4. วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานภายนอก

การนำลักษณะสัณฐานภายนอกมาใช้พิจารณาหาความสัมพันธ์ในเบื้องต้น พบว่าลักษณะสัณฐานภายนอกบอกความสัมพันธ์ได้อย่างคร่าวๆ ว่าพืชกลุ่มใดใกล้ชิดกัน ดังรูปที่ 31 โดยพืชในแต่ละสกุลจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มมาก ไม่กระจายตัว อาจเนื่องจากลักษณะสัณฐานภายนอกที่ใช้ในการพิจารณาในขั้นนี้ ช่วยในการพิจารณาความสัมพันธ์โดยรวมในระดับสกุลมากกว่าระดับชนิด การให้น้ำหนักของลักษณะเพื่อหาความสัมพันธ์จึงพิจารณาลักษณะที่มีร่วมกันของแต่ละสกุล มากกว่าลักษณะในระดับชนิดที่ใกล้กันในสกุลเดียวกัน เพราะมีลักษณะร่วมกันมากจึงจำเป็นต้องหาลักษณะที่บอกความแตกต่างได้เพื่อที่จะแยก และหาความสัมพันธ์ระดับชนิดได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยามีความผันแปรสูง ลักษณะข้อมูลมักมีหลายลักษณะ (multiple characters) ยากในการวิเคราะห์ เช่นข้อมูลที่ได้จากการวัดหรือนับจำนวนต้องนำมาแปลงข้อมูลในลักษณะสองลักษณะ (binary characters) โดยกำหนดเป็นช่วงของข้อมูลเพื่อง่ายต่อการวิเคราะห์ (Kithching *et al.*, 1998) ทำให้พืชในกลุ่มเดียวกันอาจให้รูปแบบความสัมพันธ์แตกต่างกันในการทดลองที่แตกต่างกัน หรือพืชที่มีลักษณะแตกต่างกันแต่ถูกจัดเป็นชนิดเดียวกันเช่น *B. curtisii* (B2, B3) หรือ *B. plicata* (B5, B6) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการเลือกให้ความสำคัญของลักษณะใดเป็นพิเศษในแต่ละการทดลอง จำเป็นต้องหาข้อมูลด้านอื่นๆ เข้ามาช่วยพิจารณาร่วมด้วยเพื่อให้ความสัมพันธ์ที่ได้น่าเชื่อถือ และบอกความสัมพันธ์ในเชิงวิวัฒนาการได้ดียิ่งขึ้น เพราะหากอาศัยลักษณะสัณฐานภายนอกเพียงอย่างเดียวในการบอกความสัมพันธ์โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการนั้น รูปแบบความสัมพันธ์ที่ได้ที่ให้ความเชื่อมั่นน้อย (Judd *et al.*, 1999) ดังนั้นจึงควรศึกษาลักษณะสัณฐานภายนอกควบคู่กับเทคนิคในระดับโมเลกุล เช่น โปรตีน หรือเอนไซม์ และดีเอ็นเอเพื่อให้ความสัมพันธ์ที่ได้เชื่อถือมากขึ้น

4.2 การศึกษาไอโซไซม์

รูปแบบของไอโซไซม์จากส่วนของพืชที่ต่างกันหรืออายุต่างกันอาจแตกต่างกันได้ (Weeden and Wendel, 1989; Garkava *et al.*, 2000) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกจึงเลือกใบที่มีไอโซไซม์อยู่สูงมาศึกษา และใบที่ใช้ศึกษามีอายุใกล้กันมากที่สุด รวมทั้งทำการสกัดทุกๆ 3 เดือน เพื่อดูความคงตัวของเอนไซม์จากผลที่ได้ พบว่าเอนไซม์ 4 ชนิด คือเปอร์ออกซิเดส, ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส, กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนส และมาเลทดีไฮโดรจีเนสให้รูปแบบที่หลากหลาย สามารถนำมาใช้วิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชนิดและสกุลได้ ส่วนเอนไซม์อื่นๆ นั้นไม่สามารถย้อมติดหรือย้อมติดแต่เป็นปื้นยาวไม่แยกเป็นแถบที่เด่นชัด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธีการสกัดสารตัวอย่าง หรือสภาวะในการย้อม เช่น ความเป็นกรดหรือด่างของปฏิกิริยา รวมทั้งชนิดของบัฟเฟอร์ในการสกัดเอนไซม์และสภาวะการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสอาจไม่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์เหล่านี้ในพืชกลุ่มนี้ ทำให้ผลการทดลองที่ได้ไม่สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบได้ ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยซึ่งพบว่าเมื่อเปลี่ยนชนิดของบัฟเฟอร์และหาสภาวะให้เหมาะสมในพืชแต่ละกลุ่ม พบว่ารูปแบบของแถบที่ได้ดีขึ้น เช่นการศึกษาเอนไซม์เอซิดฟอสฟาเทสในของข้าวและข้าวโพดเป็นต้น (Shields *et al.*, 1983) ดังนั้นการศึกษาครั้งต่อไปอาจต้องหาสภาวะที่เหมาะสมในการย้อมเอนไซม์เพื่อให้รูปแบบจากการย้อมที่ได้ดียิ่งขึ้นและหาระบบเอนไซม์ที่มีไอโซไซม์หลากหลายในการศึกษา

4.3 ไอโซไซม์กับการจำแนกพืชตัวอย่าง

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

กับระบบการป้องกันตัวของพืช (Dalton, 1963; Lange *et al.*, 2000) และแบบแผนของเอนไซม์อาจเปลี่ยนไปตามสภาวะแวดล้อม (Siegel *et al.*, 1983; Karpinska, *et al.*, 2001) แต่หากเลือกสภาวะการทดลองที่เหมาะสมเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ยังให้รูปแบบของไอโซไซม์ที่เป็นประโยชน์ในการศึกษา (Liu, 1996) ส่วนเอนไซม์กลูตาเมทดีไฮโดรจีเนส และมาเลทดีไฮโดรจีเนส ย้อมติดยากและสีของแถบที่ได้ไม่ค่อยชัดเจน ต้องเพิ่มเวลาย้อมให้นานถึง 6 ชั่วโมงจึงปรากฏแถบให้เห็น ทั้งนี้เนื่องจากปฏิกิริยาที่ได้อาจเกิดไม่สมบูรณ์ จำเป็นต้องย้อมนานขึ้นเพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้สมบูรณ์ (Jaaska, 1999) เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีหน้าที่หลักในวิถีเมตาโบลิซึมในพืชแต่ละชนิด รูปแบบของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในสกุลเดียวกันคล้ายกัน แต่หากต่างสกุลอาจแตกต่างกันได้ ดังนั้นเอนไซม์ทั้งสองชนิดเหมาะที่จะใช้ตรวจสอบความสัมพันธ์ในระดับสกุลของพืชตัวอย่างมากกว่าการตรวจสอบในระดับชนิด ส่วนเปอร์ออกซิเดสและซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทสสามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างในระดับชนิดได้ เช่นในกรณีของ *B curtisii* 2 ลักษณะ และ *B. plicata* 2 ลักษณะ ที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกแตกต่างกันแต่จัดไว้ในชนิดเดียวกัน พบว่ามีลักษณะของไอโซไซม์แตกต่างกัน

การใช้ไอโซไซม์อาจมีความหลากหลายน้อยกว่าความหลากหลายในระดับดีเอ็นเอ เพราะแม้ว่าดีเอ็นเอไม่เหมือนกัน แต่เมื่อแปลรหัสสำหรับกรดอะมิโน อาจได้กรดอะมิโนตัวเดียวกันเพราะเกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า Redundancy of the code word ได้ หรือเมื่อดีเอ็นเอถูกแปรรหัสเป็นโปรตีนแล้ว เกิดการเปลี่ยนแปลงภายหลังทำให้โปรตีนมีลักษณะแตกต่างไปจากเดิมได้โดยกระบวนการ post translation modification โปรตีนที่ได้อาจไม่แสดงความแตกต่างของการเรียงลำดับเบสบนดีเอ็นเอหรือพันธุกรรม โดยตรงจึงควรศึกษาความแตกต่างในระดับดีเอ็นเอด้วย

4.4 คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชตัวอย่าง

การสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1987) พบว่า ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้ส่วนใหญ่สามารถนำไปใช้ศึกษาในขั้นต่อไปได้ ยกเว้นดีเอ็นเอที่ได้จากพืช B9, B11, K1, K4, S1 และ S2 ที่ต้องสกัดซ้ำด้วย CTAB เนื่องจากมีสารประกอบพวกแทนนิน หรือฟีนอลสูง อาจไปรบกวนการทำงานของปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไป สอดคล้องกับการศึกษาของ Rajaseger และคณะ (1997) รวมทั้ง Rath และคณะ (1998)

ซึ่งพบว่าพืชในเขตร้อนส่วนใหญ่จะมีสารประกอบเหล่านี้สูงจำเป็นต้องสกัดด้วย CTAB ซ้ำดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ จึงจำเป็นต้องทำให้ดีเอ็นเอมีความสะอาดเพื่อให้คุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้ ดีขึ้น เพื่อนำไปใช้ในการเป็นแม่แบบศึกษาดีเอ็นเอของพืชตัวอย่างโดยวิธี PCR ในตอนขั้นต่อไป

4.5 สภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาดีเอ็นเอของพืชตัวอย่างโดยวิธี RAPD

การศึกษาดีเอ็นเอของพืชตัวอย่างโดยวิธี RAPD เป็นเทคนิคที่ต้องอาศัย PCR และ PCR เป็นเทคนิคที่มีความไวมาก สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นล้านเท่า อย่างรวดเร็วและใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยก็สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องระวังการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากภายนอก เช่น จากอากาศ ผิวหนัง ผม เป็นต้น การศึกษาครั้งนี้จึงทำในที่สะอาด และใช้อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้มีคุณภาพเกรดอณูชีววิทยา แยกจากการทดลองอื่น เพื่อกันการปนเปื้อน และจำเป็นต้องมีหลอดควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ (negative control) ในการทดลองทุกครั้ง การทดลองเบื้องต้นใช้สภาวะเดียวกับ Prathepha (2000) ซึ่งศึกษา RAPD ของพืชในกลุ่มเดียวกัน แต่การทดลองไม่ประสบผลสำเร็จ จึงเพิ่มความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เป็น 5 mM Aert และคณะ (1998) รายงานว่า ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โพลีเมอเรส มากกว่าสารอื่น โดยความเข้มข้นที่ใช้ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 1.5–10 mM ในการศึกษาพืชชนิดใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน จึงควรทดลองเพื่อเลือกความเข้มข้นให้เหมาะสมที่สุด

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 ทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน หรือไพรเมอร์เหล่านี้ ไม่สามารถเข้าไปจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่อยู่บนดีเอ็นเอแม่แบบเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไปได้ (Cronn *et al.*, 1997) แม้ไพรเมอร์ที่ให้ผลการทดลองดีและชัดเจนมีเพียง 5 ไพรเมอร์ แต่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาโดยวิธี RAPD ให้รูปแบบที่หลากหลาย สามารถนำมาใช้บอกความแตกต่างของกระชายบางชนิดที่ถูกจัดให้เป็นชนิดเดียวกัน เช่น *B curtisii* 2 ลักษณะ และ *B. plicata* 2 ลักษณะ ที่มีลักษณะสัณฐานภายนอกแตกต่างกันแต่จัดอยู่ในชนิดเดียวกัน มีความแตกต่างกันในระดับดีเอ็นเอด้วยโดยการศึกษา RAPDได้และหาความสัมพันธ์ของพืชกลุ่มนี้ได้

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 มีก้านดอกสั้นและช่อดอกจะออกตรงกาบใบคู่ในสุดเช่นเดียวกัน 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 ใกล้ชิดกันมากกับชนิด K4 สอดคล้องกับการศึกษาของ Seark (1999) ที่เสนอว่าพืชทั้งสองชนิดควรจัดเป็นชนิดเดียวกัน