที่ให้รูปแบบที่หลากหลายและมีความคงตัวในการศึกษา เบื้องต้นจะเลือกใช้เอนไซม์ 9 ชนิดจากเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส ได้แก่ แอซิดฟอสฟาเทส, อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส, แอลฟา-เอสเทอร์เรส,

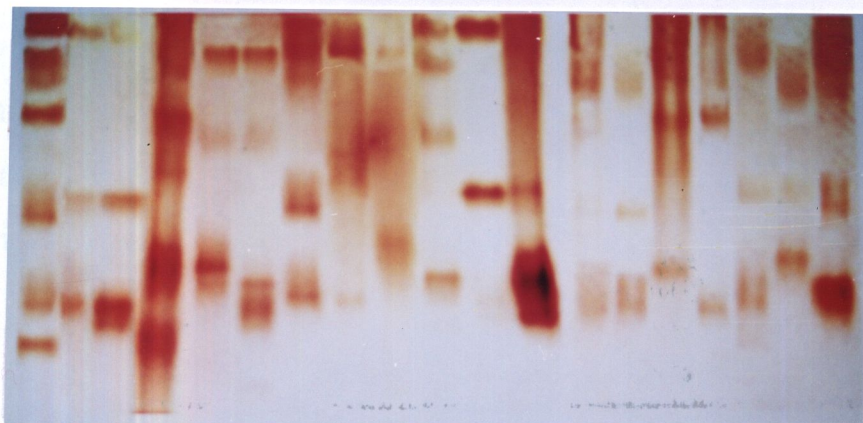
เบตา-เอสเทอร์ส และ กลุ่มออกซิโครีดักเทส คือ เปอร์ออกซิเดส, ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส, กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนส, มาเลทดีไฮโดรจีเนส, และ ซิซิเมทดีไฮโดรจีเนส ในกลุ่มไฮโดรเลส พบว่าแอซิดฟอสฟาเทส และอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส ไม่แสดงรูปแบบของไอโซไซม์ให้เห็น ส่วนเบตา-เอสเทอร์ส และแอลฟา-เอสเทอร์ส รูปแบบของไอโซไซม์ที่ได้ไม่สามารถนำมาใช้พิจารณาหาความแตกต่าง เนื่องจากเป็นป็นยาว ไม่แยกเป็นแถบชัดเจน ยากต่อการพิจารณาและวิเคราะห์ผล ส่วนในกลุ่มออกซิโครีดักเทส พบว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่ย่อยมอด และรูปแบบที่ได้หลากหลายโดยเฉพาะเปอร์ออกซิเดสและซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส ยกเว้นซิซิเมทดีไฮโดรจีเนสที่ย้อมไม่ติด

3.2.4 รูปแบบของไอโซไซม์ที่ได้จากการศึกษา

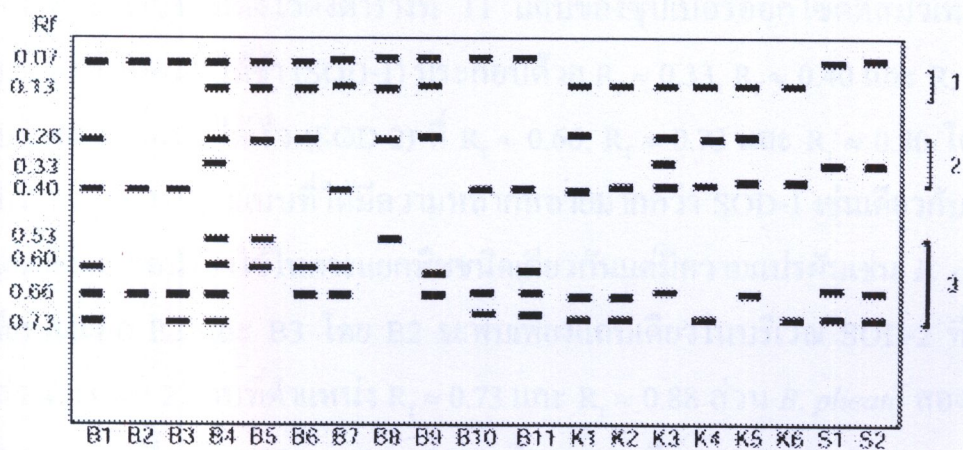
ลักษณะแถบที่ได้จากการย้อมเอนไซม์ชนิดต่างๆ แสดงไว้ดังรูปที่ 32-35

3.2.4.1 เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

จากการศึกษารูปแบบของไอโซไซม์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส ทั้ง 12 ครั้งของการทดลองทุก 3 เดือนตลอดทั้งปี พบว่าเปอร์ออกซิเดสเป็นไอโซไซม์ที่ให้รูปแบบหลากหลายมากที่สุด ในเอนไซม์ 4 ชนิด มีความคงตัวสูงพิจารณาจากความถี่ที่พบแถบดังตารางที่ 11 แบบแผนของเอนไซม์ที่ได้ ดังรูปที่ 32 ก และ 32 ข ซึ่งรูปแบบของแถบที่ได้พิจารณาได้เป็นสามบริเวณ บริเวณแรก (POX-1) เป็นบริเวณที่เคลื่อนที่ได้ช้าที่สุดมีค่า R_f สองค่าคือ $R_f \approx 0.07$ และ $R_f \approx 0.13$ ในพืชสกุลเปราะพบเพียงแถบเดียวที่ในบริเวณนี้ที่ $R_f \approx 0.13$ ส่วนสกุลกระชายแยกได้เป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่พบทั้ง 2 แถบได้แก่ B4, B5, B6, B7, B8 และ B9 ส่วนที่เหลือจะพบเพียงแถบเดียวที่ตำแหน่ง $R_f \approx 0.07$ ซึ่งมีรูปแบบเช่นเดียวกันกับพืชในสกุล *Scaphochlamys* ทั้งสองชนิด ส่วนในบริเวณที่สอง (POX-2) และสาม (POX-3) นั้นรูปแบบของแถบที่ได้มีความหลากหลายแตกต่างกัน พบว่าบริเวณ POX-3 สามารถนำมาในการแยกพืชชนิดเดียวกันในสกุลกระชายได้ ความแปรผันทางด้านพันธุกรรมนี้ สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายในการแยกพืชในกลุ่ม *B. curtisii* (B2, B3) ทั้งสองลักษณะออกจากกันได้ โดย B2 พบเพียงแถบเดียวที่ $R_f \approx 0.66$ ส่วน B3 พบ 2 ค่าที่ $R_f \approx 0.66$ และ $R_f \approx 0.73$ และในกลุ่มของ *B. plicata* ทั้ง 2 ลักษณะ



ก



ข

รูปที่ 32 รูปแบบของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส

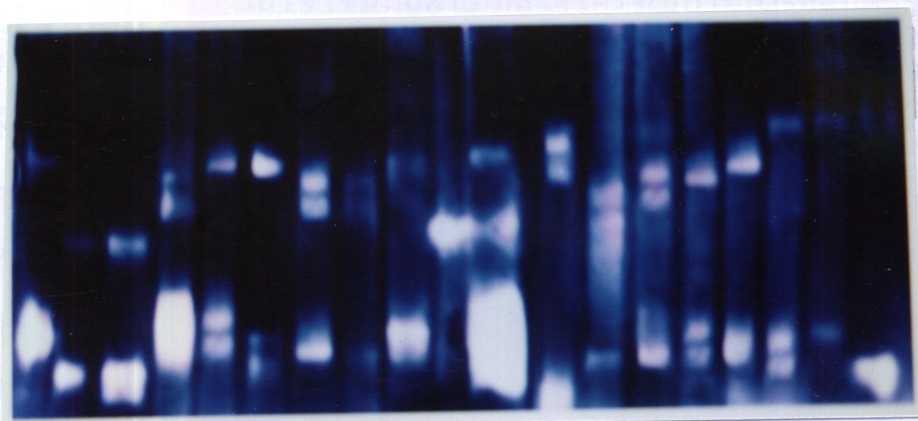
ก ภาพจากการย้อมไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส

ข โซโมแกรมของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส

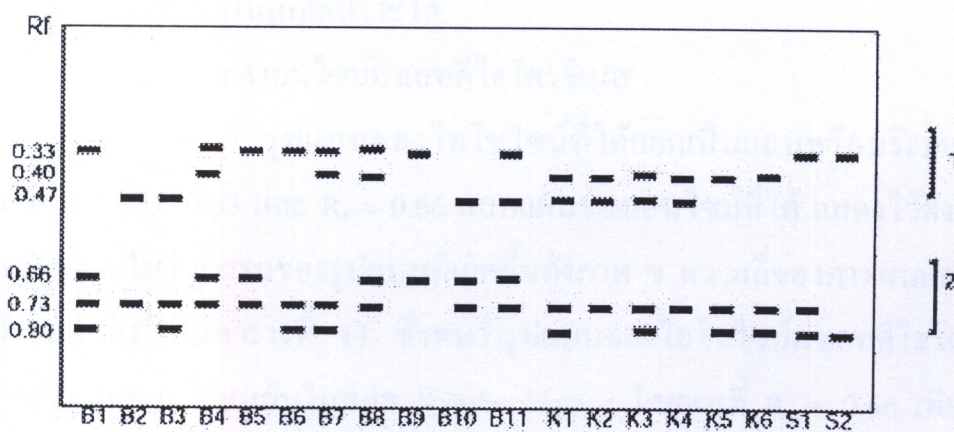
คือ B5 และ B6 โดย B5 พบแถบที่ $R_f \approx 0.53$ และ $R_f \approx 0.60$ ส่วน B6 พบที่ $R_f \approx 0.60$ และ $R_f \approx 0.66$ กลุ่มพืชในสกุลเปราะ พบว่ารูปแบบของแถบที่ได้ในพืชตัวอย่างแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ส่วนใน *Scaphochlamys* พบว่าทั้ง 2 ชนิดให้รูปแบบของแถบที่เหมือนกันทั้ง 3 บริเวณ ดังนั้นเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ไม่สามารถบอกความแตกต่างของพืชตัวอย่างในกลุ่มของ *Scaphochlamys* ได้

3.2.4.2 เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

จากการศึกษาไอโซไซม์ของซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสพบว่ารูปแบบของแถบที่ได้สามารถแยกพิจารณาได้เป็นสองบริเวณ โดยแบบแผนของเอนไซม์ที่ได้ดังรูปที่ 33 ก และลักษณะไซโมแกรมดังรูปที่ 33 ข รวมทั้งความถี่ของการพบแถบในแต่ละบริเวณแสดงไว้ดังตารางที่ 11 แถบของซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส แบ่งเป็นบริเวณที่เคลื่อนที่ได้ช้า (SOD-1) ประกอบด้วย $R_f \approx 0.33$, $R_f \approx 0.40$ และ $R_f \approx 0.47$ และบริเวณที่เคลื่อนที่ได้เร็ว (SOD-2) ที่ $R_f \approx 0.66$, $R_f \approx 0.73$ และ $R_f \approx 0.80$ โดยเฉพาะในบริเวณ SOD-2 รูปแบบที่ได้มีความหลากหลายมากกว่า SOD-1 เช่นเดียวกับเปอร์ออกซิเดสที่สามารถนำมาใช้ในการแยกพืชชนิดเดียวกันแต่มีความแปรผันเช่น *B. curtisii* สองลักษณะคือ B2 และ B3 โดย B2 จะพบเพียงแถบเดียวในบริเวณ SOD-2 ที่ $R_f \approx 0.73$ ส่วน B3 พบ 2 แถบที่ตำแหน่ง $R_f \approx 0.73$ และ $R_f \approx 0.88$ ส่วน *B. plicata* สองลักษณะคือ B5 พบแถบที่ $R_f \approx 0.66$ และ $R_f \approx 0.73$ ชนิด B6 พบที่ $R_f \approx 0.73$ และ $R_f \approx 0.80$ ส่วนกลุ่มของพืชในสกุลเปราะพบว่ารูปแบบของแถบที่ได้ในพืชตัวอย่างแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ยกเว้นในชนิด K5 และ K6 ในสกุล *Scaphochlamys* ทั้ง 2 ชนิดพบว่ารูปแบบที่ได้มีความต่างกัน โดยชนิด S1 พบที่ $R_f \approx 0.73$ และ $R_f \approx 0.80$ ส่วนชนิด S2 พบเฉพาะที่ค่า $R_f \approx 0.73$ ดังนั้นไอโซไซม์ชนิดนี้จึงนับว่ามีความหลากหลายในพืชทุกกลุ่มเกือบทุกชนิด



ก



ข

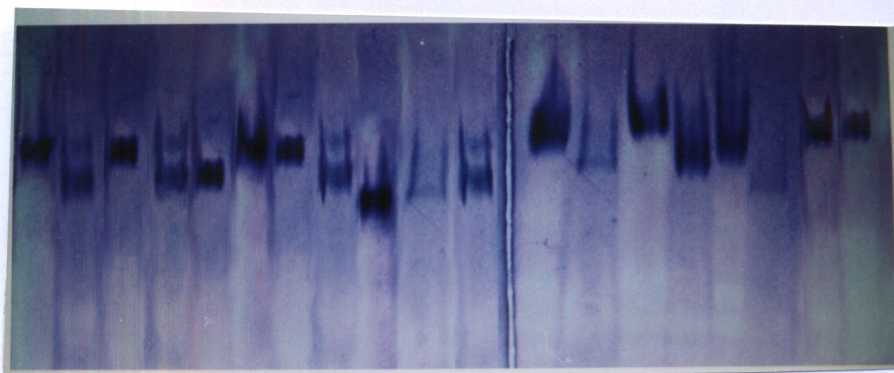
รูปที่ 33 รูปแบบของไอโซไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส
 ก ภาพจากการข้อมไอโซไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส
 ข โซโมแกรมของไอโซไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

3.2.4.3 เอนไซม์กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส

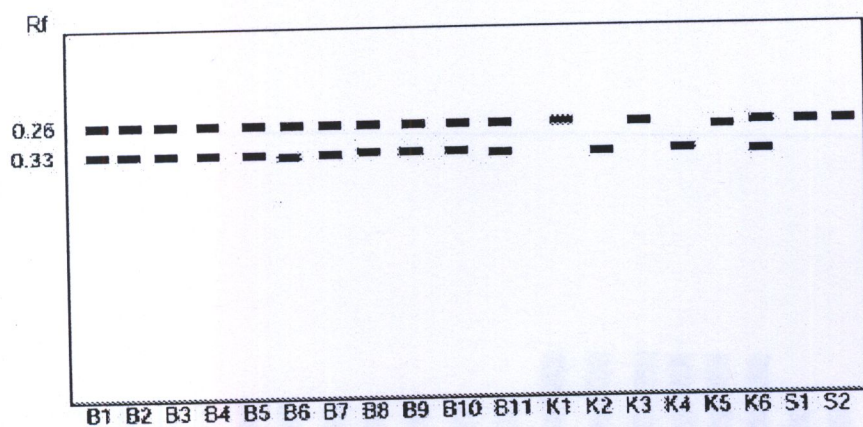
ไอโซไซม์กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนสในการย้อมส่วนใหญ่พบว่าแถบที่ได้ค่อนข้างจางและตึดยากและปรากฏให้เห็นเพียง 1-2 โดยแบบแผนของเอนไซม์ที่ได้ แสดงไว้ดังรูปที่ 34 ก และลักษณะไซโมแกรมของแถบที่เกิดขึ้นดังภาพ ข โดยความถี่ของการพบแถบในแต่ละบริเวณแสดงไว้ดังตารางที่ 11 พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้เคลื่อนที่ได้น้อยในสนามไฟฟ้า ค่า R_f ที่พบคือ $R_f \approx 0.26$ และ $R_f \approx 0.33$ จากการศึกษาพบว่ารูปแบบของแถบที่ได้ในพืชสกุลกระชายไม่แตกต่างกันโดยพบค่า R_f ทั้งสองตำแหน่งส่วนในสกุลเปราะมีเพียงชนิดเดียวคือ K6 ที่พบทั้งสองแถบส่วน K1, K3 และ K5 พบที่ $R_f \approx 0.26$ รวมทั้ง *Scaphochlamys* ทั้ง 2 ชนิด ส่วน K2 และ K4 พบที่ $R_f \approx 0.33$ ดังนั้นรูปแบบของไอโซไซม์กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนสแม้ว่าจะมีความหลากหลายของแถบไม่มากนัก แต่พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบในระดับสกุลได้ดี และสามารถนำมาใช้จำแนกพืชตัวอย่างบางชนิดในสกุลเปราะได้

3.2.4.4 เอนไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส

รูปแบบของไอโซไซม์ที่ได้แยกเป็นแถบหรือบริเวณได้เป็น 2 ตำแหน่งที่ $R_f \approx 0.53$ และ $R_f \approx 0.66$ แบบแผนของเอนไซม์ที่ได้ แสดงไว้ดังรูปที่ 35 ก และลักษณะไซโมแกรมของรูปแบบที่เกิดขึ้นดังภาพ ข ความถี่ของการพบแถบในแต่ละบริเวณแสดงไว้ดังตารางที่ 11 ซึ่งพบว่ารูปแบบของไอโซไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนสในสกุลกระชายจะเหมือนกับในสกุล *Scaphochlamys* โดยพบที่ $R_f \approx 0.66$ เพียงตำแหน่งเดียว ส่วนในสกุลเปราะจะพบทั้งสองตำแหน่งและจากการตรวจสอบพบว่ามาเลตดีไฮโดรจีเนสไอโซไซม์จะย้อมติดได้ง่าย และมีความคงตัวในสกุลเปราะมากกว่ากลุ่มสกุลกระชายและสกุล *Scaphochlamys* ดังนั้นรูปแบบของไอโซไซม์ชนิดนี้จึงเหมาะที่จะนำมาช่วยในการตรวจสอบระดับสกุลมากกว่าในระดับชนิดของพืชกลุ่มนี้

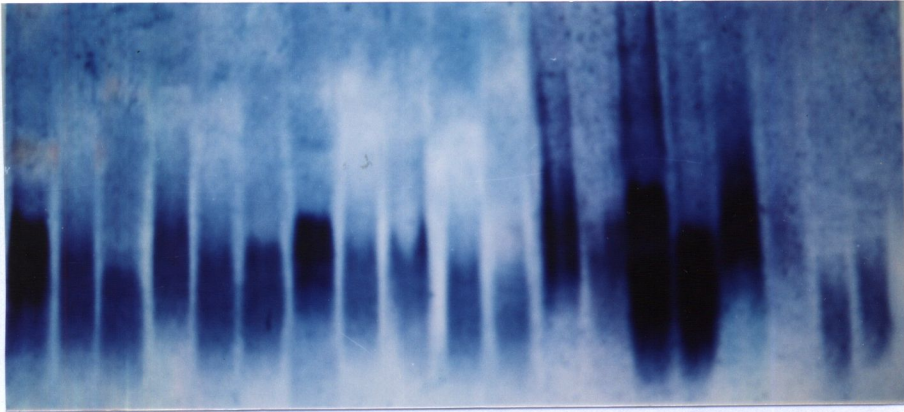


ก

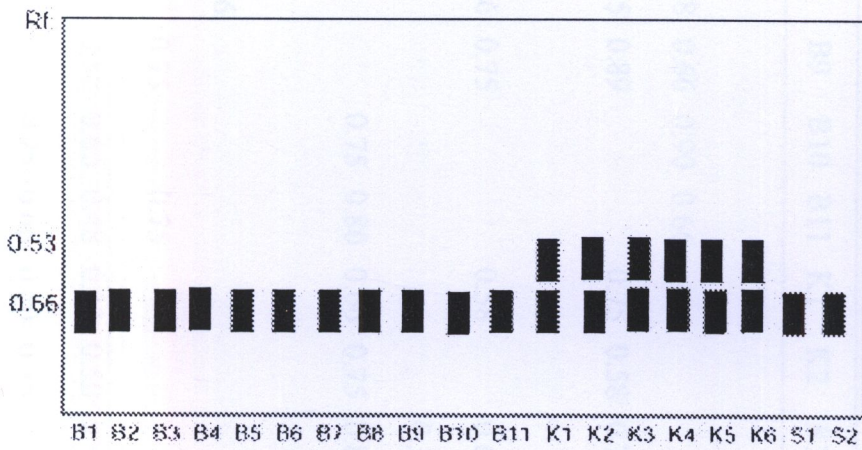


ข

รูปที่ 34 รูปแบบของไอโซไซม์กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส
 ก ภาพจากการย้อมไอโซไซม์กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส
 ข โซโมแกรมของไอโซไซม์กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส



ก



ข

รูปที่ 35 รูปแบบของไอโซไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส

- ก ภาพจากการย้อมไอโซไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส
- ข ไซโมแกรมของไอโซไซม์มาเลตดีไฮโดรจีเนส

ตารางที่ 11 ความถี่ของตำแหน่งที่พบไอโซไซม์

ตำแหน่ง (R _i)	ชนิด B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	K1	K2	K3	K4	K5	K6	S1	S2	
POX1																				
0.07	0.66	0.75	0.66	0.85	0.90	0.85	0.75	0.88	0.66	0.90	0.66								0.75	0.66
0.13				0.66	0.75	0.58	0.66	0.85	0.89			0.75	0.58	0.75	0.66	0.70	0.66			
POX2																				
0.26	0.58			0.75	0.88	0.95		0.66	0.75			0.58		0.66	0.58	0.50				
0.33				0.66										0.33				0.66	0.58	
0.40	0.75	0.66	0.66							0.75	0.80	0.66	0.75	0.80	0.58	0.75	0.66			
POX3																				
0.53				0.80	0.50			0.66												
0.60	0.75			0.75	0.66	0.75	0.58		0.75		0.75									
0.66	0.66	0.75	0.80	0.86		0.75	0.70		0.58	0.66	0.48	0.33	0.50	0.44		0.50		0.66	0.50	
0.73	0.75			0.75	0.80					0.75	0.66	0.50	0.75		0.50			0.66	0.75	0.66

ตารางที่ 11 ความถี่ของตำแหน่งที่พบไอโซไซม์ (ต่อ)

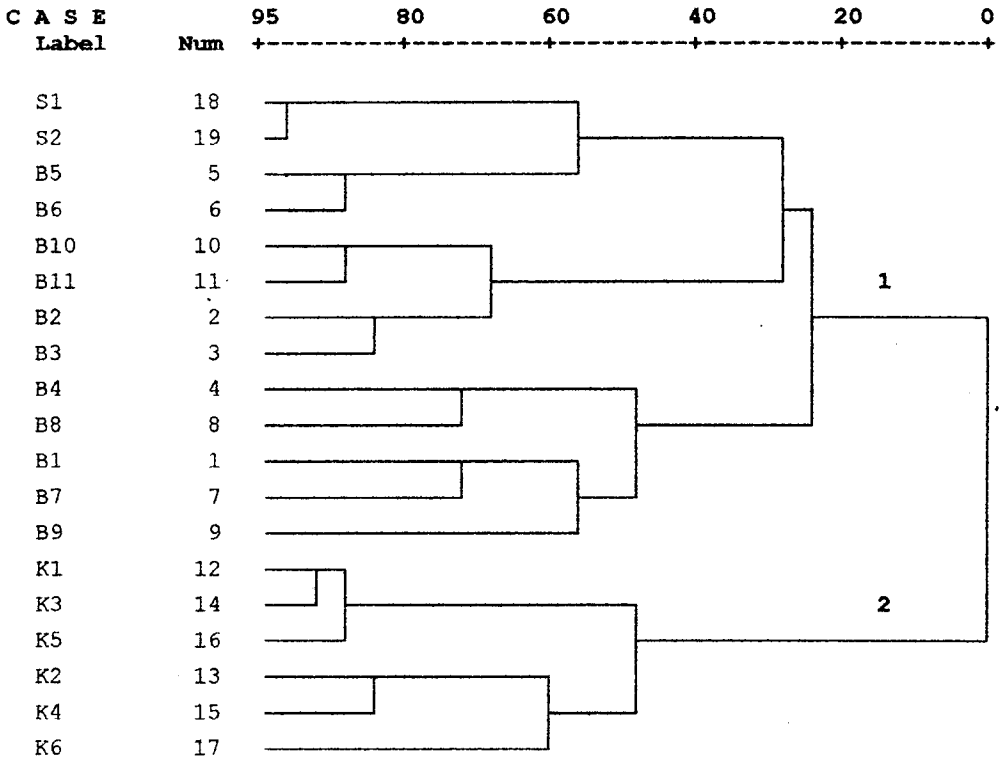
ตำแหน่ง (R)	ชนิด	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	K1	K2	K3	K4	K5	K6	S1	S2	
SOD1	0.33	0.66			0.75	0.66	0.75	0.58	0.75	0.66		0.58								0.66	0.58
	0.40				0.66				0.66	0.66			0.58	0.66	0.75	0.66	0.66	0.50			
	0.47		0.75	0.66							0.58	0.66	0.25	0.16	0.33	0.42					
SOD2	0.66	0.66			0.58	0.66			0.66	0.75	0.66	0.58									
	0.73	0.42	0.83	0.83	0.58	0.66	0.50	0.50	0.66	0.75	0.75	0.58	0.50	0.50	0.33	0.66	0.42	0.50	0.58	0.58	0.58
	0.80	0.66		0.83			0.60	0.58					0.66		0.42		0.58	0.42	0.66	0.33	0.33
GDH	0.26	0.75	0.75	0.66	0.42	0.42	0.50	0.42	0.33	0.42	0.50	0.58								0.42	0.33
	0.33	0.66	0.50	0.66	0.58	0.42	0.58	0.50	0.42	0.50	0.66	0.50	0.66	0.75	0.75	0.66	0.75	0.66			
MDH	0.53												0.75	0.75	0.80	0.75	0.80	0.75			
	0.66	0.42	0.33	0.50	0.42	0.42	0.33	0.50	0.33	0.33	0.42	0.50	0.75	0.80	0.75	0.75	0.75	0.66	0.42	0.33	0.33

3.2.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่างโดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์

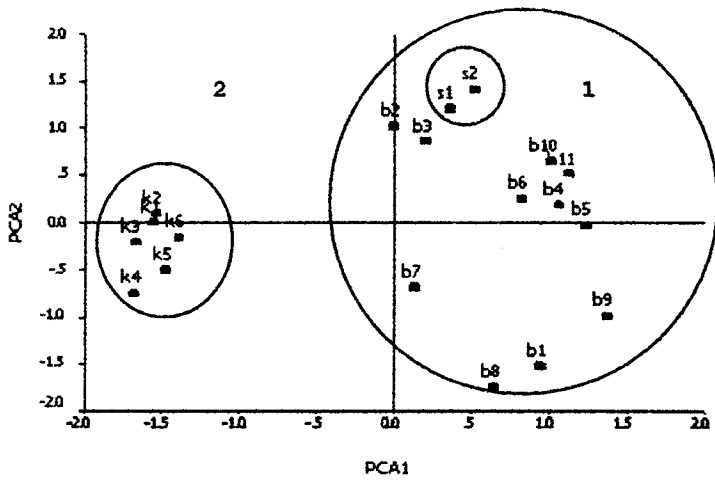
เลือกแถบที่มีความคงตัวและชัดเจน 20 แถบของรูปแบบไอโซไซม์ที่ได้จากเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มาพิจารณาหาดัชนีความคล้ายคลึง โดยใช้ Dice index ค่าที่ได้แสดงไว้ดังตารางที่ 12 จากการใช้รูปแบบของไอโซไซม์ พบว่าช่วงค่าความคล้ายคลึงของพืชตัวอย่างทั้งสามสกุลคือ 31.1-94.7% และเมื่อแยกพิจารณาในแต่ละกลุ่มพบว่าในกลุ่มสกุลกระชายมีความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง 47.6%-90.9% กลุ่มสกุลเปราะอยู่ในช่วง 45.5-90.9% กลุ่มสกุล *Scaphochlamys* 94.7% หากพิจารณาโดยดูความสัมพันธ์ในแต่ละกลุ่ม พบว่าค่าความคล้ายคลึงระหว่างสกุลกระชายกับสกุลเปราะอยู่ในช่วง 40%-72% ระหว่างสกุลกระชายกับสกุล *Scaphochlamys* 40-85.7% และระหว่างสกุลเปราะกับสกุล *Scaphochlamys* คือ 42.1-63.8% จากนั้นนำค่า SI ที่ได้ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ในรูปแบบของสายสัมพันธ์โดยวิธี UPGMA ดังรูปที่ 36 ก พบว่าสามารถแยกได้ความสัมพันธ์ได้เป็นสองสายสัมพันธ์ใหญ่ๆ ซึ่งพืชในสกุล *Scaphochlamys* อยู่ในสายเดียวกับพืชในสกุลกระชาย สามารถแยกได้เป็น 3 สายสัมพันธ์ย่อย ส่วนกลุ่มเปราะแยกไปอยู่ในสายสัมพันธ์ที่สองและแบ่งเป็น สองสัมพันธ์ย่อย และรูปของกลุ่มสัมพันธ์ที่แสดงไว้ในรูปที่ 36 ข โดยการวิเคราะห์ด้วยวิธี PCA พบว่าลักษณะความสัมพันธ์ที่ได้จะสอดคล้องกับรูปของสายสัมพันธ์ โดยพืชในสกุล *Scaphochlamys* จะเข้ามาอยู่ในส่วนหรือกลุ่มเดียวกับพืชในสกุลกระชาย สามารถแยกได้เป็น 2 ส่วนย่อย ส่วนในสกุลเปราะจะแยกไปอยู่รวมกัน

ตารางที่ 12 Similarity index ของพืชตัวอย่าง 19 ชนิด จาก Dice index โดยใช้รูปแบบของไอโซโทป

ชนิด	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	K1	K2	K3	K4	K5	K6	S1	S2
B1	1.000																		
B2	.667	1.000																	
B3	.783	.889	1.000																
B4	.786	.522	.560	1.000															
B5	.750	.632	.667	.846	1.000														
B6	.750	.632	.762	.769	.909	1.000													
B7	.846	.667	.696	.786	.667	.750	1.000												
B8	.667	.526	.476	.846	.727	.636	.750	1.000											
B9	.783	.556	.500	.800	.762	.667	.783	.762	1.000										
B10	.783	.889	.800	.640	.667	.571	.696	.571	.700	1.000									
B11	.880	.800	.818	.741	.783	.696	.720	.609	.727	.909	1.000								
K1	.640	.600	.727	.593	.522	.609	.720	.522	.455	.545	.583	1.000							
K2	.522	.667	.700	.560	.571	.571	.609	.476	.400	.600	.636	.818	1.000						
K3	.560	.600	.636	.593	.522	.609	.720	.522	.455	.545	.500	.917	.727	1.000					
K4	.522	.556	.600	.560	.476	.476	.609	.571	.400	.500	.545	.818	.900	.727	1.000				
K5	.609	.556	.600	.560	.476	.571	.783	.571	.500	.500	.455	.909	.700	.909	.700	1.000			
K6	.609	.556	.700	.560	.571	.667	.696	.571	.400	.500	.545	.818	.800	.727	.800	.800	1.000		
S1	.783	.667	.800	.640	.762	.857	.696	.476	.500	.600	.727	.636	.500	.636	.400	.600	.600	1.000	
S2	.727	.588	.737	.583	.700	.800	.636	.400	.526	.526	.667	.571	.421	.571	.316	.526	.526	.947	1.000



ก



ข

รูปที่ 36 ความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่างที่ใช้ศึกษาโดยอาศัยรูปแบบไอโซไซม์
 ก แสดงสายสัมพันธ์ของพืชตัวอย่าง โดยวิธี UPGMA
 ข แสดงกลุ่มความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่าง โดยวิธี PCA

3.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ผลจากการสกัดดีเอ็นเอซึ่งประยุกต์จากวิธี Doyle และ Doyle (1987) ตามข้อ 2.3.3.1 พบว่าปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้จากพืชตัวอย่างส่วนใหญ่ สามารถนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR แต่ในพืชชนิดบางชนิดได้แก่ B9, B11, K1, K4, S1 และ S2 ต้องทำการสกัดซ้ำโดยนำตะกอนที่ได้มาทำการสกัดด้วย CTAB บัฟเฟอร์ จนตะกอนที่ได้ไม่มีสี พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จะมีอัตราส่วนระหว่าง $O.D._{260}/O.D._{280}$ 1.7-2.0 และปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ประมาณ 240 $\mu\text{g/g}$ ของน้ำหนักสดเก็บดีเอ็นเอได้ในรูปของตะกอนที่ -20°C เมื่อจะใช้จึงนำมาละลายในน้ำกลั่นที่สะอาดซึ่งกำจัดไอออนออกแล้ว

3.3.2 การทดสอบหาสภาวะเหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

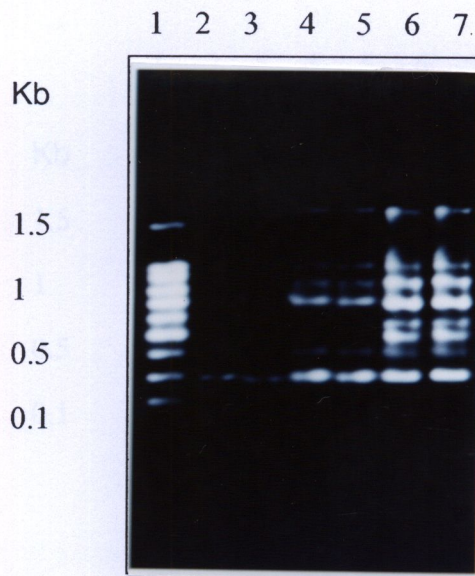
ในเบื้องต้นได้ทำการทดลองโดยใช้สภาวะเดียวกับ Prathepha (2000) จากนั้นศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองโดยเปลี่ยนแปลงปริมาณของดีเอ็นเอแม่แบบ ความเข้มข้นของ MgCl_2 และจำนวนรอบที่ทำการทดลอง

3.3.2.1 ปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบ

การตรวจสอบดีเอ็นเอแม่แบบที่ความเข้มข้นต่างกันคือ 25, 50 และ 100 ng ในปฏิกิริยา และใช้องค์ประกอบอื่นๆตามข้อ 2.3.3.3 เลือกดีเอ็นเอของกระชาย (B10) เนื่องจากเป็นพืชที่หาได้ง่าย และใช้ไพรเมอร์ชนิด OPAM-12 ผลการศึกษาที่ได้พบว่าดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณ 100 ng ให้แบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอชัดเจน และมีความคงตัวมากกว่าที่ปริมาณ 25 และ 50 ng ดังรูปที่ 37 ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ปริมาณของดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยาปริมาณ 100 ng

3.3.2.2 ความเข้มข้น MgCl_2

การตรวจสอบผลของความเข้มข้นของ MgCl_2 ที่ความเข้มข้น 3, 4 และ 5 mM และใช้องค์ประกอบอื่นๆตามข้อ 2.3.3.3 เลือกดีเอ็นเอของกระชาย (B10) และใช้ไพรเมอร์ชนิด OPAM-12 ใช้ดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณ 100 ng พบว่าผลของ MgCl_2 ที่ 5 mM ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีความคงตัวและชัดเจนง่ายต่อการสังเกตมากกว่าที่ 3 และ 4 mM ดังรูปที่ 38 ดังนั้นจึงใช้ความเข้มข้นของ MgCl_2 5 mM ในปฏิกิริยาครั้งนี้



รูปที่ 37 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ (template) ปริมาณต่างกันแล้วแยกดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 % อะกาโรสเจล ใช้ไพรเมอร์ ชนิด OPAM-12 ดีเอ็นเอแม่แบบชนิด B10

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

แถวที่ 2,3 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณ 25 ng

แถวที่ 4,5 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณ 50 ng

แถวที่ 6,7 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณ 100 ng

3.3.3 ตรวจจับผลของ MgCl₂ ใน PCR

การที่พบปริมาณดีเอ็นเอสูงเกินไปในหลอด PCR

3.3.3.1 สมองใส ใช้ปริมาณยาในหลอด PCR 45 ๖๐๐ จีออน

หลอดที่ 1 เป็น 35 ๑๕๐ พบว่า ๑๕ ในหลอดใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

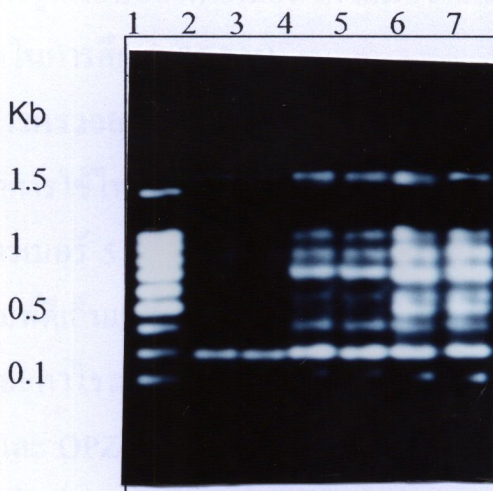
หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗

หลอดที่ ๒-๗ เป็นหลอดที่ใสเป็นปกติหลอดที่ ๒-๗



รูปที่ 38 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเมื่อทดสอบด้วย MgCl₂ ที่ความเข้มข้นต่างกันแล้วแยกดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส 1.8 % อะกาโรสเจล ใช้ไพรเมอร์ ชนิด OPAM-12 ดีเอ็นเอแม่แบบชนิด B10

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

แถวที่ 2,3 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ MgCl₂ ความเข้มข้น 3 mM

แถวที่ 4,5 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ MgCl₂ ความเข้มข้น 4 mM

แถวที่ 6,7 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ MgCl₂ ความเข้มข้น 5 mM

3.3.2.3 จำนวนรอบในการทำ PCR

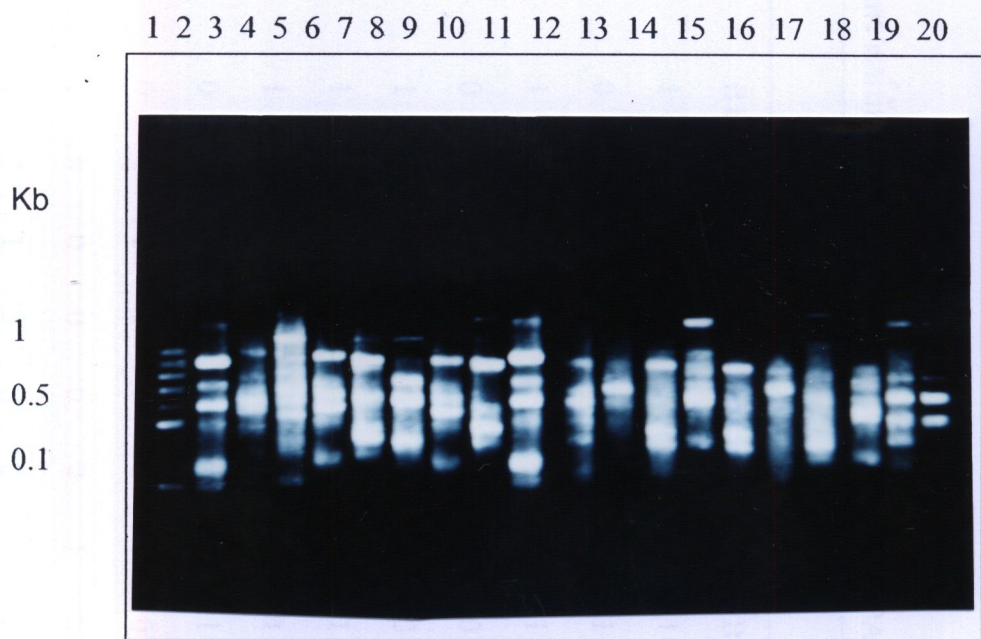
การศึกษาเปรียบเทียบผลของจำนวนรอบจากการทำ PCR ในขั้นที่ 2 ตามข้อ 2.3.3.3 เบื้องต้นจะใช้จำนวนรอบในการทดลอง 45 รอบ ต่อมาลดจำนวนรอบในขั้นตอนนี้เป็น 35 รอบ พบว่าเวลาในการดำเนินปฏิกิริยาลดลงจากเดิมประมาณ 2 ชั่วโมง และรูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษาคครั้งนี้จึงใช้จำนวนรอบในการศึกษา 35 รอบ

3.3.3 การตรวจสอบไพรเมอร์ชนิดต่างๆ

จากการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ลักษณะต่างๆ 10 ชนิด ดังตารางที่ 7 พบว่าไพรเมอร์ 5 ชนิด เมื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ให้แบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หลากหลาย ชัดเจน และมีความคงตัว เมื่อแยกโดยใช้อิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล ได้แก่ ไพรเมอร์ชนิด OPAM-01, OPAM-03, OPAM-12, OPB-14, และ OPZ-03 สำหรับไพรเมอร์อีกห้าชนิดที่เหลือพบว่า OPAM-18 และ OPB-01 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้แยกกันไม่ชัดเจนและแถบที่ได้ไม่เด่นชัด ส่วนชนิด OPC-01, OPC-05 และ OPK-05 ไม่แสดงแบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอให้เห็น

3.3.4 ลายพิมพ์จากการใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆ และดีเอ็นเอจากพืชตัวอย่างเป็นแม่แบบเฉพาะที่ให้ผลการทดลองดี แสดงไว้ดังรูปที่ 39-43 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPAM-01 ในรูปที่ 39 เมื่อใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากตัวอย่างต่างๆกัน ปรากฏแถบ (1) และไม่ปรากฏแถบ (0) ผลดังตารางที่ 13 เช่นเดียวกับผลที่ได้จากไพรเมอร์ชนิดอื่นๆ โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPAM-03 ดังรูปที่ 40 ผลจากการวิเคราะห์ดังตารางที่ 14 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPAM-12 ดังรูปที่ 41 ผลจากการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 15 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPB-14 ดังรูปที่ 42 ผลจากการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 16 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPZ-03 ดังรูปที่ 43 ผลจากการวิเคราะห์ ดังตารางที่ 17



รูปที่ 39 รูปแบบของ RAPD ของพืชที่ใช้ในการศึกษาจากไพรมอร์

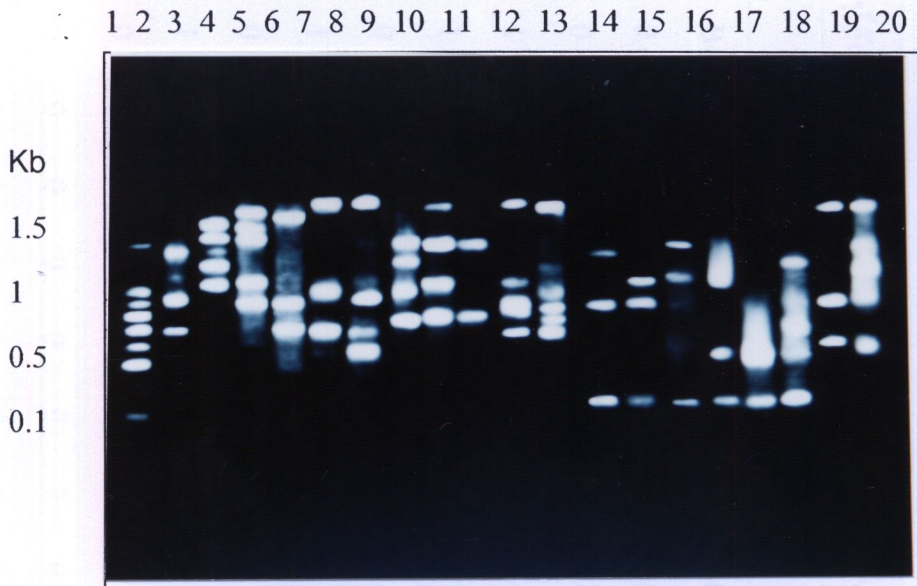
ชนิด OPAM-01 ที่แยกโดยอเล็กโตรโฟรีซิสด้วย 1.8 % อะกาโรสเจล

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

แถวที่ 2-12 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด B1-B11

แถวที่ 13-18 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด K1-K6

แถวที่ 19-20 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด S1-S2



รูปที่ 40 รูปแบบของ RAPD ของพืชที่ใช้ในการศึกษาจากไพรมอร์

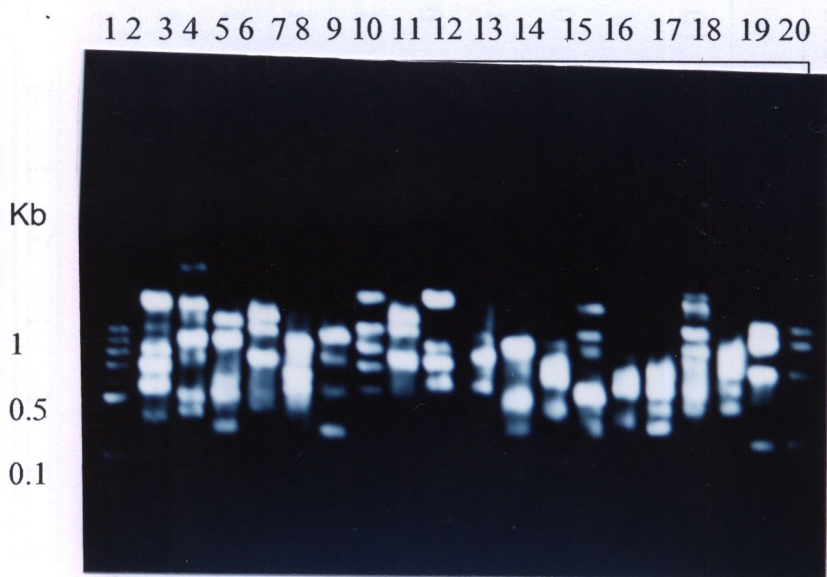
ชนิด OPAM-03 ที่แยกโดยอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วย 1.8 % อะกาโรสเจล

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

แถวที่ 2-12 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด B1-B11

แถวที่ 13-18 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด K1-K6

แถวที่ 19-20 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด S1-S2



รูปที่ 41 รูปแบบของ RAPD ของพืชที่ใช้ในการศึกษาจากไพรมอร์

ชนิด OPAM-12 ที่แยกโดยอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วย 1.8 % อะกาโรสเจล

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

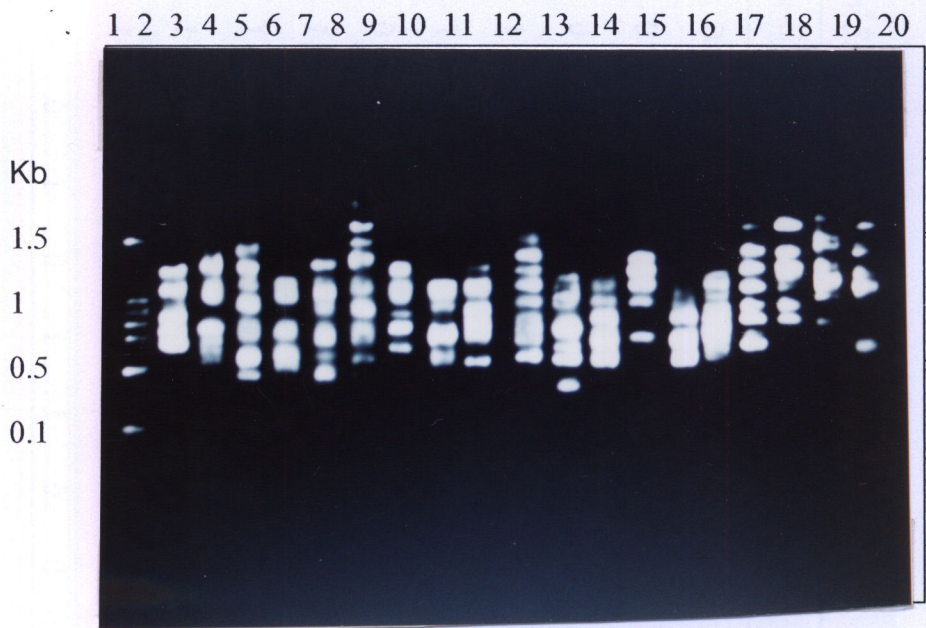
แถวที่ 2-12 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด B1-B11

แถวที่ 13-18 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด K1-K6

แถวที่ 19-20 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด S1-S2

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากโปรแกรม OPAM-12

Markers	ฐาน																			
	(bp)	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	K1	K2	K3	K4	K5	K6	S1	S2
1,500	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,300	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
1,000	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
900	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
800	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
600	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
400	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
300	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1



รูปที่ 42 รูปแบบของ RAPD ของพืชที่ใช้ในการศึกษาจากไพรมอร์ชนิด

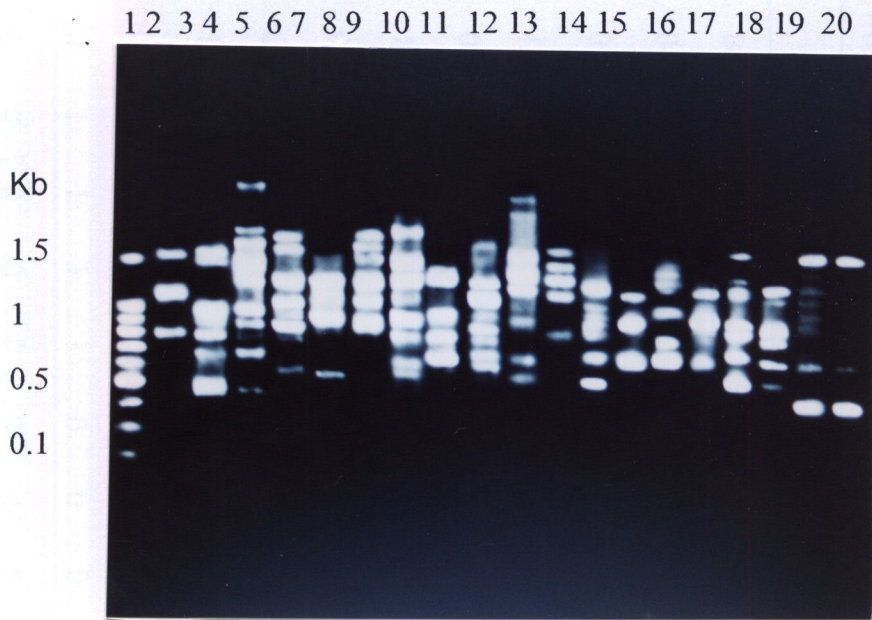
OPB-14 ที่แยกโดยอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วย 1.8 % อะกาโรสเจล

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

แถวที่ 2-12 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด B1-B11

แถวที่ 13-18 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด K1-K6

แถวที่ 19-20 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด S1-S2



รูปที่ 43 รูปแบบของ RAPD ของพืชที่ใช้ในการศึกษาจากไพรมอร์

ชนิด OPZ-03 ที่แยกโดยอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วย 1.8 % อะกาโรสเจล

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

แถวที่ 2-12 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด B1-B11

แถวที่ 13-18 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด K1-K6

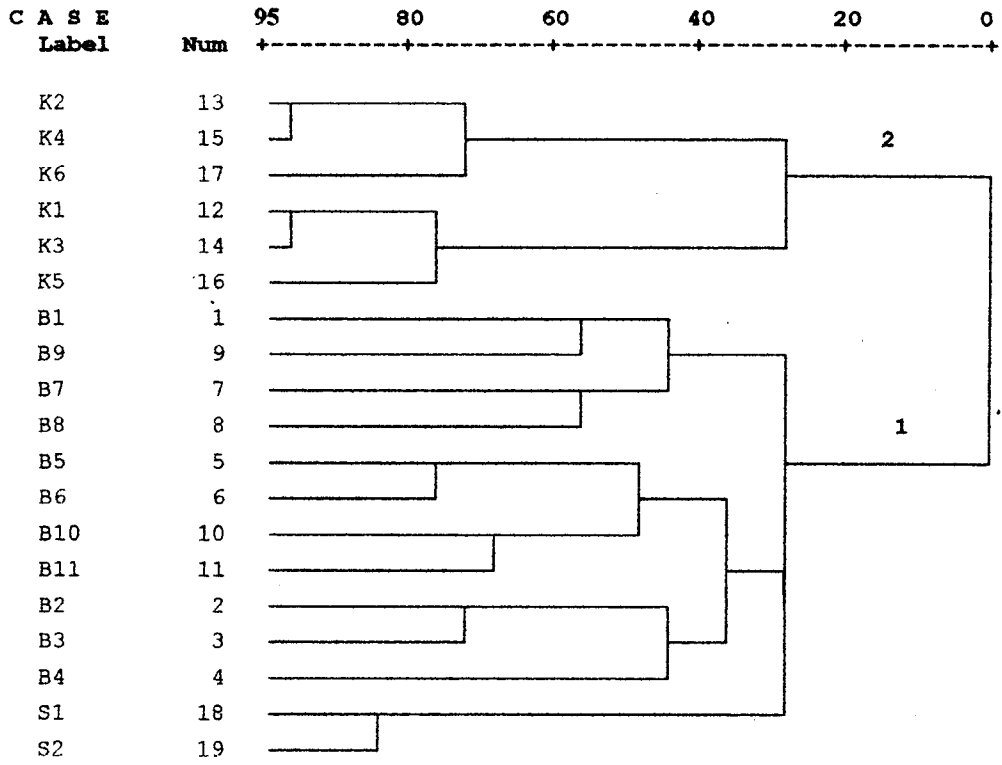
แถวที่ 19-20 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด S1-S2

3.3.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่างโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

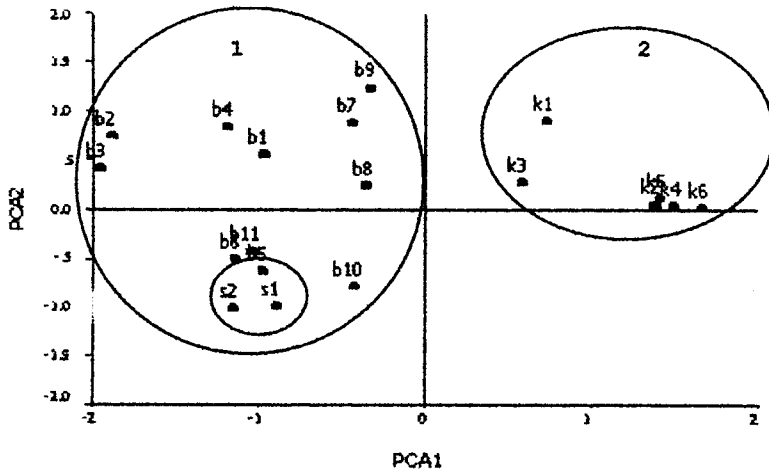
การศึกษาพบว่าแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 5 ชนิด จำนวน 53 แถบเมื่อพิจารณาหาดัชนีความคล้ายคลึง โดยใช้ Dice index ได้ผลดังตารางที่ 18 จากตารางพบว่า ช่วงของค่าความคล้ายคลึงกลุ่มของพืชตัวอย่างทั้งสามสกุลคือ 36.7%-97% และเมื่อแยกพิจารณาในแต่ละกลุ่มพบว่าในกลุ่มสกุลกระชายมีค่าความคล้ายคลึงในช่วง 54%-85.3% กลุ่มสกุลเปราะ 59.5%-97% กลุ่มสกุล *Scaphochlamys* 90.9% หากพิจารณาโดยดูความสัมพันธ์ระหว่างสกุล พบว่าช่วงของค่าคล้ายคลึงระหว่างสกุลกระชายกับสกุลเปราะเป็น 36.7%-61.5% ระหว่างสกุลกระชายกับสกุล *Scaphochlamys* 38.3%-61.5% และระหว่างสกุลเปราะกับสกุล *Scaphochlamys* ค่าที่ได้ 40-57.9% เมื่อนำค่า SI ที่ได้ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ในรูปแบบของสายสัมพันธ์ของพืชทั้งสามสกุลที่ศึกษาพบว่าพืชทั้งสามสกุลมีความสัมพันธ์กันดังรูปที่ 44 ก พบว่าสามารถแยกได้ความสัมพันธ์ได้เป็นสองสายสัมพันธ์ใหญ่ๆ โดยพืชในสกุล *Scaphochlamys* อยู่ในสายเดียวกับพืชในสกุลกระชาย สามารถแยกได้เป็นสี่สายสัมพันธ์ย่อย ส่วนกลุ่มเปราะแยกไปอยู่ในสายสัมพันธ์ที่สองและแบ่งเป็นสองสัมพันธ์ย่อย เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี PCA พืชทั้งสามสกุลมีความสัมพันธ์กันในลักษณะกลุ่มของความสัมพันธ์ในรูปที่ 44 ข ความสัมพันธ์ที่ได้จะสอดคล้องกับรูปของสายสัมพันธ์ 44 ก โดยพืชในสกุล *Scaphochlamys* จะเข้ามาอยู่ในส่วนหรือกลุ่มเดียวกับพืชในสกุลกระชาย ส่วนในสกุลเปราะแยกไปรวมกัน ดังรูปที่ 44 ข

ตารางที่ 18 Similarity index ของชุดตัวอย่าง 19 ชนิด จาก Dice index โดยใช้แบบแผนของสายพันที่ได้เสนอ

ชนิด	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	K1	K2	K3	K4	K5	K6	S1	S2
B1	1.000																		
B2	.576	1.000																	
B3	.540	.853	1.000																
B4	.654	.737	.689	1.000															
B5	.667	.677	.725	.621	1.000														
B6	.610	.656	.735	.632	.862	1.000													
B7	.755	.621	.581	.706	.712	.690	1.000												
B8	.642	.621	.581	.549	.746	.690	.769	1.000											
B9	.778	.678	.571	.615	.667	.644	.755	.717	1.000										
B10	.702	.613	.697	.582	.698	.677	.643	.679	.667	1.000									
B11	.633	.708	.754	.724	.818	.738	.644	.644	.700	.825	1.000								
K1	.511	.577	.500	.533	.528	.538	.565	.565	.553	.560	.566	1.000							
K2	.512	.375	.462	.390	.490	.458	.476	.476	.558	.522	.531	.611	1.000						
K3	.571	.593	.552	.553	.582	.593	.583	.583	.531	.615	.582	.952	.632	1.000					
K4	.500	.367	.453	.381	.480	.449	.465	.465	.545	.511	.520	.595	.970	.615	1.000				
K5	.549	.536	.533	.449	.561	.571	.520	.560	.549	.556	.526	.864	.650	.870	.683	1.000			
K6	.489	.400	.444	.372	.510	.520	.455	.409	.489	.500	.471	.632	.824	.700	.857	.762	1.000		
S1	.449	.407	.517	.383	.582	.556	.458	.542	.408	.615	.582	.429	.579	.500	.564	.565	.550	1.000	
S2	.490	.444	.552	.426	.582	.556	.500	.542	.408	.577	.545	.400	.474	.500	.462	.565	.450	.909	1.000



ก



ข

รูปที่ 44 ความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่างที่ใช้ศึกษา โดยอาศัยรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิค RAPD

ก แสดงสายสัมพันธ์ของพืชตัวอย่าง โดยวิธี UPGMA

ข แสดงกลุ่มความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่าง โดยวิธี PCA

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานภายนอก

การนำลักษณะสัณฐานภายนอกมาใช้พิจารณาหาความสัมพันธ์ในเบื้องต้น พบว่าลักษณะสัณฐานภายนอกบอกความสัมพันธ์ได้อย่างคร่าวๆ ว่าพืชกลุ่มใดใกล้ชิดกัน ดังรูปที่ 31 โดยพืชในแต่ละสกุลจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มมาก ไม่กระจายตัว อาจเนื่องจากลักษณะสัณฐานภายนอกที่ใช้ในการพิจารณาในขั้นนี้ ช่วยในการพิจารณาความสัมพันธ์โดยรวมในระดับสกุลมากกว่าระดับชนิด การให้น้ำหนักของลักษณะเพื่อหาความสัมพันธ์จึงพิจารณาลักษณะที่มีร่วมกันของแต่ละสกุล มากกว่าลักษณะในระดับชนิดที่ใกล้เคียงกันในสกุลเดียวกัน เพราะมีลักษณะร่วมกันมากจึงจำเป็นต้องหาลักษณะที่บอกความแตกต่างได้เพื่อที่จะแยก และหาความสัมพันธ์ระดับชนิดได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยามีความผันแปรสูง ลักษณะข้อมูลมักมีหลายลักษณะ (multiple characters) ยากในการวิเคราะห์ เช่น ข้อมูลที่ได้จากการวัดหรือนับจำนวน ต้องนำมาแปลงข้อมูลในลักษณะสองลักษณะ (binary characters) โดยกำหนดเป็นช่วงของข้อมูลเพื่อง่ายต่อการวิเคราะห์ (Kitching *et al.*, 1998) ทำให้พืชในกลุ่มเดียวกันอาจให้รูปแบบความสัมพันธ์แตกต่างกันในการทดลองที่แตกต่างกัน หรือพืชที่มีลักษณะแตกต่างกันแต่ถูกจัดเป็นชนิดเดียวกันเช่น *B. curtisii* (B2, B3) หรือ *B. plicata* (B5, B6) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับทางเลือกให้ความสำคัญของลักษณะใดเป็นพิเศษในแต่ละการทดลอง จำเป็นต้องหาข้อมูลด้านอื่นๆ เข้ามาช่วยพิจารณาร่วมด้วยเพื่อให้ความสัมพันธ์ที่น่าเชื่อถือ และบอกความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการได้ดียิ่งขึ้น เพราะหากอาศัยลักษณะสัณฐานภายนอกเพียงอย่างเดียวในการบอกความสัมพันธ์โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการนั้น รูปแบบความสัมพันธ์ที่ได้ที่ให้ความเชื่อมั่นน้อย (Judd *et al.*, 1999) ดังนั้นจึงควรศึกษาลักษณะสัณฐานภายนอกควบคู่กับเทคนิคในระดับโมเลกุล เช่น โปรตีน หรือเอนไซม์ และดีเอ็นเอเพื่อให้ความสัมพันธ์ที่น่าเชื่อถือมากขึ้น

4.2 การศึกษาไอโซไซม์

รูปแบบของไอโซไซม์จากส่วนของพืชที่ต่างกันหรืออายุต่างกันอาจแตกต่างกันได้ (Weeden and Wendel, 1989; Garkava *et al.*, 2000) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกจึงเลือกใบที่มีไอโซไซม์อยู่สูงมาศึกษา และใบที่ใช้ศึกษามีอายุใกล้เคียงกันมากที่สุด รวมทั้งทำการสกัดทุกๆ 3 เดือน เพื่อดูความคงตัวของเอนไซม์จากผลที่ได้ พบว่าเอนไซม์ 4 ชนิด คือเปอร์ออกซิเดส, ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส, กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส และมาเลตดีไฮโดรจีเนสให้รูปแบบที่หลากหลาย สามารถนำมาใช้วิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชนิดและสกุลได้ ส่วนเอนไซม์อื่นๆ นั้นไม่สามารถย้อมติดหรือย้อมติดแต่เป็นปื้นยาวไม่แยกเป็นแถบที่เด่นชัด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีการสกัดสารตัวอย่าง หรือสถานะในการย้อม เช่น ความเป็นกรดหรือด่างของปฏิกิริยา รวมทั้งชนิดของบัฟเฟอร์ในการสกัดเอนไซม์และสถานะการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสอาจไม่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์เหล่านี้ในพืชกลุ่มนี้ ทำให้ผลการทดลองที่ได้ไม่สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบได้ ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยซึ่งพบว่าเมื่อเปลี่ยนชนิดของบัฟเฟอร์และหาสภาวะที่เหมาะสมในพืชแต่ละกลุ่ม พบว่ารูปแบบของแถบที่ได้ดีขึ้น เช่นการศึกษาเอนไซม์เอซิดฟอสฟาเทสในของข้าวและข้าวโพดเป็นต้น (Shields *et al.*, 1983) ดังนั้นการศึกษาค้นต่อไปอาจต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการย้อมเอนไซม์เพื่อให้รูปแบบจากการย้อมที่ได้ดียิ่งขึ้นและหาระบบเอนไซม์ที่มีไอโซไซม์หลากหลายในการศึกษา

4.3 ไอโซไซม์กับการจำแนกพืชตัวอย่าง

การศึกษาไอโซไซม์จากพืชในสกุลกระชาย เปราะ และ *Scaphochlamys* พบว่าเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสให้รูปแบบความหลากหลายของแถบมากที่สุด และค่อนข้างมีความคงตัวซึ่งสอดคล้องกับทดลองกับในกลุ่มของวงศ์ขิงหลายชนิด เช่นเดียวกับซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสที่ให้แบบแผนที่หลากหลายรองลงมา (Ibrahim, 1991,1996; Liu, 1991,1996; Shamina *et al.*, 1998; Apavatjirut *et al.*, 1999) ซึ่งรูปแบบที่ได้สามารถบอกความแตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด แม้ว่าบทบาทของเอนไซม์ทั้งสองนี้จะเกี่ยวข้อง

กับระบบการป้องกันตัวของพืช (Dalton, 1963; Lange *et al.*, 2000) และแบบแผนของ เอนไซม์อาจเปลี่ยนไปตามสภาวะแวดล้อม (Siegel *et al.*, 1983; Karpinska, *et al.*, 2001) แต่หากเลือกสภาวะการทดลองที่เหมาะสมเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ยังให้รูปแบบของ ไอโซไซม์ที่เป็นประโยชน์ในการศึกษา (Liu, 1996) ส่วนเอนไซม์กลูตาเมท ดีไฮโดรจีเนส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส ย่อมติดยากและสีของแถบที่ได้ไม่ค่อยชัดเจน ต้องเพิ่มเวลาย้อมให้นานถึง 6 ชั่วโมงจึงปรากฏแถบให้เห็น ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาที่ได้ อาจเกิดไม่สมบูรณ์ จำเป็นต้องย้อมนานขึ้นเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้สมบูรณ์ (Jaaska, 1999) เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีหน้าที่หลักในวิถีเมตาโบลิซึมในพืชแต่ละชนิด รูปแบบของ เอนไซม์ทั้งสองชนิดในสกุลเดียวกันคล้ายกัน แต่หากต่างสกุลอาจแตกต่างกันได้ ดังนั้น เอนไซม์ทั้งสองชนิดเหมาะที่จะใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ในระดับสกุลของพืชตัวอย่าง มากกว่าการตรวจสอบในระดับชนิด ส่วนเปอร์ออกซิเดสและซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิว เทสสามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างในระดับชนิดได้ เช่นในกรณีของ *B. curtisii* 2 ลักษณะ และ *B. plicata* 2 ลักษณะ ที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกแตกต่างกันแต่จัดไว้ใน ชนิดเดียวกัน พบว่ามีลักษณะของไอโซไซม์แตกต่างกัน

การใช้ไอโซไซม์อาจมีความหลากหลายน้อยกว่าความหลากหลายในระดับ ดีเอ็นเอ เพราะแม้ว่าดีเอ็นเอไม่เหมือนกัน แต่เมื่อแปลรหัสสำหรับกรดอะมิโน อาจได้ กรดอะมิโนตัวเดียวกันเพราะเกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า Redundancy of the code word ได้ หรือเมื่อดีเอ็นเอถูกแปลรหัสเป็นโปรตีนแล้ว เกิดการเปลี่ยนแปลงภายหลังทำให้ โปรตีนมีลักษณะแตกต่างไปจากเดิมได้โดยกระบวนการ post translation modification โปรตีนที่ได้ อาจไม่แสดงความแตกต่างของการเรียงลำดับเบสบนดีเอ็นเอหรือพันธุกรรม โดยตรงจึงควรศึกษาความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอด้วย

4.4 คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชตัวอย่าง

การสกัดดีเอ็นเอคัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1987) พบว่า ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้ส่วนใหญ่สามารถนำไปใช้ศึกษาในขั้นต่อไปได้ ยกเว้นดีเอ็นเอที่ได้จาก พืช B9, B11, K1, K4, S1 และ S2 ที่ต้องสกัดซ้ำด้วย CTAB เนื่องจากมีสารประกอบพวก แทนนิน หรือฟีนอลสูง อาจไปรบกวนการทำงานของปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไป สอดคล้องกับการศึกษาของ Rajaseger และคณะ (1997) รวมทั้ง Rath และคณะ (1998)

ซึ่งพบว่าพืชในเขตร้อนส่วนใหญ่จะมีสารประกอบเหล่านี้สูงจำเป็นต้องสกัดด้วย CTAB ขั้นตอนการศึกษาครั้งนี้ จึงจำเป็นต้องทำให้ดีเอ็นเอมีความสะอาดเพื่อให้คุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ ดีขึ้น เพื่อนำไปใช้ในการเป็นแม่แบบศึกษาดีเอ็นเอของพืชตัวอย่าง โดยวิธี PCR ในตอนขั้นต่อไป

4.5 สภาพที่เหมาะสมในการศึกษาดีเอ็นเอของพืชตัวอย่างโดยวิธี RAPD

การศึกษาดีเอ็นเอของพืชตัวอย่างโดยวิธี RAPD เป็นเทคนิคที่ต้องอาศัย PCR และ PCR เป็นเทคนิคที่มีความไวมาก สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นล้านเท่าอย่างรวดเร็วและใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยก็สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องระวังการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากภายนอก เช่น จากอากาศ ผิวหนัง ผม เป็นต้น การศึกษาครั้งนี้ จึงทำในที่สะอาด และใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้มีคุณภาพ เกรดอณูชีววิทยา แยกจากการทดลองอื่น เพื่อป้องกันการปนเปื้อน และจำเป็นต้องมีหลอดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ (negative control) ในการทดลองทุกครั้ง การทดลองเบื้องต้นใช้สภาวะเดียวกับ Prathepha (2000) ซึ่งศึกษา RAPD ของพืชในกลุ่มเดียวกัน แต่การทดลองไม่ประสบความสำเร็จ จึงเพิ่มความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เป็น 5 mM Aert และคณะ (1998) รายงานว่า ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โพลีเมอเรส มากกว่าสารอื่น โดยความเข้มข้นที่ใช้ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 1.5–10 mM ในการศึกษาพืชชนิดใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน จึงควรทดลองเพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด

4.6 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ที่เลือก

ผลของการทดลองพบว่า ไพรเมอร์ 5 ชนิด ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและให้รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หลากหลายนั้นมี % G และ C ได้ทั้ง 60% และ 70% และมีเบสครบทั้งสี่ชนิดและไม่ครบ แม้ไพรเมอร์บางตัวจะไม่มี A หรือ T ก็สามารถให้ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่หลากหลายได้ โดยเฉพาะไพรเมอร์ในชุด OPAM สอดคล้องกับ Prathepha (2000) ซึ่งใช้ไพรเมอร์ส่วนใหญ่ในชุด OPAM นี้ และในชนิด OPB-14 ใช้เป็นไพรเมอร์ในการแยกพืชสกุลกระเจียว ส่วนไพรเมอร์ชนิด OPZ-03 ให้ผลสอดคล้องกับ Dasuki และคณะ (2000) ซึ่งพบว่า ไพรเมอร์ในชุด OPZ โดยส่วนใหญ่ให้ความหลากหลายในการแยกพืชในกลุ่มวงศ์ขิงได้ดี ไพรเมอร์ชนิดต่าง ๆ ที่ไม่ให้ผลดีเอ็นเอ

ที่หลากหลาย และชัดเจนหรือไม่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น อาจมีสาเหตุมาจากลำดับเบสบนไพรเมอร์เหล่านี้ ทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจนหรือไพรเมอร์เหล่านี้ ไม่สามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่อยู่บนดีเอ็นเอแม่แบบเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไปได้ (Cronn *et al.*, 1997) แม้ไพรเมอร์ที่ให้ผลการทดลองดีและชัดเจนมีเพียง 5 ไพรเมอร์ แต่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาโดยวิธี RAPD ให้รูปแบบที่หลากหลาย สามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างของกระชายบางชนิดที่ถูกจัดให้เป็นชนิดเดียวกัน เช่น *B. curtisii* 2 ลักษณะ และ *B. plicata* 2 ลักษณะ ที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกแตกต่างกันแต่จัดอยู่ในชนิดเดียวกัน มีความแตกต่างกันในระดับดีเอ็นเอด้วยโดยการศึกษา RAPD ได้ และหาความสัมพันธ์ของพืชกลุ่มนี้ได้

4.7 ลักษณะความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้

การนำผลจากการศึกษาในระดับโมเลกุลทั้งในระดับโปรตีนในรูปของไอโซไซม์และดีเอ็นเอจากวิธี RAPD มาประมวลผลโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ พบว่าพืชกลุ่ม *Scaphochlamys* มีความใกล้ชิดกับพืชในสกุลกระชายมากกว่าในสกุลเปราะ สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานภายนอกที่ใช้ในการศึกษาและสอดคล้องกับ Hussin และคณะ (2001) ที่เสนอว่าความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการพืชในสกุลกระชายน่าจะมีความใกล้ชิดกับพืชในสกุล *Scaphochlamys* มากกว่าสกุลเปราะ ในการยืนยันการจำแนกชนิดและหาความสัมพันธ์ในระดับชนิด โดยใช้ผลจากการวิเคราะห์ที่ได้จากรูปแบบไอโซไซม์และการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเป็นไปในทางเดียวกัน ลายพิมพ์ดีเอ็นเอให้ค่าความคล้ายคลึงในช่วง 36.7%-97% ส่วนไอโซไซม์อยู่ในช่วง 31.6%-94.7 %

เมื่อแยกพิจารณาแต่ละสกุล พบว่าในสกุลกระชายในชนิด *B. plicata* (B5, B6) จะใกล้กับพืชในกลุ่ม *Scaphochlamys* มากที่สุด สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานภายนอก เช่น กลีบปากมีลักษณะไม่เป็นกระพุ้ง ส่วนสกุลกระชายชนิดอื่นกลีบปากจะมีลักษณะเป็นกระพุ้งอย่างชัดเจน และชนิด B1, B9, B7, B8 อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และพืชในกลุ่มนี้มีลักษณะสัณฐานภายนอกบางลักษณะร่วมกัน เช่น ช่อดอกจะออกทางด้านข้าง เป็นต้น ส่วนในกลุ่ม B10, B11, B2, B3, B4 ที่ใกล้ชิดกัน มีก้านดอกสั้นและช่อดอกจะออกตรงกบใบคู่ในสุดเช่นเดียวกัน ส่วนพืชในสกุลของเปราะ พบว่าสามารถแยกออกได้เป็นสองกลุ่มใหญ่ตามการวิเคราะห์จากไอโซไซม์และ RAPD ซึ่ง

สอดคล้องกับลักษณะสัณฐานภายนอกเช่นกัน โดยพืชในกลุ่มของ K1, K3 และ K5 ที่อยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกัน กลีบปาก และ lateral staminodes ของพืชกลุ่มนี้จะวางตัวในตำแหน่งทำมุมแหลม ส่วนในกลุ่ม K2, K4 และ K6 กลีบปาก และ lateral staminodes วางตัวในแนวขนานกัน จากการศึกษาในระดับโมเลกุล พืชชนิด K2 ใกล้เคียงกันมากกับชนิด K4 สอดคล้องกับการศึกษาของ Seark (1999) ที่เสนอว่าพืชทั้งสองชนิดควรจัดเป็นชนิดเดียวกัน

5. สรุปผลการทดลอง

การศึกษาความสัมพันธ์ของพืชวงศ์จิง 19 ชนิด จากสกุลกระชาย 11 ชนิด สกุลเปราะ 6 ชนิด และสกุล *Scaphochlamys* 2 ชนิด สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. การศึกษาลักษณะสัณฐานภายนอกเลือก 15 ลักษณะมาใช้หาความสัมพันธ์ พบว่าพืชสกุลกระชายใกล้เคียงกับสกุล *Scaphochlamys* มากกว่าเปราะ
2. ในการสกัดเอ็นไซม์เพื่อศึกษาเอ็นไซม์จากใบของพืชตัวอย่างในระยะเดียวกันพบว่าควรทำการสกัดทุก 3 เดือนและเก็บที่ -20°C เพื่อความคงตัวของรูปแบบของไอโซไซม์
3. จากเอ็นไซม์ 9 ชนิด ที่เลือกมาศึกษา พบว่ามีเพียง 4 ชนิดที่ให้รูปแบบความหลากหลายที่เป็นประโยชน์ในการศึกษาได้แก่ เปอร์ออกซิเดส, ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส, กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส โดยสองชนิดแรกให้รูปแบบเอ็นไซม์ที่หลากหลายและมีความคงตัวสามารถใช้ยืนยันการจำแนกชนิดได้ดีกว่าสองชนิดหลัง
4. จากรูปแบบของไอโซไซม์ที่เลือกมา 20 แถบ นำมาหาความคล้ายคลึงของพืชวงศ์จิงที่ศึกษา ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในช่วง 31.6%-94.7% พบว่าความคล้ายคลึงระหว่างสกุลกระชายกับ *Scaphochlamys* จะสูงกว่าระหว่างสกุลกระชายกับเปราะ และเปราะกับ *Scaphochlamys*
5. ในการสกัดดีเอ็นเอจากใบของพืชตัวอย่าง พบว่าพืชหลายชนิดต้องสกัดด้วย CTAB บัฟเฟอร์ซ้ำ จึงจะได้ดีเอ็นเอคุณภาพดี $\text{O.D.}_{260}/\text{O.D.}_{280} \approx 1.7-2.0$ และปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ประมาณ 240 $\mu\text{g/g}$ ใบพืชสด
6. สภาพที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี RAPD ของการศึกษาครั้งนี้คือที่ MgCl_2 เข้มข้น 5 mM และดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณ 100 ng ในปฏิกิริยาและปล่อยให้เกิดปฏิกิริยา 35 รอบในการศึกษา
7. ไพรเมอร์ 5 ชนิด OPAM-01, OPAM-03, OPAM-12, OPB-14 และ OPZ-03 จากไพรเมอร์ 10 ชนิดที่นำมาทดลอง ให้รูปแบบดีเอ็นเอที่หลากหลาย

8. ปลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก RAPD ปราบกฎแถบ 53 แถบที่นำมาหาค่าความคล้ายคลึงพบว่าค่าความคล้ายคลึงที่ได้อยู่ในช่วง 36.7%-97% และค่าที่ได้ระหว่างสกุลกระชายกับ *Scaphochlamys* จะสูงกว่าระหว่างสกุลกระชายกับเปราะ และเปราะกับ *Scaphochlamys*
9. เมื่อนำค่าความคล้ายคลึงที่ได้จากรูปแบบของไอโซไซม์และดีเอ็นเอมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ พบว่ารูปแบบของสายสัมพันธ์และกลุ่มของความสัมพันธ์จากการตรวจสอบทั้งสองรูปแบบให้ผลสอดคล้องกัน โดยพืชสกุลกระชายจะใกล้ชิดกับพืชสกุล *Scaphochlamys* มากกว่าพืชสกุลเปราะ
10. รูปแบบของไอโซไซม์และปลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RAPD สามารถนำมาช่วยยืนยันการจำแนกพืชในสกุลเดียวกัน และหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชในกลุ่มนี้ได้ดี พืชสกุลกระชายน่าจะมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับพืชสกุล *Scaphochlamys* มากกว่าสกุลเปราะ สอดคล้องกับการพิจารณาจากลักษณะสัณฐานภายนอกแต่ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในระดับ โมเลกุลจะให้รายละเอียดของความสัมพันธ์ของแต่ละชนิดในสกุลเดียวกัน มากกว่าข้อมูลที่ได้จากการพิจารณาจากลักษณะสัณฐานภายนอกเพียงอย่างเดียว

เอกสารอ้างอิง

พวงเพ็ญ ศิริรักษ์. 2544. พรรณพืชวงศ์ขิงของไทย. ใน: วิสุทธ์ ไบไม้ และ รังสิมา
คุ่มหอม (บรรณาธิการ) รายงานการวิจัยในโครงการ BRT, หน้า 65-77.
กรุงเทพฯ: บริษัท จีรวัฒน์ เอ็กเพรส จำกัด.

พวงเพ็ญ ศิริรักษ์. 2532. การสำรวจพืชวงศ์ขิงในบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย.
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ฉัตรชัย งามเรียบสกุล. 2535. การเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาและไอโซไซม์ของพืช
บางชนิดในวงศ์ขิง (Zingiberaceae). โครงการงานทางชีววิทยา, ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Aert, R., Voet, M., Van Canmpenhout, S., Stappen, J.A., Volckaert, G. 1998.
Polymerase Chain Reaction. *In*: Karp, A., Isaac, P.G. and Ingram, D.S.
(eds.), *Molecular Tool for Screening Biodiversity*, pp. 111-118. London:
Chapman and Hall Inc.

Adams, W.T. 1983. Application of Isozymes in Tree Breeding. *In*: Tanksley
S.D. and Orton T.J. (eds.), *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*.
Part A, pp. 381-400. Amsterdam: Elsevier Publishing Co.

Apavatjirut, P., Anupatalabhochai, S., Sirirugsa, P., and Alisi, C., 1999. Molecular
marker in the identification of some early flowering *Curcuma* L.
(Zingiberaceae) species. *Ann. Bot.* 84: 529-534.

- Avery, O.T., Macleod, C.M. and McCarty, M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of *Pneumococal* types I introduction of transformation by a DNA isolated from *Pneumococcus* type III. *J. Exp. Med.* 79: 137-158.
- Avise, J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. New York: Chapman and Hall Inc.
- Backjau, T., Bruyn, L.D., Wolf, H.D., Jordaens, K., Van dongen, S. and Winnepeninckx, B. 1996. Multiple UPGMA and neighbor-joining tree and performance of some computer packages. *Mol. Biol. Evol.* 13: 309-313.
- Bailey, D.C. 1983. Isozyme Variation and Plant Breeders Rights. *In: Tanksley S.D. and Orton, T.J. (eds.), Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A*, pp. 425-440. Amsterdam: Elsevier Publishing Co.
- Beevers, L. 1982. Post-translational Modifications. *In: Boulter, D. and Parthier, B. (eds.), Encyclopedia of Plant Physiology, New series, Vol.14A*, pp. 136-168. Berlin: Springer-Verlag Inc.
- Birchler, J.A. 1983. Allozymes in Gene Dosage Studies. *In: Tanksley S.D. and Orton T.J. (eds.), Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A*, pp. 85-110. Amsterdam: Elsevier Publishing Co.
- Brettschneider, R. 1998. RFLP Analysis. *In: Karp, A., Isaac, P.G. and Ingram, D.S. (eds.), Molecular Tool for Screening Biodiversity*, pp. 83-95. London: Chapman and Hall Inc.

- Briggs, D. and Walters, S.M. 1997. *Plant Variation and Evolution*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Burdon, J.J. and Marshall, D.R. 1983. The Use of Isozymes in Plants Disease Research. *In*: Tanksley S.D. and Orton T.J. (eds.), *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A*, pp. 401-412. Amsterdam: Elsevier Publishing Co.
- Buth, D.G. 1984. The application of electrophoretic data in systematic studies. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 501-522.
- Buth, D.G. and Murphy, R.W. 1999 The use of isozyme characters in systematic studies. *Biochem. Syst. Ecol.* 27: 117-129.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J., and Gresshoff, P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio. Technology* 9: 553-557.
- Case, M.A., Mlodozienec, H.T. Wallace, L.E. and Weldy, T.W. 1998. Conservation genetics and taxonomic status of the rare Kentucky lady's slipper: *Cypripedium kentuckiense* (Orchidaceae). *Amer. J. Bot.* 85: 1779-1786.
- Chu, D., Miles, H., Toney, D., Chi, N., Marciano, C.F. and Chu, D.M. 1998. Amebicidal activity of plants extracts from Southeast Asia on *Acanthamoeba* spp. *Parasitology Research* 84: 746-752.

- Ciofi, C., Funk, S.M., Coote, T., Cheesman, D.J., Hammond, R.L., Saccheri, L.J. and Bruford M.W. 1998. Genotyping with Microsatellite Markers. *In*: Karp, A., Isaac, P.G. and Ingram, D.S. (eds.), *Molecular Tool for Screening Biodiversity*, pp. 195-200. London: Chapman and Hall Inc.
- Clarke, J. and Shannon, L.M. 1976. The isolation and characterization of the glycopeptides from horseradish peroxidase isozyme C. *Biochem. Biophys. Acta.* 427: 428-442.
- Crawford, D.J. 1990. *Plant Molecular Systematics: Macromolecular Approaches*. New York: Wiley-Interscience Publication.
- Cronn, R., Brother, M., Klier, K., Bretting, P.K. and Wendel, J.F. 1997. Allozyme variation in domesticated annual sunflower and its wild relatives. *Theor. Appl. Genet.* 95: 532-545.
- Dasuki, S.M., Kamaruzaman, M. and Sulaiman, S.F. 2000. Genetic variation and relationships among the species of Zingiberaceae by using random amplified polymorphic DNA marker (RAPD-PCR). The Third Regional IMT-GT uninet conference, p. 52. Universitas Sumatera Utara Medan, Indonesia.
- Dahlgren, R. and Rasmussen F.N. 1983. Monocotyledon evolution: characters and phylogenetic estimation. *Evol. Biol.* 16: 255-395.

- Dalton, P.A., 1963. Ascorbate Peroxidase. *In*: Bverse, J., Bverse, K.E. and Grisham, M.B. (eds.), *Peroxidase in Chemistry and Biology* (Vol. II), pp. 139-153. Boston: CRC. Press.
- Doyle J.A. 1998. Phylogenetic of vascular plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 29: 567-599.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15
- Eanes, W.F. 1999. Analysis of selection on enzyme polymorphisms. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 30: 301-326.
- Edwards, K. 1998. Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLPs). *In*: Karp, A., Isaac, P.G. and Ingram, D.S. (eds.), *Molecular Tool for Screening Biodiversity*, pp. 131-134. London: Chapman and Hall Inc.
- Eksomtramage, L., Sirirugsa, P. and Mayakul, S. 1996. Chromosome number of some Thai Zingiberaceae. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 18: 153-159.
- Freeling, M. 1983. Isozyme System to Study Gene Regulation During Development; A Lecture *In*: Tanksley S.D. and Orton T.J. (eds.), *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A*, pp. 61-83. Amsterdam: Elsevier Publishing Co.

- Garkava, P.A., Rumpunen, K. and Bartish I.V. 2000. Genetic relationships in *Chaenomele* (*Rosaceae*) revealed by isozyme analysis. *Scientia Horticulturae* 85: 21-35.
- Gottlieb, L.D. 1981. Electrophoretic evidence and plant populations. *Progr. Phytochem.* 7:1-46.
- Gottlieb, L.D. 1982. Conservation and duplication of isozyme in plants. *Science* 216: 373-380.
- Graham, R.T. 1991. Polymerase Chain Reaction: Basic Principal and Automation. *In: McPheson, P.Q. and Taylor, G.R. (eds.), A Practical Approach*, pp. 1-13. New York: Oxford University Press.
- Haginiwa, J., Harada, M.M. and Morishita, I. 1963. Properties of essential oil components of aromatics and their pharmacological effect on mouse intestine. Pharmacological studies on crude drugs. VII. *Yakugaku Zasshi* 88:624.
- Hammond, R.L., Saccheri, I.J., Ciofi, C., Coote, T., Funk, S.M., Mcmillan, W.O., Bayes, M.K., Taylor, E., and Bruford, M.W. 1998. Isolation of Microsatellite Markers in Animals. *In: Karp, A., Isaac, P.G., and Ingram, D.S. (eds.), Molecular Tool for Screening Biodiversity*, pp. 279-285. London: Chapman and Hall Inc.

- Hennig, W. 1966. *Phylogenetic Systematics*. Illinois: University of Illinois Press.
- Holtum, R.E. 1950. Zingiberaceae of Malay Peninsular Gardens' Bulletin Singapore. 13: 1-282.
- Horandl, E., Jakubowsky, G. and Dobes., C. 2001. Isozyme and morphological diversity within apomictic and sexual taxa of *Ranunculus auricomus* complex. *Plant Syst. Evol.* 226: 165-185.
- Hussin, K.H., Ibrahim, H., and Ali, D.A.H.A. 2001. Anatomical variations in leaves at *Boesenbergia* O. Kuntze and *Kaempferia* L. species (Zingiberaceae). *J. Trop. and Subtrop. Bot.* 9: 49-54.
- Ibrahim, H. 1991. Taxonomic implications of isozyme and anatomical studies on *Curcumar* spp. *In: Botany 2000 Asia: A workshop meeting on the family Zingiberaceae*, p. 12. Prince of Songkla university Thailand
- Ibrahim, H. 1996. Isozyme variations in selected Zingiberaceae spp. *In: Proceedings of the Second Symposium on the Family Zingiberaceae*, pp. 142-149. South Institute of Botany, Guangzhou, China.
- Innis, M.A. and Gelfand D.H. 1990. Optimization of PCRs. *In: Innis, M.A. and Gelfand D.H. and Sninsky, J.J. (eds.), PCR Protocol: A Guide to Methods and Application*, pp. 3-12. California: Academic Press Inc.

- Inouye, J. and Hagiwara, T. 1980. Classification of floating rice varieties by acid phosphatase and peroxidase zymogram. *Jap. J. Trop. Agric.* 24: 159-164.
- Jaaska, V. 1999. Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities among the Africa beans of the genus *Vigna Savi* (Fabaceae). *Biochem. Syst. and Ecol.* 27: 569-589.
- Jeffreys, A.L., Wilson, V. and Thein, S.L. 1985. Individual-specific "fingerprints" of human DNA. *Nature* 316: 76-79.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castiglione, S., Winfield, M.O., Sala, F., Van der Wiel, C., Vosman, B.L., Matthes, M., Daly A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, N., Marmioli, N., Aert, R.L., Volckaert, G., Rueda, J., Vazquez, A., and Karp, A. 1998. Reproducibility Testing of RAPDs by Network of European Laboratory. *In: Karp, A., Isaac, P.G. and Ingram, D.S. (eds.), Molecular Tool for Screening Biodiversity*, pp. 176-180. London: Chapman and Hall Inc.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A. and Stevens, P.E. 1999. *Plant Systematic Approach*. Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Karp, A., Isaac, P.G., and Ingram, D.S. 1998. *Molecular Tool for Screening Biodiversity*. London: Chapman and Hall Inc.

- Karpinska, B., Karlsson, M., Schinkel H., Streller, S., Süss, K., Melzer, M. and Wingsle, G. 2001. A novel superoxide dismutase with a high isoelectric point in higher plant. Expression, regulation and protein localization. *Plant Physiology*. 126: 1668-1677.
- Kitching, I.J., Forey, P.L., Humphries, J. and Williams, D. 1998. Cladistics: The Theory and Practice of Parsimony Analysis (2nd ed). Oxford: Oxford University Press.
- Kress, W.J. 1990. The phylogenetic and classifications of the Zingiberales. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 77: 131-142.
- Kress, W.J. 1996. Phylogenetic of the Zingiberaceae: Morphology and molecular. In Rudall, P.J., Cribb, P.J., Cutler, D.E., and Humphries, C.J. (eds.), *Monocotyledons: Systematic and Evolution*, pp. 443-460. Kew: Royal Botanical Garden.
- Lange, O. and Schifino-Wittmann, M. 2000. Isozyme variation in wild and cultivated species of the Genus *Trifolium* L. (Leguminosae). *Ann. Bot.* 86: 339-345.
- Larsen, K. 1993. *Boesenbergia tenuispicata* (Zingiberaceae): a new species from Thailand. *Nordic J. Bot.* 13: 281-283.
- Larsen, K. 1997. Further Studies in the genus *Boesenbergia* (Zingiberaceae). *Nordic J. Bot.* 17: 361-366.

- Larsen, K. 1999. New research in Zingiberaceae in Thailand. 24 September 1999. At Forest Herbarium, Royal Forest Department. Bangkok.
- Larsen, K., Ibrahim, H., Khaw, S.H. and Saw, L. G. 1999. Gingers of Peninsular Malaysia and Singapore. Malaysia: Natural History Publications.
- Larsen, K., Lock, J.M., Maas, H. and Mass, P.J.M., 1998. Zingiberaceae. *In*: Knbitzki K. (ed.), The Families and Genera of Vascular Plants (Vol. IV), pp. 474-495. Germany: Springer.
- Lawyer, F.C., Stoffel, S., Saiki, R.K., Myambo, K., Drummond, R. and Gelfand, D.H. 1989. Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J. Biol. Chem.* 264: 6427-6437.
- Lim, S.W., Teng, P.C.P., Lee, Y.H. and Goh, C.J. 1999. RAPD analysis of some species in genus *Vanda* (*Orchidaceae*). *Ann. Bot.* 83: 193-196.
- Linz, U. 1990. Thermocycler temperature variation in validates PCR results. *Bio. Techniques.* 9: 286-293.
- Liu, N. 1991. The peroxidase isozyme of *Curcuma* and *Alpinia*. *In*: Botany 2000 Asia: A workshop meeting on the family Zingiberaceae, p. 9. Prince of Songkla University Thailand.

- Liu, N. 1996. Peroxidase isoenzymes and ordination of some *Alpinia* spp. In: Proceedings of the Second Symposium on the Family Zingiberaceae, pp. 150-160. South China Institute of Botany, Guangzhou, China.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.K., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Ludwig, J.A. and Reynolds, J.F. 1988. Statistical Ecology A Primer on Methods and Computing. USA: John Willey and Sons Inc.
- Makhuvha, N., Van Wyk, B.E., Van der Bank, H. and Van der Bank, M., 1997. Genetic polymorphism in wild and cultivated *Siphonochilus aethiopicus* (Zingiberaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 25(4): 343-351.
- Mahidol, C., Tantiwachwuttikul, P., Reutrakul, V. and Taylor, W.C. 1984. Constituents of *Boesenbergia pandurata* (syn. *Kaempferia pandurata*) III isolation and synthesis of (+)-boesenbergia B. *Aust. J. Chem.* 37: 1739-1745.
- Maknoi, C. 2001. Diversity and Habitat Relationships of Zingiberaceae along Thai-Malaysian Border in Yala and Narathiwat Provinces. Master Thesis. Graduate School, Prince of Songkla University Thailand.
- Matthes, M.C., Daly, A. and Edward, K.J. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP). In Karp, A., Isaac, P.G., and Ingram, D.S. (eds), Molecular Tool for Screening Biodiversity, pp. 183-190. London: Chapman and Hall Inc.

- McMillin, D.E. 1983. Plants Isozyme: a History Perspective. *In: Tanksley S.D. and Orton T.J. (eds.) Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A,* pp. 3-14. Amsterdam: Elsevier Publishing Co.
- Murakami, A., Kondo, A., Nakamura, Y., Ohigashi, H. and Koshimizu, K. 1993. Possible anti-tumor promoting properties of edible plants from Thailand and identification of an active constituent cardamonin of *Boesenbergia pandurata*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 57: 1971-1973.
- Murphy, R.W., Sites, J.W., Buth, D.G. and Haufler, C.H., 1996. Protein: Isozyme electrophoresis. *In: Hillis, D.M., Moritz, C. and Mable, B.K. (eds.), Molecular Systematics, (2nded), pp. 51-120. Sunderland: Sinauer Associates Inc.*
- Moritz, C. and Hillis, D.M. 1996. Molecular systematic: context and controversies. *In: D.M., Hillis, C., Moritz and B.K., Mable (eds.), Molecular Systematic (2nded), pp. 1-13. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.*
- Nadolny, L. and Sequeira, L. 1980. Increase in peroxidase activities are not directly involved in induced resistance in tobacco. *Physiol. Plant Pathol.* 8 307-311.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolution Genetic.* New York: Columbia University Press.

- Newton, K.J. 1983. Genetic of Mitochondrial Isozymes. In: Tanksley S.D. and Orton T.J. (eds.), *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A*, pp. 157-176. Amsterdam: Elsevier Publishing Co.
- Ozaki, Y., Tashiro, T. and Okubo, H. 2000. Use of allozyme variation for evaluating genetic purity in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) cultivars. *J. of Horticultural Science & Biotechnology* 75: 105-111
- Paisookamtivatana, Y., Kako, S., and Seiko, H. 2001. Isozyme polymorphism in *Curcuma alismatifolia* Gagnep. (Zingiberaceae) populations from Thailand. *Scientia Horticulturae* 88: 299-307.
- Pasteur, N., Pasteur, G. 1988. *Practical Enzyme Genetics*. New York: John Willey and Sons Inc.
- Pillay, M., Nwakanma, D.C. and Tenkouana, A. 2000. Identification of RAPD markers linked to A and B genome sequences in *Musa* L. *Genome* 43: 763-767.
- Prakash, V. and Mehrotra, B.N. 1996. Zingiberaceae of NE India: biodiversity and taxonomy status. *In: Proceedings of the Second Symposium on the Family Zingiberaceae*, pp. 262-273. South China Institute of Botany, Guangzhou, China.
- Prathepha, P. 2000. Screening of random primer to evaluate DNA diversity in Thai *Curcuma* using random amplified polymorphic DNAs. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 22: 7-13.

- Provan, J., Powell, W. and Hollingsworth, P.M. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecol & Evol.* 16: 142-147.
- Rajaseger, G., Tan, H.T.W., Turner, I.M. and Kumar, P.P. 1997. Analysis of genetic diversity among *Ixora* cultivars (*Rubiaceae*) using random amplified polymorphic DNA. *Ann. Bot.* 80: 355-361.
- Ranade, S.A., Farooqui, N., Bhattacharya, E. and Verma, A. 2001. Gene tagging with random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker for molecular breeding in plants. *Critical Reviews in Plants Science* 20: 251-275.
- Rao, K.P. and Randall, D.D. 1980. Plant pyruvate dehydrogenase complex: Inactivation and reaction by phosphorylation and dephosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 200: 461-466.
- Rath, P., Rajaseger, G., Goh, C.J. and Kumar, P.P. 1998. Phylogenetic analysis of Dipterocarps using random amplified polymorphic DNA markers. *Ann Bot.* 82: 61-65.
- Rout, G.R., Das, P., Goel, S. and Raina, S.N. Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 39: 23-27.

- Rueda, J. Linacero, R. and Vazquez, A.M. Plant Total DNA Extraction. *In*. Karp, A., Isaac, P.G. and Ingram, D.S. (eds), *Molecular Tool for Screening Biodiversity*, pp. 10-14. London: Chapman and Hall Inc.
- Russell, J.R., Fuller, J.D., Macaulay, M., Jahoor, A., Powell W. and Waugh, R. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95: 714-722.
- Saiki, S.F. 1990. Amplification of Genomic DNA. *In*: Innis, M.A. and Gelfand D.H. and Sninsky, J.J. (eds.), *PCR Protocol: A Guide to Methods and Application*, pp. 13-20. California: Academic Press Inc.
- Saiki, S.F., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.S., Harm, G.T., Erich, H.A. and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplication of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Sarich, V.M. and A.C. Wilson. 1967. Immonological time scale for hominid evolution. *Science.* 158: 1200-1203.
- Saunders, G.C., Dukes, J., Parkers, H.C. and Cornett, J.H. 2001. Interlaboratory study on thermal cycler performance in controlled PCR random amplified polymorphic DNA analysis. *Clinical Chemistry* 47: 47-55.
- Scandalios, J.G. 1974. Isozymes in development and differentiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25: 225-258.

- Seark, R.J. 1999. A new combination and new synonym in *Kaempferia* (Zingiberaceae: Hedychieae). *Telopea*. 8: 375-376.
- Shamina, A., Zachariah, T.J., Sasikumar B. and George, J.K.. 1998. Biochemical variation in Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) accessions based on isozyme polymorphism. *J. Hort. Sci. & Biotech.* 73: 479-483.
- Shields, C.R. Orton, T.J. and Stuber, C.W. 1983. An Outline of General Resource Need and Procedure for Electrophoretic Separation of Active Enzyme from Plant Tissue. In: Tanksley S.D. and Orton T.J. (eds.), *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A*, pp. 443-468. Amsterdam: Elsevier Publishing Co.
- Siegel, S.M., Chen, J., Kottenmeier, W., Clark, K., Siegel, B.Z. and Chang, H. 1982. Reduction in peroxidase in *Cucumis brassica* and other seedings cultured in saline waters. *Phytochemistry* 21: 539-542.
- Simpson, M.J.A. and Wither, L.A. 1986. Characterization using isozyme electrophoresis. Guide to the literature. Rome: International Board for Plant Genetic Resources.
- Sirirugsa, P. 1992a. A revision of genus *Boesenbergia* Kuntze (Zingiberaceae) in Thailand. *Nat. His. Bull. Siam Soc.* 40: 67-90.
- Sirirugsa, P. 1992b. Taxonomy of the genus *Kaempferia* (Zingiberaceae) in Thailand. *Thai. For. Bull.* 19: 1-15.

- Sirirugsa, P. and Larsen, K. 1991. A new species of *Scaphochlamys* (Zingiberaceae) from Thailand. *Nordic J. Bot.* 11: 93-95.
- Skoula, M., El hilali, I., Makris A.M., 1999. Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. *Biochem. Syst. and Eco.* 27: 559-568.
- Smith, R.M. 1981. Synoptic Keys to the Genera of Zingiberaceae, pp. 1-28. Edinburgh: Royal Botanical Garden.
- Smithies, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gel: group variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochem. J.* 61:629-641.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. 1973. Numerical Taxonomy. San Francisco: W.H. Freeman
- Soltis, P., Soltis, D. and Doyle, J.J. 1992. Molecular Systematic of Plants. New York: Chapman and Hall Inc.
- Specht, C.D., Kress, W.J., Stevenson, D.W. and DeSalle, R. 2001. A molecular phylogeny of Costaceae (Zingiberaceae). *Molecular Phylogenetic and Evolution.* 21: 333-345.
- Stearns, S.C. 1992. The evolution of life histories. Oxford: Oxford University Press.

Stuber, C.W., Wendel, J.F., Goodman, M.M. and Smith, J.S.C. 1988.

Techniques and Scoring Procedures for Starch Gel Electrophoresis of Enzymes from Maize (*Zea mays* L.). Agricultural Research service, North Carolina State University.

Sunnucks, P. 2000 Efficient genetic markers for population biology. *Tree* 15: 199-203.

Suvachittanont, W. 1991. Characterization of some species of the genus *Kaempferia* using isozyme electrophoresis. *In: Botany 2000 Asia: A workshop meeting on the family Zingiberaceae*, p. 11. Prince of Songkla university Thailand.

Suvachittanont, W. and Pongspaiboon, K. 1994. Factor affecting isozyme patterns in leaves of *Havea brasiliensis*. 11 FAOBMB Symposium, Bangkok Thailand.

Tansley, S.A. and Brown, C.R. 2000. RAPD variation in the rare and endangered *Leucadendron elimense* (Proteaceae): implication for their conservation. *Biol. Conserv.* 92: 39-48.

Tanksley, S.D. and Rick, C.M. 1980. Genetic of esterase in species of *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet.* 56: 209-219.

- Trakoontivakorn, G., Nakahara, K., Shinmoto, H., Takenaka, M., Onishi-Kameyama, M., Ono, H., Yoshida, M., Nagata, T., and Tsushida, T. 2001. Structural analysis of a novel antimutagenic compound, 4-hydroxypanduratin A, and the antimutagenic activity of flavonoids in a Thai spice, fingerroot (*Boesenbergia pandurata* Schult.) against mutagenic heterocyclic amines. *J. Agric. Food Chem.* 49: 3046-3050.
- Tuchinda, P., Reutrakul, V., Claeson, P., Pongprayoon, U., Sematong, T., Santisuk, T. and Taylor, W.C. 2002. Anti-inflammatory cyclohexenyl chalcone derivatives in *Boesenbergia pandurata*. *Phytochemistry* 59: 169-173.
- Vallejos, E. 1983. Enzyme activity staining. *In*: Tanksley S.D. and Orton T.J. (eds.), *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A*, pp. 469-514. Amsterdam: Elsevier Publishing Co.
- Van der Bank, H., Van der Bank, M. and Van Wyk, B.E. 2001. A review of the use of allozyme electrophoresis in plant systematics. *Biochem. Syst. Ecol.* 29: 469-483.
- Volis, S., Mendlinger, S., Turspekov Y., Esnazarov, U., Abugalieva, S. and Orlovsky, N. 2001. Allozyme variation in Turkmenian Population of wild barley, *Hordeum spontaneum* Koch.. *Ann. Bot.* 87: 435-446.
- Walter, H. 1954 *Grundlagen der pflanzenverbreitung: Einführung in die pflanzengeographie (Fundamental of plant distribution: introduction to plant geography)*, pp. 25. Ludwigsburg: Eugen Ulmer.

- Watson, J.D. and Crick, F.H.C. 1953. A structure for DNA. *Nature* 171: 736-738.
- Weeden, N.F. 1983a. Plastid Isozymes. *In*: Tanksley S.D. and Orton T.J. (eds.), *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A*, pp. 141-149. Amsterdam: Elsevier Publishing Co.
- Weeden, N.F. 1983b. Evolution of Isozyme. *In*: Tanksley S.D. and Orton T.J. (eds.), *Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A*, pp. 177-207. Amsterdam: Elsevier Publishing Co.
- Weeden, N.F. 1989. Application of isozyme in plant breeding. *Plant Breeding Reviews* 6: 11-54.
- Weeden, N.F. and Wendel, J.F. 1989. Genetic of Plant Isozymes. *In*: Soltis, D.E., Soltis, P.S. (eds.), *Isozyme in Plant Biology*, pp. 46-72. Oregon: Dioscorides Press.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primer. *Nucl. Acids Res.* 18: 7213-7218.
- Werman, S.D., Springer, M.S. and Britten, R.J. 1996. Nucleic Acid I: DNA-DNA Hybridization. *In*. D.M., Hillis, C., Moritz and B.K., Mable (eds.), *Molecular Systematic (2nded)*, pp. 169-180. Massachusetts: Sinauer Associates Inc.

- Winter, P and Kahl G. 1995. Molecular markers technologies for plant improvement. *J. Micro and Biotech.* 11: 438-448.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *J. Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Urasaki, N., Tokumoto, M., Tarora., K., Ban, Y., Kayano, H., Tanaka, H., Oku, H., Chinen, I. and Terauchi, R. 2002. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104: 281-285.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นายไองการ วณิชาชีวะ	
วัน เดือน ปี เกิด	24 มีนาคม 2520	
วุฒิทางการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่	2541