บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาข้อมูลทางสัณฐานวิทยา 22 ลักษณะมาจัดกลุ่มด้วย UPGMA โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกันของ Jaccard พบว่าสามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย งาแดงพื้นเมือง IS-1-21 BL5 S-25 มข.3 อุบลราชธานี1 บุรีรัมย์ MR36 MR4 MR13 NS4 มก.18 NS6 และ NS15 และในกลุ่มนี้พบว่ามีงาหลายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันมากคือ งาพันธุ์ มข.3 กับ อุบลราชธานี MR4 กับ MR13 บุรีรัมย์กับ MR36 และ WL9กับ NS14 ซึ่งพบว่ามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกันเท่ากับ 0.89 มื่อสืบแหล่งที่มาแล้วจะเห็นได้ว่า มข.3 กับ อุบลราชธานี MR4 กับ MR13 มาจากถิ่นกำเนิดเดียวกันคือพม่า ซึ่งลักษณะส่วนใหญ่คล้ายกันมาก เช่น สีกลีบดอกด้านนอกเป็นสีขาวอมม่วง ฝักมี 2 พู สีเปลือกหุ้มเมล็ดสีแดง ลำต้นมีการแตกกิ่ง เป็นต้น เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วงาพันธุ์เลยจะแยกออกจากในกลุ่มที่ 1 อย่างชัดเจนเนื่องจากเป็นงาที่มีการแตกกิ่งสูง เมล็ดจะเล็ก ในกลุ่มที่ 2 เป็นงาที่มีเปลือกหุ้มเมล็ดสีขาวทั้งหมด มีขนบนลำต้น ฝักมีลักษณะเป็น 4 พู เหมือนกัน ยกเว้น MK60 และ มข.1 MK60 มีมุมใบมีลักษณะนอน มีสีของกลีบดอกด้านนอกเป็นสีขาว ส่วน มข.1 และมีการพัฒนาของต่อมน้ำหวานเป็นดอก ส่งผลให้หนึ่งซอกใบมีหลายดอกหลายฝัก ส่วนงาพันธุ์ป่าที่นำเข้ามาจากประเทศอินเดีย เป็นพันธุ์ที่มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาจากพันธุ์ปลูกอย่างชัดเจน จึงทำให้การจัดกลุ่มเห็นความแตกต่างออกจากพันธุ์ปลูกชัดเจน

การกระจายตัวของข้อมูลในการจัดกลุ่มมีค่า ค่า cophenetic correlation 0.83 ซึ่งถือได้ว่าเป็นการจัดกลุ่มที่ดี Sirithunya *et al.* (2001) รายงานว่าการกระจายตัวของข้อมูลในการจัดกลุ่มที่มีค่า cophenetic correlation เป็นค่าที่บอกถึงว่าการจัดกลุ่มที่ได้ดีเพียงใดซึ่ง ค่า cophenetic correlation น้อยกว่า 0.7 ถือว่าจัดกลุ่มได้ไม่ดี ถ้าค่าอยู่ระหว่าง 0.7-0.8 ถือว่าเป็นการจัดกลุ่มได้ปานกลาง หากค่าอยู่ระหว่าง 0.8-0.9 ถือว่าเป็นการจัดกลุ่มที่ดี และค่าอยู่ระหว่าง 0.9-1.0 เป็นการจัดกลุ่มที่ดีมาก

เมื่อปลูกต้นฤดูฝนและปลายฝน พบว่ามีบางลักษณะความแปรปรวนตามสภาพแวดล้อม เช่น การออกดอก การแตกกิ่ง ความสูงของต้น สีใบ สีดอก ฤดูปลายฝนจะมีสีของกลีบดดอกด้านนอกเข้มกว่าต้นฤดูฝน นอกจากนั้นงาพันธุ์เลยในช่วงปลายฝนจะออกดอกช้ากว่าพันธุ์อื่น ส่งผลให้มีจำนวนดอกน้อย จำนวนฝักที่ได้ก็จะน้อยตามด้วย เนื่องจากว่างาพันธุ์เลยมีการตอบสนองต่อช่วงแสง

การนำตัวอย่างมาสกัด DNA เพื่อให้มีคุณภาพต้องคำนึงถึง อายุของเนื้อเยื่อที่นำมาสกัดควรใช้ใบอ่อนที่มีอายุยังน้อยและอยู่ในระยะการเจริญเติบโต เนื้อเยื่อที่อายุยังน้อยจะประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีอัตราการแบ่งเซลล์สูงมีจำนวนเซลล์มาก (Shaw, 1988; Staub *et al.*, 1996) เนื้อเยื่อของใบอ่อนที่นำมาสกัด DNA ควรมีอายุไม่เกิน 2 สัปดาห์หลังงอก (Ozdemir *et al.*, 2002) ซึ่งสอดคล้องกับ ประสาน (2534) ที่รายงานว่าส่วนของใบอ่อนของมะเขือเทศเหมาะสม

ที่สุดในการสกัด DNA ในการสกัด DNA นั้นมีหลายวิธีด้วยกัน วิธี CTAB เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ เนื่องจากให้ DNA ที่มีปริมาณสูง พรพันธ์ (2538) รายงานว่าวิธี CTAB เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับสกัด DNA จากใบพืชที่มี polysaccharide สูง และสามารถใช้กับพืชได้หลายชนิด เช่น nutsedge ซึ่งเป็นวัชพืชประเภทแห้วหมู (Okoli *et al.*, 1997) ข้าวหอม (Prathepha,1999) ข้าวบาร์เลย์ (Vanhala *et al.*, 2004) ข้าวฟ่าง (Dabhlberg, 2002) จากการสกัด DNA งาด้วยวิธี CTAB วัดค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร ด้วย spectrophotometer ได้ปริมาณ DNA อยู่ที่ 605-3830 μg/ml และเมื่อตรวจสอบคุณภาพ จากการหาอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 1.4291-1.74872 สุรินทร์ (2540) รายงานว่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 เท่ากับ 1.8 แสดงว่าสารละลาย DNA มีความบริสุทธิ์ ค่าที่ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนและฟีนอล ถ้าค่าสูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของ RNA จากการทดลองจะมีอัตราส่วนที่ต่ำกว่า 1.8 แสดงมีการปนเปื้อนของโปรตีนและฟีนอลอยู่บ้าง แต่พบว่าเมื่อนำ DNA ที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer แบบสุ่มแล้ว ไม่มีผลต่อการเกิดปฏิกิริยา สามารถหาความแตกต่างระหว่างพันธุ์งาได้

เทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยา PCR โดยอาศัยการจับของ primer แบบสุ่ม เพื่อเพิ่มขยาย DNA ให้มีปริมาณมาก จากนั้นนำ DNA ที่เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส โดยอาศัยการเคลื่อนที่ของ DNA ในสนามไฟฟ้าจากขั้วบวกผ่านตัวกลางคือ agarose gel ซึ่งจะสามารถแยกขนาดของ DNA ตามขนาดโมเลกุล จึงปรากฏแถบ DNA ในตำแหน่งที่ต่างกันตามขนาดความยาวโมเลกุล (อาภัสสรา, 2537) จากการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด RAPD ที่ใช้จำแนกพันธุ์งาในครั้งนี้โดยทำการคัดเลือก primer จากรายงานที่มีใช้ primer ชนิดนั้นที่ใช้กับถั่วซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่เช่นเดียวกันกับงา โดยทดสอบหาความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่เหมาะสมก่อน โดยใช้ total volume 20 μl ให้ความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบที่แตกต่างกันที่ 15, 50,100,150, และ 200 นาโนกรัม จากการทำ PCR พบว่าความเข้มข้นของ DNA ต้นแบบ ใน total volume 20 μl ที่สามารถสังเคราะห์ได้คือ 100, 150 และ 200 นาโนกรัม จึงทำการเลือกความเข้มข้นสุดท้ายของ DNA ต้นแบบที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ให้ผลดี นอกจากนั้นก่อนทำ PCR ทุก primer ที่ใช้นั้น ก่อนการทดลองจะทำการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับ annealing โดยใช้ช่วงของอุณหภูมิสำหรับ annealing คือ 32-55 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิที่บริษัทผู้ผลิต primer แนะนำมาพบว่าไม่สามารถให้แถบ DNA ที่คมชัดได้ จึงทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะทุก primer พบว่าช่วงอุณหภูมิที่ให้แถบ DNA คมชัดคือช่วง 42-48 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกันกับ Anuntabhochai *et al.* (2000) ที่รายงานว่าการใช้อุณหภูมิในขั้นตอน primer annealing ของ primer ชนิด RAPD สูงถึง 46-62 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการสังเคราะห์แถบ DNA จำนวนมากที่มีความคมชัดสูง และการทดลองสามารถทำซ้ำได้ เนื่องจากการใช้อุณหภูมิสูงจะไปเพิ่ม stringency ของ primer ในการเข้าไปจับกับ DNA ต้นแบบสายเดี่ยวในบริเวณที่มีเบสคู่ผสมกัน (complementary) จากการสุ่มเลือก โดยสุ่มเลือก primer มาใช้ 33 ชนิด เมื่อนำมาทำอิเลคโตโฟรีซีส โดยใช้การเคลื่อนที่ของ DNA ในสนามไฟฟ้า จากขั้วลบไปยังขั้วบวก ผ่านตัวกลางคือ agarose gel ซึ่งพบว่า DNA ขนาดใหญ่ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก จะเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจลได้ช้า จึงปรากฏแถบ DNA อยู่บริเวณด้านบนของเจล ส่วน DNA ที่มี

ขนาดเล็กน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าจะเครื่องที่ผ่านรูพรุนของเจลได้เร็วกว่า จึงปรากฏแถบอยู่บริเวณด้านล่างของเจล (วาสนา, 2539: อาภัสสรา, 2537) มี 10 primer ที่สามารถเกิด polymorphic ขึ้น คือ OPB08, OPB11, OPB12, OPF09, OPF10, OPG03, OPG10, OPG11, OPG17 และ OPG18 นฤทัยและคณะ (2544) ศึกษาลายพิมพ์ DNA ของงาเช่นกัน ใช้พันธุ์งา 3 พันธุ์โดยใช้ primer แบบสุ่ม 6 ชนิด มีเพียง 2 ชนิดเท่านั้นที่สามารถให้ความแตกต่างทั้ง 3 พันธุ์ได้

เมื่อนำข้อมูลทางลักษณะทางสัณฐานวิทยาและรูปแบบลายพิมพ์ DNA ที่เกิดขึ้นมาบันทึกข้อมูลเป็นแบบ binary และนำข้อมูลไปคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนกัน (similarity coefficient) ของ simple matching Jaccard และ Dice เพื่อนำไปจัดกลุ่มทางพันธุกรรม และสร้าง dendrogram โดยใช้ UPGMA หา ค่าสหสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและรูปแบบลายพิมพ์ DNA ที่คำนวณ similarity coefficient ทั้ง 3 วิธี พบว่า ค่าสหสัมพันธ์ ที่คำนวณจาก Jaccard มีค่าสูงที่สุด จึงนำมาใช้ในการจัดกลุ่มทางพันธุกรรม

การจัดจำแนกพันธุ์งาโดยใช้ PCR based markers ชนิด primer แบบสุ่ม มีความสามารถในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของงาได้ เมื่อนำความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของงา 34 พันธุ์/สายพันธุ์ด้วยวิธี UPGMA และนำมาสร้างภาพแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ในการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมพบว่า งาพันธุ์ป่าที่มีการนำมาจากประเทศอินเดียแยกออกจากกลุ่มงาปลูกอย่างชัดเจน งาพันธุ์ปลูกสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม ซึ่งงาในกลุ่มที่ 2 จะมีความหลายหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก ในกลุ่มนี้มี NS ที่เป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์มหาสารคาม60 กับพันธุ์ที่นำเข้ามาจากอเมริกา เมื่อพิจารณากลุ่มจาก dendrogram แล้วส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มที่ใกล้ชิดกับ มหาสารคาม60

เมื่อพิจารณาการจัดกลุ่มทางพันธุกรรมจากการใช้ลายพิมพ์ DNA โดยดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า ลักษณะของพันธุ์ป่าที่แตกต่างจากพันธุ์ปลูกคือ ดอกมีสีม่วง สีของต่อมน้ำหวานมีสีม่วง เมล็ดลีบแบน สีของเมล็ดเป็นสีน้ำตาลดำ ไม่มีสีของ faveola เป็นงาที่มีลักษณะขอบใบแบบหยัก ในกลุ่มของพันธุ์ปลูกนั้น ในกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย BL5 BL1 MKSI84001 S-25 IS-1-21 และ เลย มีสีของกลีบดอกด้านนอกเป็นสีขาวอมม่วง ขนของใบมาก ลำต้นมีการแตกกิ่ง ต่อมน้ำหวานไม่มีการพัฒนาเป็นดอกและมีสีเหลือง ดอกไม่มีขน ลักษณะขอบใบจะเรียบ เมล็ดมีความเต่งไม่ลีบแบน การจัดเรียงตัวของใบส่วนใหญ่เป็นแบบ mixed สีของเปลือกหุ้มเมล็ดส่วนใหญ่เป็นสีดำ และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ค่อนข้างใหญ่สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยที่ 1 เป็นกลุ่มค่อนข้างใหญ่ประกอบด้วย KKU2 GMUB1 งาแดงพื้นเมืองนครสวรรค์ บุรีรัมย์ WL9 MR13 มก18 MR4 LH214 อุบลราชธานี1 GMUB8 ร้อยเอ็ด MKSI83042 GMUB4 มข.1 มีลักษณะส่วนใหญ่ที่ร่วมกันคือ สีของกลีบดอกด้านนอกเป็นสีขาวอมม่วง ต่อมน้ำหวานไม่มีการพัฒนาเป็นดอกและมีสีเหลือง เมล็ดเต่งไม่ลีบแบน กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย GMUB3 NS15 NS6 NS14 และ มหาสารคาม60 มีลักษณะส่วนใหญ่ร่วมกันคือ สีของกลีบดอกด้านนอกเป็นสีขาวอมม่วง ฝักมี 2 พู ตำแหน่งใบเป็นแบบ alternate มีขนบนลำต้นและใบมาก เมล็ดมีสีขาว มีลักษณะมุมใบแบบตั้ง ลำต้นมีการแตกกิ่ง รูปร่างของฝักกลมรีค่อนข้างยาว เมล็ดมีความเต่งไม่ลีบแบน ต่อมน้ำหวานไม่มีการพัฒนาเป็นดอกและมีสีเหลือง กลุ่มย่อยที่

3 ประกอบด้วย GMUB5 NS4 LH220 GMUB7 มข.3 และ MR36 มีลักษณะส่วนใหญ่ร่วมกัน คือ สีของกลีบดอกด้านนอกเป็นสีขาวอมม่วง ฝักมี 2 พู ขนใบและลำต้นมาก ต่อมน้ำหวานไม่มีการพัฒนาเป็นดอกและมีสีเหลือง รูปร่างของฝักกลมรีค่อนข้างยาว เมล็ดมีความเด่งไม่ลีบแบน การกระจายตัวของข้อมูลในการจัดกลุ่มที่มีค่า cophenetic correlation 0.96 การจัดกลุ่มที่ดีมาก ซึ่งเป็นการจัดกลุ่มที่ดีมาก (Sirithunya *et al.*, 2001)

จากการจัดกลุ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยากับ PCR based markers มีสหสัมพันธ์ในระดับปานกลาง อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยมีค่า r เป็น 0.5435 (P=0.00)