ปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ในกล้วยไม้รองเท้านารีของไทย

Suitable Factors for Establishing Isozyme Patterns in Thai Lady's Slipper (*Paphiopedilum* Pfitzer)

พสุ สกุลอารีวัฒนา [1/] ***และ พิมพ์ใจ อาภาวัชรุตม์*** [1/]
Pasu Skunareewattana [1/] *and Pimchai Apavatjrut* [1/]

Abstract : A series of study to find suitable factors for establishing isozyme patterns in 10 Thai *Paphiopedilum* and 1 natural hybrid showed that 0.5 gram young leaf fresh weight, 0.1 M Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA, 1 % w/v PVP-360, 2 mM DTT, 10 mM β-mercaptoethanol and 11% separating gel are most suitable for polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

Keywords : *Paphiopedilum,* isozyme, electrophoresis

บทคัดย่อ : การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการทำให้เกิดรูปแบบไอโซไซม์ของกล้วยไม้รองเท้านารีของไทย 10 ชนิด และ ลูกผสมจากธรรมชาติ 1 ชนิด โดยวิธีโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทร-โฟรีซีส พบว่าการใช้ใบอ่อน 0.5 กรัม กับน้ำยาสกัดที่มีส่วนประกอบของ 0.1 M Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA, 1 % w/v PVP-360, 2 mM DTT, 10 mM β-mercaptoethanol และการใช้ separating gel 11% ให้ผลดีที่สุด

คำสำคัญ : กล้วยไม้รองเท้านารี ไอโซไซม์ อิเล็กโทรโฟรีซีส

[1/] ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

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

คำนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งกล้วยไม้เขตร้อนที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก เฉพาะในประเทศไทยสามารถพบกล้วยไม้อยู่ประมาณ 167 สกุล 1,140 ชนิด (อบฉันท์, 2544) หนึ่งในสกุลของกล้วยไม้ที่พบในประเทศไทย และเป็นที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก คือ สกุลรองเท้านารี (*Paphiopedilum*) ซึ่งพบตามธรรมชาติของประเทศอย่างน้อย 14 ชนิด กล้วยไม้สกุลนี้ มีรูปทรง สีสัน สวยแปลกตา บางชนิดมีลายที่ใบด้วย มีการนำกล้วยไม้รองเท้านารีมาปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้พันธุ์ใหม่ๆ และมีการขยายพันธุ์เพื่อการค้าอย่างแพร่หลาย ทั้งในประเทศ และต่างประเทศ

กล้วยไม้รองเท้านารีที่พบในธรรมชาติ บางชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก จึงมีความสับสนในการจัดจำแนก นอกจากนั้นแล้วลูกผสมที่มนุษย์ได้ทำการผสมพันธุ์ขึ้นโดยเฉพาะลูกผสมชั่วแรกมีลักษณะคล้ายคลึงกับต้นพ่อ แม่ มาก การหาวิธีการที่นำมาใช้ช่วยจำแนกชนิดให้แม่นยำ เพื่อสนับสนุนงานด้านอนุกรมวิธาน และยืนยันการเป็นลูกผสมโดยเฉพาะอย่างยิ่งลูกผสมชั่วแรกที่อาจมีการเรียกชื่อพันธุ์สับสนให้สามารถนำไปใช้งานอย่างถูกต้องต่อไปจึงมีความจำเป็นมากในด้านการพัฒนาพันธุ์ การวิเคราะห์ไอโซไซม์เป็นการวิเคราะห์โปรตีนรูปแบบหนึ่งโดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส ซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่แพง ทั้งยังสามารถทำกับพืชได้จำนวนมากอย่างรวดเร็ว โดยการใช้ชิ้นส่วนพืชเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดตลอดจนหาความสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างชนิดได้ (Moore and Collins, 1983)

การทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการทำให้เกิดรูปแบบไอโซไซม์ของพืชกลุ่มนี้โดยวิธีโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ แบ่งเป็นการทดลองย่อยดังต่อไปนี้

1. การศึกษาวิธีการสกัดเอนไซม์

เปรียบเทียบวิธีการสกัดเอนไซม์จากตัวอย่างพืช 2 กรรมวิธี คือ

กรรมวิธีที่ 1 นำใบที่หนึ่งจากยอดของกล้วยไม้รองเท้านารีซึ่งปลูกในโรงเรือนพรางแสง 50 เปอร์เซ็นต์ มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น และเช็ดให้แห้ง ชั่งใบมา 0.5 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในโกร่งที่แช่เย็นจัด เติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดตัวอย่างจนละเอียดเป็นผง จากนั้นเติมน้ำยาสกัดที่แช่เย็นจัดตามสูตรของ Apavatjrut *et al.* (1999) ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 0.5 % w/v PVP-10, 2 mM DTT, 10 mM β-mercaptoethanol 1.5 มิลลิลิตร แล้วบดจนตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทสารของเหลวที่ได้ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็วสูง 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที แล้วดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ แช่ในน้ำแข็งระหว่างรอเพื่อทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น

กรรมวิธีที่ 2 ขั้นตอนการสกัดเหมือนกรรมวิธีที่ 1 แต่ดัดแปลงน้ำยาสกัดเป็น 0.1 M Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA, 1 % w/v PVP-360, 2 mM DTT, 10 mM β-mercaptoethanol ทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ต้น การทดลองนี้ใช้ separating gel 10 %

2. pH ของน้ำยาสกัดเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

เปรียบเทียบ pH น้ำยาสกัดเอนไซม์ที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 และ 8.5 ส่วนประกอบอื่นเหมือนกรรมวิธีที่ 2 ทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 1 ต้น

3. เนื้อเยื่อที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

เปรียบเทียบเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆของต้น 5 ส่วน คือ ใบ (ตำแหน่งที่ 3 จากยอด) ใบอ่อน (ตำแหน่งที่ 1 จากยอด) ดอก (บานเต็มที่) ดอกอ่อน (ดอกตูม) และราก นำตัวอย่างของแต่ละส่วนมาล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด แล้วเช็ดให้แห้ง ชั่งแต่ละตัวอย่างมา 0.5 กรัม นำมาสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำยาสกัดที่ได้จากการทดลองข้างต้น แล้วนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 1 ต้น

4. น้ำหนักชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

เปรียบเทียบน้ำหนักสดจากเนื้อเยื่อใบอ่อน โดยเปรียบเทียบน้ำหนัก 0.25, 0.5 และ 0.75 กรัม นำมาสกัดด้วยน้ำยาสกัดที่ได้จากกรรมวิธีที่ 2 จากการทดลองที่ 1 แล้วนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 1 ต้น

5. ความเข้มข้นของเจลที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

เปรียบเทียบความเข้มข้นของ separating gel ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 10, 11 และ 12 % ทำกรรมวิธีละ 5 ซ้ำๆละ 1 ต้น

การทดลองที่ 1 ถึง 5 ใช้รองเท้านารีเหลือง-ปราจีน [*P. concolor* (Lindl.) Pfitzer] เป็นวัสดุทดลอง ย้อมสีเอนไซม์ 4 ชนิด คือ esterase (EST), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), leucine aminopeptidase (LAP) และ malate dehydrogenase (MDH) โดยทำการทดลอง 2 ครั้ง ทุกการทดลอง ดำเนินการบันทึกข้อมูลโดยเปรียบเทียบจำนวน ขนาด และความคมชัดของแถบสีในแต่ละกรรมวิธี

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาวิธีการสกัดเอนไซม์

จากการศึกษาการสกัดเอนไซม์จากใบอ่อนของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองปราจีนแล้วนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซีส และย้อมสีเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด พบว่า กรรมวิธีที่ 2 ซึ่งน้ำยาสกัดมีส่วนประกอบ 0.1 M Tris - HCl pH 7, 1 mM EDTA, 1 % w/v PVP-360, 2 mM DTT, 10 mM β-mercaptoethanol ให้ผลดีกว่ากรรมวิธีที่ 1 โดยให้แถบสีไอโซไซม์ที่คมชัดกว่า (ตารางที่ 1) และในระบบเอนไซม์ LAP พบว่า แสดงแถบสีเพียงแถบเดียวเมื่อใช้น้ำยาสกัดในกรรมวิธีที่ 2 แต่ไม่แสดงแถบสีเมื่อใช้น้ำยาสกัดกรรมวิธีที่ 1 แต่เมื่อเกิดแถบสีแล้วจำนวนแถบสี และค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) จากทั้ง 2 กรรมวิธีไม่แตกต่างกันในแต่ละเอนไซม์ สาเหตุที่ทำให้แถบสีแสดงความคมชัดไม่เท่ากันอาจเป็นผลของ PVP ที่ใช้ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน และผลของ pH น่าจะมีส่วนร่วมด้วย

pH ของน้ำยาสกัดเอนไซม์

การเปรียบเทียบ pH 5 ระดับ พบว่า pH ของน้ำยาสกัดเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบ

Table 1 Effect of extraction buffer on 4 enzyme banding.

Enzyme system	Extraction buffer	Band appearance	Number of bands	R_f	Remarks
EST	1	+	4	0.15, 0.25, 0.36, 0.5	Smear band
	2	+	4	0.15, 0.25, 0.36, 0.5	Sharp band
GOT	1	+	3	0.20, 0.26, 0.35	Sharp band
	2	+	3	0.20, 0.26, 0.35	Very sharp band
LAP	1	-	-	-	-
	2	+	1	0.40	Sharp band
MDH	1	+	2	0.30, 0.36	Smear band
	2	+	2	0.30, 0.36	Sharp band

ไอโซไซม์กล้วยไม้รองเท้านารี คือ pH 7 ซึ่งให้แถบสีที่คมชัดกว่าที่ระดับ pH 6.5, 7.5, 8.0 และ 8.5 และเกิดแถบสีจากทุกเอนไซม์ที่ใช้ทดสอบ (ตารางที่ 2) โดยที่ระดับ pH 6.5 และ 8.5 เอนไซม์ EST ไม่เกิดแถบสี ส่วนเอนไซม์ GOT ที่ระดับ pH 6.5 ไม่เกิดแถบสี และเอนไซม์ LAP ที่ระดับ pH 6.5, 7.5, 8.0 และ 8.5 ไม่เกิดแถบสี สำหรับเอนไซม์ MDH ที่ระดับ pH 6.5 และ 8.5 ไม่เกิดแถบสี เช่นเดียวกับเอนไซม์ EST ในกรณีที่เกิดแถบสี จำนวนแถบสี และ ค่า R_f ที่เกิดจากการใช้ pH ต่างกันในแต่ละเอนไซม์ มีค่าไม่แตกต่างกัน การที่น้ำยาสกัด pH 7 ให้แถบสีได้ดีที่สุด น่าจะเป็นดังที่ อาภัสสรา (2537) ได้อธิบายไว้ว่า น้ำยาสกัดที่มี pH เหมาะสมทำให้เอนไซม์มีความเสถียรมากที่สุด แถบสีที่เกิดขึ้นจึงมีความคมชัด ผลของระดับ pH ที่เหมาะสมนี้เป็นไปในทำนองเดียวกับรายงานของ Durham *et al*. (1987) ที่ใช้สารสกัดที่มี pH 7 ในการศึกษาเอนไซม์ MDH, diaphorase (DIA), isocitrate dehydrogenase (IDH), phosphoglucomutase (PGM) และ phosphoglucoisomerase (PGI) ในต้นท้อ และเช่นเดียวกับ Marquard (1987) ที่ใช้สารสกัด pH 7 ในการศึกษา ไอโซไซม์ PGI และ MDH ในต้น Pecan

Table 2 Effect of pH levels of extraction buffer on 4 enzyme banding.

Enzyme system	pH	Band appearance	Number of bands	R_f	Remarks
EST	6.5	-	-	-	-
	7.0	+	4	0.15, 0.25, 0.36, 0.5	Sharp band
	7.5	+	4	0.15, 0.25, 0.36, 0.5	Smear band
	8.0	+	4	0.15, 0.25, 0.36, 0.5	Smear band
	8.5	-	-	-	-
GOT	6.5	-	-	-	-
	7.0	+	3	0.22, 0.38, 0.46	Sharp band
	7.5	+	3	0.22, 0.38, 0.46	Sharp band
	8.0	+	3	0.22, 0.38, 0.46	Sharp band
	8.5	+	3	0.22, 0.38, 0.46	Smear band
LAP	6.5	-	-	-	-
	7.0	+	1	0.44	Sharp band
	7.5	-	-	-	-
	8.0	-	-	-	-
	8.5	-	-	-	-
MDH	6.5	-	-	-	-
	7.0	+	2	0.27, 0.39	Smear band
	7.5	+	2	0.27, 0.39	Smear band
	8.0	+	2	0.27, 0.39	Smear band
	8.5	-	-	-	-

เนื้อเยื่อที่เหมาะสม

การเปรียบเทียบส่วนต่างๆ ของต้น 5 ส่วนคือ ใบ (ตำแหน่งที่ 3 จากยอด) ใบอ่อน (ตำแหน่งที่ 1 จากยอด) ดอก (บานเต็มที่) ดอกอ่อน (ดอกตูม) และรากเพื่อสกัดเอนไซม์พบว่า ใบแสดงแถบสีคมชัดในเอนไซม์ LAPเท่านั้น ในขณะที่ใบอ่อนแสดงแถบสีคมชัดในเอนไซม์ EST, GOT และ LAP ดอกไม่มีเอนไซม์ใดที่แสดงแถบสีที่คมชัด ดอกอ่อนแสดงแถบสีคมชัดในเอนไซม์ GOT และ LAP รากแสดงแถบสีคมชัดในเอนไซม์ EST ส่วนในเอนไซม์ MDH ไม่มีเนื้อเยื่อใดที่แสดงแถบสีที่คมชัด โดยใบอ่อนและดอกอ่อนให้แถบสีที่มีรอยปื้นน้อยกว่าส่วนดอก ใบ และราก นอกจากนี้ พบว่าเอนไซม์ EST จากดอกให้จำนวนแถบสีไอโซไซม์มากที่สุด (5 แถบ) และรากให้แถบสีน้อยที่สุด (3 แถบ) ส่วนเอนไซม์ GOT, LAP และ MDH ไม่มีความแตกต่างของจำนวนแถบสีจากเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน สำหรับค่า R_f มีค่าเท่ากันในแต่ละส่วนของพืชที่ใช้เพื่อวิเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ LAP และ MDH (ตารางที่ 3) แต่ค่า R_f ของแถบสีจากเอนไซม์ EST และ GOT จะแตกต่างกันไปตามเนื้อเยื่อที่ใช้การใช้ใบอ่อนให้ความคมชัดของแถบสีที่ดีสาเหตุเป็นเพราะใบอ่อนเป็น

Table 3 Effect of plant tissues on 4 enzyme banding.

Enzyme system	Plant tissue	Band appearance	Number of bands	R_f	Remarks
EST	Young flower	+	4	0.12, 0.16, 0.25, 0.51	Smear band
	Flower	+	5	0.15, 0.28, 0.33, 0.36, 0.5	Smear band
	Leaf	+	4	0.15, 0.25, 0.36, 0.5	Smear band
	Young leaf	+	4	0.15, 0.3, 0.46, 0.53	Sharp band
	Root	+	3	0.3, 0.36, 0.53	Sharp band
GOT	Young flower	+	3	0.11, 0.28, 0.36	Sharp band
	Flower	+	3	0.11, 0.26, 0.35	Smear band
	Leaf	+	3	0.2, 0.26, 0.36	Smear band
	Young leaf	+	3	0.1, 0.26, 0.36	Sharp band
	Root	+	3	0.1, 0.2, 0.25	Smear band
LAP	Young flower	+	1	0.41	Sharp band
	Flower	+	1	0.41	Smear band
	Leaf	+	1	0.41	Sharp band
	Young leaf	+	1	0.41	Sharp band
	Root	+	1	0.41	Smear band
MDH	Young flower	+	2	0.32, 0.39	Smear band
	Flower	+	2	0.33, 0.39	More smear band
	Leaf	+	2	0.35, 0.39	More smear band
	Young leaf	+	2	0.33, 0.39	Smear band
	Root	+	2	0.32, 0.39	More smear band

ส่วนที่กำลังมีการเจริญเติบโต จึงเป็นส่วนของพืชที่มีกิจกรรมของเอนไซม์หลักสูง ที่สุด (Wendel and Weeden, 1989) ซึ่งสอดคล้องกับ รายงานของ Soltis *et al*. (1987) ที่ใช้ใบอ่อนของ *Tillandsia ionantha* และ *T. recurvata* (Bromeliaceae) จากต้นที่โตเต็มที่เพราะให้แถบสีที่คมชัดที่สุด ในทำนองเดียวกัน Al-Jibouri and Adham (1990) ใช้ใบอ่อนของต้นอินทผลัมตัวผู้ในการสกัดเอนไซม์ ในขณะที่ Mowrey *et al*. (1990) ใช้ใบอ่อนของต้นท้อ และ Apavatjrut *et al*. (1999) ใช้ใบอ่อนของพืชกลุ่มกระเจียว (*Curcuma*)

น้ำหนักชิ้นส่วนพืชที่เหมาะสม

การเปรียบเทียบน้ำหนักสดจากใบอ่อน พบว่า น้ำหนักสด 0.5 กรัม ต่อน้ำยาสกัด 1.5 มิลลิลิตร ให้แถบสีคมชัดที่สุด รองลงมาคือ 0.25 กรัม และ ที่ 0.75 กรัม แถบสีเริ่มไม่คมชัด และมีปื้นมาก (ตารางที่ 4) น้ำหนักสดของเนื้อเยื่อจากใบอ่อนที่ให้ปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาครั้งนี้ เป็นไปใน ทิศทางเดียวกับที่ Parfitt and Arulsekar (1989) ใช้ใบอ่อนหนัก 0.5 กรัม ในการศึกษาไอโซไซม์ในองุ่น 145 สายพันธุ์ ในทำนองเดียวกัน Byrne and Littleton (1988) และ Kumar *et al*. (1995) ใช้ใบอ่อน 0.5 กรัม ในการศึกษารูปแบบไอโซไซม์จากพลัมสายพันธุ์ญี่ปุ่น และจากต้น Ber (*Zizyphus mauritiana* Lam.) ตามลำดับ การใช้น้ำหนักของใบน้อยลงครึ่งหนึ่งทำให้เกิดแถบสีไม่เข้ม เป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยากับซับสเตรทน้อย และการที่เพิ่มประมาณของเนื้อเยื่อใบทำให้เกิดปื้นสี น่าจะเป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์มีมากเกินไป และ/หรือ มีสาร phenol complex ปนมากับเนื้อเยื่อมากไป

Table 4 Effect of fresh weights on 4 enzyme banding.

Enzyme system	Fresh weight (gram)	Band appearance	Number of bands	R_f	Remarks
EST	0.25	+	4	0.23, 0.37, 0.45, 0.51	Sharp, but not dark band
	0.50	+	4	0.23, 0.37, 0.45, 0.51	Sharp and dark band
	0.75	+	4	0.23, 0.37, 0.45, 0.51	Smear band
GOT	0.25	+	3	0.22, 0.38, 0.46	Sharp band
	0.50	+	3	0.22, 0.38, 0.46	Sharp band
	0.75	+	3	0.22, 0.38, 0.46	Smear band
LAP	0.25	+	1	0.42	Sharp, but not dark band
	0.50	+	1	0.42	Sharp and dark band
	0.75	+	1	0.42	Smear band
MDH	0.25	+	2	0.29, 0.39	Sharp, but not dark band
	0.50	+	2	0.29, 0.39	Sharp and dark band
	0.75	+	2	0.29, 0.39	Thick and very dark band

ความเข้มข้นของเจลที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์

การเปรียบเทียบความเข้มข้นของ separating gel ที่ 3 ระดับความเข้มข้นคือ 10, 11 และ 12 % พบว่าความเข้มข้นของ separating gel ที่ 11เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ เพราะให้แถบสีที่คมชัดกว่าที่ 10 % และสามารถวัดระยะระหว่างแถบสีได้ดีกว่าที่ได้จากการใช้ 12 % เปอร์เซ็นต์ของ separating gel ที่ใช้มีผลต่อค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ของไอโซไซม์ โดยเมื่อมีความเข้มข้นมากค่าเคลื่อนที่สัมพัทธ์จะลดลงเสมอ โดยเกิดขึ้นกับทุกเอนไซม์ที่ใช้ทดสอบ และการใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับพืชที่ทำการศึกษาจะทำให้ได้รูปแบบแถบสีที่คมชัด และลดรอยปื้นของสีได้ระดับหนึ่ง

สรุปผลการทดลอง

ปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของกล้วยไม้รองเท้านารี เมื่อพิจารณา จำนวน ขนาด และความคมชัดของแถบสี พบว่า การใช้ใบอ่อน 0.5 กรัม กับน้ำยาสกัดที่มีส่วนประกอบของ 0.1 M Tris-HCl pH 7, 1 mM EDTA, 1 % w/v PVP-360, 2 mM DTT, 10 mM β-mercaptoethanol และการใช้ separating gel 11% ในการทำโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสให้ผลดีที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

การทดลองนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ

เอกสารอ้างอิง

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส. สหมิตรออฟเซท, กรุงเทพฯ. 91 น.

อบฉันท์ ไทยทอง. 2544. กล้วยไม้เมืองไทย, พิมพ์ครั้งที่ 2. บ้านและสวน, กรุงเทพฯ. 461 น.

Al-Jibouri, A.A.M. and K.M. Adham. 1990. Biochemical classification of date palm male cultivars. J. Hort. Sci. 65(6): 725 – 729.

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

Byrne, D.H. and T.G. Littleton. 1988. Electrophoresis characterization of diploid plums of the southeastern United States. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113(6): 918 – 924.

Durham, R.E., G.A. Moore and W.B. Sherman. 1987. Isozyme banding patterns and their usefulness as genetic markers in peach. J. Amer. Soc. 112(6): 1013 – 1018.

Kumar, S., V.P. Sharma and H.C. Kapoor. 1995. Isozymic identification of cultivars of ber (*Zizyphus mauritiana* Lamk.). J. Hort. Sci. 70 (2): 303 – 306.

Marquard, R.D. 1987. Isozyme inheritance, polymorphism and stability of malate dehydrogenase and phosphoglucose isomerase in Pecan. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112(4): 717 – 721.

Moore, G.A. and G.B. Collins. 1983. New challenges confronting plant breeders. p. 25 - 59. *In* S.D. Tanksley and T.J. Orton (eds.). Isozyme in Plant Genetics and Breeding, Part A. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.

Mowrey, B.D., D.J. Werner and D.H. Byrne. 1990. Inheritance of isocitrate dehydrogenase, malate dehydrogenase, and shikimate dehydrogenase in peach and peach x almond hybrids. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115 (2): 312 – 319.

Parfitt, D. E. and S. Arulsekar. 1989. Inheritance and isozyme diversity for GPI and PGM among

grape cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 114 (3): 486 – 491.

Sotis, D. E., A. J. Gilmartin, L. Rieseberg and S. Gardner. 1987. Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionantha* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). Amer. J. Bot. 74(4): 531-537.

Wendel, J. F. and N. F. Weeden. 1989. Visualization and Interpretation of Plant Isozymes. p. 5-45. *In* D. E. Soltis and P. S. Soltis (eds.). Isozymes in Plant Biology, Advances in plant sciences series : Vol. 4. Dioscorides Press, Oregon.