

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการรวบรวมเอื้องแฉะมาจากแหล่งต่างๆแล้วนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐาน พบว่า ลำลูกกล้วยมีกาบใบสีน้ำตาลอ่อนหุ้มตลอดทั้งลำ และตามกาบใบมีขนสีดำ พอด้านแก่ทั้งใบและกาบใบหลุดออก ทำให้ลำลูกกล้วยมีสีเหลืองอ่อน มีร่องตามยาวของลำ ใบมีสีเขียวอ่อนปนเหลืองเป็นมัน ตามท้องใบมีขนสีดำประปรายและด้านปลายใบมีลักษณะเว้ามนิยๆ ดอกมีกลิ่นหอม กลีบดอกสีขาวเป็นมัน ซึ่งลักษณะดังกล่าวเหมือนกับารายงานของระพี (2516) และ จิตราพรรณ (2539) สำหรับสีของแผ่นปาก พบว่า มีความแตกต่างกัน โดยเอื้องแฉะจาก อ. แม่สะเรียง มีสีเหลืองอ่อน จาก อ. ปางมะผ้า อ. เชียงดาว และ คอยขุนตาล มีสีส้ม เหลืองเข้ม และส้มปน แสด ตามลำดับ ซึ่งจิตราพรรณ (2539) ได้รายงานว่ แผ่นปากจะมีเขียวอ่อน แล้วเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อดอกบานได้ 3-4 วัน และเป็นสีเหลืองอมส้มเมื่อดอกใกล้โรย แต่พบบางต้นที่แผ่นปากมีสีส้มอมแดงเมื่อดอกบาน สำหรับการทดลองนี้ได้ทำการบันทึกในช่วงที่ดอกมีอายุเท่ากัน แสดงว่า สีของแผ่นปากไม่ได้แตกต่างกันเนื่องจากอายุของดอกแต่น่าจะเป็นลักษณะประจำของเอื้องแฉะในแต่ละแหล่ง ส่วนลักษณะทางปริมาณ พบว่า บางลักษณะมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ได้แก่ ความกว้างของใบ จำนวนใบต่อลำ ความยาวของดอก ความกว้างและยาวของกลีบดอกชั้นใน ความกว้างของกลีบดอกชั้นนอก แต่บางลักษณะไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ซึ่งลักษณะดังกล่าว คือ ความสูงของลำลูกกล้วย ความยาวของใบ ความกว้างของดอก ความยาวของกลีบดอกชั้นนอก และขนาดของปาก จากลักษณะทางปริมาณดังกล่าว มีทั้งเหมือนและแตกต่างจากที่ ระพี (2516 และ 2536) ได้รายงานไว้ จะเห็นได้ว่า ลักษณะทางสัณฐานที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อาจจะไม่เพียงพอและมีความยากลำบากในการแยกกลุ่มของเอื้องแฉะ

เมื่อนำเอื้องแฉะจาก 4 แหล่ง รวม 32 ตัวอย่าง เอื้องเงินแดง และ เอื้องแฉะคอยบุย มาวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์โดยระบบเอนไซม์ 6 ชนิด คือ EST GOT MDH SKD LAP และ GPI ปรากฏว่า EST GOT MDH และ SKD สามารถแสดงความแตกต่างได้ เช่นเดียวกับ Kuntapanom and Smitamana (1997) ส่วน GPI และ LAP ไม่สามารถแสดงความแตกต่างได้เนื่องจากแสดงผลไม่ชัดเจน และ มีบางตัวอย่างที่ไม่ปรากฏแถบสี ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Obara- Okeyo *et al.* (1997 และ 1998) ซึ่งสามารถใช้ได้ผลในกล้วยไม้สกุลเข็มปีเดียม (*Cymbidium*)

ในการวิเคราะห์กลุ่มพืชโดยใช้ค่าการมีแถบสีและไม่มีแถบสีของเอนไซม์แต่ละชนิด เพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และจำแนกความแตกต่างด้วยค่า Jaccard 's coefficient similarity พบว่า เอนไซม์แต่ละชนิดสามารถจำแนกกลุ่มได้แตกต่างกัน EST สามารถจำแนกได้ 23 กลุ่ม ขณะที่ GOT MDH และ SKD สามารถจำแนกได้ 8 17 และ 5 กลุ่มตามลำดับ การที่ EST สามารถจำแนกกลุ่มได้มากที่สุดเป็นเพราะว่า EST เป็น non-specific enzyme ทำให้เกิด polymorphic มากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น ทำให้เกิดตำแหน่งของแถบสีจำนวนมาก (ชวนพิศ, 2538) เช่นเดียวกับในกล้วยไม้สกุลเข็มปีเดียม (Park *et al.*, 1990) ส่วน GPI และ LAP ที่ไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ เนื่องจากบางตัวอย่างไม่ปรากฏแถบสีทำให้เกิดค่า missing distance จำนวนมาก และพบว่า การแยกกลุ่มโดยใช้เอนไซม์แต่ละชนิด ไม่สามารถแยกบางตัวอย่างออกจากกันได้ และเอนไซม์บางชนิดไม่สามารถแยกประชากรเอื้องแฉะออกจาก เอื้องเงินแดง และ เอื้องแฉะคอยุ่ย จึงนำเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่า สามารถจำแนกตัวอย่างทั้งหมดออกเป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ 21) คือ เอื้องเงินแดง 1 กลุ่ม เอื้องแฉะคอยุ่ย 1 กลุ่ม และ ประชากรเอื้องแฉะ 4 กลุ่ม แบ่งตามแหล่งที่มา โดยภายในกลุ่มเดียวกันของเอื้องแฉะสามารถแยกความแตกต่างของแต่ละตัวอย่างออกจากกันได้ ยกเว้น เอื้องแฉะจาก คอยุ่ยศาล ตัวอย่างที่ 2 กับ 3 เอื้องแฉะจาก อ. ปางมะผ้า ตัวอย่างที่ 1 กับ 3 และ 6 กับ 7 นอกจากนี้ยังพบว่า เอื้องแฉะจาก อ. แม่สะเรียง มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ เอื้องแฉะจาก อ. ปางมะผ้า และเอื้องแฉะจาก อ. เชียงดาว มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ เอื้องแฉะจากคอยุ่ยศาล จะเห็นได้ว่า การนำเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มาวิเคราะห์ร่วมกันสามารถจำแนกได้ดีกว่าการใช้เอนไซม์แต่ละชนิด เช่นเดียวกับข้าวพันธุ์กะเหรี่ยง (เป่าน, 2539)

จากการทดลองสกัดดีเอ็นเอของเอื้องแฉะจาก อ. เชียงดาว 8 ตัวอย่าง ด้วยวิธี modified CTAB วิธี CTAB และ วิธี SDS เพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการทำ RAPD ผลปรากฏว่า วิธี CTAB สามารถสกัดดีเอ็นเอของเอื้องแฉะได้ครบทุกตัวอย่าง ส่วนวิธี modified CTAB และ วิธี SDS สกัดได้ 5 และ 2 ตัวอย่าง ตามลำดับ (ภาพที่ 22) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะใบของตัวอย่างเอื้องแฉะที่นำมาสกัดดีเอ็นเอมีอายุไม่เท่ากัน ใบมีความอ่อนและแก่แตกต่างกัน ใบที่แก่จะมี polysaccharide สูง สกัดจากการบดตัวอย่าง เวลาบดใบแก่ จะเห็นชวกว่าใบอ่อน ซึ่งวิธี modified CTAB และ วิธี SDS เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของกล้วยไม้ (Knapp and Chandlee, 1996 ; Kuntapanom and Ikeda, 1998) ส่วนวิธี CTAB เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากใบพืชที่มี polysaccharide สูง (พรพันธ์, 2538) และพบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธี CTAB มีปริมาณและคุณภาพสูงกว่า วิธี modified CTAB และ วิธี

SDS (ตารางที่ 10) ดังนั้น วิธี CTAB จึงเหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายชนิดเอื้องชะ

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการทำ RAPD ด้วย primers 8 ชนิด ขนาด 10 เบส คือ primer C07 C08 C21 C22 C43 C44 C48 และ C51 ปรากฏว่า primer C07 C08 C22 C43 และ C44 แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีความคมชัดและมีจำนวนแถบมาก primer C51 ไม่แสดงแถบดีเอ็นเอ primer C48 แสดงแถบดีเอ็นเอแต่ไม่คมชัด ส่วน primer C21 แสดงแถบดีเอ็นเอที่มีจำนวนแถบน้อย จึงได้นำ primer C07 C08 C22 C43 และ C44 มาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเอื้องชะจาก 4 แหล่ง รวม 32 ตัวอย่าง เอื้องเงินแดง และ เอื้องชะคอกยู่ย ด้วยค่า Jaccard's coefficient similarity พบว่า primers ทั้ง 5 ชนิด แสดงแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 15 22 20 22 และ 27 แถบ สามารถแยกกลุ่มของตัวอย่างดังกล่าวได้ 19 34 27 33 และ 33 กลุ่ม ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า primer C07 ไม่สามารถแยกบางตัวอย่างของเอื้องชะออกจากกันได้ และ ไม่สามารถแยกเอื้องชะคอกยู่ย และ เอื้องเงินแดง ออกจาก ประชากรของเอื้องชะ ในขณะที่ primer C22 C43 และ C44 ไม่สามารถแยกบางตัวอย่างของเอื้องชะออกจากกัน แต่สามารถแยกประชากรของเอื้องชะออกจากเอื้องเงินแดง และ เอื้องชะคอกยู่ย ส่วน primer C08 สามารถแยกตัวอย่างของเอื้องชะได้ทุกตัวอย่าง และ แยกประชากรของเอื้องชะออกจากเอื้องเงินแดง และ เอื้องชะคอกยู่ยได้ แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์เฉพาะกลุ่มตัวอย่างของเอื้องชะจากคอกยู่ยตาล ไม่สามารถแยกตัวอย่างที่ 4 กับ 5 ได้ เหมือนกับการศึกษาในกล้วยไม้สกุล *Phalaenopsis* ที่พบว่า primer บางชนิดสามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดได้แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายต้น บาง primer สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายต้นได้แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิด และ primer บางชนิด แยกความแตกต่างได้ทั้งชนิดและ สายต้น (Chen *et al.*, 1995) และเมื่อนำ primer ทั้ง 5 ชนิดมาวิเคราะห์ร่วมกันพบว่า สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างของเอื้องชะออกจากกันได้ และสามารถแยกจากเอื้องเงินแดง และ เอื้องชะคอกยู่ย และ ที่ค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 55% กลุ่มตัวอย่างของเอื้องชะจาก อ. แม่สะเรียงมีความใกล้ชิดกับ กลุ่มตัวอย่างของเอื้องชะจาก อ.ปางมะผ้า และกลุ่มตัวอย่างของเอื้องชะจาก อ.เชียงดาวมีความใกล้ชิดกับ กลุ่มตัวอย่างของเอื้องชะจากคอกยู่ยตาล (ภาพที่ 57)

จากการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์และลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการทำ RAPD พบว่า ให้ผลเหมือนกันในด้านความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเอื้องชะจาก 4 แหล่ง คือ เอื้องชะจาก อ. แม่สะเรียง มีความใกล้ชิดกับ เอื้องชะจาก อ. ปางมะผ้า และเอื้องชะจาก อ. เชียงดาวมีความใกล้ชิดกับ เอื้องชะจากคอกยู่ยตาล ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า เอื้องชะจาก อ. แม่สะเรียงมีแหล่ง

กำเนิดเดียวกับเอื้องแฉะจาก อ. ป่ามะผ้า และเอื้องแฉะจาก อ. เชียงดาว มีแหล่งกำเนิดเดียวกับเอื้องแฉะจากคอยขุนตาล แต่ในการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ พบว่า สามารถแบ่งกลุ่มของเอื้องแฉะจาก 4 แหล่ง ออกจากกันได้อย่างชัดเจน อาจเป็นเพราะว่า การรวบรวมเอื้องแฉะจากแหล่งต่างๆ มาปลูกในสภาพแวดล้อมเดียวกันเพียง 6 เดือน ไม่เพียงพอสำหรับการปรับตัวของเอื้องแฉะ จึงทำให้รูปแบบของไอโซไซม์ที่แสดงออกมายังมีความสัมพันธ์กับสภาพแวดล้อมเดิม เพราะการแสดงออกของรูปแบบไอโซไซม์มีการพัฒนาอยู่ภายใต้อิทธิพลของปฏิกิริยาระหว่างจีโนไทป์กับสภาพแวดล้อม (Caetano-Anolles *et al.*, 1991; Nybom, 1994; พรพันธุ์ 2538) และพบว่าบางตัวอย่างของเอื้องแฉะไม่สามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้รูปแบบไอโซไซม์แต่สามารถแยกประชากรของเอื้องแฉะออกจาก เอื้องเงินแดง และ เอื้องแฉะคอยขุนได้อย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า เอนไซม์ที่นำมาศึกษามีความเหมาะสมในการแยกความแตกต่างระหว่างชนิด แต่ไม่เพียงพอสำหรับการแยกความแตกต่างระหว่างสายต้น ดังนั้นต้องเพิ่มระบบไอโซไซม์ในการศึกษาให้มากขึ้น หรือ ใช้ลักษณะอื่นมาช่วยในการตัดสินใจด้วย (McKee(1973) อ้างโดย กัญจนนา, 2539) ในขณะที่การทำ RAPD ด้วย primer C07 C08 C22 C43 และ C44 สามารถแยกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างของเอื้องแฉะได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างประชากรของเอื้องแฉะออกจาก เอื้องเงินแดง และ เอื้องแฉะคอยขุน แสดงว่า ชนิดของ primer ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้เหมาะสำหรับการแยกความแตกต่างระหว่างสายต้น แต่ไม่เหมาะสมสำหรับการแยกความแตกต่างระหว่างชนิด