บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับบัวในวงศ์ Nymphaeaceae สกุล *Nymphaea* หรือเรียกว่ากลุ่มอุบลชาติ ซึ่งเป็นสกุลที่มีความหลากหลายของพันธุ์มากที่สุดเมื่อเทียบกับสกุลอื่นในวงศ์เดียวกัน เนื่องจากเป็นพืชที่มีการผสมแบบเปิดจึงเกิดลูกผสมใหม่ขึ้นเป็นจำนวนมาก ลูกผสมที่เกิดขึ้นใหม่นั้นมีความหลากหลายในเรื่องของสีสันของดอก ขนาดและความดกของดอก การบานของดอก ความสวยงามของใบ การมีข้อจำกัดของสีดอกของบัวแต่ละกลุ่ม คือ กลุ่มบัวผันและบัวฝรั่งดอกบานกลางวัน มีทุกสี ยกเว้นสีดำ แต่สีของกลุ่มบัวสาย ดอกบานกลางคืน มีเพียง 3 สีคือ สีขาว ชมพู และบานเย็นถึงแดง (เสริมลาภ, 2540) จึงอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์ต้องการพัฒนาพันธุ์ใหม่ๆขึ้นมา

เนื่องจากบัวมีความสามารถในการผสมแบบเปิดได้ง่ายนี้เองทำให้ผู้ปลูกบัวสามารถผสมพันธุ์บัวให้ได้พันธุ์ใหม่ๆเพื่อเพิ่มทางเลือกและสร้างความสนใจให้แก่ผู้บริโภคในการนำไปใช้ประโยชน์ขึ้นมาเป็นจำนวนมาก จนเกิดความสับสนและหลากหลายในการเรียกชื่อพันธุ์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าบัวที่มีอยู่ในท้องตลาดทั่วไปมีการตั้งชื่อพันธุ์ตามความพอใจของผู้ปรับปรุงพันธุ์ และยังไม่มีชื่อวิทยาศาสตร์ที่แน่นอน หรือมีแต่น้อยพันธุ์มากที่จะสามารถระบุชื่อวิทยาศาสตร์ได้โดยสังเกตจากลักษณะเด่นของบัวพันธุ์นั้น นอกจากนั้นยังมีบัวอีกหลายพันธุ์ที่มีลักษณะใบคล้ายกันมากแต่ดอกมีลักษณะต่างกัน อีกทั้งสภาพแวดล้อมยังมีผลต่อการแสดงออกของสีดอกได้ จึงเป็นเรื่องยากในการระบุชื่อพันธุ์บัวที่เห็นเพียงลักษณะใบเพียงอย่างเดียว ดังนั้น จึงมีความพยายามในการศึกษาถึงลักษณะและวิธีที่จะช่วยในการวิเคราะห์และจำแนกพันธุ์บัวเพื่อช่วยยืนยันความตรงต่อชนิดหรือพันธุ์ และแก้ปัญหาความสับสนของการเรียกชื่อพันธุ์ดังกล่าวมาข้างต้นเพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาพื้นฐานงานด้านปรับปรุงพันธุ์ ในปัจจุบันนอกเหนือจากการจำแนกเบื้องต้นด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปแล้วได้มีการศึกษาถึงระดับชีวโมเลกุล โดยใช้การวิเคราะห์ไอโซไซม์เข้ามาช่วยจำแนกพันธุ์ หาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ และจำแนกกลุ่ม โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของแบบแผนไอโซไซม์เหล่านั้นได้ (อาภัสสรา, 2537ข)

ตัวอย่างบัวที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นบัวในกลุ่มอุบลชาติทั้งหมด แบ่งออกเป็น 2 การทดลองคือ การทดลองที่ 1 การวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมดในบัวกลุ่มอุบลชาติที่มีลักษณะแตกต่างกัน 9 พันธุ์ โดยบัวที่นำมาใช้ในการทดลองที่ 1 นี้ทราบชื่อพันธุ์ทั้งหมดโดยได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. เสริมลาภ วสุวัต และการทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในการจำแนก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธุ์หรือกลุ่มย่อยของบัวอุบลชาติโดยใช้รูปแบบไอโซไซม์ในบัวกลุ่มอุบลชาติที่มีลักษณะแตกต่างกัน 10 พันธุ์และตัวอย่างบัวที่สุ่มเก็บมาจากแหล่งต่างๆ ซึ่งไม่ทราบชื่อพันธุ์ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง (5 ตัวอย่างต่อ 1 กลุ่ม) เพื่อศึกษาถึงรูปแบบจำเพาะของไอโซไซม์ของบัวในกลุ่มย่อย 3 กลุ่มที่แบ่งตามระยะเวลาการออกดอกและลักษณะใบ (กลุ่มบัวผัน บัวฝรั่งและบัวสาย)

1. การวิเคราะห์โปรตีนทั้งหมด

1.1 การศึกษาปริมาณโปรตีนโดย Bradford methodในแต่ละส่วนของต้นบัว

การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในบัวทั้ง 9 พันธุ์ พบว่า บัวแต่ละพันธุ์มีปริมาณโปรตีนในส่วนใบอ่อนและใบเจริญเต็มที่ในปริมาณใกล้เคียงกัน และมีปริมาณมากพอที่สามารถนำไปทดลองวิเคราะห์ ไอโซไซม์เมื่อใช้ในปริมาณน้ำหนักสดที่เท่ากัน ซึ่งปริมาณโปรตีนนี้มีผลต่อการเปรียบเทียบการเกิดแถบและความเข้มของแถบในระบบเอนไซม์ต่างๆ โดยบัวพันธุ์ Maroon Beauty มีปริมาณโปรตีนมากที่สุดคือ 0.035 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดในใบแก่ และ 0.033 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดในใบอ่อน ส่วนบัวพันธุ์นางกวักมีปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดคือ 0.012 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดในใบแก่และ 0.017 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักสดในใบอ่อน โดยปริมาณโปรตีนในใบบัวอาจเปลี่ยนแปลงได้ซึ่งขึ้นกับปริมาณของโลหะหนักหรือสภาพแวดล้อมในสภาพพื้นที่ปลูกโดย Vajpayee *et al.* (2000: Online) ทดลองปลูก *N. alba* L.ในระดับความเข้มข้นของโครเมี่ยมต่างๆกัน พบว่า ที่ระดับ 1 ไมโครโมลาร์มีปริมาณโครเมี่ยมสะสมอยู่มากใน ราก ใบ และไรโซม ตามลำดับ ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณ โปรตีน ปริมาณคลอโรฟิลล์ กิจกรรมของเอนไซม์ Δ-ALA dehydrogenase และ nitrate reductase ลดลง

1.2 การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE นี้เพื่อเป็นการยืนยันผลการสกัดโปรตีนจากส่วนต่างๆของบัวและเมื่อนำไปย้อมด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 แล้วพบว่าผลสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้ในการทดลอง 1.1

การทดลองนี้ใช้ส่วนของใบอ่อน ใบเจริญเต็มที่ และดอกอ่อนของตัวอย่างบัว 2 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์ Dauben และ พันธุ์ชมพูซีลอน เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนในส่วนของใบอ่อนและใบเจริญเต็มที่แตกต่างกัน โดยที่บัวพันธุ์ Dauben มีปริมาณโปรตีนในส่วนของใบอ่อนและใบเจริญเต็มที่แตกต่างกันมาก ส่วนชมพูซีลอนมีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกันในส่วนใบอ่อนและใบเจริญเต็มที่ และมีปริมาณโปรตีนอยู่ในระดับเฉลี่ยของบัวทั้ง 9 พันธุ์ แต่เนื่องจากมีข้อจำกัดที่บัวบางพันธุ์ออกดอก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้อย ในขณะที่บางพันธุ์ออกดอกตลอดปีและมีจำนวนมาก บางพันธุ์มีการพักตัวในช่วงฤดูหนาว จึงไม่สามารถนำดอกอ่อนของบัวทั้ง 10 พันธุ์มาทำการทดลองควบคู่กันได้

เมื่อนำโปรตีนที่สกัดได้ไปทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 จนปรากฏแถบสีน้ำเงินในส่วนต่างๆ พบว่า ในบัวพันธุ์ Dauben ปรากฏแถบสีน้ำเงินเข้มในส่วนใบเจริญเต็มที่มากกว่าในส่วนใบอ่อนและดอกอ่อนตามลำดับ และในบัวพันธุ์ชมพูซีลอนไม่ปรากฏแถบที่ชัดเจนเหมือนกับพันธุ์ Dauben แต่ปรากฏแถบเล็กๆ จำนวนมากและมีสีจาง เมื่อเทียบในส่วนของใบแล้วมีความแตกต่างไม่มากนัก โดยใบที่เจริญเต็มที่มีสีน้ำเงินเข้มกว่าใบอ่อนเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่คำนวณได้ในการทดลอง 1.1 แต่เมื่อเทียบกันทั้ง 3 ส่วนแล้วพบว่าแถบในส่วนดอกอ่อนมีสีเข้มกว่าในส่วนใบ และแถบมีลักษณะเป็นแถบเล็กๆเรียงกันอยู่บริเวณกลางแผ่นเจล ลักษณะที่ปรากฏนี้เป็นการแสดงออกของโปรตีนที่มีขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันเล็กน้อย เนื่องจากในการทดลองนี้ใช้วิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนระหว่างขั้นตอนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ และยังสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนหรือหน่วยย่อยของโปรตีนได้ด้วย โดยมีหลักคือ SDS (sodium dodecylsulfate) เป็น detergent ที่มีประจุเป็นลบไปเกาะกับโปรตีนทำให้ประจุทั้งหมดเป็นลบ และยังทำให้โปรตีนเสียสภาพจากรูปทรงกลมไปอยู่ในสภาพเหยียดตรง ทำให้โปรตีนที่เกาะกันอยู่แยกออกเป็นแต่ละหน่วยย่อย ฉะนั้นการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าจึงเป็นการเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียว (พิณทิพ, 2536) ดังนั้น แถบที่ปรากฏหลายๆแถบนี้จึงอาจเป็นกลุ่มของโปรตีนที่มีขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน

การทดลองในส่วนนี้ยังต้องปรับปรุงสูตรของน้ำยาสกัด โดยอาจปรับค่า pH ให้เพิ่มขึ้นหรือลดลงหรือปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารเคมีในน้ำยา เนื่องจากแถบที่ได้จากการย้อมสีนั้นยังคงมีลักษณะเป็นปื้น อาจเป็นเพราะยังมีการปนเปื้อนของคาร์โบไฮเดรตหรือเอนไซม์ protease อยู่เนื่องจากสารเคมีที่ใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาสกัดนั้นยังไม่เหมาะสมเพียงพอสำหรับการสกัดเอนไซม์หรือโปรตีนในบัว นอกจากนั้น การใช้สารสกัดหยาบซึ่งมีโปรตีนขนาดใหญ่จำนวนมากและการย้อมโปรตีนที่ไม่จำเพาะเจาะจง เช่น การย้อมด้วย Coomassie blue มักพบปัญหาการเกิดปื้นและแถบที่ซับซ้อน ทำให้ยากในการจำแนกโปรตีนที่เป็น homologous และ non-homologous ออกจากกัน (Shields *et al.*, 1983)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัวอุบลชาติโดยใช้รูปแบบไอโซไซม์

2.1 การคัดกรองไอโซไซม์ที่เหมาะสม

เมื่อทดสอบเอนไซม์ทั้ง 15 ระบบในบัว พบว่า สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ปรากฏแถบและกลุ่มที่ไม่ปรากฏแถบสี

กลุ่มที่ไม่ปรากฏแถบสี ได้แก่ ALO, DIA, GLD, GDH, IDH, MDH, ME, SOD, ACP, ALP และ LAP อาจเนื่องจากน้ำยาสกัดที่ใช้ไม่เหมาะสมต่อสภาพการทำงานของเอนไซม์หรืออาจเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ เนื่องจากเกิดการกลายพันธุ์ (null allele) หรือเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ไม่มีอยู่ในบัว

กลุ่มที่ปรากฏแถบสีได้แก่ EST, SKD, GOT และ POX โดยแถบที่ปรากฏในแต่ละระบบเอนไซม์นั้นแตกต่างกันในแต่พันธุ์ รูปแบบไอโซไซม์ที่ได้สามารถใช้จำแนกพันธุ์บัวโดยวิเคราะห์จากรูปแบบของแถบสีที่เกิดขึ้น ซึ่งแสดงถึงตำแหน่งของเอนไซม์ที่มีขนาดหรือรูปร่างโมเลกุลต่างกันในเอนไซม์ชนิดนั้นๆ (Vallejos, 1983) ส่วนแถบที่มีลักษณะเป็น monomorphic คือมี Rf เท่ากันไม่เหมาะสมสำหรับการจำแนกพันธุ์พืชออกจากกัน เพราะ ไม่สามารถแสดงถึงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ แต่มีประโยชน์ในการจัดกลุ่มหากเป็นแถบร่วมของตัวอย่างส่วนใหญ่ที่ใช้ทดสอบ

ความเข้มของแถบสีที่เกิดขึ้นอาจเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ คือ แถบที่มีสีเข้มอาจแสดงถึงความสามารถทำงานได้ดีและเต็มที่กว่าแถบที่มีสีจางกว่า ดังในไอโซไซม์ทั้ง 4 ชนิดที่มีสีของแถบใกล้เคียงกันทั้งในใบอ่อนและใบเจริญเต็มที่ และความเข้มของแถบที่เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อที่ต่างกันในบางพันธุ์ โดยสีของแถบจะเข้มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แสดงถึงกิจกรรมของเอนไซม์ที่มากขึ้น จึงทำให้ง่ายต่อการระบุค่า Rf มากขึ้น ซึ่ง Jaaska (1983) พบว่า จำนวนและการแสดงออกของแถบที่ได้นั้นขึ้นกับ พันธุ์พืช เนื้อเยื่อ และขั้นตอนการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืช การทดลองนี้เปรียบเทียบแถบจากสารสกัดจากใบอ่อนและใบเจริญเต็มที่ซึ่งมีโปรตีนมากพอสำหรับทำปฏิกิริยาและเห็นแถบไอโซไซม์ได้ชัดเจน ดังนั้น การใช้น้ำยาสกัดร่วมกับเนื้อเยื่อที่เหมาะสมจึงมีผลต่อการแสดงออกของไอโซไซม์โดยทำให้ปรากฏแถบจำนวนมากและมีความคมชัด จึงทำให้การจำแนกพันธุ์ทำได้ง่ายและมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น การทดลองพบว่า เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดจากใบอ่อนและใบเจริญเต็มที่ของบัวแต่ละพันธุ์ที่นำมาวิเคราะห์โดยระบบเอนไซม์ต่างๆนั้นปรากฏรูปแบบของแถบสีที่มีลักษณะ polymorphic แตกต่างกัน ซึ่งแต่ละระบบเอนไซม์ยังแสดงออกได้ดีในน้ำยาสกัดที่ต่างกันด้วย การคัดเลือกสภาพที่เหมาะสมสำหรับการทำไซโมแกรมของแต่ละไอโซไซม์ในการทดลองแตกต่างกันดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ไอโซไซม์ EST พบว่า การใช้น้ำยาสกัดสูตร 1 ในใบอ่อนเกิดแถบที่เหมาะสำหรับนำมาทำไซโมแกรม ถึงแม้ว่าการใช้น้ำยาสกัดสูตร 2 ให้แถบที่มีความคมชัดมากกว่าแต่มีจำนวนแถบน้อยกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้จำนวนแถบมากกว่ามาใช้วิเคราะห์ ซึ่งอาจเป็นเพราะน้ำยาสกัดสูตร 1 มี pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของ EST และใบอ่อนยังเป็นส่วนที่กำลังเจริญเติบโต อาจมีการสร้างหรือมีเอนไซม์ที่ทำงานได้มากจึงให้แถบจำนวนมากกว่าและแถบชัดกว่าในใบเจริญเต็มที่ และอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อใบมีอายุมากขึ้นจึงทำให้เอนไซม์นี้ลดการทำงานลงหรือการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ลดลง จึงทำให้บัวบางพันธุ์มีแถบของไอโซไซม์เฉพาะในใบอ่อนและไม่มีหรือเป็นแถบสีจางในใบเจริญเต็มที่ เช่นเดียวกับ Goodman and Stuber (1983) กล่าวว่า การแสดงออกของโครงสร้างแบบต่างๆ (polymorphism) ของ EST แสดงออกได้ดีในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสที่มีบัฟเฟอร์อยู่ในช่วง pH 8.2 – 8.6 และ EST ที่แตกต่างกันในระดับโครงสร้าง (mono/heterodimer) สามารถพบในเนื้อเยื่อเฉพาะที่แตกต่างกัน เช่น ในข้าวโพดพบไอโซไซม์ EST แบบ E10 เฉพาะใน endosperm ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ และแบบ E4 พบเฉพาะในรากของต้นกล้า

ไอโซไซม์ SKD พบว่า การใช้น้ำยาสกัดสูตร 2 ในใบอ่อนเกิดแถบที่เหมาะสำหรับนำมาทำไซโมแกรม เพราะสามารถแสดงแถบได้ครบทั้ง 10 พันธุ์ในขณะที่ในใบเจริญเต็มที่แสดงแถบได้ไม่ครบทุกพันธุ์ อาจเนื่องจากไม่มีกิจกรรมของ SKD ในใบเจริญเต็มที่ Wijsman (1983) พบว่า รูปแบบไอโซไซม์ SKD ในพิทูเนียแสดงถึงการสร้างเอนไซม์ถูกควบคุมด้วยยีน 1 ตำแหน่ง และยังพบว่าพิทูเนียพันธุ์แท้บางพันธุ์เป็น null allele ซึ่งมีการตั้งสมมติฐานว่า SKD มี 3 รูปแบบคือ 1) SKD มี 2 alleles แต่ละ allele ให้แถบที่แตกต่างกันเป็น monomeric enzyme 2) แถบของการเคลื่อนที่ในตัวกลางเป็นอิสระต่อกันขึ้นกับว่าเอนไซม์แต่ละตัวได้รับ post-translational modification ที่ต่างกัน และ 3) เอนไซม์ที่ทำงานได้เป็น dimer และเกิดปฏิกิริยาได้ดีในเนื้อเยื่อใบอ่อนและลดลงตามอายุที่มากขึ้น (Orton, 1983) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง

ไอโซไซม์ GOT พบว่า การใช้น้ำยาสกัดสูตร 2 ไม่ปรากฏแถบใดๆทั้งในใบอ่อนและใบเจริญเต็มที่จึงไม่สามารถใช้จำแนกพันธุ์ได้ และการใช้น้ำยาสกัดสูตร 1 ในใบเจริญเต็มที่สามารถแสดงแถบได้ในบัวเพียง 2 พันธุ์ ซึ่งน้อยเกินไปจึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้วิเคราะห์เพื่อการจำแนกพันธุ์บัวเช่นกัน อย่างไรก็ตาม GOT เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญโดย Goodman and Stuber (1983) กล่าวว่า GOT เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในปฏิกิริยา transamination ในการกำจัดไนโตรเจน (N_2) ออกจากกรดอะมิโน และการฟอร์มตัวของ keto acid ในวัฏจักรเครป (Kreb's cycle) และ gluconeogenesis และพบว่าโครงสร้างของ GOT ทั้งหมดในข้าวโพดเป็น dimer ที่ควบคุมโดยยีน 3 loci ซึ่งผลผลิตแต่ละ locus สามารถทำงานได้ในส่วนต่างๆของพืชแตกต่างกัน จึงอาจเป็นไปได้ว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

น้ำยาสกัดที่เลือกใช้ไม่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์นี้หรือในใบบัวอุบลชาติบางพันธุ์อาจไม่มีเอนไซม์ชนิดนี้อยู่

ไอโซไซม์ POX พบว่า การใช้น้ำยาสกัดสูตร 1 ในใบเจริญเต็มที่เกิดแถบที่เหมาะสำหรับนำมาทำไซโมแกรมมากกว่าใบอ่อน เพราะแสดงแถบจำนวนมากและเห็นแถบชัดเจนกว่า อาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับกับปฏิกิริยาที่เกิดในใบเจริญเต็มที่ เช่น ขบวนการเสื่อมสภาพ (senescence) โดยมีการสะสมเพิ่มขึ้นจากใบอ่อนและสะสมเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆจนกระทั่งใบแก่ เช่นเดียวกับ Sheen (1983) และ Goodman and Stuber (1983) ที่กล่าวว่ากิจกรรมและจำนวนของแถบเพิ่มขึ้นในระหว่างที่พืชมีการพัฒนา โดย POX อาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโต โดยไปขัดขวางปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ indoleacetic acid (IAA) และเกี่ยวข้องกับการสลายตัวของผนังเซลล์ นอกจากนั้น POX ยังเป็นโปรตีนกลุ่มใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนประจุจากสารตั้งต้นที่ออกซิไดซ์ได้ เช่น phenol และ aromatic amine ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งแถบจำนวนมากของ POX แสดงถึงการถูกควบคุมด้วยหลายๆ loci และแสดงถึงการเกิด post-translational modification จึงทำให้จำนวนแถบและความคมชัดของแถบมักไม่สม่ำเสมอในต้นกล้าหรือต้นพืชที่กำลังพัฒนา และยังขึ้นกับสภาพแวดล้อมด้วย (Jaaska , 1983) ดังเช่นงานทดลองของ Lavid *et. al.* (2001: Online) พบว่า ปริมาณ polyphenol และ กิจกรรมของเอนไซม์ POX เพิ่มมากขึ้นในอุบลชาติที่มีการสะสมของโลหะหนัก

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาไอโซไซม์ทั้ง 4 ระบบ พบว่า มีบัวต่างพันธุ์ที่มีแถบที่มีค่า Rf เท่ากันแต่มีความเข้มของแถบสีต่างกันอยู่เป็นจำนวนมาก สมิตและประวิทย์ (2533) กล่าวว่า การที่แถบไอโซไซม์หนึ่งๆปรากฏอยู่ในอยู่ในไซโมแกรมของสายพันธุ์ที่ต่างกัน 2 สายพันธุ์แต่ต่างกันในด้านความเข้มของแถบสี เป็นความแปรปรวนทางด้านปริมาณหรือกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งไม่ชัดเจนเหมือนความแปรปรวนทางด้านคุณภาพ ซึ่งความแปรปรวนทั้งสองชนิดนี้เป็นตัวกำหนดศักยภาพของระบบไอโซไซม์นั้นๆ ดังนั้นในการคัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่นำมาใช้ในการทดลองควรเลือกเนื้อเยื่อที่มีความเหมาะสมสำหรับการแสดงออกของเอนไซม์ชนิดนั้นๆ เพื่อทำให้ได้ข้อมูลที่ละเอียดและมีความถูกต้องแม่นยำในการจำแนกพันธุ์พืชมากยิ่งขึ้น

เมื่อนำลักษณะแถบที่ได้ไปจัดความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการทำไซโมแกรมและเดนโดรแกรม พบว่า แม้ยังไม่สามารถแยกกลุ่มอุบลชาติเป็น 3 กลุ่มย่อยตามลักษณะใบและการออกดอกได้อย่างชัดเจนที่ระยะความห่างทางพันธุกรรม 25% แต่พบว่าบางระบบเอนไซม์มีแนวโน้มที่ดีในการจำแนกกลุ่มย่อย เช่น เมื่อใช้ EST พบว่า บัวสายทั้งหมดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือเมื่อใช้ POX พบว่า บัวผันและบัวสายแยกกลุ่มจากกันชัดเจน ส่วนกลุ่มที่จัดโดยระบบ SKD นั้นมีบัวจากทุกกลุ่มย่อยคละกัน แต่อาจใช้ความหลากหลายของแถบเพื่อการจำแนกพันธุ์ได้ ในขณะที่ GOT ให้แถบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เฉพาะในนางกวักและ Maroon Beauty เท่านั้น จึงอาจไม่เหมาะสมต่อการศึกษาในบัว นอกจากนั้นแล้วยังมีการใช้ไอโซไซม์ในพืชอื่นๆ ปราโมทย์และเกศิณี (2543) จำแนกสตรอเบอรี่พันธุ์ลูกผสม CMU 025 x CMU 035 และหาความสัมพันธ์ของพ่อ แม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน พบว่า สามารถใช้จำแนกลูกผสมออกจากพ่อแม่ได้ชัดเจน และทางชีวเคมีโดยวิธีอิเล็กโตร-โฟรีซิส ศึกษารูปแบบเอนไซม์ LAP , EST และ SKD พบว่าการใช้รูปแบบเอนไซม์ EST ร่วมกับ LAP สามารถจำแนกได้ 4 พันธุ์ กับ 3 กลุ่ม ซึ่งสามารถจำแนกลูกผสมบางเบอร์ออกจากพันธุ์แม่หรือพันธุ์พ่อ หรือระหว่างลูกผสมด้วยกันเองออกจากกันได้แต่ไม่ทั้งหมด ส่วนเอนไซม์ SKD แสดงออก 1 แถบ ซึ่งไม่เหมาะสมในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสของสตรอเบอรี่ ในทำนองเดียวกันกับปฐมาและธวัชชัย (2544) ได้ศึกษาความผันแปรลักษณะทางไอโซไซม์ของมะม่วงแก้วสายต้นคัดจำนวน 52 ต้น จาก 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบน เพื่อเปรียบเทียบลักษณะทางชีวเคมีสำหรับการจำแนกกลุ่ม การศึกษารูปแบบไอโซไซม์โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสจากใบแก่อายุ 7 เดือนด้วยสานสกัด Tris-buffer 0.1 M, pH 8.2 ใช้ตัวกลาง polyacrylamide gel ความเข้มข้น 22 เปอร์เซ็นต์เหมาะสมสำหรับไอโซไซม์ ACP และ EST ขณะที่ 7.5 เปอร์เซ็นต์สำหรับไอโซไซม์ POX สามารถจำแนกสายต้นมะม่วงแก้วออกได้เป็น 10, 4 และ 15 กลุ่มตามลำดับ เมื่อนำไอโซไซม์ทั้ง 3 ชนิดมาวิเคราะห์ร่วมกัน ทำให้สามารถจำแนกมะม่วงแก้วทั้ง 52 ต้น ออกได้เป็น 20 สายต้นและ 9 กลุ่ม

รูปแบบไอโซไซม์ที่ได้จากบัวพันธุ์ต่างๆแสดงถึงความแปรปรวนและ/หรือความสัมพันธ์ระหว่างพันธุ์ของบัวพันธุ์ต่างๆ แม้ว่าแต่ละพันธุ์มีรูปแบบไอโซไซม์โดยรวมไม่เหมือนกันซึ่งแสดงถึงความเป็นเอกลักษณ์ของแต่ละพันธุ์ที่สามารถนำไปใช้จำแนกพันธุ์ออกจากกัน แต่อาจปรากฏแถบที่มีค่า Rf ตรงกันบางส่วนแสดงถึงเอนไซม์ที่มีขนาดหรือรูปร่างโมเลกุลแบบเดียวกันหรืออาจกล่าวได้ว่า มียีนบนโครโมโซมที่สามารถสร้างเอนไซม์ที่มีขนาดเท่ากันได้เหมือนกัน (allele เดียวกัน) ซึ่งอาจเป็นยีนที่ได้รับมาจากต้นพ่อหรือต้นแม่เดียวกัน หรืออาจเป็นพ่อ-ลูก หรือแม่-ลูกกัน งานทดลองของ Mackill *et al.* (1993: Online) ใช้เครื่องหมายไอโซไซม์ และ RFLP probe บางตัวทำปฏิกิริยากับโครโมโซมแห่งที่ 6 ที่มียีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความยาววันของข้าวในเขตร้อน พบว่า มีไอโซไซม์ที่เป็นผลผลิตของยีน *Pgi-2* (glucose-6-phosphate isomerase) เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความยาววันในข้าวพันธุ์ GEB24 แต่ไม่สามารถนำไอโซไซม์นี้ไปใช้เพื่อเป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกพันธุ์โดยตรง เพียงแต่สามารถนำไปใช้ตรวจสอบลักษณะเพื่อชี้บ่งหรือจำแนกยีนในการผสมข้ามได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การศึกษารูปแบบจำเพาะที่แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในกลุ่มของบัวอุบลชาติ

การศึกษาในส่วนนี้ใช้ระบบเอนไซม์เช่นเดียวกับการทดลอง 2.1 ซึ่งสามารถปรากฏแถบสีได้ โดยทดสอบกับตัวอย่างที่แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามลักษณะใบเพื่อวิเคราะห์หารูปแบบจำเพาะที่แสดงความสัมพันธ์ภายในกลุ่มได้โดยพิจารณาจากการมีแถบร่วม (Rf เดียวกัน) เมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์ทั้ง 4 ระบบนี้ พบว่า

กลุ่มบัวผันแสดงรูปแบบของแถบไอโซไซม์ EST ที่มีความหลากหลายมาก ไม่มีรูปแบบที่แน่นอนจนไม่สามารถระบุรูปแบบจำเพาะของแถบในบัวทุกกลุ่มได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Micales and Bonde (1994) กล่าวว่าการย้อมเอนไซม์บางระบบ เช่น EST, ACP และ ALP ไม่เหมาะสมในการตรวจสอบแยกความแตกต่างด้วยระบบไอโซไซม์โดยเฉพาะพืชที่เป็น multiple loci แต่เมื่อพิจารณาเอนไซม์ทั้ง 4 ระบบ เฉพาะแถบร่วมที่ 60% ขึ้นไป พบว่า กลุ่มบัวผันมีแถบร่วมต่างจากกลุ่มบัวฝรั่งและบัวสาย จึงอาจนำไปใช้เป็น marker ในการจำแนกกลุ่มบัวผันได้ โดยในระบบเอนไซม์ EST แถบร่วมมีค่า Rf = 0.12, 0.13, 0.45, 0.5, 0.53 และ 0.58 ระบบเอนไซม์ SKD มีค่า Rf = 0.4 และ 0.42 ระบบเอนไซม์ GOT มีค่า Rf = 0.19, 0.22, 0.27 และ 0.33 และระบบเอนไซม์ POX มีค่า Rf = 0.25, 0.28, 0.35, 0.37, 0.55 และ 0.62 และเมื่อเปรียบเทียบค่า Rf ของบัวผันในการทดลองที่ 1 และ 2 พบว่ามีค่าคลาดเคลื่อนเล็กน้อยแต่ยังคงอยู่ในช่วง Rf ที่ใกล้เคียงกัน อาจเป็นเพราะได้รับการดัดแปลงโมเลกุลหลังกระบวนการทรานสเลชั่น (post-translational modification) ต่างๆ เช่น การได้รับหมู่ฟอสเฟตหรือน้ำตาลเพิ่มขึ้นหรือเป็นผลผลิตของการย่อยโปรตีน ทำให้โครงสร้างหรือขนาดโมเลกุลเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อยจึงมีผลต่อการเคลื่อนที่ในเจล

กลุ่มบัวฝรั่งแสดงรูปแบบของแถบไอโซไซม์ EST หลากหลายที่สุดเมื่อเทียบในบัวทั้ง 3 กลุ่ม เมื่อพิจารณา Rf เฉพาะแถบร่วมที่ 60% ขึ้นไปในเอนไซม์ทั้ง 4 ระบบ พบว่า กลุ่มบัวฝรั่งมีแถบร่วมต่างจากกลุ่มบัวผันและบัวสายจึงอาจนำไปใช้เป็น marker ในการจำแนกกลุ่มบัวฝรั่งได้ โดยในระบบเอนไซม์ EST มีค่า Rf = 0.5 และ 0.58 ระบบเอนไซม์ GOT มีค่า Rf = 0.22, 0.3 และ 0.33 ระบบเอนไซม์ POX มีค่า Rf = 0.22, 0.3, 0.33, 0.36, 0.58, 0.62 และ 0.75 แต่ระบบเอนไซม์ SKD ไม่ปรากฏแถบที่เป็นแถบร่วมภายในตัวอย่าง ซึ่งอาจเป็นเพราะกระบวนการ post-translational modification ที่ต่างกันในแต่ละตัวอย่าง มีผลต่อค่า Rf ของเอนไซม์ด้วย เมื่อเอนไซม์เปลี่ยนรูปร่างหรือขนาดไปทำให้ค่า Rf เปลี่ยนแปลงและยังอาจทำให้ไม่สามารถทำงานได้ จึงไม่ปรากฏแถบ หรืออาจเป็นเพราะตัวอย่างที่นำมาทดสอบสร้างเอนไซม์ที่ทำงานได้น้อยหรืออาจไม่มีการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ในใบอ่อนและการที่จำนวนแถบปรากฏเพียง 1-3 แถบในบัวทั้ง 3 กลุ่มย่อยยังแสดงถึงโครงสร้างของ SKD ที่ไม่ซับซ้อนเหมือน EST

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลุ่มบัวสายแสดงรูปแบบของแถบไอโซไซม์ EST หลากหลาย เมื่อพิจารณา Rf เฉพาะแถบร่วมที่ 60% ขึ้นไปในเอนไซม์ทั้ง 4 ระบบ พบว่า กลุ่มบัวสายมีแถบร่วมต่างจากกลุ่มบัวผันและบัวฝรั่งที่อาจนำไปใช้เป็น marker ในการจำแนกกลุ่มบัวสายได้ โดยในระบบเอนไซม์ EST มีค่า Rf = 0.53, 0.6 และ 0.63 ระบบเอนไซม์ SKD มีค่า Rf = 0.37 ระบบเอนไซม์ GOT มีค่า Rf = 0.19 และ 0.28 และระบบเอนไซม์ POX มีค่า Rf = 0.24, 0.4, 0.47, 0.51, 0.58 และ 0.62 นอกจากนั้นยังพบว่าค่า Rf ที่ได้แตกต่างจากการทดลองที่ 2.1 ซึ่งอาจเนื่องมาจากกระบวนการ post-translationa modification หรือเป็นความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในกลุ่มบัวสายหรือการใช้เนื้อเยื่อที่นำมาสกัดต่างกัน เห็นได้จาก POX ซึ่งจะแสดงแถบได้ดีในใบเจริญเต็มที่ และสามารถมองเห็นแถบเป็น 3 กลุ่ม แต่ในการทดลองที่ 2.2 เห็นเพียง 2 กลุ่ม จึงอาจเป็นไปได้ว่าในใบอ่อนของตัวอย่างที่นำมาทดสอบทั้ง 5 ตัวอย่างนี้ไม่มีเอนไซม์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กหรืออาจมีโมเลกุลขนาดเล็กมาก ทำให้เคลื่อนที่ได้เร็วจนหลุดออกไปจากเจลได้ เนื่องจากแถบที่ปรากฏอยู่ตอนบนของเจลเป็นแถบของโปรตีนขนาดใหญ่จึงเคลื่อนที่ผ่าน polyacrylamide gel ได้ช้า ส่วนแถบสีที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกว่าสามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าทำให้ปรากฏแถบด้านล่างของเจล (วาสนา, 2539)

จากการสังเกตใบตัวอย่างที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์นั้นแม้ว่ามีลักษณะแตกต่างกันทั้งหมดมีเพียงลักษณะของขอบใบที่เหมือนกัน แต่เมื่อวิเคราะห์ผลจากแผ่นเจลและไซโมแกรมจากการเปรียบเทียบระบบเอนไซม์ทั้ง 4 ระบบในบัวทั้ง 3 กลุ่ม พบว่ามีการแสดงออกของแถบร่วมกันในกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็น marker ได้ โดยเฉพาะระบบเอนไซม์ GOT แสดงรูปแบบจำเพาะของแถบในบัวกลุ่มเดียวกันได้ดีที่สุด คือมีแถบร่วม 80-100% ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยแสดงรูปแบบที่ใกล้เคียงกันในทุกๆตัวอย่างของบัวทุกกลุ่ม และเห็นแถบชัดเจน นอกจากนั้นยังมีแถบเล็กๆที่อาจพบหรือไม่พบในบางพันธุ์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเป็นลักษณะที่ได้รับมาจากบัวในกลุ่มอื่นหรือเป็น post-translational modification หรืออาจเป็นผลผลิตที่เกิดจากการย่อยโปรตีน

จากตารางเปรียบเทียบแถบร่วมจากการทดสอบด้วยเอนไซม์ 4 ระบบในบัวอุบลชาติ 3 กลุ่มย่อยพบว่า แถบร่วมที่เกิดขึ้นมีแนวโน้มในการใช้เป็น marker ในการจำแนกกลุ่มได้ จากตารางแสดงให้เห็นว่าบัวแต่ละกลุ่มและแต่ละเอนไซม์มีแถบร่วมต่างกัน โดยที่กลุ่มบัวผันในทุกเอนไซม์ให้แถบจำนวนมากกว่ากลุ่มบัวสายและบัวฝรั่ง และมีค่า Rf บางค่าที่ตรงกันในระหว่างกลุ่มบัวแสดงถึงเอนไซม์ที่มีขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันในรุ่นลูกที่อาจได้รับการถ่ายทอดยีนมาจากพ่อหรือแม่ในกลุ่มเดียวกัน ดังนั้นจึงอาจใช้ลักษณะหรือรูปแบบของแถบร่วมที่ต่างกันนี้เพื่อการจำแนกกลุ่มบัวได้

ดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตมีหน้าที่ควบคุมลักษณะและการถ่ายทอดลักษณะจากพ่อแม่ไปสู่ลูก (สุรินทร์, 2545) และในสายดีเอ็นเอมีการเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์หรือลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เบสแบบต่างๆ ที่เรียกว่า ยีน เพื่อเป็นข้อมูลทางด้านพันธุกรรมในการควบคุมการสังเคราะห์กรดอะมิโนหลายๆตัวมาเรียงต่อกันเป็นสายโพลีเปปไทด์หรือเส้นโปรตีนที่มีขนาดต่างๆกัน ไอโซไซม์เป็นโปรตีนที่สามารถทำงานได้ในลักษณะต่างๆกันทั้งที่เป็น monomer (โพลีเปปไทด์หรือโปรตีน 1 ชนิด) ซึ่งจะให้แถบที่ไม่ซับซ้อนมากนัก เพียง 1-3 แถบ และให้แถบซับซ้อนมากยิ่งขึ้นในเอนไซม์ที่เป็น dimer (โพลีเปปไทด์ 2 ชนิดทำงานร่วมกัน) และ multimer (โพลีเปปไทด์ 2 ชนิดขึ้นไปทำงานร่วมกัน) ตามลำดับ ลักษณะแถบที่ปรากฏในการทดลองนี้มีทั้งที่เป็นแถบเดียวเห็นชัดเจน และเป็นกลุ่มของแถบที่เรียงชิดกันและแถบที่อยู่ตรงกลางมีความหนาและสีเข้มที่สุดในเจลของไอโซไซม์ EST และไอโซไซม์ POX ในบัวทั้ง 3 กลุ่ม ลักษณะนี้อาจเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่อยู่บนโครโมโซม โดยการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ถูกควบคุมโดยยีนทั้งที่เป็น multiple alleles ที่ยีนเพียงตำแหน่งเดียว และ multiple alleles หรือ single allele ที่ยีนหลายๆตำแหน่งซึ่งจะแสดงแถบแตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อยีนทำงานร่วมกัน จึงทำให้ผลของการแสดงออกเกิดลักษณะแถบโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกันและมีความหลากหลายมากกว่าการถูกควบคุมการสร้างด้วยยีนเพียงคู่เดียว หรือเป็นผลการแสดงออกของยีนเด่นและยีนด้อยอีกด้วย ซึ่งแถบที่พบในเฉพาะบางพันธุ์อาจเป็นลักษณะเฉพาะของบัวพันธุ์นั้นๆที่อาจเกิดขึ้นจากการรวมตัวของพันธุกรรมแม่และพ่อซึ่งมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขณะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (สุรินทร์, 2545) จึงเกิดการกลายพันธุ์ของยีน (gene recombination) ในลูกผสมส่งผลให้สามารถผลิตเอนไซม์ขนาดจำเพาะขึ้นมาได้ และในกรณีเดียวกันนี้ทำให้เกิดการไม่ปรากฏแถบสีได้เช่นกันเนื่องจากลูกผสมไม่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดเดิมได้ ดังในงานทดลองของ Kostova *et al.*(1980) วิเคราะห์สารสกัดใบข้าวสาลีที่มีโครโมโซมเป็น ditelocentric จาก 18 ตัวอย่าง พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงในเชิงปริมาณและคุณภาพของรูปแบบของแถบระบบเอนไซม์EST ซึ่งขึ้นกับการไม่มีส่วนของแขนโครโมโซมที่ผิดปกติ โดยที่การสังเคราะห์ไอโซไซม์เกี่ยวข้องกับการควบคุมของยีนที่อยู่บนแขนยาวของโครโมโซม แต่การวิเคราะห์ไอโซไซม์ยังไม่สามารถนำไปใช้ในการระบุลักษณะที่แสดงออกของพืชได้ และได้มีการใช้ไอโซไซม์เพื่อทดสอบพืชกลุ่มเดียวกันที่มีความผิดปกติของจำนวนโครโมโซม (ploidy number) ที่อาจเกี่ยวข้องกับรูปแบบ จำนวนแถบไอโซไซม์ และวิวัฒนาการของพืช Chase and Olmstead (1988: Online) ศึกษาจำนวนไอโซไซม์ของ Oncidiinae (Orchidaceae) ที่มีโครโมโซมชุดเดียวเป็น n = 5-30 จำนวน 11 พันธุ์ เทียบกับสกุล Psygmorchis ที่มี n = 5 และ 7 ซึ่งเป็นจำนวนมาตรฐาน ใช้ไอโซไซม์ 13 ชนิด พบว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของจำนวนไอโซไซม์สำหรับทุกเอนไซม์ที่นำมาทดสอบ โดยจำนวนโครโมโซมต่ำนั้นเป็นผลมาจากการลดลงแบบ aneuploid และในทำนองเดียวกับการทดลองของ Anderson *et al.* (1999) ศึกษาความหลากหลายของจำนวนไอโซไซม์เพื่อประเมินวิวัฒนาการและความสัมพันธ์ของ Brassiceae จาก 7 แหล่งที่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จำนวนโครโมโซมชุดเดียวเป็น n = 6-75 โดยใช้ 10 ระบบเอนไซม์ พบว่า จำนวนโครโมโซม n = 7-13 และ n = 14-18 มีจำนวนไอโซไซม์ (isozyme number) เหมือนกัน จึงอาจเป็นไปได้ว่าโครโมโซมชุดที่มี n = 14-18 ไม่ได้เพิ่มขึ้นจากชุด n = 7-14 โดยความผิดปกติแบบ polyploidy แต่การเพิ่มขึ้นของจำนวนโครโมโซมที่เป็นแบบ aneuploid มีผลต่อวิวัฒนาการมากกว่าแบบ polyploid แต่สำหรับบัวซึ่งมีจำนวนโครโมโซมหลากหลายมากและยังมีความผิดปกติแบบ aneuploid จึงอาจมีผลต่อการทำให้เกิดลักษณะใดลักษณะหนึ่งในบัวพันธุ์นั้นๆ ได้ พบว่าการใช้ ไอโซไซม์ EST, SKD, GOT และ POX ตรวจสอบปรากฏว่ามีรูปแบบของแถบแตกต่างกันในระหว่างพันธุ์และในแต่ละระบบเอนไซม์ ซึ่งอาจแตกต่างกันทั้งหมดหรือเหมือนกันบางส่วน

การศึกษาครั้งนี้ให้ผลการทดลองที่เป็นประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นข้อมูลพิจารณาร่วมกับการจำแนกพันธุ์โดยสัณฐานวิทยา ถึงแม้ว่าผลที่ได้ยังไม่ชัดเจนนักซึ่งต้องมีการปรับปรุงเทคนิคการวิเคราะห์ให้ดีขึ้น โดยปัญหาที่พบในการทดลองครั้งนี้ คือ สารสกัดที่สกัดได้บางครั้งมีความหนืดมาก ทำให้ได้แถบที่บิดเบี้ยว ไม่เป็นเส้นตรง แต่สามารถลดความหนืดลงได้โดยรักษาความเย็นในระหว่างการบดและใช้เวลาในการบดให้น้อยลง โดยบดแต่พอละเอียดหรืออาจใช้ไนโตรเจนเหลวช่วยแล้วจึงนำไปผสมกับน้ำยาสกัดแล้วจึงนำไปเหวี่ยงเพื่อแยกสารสกัดออกมา

โดยสรุปคือ การทดลองการจำแนกพันธุ์บัวโดยการวิเคราะห์ไอโซไซม์นี้สามารถนำไปใช้ในการจำแนกพันธุ์ได้ดีในระดับหนึ่ง โดยเฉพาะพืชกลุ่มที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น polyploid เพราะสามารถแสดงแถบไอโซไซม์ได้หลากหลายกว่าพืชที่เป็น diploid (Chase and Olmstead, 1988: Online) และยังสามารถแสดงถึงรูปแบบที่หลากหลายของเอนไซม์ชนิดหนึ่งๆ ได้ ถึงแม้ว่าไม่สามารถจำแนกได้ถึงระดับความแตกต่างภายในพันธุ์เดียวกัน แต่สามารถนำไปใช้แก้ปัญหาความสับสนในการเรียกชื่อพันธุ์ในกรณีที่ปลูกต่างที่กันได้ โดยบางระบบเอนไซม์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการแบ่งกลุ่มบัว และยังสามารถนำเทคนิคนี้ไปใช้ในการตรวจสอบลูกผสมที่ทราบพ่อแม่พันธุ์เพื่อยืนยันการมีหรือไม่มีลักษณะที่ได้จากพ่อหรือแม่จริง นอกจากนั้นยังเป็นประโยชน์ในการเริ่มต้นการศึกษาทางด้านชีวโมเลกุลของอุบลชาติสำหรับผู้ที่สนใจในด้านนี้อีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved