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

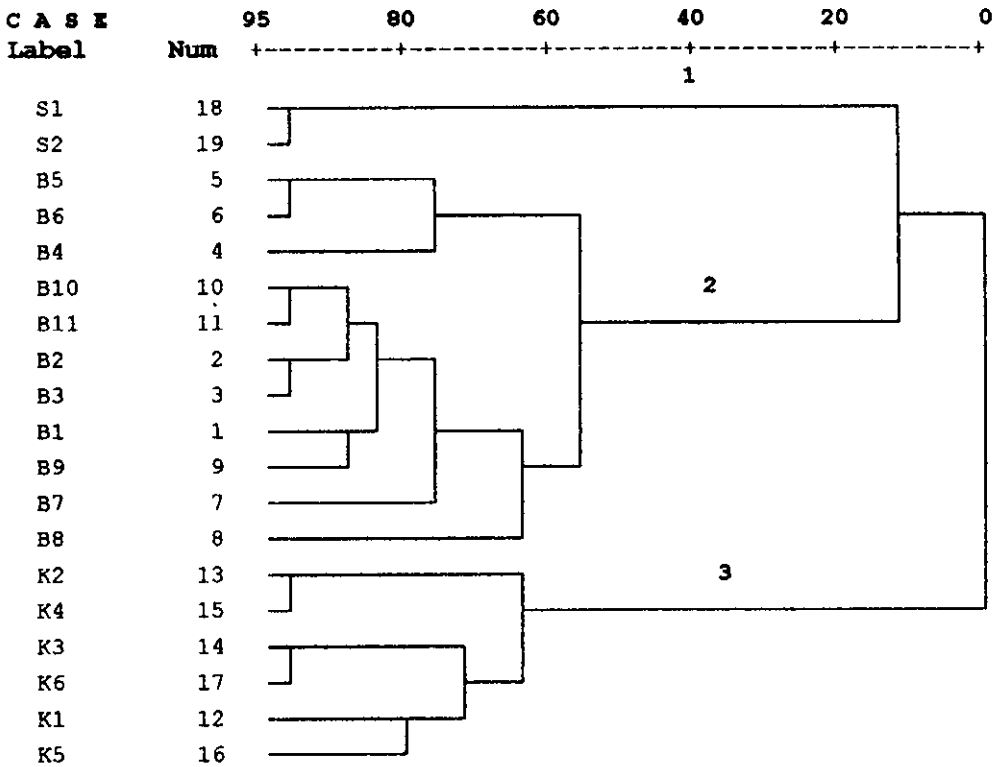
ตารางที่ 9 ลักษณะสัณฐานภายนอกที่ใช้วิเคราะห์

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)	แผ่แบน (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)	ขุรขระ (0)

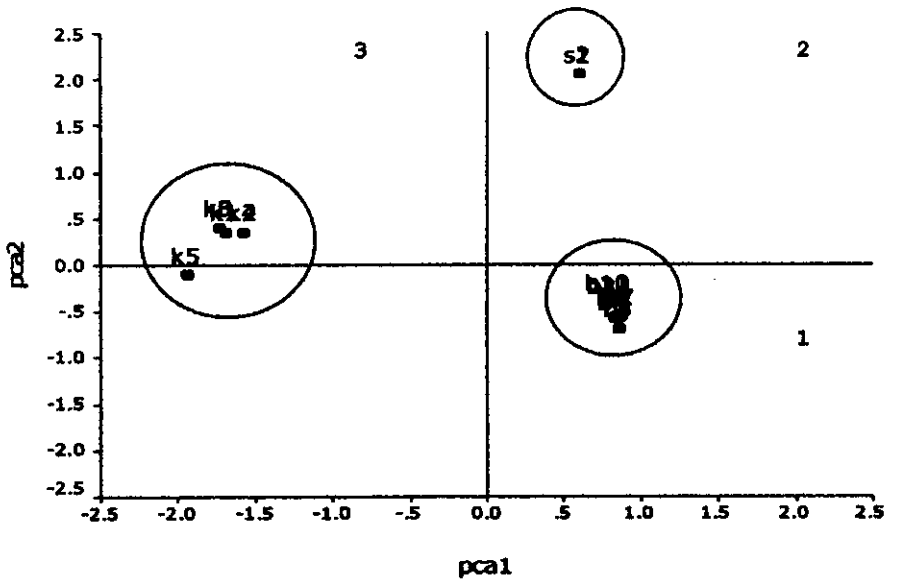
ตารางที่ 10 เมทริกซ์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของพืชและลักษณะสัณฐานภายนอกที่ใช้พิจารณา (เลขแสดงสถานะอ้างจากตารางที่ 9)

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 พบว่าสามารถแยกพืชตัวอย่างออกได้เป็นสามสายสัมพันธ์ใหญ่ๆซึ่งในแต่ละสายสัมพันธ์จะเป็นกลุ่มของพืชในสกุลนั้นๆ 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

ในการสกัดไอโซไซม์เพื่อนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการสกัดจากใบมีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง ไม่แก่เกินไปซึ่งพยายามให้อยู่ในระยะใกล้เคียงกัน โดยใช้อัตราส่วนระหว่างน้ำหนักของใบพืชตัวอย่าง 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ปริมาตร 2 มิลลิลิตร พบว่าปริมาณของโปรตีนโดยเฉลี่ยในพืชตัวอย่างแต่ละชนิดมีปริมาณสูงพอที่จะนำมาใช้ในการศึกษาไอโซไซม์ได้ ซึ่งในการศึกษาจะเจือจางให้มีโปรตีนในสารตัวอย่าง 15 µg ในแต่ละตัวอย่างสำหรับแต่ละการทดลอง

3.2.2 การเก็บรักษาสารตัวอย่าง

การเก็บรักษาสารตัวอย่างที่สกัดได้เพื่อทำการศึกษาไอโซไซม์ในครั้งนี้จะเก็บเอนไซม์ไว้ที่ -20 °C เนื่องจากพบว่าหลังจากนำมาย้อมเอนไซม์ชนิดต่าง โดยส่วนใหญ่รูปแบบของแถบไอโซไซม์ที่ได้จะมีความชัดเจนง่ายต่อการวิเคราะห์ การเก็บสารสกัดไว้ที่ –20 °C สามารถนำมาใช้ทำการศึกษาได้ประมาณ 3 เดือน พบว่ารูปแบบของไอโซไซม์ส่วนใหญ่ค่อนข้างคงเดิมแต่ความชัดเจนลดลงเล็กน้อย และหากเก็บที่อุณหภูมิ 0 °C ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับทำการศึกษาจะอยู่ที่ประมาณ 2-3 อาทิตย์ แล้วแต่ชนิดของเอนไซม์ โดยหลังจากนั้นรูปแบบของแถบที่ได้จะจางลงและบางตำแหน่งหายไป เช่น เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส พบว่าแถบที่เกิดบริเวณ POX-1 จะหายไปเกือบทุกชนิดของพืชตัวอย่าง ดังนั้นในการศึกษาไอโซไซม์ในครั้งนี้เก็บเอนไซม์ไว้ที่ -20 °C และทำการสกัดเอนไซม์ทุกๆ 3 เดือน ตลอดหนึ่งปีเพื่อตรวจสอบความคงตัวของเอนไซม์ นอกจากนี้ในการศึกษาไอโซไซม์หลังจากทำการสกัดเอนไซม์จะทำการหาปริมาณโปรตีน และแยกสารตัวอย่างไว้เป็นส่วนๆ โดยแต่ละส่วนมีความเข้มข้นประมาณ 15 µg สำหรับแต่ละการทดลอง เพื่อหลีกเลี่ยงการเสียสภาพของเอนไซม์จากการละลาย และแช่แข็งหลายครั้งที่อาจทำให้ความชัดเจนของแถบลดลง การพิจารณาผลที่ได้อาจไม่ถูกต้อง

3.2.3 การตรวจสอบไอโซไซม์ชนิดต่างๆ

การย้อมเอนไซม์ชนิดต่างๆในครั้งนี้จะเลือกเอนไซม์ที่ให้รูปแบบที่หลากหลายและมีความคงตัวในการศึกษา เบื้องต้นจะเลือกใช้เอนไซม์ 9 ชนิดจากเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส ได้แก่ แอซิดฟอสฟาเทส, อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส, แอลฟา-เอสเทอเรส,

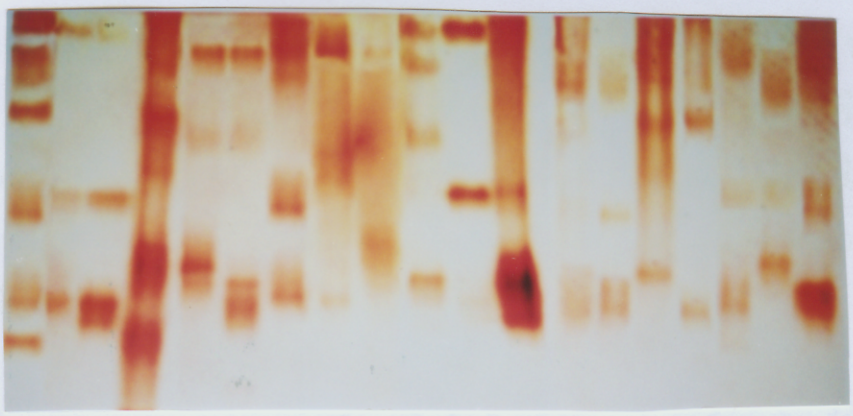
เบตา-เอสเทอเรส และ กลุ่มออกซิโดรีดัคเทส คือ เปอร์ออกซิเดส, ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส, กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนส, มาเลทดีไฮโดรจีเนส, และ ชิคิเมทดีไฮโดรจีเนส ในกลุ่มไฮโดรเลส พบว่าแอซิดฟอสฟาเทส และอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส ไม่แสดงรูปแบบของไอโซไซม์ให้เห็น ส่วนเบตา-เอสเทอเรส และแอลฟา-เอสเทอเรส รูปแบบของไอโซไซม์ที่ได้ไม่สามารถนำมาใช้พิจารณาหาความแตกต่าง เนื่องจากเป็นปื้นยาว ไม่แยกเป็นแถบชัดเจน ยากต่อการพิจารณาและวิเคราะห์ผล ส่วนในกลุ่มออกซิโดรีดัคเทส พบว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่ย้อมติด และรูปแบบที่ได้หลากหลายโดยเฉพาะเปอร์ออกซิเดสและซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส ยกเว้นชิคิเมทดีไฮโดรจีเนสที่ย้อมไม่ติด

3.2.4 รูปแบบของไอโซไซม์ที่ได้จากการศึกษา

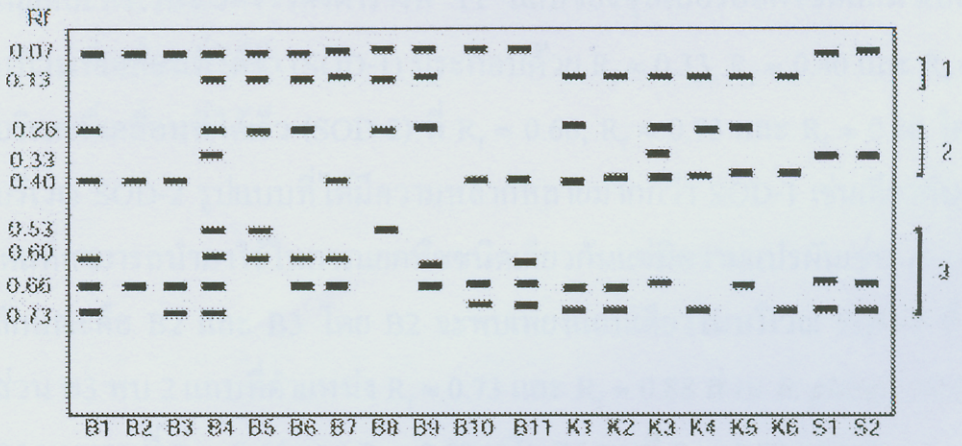
ลักษณะแถบที่ได้จากการย้อมเอนไซม์ชนิดต่างๆแสดงไว้ดังรูปที่ 32-35

3.2.4.1 เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส

จากการศึกษารูปแบบของไอโซไซม์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส ทั้ง 12 ครั้งของการทดลองทุก 3 เดือนตลอดทั้งปี พบว่าเปอร์ออกซิเดสเป็นไอโซไซม์ที่ให้รูปแบบหลากหลายมากที่สุดในเอนไซม์ 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

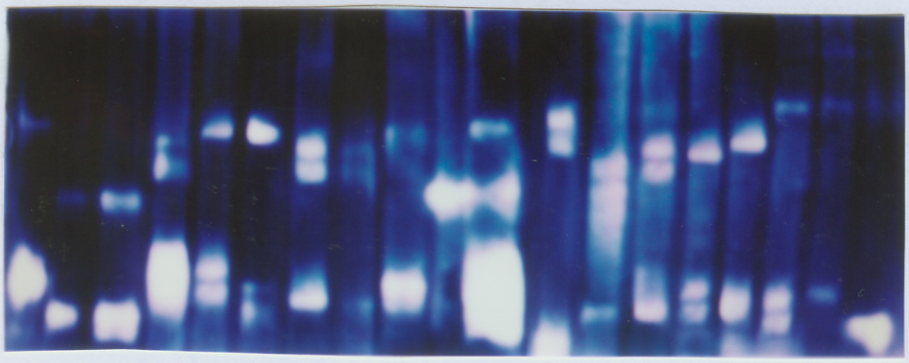
ก ภาพจากการย้อมไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส

ข ไซโมแกรมของไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส

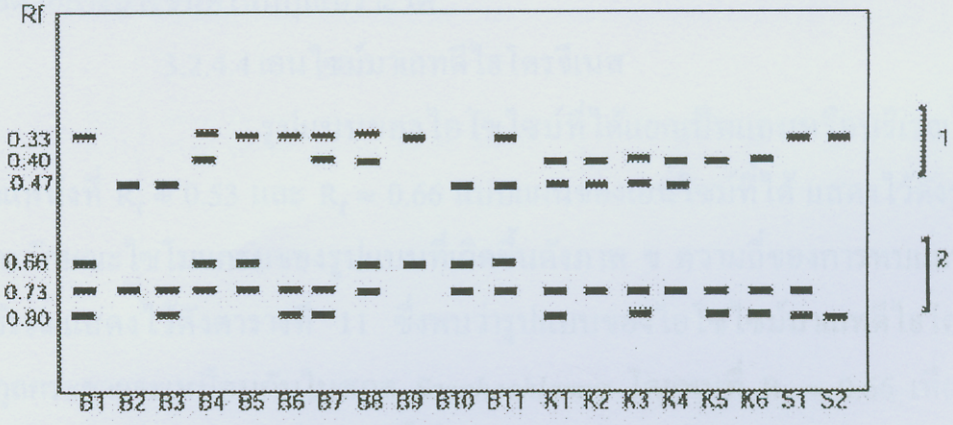
คือ B5 และ B6 โดย B5 พบแถบที่ $R_f \approx 0.53$ และ $R_f \approx 0.60$ ส่วน B6 พบที่ $R_f \approx 0.60$ และ $R_f \approx 0.66$ กลุ่มพืชในสกุลเปราะ พบว่ารูปแบบของแถบที่ได้ในพืชตัวอย่างแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ส่วนใน *Scaphochlamys* พบว่าทั้ง 2 ชนิดให้รูปแบบของแถบที่เหมือนกันทั้ง 3 บริเวณ ดังนั้นเปอร์ออกซิเดสไอโซไซม์ไม่สามารถบอกความแตกต่างของพืชตัวอย่างในกลุ่มของ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

3.2.4.2 เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

จากการศึกษาไอโซไซม์ของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสพบว่ารูปแบบของแถบที่ได้สามารถแยกพิจารณาได้เป็นสองบริเวณ โดยแบบแผนของเอนไซม์ที่ได้ดังรูปที่ 33 ก และลักษณะไซโมแกรมดังรูปที่ 33 ข รวมทั้งความถี่ของการพบแถบในแต่ละบริเวณแสดงไว้ดังตารางที่ 11 แถบของซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส 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 $R_f \approx 0.80$ ส่วนกลุ่มของพืชในสกุลเปราะพบว่ารูปแบบของแถบที่ได้ในพืชตัวอย่างแต่ละชนิดจะแตกต่างกันยกเว้นในชนิด 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 รูปแบบของไอโซไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

ก ภาพจากการย้อมไอโซไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

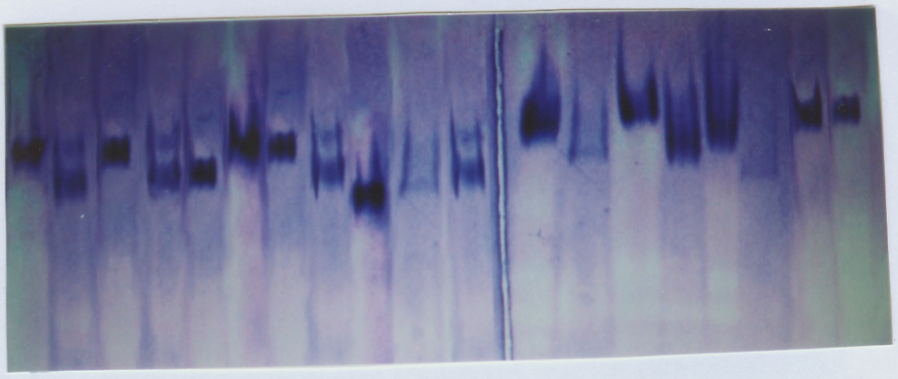
ข ไซโมแกรมของไอโซไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส

3.2.4.3 เอนไซม์กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนส

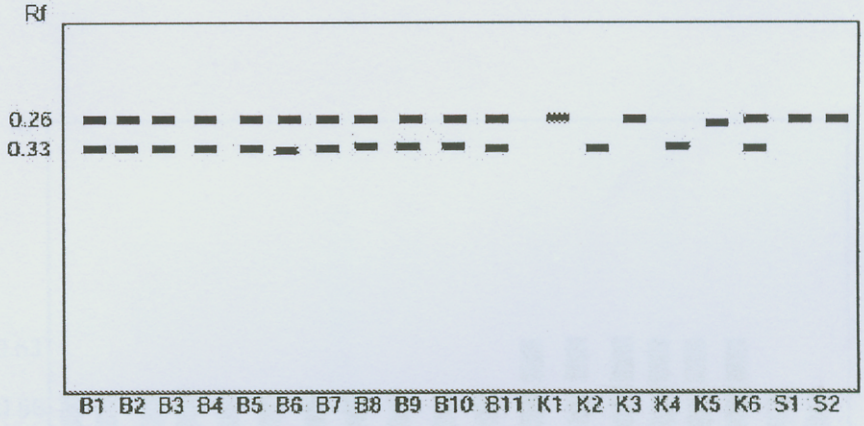
ไอโซไซม์กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนสในการย้อมส่วนใหญ่พบว่าแถบที่ได้ค่อนข้างจางและติดยากและปรากฏให้เห็นเพียง 1-2 โดยแบบแผนของเอนไซม์ที่ได้ แสดงไว้ดังรูปที่ 34 ก และลักษณะไซโมแกรมของแถบที่เกิดขึ้นดังภาพ ข โดยความถี่ของการพบแถบในแต่ละบริเวณแสดงไว้ดังตารางที่ 11 พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้เคลื่อนที่ได้น้อยในสนามไฟฟ้า ค่า 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 $R_f \approx 0.33$ ดังนั้นรูปแบบของไอโซไซม์กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนสแม้ว่าจะมีความหลากหลายของแถบไม่มากนัก แต่พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบในระดับสกุลได้ดี และสามารถนำมาใช้จำแนกพืชตัวอย่างบางชนิดในสกุลเปราะได้

3.2.4.4 เอนไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนส

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



ก

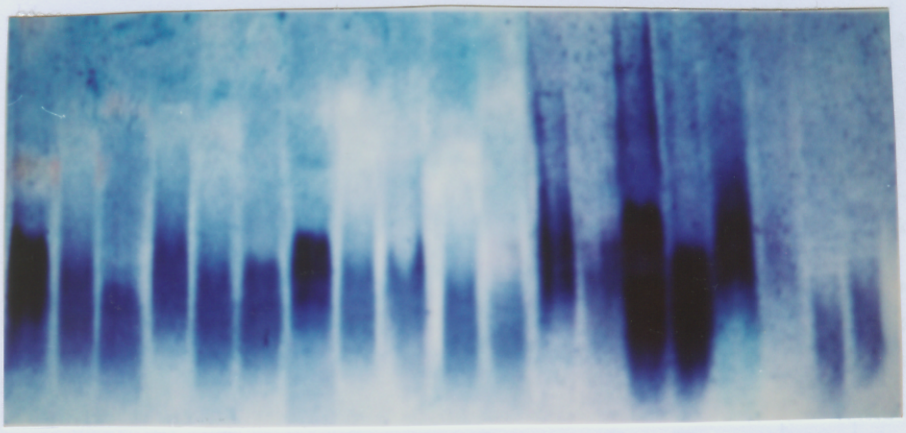


ข

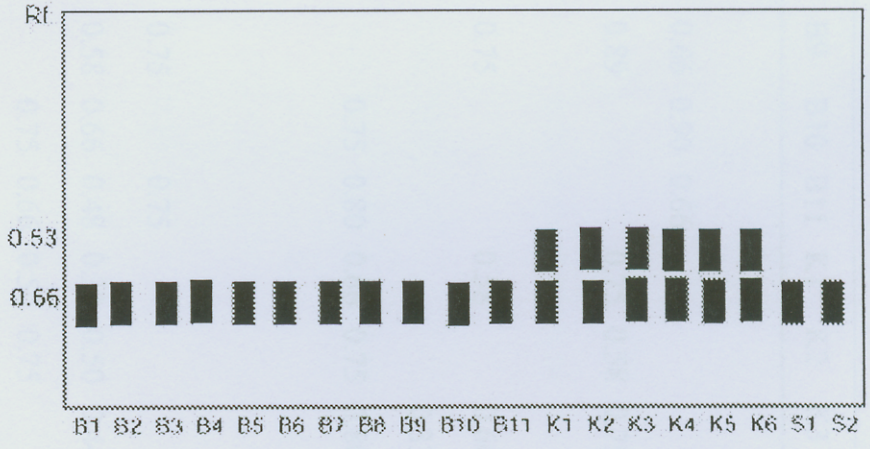
รูปที่ 34 รูปแบบของไอโซไซม์กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนส

ก ภาพจากการย้อมไอโซไซม์กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนส

ข ไซโมแกรมของไอโซไซม์กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนส



ก



ข

รูปที่ 35 รูปแบบของไอโซไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนส

ก ภาพจากการย้อมไอโซไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนส

ข ไซโมแกรมของไอโซไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนส

ตารางที่ 11 ความถี่ของตำแหน่งที่พบไอโซไซม์

ตำแหน่ง (R_f)	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					066										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)

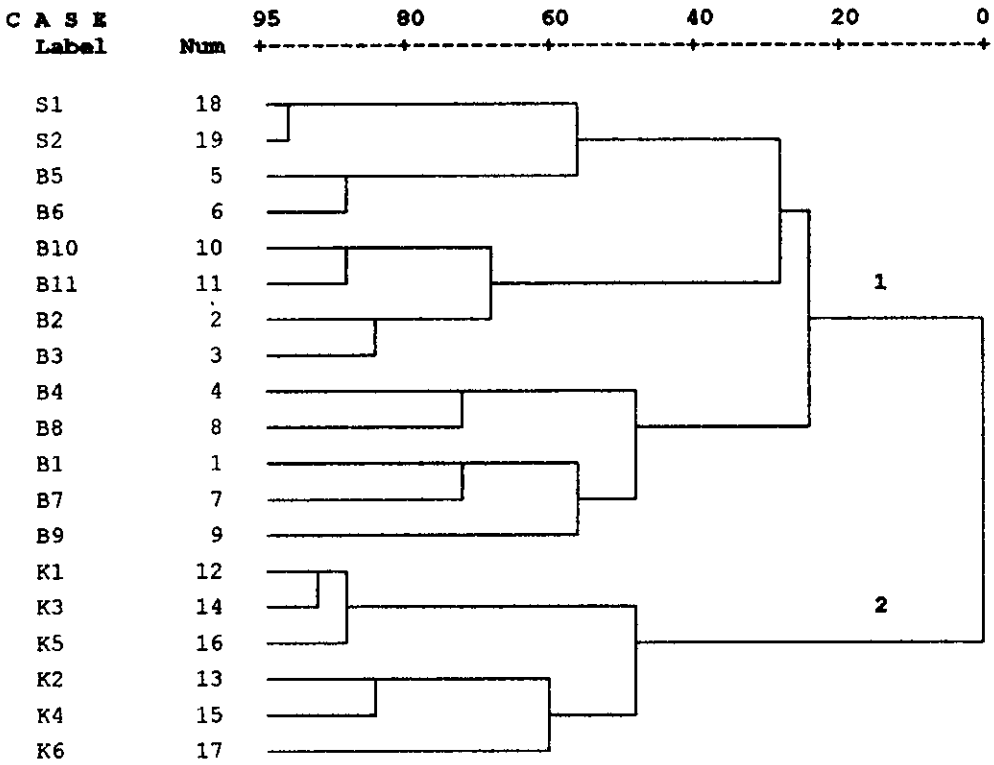
ตำแหน่ง (R_f)	ชนิด	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	K1	K2	K3	K4	K5	K6	S1	S2
SOD1																				
0.33		0.66			0.75	0.66	0.75	0.58	0.75	0.66		0.58							0.66	0.58
0.40					0.66			0.66	0.66				0.58	0.66	0.75	0.66	0.66	0.50		
0.47			0.75	0.66							0.58	0.66	0.25	0.16	0.33	0.42				
SOD2										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

3.2.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่างโดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์

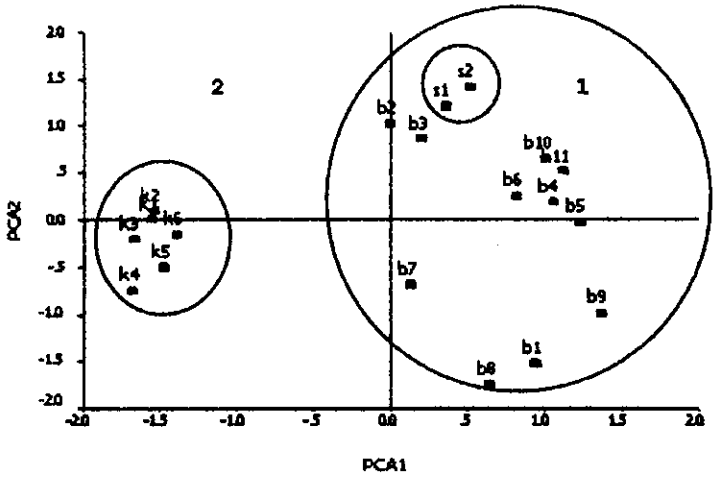
เลือกแถบที่มีความคงตัวและชัดเจน 20 แถบของรูปแบบไอโซไซม์ที่ได้จากเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มาพิจารณาหาดัชนีความคล้ายคลึง โดยใช้ Dice index ค่าที่ได้แสดงไว้ดังตารางที่ 12 จากการใช้รูปแบบของไอโซไซม์ พบว่าช่วงค่าความคล้ายคลึงของพืชตัวอย่างทั้งสามสกุลคือ 31.1-94.7% และเมื่อแยกพิจารณาในแต่ละกลุ่มพบว่าในกลุ่มสกุลกระชายมีความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง 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 โดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์

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 µg/g ของน้ำหนักสดเก็บดีเอ็นที่ได้ในรูปของตะกอนที่ -20 °C เมื่อจะใช้จึงนำมาละลายในน้ำกลั่นที่สะอาดซึ่งกำจัดไอออนออกแล้ว

3.3.2 การทดสอบหาสภาวะเหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

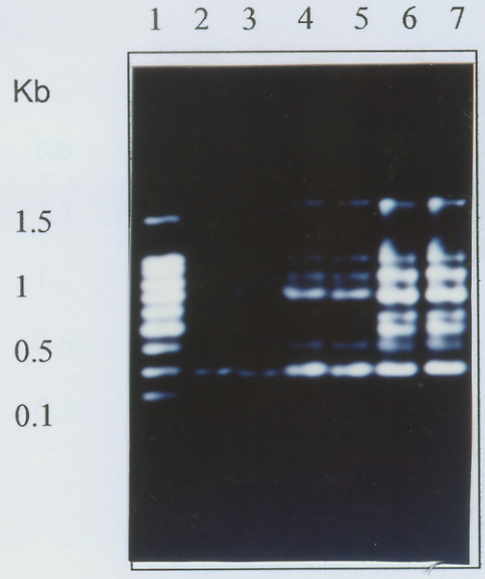
ในเบื้องต้นได้ทำการทดลองโดยใช้สภาวะเดียวกับ Prathepha (2000) จากนั้นศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองโดยเปลี่ยนแปลงปริมาณของดีเอ็นเอแม่แบบความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และจำนวนรอบที่ทำการทดลอง

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 ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นที่มีความคงตัวและชัดเจนง่ายต่อการสังเกตมากกว่าที่ 3 และ 4 mM ดังรูปที่ 38 ดังนั้นจึงใช้ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 5 mM ในปฏิกิริยาครั้งนี้



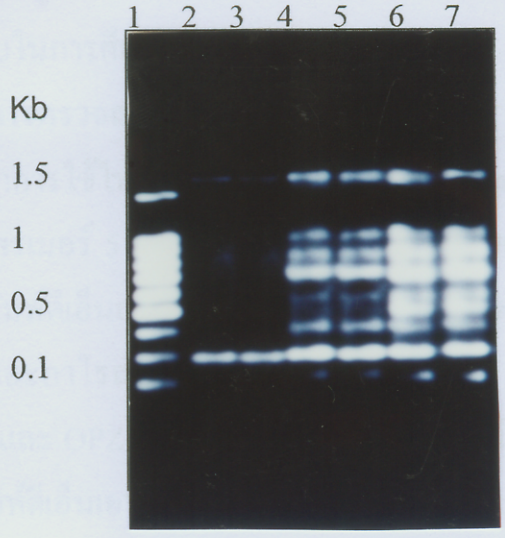
รูปที่ 37 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ (template)
ปริมาณต่างกันแล้วแยกดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส
1.8 % อะกาโรสเจล ใช้ไพรเมอร์ ชนิด OPAM-12
ดีเอ็นเอแม่แบบชนิด B10

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

แถวที่ 2,3 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณ 25 ng

แถวที่ 4,5 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณ 50 ng

แถวที่ 6,7 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณ 100 ng



รูปที่ 38 แสดงผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเมื่อทดสอบด้วย $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นต่างกันแล้วแยกดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส 1.8 % อะกาโรสเจล ใช้ไพรเมอร์ ชนิด OPAM-12 ดีเอ็นเอแม่แบบชนิด B10

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

แถวที่ 2,3 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 3 mM

แถวที่ 4,5 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 4 mM

แถวที่ 6,7 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นที่ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 5 mM

3.3.2.3 จำนวนรอบในการทำ PCR

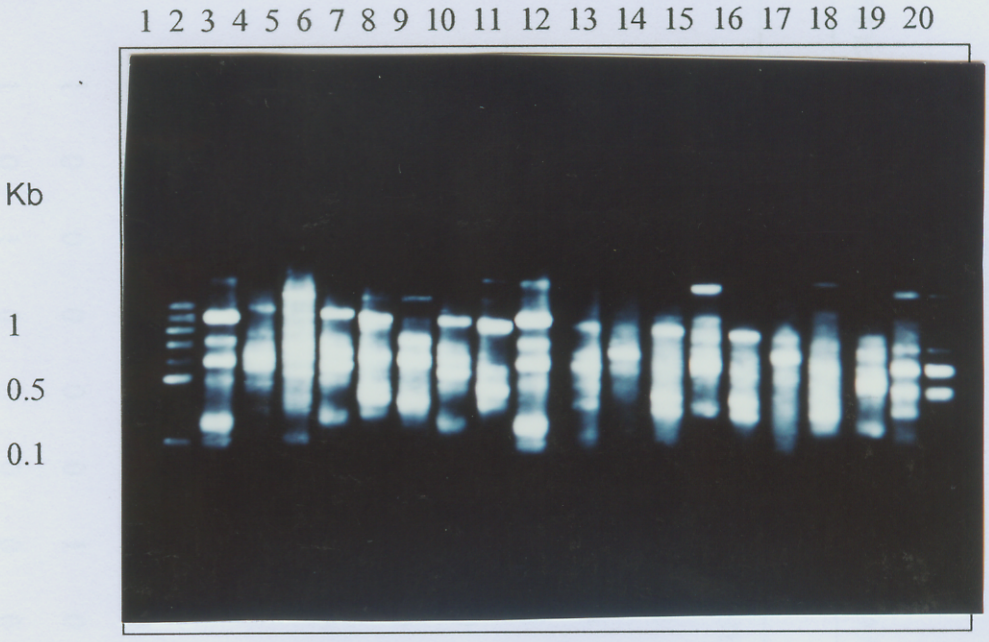
การศึกษาเปรียบเทียบผลของจำนวนรอบจากการทำ PCR ในขั้นที่ 2 ตามข้อ 2.3.3.3 เบื้องต้นจะใช้จำนวนรอบในการทดลอง 45 รอบ ต่อมาลดจำนวนรอบในขั้นตอนนี้เป็น 35 รอบ พบว่าเวลาในการดำเนินปฏิกิริยาลดลงจากเดิมประมาณ 2 ชั่วโมง และรูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงใช้จำนวนรอบในการศึกษา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

3.3.3 การตรวจสอบไพรเมอร์ชนิดต่างๆ

จากการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม (random primer) ลักษณะต่างๆ 10 ชนิด ดังตารางที่ 7 พบว่าไพรเมอร์ 5 ชนิด เมื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ให้แบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่หลากหลาย ชัดเจน และมีความคงตัว เมื่อแยกโดยใช้อิเล็กโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจล 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 ของพืชที่ใช้ในการศึกษาจากไพรเมอร์ชนิด OPAM-01 ที่แยกโดยอิเล็กโตรโฟเรซิสด้วย 1.8 % อะกาโรสเจล

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

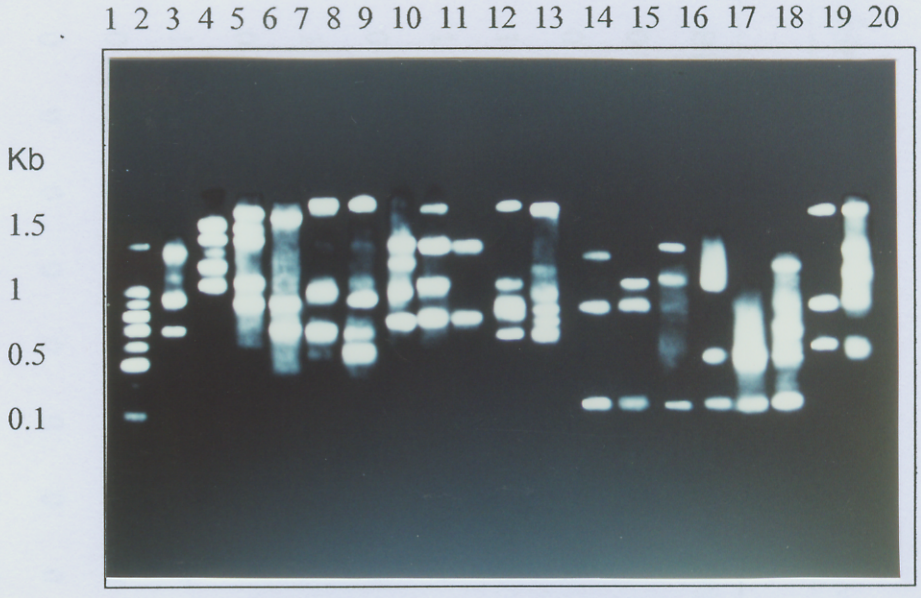
แถวที่ 2-12 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด B1-B11

แถวที่ 13-18 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด K1-K6

แถวที่ 19-20 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด S1-S2

ตารางที่ 13 การวิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPAM-01

Markers	ชนิด																		
(bp)	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	K1	K2	K3	K4	K5	K6	S1	S2
1,500	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1
1,000	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
800	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
400	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1
300	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
200	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0



รูปที่ 40 รูปแบบของ RAPD ของพืชที่ใช้ในการศึกษาจากไพรเมอร์ชนิด OPAM-03 ที่แยกโดยอิเล็กโตรโฟเรซิสด้วย 1.8 % อะกาโรสเจล

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

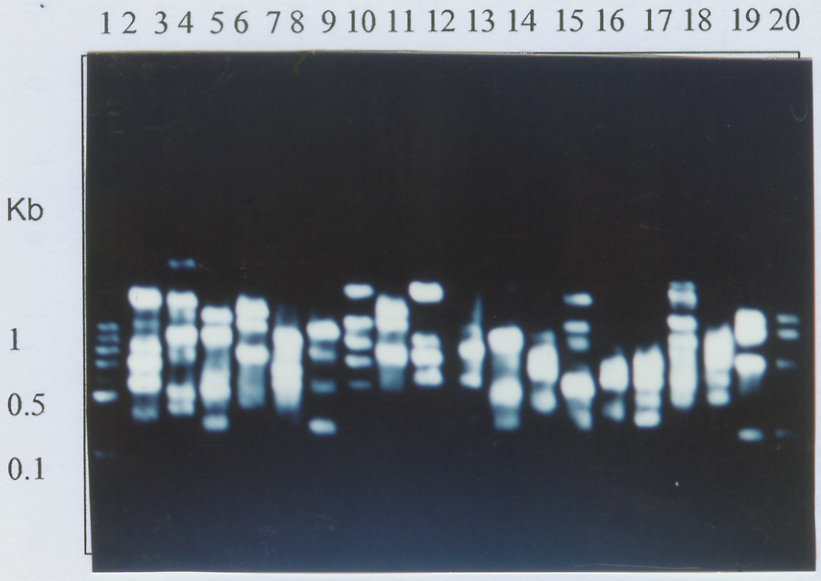
แถวที่ 2-12 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด B1-B11

แถวที่ 13-18 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด K1-K6

แถวที่ 19-20 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด S1-S2

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPAM-03

Markers	ชนิด																		
(bp)	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	K1	K2	K3	K4	K5	K6	S1	S2
2,000	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
1,700	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,500	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,200	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
1,000	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
900	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1
800	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
700	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
600	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0



รูปที่ 41 รูปแบบของ RAPD ของพืชที่ใช้ในการศึกษาจากไพรเมอร์ชนิด OPAM-12 ที่แยกโดยอิเล็กโตรโฟเรซิสด้วย 1.8 % อะกาโรสเจล

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

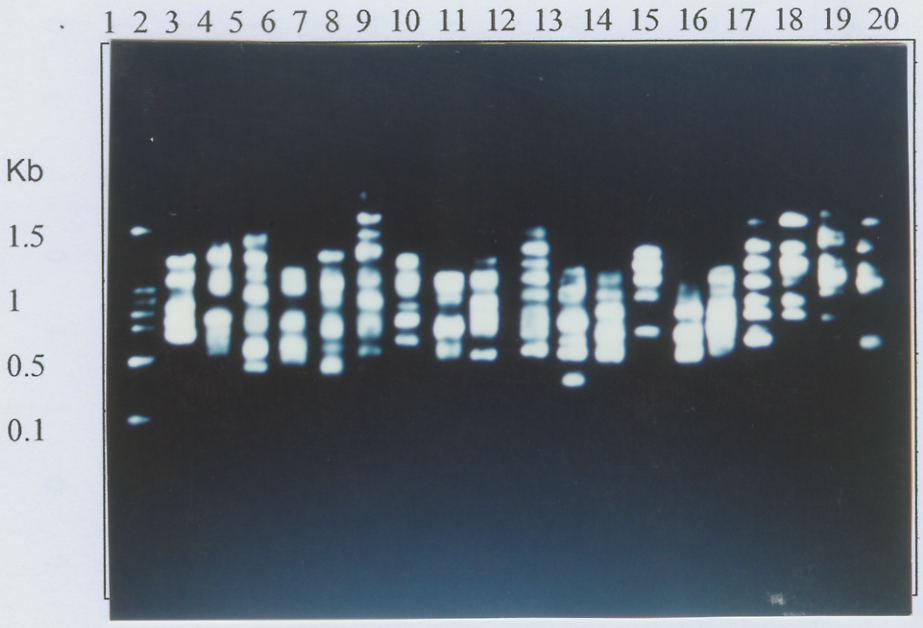
แถวที่ 2-12 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด B1-B11

แถวที่ 13-18 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด K1-K6

แถวที่ 19-20 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด S1-S2

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPAM-12

Markers	ชนิด																		
(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
1,300	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
1,000	1	0	0	0	1	0	1	1	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	1
800	1	0	0	0	1	0	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	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
500	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
300	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1



รูปที่ 42 รูปแบบของ RAPD ของพืชที่ใช้ในการศึกษาจากไพรเมอร์ชนิด OPB-14 ที่แยกโดยอิเล็กโตรโฟเรซิสด้วย 1.8 % อะกาโรสเจล

แถวที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp Ladder

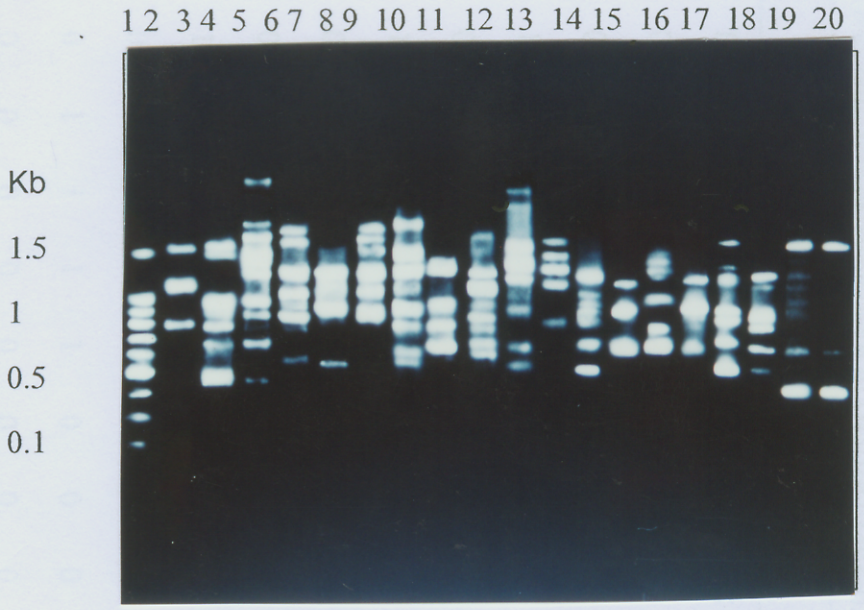
แถวที่ 2-12 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด B1-B11

แถวที่ 13-18 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด K1-K6

แถวที่ 19-20 แถบดีเอ็นเอที่ถูกสังเคราะห์ได้จากดีเอ็นเอแม่แบบชนิด S1-S2

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPB-14

Markers	ชนิด																		
(bp)	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	K1	K2	K3	K4	K5	K6	S1	S2
1,500	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
1,400	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1,300	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
1,200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1,000	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
900	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
700	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
600	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
500	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0



รูปที่ 43 รูปแบบของ RAPD ของพืชที่ใช้ในการศึกษาจากไพรเมอร์ชนิด OPZ-03 ที่แยกโดยอิเล็กโตรโฟเรซิสด้วย 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 17 การวิเคราะห์ลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ OPZ-03

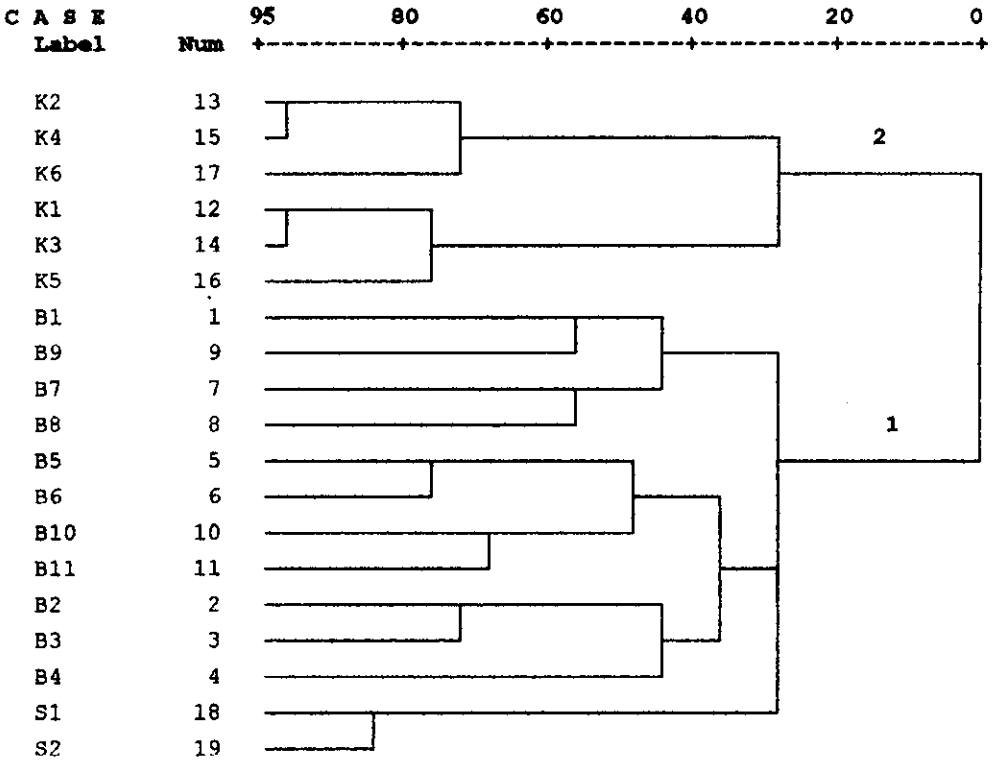
Markers	ชนิด																		
(bp)	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	K1	K2	K3	K4	K5	K6	S1	S2
1,700	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1,600	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1,500	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1,400	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
1,200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1
1,000	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
900	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0
800	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0
600	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
500	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0
400	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

3.3.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่างโดยใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

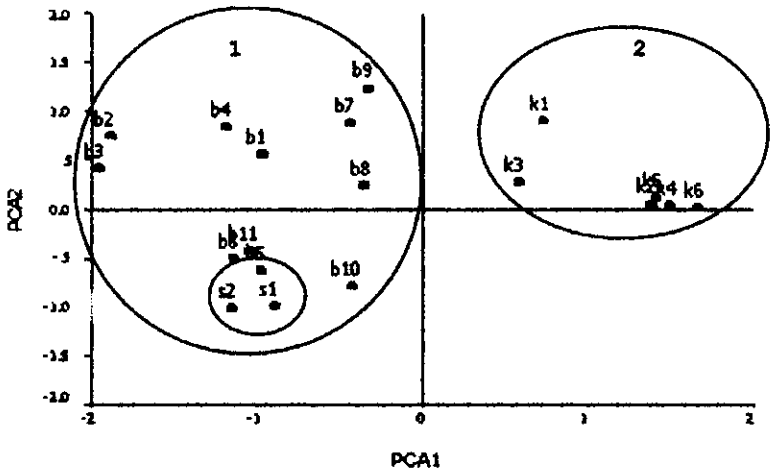
การศึกษาพบว่าแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 5 ชนิด จำนวน 53 แถบเมื่อพิจารณาหาดัชนีความคล้ายคลึง โดยใช้ Dice index ได้ผลดังตารางที่ 18 จากตารางพบว่า ช่วงของค่าความคล้ายคลึงกลุ่มของพืชตัวอย่างทั้งสามสกุลคือ 36.7%-97% และเมื่อแยกพิจารณาในแต่ละกลุ่มพบว่าในกลุ่มสกุลกระชายมีค่าความคล้ายคลึงในช่วง 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 ของพืชตัวอย่าง 19 ชนิด จาก Dice index โดยใช้แบบแผนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

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 ความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่างที่ใช้ศึกษาโดยอาศัยรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิค RAPD

ก แสดงสายสัมพันธ์ของพืชตัวอย่าง โดยวิธี UPGMA

ข แสดงกลุ่มความสัมพันธ์ของพืชตัวอย่าง โดยวิธี PCA