

การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของกล้วยไม้ดินว่านจูงนาง

Isozyme Pattern Investigation of *Geodorum* spp.

อมรรัตน์ ทองแสน^{1/} จันทนา สุวรรณธาดา^{1,2/} และ พรรัตน์ ศิริคำ^{1,2/}
Amonrat Thongsan^{1/}, Chuntana Suwanthada^{1,2/} and Pornrat Sirikhum^{1,2/}

Abstract: Isozyme patterns of 7 ecotypes of *Geodorum* collected from Khun Mae Kuang National Reserved Forest were investigated via polyacrylamide gel electrophoresis technique using four enzyme systems, i.e. acid phosphatase, esterase, peroxidase and superoxide dismutase. Cluster analysis (UPGMA) of the band patterns could allocate 4 different groups of *Geodorum* relevant to 4 different ecotypes. Other 3 ecotypes could not be clearly separated since similarity, at the level of 20 %, occurred in some populations of different ecotypes.

Keywords: *Geodorum* spp., isozyme pattern

บทคัดย่อ: ศึกษาแบบไอโซไซม์ของกล้วยไม้ว่านจูงนางที่รวบรวมจากพื้นที่ในเขตป่าสงวนแห่งชาติขุนแม่งวง จำนวน 7 อีโคไทป์ ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยศึกษาในระบบเอนไซม์ 4 ระบบ คือ acid phosphatase, esterase, peroxidase และ superoxide dismutase แล้วนำแถบสีที่ปรากฏมาวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA cluster analysis เพื่อจัดกลุ่มตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม พบว่าสามารถจัดกลุ่มว่านจูงนางออกได้เป็น 4 กลุ่ม อย่างชัดเจนตามอีโคไทป์ แต่อีก 3 กลุ่มมีความใกล้ชิดกันของประชากรบางต้นในอีโคไทป์ที่ต่างกัน

คำสำคัญ: ว่านจูงนาง รูปแบบไอโซไซม์

^{1/}ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

^{2/}ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ 50220

^{1/}Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

^{2/}Huai Hong Khrai Royal Development Study Centre, Doi Saket, Chiang Mai 50220, Thailand

คำนำ

ว่านจูงนางเป็นกล้วยไม้ดินสกุล *Geodorum* พบในป่าผลัดใบ ป่าดงดิบ (สลิล และ นฤมล, 2545) ป่าผลัดใบขึ้นป่าดิบเขา (องค์การสวนพฤกษศาสตร์, 2543) และ ป่าดิบชื้นทั่วไปของประเทศไทย (อบจันท์, 2544) จากการสำรวจว่านจูงนางในพื้นที่ป่าสงวนแห่งชาติขุนแม่งวง พบว่ากล้วยไม้สกุลนี้มีความหลากหลาย ในลักษณะทางสัณฐานวิทยา นอกจากนี้ ศลิษา และคณะ (2548) ได้นำว่านจูงนางดังกล่าวจำนวน 2 อีโคไทป์ มาศึกษาในรูปแบบไอโซไซม์ด้วยวิธีโพลีอครีลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า วิธีการดังกล่าวสามารถแยกความแตกต่างของต้นพืชออกเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจน จึงน่าจะนำวิธีการดังกล่าวมาศึกษาในอีโคไทป์อื่น ๆ ที่มีความแตกต่างกันในลักษณะทางสัณฐานและพฤติกรรม การเจริญเติบโต เพื่อประโยชน์ในการใช้เป็นข้อมูลเสริมเพื่อการจำแนกชนิดและจำแนกพันธุ์ของกล้วยไม้ดินสกุลนี้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของกล้วยไม้ดินว่านจูงนางจำนวน 7 อีโคไทป์ คือ GE01, GE02, GE03, GE04, GE05, GE06 และ GE07 ซึ่งเป็นอีโคไทป์ที่ปลูกเลี้ยงไว้ในแปลงรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้ของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอฮอดยะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ โดยใช้เทคนิคโพลีอครีลาไมด์ เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ดัดแปลงโดย พลุ (2546) และเพิ่มพงษ์ (2531)

สกัดโปรตีนจากใบของพืชทดลองอีโคไทป์ละ 5 ต้น (1-5) ตันละ 0.5 กรัม สารสกัดประกอบด้วย Tris-HCl pH 7 0.2 โมล 3 มิลลิตร (มล.) EDTA 0.5 โมล 0.06 มล. polyvinylpyrrolidone-10 0.5 กรัม dithiothreitol 0.5 โมล 0.12 มล. และ β -mer-captoethanol 14.3 โมล 21 ไมโครลิตร

เอนไซม์ที่ใช้ทดสอบมี 4 ระบบ คือ acid phosphatase (ACP), esterase (EST), peroxidase

(POX) และ super-oxide dismutase (SOD) สีที่ใช้ย้อม คือ 0.05 M acetate buffer pH 4.8, fast garnet GBC disodium salt, disodium α -naphthyl acid phosphatase, 0.1 M phosphate-buffer pH 6.0, fast blue B salt, α -naphthyl acetate, 0.1 M Tris-buffer pH 4, 3-amino-9-ethylcarbazole, β -naphthol 3% H_2O_2 , 0.05 M sodium phosphate buffer pH 7.5, 4-nitro bluetetra- zoliumchloride, dithiothreitol, TEMED, และ riboflavin หาค่าระยะทางการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) จากเจลที่ย้อมสีแล้ว เขียนแผนภาพไซโมแกรม และวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างหาค่าความสัมพันธ์จากแถบสีด้วย UPGMA cluster analysis ตามวิธีการของ Jaccard's similarity coefficient โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการศึกษา

การศึกษารูปแบบไอโซไซม์จากระบบเอนไซม์ 4 ระบบ คือ ACP, EST, POX และ SOD ในกล้วยไม้ว่านจูงนาง 7 อีโคไทป์ 35 ตัวอย่าง พบว่ามีการแสดงออกของเอนไซม์ทั้ง 4 ระบบ อย่างชัดเจน โดย ACP แสดงรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกัน 24 รูปแบบ มีค่า Rf ระหว่าง 0.24-0.37 (ภาพที่ 1A) EST แสดง 23 รูปแบบมีค่า Rf ระหว่าง 0.27-0.78 (ภาพที่ 1B) POX แสดง 16 รูปแบบ มีค่า Rf ระหว่าง 0.03-0.46 (ภาพที่ 1C) และ SOD แสดง 26 รูปแบบ มีค่า Rf ระหว่าง 0.03-0.84 (ภาพที่ 1D)

เมื่อวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ทั้ง 4 ระบบ จัดกลุ่มการกระจายตัวตามการเกิดและไม่เกิดแถบสีแล้ว เขียนแผนภาพเดนโดรแกรม (ภาพที่ 2) พบว่าที่ค่าความคล้ายคลึงกัน 20 % สามารถแยกกลุ่มตัวอย่างพืชทดลองออกได้เป็นกลุ่มย่อย 8 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 GE04 (1-5) กลุ่มที่ 2 GE03 (1-5) กลุ่มที่ 3 GE02 (4-5) กลุ่มที่ 4 GE01 (1-5) และ GE02 (1-3) กลุ่มที่ 5 GE05 (1-5) และ GE06 (1) กลุ่มที่ 6 GE07 (1-5) กลุ่มที่ 7 GE06 (2-4) กลุ่มที่ 8 GE06 (5)

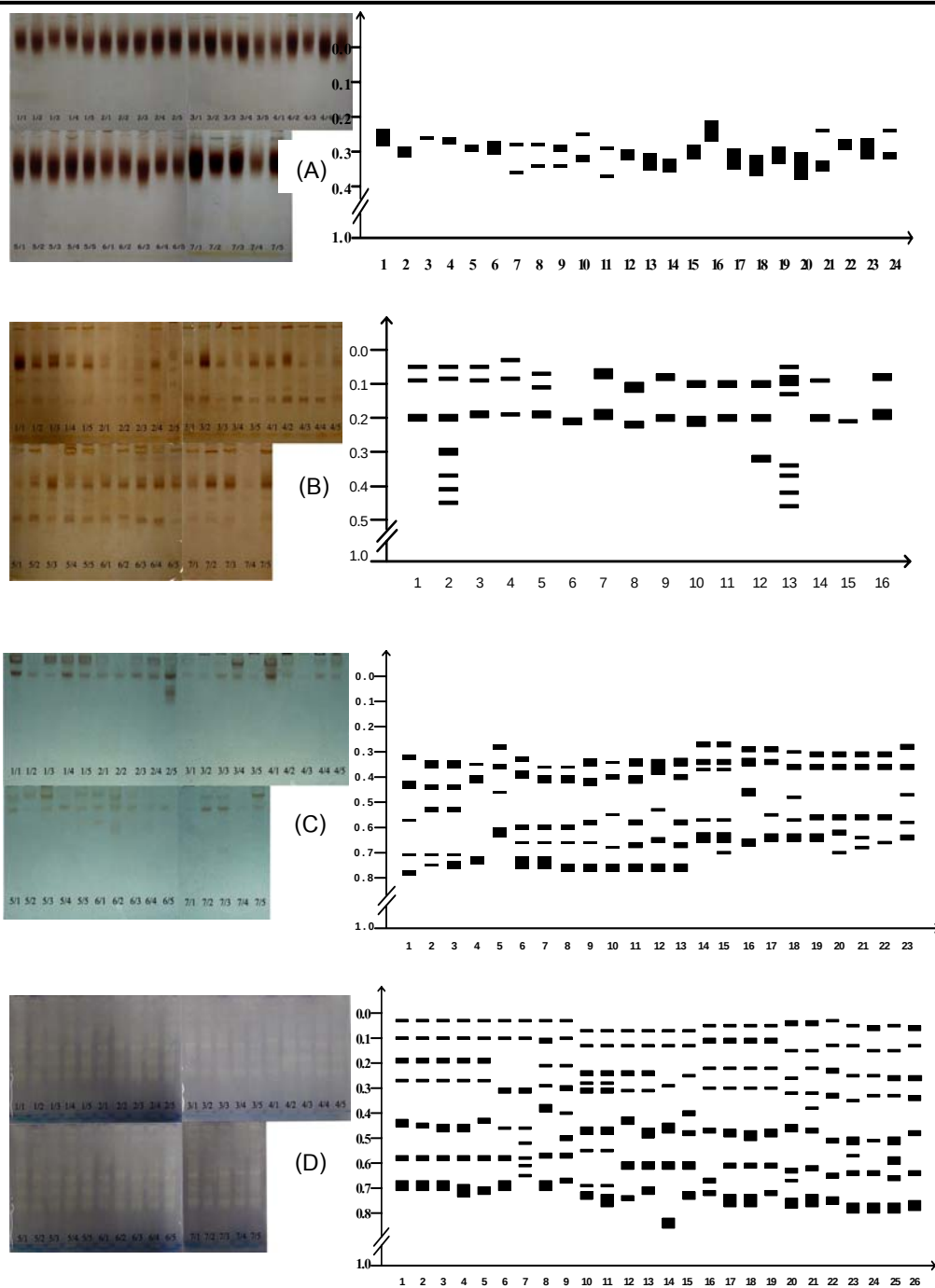


Figure 1 Banding patterns and zymograms of enzyme ACP (A), EST (B), POX (C) and SOD (D).

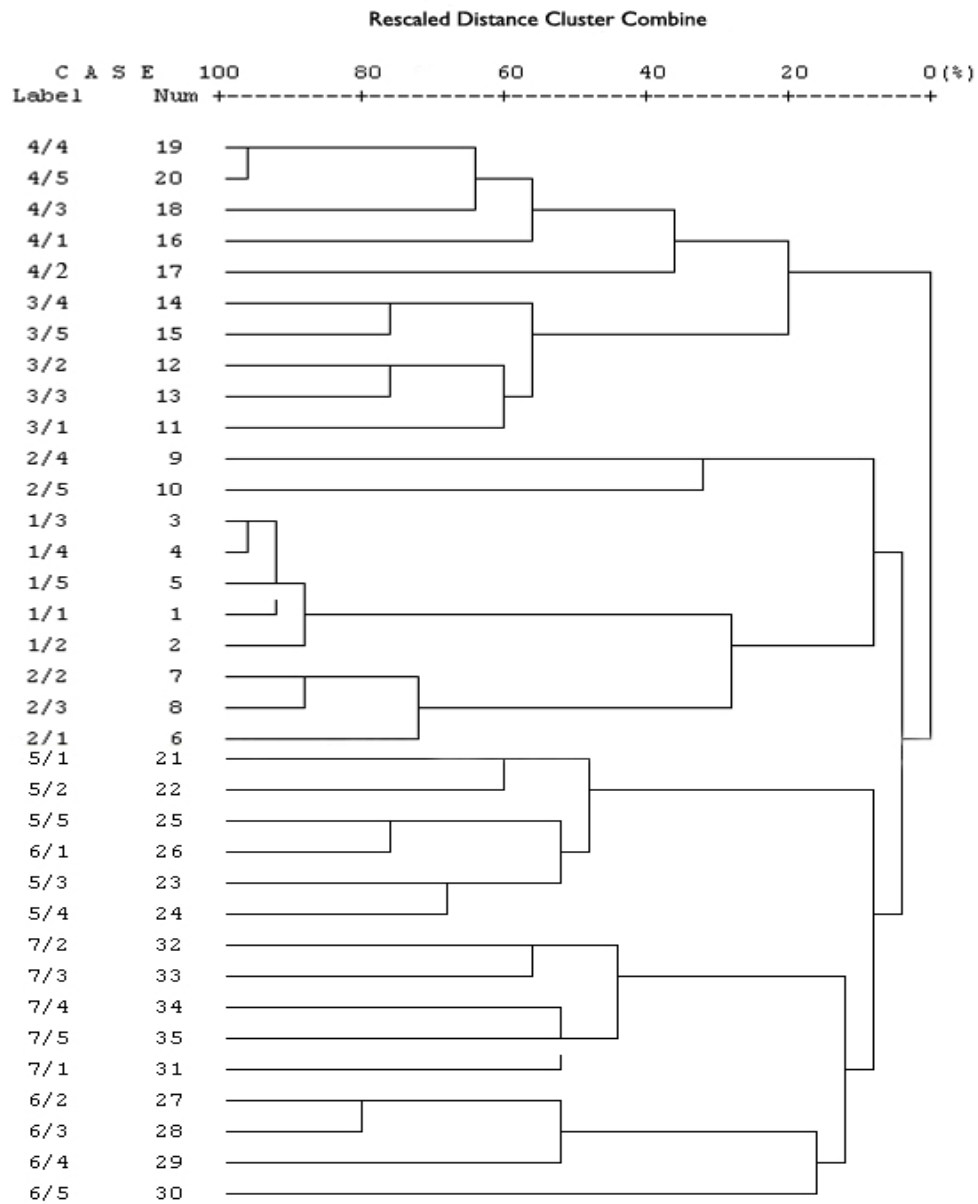


Figure 2 Dendrogram showing genetic relationship of *Geodorum* populations.

วิจารณ์

การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของกล้วยไม้ดินว่านจูงนาง 7 อีโคไทป์ ด้วยระบบเอนไซม์ ACP, EST, POX และ SOD พบว่า ปรากฏแถบสีของไอโซไซม์ที่ชัดเจนและมีรูปแบบที่แตกต่างกันมาก ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างแล้ว พบว่าที่ค่าความคล้ายคลึงกัน 20 % สามารถแยกกลุ่มของพืชทดลองออกได้เป็น 8 กลุ่ม โดยมีเพียง 4 กลุ่มที่แยกออกแล้วสอดคล้องกับการแยกกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน คือกลุ่มของ GE01, GE03, GE04 และ GE07 ส่วนอีก 4 กลุ่มนั้น พบว่ากลุ่มที่มีจำนวนประชากรมากกว่ากลุ่มอื่นคือ กลุ่มที่มี GE01 เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีประชากรของ GE02 รวมอยู่ด้วย 3 ต้น ส่วนกลุ่มที่มีประชากรมากถัดไปคือกลุ่มที่มี GE05 5 ต้น และมี GE06 อยู่ 1 ต้น ทำให้ประชากรของ GE06 ที่ยังคงเป็นกลุ่มเดียวกันโดยระบบไอโซไซม์เหลือเพียง 4 ต้น ส่วน GE02 อีก 2 ต้นนั้นรูปแบบไอโซไซม์แยกออกไว้เป็นอีกกลุ่มต่างหาก โดยมีประชากรของกลุ่มน้อยที่สุด ซึ่งจากผลการทดลองนี้พอจะกล่าวได้ว่าการแยกกลุ่มว่านจูงนางโดยใช้รูปแบบไอโซไซม์สามารถแยกได้สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานของพืชในระดับหนึ่ง นอกจากนี้ยังพบว่าการแยกกลุ่มโดยใช้โปรตีนจากใบสามารถแสดงความผันแปรที่อาจจะมีในประชากรที่อยู่ในอีโคไทป์เดียวกัน

สรุป

จากการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ 4 ระบบ คือ ACP, EST, POX, และ SOD พบว่าเทคนิคดังกล่าวสามารถแบ่งกลุ่มพืชทดลองโดยสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานออกได้เป็น 4 กลุ่ม และยังคงแสดงความคล้ายคลึงของต้นพืชที่เป็นอีโคไทป์ที่ต่างกันอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณยี่สิบการศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ที่สนับสนุนงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- พสุ สกุลอารีวัฒนา. 2546. สัณฐานวิทยาและรูปแบบไอโซไซม์ของพืชสกุลรองเท้านารีของไทย. วิทยานิพนธ์วิทยา-ศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 107 หน้า.
- เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. 2531. คู่มือปฏิบัติการเทคนิคทางอิเล็กโทรโฟเรซิสในการจำแนกพันธุ์พืช Vertical cylindrical gel, slab polyacrylamide gel. หน้า. 45-110. ใน: เอกสารประกอบการฝึกอบรมทางวิชาการ เรื่อง เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟเรซิสในการจำแนกพันธุ์พืช ณ ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนเพาะปลูกพืชทดลอง, สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- ศลิษา รุจิณชัยกุล ฉันทนา สุวรรณธาดา และพรรัตน์ ศิริคำ. 2548. การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของกล้วยไม้ว่านจูงนาง. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 5-6 (พิเศษ): 681-684.
- สลิล สิทธิจักรธรรม และ นฤมล กฤษณชาญดี. 2545. คู่มือกล้วยไม้. สำนักพิมพ์สารคดี, กรุงเทพฯ. 248 หน้า.
- องค์การสวนพฤกษศาสตร์. 2543. เล่ม 6. กล้วยไม้ไทย โอ. เอส. พรินด์ิง เฮาส์, กรุงเทพฯ. 292 หน้า.
- อบฉันท ไทยทอง. 2544. กล้วยไม้เมืองไทย. อัมรินทร์ พรินด์ิงแอนด์พบลิตซิง, กรุงเทพฯ. 461 หน้า.