น้ำยาสกัดที่เหมาะสมเพื่อการเกิดรูปแบบไอโซไซม์ของกล้วยไม้ดินใบจีบบางชนิด

Suitable Extraction Buffer for Producing Isozyme Patterns of Some Plicated-leaf Terrestrial Orchids.

สุทธินันท์ ประสาธน์สุวรรณ์ [1/] และ พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์ [1/, 2/]

Sutthinan Prasatsuwan [1/] and Pimchai Apavatjrut [1/, 2/]

Abstract: A study was carried out to produce isozyme patterns from 10 plicated-leaf terrestrial orchid species in 6 genera by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using 0.5 g young leaf, 1.5 ml extraction buffer in 4 different extraction buffers developed by Gottlieb, Apavatjrut *et al*., Obera-Okeyo *et al*. and Sharma & Jones. When 10% separating gel was used and the four enzymes were tested, i.e. Esterase (EST), Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), Leucine amino peptidase (LAP) and Shikimate dehydrogenase (SKD), it showed that Apavatjrut *et al.* solution yielded the best isozyme bands.

Keywords: Terrestrial orchid, extraction buffer

บทคัดย่อ: การศึกษาน้ำยาสกัด 4 สูตรคือ น้ำยาสกัดของ Gottlieb *et al*., Apavatjrut *et al*., Obera-Okeyo *et al*. และ Sharma & Jones เพื่อทำให้เกิดรูปแบบไอโซไซม์ของกล้วยไม้ดินใบจีบ 10 ชนิด ใน 6 สกุล โดยวิธีโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส จากการใช้ส่วนของใบอ่อน 0.5 กรัม กับน้ำยาสกัด 1.5 มิลลิลิตร และใช้ 10 % separating gel ทดสอบกับเอนไซม์ 4 ชนิดคือ Esterase (EST), Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), Leucine amino peptidase (LAP) และ Shikimate dehydrogenase (SKD) พบว่าน้ำยาสกัดของ Apavatjrut *et al.* ให้ผลดีที่สุด

คำสำคัญ: กล้วยไม้ดิน น้ำยาสกัดเอนไซม์

[1/] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[2/] ศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องจากพระราชดำริ c/o มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

[1/]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

[2/] H.M. The King's Intiative Centre for Flower and Fruit Propagation, c/o Chiang Mai University. Chiang Mai 50200, Thailand.

คำนำ

ความนิยมในการปลูกกล้วยไม้ดินเป็นการค้ามีน้อยกว่ากล้วยไม้อากาศ แต่เนื่องจากลักษณะของกล้วยไม้ดินหลายชนิดมีดอกที่สวยงาม จึงเริ่มมีผู้สนใจมากขึ้น ประกอบกับสภาพทางภูมิศาสตร์ของประเทศไทยเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของกล้วยไม้ดินหลากหลายชนิด จึงน่าจะนำไปพัฒนาพันธุ์ให้เป็นไม้ดอกเศรษฐกิจในอนาคต เนื่องจากกล้วยไม้ดินมีความหลากหลายและมีจำนวนชนิดมาก บางชนิดมีลักษณะใกล้เคียงกันมาก ทำให้เกิดความสับสนในการจัดจำแนก ซึ่งอาจทำให้มีผลกระทบต่อการพัฒนาพันธุ์ ในด้านการจดทะเบียนชื่อต้นพ่อ แม่ เพื่อขึ้นทะเบียนลูกผสม ปัจจุบันได้มีการใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลมาช่วยสนับสนุนการจัดจำแนกหรือตรวจสอบพันธุ์สิ่งมีชีวิตให้ถูกต้อง การตรวจสอบพันธุ์พืชโดยใช้ความหลากหลายของโมเลกุลของโปรตีน (protein polymorphism) โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ใช้กันมาก คือ การวิเคราะห์ไอโซไซม์ (สุรินทร์, 2543) ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ได้ผลดีกับพืชหลายชนิด เช่น พืชกลุ่มหงส์เหิน (กัลยา, 2546) กล้วยไม้รองเท้านารี (พสุ, 2546) *Prunus persica* L. (Agarwal *et al*., 2001) พืชสกุล *Curcuma* (Apavatjrut *et al*., 1999) และ วอลนัท (Vyas *et al*., 2003) เป็นต้น การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งที่จะหาน้ำยาสกัดที่เหมาะสม เพื่อนำไปหารูปแบบไอโซไซม์ของกล้วยไม้ดินใบจีบที่ทำการศึกษา เพื่อให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้หารูปแบบไอโซไซม์ที่เป็นเอกลักษณ์ของกล้วยไม้ดินชนิดอื่นและหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ดินที่ทำการศึกษาในอนาคตเพื่อสนับสนุนงานพัฒนาพันธุ์พืชกลุ่มนี้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาใช้กล้วยไม้ดินใบจีบ 10 ชนิด (ภาพที่ 1) คือ เอื้องน้ำต้น (*Calanthe cardioglossa* Schltr.), อั้วชมพูไพร (*Calanthe rosea* (Lindl.) Benth.), อั้วนวลจันทร์ (*Calanthe vestita* Lindl.), เอื้องอึ่ง (*Eulophia macrobulbon* (Parish. & Rchb. f.) Hook. f.), ว่านหัวครู (*Eulophia spectabilis* (Dennst.) Suresh.), ว่านจูงนาง (*Geodorum recurvum* (Roxb.)), เอื้องมรกต (*Liparis sutepensis* Rolfe ex Downie)), เอื้องพร้าว (*Phaius tankervilleae* (Banks ex l' Heritier) Blume), เหลืองพิศมร (*Spathoglottis affinis* de Vriese) และ บานดึก (*Spathoglottis eburnea* Gagnep.) (อบฉันท์, 2544) ชนิดละ 5 ต้น โดยปลูกในโรงเรือนพรางแสง 50 % และรดน้ำวันละ 2 ครั้ง เปรียบเทียบน้ำยาสกัดที่เหมาะสมสำหรับแต่ละตัวอย่างพืช คือ น้ำยาสกัดของ Gottlieb (1981) ประกอบด้วย 0.1 M Tris-buffer pH 8, 1.0% w/v PVP-40, 0.1% β – ME, 1 mM EDTA, 0.5 mM KCl และ 0.1 M $MgCl_2$. $6H_2O$, น้ำยาสกัดของ Apavatjrut *et al.* (1999) ประกอบด้วย 0.1 M Tris-buffer pH 8, 0.5% w/v PVP-10, 10 mM β – ME, 1 mM EDTA และ 2 mM DTT และเติม pvpp ในขณะบดตัวอย่าง น้ำยาสกัดของ Obera-Okeyo *et al.* (1997) ประกอบด้วย 0.05 M Tris-buffer pH 8, 10% w/v PVP-40, 14 mM β–ME, 20% glycerol และ 0.5% Triton –x และ น้ำยาสกัดของ Sharma & Jones (1999) ประกอบด้วย Phosphate buffer pH 6.9, 20 mg/ l PVP-40 และ DTT 1 mg/ml โดยใช้เทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis) เปรียบเทียบความคมชัด จำนวนและรูปแบบแถบสีที่เกิดขึ้นจากน้ำยาสกัดแต่ละชนิด เพื่อเลือกน้ำยาที่เหมาะสมที่สุด โดยนำส่วนของใบอ่อนที่ใบยังไม่คลี่มาทำความสะอาด หั่นแล้วนำไปชั่งให้ได้น้ำหนัก 0.5 กรัม นำไปผสมกับน้ำยาสกัดเอนไซม์ 1.5 มิลลิลิตร แล้วบดในโกร่งที่เย็นจัดจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 40 นาที แยกสารละลายใสด้านบนใส่ใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปทดสอบเปรียบเทียบน้ำยาสกัดเอนไซม์ การทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของ Stacking gel 4.5% (น้ำกลั่น, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, acrylamide 30%, APS 1.5%, TEMED) และ Separating gel 10% (น้ำกลั่น, 3 M Tris-HCl pH 8.8 acrylamide30%, APS 1.5%, TEMED) ทำการย้อมเอนไซม์ 4 ชนิด คือ Esterase (EST), Glutamate

oxaloacetate transaminase (GOT), Leucine amino peptidase (LAP) และ Shikimate dehydrogenase (SKD) การทดลองทำ 5 ซ้ำ ๆ ละ 1 ต้นต่อชนิด (แต่ละต้นเกิดจากเมล็ดที่ต่างกัน) บันทึกค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rf) และดูความคมชัดของแถบสีที่เกิดขึ้น

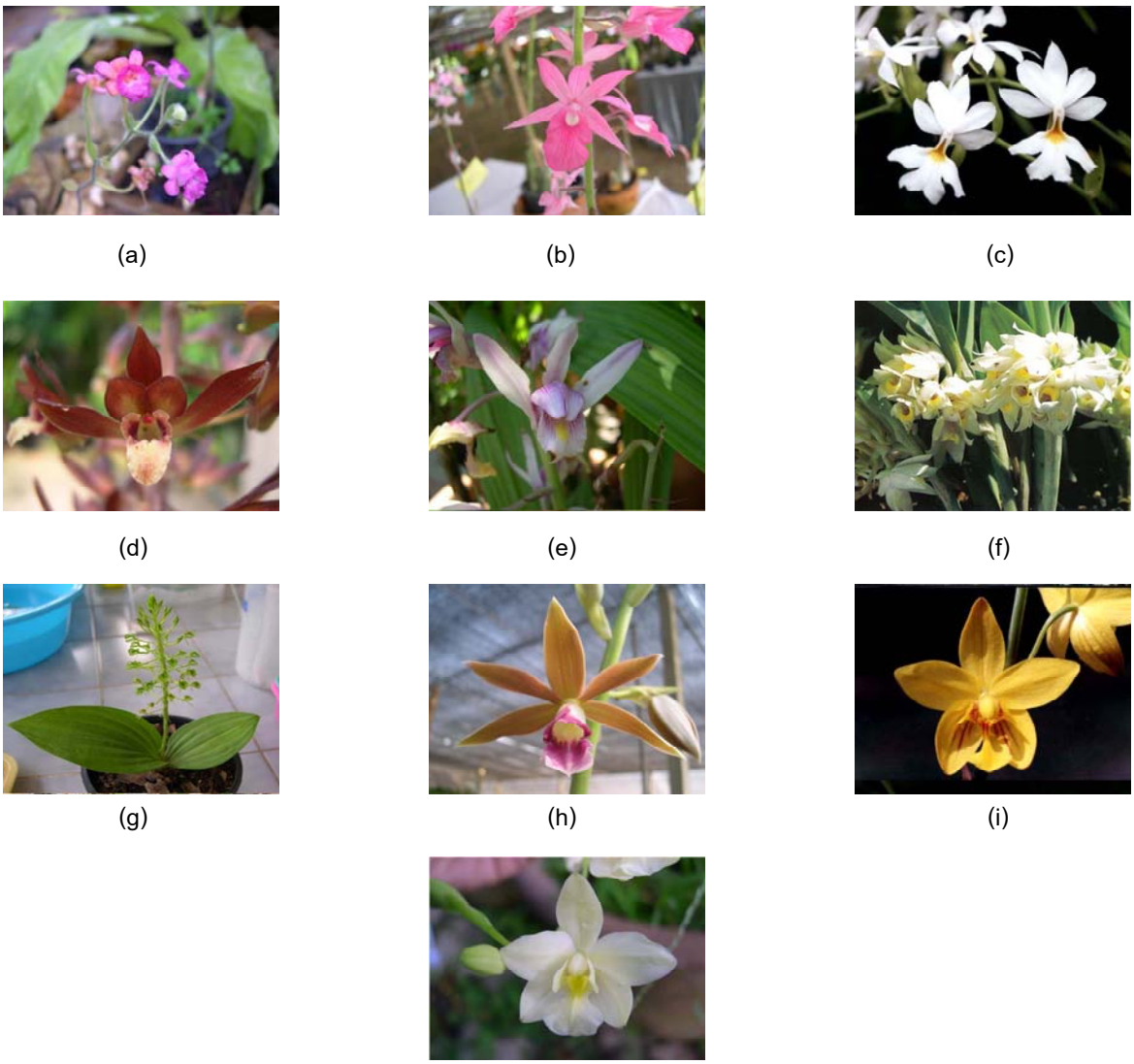

Figure 1 Ten terrestrial orchid species used in this study: (a) *Calanthe cardioglossa* Schltr., (b) *Calanthe rosea* (Lindl.) Benth., c) *Calanthe vestita* Lindl., (d) *Eulophia macrobulbon* (Parish. & Rchb. f.) Hook. f., (e) *Eulophia spectabilis* (Dennst.) Suresh., (f) *Geodorum recurvum* (Roxb.), (g) *Liparis sutepensis* Rolfe ex Downie, (h) *Phaius tankervilleae* (Banks ex l' Heritier) Blume, (i) *Spathoglottis affinis* de Vriese, (j) *Spathoglottis eburnea* Gagnep.

ผลการทดลอง

การเปรียบเทียบน้ำยาสกัดเอนไซม์เพื่อหารูปแบบไอโซไซม์จากกล้วยไม้ดิน 10 ชนิด โดยใช้ น้ำยาสกัด 4 สูตร คือ 1) Gottlieb (1981) 2) Apavatjrut *et al.* (1999) 3) Obera-Okeyo *et al*. (1997) และ 4) Sharma & Jones (1999) เพื่อพิจารณาการเกิด และไม่เกิดแถบสี ตำแหน่งการเกิดแถบสี และ ความคมชัดของแถบสีในแต่ละกรรมวิธี จากการย้อมเอนไซม์ 4 ระบบ คือ EST, LAP, GOT และ SKD ให้ผลการทดลองดังแสดงใน ตารางที่ 1 ถึง10 และ ภาพที่ 2

Table 1 Enzyme banding of EST, GOT, LAP and SKD from *Calanthe cardioglossa* Schltr.

Enzyme	Extraction buffer	Plant No.	No. of band (s)	Rf	Remarks
EST	Gottlieb	1-5	6	0.07, 0.16, 0.28, 0.45, 0.54, 0.62	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	6	0.07, 0.16, 0.28, 0.45, 0.54, 0.62	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	6	0.07, 0.16, 0.28, 0.45, 0.54, 0.62	Sharp
	Sharma & Jones	1-5	6	0.07, 0.16, 0.28, 0.45, 0.54, 0.62	Sharp
GOT	Gottlieb	1-5	3	0.17, 0.32, 0.40	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.17, 0.32, 0.40	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.17, 0.32, 0.40	Sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.17, 0.32, 0.40	Sharp
LAP	Gottlieb	1-5	1	0.21	Not sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	1	0.21	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	1	0.21	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	1	0.21	Not sharp
SKD	Gottlieb	1-5	2	0.33, 0.42	Not sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	2	0.33, 0.42	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	2	0.33, 0.42	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	2	0.33, 0.42	Not sharp

Table 2 Enzyme banding of EST, GOT, LAP and SKD from *Calanthe rosea* (Lindl.) Benth.

Enzyme	Extraction buffer	Plant No.	No. of band (s)	Rf	Remarks
EST	Gottlieb	1-5	5	0.07, 0.16, 0.38, 0.46, 0.49	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	5	0.07, 0.16, 0.38, 0.46, 0.49	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.07, 0.16, 0.38	Sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.07, 0.16, 0.38	Sharp
GOT	Gottlieb	1-5	3	0.17, 0.32, 0.40	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.17, 0.32, 0.40	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	2	0.32, 0.40	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	2	0.32, 0.40	Not sharp
LAP	Gottlieb	1-5	1	0.23	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	1	0.23	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	1	0.23	Sharp
	Sharma & Jones	1-5	1	0.23	Not sharp
SKD	Gottlieb	1-5	2	0.31, 0.39	Not sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	2	0.31, 0.39	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	2	0.31, 0.39	Sharp
	Sharma & Jones	1-5	2	0.31, 0.39	Not sharp

Table 3 Enzyme banding of EST, GOT, LAP and SKD from *Calanthe vestita* Lindl.

Enzyme	Extraction buffer	Plant No.	No. of band (s)[1/]	Rf	Remarks
EST	Gottlieb	1-5	7	0.20, 0.41, 0.47, 0.52, 0.55, 0.57, 0.65	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	7	0.20, 0.41, 0.47, 0.52, 0.55, 0.57, 0.65	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	7	0.20, 0.41, 0.47, 0.52, 0.55, 0.57, 0.65	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	7	0.20, 0.41, 0.47, 0.52, 0.55, 0.57, 0.65	Sharp
GOT	Gottlieb	1-5	3	0.12, 0.33, 0.35	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.12, 0.33, 0.35	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.12, 0.33, 0.35	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.12, 0.33, 0.35	Sharp
LAP	Gottlieb	1-5	1	0.18	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	1	0.18	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	1	0.18	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	1	0.18	Not sharp
SKD	Gottlieb	1-5	3	0.45, 0.48, 0.54	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.45, 0.48, 0.54	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.45, 0.48, 0.54	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.45, 0.48, 0.54	Not sharp

[1/] ดู Figure 2 (a) ประกอบ

Table 4 Enzyme banding of EST, GOT, LAP and SKD from *Eulophia macrobulbon* (Par. & Rchb. f.) Hook. f.

Enzyme	Extraction buffer	Plant No.	No. of band (s)	Rf	Remarks
EST	Gottlieb	1-5	4	0.32, 0.35, 0.60, 0.63	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	4	0.32, 0.35, 0.60, 0.63	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	4	0.32, 0.35, 0.60, 0.63	Sharp
	Sharma & Jones	1-5	4	0.32, 0.35, 0.60, 0.63	Sharp
GOT	Gottlieb	1-5	1	0.31	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	1	0.31	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	1	0.31	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	1	0.31	Not sharp
LAP	Gottlieb	1-5	3	0.31,0.45, 0.50	Not sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.31, 0.45, 0.50	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.31, 0.45, 0.50	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.31, 0.45, 0.50	Not sharp
SKD	Gottlieb	1-5	3	0.22, 0.38, 0.41	Not sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.31, 0.45, 0.50	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.31, 0.45, 0.50	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.31, 0.45, 0.50	Not sharp

Table 5 Enzyme banding of EST, GOT, LAP and SKD from *Eulophia spectabilis* (Dennst.) Suresh.

Enzyme	Extraction buffer	Plant No.	No. of band (s) [1/]	Rf	Remarks
EST	Gottlieb	1-5	3	0.18, 0.7, 0.73	Not sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	6	0.18, 0.45, 0.62, 0.67, 0.7, 0.73	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	6	0.18, 0.45, 0.62, 0.67, 0.7, 0.73	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.18, 0.7, 0.73	Not sharp
GOT	Gottlieb	1-5	3	0.07, 0.33, 0.38	Not sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.07, 0.33, 0.38	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.07, 0.33, 0.38	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.07, 0.33, 0.38	Not sharp
LAP	Gottlieb	1-5	1	0.35	Not sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	1	0.35	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	1	0.35	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	1	0.35	Not sharp
SKD	Gottlieb	1-5	3	0.23, 0.38, 0.41	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.23, 0.38, 0.41	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.23, 0.38, 0.41	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.23, 0.38, 0.41	Not sharp

[1/] ดู Figure 2 (b) ประกอบ

Table 6 Enzyme banding of EST, GOT, LAP and SKD from *Geodorum recurvum* (Roxb.).

Enzyme	Extraction buffer	Plant No.	No. of band (s)[1/]	Rf	Remarks
EST	Gottlieb	1-5	3	0.21, 0.48, 0.52	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.21, 0.48, 0.52	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.21, 0.48, 0.52	Sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.21, 0.48, 0.52	Sharp
GOT	Gottlieb	1-5	3	0.10, 0.34, 025	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.10, 0.34, 025	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.10, 0.34, 025	Sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.10, 0.34, 025	Sharp
LAP	Gottlieb	1-5	2	0.27, 0.34	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	2	0.27, 0.34	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	2	0.27, 0.34	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	2	0.27, 0.34	Not sharp
SKD	Gottlieb	1-5	1	0.33	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	1	0.33	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	1	0.33	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	1	0.33	Sharp

[1/] ดู Figure 2 (c) ประกอบ

Table 7 Enzyme banding of EST, GOT, LAP and SKD from *Liparis sutepensis* Rolfe ex Downie.

Enzyme	Extraction buffer	Plant No.	No. of band (s) [1/]	Rf	Remarks
EST	Gottlieb	1-5	3	0.07, 0.32, 0.62	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.07, 0.32, 0.62	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.07, 0.32, 0.62	Sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.07, 0.32, 0.62	Sharp
GOT	Gottlieb	1-5	2	0.22, 0.32	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	2	0.22, 0.32	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	2	0.22, 0.32	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	2	0.22, 0.32	Sharp
LAP	Gottlieb	1-5	1	0.45	Not sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	1	0.45	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	1	0.45	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	1	0.45	Not sharp
SKD	Gottlieb	1-5	4	0.22, 0.35, 0.38, 0.42	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	4	0.22, 0.35, 0.38, 0.42	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	1	0.22	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	1	0.22	Not sharp

[1/] ดู Figure 2 (d) ประกอบ

Table 8 Enzyme banding of EST, GOT, LAP and SKD from *Phaius tankervilleae* (Banks ex l' Heritier) Blume.

Enzyme	Extraction buffer	Plant No.	No. of band (s) [1/]	Rf	Remarks
EST	Gottlieb	1	4	0.10, 0.13, 0.31, 0.42	Sharp
	Gottlieb	2	4	0.13, 0.29, 0.31, 0.42	Sharp
	Gottlieb	3	3	013, 0.31, 0.42	Sharp
	Gottlieb	4	6	0.06, 0.13, 0.29, 0.31, 0.35, 0.42	Sharp
	Gottlieb	5	6	0.06, 0.13, 0.29, 0.31, 0.35, 0.42	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1	4	0.10, 0.13, 0.31, 0.42	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	2	4	0.13, 0.29, 0.31, 0.42	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	3	3	013, 0.31, 0.42	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	4	6	0.06, 0.13, 0.29, 0.31, 0.35, 0.42	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	5	6	0.06, 0.13, 0.29, 0.31, 0.35, 0.42	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1	4	0.10, 0.13, 0.31, 0.42	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	2	4	0.13, 0.29, 0.31, 0.42	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	3	3	013, 0.31, 0.42	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	4	6	0.06, 0.13, 0.29, 0.31, 0.35, 0.42	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	5	6	0.06, 0.13, 0.29, 0.31, 0.35, 0.42	Sharp
	Sharma & Jones	1	4	0.10, 0.13, 0.31, 0.42	Sharp
	Sharma & Jones	2	4	0.13, 0.29, 0.31, 0.42	Sharp
	Sharma & Jones	3	3	013, 0.31, 0.42	Sharp
	Sharma & Jones	4	6	0.06, 0.13, 0.29, 0.31, 0.35, 0.42	Sharp
	Sharma & Jones	5	6	0.06, 0.13, 0.29, 0.31, 0.35, 0.42	Sharp
GOT	Gottlieb	1-5	3	0.10, 0.12, 0.28	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.10, 0.12, 0.28	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.10, 0.12, 0.28	Sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.10, 0.12, 0.28	Sharp
LAP	Gottlieb	1-5	1	0.23	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	1	0.23	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	1	0.23	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	1	0.23	Not sharp
SKD	Gottlieb	1-5	2	0.24, 0.31	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	2	0.24, 0.31	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	2	0.24, 0.31	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	2	0.24, 0.31	Sharp

[1/] ดู Figure 2 (e) ประกอบ

Table 9 Enzyme banding of EST, GOT, LAP and SKD from *Spathoglottis affinis* de Vriese.

Enzyme	Extraction buffer	Plant No.	No. of bands	Rf	Remarks
EST	Gottlieb	1-5	5	0.13, 0.22, 0.44, 0.46, 0.48	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	5	0.13, 0.22, 0.44, 0.46, 0.48	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	5	0.13, 0.22, 0.44, 0.46, 0.48	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	5	0.13, 0.22, 0.44, 0.46, 0.48	Not sharp
GOT	Gottlieb	1-5	3	0.08, 0.28, 0.33	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.08, 0.28, 0.33	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.08, 0.28, 0.33	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.08, 0.28, 0.33	Not sharp
LAP	Gottlieb	1-5	2	0.16, 0.19	Not sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	2	0.16, 0.19	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	2	0.16, 0.19	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	2	0.16, 0.19	Not sharp
SKD	Gottlieb	1-5	3	0.28, 0.31, 0.35	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.28, 0.31, 0.35	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.28, 0.31, 0.35	Sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.28, 0.31, 0.35	Sharp

Table 10 Enzyme banding of EST, GOT, LAP and SKD from *Spathoglottis eburnea* Gagnep.

Enzyme	Extraction buffer	Plant No.	No. of bands	Rf	Remarks
EST	Gottlieb	1-5	3	0.10, 0.48, 0.54	Not sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.10, 0.48, 0.54	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.10, 0.48, 0.54	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.10, 0.48, 0.54	Not sharp
GOT	Gottlieb	1-5	4	0.03, 0.09, 0.15, 0.28	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	4	0.03, 0.09, 0.15, 0.28	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	4	0.03, 0.09, 0.15, 0.28	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	4	0.03, 0.09, 0.15, 0.28	Not sharp
LAP	Gottlieb	1-5	3	0.25, 0.27, 0.31	Not sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.25, 0.27, 0.31	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.25, 0.27, 0.31	Sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.25, 0.27, 0.31	Not sharp
SKD	Gottlieb	1-5	3	0.25, 0.27, 0.31	Sharp
	Apavatjrut *et al.*	1-5	3	0.25, 0.27, 0.31	Sharp
	Obera-Okeyo *et al.*	1-5	3	0.25, 0.27, 0.31	Not sharp
	Sharma & Jones	1-5	3	0.25, 0.27, 0.31	Not sharp

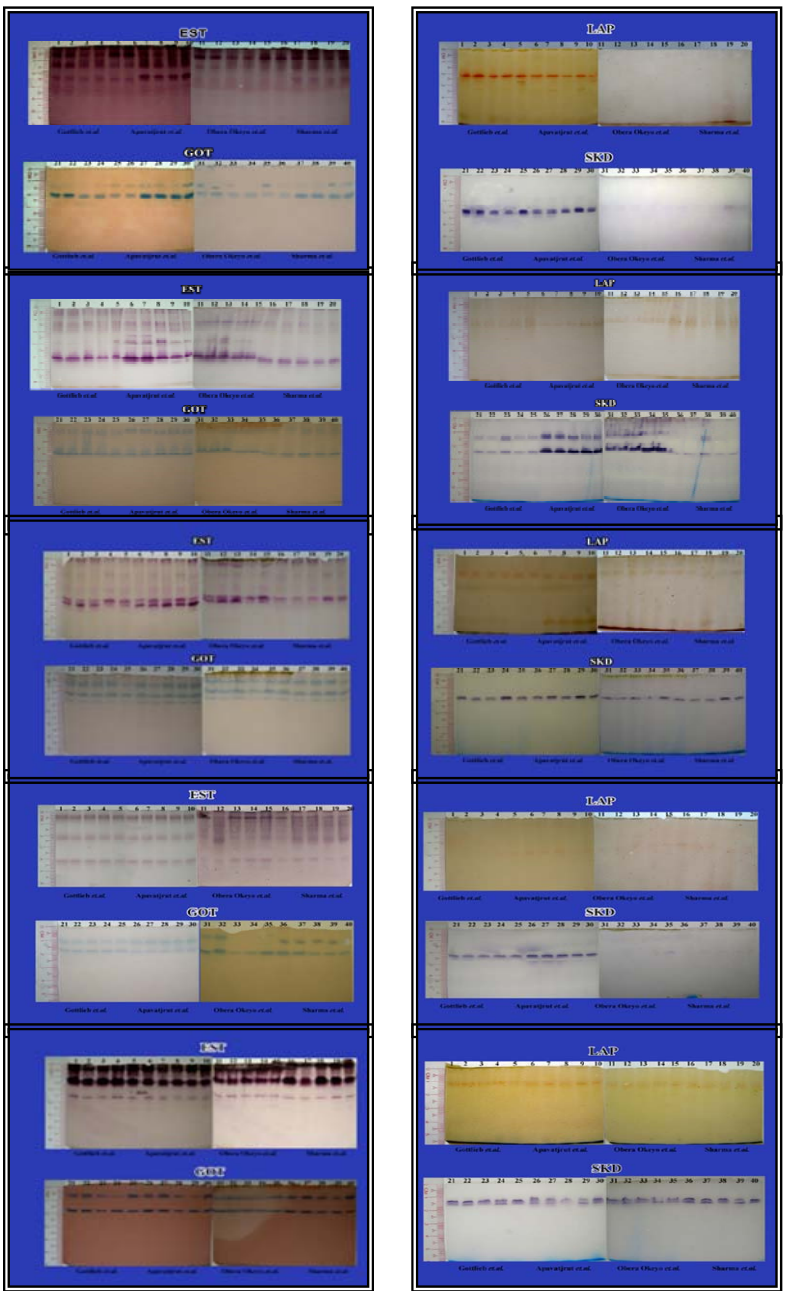

Figure 2 Enzyme banding of EST, GOT, LAP and SKD from (a) *Calanthe vestita* Lindl., (b) *Eulophia spectabilis* (Dennst.) Suresh., (c) *Geodorum recurvum* (Roxb.), (d) *Liparis sutepensis* Rolfe ex Downie, (e) *Phaius tankervilleae* (Banks ex l' Heritier) Blume.

Note : Lanes 1-5 = extraction buffer of Gottlieb (1981), Lanes 6-10 = extraction buffer of Apavatjrut *et al.* (1999), Lanes 11-15 = extraction buffer of Obera-Okeyo *et al.* (1997), Lanes 16-20 extraction buffer of Sharma & Jones (1999).

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาน้ำยาสกัดที่เหมาะสมเพื่อศึกษารูปแบบไอโซไซม์เพื่อให้ได้แถบสีที่คมชัดและรูปแบบไอโซไซม์ที่ชัดเจนของกล้วยไม้ดินแต่ละสกุล โดยพิจารณาความคมชัดของแถบสี ด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส พบว่าทุกน้ำยาสกัดสามารถทำให้เกิดแถบสี พบว่าน้ำยาสกัดของ Apavatjrut *et al.* (1999) ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M Tris-buffer pH 8, 0.5% w/v PVP-10, 10 mM β – ME, 1 mM EDTA และ 2 mM DTT ให้จำนวนและความคมชัดของแถบสีโดยรวมดีที่สุดกับกล้วยไม้ดินทั้ง 10 ชนิด จึงเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ ส่วนน้ำยาสกัดของ Gottlieb (1981) ให้ผลรองลงมา โดยสามารถทำให้เกิดแถบสีจาก EST จากกล้วยไม้ดิน 8 ใน10 ชนิด (ยกเว้น *Eulophia spectabilis* และ *Spathoglottis eburnea*) และเกิดแถบสีคมชัดจาก 9 ใน 10 ชนิด (ยกเว้น *Eulophia spectabilis*) แต่เกิดแถบสีคมชัดกับเอนไซม์ LAP และ SKD จากกล้วยไม้ดิน 4 และ 7 ชนิดตามลำดับ ซึ่งน่าจะมีศักยภาพนำไปประยุกต์ใช้หารูปแบบไอโซไซม์ของกล้วยไม้ดินชนิดอื่นได้ สำหรับน้ำยาสกัดของ Obera-Okeyo *et al.* (1997) และ Sharma & Jones (1999) ให้ความคมชัดใกล้เคียงกัน โดยมีความคมชัดของแถบสี จากเอนไซม์ EST 6 และ 7 ชนิดตามลำดับ ในขณะที่เกิดความคมชัดเพียง 2 -5 ชนิด จากแถบสีของเอนไซม์ EST GOT และ SKD การที่น้ำยาสกัดของ Apavatjrut *et al.* (1999) และ Gottlieb (1981) ให้ผลดีเป็นเพราะส่วนประกอบ มี PVP เป็น phenol-complexing agent ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ phenoloxidase และผลที่ได้อาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในน้ำยาสกัด คือ EDTA ซึ่งเป็น chelating agent ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับ metalloprotein DTT และ β-ME เป็น reducing agent ป้องกันโปรตีนไม่ให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น สารเหล่านี้เป็นส่วนทำให้เอนไซม์ยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ และเอนไซม์ไม่เกิดการสูญเสียหรือเสียสภาพทางธรรมชาติ (Michaud and Asselin, 1995) ในทำนองเดียวกันน้ำยาสกัดของ Apavatjrut *et al.* (1999) ก็เป็นน้ำยาสกัดที่เหมาะสมสำหรับการเกิดรูปแบบไอโซไซม์ของปทุมมาพันธุ์เบาด้วย (Apavatjrut *et al.*, 1999) โดยสรุปแม้ว่าน้ำยาสกัดบางส่วนผสมทำให้เกิดแถบสีชัดเจนกับกล้วยไม้ดินบางชนิด แต่เมื่อต้องการใช้กับกล้วยไม้ดินจำนวนมากชนิดก็ควรเลือกน้ำยาสกัดที่ใช้ได้ผลดีกับกล้วยไม้มากชนิดที่สุด

สำหรับการเกิดรูปแบบแถบสีของกล้วยไม้ดินใบจีบแต่ละชนิดทั้ง 5 ต้น จากแต่ละเอนไซม์ส่วนใหญ่ให้รูปแบบแถบสีที่เหมือนกัน แสดงว่าน้ำยาสกัดเอนไซม์ที่ใช้ทำให้เกิดรูปแบบไอโซไซม์ที่มีความจำเพาะในระดับชนิดได้ ส่วนในกรณีของ *Phaius tankervilleae* น้ำยาสกัดทุกส่วนผสมให้รูปแบบแถบสีที่หลากหลายจากเอนไซม์ EST แสดงให้เห็นว่าแถบสีเหล่านี้สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างโคลน (clone) ที่ทดสอบได้เกือบทั้งหมด ที่เป็นเช่นนี้เป็นผลมาจากลักษณะทางพันธุกรรมที่มองเห็นใน *Phaius tankervilleae* ที่นำมาศึกษามีความหลากหลายที่เห็นได้ชัดเจนของความยาวและความกว้างของก้านช่อดอก ความกว้างของกลีบดอก สีดอกและสีของกลีบปาก

เอกสารอ้างอิง

กัลยา ปานคง. 2546. สัณฐานวิทยาและรูปแบบไอโซไซม์ของพืชสกุลหงส์เหิน. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัย เชียงใหม่, เชียงใหม่. 150 หน้า.

พสุ สกุลอารีวัฒนา. 2546. สัณฐานวิทยาและรูปแบบไอโซไซม์ของพืชสกุลรองเท้านารีของไทย .วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 107 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคคณากุล. 2543. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 282 หน้า.

อบฉันท์ ไทยทอง. 2544. กล้วยไม้เมืองไทย. สำนักพิมพ์บ้านและสวน. กรุงเทพฯ. 461 หน้า.

Agarwal, S., A.K. Nath and D.R. Sharma. 2001. Characterization of peach (*Prunus persica* L.) cultivars using isozyme as molecular marker. Sci. Hort. 90: 227-242.

Apavatjrut, P., S. Anuntalabhochai, P. Sirirugsa and C. Alisi. 1999. Molecular markers in the identification of some early flowering *Curcuma* L. (Zingiberaceae) species. Annals of Botany 84: 529-534.

Gottlieb, L.D. 1981. Electrophoretic evidence and plant populations. Prog. Phytochem. 7: 1-46.

Michaud, D. and A. Asselin. 1995. Application to plant proteins of gel electrophoretic methods. Chromatography 698: 263-279.

Obera-Okeyo, P., K. Fuji and S. Kako. 1997. Enzyme polymorphism in *Cymbidium* orchid cultivars and inheritance of leucine aminopeptidase. HortScience 32(7): 1267-1271.

Sharma, I.K. and D.L. Jones. 1999. Characterization of natural hybrids between *Pterostylis alveata* Garnet and *Pterostylis ophioglossa* R. Br. (Orchidaceae) by starch gel electrophoresis. Biochem. Syst. Ecol. 27(5): 499-505

Vyas, D., S.K. Sharma and O.R. Sharma. 2003. Genetic structure of walnut genotype using leaf isozyme as variability measure. Sci. Hort. 97: 141-152.