บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การใช้สารสกัดเอนไซม์ของใบรองเท้านารี พบว่า การใช้น้ำยาสกัดที่ประกอบด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA, 1 % w/v PVP-360, 2 mM DTT, 10 mM β-mercaptoethanol ให้ผลดีกว่าการใช้ 0.1 M Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0.5 % w/v PVP-10, 2 mM DTT, 10 mM β-mercaptoethanol สาเหตุหนึ่งอาจเป็นผลของ PVP ที่ใช้ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน และเมื่อนำน้ำยาสกัดมาศึกษา pH ที่เหมาะสมพบว่าที่ pH 7 ให้แถบสีได้ดีที่สุด ดังที่อาภัสสรา (2537) ได้อธิบายไว้ว่า น้ำยาสกัดที่มี pH เหมาะสมทำให้เอนไซม์มีความเสถียรมากที่สุด แถบสีที่เกิดขึ้นจึงมีความคมชัด ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับรายงานของ Durham *et al.* (1987) ที่ใช้สารสกัดที่มี pH 7 ในการศึกษาเอนไซม์ MDH, DIA, IDH, PGM และ PGI ในต้นท้อ และเช่นเดียวกับ Marquard (1987) ที่ใช้สารสกัด pH 7 ในการศึกษาไอโซไซม์ PGI และ MDH ในต้น Pecan

ในส่วนของเนื้อเยื่อที่นำมาใช้ในการสกัดเอนไซม์ พบว่า การใช้ใบอ่อนให้ความคมชัดของแถบสีดีกว่าการใช้ดอกอ่อน ดอก ใบแก่ และรากตามลำดับ ตามที่ Wendel and Weeden (1989) กล่าวว่า ใบอ่อนเป็นส่วนที่กำลังมีการเจริญเติบโต ทำให้ใบอ่อนเป็นส่วนของพืชที่มีกิจกรรมของเอนไซม์หลักสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Soltis *et al.* (1987) ที่ใช้ใบอ่อนจากต้นที่โตเต็มที่เพราะให้แถบสีที่คมชัดที่สุดใน *Tillandsia ionantha* และ *T. recurvata* (Bromeliaceae) ในทำนองเดียวกัน Al-Jibouri and Adham (1990) ใช้ใบอ่อนของต้นอินทผาลัมตัวผู้ในการสกัดเอนไซม์ และ Mowrey *et al.* (1990) ใช้ใบอ่อนของต้นท้อ

สำหรับปริมาณชิ้นส่วนของเนื้อเยื่อรองเท้านารีที่ 0.5 กรัม ให้ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ เป็นไปในทำนองเดียวกับ Parfitt and Arulsekar (1989) ซึ่งรายงานว่าใช้ใบอ่อนหนัก 0.5 กรัม ในการศึกษาไอโซไซม์ในองุ่น 145 สายพันธุ์ Byrne and Littleton (1988) ก็ใช้ใบอ่อนประมาณ 0.5 กรัม ในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ใน Plum สายพันธุ์ญี่ปุ่น และ Kumar *et al.* (1995) ใช้ใบ 0.5 กรัมในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ในต้น Ber (*Zizyphus mauritiana* Lamk.) การใช้น้ำหนักของใบน้อยลงครึ่งหนึ่งทำให้เกิดแถบสีไม่เข้มเป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับซับสเตรทน้อย และการที่เพิ่มประมาณของเนื้อเยื่อใบทำให้เกิดปื้นสี น่าจะเป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์มีมากเกินไป และ/หรือ มีสาร phenol complex ปนมากับเนื้อเยื่อมากไป

เปอร์เซ็นต์ของ separating gel ที่ใช้มีผลต่อค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของไอโซไซม์โดยเมื่อมีความเข้มข้นมากค่าเคลื่อนที่สัมพัทธ์จะลดลงเสมอ และการใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับพืชที่ทำการศึกษาจะทำให้ได้รูปแบบแถบสีที่คมชัด และลดรอยปื้นของสีได้ระดับหนึ่ง

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกล้วยไม้รองเท้านารี ทำให้สามารถแยกกล้วยไม้รองเท้านารีออกเป็นชนิดต่างๆได้โดยที่แต่ละชนิดมีลักษณะที่จำเพาะเจาะจง ไม่ว่ารูปทรงของกลีบนอกบน (dorsal sepal) ตลอดจนแต้มสี หรือลายเส้น ลักษณะกลีบดอก (petal) ตลอดจนรูปทรง และสีสันของกระเป๋า หรือหัวรองเท้า (pouch) รวมไปถึงลักษณะรูปทรง และสีสันของใบด้วย ตามที่ Cribb (1987) ได้อธิบายไว้ แต่ในกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดเดียวกันยังพบความหลากหลายในรายละเอียดของลักษณะต่างๆ ในแง่ของสีสัน และแต้มสีบนกลีบนอกบน กลีบดอก และกระเป๋าด้วย ลักษณะสัณฐานวิทยาที่หลากหลายภายในชนิดเดียวกันบางครั้งแสดงให้เห็นได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่แสดงออกด้วยรูปแบบแถบสีของไอโซไซม์ที่มีแถบบางๆเพิ่มขึ้นหรือลดลง โดยภาพรวมผลที่เห็นได้ทางสัณฐานวิทยามีความสัมพันธ์กับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ไอโซไซม์ด้วย กล่าวคือเอนไซม์ต่างๆที่ใช้สามารถสร้างรูปแบบแถบสีหลักของไอโซไซม์ที่มีความจำเพาะเป็นเอกลักษณ์ของชนิดนั้นๆ แต่มีบางกรณีที่จำนวนและรูปแบบแถบสีซ้ำกันทำให้ส่วนใหญ่ไม่แสดงความจำเพาะระหว่างชนิด เช่น เอนไซม์ GOT และ SKD และเอนไซม์บางชนิดยังสามารถแสดงความแตกต่างระหว่างสายต้น (clone) ได้ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง EST

จากการวิเคราะห์เอนไซม์ โดยวิธีโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส พบว่ามีเอนไซม์ 6 ชนิด ที่แสดงรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกัน คือ EST, GOT, LAP, MDH, SKD และ SOD โดย EST สามารถจำแนกตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารี 11 ชนิด ที่ทำการศึกษาได้มากที่สุด คือ 24 กลุ่ม ส่วน GOT, LAP, MDH, SKD และ SOD จำแนกได้ 16, 11, 11, 12 และ 13 กลุ่ม ที่ค่าความแตกต่าง 5 % ตามลำดับ การที่เอนไซม์ EST สามารถจำแนกกลุ่มได้มากที่สุดเป็นเพราะว่า EST เป็น non-specific enzyme ทำให้เกิด polymorphic bands มากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น ทำให้เกิดตำแหน่งของแถบสีจำนวนมาก (ชวนพิศ, 2538) ในขณะที่ MDH มีศักยภาพในการจำแนกชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารี ซึ่งเห็นได้จากผลการทดลองที่ 3.4 ที่รูปแบบแถบสีมีความจำเพาะต่อชนิดของรองเท้านารี ได้แก่ *P. bellatulum*, *P. callosum*, *P. exul*, *P. hirsutissimum* และ *P. parishii* เป็นต้น และยังสามารถจำแนกชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีที่ทำการศึกษาได้มากที่สุด คือ 8 ชนิด ที่ค่าความแตกต่าง 2 % จากทั้งหมด 11 ชนิด ส่วน GOT จำแนกได้ 7 ชนิด ที่ค่าความแตกต่าง 3 % SOD จำแนกได้ 7 ชนิด ที่ค่าความแตกต่าง 3 % LAP จำแนกได้ 4 ชนิด ที่ค่าความแตกต่าง 3 % SKD จำแนกได้ 3 ชนิด ที่ค่าความแตกต่าง 3 % และ EST จำแนกได้ 5 ชนิด ที่ค่าความแตกต่าง 7.5 % เมื่อนำเอนไซม์ทั้ง 6 ชนิดมาวิเคราะห์ร่วมกัน พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มได้ทั้งหมด 31 กลุ่ม และเมื่อพิจารณาค่าความ

แตกต่างที่ 17.5 % (ภาพ 35) สามารถจำแนกตัวอย่างทั้งหมดได้ 11 กลุ่ม (ในการศึกษาครั้งนี้รวม *P.* x *ang-thong* ด้วย) ตามชนิดของกล้วยไม้ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการแบ่งชนิดโดย Cribb (1987)

จากที่กล่าวมาเห็นได้ว่ามีเอนไซม์หลายระบบสามารถจัดกลุ่มชนิดของรองเท้านารีได้เมื่อใช้ค่าความแตกต่างน้อย แสดงให้เห็นว่ากล้วยไม้รองเท้านารีที่นำมาศึกษามีความแปรปรวนภายในชนิดไม่มากนัก บางชนิดถึงแม้จะถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม แต่มีระยะความห่างไกลทางพันธุกรรม (different distance)ต่ำ และเมื่อพิจารณาแถบสีเห็นได้ชัดว่าต่างกันเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าภายในกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดเดียวกันที่มีรายละเอียดต่างกันจะมีโปรตีนที่คล้ายๆกัน

กล้วยไม้รองเท้านารีถึงแม้จะมีความแปรปรวนของลักษณะทางสัณฐานวิทยาสูง แต่จากผลการทดลองที่ 3 พบว่ามีหลายชนิดสามารถใช้ไอโซไซม์เป็นเครื่องหมายในการจำแนกชนิดได้ และเมื่อวิเคราะห์ไอโซไซม์ทั้งหมดร่วมกันสามารถจำแนกชนิดของกล้วยไม้รองเท้านารีที่ทำการศึกษาได้ทั้งหมด การจำแนกกลุ่มชัดเจน และสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการทดลองนี้พอสรุปได้ว่า การใช้ไอโซไซม์จำแนกชนิดรองเท้านารีควรใช้เอนไซม์ที่แสดงรูปแบบแถบสีหลักที่เป็นเอกลักษณ์ของชนิดนั้นๆ โดยเปรียบเทียบร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่น เพื่อช่วยให้การจำแนกแม่นยำยิ่งขึ้น และหากใช้เอนไซม์หลายชนิดวิเคราะห์ร่วมกันอาจใช้ได้ทั้ง 2 แบบ คือ ใช้รูปแบบแถบสีทุกแถบสีที่ปรากฏ (แถบสีหลักและแถบสีที่แสดงความแตกต่างระหว่างสายต้น) จากทุกต้นที่ทำการศึกษา ซึ่งจะทำให้สามารถจำแนกชนิดออกจากกันได้ที่ค่าความห่างไกลทางพันธุกรรมสูงในการทดลองนี้ใช้ 17.5 % (ภาพ 35) หรือใช้เฉพาะแถบสีหลักของรูปแบบแถบสีของเอนไซม์ต่างๆมาวิเคราะห์ร่วมกันซึ่งวิธีนี้จะสามารถจำแนกชนิดได้เช่นกัน โดยการแบ่งกลุ่มที่ค่าความห่างไกลทางพันธุกรรมน้อย (ภาพ 36)

ในการทดลองนี้ได้ทดลองใช้เอนไซม์ 20 ชนิด แต่ที่สามารถใช้ในการจำแนกรองเท้านารีได้มี 6 ชนิด คือ EST, GOT, LAP, MDH, SKD และ SOD ซึ่งอาจยังไม่เพียงพอที่จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างชนิด ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม ทั้งในส่วนของเอนไซม์ ระบบบัฟเฟอร์ การสกัดไอโซไซม์ในออร์กาเนลล์ (organellar isozymes) เพราะระบบไอโซไซม์ส่วนใหญ่จะอยู่ใน cytosal คืออาจอยู่ในของเหลวภายในเซลล์หรืออยู่ติดกับเซลล์เมมเบรน Weeden (1983) รายงานว่าอาจพบไอโซไซม์ได้ในส่วนของเซลล์เดียวกัน (subcellular compartment) หรืออาจพบได้ในส่วนต่างๆ แต่อยู่ในเซลล์เดียวกัน หรืออาจพบได้ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างกัน หรือต่างระยะของการพัฒนาการ และไอโซไซม์ของพืชชั้นสูงค่อนข้างจะคงที่ในวิวัฒนาการ สามารถพบได้ทั่วไปในสปีชีส์ต่างๆ โดย cytosolic isozymes มักมีความแปรผันมากกว่าไอโซไซม์ในออร์กาเนลล์