บทที่ 5

การใช้วิธีการทางอิเลคโตรโฟรีซีสในการตรวจสอบลูกผสมชั่วที่ 1

การตรวจสอบลูกผสมชั่วที่ 1 ของมะเขือเทศ โดยใช้วิธีการทางอิเลคโตรโฟรีซีสนั้นเป็นวิธีการหนึ่งที่สะดวกและรวดเร็ว โดยทั่ว ๆ ไปแล้วพืชต่างพันธุ์กันย่อมมีพันธุกรรมที่แตกต่างกันไป พันธุกรรมที่แตกต่างกันนี้มีผลทำให้ลักษณะทางสัญฐานวิทยา สรีรวิทยา และสารชีวเคมีภายในต้นพืชแตกต่างกันไปด้วย พืชที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมาก ๆ ย่อมจะมีลักษณะทางสัญฐานวิทยา สรีรวิทยาที่คล้ายคลึงกัน นอกจากนั้นสภาพแวดล้อมที่ปลูกยังมีผลต่อการแสดงออกของลักษณะต่าง ๆ เหล่านี้มาก มีผลทำให้การจำแนกพันธุ์มีโอกาสผิดพลาดได้ ดังนั้นในปัจจุบันนี้จึงได้มีการใช้วิธีการทางอิเลคโตรโฟรีซีสเข้ามาช่วยในการจำแนกพันธุ์หรือลูกผสมชั่วที่ 1 กันมากขึ้น ซึ่งในพืชบางชนิดก็ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ สารชีวเคมีที่นิยมศึกษากันในปัจจุบันนี้ ได้แก่ โปรตีน และเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น peroxidase esterase และ acid phosphatase เป็นต้น โปรตีนและเอนไซม์ต่าง ๆ เหล่านี้เป็นสารชีวโมเลกุลที่ถูกควบคุมโดยพันธุกรรมทั้งสิ้น ดังนั้นการพิจารณาจาก zymogram ที่เกิดขึ้นจึงสามารถใช้แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พืชได้เป็นอย่างดี เอนไซม์ esterase และ peroxidase เป็นเอนไซม์ที่ตรวจพบได้ในพืชทั่วๆ ไป และมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่อนข้างคงตัว ไม่ค่อยผันแปรได้ง่ายเหมือนเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ การใช้วิธีการทางอิเลคโตรโฟรีซีสเพื่อวิเคราะห์ isozyme ต่าง ๆ เหล่านี้ออกมาได้ จึงเป็นวิธีการที่ดีวิธีหนึ่งในการจำแนกพืชที่มีพันธุกรรมต่างกัน

วัตถุประสงค์ของการทดลองในครั้งนี้ก็เพื่อศึกษาถึงการใช้แถบของ peroxidase isozyme ตรวจสอบลูกผสมชั่วที่ 1 เมื่อเปรียบเทียบกับพันธุ์พ่อและแม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเตรียมเจล (polyacrylamide gel)

1.1 การเตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solution)

1.1.1 สารละลายเข้มข้นสำหรับเตรียม separating gel

1.1.1.1 สารละลายเข้มข้น A

นำ tris (hydroxymethyl) aminomethane จำนวน 36.60 กรัม และ N, N, N', N'-Tetramethylenediamine (TEMED) จำนวน 0.23 มิลลิลิตร ละลายในน้ำประมาณ 20-30 มิลลิลิตร เติม 1N HCl ลงไปประมาณ 20 มิลลิลิตร จะช่วยละลายได้ดีขึ้น ปรับ pH ให้ได้ 8.9 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 °ซ

1.1.1.2 สารละลายเข้มข้น C

นำ acrylamide จำนวน 28 กรัม และ Bis-acrylamide จำนวน 0.735 กรัม ละลายในน้ำประมาณ 20-30 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร กรอง ใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 °ซ

1.1.1.3 สารละลายเข้มข้น F

นำ ammoniumpersulphate จำนวน 0.14 กรัม ละลายในน้ำประมาณ 20-30 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง ถ้าจะเก็บไม่ควรเกิน 7 วันที่อุณหภูมิ 4-5 °ซ)

1.1.2 สารละลายเข้มข้นสำหรับเตรียม stacking gel

1.1.2.1 สารละลายเข้มข้น B

นำ tris (hydroxymethyl) aminomethane จำนวน 5.98 กรัม และ TEMED จำนวน 0.46 มิลลิลิตร ละลายในน้ำ 20-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

30 มิลลิลิตร เติม 1N HCl ลงไปประมาณ 20 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 6.7 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 °ซ

1.1.2.2 สารละลายเข้มข้น D

นำ acrylamide จำนวน 15 กรัม และ Bis-acrylamide จำนวน 2.5 กรัม ละลายในน้ำประมาณ 20-30 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร กรอง ใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 °ซ

1.1.2.3 สารละลายเข้มข้น E

นำ riboflavin จำนวน 4 มิลลิกรัม ละลายในน้ำประมาณ 20-30 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 °ซ

1.1.2.4 สารละลายน้ำตาล 40%

นำ saccharose จำนวน 40 กรัม ละลายในน้ำ 30-50 มิลลิลิตร เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร กรอง เก็บไว้ในตู้เย็น

1.2 การเตรียมเจลแบบ rod

1.2.1 เตรียมหลอดแก้วขนาด 0.7x7.5 เซนติเมตร มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.5 เซนติเมตร ปิดปลายหลอดข้างหนึ่งด้วยแผ่น parafilm วางไว้บนแท่นสำหรับเตรียมเจล

1.2.2 นำสารละลายเข้มข้น A:C:น้ำ:F ผสมกันในอัตราส่วน 1:2:1:4 นำไปไล่อากาศออกนานประมาณ 1-2 นาที ใช้ pasture pipette ดูดใส่ในหลอดแก้วที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2.1 (ระวังอย่าให้ฟองอากาศเกิดขึ้นในหลอดเจล) ให้สูงขึ้นมา 6 เซนติเมตร (การนำเจลใส่หลอดนี้ควรใช้เวลาไม่เกิน 5 นาที มิฉะนั้นเจลจะแข็งตัวก่อน) ดูดน้ำกลั่นหยดลงไปบนผิวหน้าเจลอย่างช้า ๆ ให้สูงเหนือเจลขึ้นมา 2-3 มิลลิเมตรหลังจากที่บรรจุเจลเสร็จเพื่อให้หน้าเจลเรียบ ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวอย่างสมบูรณ์ประมาณ 90 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ) เจลที่เตรียมได้นี้เราเรียกว่า separating gel หรือ running gel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.3 นำสารละลาย B:D:E:น้ำตาล 40% ผสมกันในอัตราส่วน 1:2:1:4 (เตรียมหลังจากเตรียม separating gel แล้วประมาณ 90 นาที) นำไปไล่อากาศออกนานประมาณ 1-2 นาที สะบัดน้ำกลั่นที่อยู่บน separating gel ออกให้หมด ล้างหน้าเจลด้วยสารละลายที่เตรียมไว้ 1-2 ครั้ง แล้วใส่สารละลายที่เตรียมไว้นี้ลงไปบน separating gel ให้สูงขึ้นมา 1 เซนติเมตรหยอดน้ำกลั่นลงไปช้า ๆ ให้สูงขึ้นมาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร เพื่อให้หน้าเจลเรียบ ทิ้งไว้ภายใต้แสง fluorescence ประมาณ 8 ชั่วโมง เจลที่เตรียมได้ในชั้นนี้เราเรียกว่า stacking gel เมื่อครบกำหนดแล้วสะบัดเอาน้ำกลั่นออก เก็บหลอดเจลที่เตรียมได้ไว้ในตู้เย็น เพื่อรออิเลคโตรโฟรีซีสต่อไป

2. การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดเอนไซม์

นำกล้ามะเขือเทศที่มีอายุ 7 วัน จำนวนตัวอย่างละ 3 กรัม มาแช่แข็งที่อุณหภูมิประมาณ -40 °ซ เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาบดกับทรายที่ล้างด้วยกรดด้วยโกร่งที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -40 °ซ เติม tris-buffer 0.1 M pH 8 ลงไป 5 มิลลิลิตร บดให้เข้ากัน กรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น นำไปเหวี่ยงที่ 28,000 g เป็นเวลา 30 นาที นำน้ำใสที่อยู่ด้านบน (supernatant) ใส่ขวด vial ที่มี glycerine อยู่ 0.1 มิลลิลิตร (การใส่ glycerine นี้จะช่วยรักษาสภาพของเอนไซม์ไม่ให้เกาะกันเป็นก้อน) เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ในตู้แช่แข็งประมาณ -20 °ซ เพื่อรออิเลคโตรโฟรีซีสต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>หมายเหตุ</u> การเตรียม tris-buffer 0.1 M pH 8.2

นำ 0.1 M tris- (hydroxymethyl) aminomethane จำนวน 50 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.1 M HCl จำนวน 21.9 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.2 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาในตู้เย็น

3. การแยกเอนไซม์ด้วยเครื่องอิเลคโตรโฟรีซีส

3.1 นำหลอดเจลที่เตรียมไว้ออกมา ดึง parafilm ที่อยู่ด้านล่างทิ้งไป ล้างหน้าเจลด้วย electrode buffer pH 8.3 4-5 ครั้ง

3.2 เท electrode buffer ลงไปใน lower chamber ให้ต่ำกว่าพื้นล่างของ upper chamber เล็กน้อย

3.3 ติดตั้งหลอดเจลเข้ากับช่อง upper chamber โดยยึดตัวหลอดให้ตรง และติดแน่นด้วย silicone rubber ดันหลอดเจลลงไปให้ต่ำกว่าขอบบนของ upper chamber ประมาณ 2-3 เซนติเมตร ติดตั้ง upper chamber ลงใน lower chamber ให้เรียบร้อย

3.4 เปิดมอเตอร์เพื่อสูบ electrode buffer จาก lower chamber ให้ขึ้นมาบน upper chamber จนท่วมหลอดเจล โดยให้ electrode buffer อยู่เหนือเจลประมาณ 2 เซนติเมตร

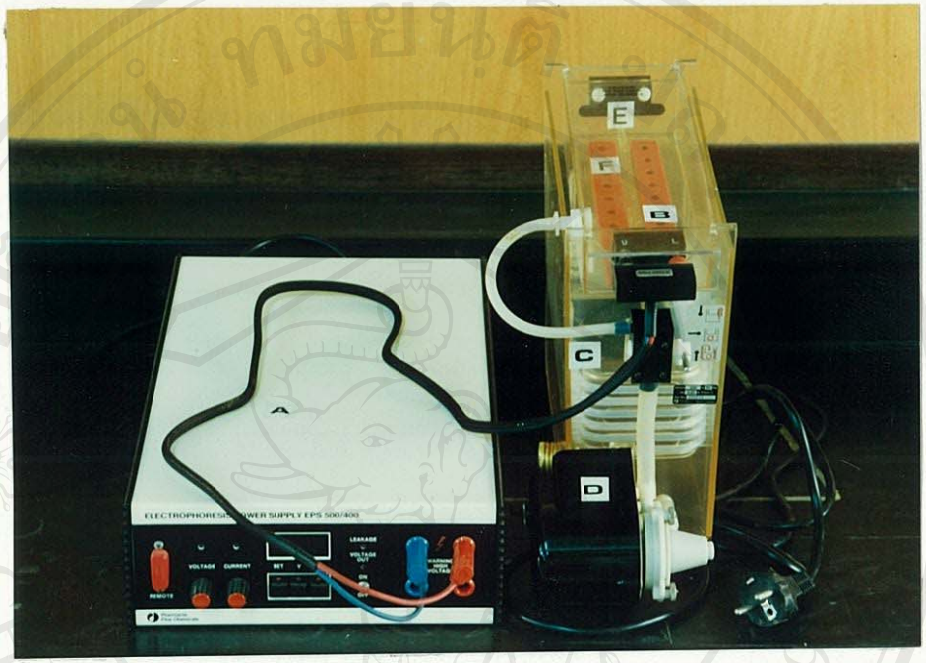
3.5 ตรวจสอบว่ามีการรั่วของ electrode buffer จาก upper chamber ลงไปหรือไม่ ถ้าไม่มีรอยรั่ว เท electrode buffer ลงไปใน lower chamber ให้ electrode buffer อยู่ประมาณกึ่งกลางของหลอดเจล

3.6 ไล่ฟองอากาศที่ก้นหลอดและบนหลอดของเจลออกให้หมด

3.7 ปิดฝา upper chamber โดยให้ upper electrode เป็นขั้วลบ และ lower electrode เป็นขั้วบวกเมื่อต่อกับ power supply (ภาพที่ 28)

3.8 เดินเครื่อง (prerum) โดยใช้กระแสไฟ 120 โวลล์ 3 มิลลิแอมแปร์ต่อหลอด นานประมาณ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4-5 °ซ ปิดเครื่อง เปิดฝา upper chamber ออก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 28 แสดงถึงส่วนประกอบที่สำคัญของเครื่องอิเลคโตรโฟรีซีส
(A = power supply, B = upper chamber lid,
C = lower chamber, D = motor and pump,
E = upper chamber, F = silicone rubber)

3.9 ใส่ตัวอย่างที่จะทำการศึกษาลงไปในหลอดเจลด้านบน จำนวนตัวอย่างละ 30 ไมโครลิตรต่อหลอด จากนั้นหยด bromphenol blue 0.02% ในน้ำตาล 10% ลงไป 1-2 หยด

3.10 ปิดฝา upper chamber และเดินเครื่องโดยใช้กระแสไฟฟ้าเท่าเดิม ที่อุณหภูมิ 4-5 °ซ จนกระทั่งสีน้ำเงินของ bromphenol อยู่ห่างจากขอบล่างของหลอดเจลประมาณ 1 เซนติเมตร

3.11 ปิดเครื่อง นำหลอดเจลออกมาจาก upper chamber ใช้ syring ขนาดใหญ่ฉีดน้ำไล่ให้เจลหลุดออกมาจากหลอด

3.12 นำไปย้อมสีโดยวิธีการตรวจจับเอนไซม์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมายเหตุ การเตรียม electrode buffer pH 8.3

นำ tris (hydroxymethyl) aminomethane จำนวน 6 กรัม และ glycine จำนวน 28.8 กรัม ละลายในน้ำประมาณ 200 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.3 ด้วย 1 N HCl หรือ 1 N NaOH เติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร ใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็น เวลาใช้แบ่งส่วนออกมาเจือจาง 10 เท่า

4. การตรวจจับเอนไซม์ peroxidase

การตรวจจับเอนไซม์ peroxidase จะใช้ H_2O_2 เป็น substrate และย้อมสีของปฏิกิริยา (enzyme-substrate reaction) ด้วย 3-amino-9-ethylcarbazole กับ β-naphthal ซึ่งมีวิธีการ ดังนี้

4.1 การเตรียมสารละลายเข้มข้น

สารละลายเข้มข้น A

3-amino-9-ethylcarbazole	420	มิลลิกรัม
β-naphthal	290	มิลลิกรัม
Acetone	200	มิลลิลิตร

ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็น

สารละลายเข้มข้น B

Tris (hydroxymethyl) aminomethane	3.78	กรัม
Acetic acid	4.05	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันเติมน้ำลงไปประมาณ 2 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 4.0 ด้วย 1 N HCl หรือ 1 N NaOH เติมน้ำให้ครบ 2.5 ลิตร ใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็น

สารละลายเข้มข้น C

H_2O_2 30%	10	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	100	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำสารละลายเข้มข้น A:B:C ผสมกันในอัตราส่วน 20:80:1 เทใส่หลอดฝาเกลียวขนาด 100x13 มิลลิเมตร ไม่น้อยกว่า 3 ใน 4 ของหลอด (ควรเตรียมก่อนหมดเวลาของขบวนการแยกเอนไซม์ประมาณ 15 นาที)

4.2 นำแท่งเจลที่ผ่านขบวนการแยกเอนไซม์แล้ว ใส่ลงไปในหลอดฝาเกลียวที่เตรียมไว้ในข้อ 4.1 ปล่อยทิ้งไว้ในที่มืด ณ อุณหภูมิห้องประมาณ 20-30 นาที หรือจนกว่าสีจะชัดตามต้องการ

4.2 นำเจลออกล้างน้ำสะอาด 2-3 ครั้ง

4.3 เก็บเจลไว้ใน glycerine 10% ใน acetic acid 7% ประมาณ 12-24 ชั่วโมง แล้วจึงอ่านผล

5. การอ่านผล

5.1 ทำการถ่ายภาพ

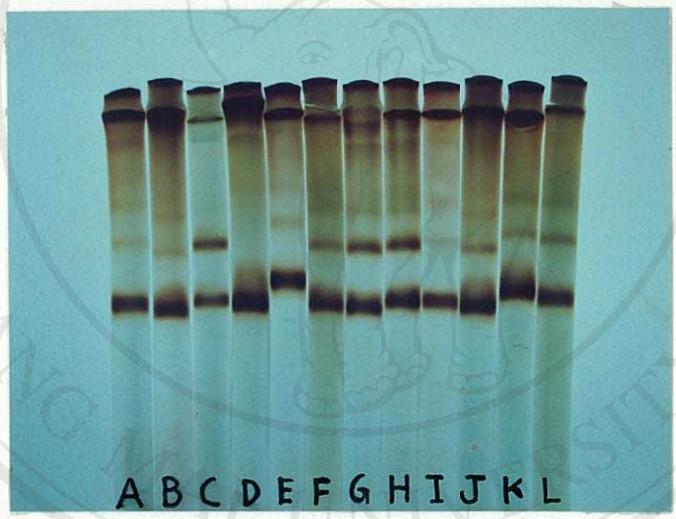
5.2 เขียนรูปแบบของแถบที่เกิดขึ้นบนแท่งเจล ตามความเข้มของแถบสี และระยะที่แถบสีของเอนไซม์เคลื่อนที่ไปจากจุดเริ่มต้น

ผลการทดลอง

จากการศึกษาถึงรูปแบบของ peroxidase isozyme ของมะเขือเทศพันธุ์พ่อแม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 24 พันธุ์ (ภาพที่ 29 และภาพที่ 30) ในครั้งนี้ พบว่า มีแถบรวมทั้งหมด 8 แถบด้วยกัน (ภาพที่ 31z) โดยแถบที่ 1 2 3 4 5 6 7 และ 8 มีการเคลื่อนออกจากจุดเริ่มต้น (ขั้วลบ) ประมาณ 0.3 0.5 0.9 1.5 1.9 3.0 3.2 และ 3.5 เซนติเมตร ตามลำดับ จากภาพที่ 31 จะเห็นได้ว่ามะเขือเทศทุกพันธุ์จะมีแถบที่ 4 และแถบที่ 6 พันธุ์ nor_2(D) และลูกผสม L_{22}x nor_2(X) พบว่าไม่มีแถบที่ 5 ส่วนลูกผสม #607 x nor_1(S) พบว่ามีแถบที่ 7 และ 8 เกิดขึ้นเพียงคู่เดียว ขณะที่พันธุ์และลูกผสมคู่อื่น ๆ ไม่พบเลย จากการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ศึกษาครั้งนี้สามารถเขียนจำนวนแถบและหมายเลขแถบของมะเขือเทศแต่ละพันธุ์หรือแต่ละคู่ผสมได้ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 15



ภาพที่ 29 แสดงการเปรียบเทียบแถบของ peroxidase isozyme ที่เกิดขึ้นบนแท่งเจลของมะเขือเทศ จำนวน 12 พันธุ์ (A-L หมายถึงตัวอักษรที่ใช้แทนชื่อพันธุ์หรือลูกผสมดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 15)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>ภาพที่ 30</u> แสดงการเปรียบเทียบแถบของ peroxidase isozyme ที่เกิดขึ้นบนแท่งเจลของมะเขือเทศ จำนวน 12 พันธุ์ (M-X หมายถึงตัวอักษรที่ใช้แทนชื่อพันธุ์หรือลูกผสมดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 15)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพที่ 31 แสดงการเปรียบเทียบรูปแบบของ peroxidase isozyme ของมะเขือเทศจำนวน 24 พันธุ์ (A-X) และรูปแบบมาตรฐานร่วม (Z)

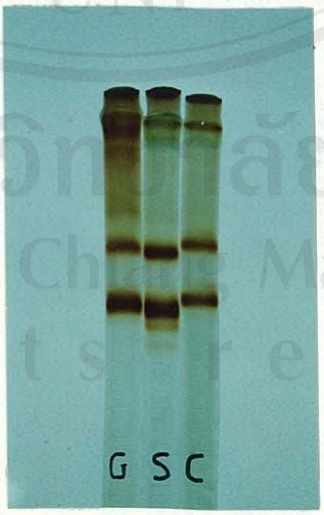
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 15 แสดงถึงจำนวนแถบและหมายเลขแถบ peroxidase isozyme ของมะเขือเทศ

พันธุ์หรือลูกผสม	(ตัวอักษรที่ใช้แทนชื่อ)	จำนวนแถบที่เกิดขึ้น	หมายเลขแถบ
alc	(A)	5	6,5,4,3,2
rin	(B)	4	6,5,4,3
nor1	(C)	3	6,5,4
nor2	(D)	3	6,4,2
#598	(E)	3	6,5,4
#605	(F)	3	6,5,4
#607	(G)	5	6,5,4,2,1
L22	(H)	4	6,5,4,2
# 598 x alc	(I)	5	6,5,4,3,2
# 598 x rin	(J)	4	6,5,4,3
# 598 x nor1	(K)	3	6,5,4
# 598 x nor2	(L)	5	6,5,4,3,2
# 605 x alc	(M)	5	6,5,4,3,2
# 605 x rin	(N)	4	6,5,4,3
# 605 x nor1	(O)	3	6,5,4
# 605 x nor2	(P)	5	6,5,4,3,2
# 607 x alc	(Q)	6	6,5,4,3,2,1
# 607 x rin	(R)	6	6,5,4,3,2,1
# 607 x nor1	(S)	6	8,7,6,5,4,1
# 607 x nor2	(T)	6	6,5,4,3,2,1
L22 x alc	(U)	5	6,5,4,3,2
L22 x rin	(V)	5	6,5,4,3,2
L22 x nor1	(W)	4	6,5,4,2
L22 x nor2	(X)	3	6,4,2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากตารางที่ 15 จะเห็นได้ว่าลูกผสมส่วนใหญ่จะมีจำนวนแถบและหมายเลขแถบของ peroxidase isozyme แตกต่างกับพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่อยู่ถึง 7 คู่ คือ ลูกผสม #598 x nor_2 (L) #605 x nor_2(P) #607 x alc(Q) #607 x rin(R) #607 x nor_1(S) #607 x nor_2(T) และ L_{22} x rin (V) ส่วนลูกผสมคู่อื่น ๆ ส่วนใหญ่จะมีจำนวนแถบและหมายเลขแถบของ peroxidase isozyme แตกต่างกับพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ อย่างเช่น ลูกผสม #598 x alc(I) และลูกผสม #605 x rin(N) จะมีจำนวนแถบหรือหมายเลขแถบแตกต่างกับพันธุ์แม่แต่จะเหมือนกับพันธุ์พ่อ ขณะที่ลูกผสม L_{22} x nor_1(W) มีจำนวนแถบหรือหมายเลขแถบแตกต่างกับพันธุ์พ่อ แต่เหมือนกับพันธุ์แม่เป็นต้น มีลูกผสมเพียง 2 คู่เท่านั้น ที่มีจำนวนแถบและหมายเลขแถบของ peroxidase isozyme เหมือนกับพันธุ์พ่อและแม่คือลูกผสม #598 x nor_1 (K) และ #605 x nor_1(O) จากผลการทดลองในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าลูกผสมส่วนใหญ่จะมีแถบ peroxidase isozyme รวมกันระหว่างพันธุ์พ่อแม่ อย่างเช่นพันธุ์ L_{22}(H) มีหมายเลขแถบเป็น 6,5,4,2 พันธุ์ rin(B) มีหมายเลขแถบเป็น 6,5,4,3 ลูกผสมของ L_{22} x rin(V) มีหมายเลขแถบเป็น 6,5,4,3,2 เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามก็ไม่ได้เกิดขึ้นทั้งหมดทุกกรณี ทั้งนี้เนื่องจากมีลูกผสมบางคู่มีการสูญหายของแถบหรือมีการสร้างแถบใหม่ นอกเหนือไปจากพันธุ์พ่อและแม่ได้ อย่างเช่น ลูกผสม #607 x nor_1(S) จะมีแถบที่ 2 ของพันธุ์แม่หายไปและสามารถสร้างแถบที่ 7 และแถบที่ 8 ขึ้นมาใหม่ได้ ดังที่แสดงไว้ในภาพที่ 32 เป็นต้น



<u>ภาพที่ 32</u> แสดงถึงความแตกต่างของแถบ peroxidase isozyme ที่เกิดขึ้นในลูกผสม #607 x nor_1(S) กับพันธุ์ #607(G) และพันธุ์ nor_1(C)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 15) จะเห็นว่าลูกผสมส่วนใหญ่จะมีจำนวนแถบรวมกันของพันธุ์พ่อแม่ ดังนั้นถ้าพันธุ์พ่อแม่มีแถบเหมือนกันลูกผสมก็มีแนวโน้มที่จะมีแถบเหมือนกับพันธุ์พ่อแม่ด้วย อย่างเช่น ลูกผสม #598 x nor_1(K) เป็นต้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าลักษณะนี้เป็นลักษณะที่ควบคุมโดยยีนและมีการแสดงออกได้ตามปกติ แต่อย่างไรก็ตามก็ยังมีลูกผสมบางคู่ที่มีแถบของพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ขาดหายไปบ้างอย่างเช่น ลูกผสม L_{zz} x nor_2(X) มีแถบที่ 5 ของพันธุ์ L_{zz}(H) ขาดหายไป และบางคู่ผสม อย่างเช่น #598 x nor_2(L) มีแถบที่ 3 เพิ่มขึ้นมา ลูกผสม #607 x nor_1(S) มีแถบที่ 7 และแถบที่ 8 เพิ่มขึ้นมาทั้ง ๆ ที่ทั้ง 2 แถบนี้ไม่มีอยู่ในพันธุ์พ่อแม่เลย การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างในการแสดงออกของยีนที่มีอยู่ในลูกผสมกับยีนที่อยู่ในพันธุ์พ่อแม่ ดังรายงานของ Huang et al (1985) จึงมีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของโมเลกุล หรือความสามารถในการเป็นประจุไฟฟ้าแตกต่างกันไปมีผลทำให้มีอัตราการเคลื่อนที่แตกต่างกันไปด้วย จากผลการทดลองในครั้งนี้จะไปสอดคล้องกับงานทดลองของ Baralieva and Khristova (1984) ที่ว่าลูกผสมบางคู่สามารถใช้แถบของ peroxidase isozyme แยกออกจากพันธุ์พ่อและแม่ได้ และบางคู่ผสมก็ไม่สามารถใช้จำแนกลูกผสมออกจากพ่อแม่ได้ แต่จะไปขัดแย้งกับงานทดลองของ Wang et al (1983) ที่พบว่าแถบของ peroxidase isozyme ของมะเขือเทศลูกผสมแตกต่างกับพันธุ์พ่อแม่ทั้งหมด อย่างไรก็ตามการที่จะเปรียบเทียบว่าแตกต่างกันได้ทั้งหมดหรือไม่นั้น ก็ขึ้นอยู่กับจำนวนของลูกผสมที่ทำการเปรียบเทียบในแต่ละครั้งด้วยว่ามีมากน้อยเท่าไร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปผลการทดลอง

จากการใช้วิธีการทางอิเลคโตรโฟรีซีส โดยการใช้แถบของ peroxidase isozyme เป็นหลักในการจำแนกมะเขือเทศลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 16 คู่ ออกจากพันธุ์พ่อแม่นั้น สามารถจำแนกลูกผสมออกจากพันธุ์พ่อและแม่ได้ถึง 7 คู่ จำแนกลูกผสมออกจากพันธุ์พ่อหรือพันธุ์แม่ได้ถึง 7 คู่ และไม่สามารถจำแนกลูกผสมออกจากพันธุ์พ่อหรือแม่ได้เลย 2 คู่ ถึงแม้ว่าวิธีการนี้จะไม่สามารถใช้จำแนกลูกผสมออกจากพันธุ์พ่อและแม่ได้ทั้งหมดก็ตาม แต่วิธีการนี้ก็สามารถใช้เป็นเครื่องช่วยในการจำแนกลูกผสมบางคู่ออกจากพันธุ์พ่อและแม่ได้วิธีการหนึ่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved