บทที่ 5
วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

1. การตรวจสอบชนิดของพันธุ์กวาวโดยใช้เทคนิค ไอโซไซม์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส

การตรวจสอบชนิดของพันธุ์กวาว 5 ชนิด (species) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่าง โดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์ (Zymogram) AAT or GOT , EST , LAP , MDH และ POX พบว่ารูปแบบของไอโซไซม์ (Zymogram)มีลักษณะแตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของกวาวแต่ละชนิดก่อให้เกิดความแตกต่างในระดับโปรตีนหรือเอนไซม์ (สุคันธรสและคณะ,2535) แถบสีหลายๆลักษณะ (polymorphism) ของไอโซไซม์แต่ละชนิดจะมีความเกี่ยวข้องกับจำนวนตำแหน่ง(locus) จำนวนรูปของยีนหรืออัลลีลต่อโลกัสและโครงสร้างของไอโซไซม์ ซึ่งแถบสีที่ปรากฏบนเจลจะพบว่ามีความเข้มของแถบสีไม่เท่ากันแม้ว่าจะเป็นไอโซไซม์เดียวกัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากการแสดงออกของยีนหรืออัลลีลที่แตกต่างกัน และส่งผลให้ไอโซไซม์แต่ละชนิดมีปริมาณ โครงสร้าง และกิจกรรมของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน(อัญชลี,2536)แถบสีที่มีความเข้มมากแสดงว่ามีปริมาณและกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าแถบสีที่มีความเข้มน้อย นอกจากนี้สารบางชนิดที่ปนอยู่ในสารสกัดของตัวอย่างที่เตรียมสำหรับทำไอโซไซม์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส (Gel electrophoresis) อาจมีผลต่อจำนวนแถบสีบนแผ่นเจล สารบางชนิดที่ปนอยู่ในสารสกัด เช่น แทนนิน (tannin) ฟีนอล (phenol) (โดยเฉพาะพืชในกลุ่มกวาวจะพบว่ามีฟีนอลอยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง) อาจรบกวนแถบสีทำให้แถบสีเป็นแถบเดียวกันหรือเป็นปื้นสี (ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้จะพบในไอโซไซม์ MDH) เนื่องจากสารเหล่านี้เมื่อถูกออกซิไดส์ด้วยเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส

(phenol oxidase) ได้สารควินโนน (Quinone) ซึ่งจะไปจับกับซับสเตรท (substrate) เมื่อทำการย้อมสีจึงติดเป็นแถบเดียวหรือปื้นสีซึ่งอาจเกิดการรวมตัวกันของแถบที่อยู่บริเวณใกล้ชิดกัน (Anderson,1968 and Andrew,1984)

ผลการอ่านรูปแบบของไอโซไซม์ (Zymogram) ของกวาว 5 ชนิด (species) หลังจากย้อม acrylamide gel เพื่อศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ 5 ชนิด คือ AAT หรือ GOT , EST ,LAP, MDH และ POX พบว่ามีไอโซไซม์เพียง 4 ชนิด คือ AAT หรือ GOT , EST , MDH และ POX สามารถนำมาเปรียบเทียบเพื่อบ่งบอกความแตกต่างของตัวอย่างกวาว 5 ชนิด (species) ได้ ส่วนไอโซไซม์ LAP ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างได้เด่นชัดเนื่องจากใน *P. stricta* และ *P. alopecuroides* ไม่สามารถแยกความแตกต่างรูปแบบของไอโซไซม์ (Zymogram) ได้เพราะตำแหน่งและจำนวนแถบสีที่พบใกล้เคียงกันซึ่งเป็นเช่นเดียวกับใน *P. wallichii* และ *P. phaseoloides* สำหรับ *P. mirifica* รูปแบบของไอโซไซม์ LAP จะมีลักษณะที่แตกต่างจากกวาวทั้ง 4 ชนิด (species)คือ มีแถบจำนวน 3 แถบ

ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของตัวอย่างกวาวด้วยเทคนิคไอโซไซม์พบว่าแต่ละเอนไซม์จะให้รูปแบบของรูปแบบของไอโซไซม์ (Zymogram)ที่แตกต่างกัน ซึ่งการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีไอโซไซม์ 4 ชนิดที่สามารถนำรูปแบบของไอโซไซม์ (Zymogram)มาเปรียบเทียบความแตกต่างของกวาว 5 ชนิด (species)ได้อย่างชัดเจน คือ EST , LAP , MDH และ POX ซึ่งโดยทั่วไปพบว่า EST จะถูกใช้อย่างกว้างขวางในพืชหลายชนิด เช่น ข้าว ไผ่ (สุปราณี,2538 ,หทัยรัตน์และคณะ,2536,อัญชลี,2536) สำหรับ MDH นั้น จะปรากฏแถบสีเป็นปื้น การนับจำนวนแถบหรือกำหนดจำนวนแถบจะทำได้ค่อนข้างยากจึงไม่ค่อยนิยมใช้กันแพร่หลาย (ป่าน,2539) แต่พบว่า Lefevre และ Charrier (1993) ได้ใช้ MDH ในการจำแนกพันธุ์มันสำปะหลังได้ ขณะที่ POX แสดงความแตกต่างของแบบแผนไอโซไซม์ของกวาว 5 ชนิด (species)ได้อย่างชัดเจน แต่ใน POX เองก็มีข้อจำกัดคือเป็นเอนไซม์ที่พืช

สามารถพบในพืชได้มากกว่าปกติเมื่อมีสภาพแวดล้อมหรือสิ่งเร้าจากภายนอกมากระทบกับพืชทำให้เกิดภาวะเครียด (stress) เช่น การขาดน้ำ เป็นต้น สะดวกกับการพิจารณาเช่นเดียวกับการศึกษาของป่าน (2539) ที่พบว่า POX สามารถจำแนกชนิดของข้าวพันธุ์กะเหรี่ยงออกจากกันได้อย่างชัดเจน สำหรับ AAT หรือ GOT สามารถนำมาใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของตัวอย่างกวาวที่ศึกษาได้แต่พบว่าแถบสีที่ปรากฏมีความคมชัดของแถบสีน้อย ทำให้การพิจารณาเพื่อกำหนดค่าการมีแถบสีและไม่มีแถบสีเพื่อการวิเคราะห์ค่อนข้างยาก และLAP นั้นพบว่ารูปแบบของไอโซไซม์ (Zymogram)ของกวาวในแต่ละมีความแตกต่างกันไม่ชัดเจน

ในการศึกษาความแตกต่างของตัวอย่างกวาว 5 ชนิด (species) พบว่าไอโซไซม์ EST และ POXสามารถนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของกวาว 5 ชนิด (species) ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากมีลักษณะของ Polymorphic ที่มีจำนวนแถบสีมาก จึงมีโอกาสแสดงแถบสีที่ตำแหน่งต่างๆได้มากกว่า ในขณะที่ไอโซไซม์ AAT หรือ GOT และ LAPมีจำนวนตำแหน่งแถบสี ที่เกิดได้น้อยกว่าคือ 6 และ 4 ตามลำดับ สำหรับ MDH มีจำนวนตำแหน่งที่เกิดแถบสีมากแต่แถบสีที่ปรากฏจะเป็นปื้นสียากต่อการพิจารณา

เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรม (activity)ของไอโซไซม์ที่สกัดจากตัวอย่างกวาวสดกับสกัดจากตัวอย่างกวาวที่เก็บไว้ในรูปผงบดละเอียดที่อุณหภูมิ - 20 ^{0} C นานกว่า 6 เดือนพบว่าในไอโซไซม์ทั้ง5ชนิดที่ศึกษาครั้งนี้จะมีกิจกรรมที่ทำกับซับสเตรทลดลงโดยพิจารณาจากการเกิดจำนวนแถบและความเข้มของแถบสี ซึ่งไอโซไซม์ที่มีกิจกรรมลดลงมากได้แก่ EST และ POXโดยจะพบว่ามีแถบสีหายไปและแถบสีที่ยังปรากฏให้เห็นจะมีความเข้มของสีลดลง สำหรับ AAT หรือ GOT , LAP และ MDH กิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลงซึ่งสามารถสังเกตเห็นได้คือ ความเข้มของแถบสีที่ปรากฏจะลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างกวาวที่ศึกษา 5 ชนิด (species) กิจกรรมของไอโซไซม์ที่สกัดได้จากตัวอย่างกวาวที่เก็บไว้นานกว่า 6 เดือน ใน *P. mirifica* , *P. stricta* และ *P. wallichii* จะลดลงมากกว่าใน *P. alopecuroides* และ

P. phaseoloides ในเกือบทุกไอโซไซม์ (จากรูปที่ 7,9,11,13 และ 15) ดังนั้นในการศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ควรจะใช้ตัวอย่างพืชสดเพื่อนำมาสกัดไอโซไซม์

2. การตรวจสอบชนิดของพันธุ์กวาวโดยใช้เทคนิค RAPD

การศึกษาความแตกต่างของกวาว 5 ชนิด (species)โดยใช้เทคนิค RAPD โดยการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งที่ใช้ในครั้งนี้มีจำนวน 30 ชนิด (ภาคผนวก) พบว่ามี primer 12 ชนิดที่สามารถทำให้เกิดแบบแผนของลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint)ในกวาวได้โดยแบบแผนของลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint) ในแต่ละตัวอย่างจะมีแบบแผนของลายพิมพ์ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint) เฉพาะในแต่ละ primer

ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของกวาว 5 ชนิด (species) โดยการใช้ primer 12 ชนิดจะพบว่าแบบแผนของลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint) ที่เกิดจาก primer OPA 05 , OPAH 17 , OPK 14 , OPW 14 (รูปที่ 18,19)มีลักษณะที่คมชัด จำนวนแถบที่เกิดในกวาวแต่ละ ชนิด (species) สามารถนำมาพิจารณา กำหนดค่าการปรากฏแถบและไม่ปรากฏแถบได้ สำหรับ primer OPE 15, OPE 20 , OPAA 07, OPAQ 05 , OPAC 14 แบบแผนของลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint) ที่เกิดขึ้นไม่มีความคมชัดทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณของ ดี เอ็น เอ ที่เป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนของ ดี เอ็น เอ ต้นแบบ (DNA template)ในปริกิริยา PCR มีปริมาณน้อยจึงไม่สามารถแสดง polymorphism ออกมาให้เห็นได้อย่างชัดเจน ในprimer OPA 19 และ OPAJ 04 จะไม่ปรากฏแถบใน *P. mirifica* แต่สามารถเกิดแถบได้ในกวาวที่ศึกษา 4 ชนิด (species) ทั้งนี้อาจเนื่องจากลำดับเบส (base sequence) ของ primer ไม่สามารถเข้าจับกับเบสบนสาย ดี เอ็น เอ ของกวาว (non-complementary)ได้ เนื่องจากในการทำปฏิกิริยา PCR จะได้ผลหรือมีแถบปรากฏได้เพราะ

ลำดับเบสของ primer จะต้องเข้าไปจับกับ ดี เอ็น เอ ต้นแบบ (DNA template)จึงจะสามารถเพิ่มจำนวนของดี เอ็น เอ ต้นแบบ (DNA template) ให้มีจำนวนเพิ่มขึ้น และ ดี เอ็น เอ ต้นแบบ (DNA template) ที่เป็นชิ้นส่วนเล็กๆก็จะเป็นสาเหตุหนึ่งที่จะเข้าไปรบกวนการจับกันของ primer กับ ดี เอ็น เอ ต้นแบบ (DNA template) จะมีผลทำให้เกิดเป็นปื้นสีเมื่อนำเจลไปย้อมด้วย Ethidium bromide

การเคลื่อนที่ของ ดี เอ็น เอ ในสนามไฟฟ้าโดยมีตัวกลางค้ำจุน(Agarose gel) จะพบว่า ดี เอ็น เอ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากจะพบว่าตำแหน่งของแบนที่ปรากฏจะพบอยู่บริเวณตอนบนของเจล และที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะมีตำแหน่งเคลื่อนที่อยู่ด้านล่างของเจล ซึ่งจากการวิจัยครั้งนี้พบว่า primer OPK 14 ,OPW 14 , OPA 05 OPAH 17สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของกวาว 5 ชนิด (species) ได้

เมื่อพิจารณาจาก Dendrogram ซึ่งเป็นผลจากการนำค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง (Coefficient)เปรียบเทียบความแตกต่างของกวาว 5 ชนิด (species) โดยใช้ไอโซไซม์ 5 ไอโซไซม์(AAT or GOT , EST , LAP , MDH และ POX)และ เทคนิค RAPD ซึ่งเป็นผลจากการใช้ 4 ชนิด(primer OPK 14 ,OPW 14 , OPA 05 OPAH 17)จะให้ผลเหมือนกันกล่าวคือแยกกวาวออกได้เป็น 2 กลุ่มตามความแตกต่างกัน โดยมี กลุ่มที่ 1 *P. wallichii* มีความแตกต่างกับ *P.phaseoloides* น้อยที่สุดและ *P.alopecuroides* มีความแตกต่างกับ *P. wallichii* และ *P.phaseoloides* น้อยกว่า *P.mirifica* และ *P.stricta* ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ 2

สรุปผลการทดลอง

1.การแยกความแตกต่างของกวาวโดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์ (Zymogram) 5 ชนิด พบว่า EST และ POX สามารถแยกความแตกต่างของกวาว 5 ชนิด (species) ได้อย่างชัดเจน สำหรับ AAT or GOT และ MDH สามารถใช้แยกความแตกต่างของกวาวได้แต่การพิจารณาจะค่อนข้างยากเนื่องจากความคมชัดของแถบแบนมีน้อยและการติดเป็นปื้นสีใน MDH สำหรับ LAP นำมาใช้แยกความแตกต่างของกวาว 5 ชนิด (species) ได้ไม่ชัดเจน เนื่องจากกวาวบางชนิด (species) (P. stricta และ P.alopecuroides , P.wallichii และ P. phaseoloides)จะมีรูปแบบของไอโซไซม์ (Zymogram) LAP เหมือนกัน

2.ในการสกัดไอโซไซม์จากตัวอย่างกวาวควรใช้ตัวอย่างสดเพราะการเก็บตัวอย่างไว้นานเกินไปมีผลทำให้กิจกรรม (activity)ของเอนไซม์ที่จะทำกับซับสเตรทลดลง มีผลทำให้ความคมชัดของแถบสีจะลดลงและบางแถบสีจะหายไป

3. การเปรียบเทียบความแตกต่างของกวาวโดยใช้เทคนิค RAPD โดยใช้ primer 30 ชนิด พบว่ามี primer เพียง 4 ชนิดที่สามารถนำแบบแผนของลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint)มาพิจารณาเพื่อแยกความแตกต่างของกวาว 5 ชนิด (species) คือ OPK 14, OPW 14, OPA 15 และ OPAH 17

4. การใช้เทคนิคไอโซไซม์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส และเทคนิค RAPD ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของกวาว 5 ชนิด (species) พบว่าผลการทดลองทั้ง 2 วิธีให้ผลการทดลองที่คล้ายคลึงกันและสนับสนุนซึ่งกันและกัน