วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาไอโซไซม์ทั้ง 5 ระบบ ซึ่งประกอบด้วย ไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดส (Prx) ไอโซไซม์กลูตาเมต ออกซาโลอะซิเตต ทรานสะมิเนส (GOT) ไอโซไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (Pgm) ไอโซไซม์กลูโคสฟอสเฟต ไอโซเมอเรส (Pgi) และ ไอโซไซม์ลิวซีนอะมิโนเปบติเดส(LAP) พบว่าปัจจัยต่าง ๆที่ศึกษา คือ ชนิดของเอนไซม์ เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของตัวกลาง ชนิดของสารสกัดเอนไซม์ และอายุกล้า มีผลต่อการปรากฏแถบของไอโซไซม์ทั้งสิ้น นอกจากปัจจัยดังกล่าวแล้วยังมีปัจจัยอื่น ๆที่ทำให้ผลของการวิเคราะห์เปลี่ยนแปลงได้ ปัจจัยเหล่านี้ประกอบด้วยปัจจัยที่เกี่ยวกับตัวพืช เช่น ความเครียดที่เกิดกับพืช (Thom และ Maretzki, อ้างถึงใน Peirce และ Brewbaker, 1973 ; Gerloff *et al.*, 1967 ; Mclown *et al* ., 1967) สารเคมี (Gasper *et al.*, อ้างถึงใน Udomprasert และ Attathom 1991) การซ่อมแซมเซลล์ที่เป็นแผล (Birecka *et al.*, 1975 ; Espelie *et al.*, 1986 และ Lagrimini และ Rothstien, 1987) การเข้าทำลายของเชื้อโรค (Peirce และ Brewbaker , 1973 และ Udomprasert และ Attathom, 1991) ส่วนปัจจัยภายนอก เช่น ปริมาณของตัวอย่างที่ใช้ ชนิดของสารสกัด ความเข้มข้นของตัวกลาง ระดับความเป็นกรดด่างของตัวกลางและสะพานไฟ รวมถึงขั้นตอนการทำงานของเครื่องและวิธีการย้อมเอนไซม์ (Peirce และ Brewbaker, 1973) ดังนั้นในการศึกษาทางด้านอิเลคโตรโฟเรซีสควรต้องมีการศึกษาระบบ วิธีการ อายุของพืช และปัจจัยอื่น ๆอย่างละเอียดและเลือกวิธีการที่เหมาะสมมาใช้จะทำให้ผลที่ได้ถูกต้องแม่นยำ เช่น ในการศึกษาไอโซไซม์ 5 ชนิด ในพริกพันธุ์ห้วยสีทน พบว่า ถ้าเป็น Prx อายุกล้าที่เหมาะสมคือตั้งแต่ 35 วันและความเข้มข้นของตัวกลางที่เป็นโพลีอะคริลาไมด์ที่เหมาะสมคือ 10 เปอร์เซ็นต์จะทำให้แถบที่ได้ทั้ง 3 แถบคมชัดแต่ถ้าเปลี่ยนความเข้มข้นของตัวกลางเป็น 7.5 % จะพบว่าการเคลื่อนที่ของเอนไซม์เร็วขึ้นเนื่องจากรูพรุนของตัวกลางมีขนาดใหญ่ขึ้นทำให้แถบที่ปรากฏเป็นแถบกว้าง ไม่คมชัด เช่นเดียวกับไอโซไซม์ GOT ซึ่งพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวกลางคือ 7.5 % ส่วนการศึกษาระบบไอโซไซม์ Pgm พบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดแถบของไอโซไซม์มีทั้งความเข้มข้นของตัวกลางและชนิดของสารสกัด นอกจากปัจจัยดังกล่าวแล้วยังพบว่าน้ำคั้นที่ได้จากส่วนทั้งหมดของใบมะเขือเทศ (crude extraction) และส่วนน้ำคั้นที่แยกเฉพาะส่วนของคลอโรพลาสต์ (isolated chloroplast) เมื่อนำมาทำอิเลคโตรโฟเรซีสจำนวนแถบของไอโซไซม์ที่ได้แตกต่างกัน โดยพบว่า แถบของไอโซไซม์ Pgm ที่ได้จากส่วนที่เป็นน้ำคั้นทั้งหมดปรากฏแถบ

2 แถบ ส่วนในน้ำคั้นที่สกัดเฉพาะส่วนของคลอโรพลาสต์ จะมีแถบของไอโซไซม์ปรากฏแถบเพียง 1 แถบ (Tanksley, 1979) และจากการทดลองของ Weeden และคณะ (1988) พบว่าไอโซไซม์ Pgm เป็นไอโซไซม์ที่เฉพาะเจาะจงในพลาสติดและส่วนของไซโตซอล ส่วนไอโซไซม์ Pgi ที่ศึกษาในองุ่นก็พบว่าเป็นไอโซไซม์ที่จำเพาะเจาะจงในพลาสติดเช่นเดียวกันกับ Pgm โดยแถบที่ปรากฏในน้ำคั้นพืชทั้งหมด จะปรากฏทั้ง 2 โลไซ คือ Pgi-1 และ Pgi-2 แต่ถ้าเป็นน้ำคั้นที่สกัดเฉพาะส่วนของคลอโรพลาสต์ จะพบเพียง Pgi-1 เท่านั้น สำหรับไอโซไซม์ LAP ที่ศึกษาในองุ่น พบว่า LAP สามารถจำแนกพันธุ์องุ่น 2 พันธุ์ที่มีชนิดต่างกันได้ คือพันธุ์ Aurore ที่เป็นลูกผสมสามทาง (three way cross hybrid) ระหว่างองุ่นที่อยู่ในชนิด (species) *Vitis vinifera* x *V. rupestis* ผสมกับ *V. lincecumii* และ พันธุ์ Cayuga White ที่เป็นพันธุ์ลูกผสมคู่ (double crooss hybrid) ระหว่างองุ่นที่อยู่ในชนิด *V. labrusca* x *V. labrusca* ผสมกับ V. *rupestis* x *V. lincecumii* ได้ (Weeden *et al.*, 1988) แต่จากการทดลองในพริกพันธุ์ห้วยสีทน ไอโซไซม์ LAP ไม่ปรากฏแถบ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยที่ศึกษาไม่เหมาะสม

ในการใช้ไอโซไซม์ที่ศึกษามาจำแนกชนิดและพันธุ์ของพริก พบว่า Prx สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดที่เป็น *C. annuum.* (พริกห้วยสีทนและพริกช่อ มช.) *C. frutescens.*(พริกพื้นเมืองจังหวัดเลย พันธุ์ปากปวน) ได้แต่ไม่สามารถแยกระหว่างพันธุ์ที่อยู่ในชนิดเดียวกัน ส่วน GOT จากการทดลองไม่สามารถแยกความแตกต่างทั้งในชนิดและพันธุ์ได้ ทั้งนี้เนื่องมาจากข้อจำกัดในการใช้ไอโซไซม์มาจำแนกพันธุ์ในพริก ดังเช่นในการศึกษาของ Marino *et al.*, (1992) ได้ศึกษาพริกทั้งหมด 16 ประชากรที่อยู่ในชนิดที่เป็น *C. annuum* L. var. annuum. โดยใช้ไอโซไซม์ทั้งหมด 10 ชนิด ผลที่ได้พบว่าไม่พบความแตกต่างของรูปแบบของไอโซไซม์เกิดขึ้นเช่นเดียวกับการศึกษาการจัดหมวดหมู่พบว่าประชากรในกลุ่มเดียวกันให้ลักษณะทางไอโซไซม์เหมือนกัน (Jarsen *et al.*, ; McLeod *et al.*, อ้างถึงใน Marino *et al.*, 1992) โดยทั่วไปสกุล Capsicum จะมีลักษณะภายนอกแตกต่างกันอย่างมากมายแต่อย่างไรก็ตามลักษณะที่เปลี่ยนแปลงทางไอโซไซม์ไม่สัมพันธ์กับลักษณะภายนอกเสมอไปตัวอย่างเช่น *C. cardennasii* และ *C. eximium* เป็นพริกที่สามารถแยกได้โดยใช้ลักษณะภายนอกได้อย่างง่ายดาย แต่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางไอโซไซม์แยกได้ (Marino *et al.*, 1992) ส่วนในการศึกษาการแยกสปีชีสผีของพริก 3 ชนิด คือ *C. annuum* *C. baccatum* และ C. chacoense โดยใช้ไอโซไซม์ 5 ชนิด พบว่า ไอโซไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ไดมิวเตส (SOD) สามารถแยกความแตกต่างของทั้ง 3 ชนิด ได้ ส่วน GOT Pgm ไอโซซิเตตดีไฮโดรจีเนส (IDH) และ

ชิกิเมตดีไฮโดรจีเนส (SKDH) สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *C. annuum* กับ *C. chacoense* และ *C. baccatum* กับ C. chacoense ได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *C. annuumm* กับ *C. baccatum* ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาหา มาร์คเกอร์ ขึ้นเพื่อสร้างความแตกต่างของลักษณะทางไซโมแกรมในพันธุ์ที่อยู่ในชนิดเดียวกันเพื่อประโยชน์ทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ การขอสิทธิบัตรพันธุ์ การสร้างสายพันธุ์ลูกผสมที่สามารถใช้คุณสมบัติทางไอโซไซม์จำแนกลูกผสมออกจากสายพันธุ์พ่อ แม่ โดยได้มีการศึกษาในพริกหวาน (*C. annuumm*) ซึ่งเป็นพริกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้มีการถ่ายลักษณะความแตกต่างทางไซโมแกรมจากพริกที่มาจากชนิดที่เป็น *C. baccatum* และ *C. chacoense* และทำการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมกลับ (Andrzejewski, 1992)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาระบบของอิเลคโตรโฟเรซีส ทั้ง 5 ระบบและอายุกล้าที่เหมาะสมนั้นพบว่าแถบของไอโซไซม์ Prx ที่ได้จากต้นกล้าพริกอายุตั้งแต่ 35 วันขึ้นไป จะให้แถบที่คมชัดเมื่อใช้ความเข้มข้นของตัวกลาง 10 เปอร์เซ็นต์ แถบที่ปรากฏมี 3 แถบ โดยที่สารสกัดทั้ง 2 ชนิด ให้ผลเช่นเดียวกัน ส่วนแถบไอโซไซม์ GOT พบว่าทุกระยะการเจริญเติบโตที่นำมาศึกษา ให้แถบที่มีความคมชัดดีเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะเมื่อใช้ตัวกลางที่มีความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์ โดยจะปรากฏแถบของไอโซไซม์ 2 แถบ ซึ่งสารสกัดทั้ง 2 ชนิด ให้ผลไม่แตกต่างกัน ส่วนการศึกษาระบบของไอโซไซม์ Pgm และ Pgi พบว่า แถบไอโซไซม์จากกล้าระยะต่าง ๆที่นำมาศึกษา ให้แถบที่มีความคมชัดเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของตัวกลาง 10 เปอร์เซ็นต์จะให้แถบที่คมชัด แต่ผลของสารสกัดทั้งสองชนิดให้ผลแตกต่างกัน โดยในการศึกษาไอโซไซม์ Pgm จำนวนแถบของไอโซไซม์ที่ใช้สารสกัดชนิดที่ 1 ปรากฏแถบ 2 แถบ แต่ถ้าใช้สารสกัดชนิดที่ 2 จะปรากฏแถบ 3 แถบ ส่วนไอโซไซม์ Pgi จำนวนแถบที่ได้จะได้ 2 แถบเท่ากัน แต่แตกต่างกันที่การเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ โดยพบว่าตำแหน่งที่ 2 ของแถบไอโซไซม์จากกล้าพริก อายุ 25 และ 55 วัน ที่ได้จากสารสกัดชนิดที่ 2 จะเคลื่อนที่ช้ากว่าตำแหน่งที่ 2 ของแถบที่ได้จากสารสกัดชนิดที่ 1

เมื่อเปรียบเทียบสายพันธุ์พริกโดยใช้วิธีทางอิเลคโตรโฟเรซีสที่สามารถทำได้รวดเร็วเหมาะสม และประหยัดพบว่าไอโซไซม์ Prx และ GOT เป็นระบบที่ประหยัดค่าใช้จ่ายโดยในการย้อมหนึ่งครั้งเสียค่าใช้จ่ายประมาณ 100 บาท เมื่อเทียบกับ Pgm และ Pgi ซึ่งในการย้อมแต่ละครั้งจะเสียค่าใช้จ่ายประมาณ 2,000 บาท โดยจากการศึกษาพบว่าไอโซไซม์ Prx อายุกล้าที่เหมาะสมเริ่มตั้งแต่ 35 วัน ส่วน ไอโซไซม์ GOT สามารถใช้กล้าพริกอายุ 25 วันเป็นต้นไป ในการทดลองแยกพันธุ์พริก 3 พันธุ์ คือ ห้วยสีทน (*Capsicum annuum L.*) พริกช่อ มช. (*C. annuum L.*) และพริกพื้นเมืองจ.เลย พันธุ์ปากปวน (*C. frutescens L.*) พบว่า จากการศึกษาไอโซไซม์ GOT แถบของไอโซไซม์ที่ปรากฏของทั้ง 3 สายพันธุ์ มี 2 แถบ มีค่า Rf เท่ากัน จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ทั้ง 3 ได้ ส่วนการศึกษาการแยกสายพันธุ์พริกโดยใช้ไอโซไซม์ Prx พบว่า ค่า Rf ของพริกพันธุ์ห้วยสีทนและพริกช่อ มช ซึ่งเป็นพริกที่อยู่ในชนิด *Capsicum annuum L.*หมือนกันมีค่าเท่ากัน ส่วนค่า Rf ของพริกพันธุ์ ปากปวน (*C. frutescens L.*) ในตำแหน่งที่ 2 มีค่า Rf แตกต่างจากตำแหน่งที่ 2 ของพริกพันธุ์ห้วยสีทนและพริกช่อ มช. จากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าไอโซไซม์

Prx นอกจากจะเป็นระบบที่ประหยัดค่าใช้จ่ายแล้วยังสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพริกที่อยู่ในชนิดที่เป็น *C. annuum L.* และ *C. frutescens L.* ได้แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพริกที่อยู่ในชนิดเดียวกัน คือ *C. annuum L.* ได้.

จากปัญหาหลายประการที่กล่าวมานั้นอาจมีผลทำให้การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพริกโดยใช้ไอโซไซม์มีข้อจำกัดมากขึ้นจึงได้มีการแก้ปัญหาโดยมีผู้ทำการศึกษาในระดับองค์ประกอบภายในของเซลล์ เช่น ดีเอ็นเอ โดยการทำแผนที่ยีนโดยเทคนิค RFLP (Restriction Fragment Lenght Polymorphism) ในการแยกระหว่างลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อแม่ ในพริก (*C . annumm*) (Livneh *et al* ., 1990) แต่เนื่องจากวิธี RFLP เป็นวิธีที่ต้องใช้เวลาและมีความซับซ้อนมาก ในทางปฏิบัติถ้าจะนำวิธีการนี้มาใช้แยกลูกผสมทางการค้าอาจไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงได้มีการประยุกต์ใช้วิธี RFLP โดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ให้มีปริมาณมากขึ้นเป็นหลายเท่าในระยะเวลาไม่นาน แล้วจึงนำมาทำอิเลคโตรโฟเรซีสโดยการย้อม ดีเอ็นเอ ด้วยเอธทิเดียมโบรไมด์ (ethydium bromide) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง ดีเอ็นเอ ของลูกผสมกับสายพันธุ์แม่ ((Livneh *et al*., 1992) อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าวิธีการดังกล่าวยังมีความซับซ้อนอยู่มากซึ่งคาดว่าในอนาคตคงมีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคนี้ต่อไปอย่างไม่หยุดยั้งเพื่อให้เหมาะสมกับชนิดพืชและจุดประสงค์ของแต่ละการทดลอง โดยเฉพาะเพื่อให้มีความเป็นไปได้สูงที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชและทางการค้ามากขึ้น