1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

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

การจำแนกและหาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะในพืช อาจเปรียบเทียบจากความแตกต่างทางด้านรูปพรรณสัณฐานภายนอก (morphological markers) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันมานานและยังคงใช้ได้ผลดีในปัจจุบัน แต่อาจใช้เวลานานและบางครั้งก็เกิดความผิดพลาดได้ในบางกรณี จำเป็นต้องอาศัยผู้ชำนาญเท่านั้นจึงจะแยกความแตกต่างได้ ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องนำวิธีการอื่นๆเข้ามาช่วยในการตรวจสอบเพื่อให้ได้ ข้อมูลใหม่ๆ ที่จะนำไปพัฒนาทฤษฎี และข้อมูลที่มีอยู่เกี่ยวกับการจำแนก และจัดระบบของสิ่งมีชีวิต รวมทั้งรูปแบบของความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Stearns, 1992)

เครื่องหมายทางโมเลกุลเป็นเครื่องมือที่ช่วยในการจำแนกและตรวจสอบสายสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตที่ดี (Karp *et al.*, 1998) โดยวิเคราะห์แบบแผนของไอโซไซม์ที่ได้จากการทำอิเล็กโตรโฟเรซิส 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) ข้อมูลดังกล่าวมีข้อได้เปรียบกว่าการศึกษาด้วยวิธีการอื่นๆใน ระดับเดียวกัน 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 at.*, 1996) ทั้งในรูปของสายสัมพันธ์ (dendrogram) (Apavatjrut *et al.*, 1999 ; Skoula *et at.*, 1999) และกลุ่มของความสัมพันธ์ (Principal component) (Garkava *et al.*, 2000) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการช่วยยืนยันการจำแนกชนิดของพืชในกลุ่มสกุลกระชาย สกุลเปราะ และสกุล *Scaphochlamys* พร้อมทั้งเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชในกลุ่มนี้ด้วย

บทตรวจเอกสาร

1.1 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืช

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต มีการศึกษามากว่าศตวรรษแล้วโดยหลังจาก Darwin ค้นพบทฤษฎีของวิวัฒนาการ "Theory of evolution" ในปี ค.ศ. 1859 และพัฒนาเป็น Neo-Darwinian synthesis ในปี ค.ศ. 1930 ทำให้การศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในแง่วิวัฒนาการนั้นมีการศึกษากันอย่างจริงจังมากยิ่งขึ้น (Briggs and Walters, 1997) ระยะแรกการตรวจสอบอาศัยลักษณะสัณฐานภายนอกเพียงอย่างเดียว และเน้นการศึกษาในสัตว์มากกว่าในพืชเนื่องจากมีหลักฐานที่สำคัญในการเปลี่ยนแปลงช่วงเวลาที่เรียกว่า ฟอสซิล มากกว่าในพืช Avery และคณะ (1944) พบสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั่นคือดีเอ็นเอ จากนั้น Watson และ Crick (1953) ค้นพบโครงสร้างของดีเอ็นเอที่เป็นกุญแจสำคัญในการส่งผ่านรหัสทางพันธุกรรมจากรุ่นหนึ่งไปยังรุ่นถัดไป ขณะเดียวกัน Smithies (1955) ค้นพบเทคนิคอิเล็กโตรโฟเรซิสซึ่งสามารถตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในระดับโปรตีนได้กระทั่ง Hennig (1966) เสนอทฤษฎี Hennigial Principal ที่แสดงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในรูปของ Phylogenetic tree หรือ Evolutionary tree ทำให้ง่ายต่อการศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในเชิงวิวัฒนาการมากยิ่งขึ้น ทำให้วิธีการตรวจสอบในระดับโปรตีน และดีเอ็นเอเข้ามามีบทบาทในการศึกษาในความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตมากขึ้น (Avise, 1994)

ช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาการศึกษาหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยเฉพาะในพืชซึ่งแสดงในรูปแบบของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการนั้นเป็นที่สนใจ และได้รับการตรวจสอบอย่างจริงจังมากยิ่งขึ้นโดยอาศัยข้อมูลจากลักษณะสัณฐานภายนอกทั้งทางสัณฐานวิทยา ทางกายวิภาค ควบคู่ไปกับการตรวจสอบระดับเซลล์ และ เครื่องหมายในระดับพันธุกรรม หรือเครื่องหมายในระดับโมเลกุล ซึ่งประกอบด้วยเครื่องหมายในระดับโปรตีน และระดับดีเอ็นเอ (Judd *et al.*, 1999) ปัจจุบันพบว่าเครื่องหมายในระดับโมเลกุลเหล่านี้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในการจัดสิ่งมีชีวิต สามารถนำมาหาความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มของพืชได้มากยิ่งขึ้น (Sunnucks, 2000)

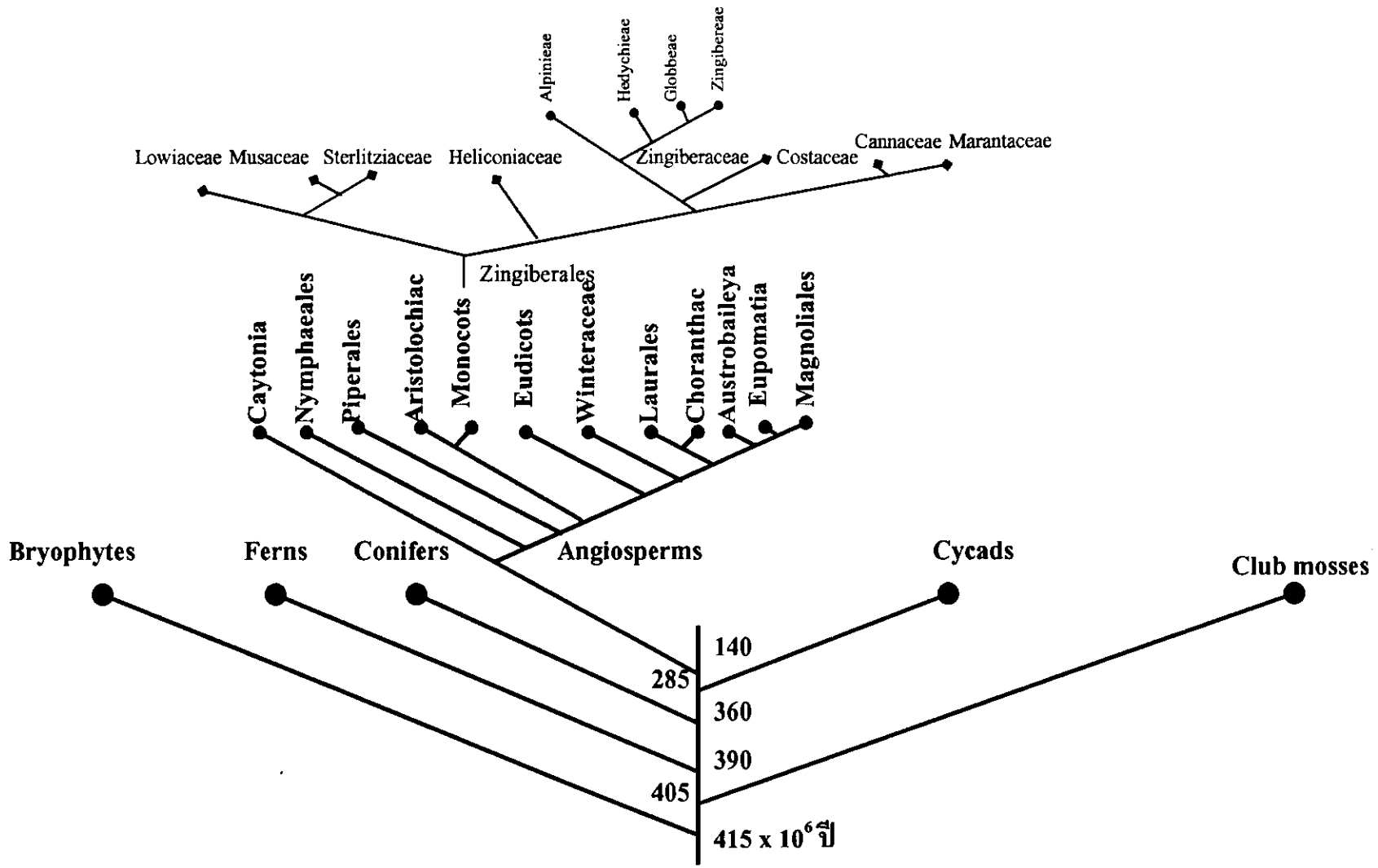
1.2 พืชวงศ์ขิง

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) ใช้ลักษณะสัณฐานภายนอกควบคู่ไปกับข้อมูลในระดับโมเลกุลเพื่อจัดความสัมพันธ์ทั้งในระดับเผ่าของพืชวงศ์ขิงเองกับวงศ์ใกล้เคียง Specht และคณะ (2001) ทำการศึกษาในระดับโมเลกุลของพืชวงศ์เอื้องหมายนา พบว่าพืชวงศ์ขิงมีบรรพบุรุษร่วมพืชวงศ์เอื้องหมายนามากกว่าวงศ์อื่นๆในลำดับเดียวกัน 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 แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยรวมของพืชในวงศ์ขิงกับพืชในกลุ่มอื่น (ดัดแปลงจาก Judd *et al.*, 1999)

1.2.3 แหล่งที่พบและการกระจายตัว

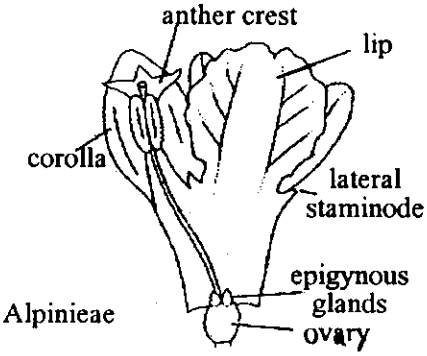
พืชวงศ์ขิงประกอบด้วย 52 สกุล 1,500 ชนิด พบในเขตร้อนโดยเฉพาะเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบประมาณ 52 สกุล 1,400 ชนิด (Prakash and Mehrotra, 1996) มีการกระจายตัว ดังรูปที่ 2 พืชวงศ์นี้ในประเทศไทยพบ 27 สกุล 250 ชนิด (Larsen, 1999) ภาคใต้พบประมาณ 11 สกุล 44 ชนิด (พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2532)

รูปที่ 2 การกระจายตัวของพืชวงศ์ขิง (Walter, 1954)

1.2.4 การจัดกลุ่มของพืชวงศ์ขิง

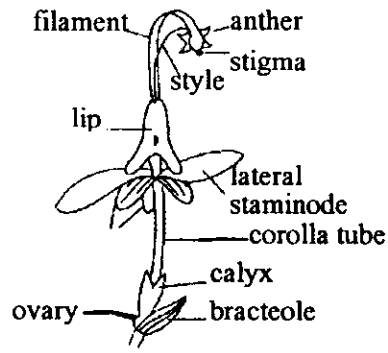
พืชวงศ์ขิงสามารถจำแนกแบ่งออกได้เป็น 4 เผ่า (Smith, 1981) ลักษณะของดอกแตกต่างกันตามรูปที่ 3-6 (ดัดแปลงจาก Larsen *et al.*, 1999) ดังนี้

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



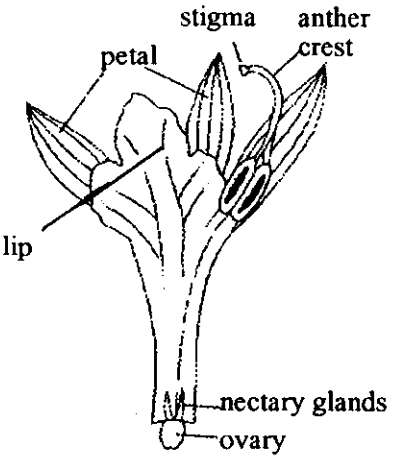
รูปที่ 3 ลักษณะดอกของเผ่า Alpinieae

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



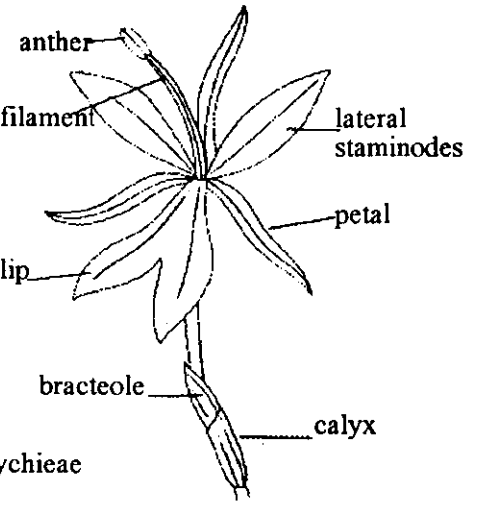
รูปที่ 4 ลักษณะดอกของเผ่า Globbeae

1.2.4.3. เผ่า Zingibereae ระนาบใบขนานกับแง่งใต้ดิน lateral staminodes มีรูปร่างคล้ายกลีบดอก และเชื่อมติดกับกลีบปากลักษณะเด่นของพืชเผ่านี้คือ รยางค์ (anther-crest) จะยืดยาวเหนืออับเรณู โค้งเป็นจะงอย 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

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

เป็นลักษณะสำคัญในการแยกสกุล พบว่าในสกุลเปราะมีขนาดใหญ่และเด่นชัด แต่สกุลกระชาย และ*Scaphochlamys* ลดรูปมีขนาดเล็กลง (Larsen *et al.*, 1998)

1.3.2 แหล่งที่พบและการกระจาย

พืชในสกุลกระชายทั่วโลกพบประมาณ 60 ชนิด สกุลเปราะพบประมาณ 40 ชนิด สกุล *Scaphochlamys* พบประมาณ 30 ชนิด (Larsen *et al.*, 1998) ในประเทศไทย Sirirugsa (1992a) ได้ทบทวนพืชในสกุลกระชายไว้ 13 ชนิด ต่อมา Larsen (1993, 1997) รายงานเพิ่มเติมอีก 2 ชนิดในทางภาคใต้ของประเทศไทย ในสกุลเปราะ Sirirugsa (1992b) ได้ทบทวนไว้ 15 ชนิด สกุล *Scaphochlamys* Sirirugsa และ Larsen (1991) รายงานไว้ 2 ชนิด ต่อมา Maknoi (2001) พบในสกุลกระชายอีก 2 ชนิด และสกุล *Scaphochlamys* อีก 1 ชนิด

1.3.3. ประโยชน์ของพืชในกลุ่มนี้

พืชในกลุ่มนี้หลายชนิดนอกจากจะนำมาเป็นเครื่องเทศในการประกอบอาหารตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันแล้วพบว่ามีสารสกัดจากรากหรือเหง้าหลายชนิด (Mahidol *et al.*, 1984) ซึ่งมีคุณสมบัติในทางเภสัชวิทยา เช่น สาร cincole ที่ช่วยลดการบีบตัวของลำไส้จึงลดอาการปวดเกร็งของลำไส้ได้ (Haginiwa *et al.*, 1963) และมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ได้ดีกว่าราและยีสต์จึงช่วยลดอาการท้องอืดท้องเสีย (Chu *et al.*, 1998) นอกจากนี้ Murakami และคณะ (1993) พบว่ามีสารบางตัวที่สามารถป้องกันการเกิดเนื้องอก อันเป็นสาเหตุก่อให้เกิดมะเร็งได้ Trakoontivakorn และคณะ (2001) พบว่าสารสกัดจากพืชในกลุ่มนี้มีฤทธิ์อย่างแรงในการป้องกันการกลายพันธุ์ Tuchinda และคณะ (2002) พบสารที่ช่วยลดการอักเสบหลายชนิด ในสารสกัดจากรากเหง้าของพืชในกลุ่มนี้ ดังนั้นพืชในกลุ่มนี้นับว่ามีประโยชน์อย่างมากและน่าสนใจหากจะมีการพัฒนาเป็นยา

1.3.4 ปัญหาในการจำแนกชนิด

พืชทั้งสามสกุลนี้จัดว่ามีความใกล้ชิดกันมากทั้งจากลักษณะสัณฐานภายนอกและความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการ (Holttum, 1950) การจำแนกพืชในกลุ่มนี้จึงทำได้ยากด้วยเหตุหลายประการ ประการแรกคือการที่โครงสร้างของลักษณะสัณฐานภายนอกมีคล้ายกันมาก เช่น ลักษณะลำต้นเหนือดินและรากเหง้ามีขนาดเล็ก จำนวนใบต่อ

ต้นตั้งแต่ หนึ่งใบหรือมากกว่าเล็กน้อยและพบในแหล่งที่คล้ายคลึงกัน เหตุที่ทำให้การจำแนกยากประการที่สองคือดอกซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญในการตรวจสอบจำแนกชนิดทางพฤกษศาสตร์มีลักษณะบอบบาง เหี่ยวเฉาได้ง่ายและเร็วมาก พบว่าในบางฤดูพืชในกลุ่มนี้จะมีการพักตัวโดยทิ้งใบเหลือไว้แต่เหง้าใต้ดินเท่านั้น นอกจากจะทำให้ยากต่อการตรวจสอบลักษณะทางพฤกษศาสตร์แล้วอาจต้องใช้ระยะเวลาในการติดตามโดยต้องคอยให้ถึงอีกฤดูกาลถัดไป (พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2532) ประการที่สามพืชในกลุ่มนี้มีความแปรผันทางพันธุกรรม ค่อนข้างสูง 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 พู กลีบปาก ค่อนข้างกลม พองออกเป็นกระพุ้ง ปลายหยักแบบฟันเลื่อยไม่เป็นระเบียบ ไม่มีเยื่อเหนืออับเรณู ช่องรังไข่มี 3 ช่อง แบบไม่สมบูรณ์ (Sirirugsa, 1992a)

1.3.5.2 *Boesenbergia longipes* (King & Prain) Schltr. (นิลภูมี) (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 บริเวณฐานด้านนอกของแผ่นมีขนสีน้ำตาล กลีบปาก มีสีขาวบริเวณกลางแผ่นมีแต้มจุดสีแดง รูปไข่หัวกลับ โค้งเป็นกระพุ้ง ปลายโค้งขึ้นเล็กน้อย ไม่มีเนื้อเยื่อเหนืออับเรณู ช่องรังไข่ 3 ช่อง (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 ลักษณะดอกดังรูป10 lateral staminodes มีสีขาว บริเวณฐานมีแต้มสีแดง กลีบปาก มีสีเหลืองอ่อน บริเวณกลางแผ่นมีสีชมพู ปลายหยักเป็นพู หรือเป็นฟันเลื่อยไม่เป็นระเบียบปลายโค้งขึ้น เยื่อเหนืออับเรณูสั้น และแยกเป็นช่องรังไข่ 3 ช่อง (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 ปลายมนหรือหยัก มีขนบนแผ่นและบริเวณขอบ กลีบปากไม่โค้งเป็นกระพุ้ง และมีสีแดงแต้มบริเวณตรงกลางแผ่นด้วย เยื่อเหนืออับเรณูสั้น ช่องรังไข่มี 3 ช่อง (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 โค้งออกเป็นกระพุ้ง เยื่อเหนืออับเรณูสั้น ช่องรังไข่มี 3 ช่อง (Sirirugsa, 1992a)

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

ชื่อพ้อง *Gastrochilus pulcherrima* Wall.

ลักษณะโดยทั่วไป ลำต้นเหนือดิน ผอมยาวสูงประมาณ 20-50 ซม. ใบมีประมาณ 5-7 ใบ ช่อดอก เกิดจากเหง้าใต้ดิน เกิดตรงกลางระหว่างกาบใบคู่ในสุด ลักษณะดอกดังรูปที่ 14 lateral staminodes มีสีขาว กลีบปากสีขาวมีจุดแต้มบริเวณกลางแผ่นมีสีแดงโค้งออกเป็นกระพุ้ง ขอบหยักเป็นฟันเลื่อยไม่เป็นระเบียบโค้งและอ่อนพลิ้ว เยื่อเหนืออับเรณูสั้น ช่องรังไข่มี 3 ช่อง (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 โค้งออกเป็นกระพุ้ง จุดแต้มบริเวณกลางแผ่นมีสีม่วง ไม่มีเยื่อเหนืออับเรณู ช่องรังไข่มี 3 ช่อง (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 กลีบปากมีสีชมพูเข้มตรงบริเวณปลายกลีบแล้วค่อยๆ จางมาหาฐาน บริเวณกลางแผ่นมีจุดแต้มสีแดง โค้งออก

เป็นกระพุ้งเล็กน้อย ปลายแยกเป็น 2 พู ขอบหยักเป็นฟันเลื่อยไม่เป็นระเบียบ โค้งและอ่อนพลิ้วผิวเกลี้ยง เยื่อเหนืออับเรณูสั้น 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 ลักษณะดอกดังรูปที่ 17 lateral staminodes เป็นรูปไข่หัวกลับกลีบปากมีสีเหลืองแผ่นกว้างรูปไข่หัวกลับ ผิวเกลี้ยงมีเส้นสีแดงตัดขนานทั้งสองด้าน เยื่อเหนืออับเรณูสั้น ช่องรังไข่มี 3 ช่อง (Maknoi, 2001)

1.3.5.10 *Kaempferia angustifolia* Rosc.

(เฒ่าหนังแห้ง,ปราบสมุทร) (K1)

ชื่อพ้อง *Kaempferia roxburhiana* Schult.

ลักษณะโดยทั่วไป เหง้า สั้น ตรงปลายมีหัวแตกออกมากมาย ใบมีประมาณ 3-5 ใบ เรียงสลับซ้ายขวา แตกเป็นกอจากฐาน ช่อดอก ก้านช่อดอกสั้นมากหรือไม่มี แกนของช่อดอกไม่ยืดยาว ดอกจึงเรียงกันแน่น ถูกหุ้มด้วยกาบใบคู่ในสุด ในช่อดอกหนึ่งๆ มีดอกประมาณ 10-12 ดอก ลักษณะดอกดังรูปที่ 18 lateral staminodes มีสีขาว กลีบปากมีสีม่วง บริเวณตรงกลางมีสีม่วงเข้มรูปไข่หัวกลับ เยื่อเหนืออับเรณูรูปรีค่อนข้างสี่เหลี่ยม แยกเป็น 2 แฉก ตื้น มีสีขาว และบริเวณตรงกลางมีสีม่วงแต้ม ช่องรังไข่มี 3 ช่อง (Sirirugsa, 1992b)

1.3.5.11. *Kaempferia elegans* Wall. (K2)

ชื่อพ้อง *Kaempferia crawfurdii* Wall.

ลักษณะโดยทั่วไป เหง้า สูง 10-20 ซม.ใบมี 2 ใบ ตั้งขึ้น ช่อดอกมีก้านช่อดอกยืดยาวมีขนเกิดระหว่างบริเวณกาบใบคู่ในสุด ในช่อดอกหนึ่งๆ มีดอกหลายดอก ลักษณะดอกดังรูปที่ 19 lateral staminodes แผ่กว้าง กลีบปากแยกเป็น 2 พู รอยแยกลึกจรดฐานแต่ละพูมีลักษณะเป็นรูปไข่หัวกลับ เยื่อเหนืออับเรณูเป็นแผ่นรูปหอกหัวกลับปลายแหลม ช่องรังไข่มี 3ช่อง (Sirirugsa, 1992b)

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

ลักษณะโดยทั่วไป เหง้า สั้น มีรากเป็นกระจุกมากมาย ใบมี 2 ใบ มักแบนราบกับพื้นหรือแผ่อยู่ในแนวขนานกับพื้น ไม่มีก้านใบ ผิวใบด้านบนเกลี้ยง ผิวล่างมีขนอ่อนนุ่ม กาบใบกว้าง หนาและตรงกลางเป็นสันโค้งแบบกระดูกงูของเรือ ช่อดอกไม่มีก้าน เกิดตรงกลางในระหว่างกาบใบ มีดอกจำนวนมากลักษณะดอกดังรูปที่ 20 lateral staminodes มีสีขาวรูปหอกหัวกลับ กลีบปากมีสีขาวและบริเวณตรงกลางมีแต้มสีม่วงแยกเป็น 2 พูรอยแยกลึกจรดฐาน แต่ละพูเป็นรูปไข่หัวกลับปลายหยักเป็นฟันเลื่อยไม่เป็นระเบียบ เยื่อเหนืออับเรณูแยกลึกแบ่งเป็น 2 พู มีช่องรังไข่ 3 ช่อง (Sirirugsa, 1992b)

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

ลักษณะโดยทั่วไปเหง้า สั้น บริเวณปลายรากมีปมเกิดขึ้นมากมาย ใบมีประมาณ 1-6 ใบ ใบออกจากฐาน เรียงชิดกันมีลักษณะเป็นกอ ส่วนใหญ่ใบจะแผ่ขนานกับพื้น แผ่นใบรูปร่างแปรผันไปได้หลายแบบ มักไม่มีก้านใบ ผิวใบด้านบนเกลี้ยง ผิวล่างมีขน ช่อดอก ออกตรงกลางระหว่างกาบใบคู่ในสุด ประกอบด้วยดอก 10-12 ดอก ลักษณะดอกดังรูปที่ 21 lateral staminodes เป็นรูปไข่หัวกลับตรงฐานยืดออกเป็นก้าน กลีบปากแยกเป็น 2 พูรอยแยกลึกจรดฐานแต่ละพูมีรูปไข่หัวกลับ เยื่อเหนืออับเรณูลักษณะเป็นแผ่นและมีก้าน ส่วนที่เป็นแผ่นรูปหอกหัวกลับปลายแหลม มีช่องรังไข่ 3 ช่อง (Sirirugsa, 1992b)

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

ลักษณะโดยทั่วไป เหง้า สูง 2-3 ซม. ตรงปลายมีหัวแตกออกมากมาย ใบขนานกับพื้นอยู่ติดกับ ช่อดอกมีก้านช่อดอกสั้นมากหรือไม่มีแกนของช่อดอกไม่ยืดยาว ในช่อดอกหนึ่งๆ มีดอกประมาณ 10-12 ดอกลักษณะดอกดังรูปที่ 22 lateral staminodes มีสีม่วงรูปไข่หัวกลับปลายมน กลีบปากมีสีม่วงรูปไข่หัวกลับ แผ่นปลายแยกลึกถึงกลางแผ่นเป็น 2 พู เยื่อเหนืออับเรณูรูปรีขนาดไม่เท่ากันสองด้าน 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 ลักษณะดอกดังรูปที่ 23 lateral staminodes มีสีขาว รูปไข่หัวกลับปลายมน กลีบปากมีสีขาวและจุดแต้มสีเหลือง ปลายแยกเป็น 2 แฉกแยกลึกลงมาถึงฐาน อับเรณู เยื่อเหนืออับเรณูรูปรีขนาดไม่เท่ากันสองด้านแยกเป็น 2 แฉก มีช่องรังไข่ 3 ช่อง (Sirirugsa, 1992b)

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

ลักษณะโดยทั่วไป เหง้า สีขาวแกมเขียว ผอมบางตรงข้อที่ชูลำต้นเหนือดินขึ้นมาใบมีเพียงใบเดียวและมีกาบสีม่วงหุ้มส่วนโคนใบประมาณ 2 กาบ ด้านบนใบสีเขียวเข้ม และมีแถบสีขาว ปรากฏตามยาว 2 ข้างของเส้นกลางใบ อยู่ระหว่างเส้นกลางใบกับขอบใบ ด้านล่างของใบสีม่วงเข้ม ช่อดอกประกอบด้วยดอกประมาณ 10 ดอก ลักษณะดอกดังรูปที่ 24 ดอกเรียวสลับเป็นบันไดเวียนดอกล่างบานก่อน lateral staminodes มีสีขาวปลายมนขอบโค้งกลับหลัง กลีบปากมีรูปไข่หัวกลับสีขาวและมีสีเหลืองอ่อนแต้มบริเวณกลางแผ่นปลายแยกเป็น 2 พูรอยแยกลึกขอบของพูตรงรอยแยกซ้อนกันเล็กน้อย เยื่อเหนืออับเรณูมีสีขาววกกลับไปด้านหลังตั้งฉากกับอับเรณู ลักษณะเป็นแผ่นรูปสี่เหลี่ยม ปลายมนตัดหรือเว้าลงเล็กน้อย ผิวเกลี้ยง ช่องรังไข่มี 3 ช่อง (พวงเพ็ญ ศิริรักษ์, 2532)

1.3.5.17 ***Scaphochlamys perakensis*** Holtt. (S2)

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

รูปที่ 7 *Boesenbergia basispicata* (B1)

รูปที่ 8 *Boesenbergia longipes* (B4)

รูปที่ 9 *Boesenbergia curtisii* (B2)

กาบใบดำ

รูปที่ 10 *Boesenbergia curtisii* (B3)

กาบใบขาว

รูปที่ 11. *Boesenbergia plicata* (B5)

ดอกสีแดง

รูปที่ 12 *Boesenbergia plicata* (B6)

ดอกสีเหลือง

รูปที่ 13 *Boesenbergia prainiana* (B7)

รูปที่ 14 *Boesenbergia pulcherrima* (B8)

รูปที่ 15 *Boesenbergia tenuispicata* (B9)

รูปที่ 16 *Boesenbergia rotunda* (B10)

รูปที่ 17 *Boesenbergia* aff. *rotunda* (B11)

รูปที่ 18 *Kaempferia angustifolia* (K1)

รูปที่ 19 *Kaempferia elegans* (K2)

รูปที่ 20 *Kaempferia galanga* (K3)

รูปที่ 21 *Kaempferia pulchra* (K4)

รูปที่ 22 *Kaempferia siamensis* (K5)

รูปที่ 23 *Kaempferia roscoeana* (K6)

รูปที่ 24 *Scaphochlamys biloba* (S1)

รูปที่ 25 *Scaphochlamys perakensis* (S2)

1.4 การตรวจสอบในระดับโปรตีน

การศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตในระดับโปรตีน อาจแบ่งการตรวจสอบได้เป็น 2 แบบได้แก่ ตรวจสอบจากโปรตีนที่ทำหน้าที่ภูมิคุ้มกัน และโปรตีนอิเล็กโตรโฟเรซิส โดยวิธีแรกอาศัยหลักการการจำกันได้ระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี (serological reaction) ของสิ่งมีชีวิต โดย Sarich และ Wilson (1967) ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ระหว่างมนุษย์กับลิงไม่มีหาง (apes) ว่ามีความสัมพันธ์ใกล้กันแต่วิธีการนี้บอกความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตได้ไม่ละเอียดมากนักเมื่อเทียบกับการตรวจสอบโดยวิธีการแยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่เรียกว่าอิเล็กโตรโฟเรซิส ดังตารางที่1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบการตรวจสอบในระดับโปรตีน (ดัดแปลงจาก Avise, 1994)

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

** = ให้ข้อมูลสูง * = ให้ข้อมูลเพียงเล็กน้อย - = ไม่เหมาะสม

วิธีการนี้อาศัยความหลากหลายรูปแบบของโปรตีน ที่เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ต่างกัน เนื่องจากมีขนาด รูปร่างรวมถึงประจุภายในโมเลกุลต่างกัน ทำให้แยกโมเลกุลที่ต่างกันออกจากกันได้ โปรตีนที่แตกต่างกันนี้บางตัวอาจเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้โดยใช้สารที่เหมาะสม (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 ว่า เป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างของโมเลกุลต่างกัน 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 การเปลี่ยนแปลงหลังการแปลงรหัสทางพันธุกรรม (Weeden and Wendel, 1989)

1.4.2.1 ระบบพันธุกรรม (genetic) ที่ทำให้เกิดไอโซไซม์ ระบบแรกคืออัลโลไซม์ (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

Central Library
Prince of Songkla University

มาเลทดีไฮโดรจีเนส (Gottlieb, 1982) ระบบที่สามคือ multilocus II เป็นระบบที่มีการควบคุมของยีนหลายตำแหน่งเหมือนระบบสอง แต่ต่างกันที่เอนไซม์เป็นโพลีเพพไทด์หลายสาย (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 เอนไซม์กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนส (Newton, 1983)

1.4.2.2 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนภายหลังการแปลรหัสพันธุกรรมเป็นสายโพลีเพพไทด์ (post translation modifications) เกิดขึ้นกับไอโซไซม์หลายชนิด (Beevers, 1982) จากหลายสาเหตุ เช่น การเติมโมเลกุลบางชนิดภายหลังการแปลรหัส ได้แก่ ปฏิกิริยาการเติมฟอสเฟต (phosphorylation) ในเอนไซม์เพื่อกระตุ้นการทำงาน มักจะเกิดขึ้นในสัตว์ ส่วนในพืชพบน้อยมาก (Rao and Randall, 1980) และการเติมคาร์โบไฮเดรต (glycosylation) เช่น ในเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส เป็นต้น (Clarke and Shannon, 1976) ถัดมาเป็นการตัดออกหลังการแปลรหัส การเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นเนื่องจากส่วนปลายของสายโพลีเพพไทด์หลุดหรือขาดออก เช่น เอนไซม์ในกลุ่มเพพทิเดส ที่มักจะเกิดขึ้นในรูปของโปรเอนไซม์ (proenzyme) ต้องตัดบางส่วนออกจึงทำงานได้ สุดท้ายเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือโครงรูปของโปรตีนหลังการแปลรหัส ทำให้รูปร่างหรือโครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป เช่น การม้วนพับของสายโพลีเพพไทด์ (post-translational conformation) ส่งผลให้การเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเปลี่ยนแปลงไปได้ด้วย

1.4.3 แหล่งที่พบไอโซไซม์ในพืช

ไอโซไซม์จะพบได้ในเนื้อเยื่อเกือบทุกส่วนของพืชไม่ว่าจะเป็นในลำต้น ใบ และราก ของพืชชนิดต่างๆ โดยส่วนใหญ่จะอยู่ในของเหลวภายในเซลล์ หรืออยู่ติดกับเยื่อเซลล์ รวมทั้งอาจพบได้ในออร์กาเนลล์ หลายชนิดภายในเซลล์ เช่น ไกลออกซิโซม (glyoxysomes) เปอร์ออกซิโซม (peroxisome)ไมโตคอนเดรีย

(mitochondria) คลอโรพลาสต์ (chloroplasts) (Tanksley, 1983) เอนไซม์ที่มาจากต่างบริเวณกันแม้จะมาจากเซลล์เดียวกัน ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างกัน รวมทั้งระยะเวลาในพัฒนาต่างกันจะให้รูปแบบที่แตกต่างกัน (Scandalios, 1974; Cronn *et al.*, 1997; Garkava *et al.*, 2000) ไอโซไซม์ในของเหลวภายในเซลล์มักมีความผันแปรมากกว่าไอโซไซม์ในออร์กาเนลล์ (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) และข้าวบาเล่ย์ (Volis, *et al.*, 2001) เป็นต้น

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

brasiliensis) (Suvachittanont and Pongspaiboon, 1994) ทานตะวัน (*Helianthus annus*) (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 แต่มีลักษณะสัณฐานภายนอกที่แตกต่างกันพบว่ารูปแบบที่ได้แตกต่างกันเช่นกันจึงเสนอว่าน่าจะเป็นคนละชนิดกัน และพบว่าในพืชในกลุ่มนี้ไอโซไซม์ที่สกัดจากใบจะมีปริมาณและประสิทธิภาพการทำงานดีที่สุดเมื่อเทียบกับส่วนต่างๆ สำหรับพืชในกลุ่มกระเจียว และ Ibrahim (1991) นำมาหาความสัมพันธ์ในสกุลกระเจียว 5 ชนิด (*Curcuma* spp.) พบว่าไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดสสามารถจำแนก *C. xanthorhiza* และ *C. zedoaria* ได้แม้ว่าจะมีลักษณะสัณฐานภายนอกที่คล้ายกันมาก Liu (1991) ศึกษาในพืชสกุลกระเจียว 11 ชนิดพบว่าไอโซไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสและเปอร์ออกซิเดส จำแนกพืชในสกุลนี้ออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะสีของเหง้าคือ เหง้าเหลือง เขียวและขาว Shamina และคณะ (1998) ตรวจสอบประชากรของขมิ้น (*Curcuma longa*) ในประเทศอินเดีย โดยไอโซไซม์ 6 ชนิด พบว่ามีความแปรผัน 63.8-96% และเปอร์ออกซิเดสให้รูปแบบที่มีความคงที่มากที่สุด Apavatjrut 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 และเอสเทอเรสให้รูปแบบความหลากหลายในพืชทั้งสองกลุ่ม โดยไอโซไซม์ที่ได้จากเหง้าและใบให้รูปแบบของไอโซไซม์ต่างกัน และไอโซไซม์จากใบมีความหลากหลายมากกว่าในเหง้า Liu (1996) ศึกษาในสกุลข่า (*Alpinia* spp.) 32 ชนิด โดยใช้ไอโซไซม์เปอร์ออกซิเดส พบว่าสามารถจำแนกพืชกลุ่มนี้ออกได้เป็น 4 สกุลย่อย Makhuvha และคณะ (1996) นำมาใช้ในการศึกษาประชากรของ *Siphonoclilus aethiopicus* ซึ่งเป็นพืชวงศ์ขิงที่พบในแถบประเทศแอฟริกา ระหว่างประชากรที่ปลูกในเชิงเกษตรกรรมและประชากรที่ได้จากป่า พบว่าให้รูปแบบที่ต่างกัน ฉัตรชัย งามเรียบสกุล (2535) ใช้ตรวจสอบพืช 7 สกุล 16 ชนิด ได้แก่สกุลกระชาย 4 ชนิด สกุลเปราะ 6 ชนิด สกุลกระเจียว 2 ชนิด พร้อมทั้ง *Curcumorpha longiflora, Scaphochlamys biloba* ดาหลา (*Etlingera elatior*) ข่า (*Alpinia zerumbet*) โดยใช้เอนไซม์ 6 ชนิดในการตรวจสอบ พบว่ารูปแบบที่ได้มีความหลากหลายสามารถช่วยยืนยันการจำแนกได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าปัจจุบันได้มีการนำไอโซไซม์มาใช้ช่วยในการศึกษาและจำแนกพืชในวงศ์ขิงกว้างขวางมากขึ้น

1.4.6 ปัญหาที่เกิดขึ้นจากการศึกษาไอโซไซม์

การประยุกต์ใช้ไอโซไซม์ในการศึกษานั้นแม้ว่าจะมีข้อดีและมีประโยชน์มากแต่พบว่ายังมีข้อจำกัด หลายประการด้วยกัน

1.4.6.1 ข้อจำกัดด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic limitations)

การตรวจสอบโดยวิธีไอโซไซม์อิเล็กโตรโฟเรซิสนั้นให้ข้อมูลใน 2 ลักษณะ คือ เห็นแถบ และไม่เห็นแถบ โดยลักษณะของแถบที่ได้ เรียกว่าไซโมแกรม (zymograms) (Gottlieb, 1981) หากพืชที่ทำการศึกษาห่างกันมากแต่เมื่อนำมาทดสอบอาจให้รูปแบบเหมือนกัน เนื่องจากบางครั้งโครงสร้างของโปรตีนต่างชนิดกัน มีการเรียงตัวของกรดอะมิโนต่างกัน อาจเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้เหมือนกัน เพราะประจุและขนาดของโปรตีนเท่ากัน วิธีการนี้จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการศึกษาสิ่งมีชีวิตหรือพืชที่มีความใกล้เคียงกัน หรือคล้ายกันมากจนมีปัญหาในการจำแนกจากลักษณะสัณฐานภายนอก (Nei, 1987) แต่จะไม่สามารถศึกษาได้โดยลำพัง เช่นเดียวกับ

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

1.4.6.2 ข้อจำกัดจากตัวอย่าง (sample limitations)

นอกจากข้อจำกัดในการวิเคราะห์ในเรื่องของตัวอย่างทำการศึกษาที่จะต้องอยู่ในกลุ่มใกล้เคียงกันแล้วยังอาจมี ข้อจำกัดที่เกิดขึ้นจากการเลือกชนิดของเอนไซม์ที่ทำการศึกษา และการเลือกชนิดของตัวอย่างหรือเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษา รวมทั้งการเก็บรักษาเอนไซม์ให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม

1.4.6.2.1 ชนิดของเอนไซม์ที่นำมาใช้ในการศึกษานับว่ามีความสำคัญเช่นกัน เนื่องจากรูปแบบไอโซไซม์ที่ได้เป็นผลมาจากการแสดงออกของยีนที่มีถ่ายทอดไปยังรุ่นถัดไป จึงมักนำมาใช้เป็นเครื่องมือแรกๆในการตรวจสอบในระดับโมเลกุล ดังนั้นในการเลือกเอนไซม์ที่นำมาใช้ศึกษาจำเป็นต้องเลือกที่มีลักษณะไอโซไซม์ที่มีความหลากหลาย (Eanes, 1999) รวมทั้งไม่เปลี่ยนแปลงตามสิ่งแวดล้อม เช่น เอนไซม์กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนส ที่มีความคงตัวสูงในวิวัฒนาการของพืช เป็นต้น (Crawford, 1990) แต่มีเอนไซม์หลายชนิดที่เปลี่ยนแปลงตามสภาวะแวดล้อม เช่น เปอร์ออกซิเดส (Siegel *et al.*, 1982) ซึ่งจำแนกและหาความสัมพันธ์ในสิ่งมีชีวิตได้และให้ผลการศึกษาดี (Liu, 1996) และให้รูปแบบคงที่เช่นกัน (Shamina *et al.*, 1998) ดังนั้นในการศึกษารูปแบบของไอโซไซม์จึงควรตรวจสอบความคงตัวของไอโซไซม์ชนิดนั้นๆ และควบคุมสภาวะการทดลองให้เหมาะสมเพื่อให้รูปแบบของไอโซไซม์ที่มีความหลากหลายและมีความคงที่ในการทดลอง (Buth *et al.*, 1999)

1.4.6.2.2 การเลือกเนื้อเยื่อหรือชนิดของตัวอย่างมีผลอย่างมากในการศึกษาเพราะไอโซไซม์ในพืชจะแตกต่างกันตามสภาวะแวดล้อมและตามช่วงเวลาหรืออายุของพืช (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 เนื่องจากเอนไซม์บางชนิดอาจเสียสภาพไปตามเวลา หากเก็บสารตัวอย่างไว้นานเกินไปอาจทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลง ผลการทดลองที่ได้แตกต่างไป ดังนั้นการรักษาสภาพเอนไซม์ให้คงที่จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำๆ (Apavatjrut *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, ไมโตคอนเดรีย และจากนิวเคลียส (Soltis *et al.*, 1992) คลอโรพลาสต์เป็นออร์แกนเนลที่พบเฉพาะในพืชเท่านั้น ลักษณะของดีเอ็นเอจากคลอโรพลาสต์มีการเรียงลำดับของเบสค่อนข้างคงที่ มีความคล้ายคลึงกันสูง จึงนิยมศึกษาเพื่อตรวจสอบความเหมือนและแตกต่างในระดับประชากรและหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการในพืช (Provan *et al.*, 2001) ส่วนไมโตคอนเดรียพบได้ทั้งในพืชและสัตว์มีขนาดใหญ่กว่าในคลอโรพลาสต์ 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) เป็นเทคนิคแรกๆพัฒนามาจาก Jeffreys และคณะ ในปี 1985 ซึ่งตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่อาศัยความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะตรงบริเวณตำแหน่งจดจำ อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์แบบแผนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่อาจทำได้ยาก

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดอาจเลือกตรวจสอบเฉพาะยีน หรือตำแหน่งที่จำเพาะโดยใช้โพรบ (probe) ที่สามารถไฮบริไดซ์ (hybridize) ได้กับชิ้นส่วนดีเอ็นเอในบริเวณนั้น โพรบที่ใช้จะสกัดมาจากพืชชนิดเดียวกันกับพืชที่ต้องการนำมาศึกษาหรืออาจมาจากชนิดที่ใกล้เคียงกันหรือเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ที่สังเคราะห์ขึ้นมาโดยมีเบสคู่สมกับส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการศึกษา นำมาติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี หรือสารเรืองแสงบางชนิด โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังนี้ คือ ภายหลังการแยกดีเอ็นเอที่ได้โดย วิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส แล้วถ่ายดีเอ็นเอจากเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสลงไปบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน แล้วนำแผ่นเมมเบรนนั้นมาทำปฏิกิริยาที่เรียกว่า ไฮบริไดซ์กับโพรบอีกครั้ง เพื่อหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอที่มีเบสเป็นคู่สมกับโพรบ วิธีการนี้เรียกว่า Southern blotting ดังรูปที่ 26 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้โพรบเช่นนี้มีขั้นตอนยุ่งยากเพราะมีโพรบซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์หรือที่ได้จากการโคลนยีนและแยกให้บริสุทธิ์ แล้วจึงนำมาติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสีหรือสารเรืองแสง วิธีการที่ทำได้สะดวกและง่ายกว่านี้คือการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอแบบอาศัยเทคนิค 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 ขั้น 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 มีหลายวิธีการด้วยกันได้แก่

1.5.1.1 การตรวจสอบโดยวิธี RFLP (restriction fragment length polymorphism)

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

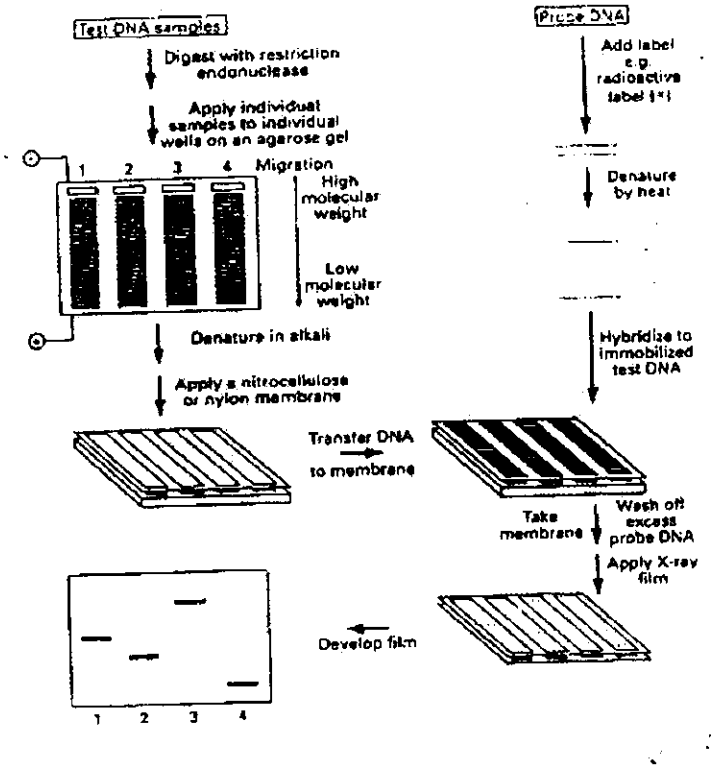
1.5.1.2 การตรวจสอบโดยวิธี AFLP (amplified fragment length polymorphism)

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

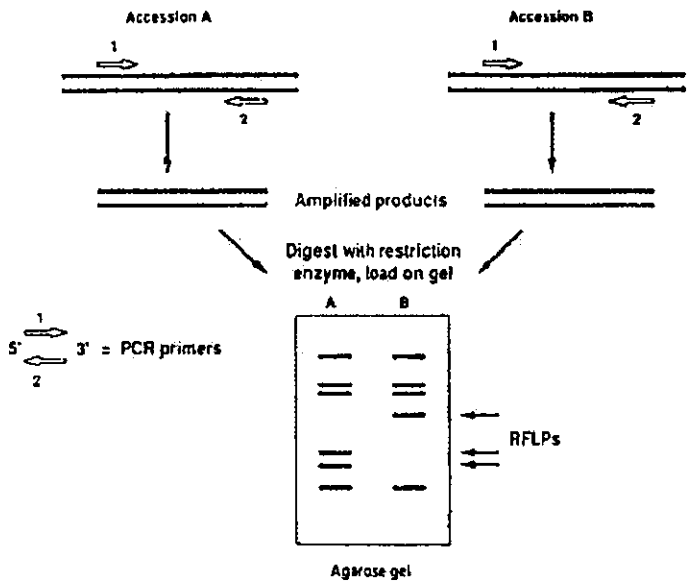
เหมือนกับส่วนของ adapter ดังรูปที่ 28 ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณขึ้นมาจะมีลำดับเบสที่เข้าคู่หรือเป็นคู่สมกันกับไพรเมอร์ที่ใช้ จากนั้นแยกดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส และบันทึกผล แม้ว่าวิธีการนี้จะใช้เวลาในการศึกษาน้อยและราคาไม่สูงมากนัก Russell และคณะ (1997) พบว่าการวิเคราะห์ รูปแบบของดีเอ็นเอนั้นค่อนข้างยากและให้ความหลากหลายของดีเอ็นเอไม่มากนักเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ ดังตารางที่ 2 เนื่องจากก่อนจะนำดีเอ็นเอไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR มีการตัดจีโนม หรือดีเอ็นเอแม่แบบด้วยเอนไซม์จำเพาะ ทำให้ดีเอ็นเอมีขนาดสั้นลง และมีความจำเพาะมากขึ้น แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจึงมีความหลากหลายลดลง (Matthes *et al.*, 1998)

1.5.1.3 การตรวจสอบโดยวิธี SSRs (simple sequence repeats)

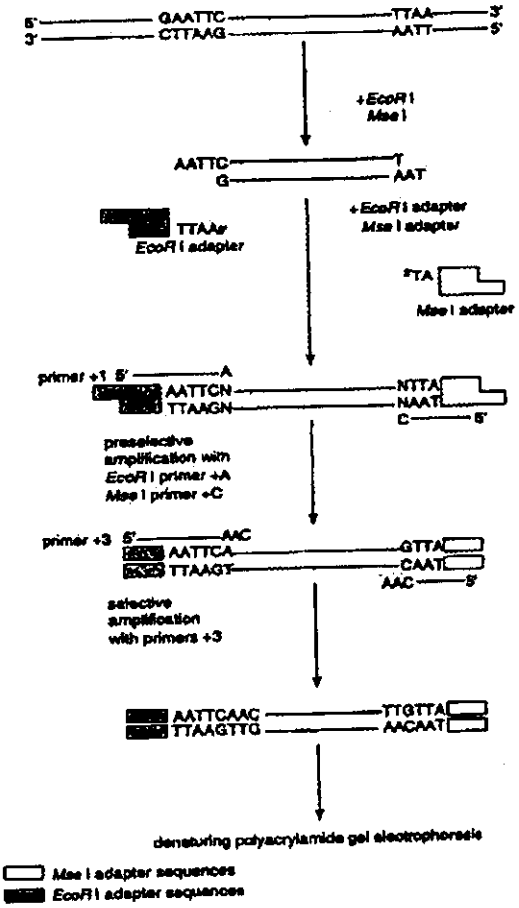
SSRs เป็นเทคนิคที่อาศัยรูปแบบของดีเอ็นเอขนาดสั้น 1-10 คู่เบสที่มีรูปแบบซ้ำๆกันที่เรียกว่าไมโครแซตเทลไลต์ (microsattellites) ไมโครแซตเทลไลต์เป็นรูปแบบของดีเอ็นเอที่พบได้ในจีโนมของสัตว์ พืช เชื้อรา และแบคทีเรีย โดยรูปแบบของดีเอ็นเอที่พบบนไมโครแซตเทลไลต์ จะเป็นดีเอ็นเอชุดซ้ำๆกัน ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน วิธีการตรวจสอบอาศัยไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นจากลำดับเบสที่มีรูปแบบซ้ำๆกันบนส่วนหนึ่งของไมโครแซตเทลไลต์นี้ (SSR-anchored primer) แล้วนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากหลายตำแหน่ง โดยวิธี PCR จากนั้นตรวจสอบรูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส ดังรูปที่ 29 วิธีการนี้แม้ว่าจะให้รูปแบบความหลากหลายของดีเอ็นเอดี และรวดเร็วแต่พบว่ายังมีราคาสูงและจำเป็นต้องทราบลำดับของดีเอ็นเอในบริเวณ SSRs เพื่อนำไปสังเคราะห์เป็นไพรเมอร์ และเลือกชนิดให้เหมาะสมกับพืชที่ใช้เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ ดังตารางที่ 2 (Ciofi *et al.*, 1998)



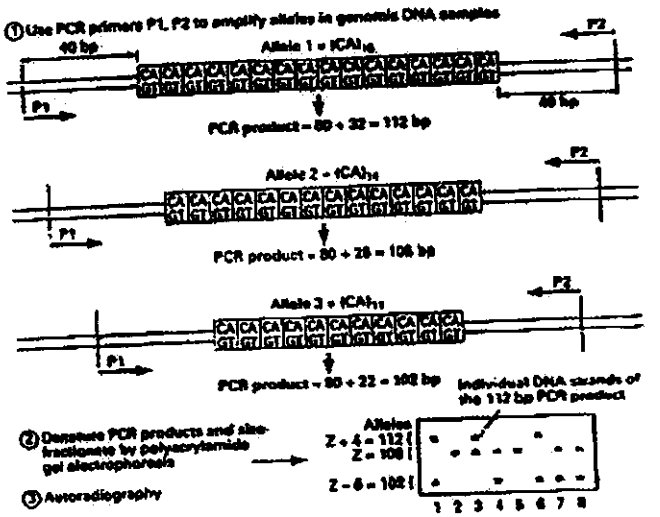
รูปที่ 26 การทำ Southern blotting (ดัดแปลงจาก Werman *et al.*, 1996)



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 (Caetano-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 เนื่องจากข้อมูลที่ได้ไม่ค่อยคงตัว จำเป็นต้องศึกษาอิทธิพลของการเปลี่ยนแปลงสภาวะต่างๆต่อผลการทดลอง จึงต้องระมัดระวัง และควบคุมสภาวะของการทดลองให้คงที่ (Saunders *et al.*, 2001)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจาก 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 amplication 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	2-10μg	1-2μg	50-100ng	10-25μg
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 และขนาดของแถบดีเอ็นและแถบที่เกิดขึ้นได้ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน ($MgCl_2$) มีผลต่อการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบและการทำงานของ DNA polymerase ในการสังเคราะห์ดีเอ็นอด้วย 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) พบว่าอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อรูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้ อุณหภูมิที่ใช้เพื่อให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอเป้าหมาย ในเทคนิค RAPD อยู่ในช่วง 35-39 °C และแต่ละอุณหภูมิจะให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน เช่นที่อุณหภูมิที่ 37, 38 และ 39 °C ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จะมีรูปแบบของแถบที่เกิดขึ้นภายหลังการแยกโดยอิเล็กโตรโฟเรซิสชัดเจนกว่าที่ 35 °C และเนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาดสั้นๆอุณหภูมิที่ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอเป้าหมายไม่จำเป็นต้องสูงมาก (36-37 °C) ส่วนอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพและแยกออกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว และอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากไพรเมอร์จะไม่ค่อยมีผลมากนัก โดยมากมักจะใช้อุณหภูมิคงที่ที่ 95 °C และ 72 °C ส่วนจำนวนรอบนั้นมักจะทำการศึกษาที่ประมาณ 35, 40 หรือ 45 โดยจะไม่ค่อยส่งผลต่อของแถบดีเอ็นเอมากนัก แต่หากทำการทดลองนานเกินไปประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase อาจจลดลงได้ (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 ข้าวบาเล่ย์, 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 หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชในหลายกลุ่ม 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 ที่ให้รูปแบบที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบและการทำให้ลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับการขยายพันธุ์แบบธรรมดา Prathepha (2000) ทำการตรวจสอบไพรเมอร์ 20 ชนิดที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกันเพื่อค้นหาไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในกระเจียว (*Curcuma aeruginosa*) พบว่าไพรเมอร์ 19 ชนิดสามารถเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอในกระเจียวได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้สามารถบอกความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากการแปรผันจากลักษณะทางพันธุกรรมได้ดี โดยสรุปเทคนิค RAPD มีศักยภาพในการจำแนกพืชในกลุ่มนี้ Dasuki และคณะ (2000) ใช้ RAPD ตรวจสอบพืชวงศ์ขิงใน สกุล *Alpinia, Curcuma, Costus, Etlingera* และ *Zingiber* โดยใช้ไพรเมอร์ 40 ชนิด พบว่ามีเพียง 9 ชนิดที่ให้รูปแบบของดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายและความสัมพันธ์ตั้งแต่ 51.22%-90.32% ปัจจุบันมีการใช้เทคนิค RAPD ในพืชวงศ์ขิงเพื่อใช้ศึกษาและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของพืชในกลุ่มนี้น้อย

1.6 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์

ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาที่ได้โดยตรงจากธรรมชาติมักจะมีความผันแปรสูง เนื่องจากลักษณะข้อมูลจะเป็นหลายรูปแบบ (multistate characters) ได้แก่ข้อมูลที่ได้จากวัดหรือนับจำนวน เช่น ความสูงของลำต้น ขนาดของรังไข่ จำนวนใบเป็นต้น ข้อมูลเหล่านี้ยากต่อการวิเคราะห์ ดังนั้นลักษณะข้อมูลเชิงคุณภาพ (qualitative data) วิเคราะห์ได้ง่ายกว่า นิยมนำมาหาความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน เนื่องจากข้อมูลที่ได้จะแสดงให้เห็นในลักษณะ มี และไม่มีลักษณะที่สนใจจึงไม่ค่อยมีความแปรผันมากนัก การศึกษาลักษณะต่างๆ ในระดับโมเลกุลจากรูปแบบของแถบของโปรตีนและดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาตัวอย่างข้อมูลในลักษณะเช่นนี้นอกจากจะบอกความแตกต่างระหว่างชนิดได้แล้ว 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 พืชนั้นๆไว้ ทำให้บอกความสัมพันธ์ของของพืชแต่ละชนิดได้ (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 (Apavatjrut *et al.*, 1999) และดีเอ็นเอ (Skoula *et al.*, 1999)

วัตถุประสงค์

1.เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ไอโซไซม์และลายพิมพ์ดีเอ็นเอในรูปของ RAPD ของพืชในวงศ์ขิงบางชนิดในสกุลกระชาย สกุลเปราะและสกุล *Scaphochlamys* ว่ามีความใกล้เคียงกันหรือแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด

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

3.เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของพืชในกลุ่มนี้และเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆของพืชในวงศ์ขิงโดยใช้ข้อมูลจากไอโซไซม์และ RAPD ที่ได้