บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ผักกาดขาวปลี [Chinese cabbage : *Brassica campestris* Linn. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson] (Li, 1981) จัดอยู่ในพืชวงศ์กะหล่ำ (Cruciferae) ซึ่งพืชในวงศ์นี้จำแนกเป็น 51 สกุล ดังตารางที่ 2.1 จำนวนชนิดทั้งหมดมีถึง 218 ชนิด และมีชนิดย่อยหรือพันธุ์มากกว่า 300 ชนิด พวกที่มีชนิดเดียวมีจำนวน 22 สกุล และสกุล *Brassica* มีจำนวนชนิดมากที่สุด คือ 37 ชนิด (Gomez-Campo, 1980) ผักกาดขาวปลีมีช่อดอกแบบช่อกระจะ (raceme) ดอกสมบูรณ์เพศ ประกอบด้วยกลีบเลี้ยง 4 กลีบ กลีบดอก 4 กลีบ เกสรเพศผู้ 6 อัน ก้านเกสรเพศเมีย 1 อัน และยอดเกสรเพศเมีย 1 อัน รังไข่แบบเหนือวงกลีบ (superior ovary) มีออวุลตะแคง (campylotropous) จำนวน 2 แถว วงเกสรเพศผู้เป็นแบบยาวสี่สั้นสอง (tetradynamous) คือ มีเกสรเพศผู้ยาว 4 อัน และสั้น 2 อัน กลีบดอกสีเหลืองสด ดอกจะเริ่มบานในช่วงบ่ายและบานเต็มที่ตอนเช้าอีกวัน การถ่ายเรณูจะอาศัยแมลงโดยเฉพาะผึ้ง (Opena *et al.*, 1988)

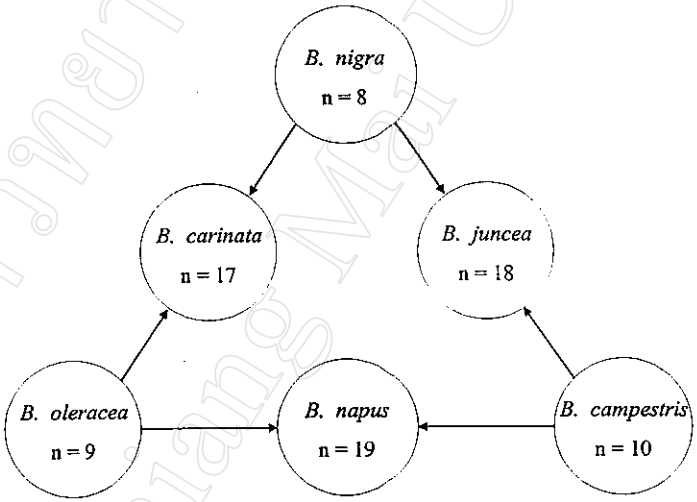
ตารางที่ 2.1 พืชในวงศ์กะหล่ำ (ตัวเลขข้างหลังในวงเล็บ คือ จำนวนชนิดในแต่ละสกุล)

Ammosperma (1)	Erucaria (8)	Pseuderucaria (3)
Boleum (1)	Erucastrum (11)	Pseudofortuynia (1)
Brassica (37)	Euzomodendron (1)	Psychine (1)
Cakile (7)	Fezia (1)	Quezelia (1)
Carrichtera (1)	Foleyola (1)	Raffenaldia (2)
Ceratocnemum (1)	Fortuynia (2)	Raphanus (3)
Chalcanthus (1)	Guiraoa (1)	Rapistrum (2)
Conringia (6)	Hemicrambe (2)	Reboudia (2)
Cordylocarpus (1)	Hirschfeldia (2)	Rytidocarpus (1)
Crambe (31)	Hutera (12)	Savignya (2)
Crambella (1)	Kremeriella (1)	Schouwia (2)
Didesmus (2)	Moricandia (8)	Sinapidendron (4)
Diplotaxis (20)	Morisia (1)	Sinapis (7)

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Douepia (1)	Muricaria (1)	Succowia (1)
Enarthrocarpus (5)	Otocarpus (1)	Trachystoma (3)
Eremophyton (1)	Oudneya (2)	Vella (3)
Eruca (4)	Physorrhinchus (2)	Zilla (2)

พืชผักในสกุล *Brassica* มีการเจริญแพร่กระจายทั้งในโลกเก่าและใหม่ ประกอบด้วย 6 ชนิด คือ *B. nigra* Koch (n = 8, จีโนม B), *B. oleracea* L. (n = 9, C) และ *B. campestris* L. (n = 10, A) ซึ่งเป็น 3 ชนิดพื้นฐานของอีก 3 ชนิดที่เป็นพวก amphidiploid คือ *B. carinata* Braun (n = 17, BC), *B. juncea* Coss. (n = 18, AB) และ *B. napus* L. (n = 19, AC) (Nishi, 1980) (ดังรูปที่ 2.1)



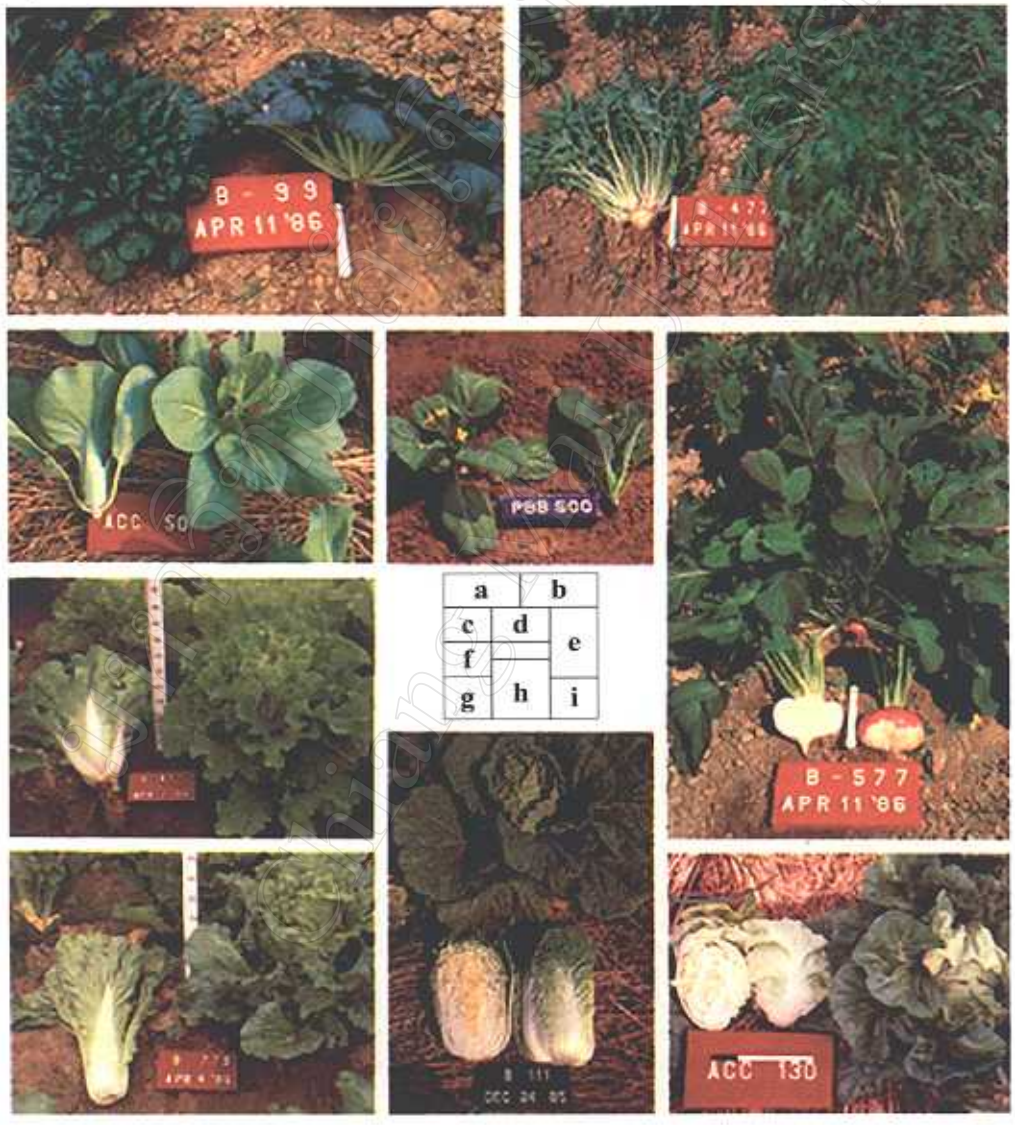
รูปที่ 2.1 จำนวนโครโมโซมและจีโนมของ *Brassica* ทั้ง 6 ชนิด (Opena *et al.*, 1988)

โดยทั่วไปพืชพันธุ์ป่าของชนิด *B. campestris* มีถิ่นกำเนิดบริเวณที่ราบสูง Irano-Turanian (Tsunoda, 1980) ในบริเวณ Mediterranean (Opena *et al.*, 1988) และพืชชนิด *B. campestris* สามารถแบ่งย่อยได้หลายชนิด คือ (ดังรูปที่ 2.2)

1. *B. campestris* ssp. *campestris* มีลักษณะเป็น leafy vegetable ที่เก่าที่สุดในพืชกลุ่ม *B. campestris* มีก้านดอกและใบซ้อนกันเป็นกระจุก (rosette) ใช้บริโภคได้ พืชชนิดย่อยนี้ไม่ได้พัฒนาแตกต่างไปจาก oil rape seed ของจีนมากนัก ซึ่งเป็นการสนับสนุนบรรพบุรุษร่วมกันของกลุ่ม leafy vegatable ทั้งหมดของ *B. campestris* (Opena *et al.*, 1988) ในประเทศอินเดีย

B. campestris และ *B. campestris* var. *sarson* ซึ่งเป็นชนิดที่เกี่ยวข้องกัน (related specie) จะปลูกเป็นพืชที่เมล็ดมีน้ำมัน (oil seed crop) (Nishi, 1980 ; Opena *et al.*, 1988)

2. *B. campestris* ssp. *chinensis* มีชื่อเรียกว่า pak choi พืชกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะไม่เข้าปลี ซึ่งมีหลายชนิด คือ ชนิดก้านใบแคบเมื่อตัดตามขวางจะมีลักษณะกลม และชนิดก้านใบกว้าง เมื่อตัดตามขวางจะมีลักษณะแบน ก้านใบมีสีขาวและเขียว มีความแตกต่างในเรื่องขนาด สีใบ เป็นต้น ความแตกต่างในชนิดย่อยนี้มีจุดสังเกตที่แน่นอนมากกว่าพืชในกลุ่ม leafy vegetable อื่นๆ ของสกุล *Brassica*



รูปที่ 2.2 ชนิดย่อยของพืชในชนิด *B. campestris* : (a) ssp. *narinosa* (b) ssp. *japonica* (c) ssp. *chinensis* (d) ssp. *parachinensis* (e) ssp. *rapa* และในชนิดเข้าปลีของ ssp. *pekinensis* (f) semiheading (g) cylindrical (h) typical temperate (i) typical tropic

3. *B. campestris* ssp. *japonica* พืชกลุ่มนี้จะมีลักษณะคล้ายคลึงกับ *B. juncea* เช่น การสร้างก้านใบและผล (silique) และขนาดของเมล็ด ก้านช่อดอกของทั้งสองชนิดจะไม่ถูกใบมาหุ้มปิดไว้

4. *B. campestris* ssp. *narinosa* มีชื่อเรียกว่า chinese flat cabbage ต้นมีขนาดพอเหมาะและอ้วนเตี้ย ทรงพุ่มต้นหนา ใบย่นและกว้าง ก้านใบสีขาว ทนต่ออากาศเย็น ใบกรอบและก้านใบหนาเหมาะสำหรับการเตรียมเป็นผักต้ม

5. *B. campestris* ssp. *oleifera* เป็นพืชที่ให้ผลผลิตเป็นน้ำมัน ต้นมีกิ่งแขนงจำนวนมาก มีการพัฒนาของผลและเมล็ดดีมาก

6. *B. campestris* ssp. *parachinensis* มีชื่อเรียกว่า flowering chinese cabbage และถูกอ้างว่ามีต้นกำเนิดมาจาก *B. chinensis* เพราะมีสัณฐานวิทยาของก้านใบคล้ายคลึงกัน อย่างไรก็ตาม ชนิดย่อยนี้จะแทงช่อดอกและกิ่งก้านเร็ว และจำนวนมากจากซอกใบ (axillary leaf) ก้านช่อดอกเป็นส่วนที่นำมาบริโภค

7. *B. campestris* ssp. *pekinensis* จะประกอบด้วยชนิดเข้าปลีเป็นส่วนใหญ่ ปลีจะมีระดับความแตกต่างของการเข้าปลี และอาจแบ่งได้เป็นชนิดปลีหลวม กึ่งเข้าปลี และเข้าปลีแน่น นอกจากนี้รูปร่างปลีมีหลายแบบ เช่น ยาว สั้น กลมหรือแบนด้านบน ใบจะซ้อนทับหรือเป็นปลายแหลมด้านบน เป็นต้น

8. *B. campestris* ssp. *rapa* or *rapifera* แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดเอเชีย และ ยุโรป โดยชนิดเอเชียจะมีความแตกต่างจากชนิดยุโรป คือ ใบจะเรียบ และเกลี้ยง รากแก้ว (tab root) มีการเจริญดีซึ่งเป็นส่วนที่ใช้บริโภค ในชนิดเอเชียมีการปรับปรุงพันธุ์ที่ดีมากในระหว่างการเพาะปลูกที่ยาวนาน (Opena *et al.*, 1988)

ผักกาดขาวปลีมีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน แต่จะไม่พบพันธุ์ป่าดั้งเดิมในบริเวณนี้ โดยจะพบ *B. campestris* ssp. *rapa* (turnip) และ *B. juncea* (mustard) เป็นพืชที่ปลูกในจีนตอนเหนือเมื่อศตวรรษที่ 5 จนถึงศตวรรษที่ 7 โดย turnip จะปลูกทางตอนเหนือของจีนเท่านั้น ส่วน pak choi จะปลูกทางตอนใต้ของจีน (Li, 1981) ซึ่งผักกาดขาวปลีอาจเกิดจากการถ่ายเรณูข้ามตามธรรมชาติระหว่าง turnip และ pak choi (Li, 1981 ; Shu และ Chun, 1996) ต่อมาในศตวรรษที่ 10 ผักกาดขาวปลีได้ถูกบันทึกในหนังสือทางการแพทย์ชื่อ Ben-Cao-Tou-Jing (The Classic of Illustrated Medical Herbs) ซึ่งที่เมือง Young-Chou เป็นศูนย์กลางของส่วนเหนือและใต้ของ Great canal ที่เชื่อมต่อระหว่างจีนตอนเหนือและใต้ และมีผักชนิดหนึ่งมีชื่อเรียกว่า " ox-stomach cabbage " (Li, 1981)

Li (1981) ได้จัดจำแนกผักกาดขาวปลีตามลักษณะสัณฐานวิทยา นิเวศน์วิทยา และทางเศรษฐกิจ ซึ่งได้จากการสำรวจพื้นที่ขนาดใหญ่ที่ปลูกผักกาดขาวปลีพันธุ์ท้องถิ่นได้เป็น 4 พันธุ์ (variety) คือ (ดังรูปที่ 2.3)

1. พันธุ์ใบหรือเข้าปลีหลวม [A ; loose-leaved variety (var *dissoluta* Li)] ตายอดไม่พัฒนา ไม่เข้าปลีหรือเข้าปลีหลวมๆ ใบเป็นรูปใบหอกกลับ (oblanceolate) ซ้อนกันเป็นกระจุก ใบกางออกหรือตั้งตรง

2. พันธุ์กึ่งเข้าปลี [B ; semi-heading variety (var *infarcta* Li)] ตายอดและใบข้างนอกมีการพัฒนาดีสมควร มีการเข้าปลี แต่ตรงกลางปลีจะเป็นโพรงหรือไม่เข้าปลี ต้นมีขนาดใหญ่และสูง ใบเป็นรูปใบหอกกลับซ้อนกันเป็นกระจุกและตั้งตรง ปลีมีการพัฒนาปานกลางและใบที่ซ้อนกันเป็นกระจุกใช้บริโภค

3. พันธุ์เข้าปลีปลายฟู [C ; fluffy-topped heading variety (var *laxa* Tsen *et* Lee)] ตายอดพัฒนาดี เข้าปลีแน่น ต้นมีขนาดเล็ก ปลายใบด้านบนม้วนหยักและฟู ใบเป็นรูปไข่กลับ (obovate) ซ้อนกันเป็นกระจุกและกางออก

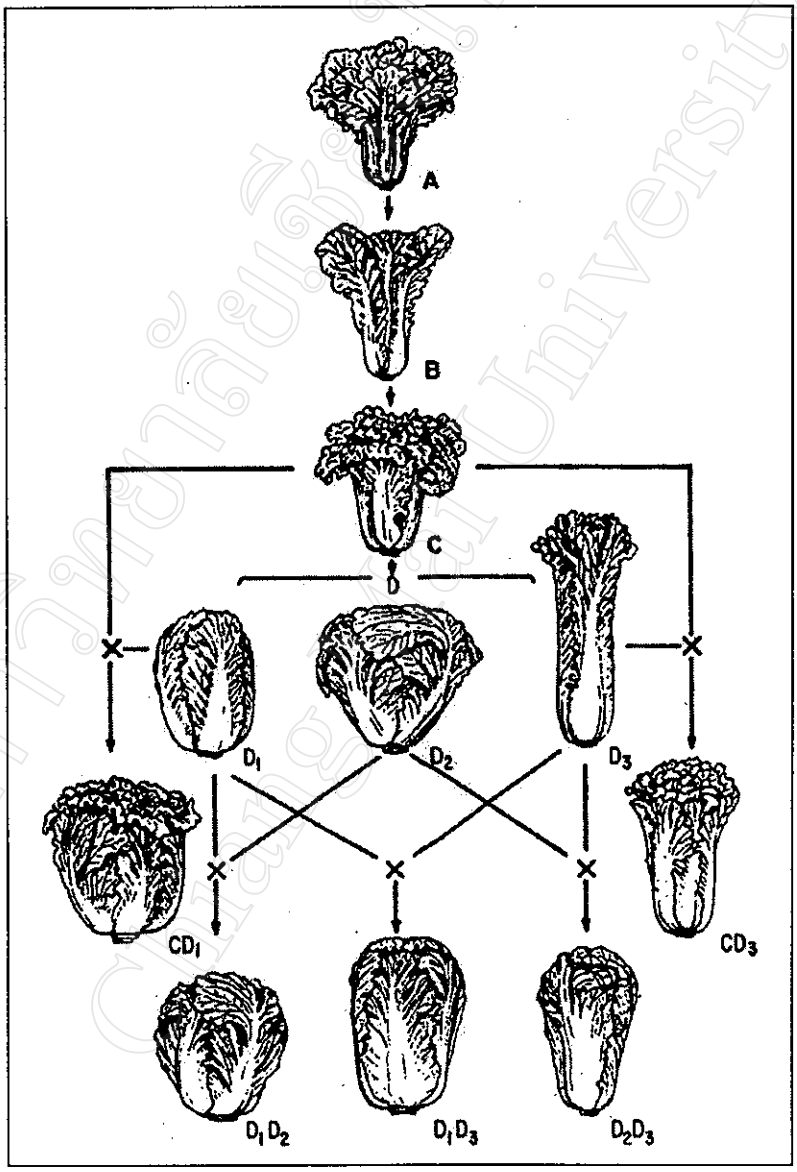
4. พันธุ์เข้าปลี [D ; heading variety (var *cephalata* Tsen *et* Lee)] ตายอดพัฒนาดี เข้าปลีแน่น ปลายใบปิด และซ้อนทับกันด้านบน มีความแตกต่างในลักษณะสัณฐานวิทยา นิเวศน์วิทยา และการกระจายพันธุ์ตามท้องถิ่น ผักกาดขาวปลีพันธุ์นี้ยังจำแนกได้อีก 3 ประเภท คือ

4.1 ประเภทปลีรูปไข่ [D_1 ; ovate type (f *ovata* Li)] ปลีรูปไข่ มีค่าดรรชนีความสูงต่อเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 ลักษณะใบอ่อนของตาใบจะพับจีบ (plicate) ใบเป็นรูปไข่กลับ ซ้อนกันเป็นกระจุกและกางออก ปลายใบปิดด้านบนแต่ไม่ซ้อนทับกัน แหล่งกำเนิดอยู่บริเวณคาบสมุทร Shandong ซึ่งเป็นบริเวณที่มีลักษณะนิเวศน์แบบชายทะเล สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพภูมิประเทศเขตอบอุ่นและความชื้นปานกลางได้

4.2 ประเภทปลีป้าน [D_2 ; flat-topped type (f *depressa* Li)] ปลีรูปกรวยกลับหัว มีค่าดรรชนีความสูงต่อเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.0 ลักษณะใบอ่อนของตายอดจะพับเข้าหากันหรือเรียงพับซ้อนกัน (conduplicate) ปลายใบซ้อนทับกันด้านบน ใบกว้างเป็นรูปไข่กลับ ซ้อนกันเป็นกระจุกและกางออก แหล่งกำเนิดบริเวณตอนกลางของจังหวัด Ho-nan ซึ่งเป็นบริเวณที่มีภูมิประเทศคล้ายทวีปยุโรป สามารถปรับตัวเข้ากับบริเวณในเมืองที่มีอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ความชื้นสัมพัทธ์ต่ำและแดดจัด

4.3 ประเภทปลียาวทรงกระบอก [D_3 ; cylindrical type (f *cylindrica* Li)] ปลียาวและรูปทรงกระบอก มีค่าดรรชนีความสูงต่อเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4.0 ลักษณะใบอ่อนของตายอดม้วนตามยาว (convolute) ปลายใบปิดด้านบนแต่ไม่ซ้อนทับกัน ใบเป็นรูปใบหอกกลับ

ซ้อนกันเป็นกระจุก ตั้งตรง แหล่งกำเนิดบริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออกของจังหวัด Ho-bei ทางตอนใต้ของอ่าว Pu-hai และทางตอนเหนือของที่ราบสูง Mongolian ตอนใน ซึ่งมีสภาพภูมิประเทศแบบชายทะเลและคล้ายทวีปยุโรป ผักกาดขาวปลีประเภทนี้จึงสามารถปรับตัวได้กว้างในทุกพื้นที่ของประเทศจีนเกือบทั้งหมด



รูปที่ 2.3 วิวัฒนาการของผักกาดขาวปลี : (A) var *dissoluta* (B) var *infarcta* (C) var *laxa* (D) var *cephalata* (D_1) f *ovata* (D_2) f *depressa* (D_3) f *cylindrica* (CD_1) var *laxa* x f *ovata* (CD_3) var *laxa* x f *cylindrica* (D_1D_2) f *ovata* x f *depressa* (D_1D_3) f *ovata* x f *cylindrica* (D_2D_3) f *depressa* x f *cylindrica*

Opena *et al.* (1988) ได้เสนอว่าผักกาดขาวปลีพันธุ์ต่างๆ จำนวนมากได้มีการพัฒนาจาก 3 พันธุ์ ต่อไปนี้

1. *B. campestris* var *cephalata* เป็นรูปแบบของผักกาดขาวปลีมากที่สุด ปลีมีขนาดใหญ่พอเหมาะ รูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปไข่กลับ ใบห่อปลีม้วนงอเข้าและซ้อนทับกันด้านบน รูปร่างปลีสามารถจำแนกได้เป็นประเภทปลีกลม รูปไข่ และทรงป้าน

2. *B. campestris* var *cylindrica* เป็นชนิดปลีขนาดพอเหมาะ ปลีมีรูปร่างยาวและตั้งตรง ใบอาจจะซ้อนทับกันด้านบนหรือไม่ก็ได้ ปลีด้านบนอาจจะแหลมมากหรือน้อย และหมุนบิดด้วย

3. *B. campestris* var *laxa* เข้าปลีหลวมและปลายปลีเปิด มีชื่อเรียกว่า flowering hearted type ปลายใบและขอบใบด้านบนของปลีอาจตั้งตรงหรือม้วนออก ใบมีสีเหลืองหรือขาวเหลือง

นอกจากนี้ Li (1981) ได้อ้างถึงชนิดลูกผสมซึ่งอาจถูกสร้างจากผักกาดขาวปลี 6 แบบพื้นฐานที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ควรจะมีลูกผสมทั้งหมด 35 แบบ แต่ที่พบว่าใช้ในการปลูกที่สำคัญมีเพียง 5 แบบ คือ (ดังรูปที่ 2.3)

1. รูปไข่ปลายฟู [CD_1 ; fluffy-topped ovate form] เป็นลูกผสมที่เกิดจาก var *laxa* x f *ovata* ปลีอ้วนเตี้ย แน่น ปลายฟูด้านบน สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพภูมิประเทศที่ไม่เหมาะสมและเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมกว้าง

2. รูปทรงกระบอกปลายฟู [CD_3 ; fluffy-topped cylindrical form] เป็นลูกผสมที่เกิดจาก var *laxa* x f *cylindrica* ปลีทรงกระบอกและปลายฟูด้านบน ถึงแม้ว่าปลีจะไม่แน่น แต่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพภูมิประเทศที่ไม่เหมาะสมและเจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมต่างๆ

3. รูปป้านไข่ [D_1D_2 ; flat-topped ovate form] เป็นลูกผสมที่เกิดจาก f *ovata* x f *depressa* ปลีรูปไข่และป้านด้านบน ปลีแน่นและคุณภาพในการเก็บรักษาดีกว่า f *ovata*

4. รูปทรงกระบอกอ้วนเตี้ย [D_1D_3 ; stout-cylindrical form] เป็นลูกผสมที่เกิดจาก f *ovata* x f *cylindrica* รูปทรงปลีดี มีค่าดรรชนีความสูงต่อเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.0 ต้องการการบำรุงอย่างมาก เพื่อผลผลิตที่สูงในฤดูการเพาะปลูกที่นาน

5. รูปทรงกระบอกป้าน [D_2D_3 ; flat-topped cylindrical form] เป็นลูกผสมที่เกิดจาก f *depressa* x f *cylindrica* ปลีด้านบนมีขนาดใหญ่และป้าน ส่วนด้านล่างจะผอมเรียว เจริญเติบโตได้ในพื้นที่ที่จำกัดเท่านั้น

พืชดอกชั้นสูงมีการพัฒนาอย่างดีในระบบควบคุมการผสมพันธุ์ก่อนการปฏิสนธิ ในพืชหลายวงศ์มีการผสมข้ามที่เป็นการผสมพันธุ์ภายในชนิดเดียวกัน ซึ่งถูกควบคุมโดยการขัดขวางจากลักษณะพันธุกรรมที่เกี่ยวกับการผสมตัวเอง ลักษณะเช่นนี้เรียกว่า การผสมตัวเองไม่ได้ (self incompatibility) (Nasrallah and Nasrallah, 1993 ; Nasrallah *et al.*, 1994 ; Isogai *et al.*, 1987)

ผักกาดขาวปลีเป็นพืชอาศัยแมลงช่วยถ่ายเรณูโดยเฉพาะผึ้ง ดังนั้นจึงเป็นพืชผสมข้ามและยังมีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ซึ่งเป็นระบบควบคุมการผสมพันธุ์ที่พบได้ในพืชวงศ์กะหล่ำ

ลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ (self incompatibility)

สรีรวิทยาของลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ เป็นลักษณะที่ละอองเรณูไม่สามารถลงไปผสมกับไข่ได้ เมื่อทั้งคู่มีจีโนไทป์เหมือนกัน กลไกอันนี้เป็นสิ่งที่สำคัญในการป้องกันการผสมพันธุ์ในพวกเดียวกัน และทำให้พืชจำเป็นต้องผสมข้าม ซึ่งจะก่อให้เกิดการจัดกลุ่มของยีน (gene recombination) อยู่ตลอดเวลา การที่ละอองเรณูไม่สามารถที่จะงอกได้เมื่อตกลงบนยอดเกสรเพศเมียหรือเมื่องอกแล้วไม่สามารถจะผ่านลงไปในก้านเกสรเพศเมียได้ เป็นลักษณะที่ควบคุมโดยสารพันธุกรรม (กฤษฎา, 2519) โดยทั่วไประบบของลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม heteromorphic มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับความยาวที่ต่างกันของก้านเกสรเพศผู้และก้านเกสรเพศเมีย (Briggs and Knowles, 1967) และ กลุ่ม homomorphic เกี่ยวกับลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ที่ควบคุมด้วยยีน S locus ซึ่งจะแสดงออกเมื่ออัลลีลทั้งเรณู และยอดเกสรเพศเมียเหมือนกัน (Gaude *et al.*, 1993 ; Pastuglia *et al.*, 1997 ; Nasrallah and Nasrallah, 1993)

ลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ในกลุ่ม homomorphic สามารถแบ่งออกได้เป็นอีก 2 ชนิด คือ (ดังตารางที่ 2.2)

1. Gametophytic self incompatibility พบครั้งแรกใน *Nicotiana sanderae* และพบได้ใน red clover, white clover, alsike clover, yellow clover (Briggs and Knowles, 1967) พืชในวงศ์ Solanaceae (Gaude *et al.*, 1993) ถั่วและหญ้า (Raven *et al.*, 1994) โดยลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ควบคุมด้วยยีน 1 ตำแหน่ง หลายอัลลีล ที่ self incompatibility locus หรือ S locus (Gaude *et al.*, 1993) โดยปฏิกิริยาระหว่างหลอดเรณูกับก้านเกสรเพศเมียจะเกี่ยวกับละอองเรณูที่มีจีโนไทป์แบบมีโครโมโซมหนึ่งชุด และเกสรเพศเมียที่มีจีโนไทป์แบบมีโครโมโซมสองชุดอยู่ในก้านเกสรเพศเมีย (Mauseth, 1991) ซึ่งการแสดงออกของเรณูจะเป็นอิสระต่อกัน โดยฟีโนไทป์ของเรณูถูกกำหนดจากจีโนไทป์แบบมีโครโมโซมหนึ่งชุดของมันเอง (Raven *et al.*, 1994 ; Gaude *et al.*, 1993) เนื่องจากการสร้าง s-allele จะเกิดขึ้นหลังจากแบ่งตัวในระยะ meiosis แล้ว ถ้าละอองเรณูมีอัลลีลเหมือนกันกับเนื้อเยื่อของก้านเกสรเพศเมียก็จะเป็นอุปสรรคในการงอกบนยอดเกสรเพศเมีย การแทงผ่านยอดเกสรเพศเมีย และการเจริญของหลอดเรณูในก้านเกสรเพศเมียซึ่งจะมีความแตกต่างจากชนิด sporophytic self incompatibility (Newbigin *et al.*, 1993 ; Snustad *et al.*, 1997) ละอองเรณูจะมี 2 นิวเคลียส (binucleate) (Opena *et al.*, 1988)

ตารางที่ 2.2 ความสามารถในการผสมพันธุ์ของพืชจีโนไทป์ต่างๆ เมื่อมีระบบ gametophytic และ sporophytic เข้ามาเกี่ยวข้อง

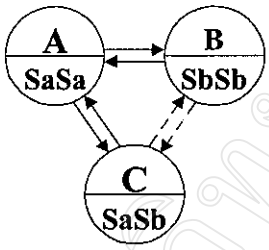
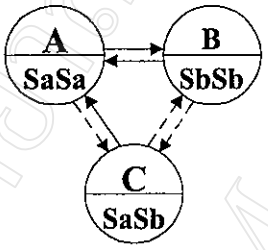
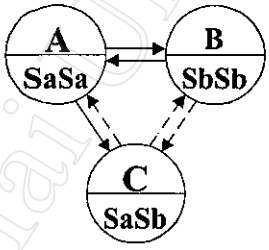
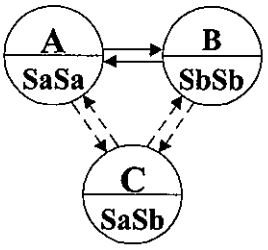
ระบบ	คู่ผสม	เซลล์สืบพันธุ์ต้นพ่อ		จีโนมไทป์
	ต้นแม่ ต้นพ่อ	ผสมได้	ผสมไม่ได้	ลูกผสม
Gametophytic				
	S_1S_2 x S_1S_2	ไม่มี	ทั้งหมด	ไม่มี
	S_1S_2 x S_1S_3	S_3	S_1	S_1S_3, S_2S_3
	S_1S_3 x S_1S_2	S_2	S_1	S_1S_2, S_2S_3
	S_1S_2 x S_3S_4	S_3 , S_4	ไม่มี	S_1S_3, S_2S_3, S_1S_4, S_2S_4
	S_3S_4 x S_1S_2	S_1 , S_2	ไม่มี	S_1S_3, S_2S_3, S_1S_4, S_2S_4
Sporophytic*				
	S_1S_2 x S_1S_2	ไม่มี	ทั้งหมด	ไม่มี
	S_1S_2 x S_2S_3	ไม่มี	S_2 , S_3	ไม่มี
	S_2S_3 x S_1S_2	S_1 , S_2	ไม่มี	S_1S_2, S_1S_3, S_2S_2, S_2S_3
	S_1S_2 x S_3S_4	S_3 , S_4	ไม่มี	S_1S_3, S_2S_3, $0S_1S_4$, S_2S_4
	S_3S_4 x S_1S_2	S_1 , S_2	ไม่มี	S_1S_3, S_2S_3, S_1S_4, S_2S_4

* $S_1 > S_2 > S_3 > S_4$ในละอองเรณู ; $S_1 = S_2 = S_3 = S_4$ ในก้านเกสรเพศเมีย

2. Sporophytic self incompatibility พบในพืชวงศ์กะหล่ำ (Karron, 1990 ; Nasrallah and Nasrallah, 1993 ; Opena *et al.*, 1988) และวงศ์ composite (Raven *et al.*, 1994) โดยลักษณะผสมตัวเองไม่ได้จะควบคุมด้วยยีนที่ self incompatibility locus หรือ S locus (Chen and Nasrallah, 1991 ; Gaude *et al.*, 1993 ; Nasrallah and Nasrallah, 1993 ; Trick and Flavell, 1990 ; Watanabe *et al.*, 1994) ที่มียีนควบคุมอย่างน้อย 2 ยีน ซึ่งมีความสัมพันธ์กัน (Boyes *et al.*, 1996 ; Delorme *et al.*, 1995 ; Giranton *et al.*, 1996) คือ S locus glycoprotein (SLG) และ S receptor kinase (SRK) (Boyes and Nasrallah, 1993 : 1996 ; Doughty *et al.*, 1998 ; Isogai *et al.*, 1988 ; Kumar and Trick, 1995 ; Lalonde *et al.*, 1989 ; Sato *et al.*, 1991 ; Stein *et al.*, 1992 : 1996 ; Yu *et al.*,1996) โดยปฏิกิริยาระหว่างหลอดเรณูกับก้านเกสรเพศเมียจะเกี่ยวกับเรณูและเกสรเพศเมียที่มีจีโนไทป์แบบมีโครโมโซมสองชุด (Mauseth, 1991) ซึ่งละอองเรณูและออวุลได้มีการสร้าง s-allele มาก่อนการแบ่งตัวแบบ meiosis (Newbigin *et al.*, 1993) ลักษณะผสมตัวเองไม่ได้เป็นปฏิกิริยาระหว่างปุ่มเล็ก (papilla) กับเรณูหรือหลอดเรณู (Hinata และ Nishio, 1980)

ซึ่งจะควบคุมปรากฏการณ์ recognition ที่เป็นความสามารถในการแยกเรณูจากต้นมันเองและจากต้นอื่นที่มีพันธุกรรมเหมือนกับของเกสรเพศเมีย (Nasrallah *et al.*, 1996) อุปสรรคในระบบนี้ต่อการงอกของละอองเรณูเกี่ยวข้องกับการเจริญของหลอดเรณูจะเป็นบริเวณผิวหน้าของยอดเกสรเพศเมีย (Newbigin, *et al.*, 1993) ซึ่งยอดเกสรตัวเมียจะเป็นแบบแห้ง (Elleman และ Dickinson, 1995) ละอองเรณูจะมี 3 นิวเคลียส (trinucleate) (Opena *et al.*, 1988)

กลไกพันธุกรรมการผสมตัวเองไม่ได้ในกะหล่ำดาว กะหล่ำปลี บรอคโคลี่ ผักกาดขาวปลี เทอร์นิพ และผักกาดหัว พบว่าลักษณะพันธุกรรมที่ควบคุมการผสมตัวเองไม่ได้มี 4 ประเภท คือ (ดังรูปที่ 2.4) (จานุลักษณ์, 2531)

TYPE I	TYPE II	TYPE III	TYPE IV
			
DOMINANCE RELATIONS BETWEEN ALLELES			
POLLEN : Sa<Sb	**Sa<Sb**	**Sa=Sb**	**Sa=Sb**
STIGMA : Sa<Sb	**Sa=Sb**	**Sa<Sb**	**Sa=Sb**

รูปที่ 2.4 ลักษณะที่ควบคุมการผสมตัวเองไม่ได้ในระบบ sporophytic ในพืชวงศ์กะหล่ำ

1. ประเภทที่ 1 ลักษณะการแสดงออกของยีนในต้นพ่อและแม่ คือ ยีน Sb ข่มยีน Sa (Sa < Sb) ยอดเกสรเพศเมียจะไม่รับละอองเรณูจากต้นที่มีจีโนไทป์เหมือนกัน จีโนไทป์มี 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม A B C ซึ่งภายในกลุ่มเดียวกันผสมตัวเองไม่ติด เพราะมีจีโนไทป์เหมือนกัน การผสมข้ามสลับไม่ติดระหว่างกลุ่ม B กับ C แต่สามารถผสมข้ามสลับกันต่างกลุ่มได้และติดเมล็ด กลุ่ม A มีจีโนไทป์ SaSa กลุ่ม B มีจีโนไทป์ SbSb และกลุ่ม C มีจีโนไทป์ SaSb อัตราส่วนของจีโนไทป์เมื่อมีการผสมข้ามกันแบบสุ่ม คือ SaSa : SaSb : SbSb เท่ากับ 1 : 3 : 0 การผสมติดเมล็ดเท่ากับ 67 % หรือ 4 : 6

2. ประเภทที่ 2 ลักษณะการแสดงออกของยีนในต้นแม่ คือ ยีน Sa และ ยีน Sb แสดงออกร่วมกันหรือเป็นอิสระต่อกัน (Sa = Sb) และต้นพ่อ คือ Sa < Sb แต่ยอดเกสรเพศเมีย (SaSb) จะ

ผลิตทั้งสารยับยั้งที่เป็น Sa และ Sb จีโนไทป์มี 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม A B C ภายในกลุ่มเดียวกันผสมกันไม่ติด การผสมข้ามสลับกันติดระหว่างกลุ่ม A กับ B ระหว่างกลุ่ม B กับ C ผสมสลับกันไม่ติด การผสมระหว่างกลุ่ม A กับ C พบว่า ผสมกันติดระหว่างกลุ่ม A ผสมกับ C (กลุ่ม A เป็นต้นแม่) การผสมระหว่างกลุ่ม C กับ A ผสมกันไม่ติด กลุ่ม A มีจีโนไทป์ SaSa กลุ่ม B มีจีโนไทป์ SbSb และกลุ่ม C มีจีโนไทป์ SaSb อัตราส่วนของจีโนไทป์เมื่อมีการผสมข้ามกันแบบสุ่ม คือ SaSa : SaSb : SbSb เท่ากับ 0.5 : 2.5 : 0 การผสมติดเมล็ด เท่ากับ 50 % หรือ 3 : 6

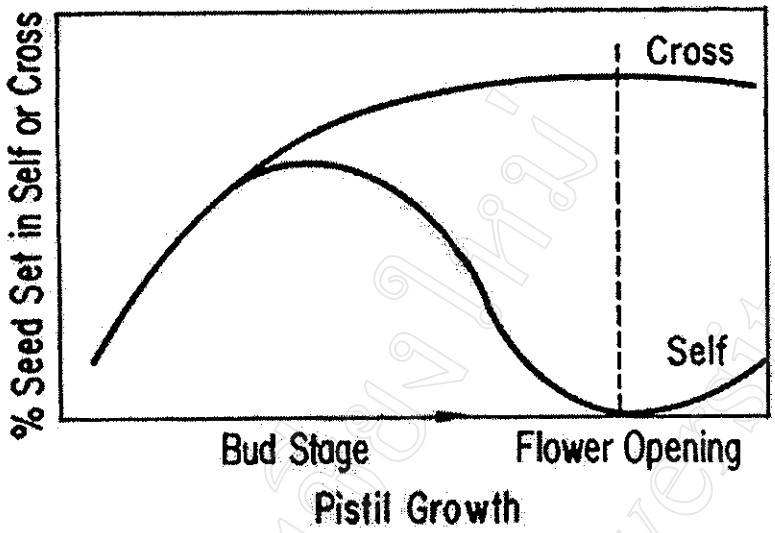
3. ประเภทที่ 3 ลักษณะการแสดงออกของยีนในต้นแม่ คือ Sa < Sb และในต้นพ่อ คือ Sa = Sb จีโนไทป์มี 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม A B C และผสมตัวเองภายในกลุ่มไม่ติด กลุ่ม A และ B ผสมสลับกันติด แต่กลุ่ม B และ C ผสมสลับกันไม่ติด การผสมระหว่างกลุ่ม A กับ C ตรงกันข้ามกับประเภทที่ 2 คือ A ผสมกับ C (กลุ่ม A เป็นต้นแม่) ผสมกันไม่ติด แต่การผสมระหว่างกลุ่ม C กับ A ผสมกันติด กลุ่ม A และ B มีจีโนไทป์ SaSa และ SbSb กลุ่ม C มีจีโนไทป์ SaSb อัตราส่วนของจีโนไทป์เมื่อมีการผสมข้ามกันแบบสุ่ม คือ SaSa : SaSb : SbSb เท่ากับ 0.5 : 2.5 : 0 การผสมติดเมล็ด เท่ากับ 50 % หรือ 3 : 6

4. ประเภทที่ 4 ลักษณะการแสดงออกของยีนในต้นแม่และต้นพ่อ คือ Sa = Sb จะเป็นอิสระต่อกัน จีโนไทป์มี 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม A B C และผสมตัวเองภายในกลุ่มไม่ติด กลุ่ม A กับ B ผสมสลับกันติด แต่กลุ่ม B และ C และกลุ่ม A กับ C ผสมสลับกันไม่ติด กลุ่ม A และ B มีจีโนไทป์ SaSa และ SbSb กลุ่ม C มีจีโนไทป์ SaSb อัตราส่วนของจีโนไทป์เมื่อผสมข้ามกันแบบสุ่ม คือ SaSa : SaSb : SbSb เท่ากับ 33 % หรือ 2 : 6

ปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ในพืชวงศ์กะหล่ำ สรุปได้ดังนี้

1.อายุของดอก (stage of pistil development) เนื่องจากการติดเมล็ดในการถ่ายเรณูในต้นเดียวกันและการถ่ายเรณูข้ามจะเปลี่ยนแปลงตามอายุของดอก โดยการถ่ายเรณูทั้งสองชนิดในดอกตูมจะติดเมล็ดได้ดี ซึ่งเรียกวิธีนี้ว่า การผสมดอกอ่อน (bud pollination) เพราะดอกอ่อนไม่สามารถที่จะแยกแยะระหว่างจีโนไทป์ของมันเองและต้นอื่นได้ (Opena *et al.*, 1988) ช่วงเวลาก่อนและหลังดอกบานเป็นเวลา 5 วัน การติดเมล็ดจากการถ่ายเรณูในต้นเดียวกันจะลดลงเนื่องจากลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ แต่การถ่ายเรณูข้ามจะยังติดเมล็ดได้ดี ดังรูปที่ 2.5

ความแตกต่างของการติดเมล็ดระหว่างการถ่ายเรณูทั้งสอง คือ ช่วงก่อน และหลังดอกบาน 1 วัน (Hinata, 1981 ; Opena *et al.*, 1988) ต้นที่มีค่าเฉลี่ยการติดเมล็ดสูงจะเป็นพวกผสมตัวเองไม่ได้อย่างอ่อน (weak self incompatibility) ส่วนต้นที่ติดเมล็ดต่ำหรือไม่ติดเมล็ดเลยจะเป็นพวกผสมตัวเองไม่ได้อย่างแรง (strong self incompatibility) (Opena *et al.*, 1988)



รูปที่ 2.5 เปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงการติดเมล็ดในการถ่ายเรณูในต้นเดียวกัน และข้ามต้น เนื่องจากอายุของดอก

2. อุณหภูมิ (temperature) การผันแปรของการตอบสนองต่ออุณหภูมิจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างของจีโนไทป์และ s-allele การเพิ่มอุณหภูมิสูงประมาณ 25 - 30 องศาเซลเซียส จะทำให้ติดเมล็ดดีขึ้น และติดเมล็ดต่ำเมื่ออุณหภูมิประมาณ 15 - 20 องศาเซลเซียส (Hinata, 1981) โดยมีการศึกษาพบว่า อุณหภูมิสูงทำให้ติดเมล็ดมากขึ้นในกะหล่ำปลี (Alipieva, 1990) กะหล่ำดาว (Johnson, 1971 ; Ockenden, 1973) และผักกาดหัว (Matsubara, 1984)

3. ความชื้น (relative humidity) ความชื้นจะเร่งการงอกของเรณูและเพิ่มเปอร์เซ็นต์การงอกของละอองเรณู อัตราการงอกของเรณูในการถ่ายเรณูในต้นเดียวกันจะน้อยกว่าการถ่ายเรณูข้าม ซึ่งมีสภาพความชื้นเหมือนกัน โดยการถ่ายเรณูข้ามจะพบหลอดเรณูแทงผ่านยอดเกสรเพศเมียเพิ่มขึ้นเมื่อการงอกของเรณูมีมากขึ้น แต่ในการถ่ายเรณูในต้นเดียวกันจะไม่พบหลอดเรณูแทงผ่านยอดเกสรเพศเมีย ดังนั้นความชื้นจะไม่มีผลต่อการปฏิสนธิตัวเองในต้นที่แสดงลักษณะผสมตัวเองไม่ได้อย่างแรงปานกลาง (Hinata, 1981) อย่างไรก็ตาม พืชที่มีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้อย่างอ่อนจะมีหลอดเรณูแทงผ่านยอดเกสรเพศเมียได้ เพราะความชื้นอาจจะช่วยเพิ่มการถ่ายเรณูในต้นเดียวกัน โดยจะส่งเสริมการงอกของเรณูซึ่งอาจเพิ่มโอกาสการแทงผ่านของเรณูได้ด้วย (Hinata, 1981 ; Opena *et al.*, 1988)

4. สภาวะก๊าซในบรรยากาศ (gas environment) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะได้ผลที่จำกัดต่อการงอกของเรณู และยังไปรบกวนการแทงผ่านของเรณูมากกว่า โดยมี recogniton phase ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้อง ผลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ตามธรรมชาติต่อการงอกของหลอดเรณู

ยังไม่ทราบแน่นอน แต่ผลปรากฏชัดคือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเข้ากันไม่ได้ คือ ความไวต่อสิ่งเร้าภายนอกต้นพืชมากกว่าการบังคับการงอกของเรณู การเจริญของหลอดเรณู และการปฏิสนธิ (Opena *et al.*, 1988)

สำหรับวิธีการตรวจสอบพืชว่าผสมตัวเองได้หรือไม่ได้นั้น มีผู้ทำการศึกษาและแนะนำไว้หลายวิธี เช่น

1. ตรวจสอบหลอดเรณูที่งอกลงสู่ก้านเกสรเพศเมียหลังจากที่มีการถ่ายเรณู ซึ่งการตรวจสอบทำได้โดยใช้ fluorescent microscope (Hadj-Arab, 1990a ; 1990b ; Kho and Baer, 1968 ; Opena et al., 1988) และ Martin's fluorescent technique (Chou and Harberd, 1970 ; Arusa, 1970)

2. การใช้ scanning electron microscope เพื่อตรวจดูหลอดเรณูที่แทงผ่านปุ่มเล็กบริเวณยอดเกสรเพศเมีย (Hadj-Arab, 1990a ; 1990b ; Matsubara, 1984)

3. สังเกตการติดเมล็ดหลังจากที่มีการถ่ายเรณู (Hinata, 1981 ; Opena *et al.*, 1988)

ในการพัฒนาสายพันธุ์พืชที่มีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ของสายพันธุ์แท้ จำเป็นต้องมีวิธีที่จะทำลายหรือหลีกเลี่ยงกลไกการผสมตัวเองไม่ได้ก่อนชั่วคราว เพื่อทำให้การถ่ายเรณูในต้นเดียวกันได้ผล ซึ่งนั่นหมายถึงการติดเมล็ดเพิ่มขึ้น ทำให้สามารถรักษาสายพันธุ์แท้เอาไว้และใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป โดยมีผู้ทำการศึกษาทดลองไว้หลายวิธี ได้แก่

1. การถ่ายเรณูขณะดอกอ่อน (bud pollination) วิธีการนี้ได้นำมาใช้กับกะหล่ำปลีที่ประเทศญี่ปุ่นเป็นประเทศแรก ตั้งแต่ ค.ศ. 1933 (Wiering, 1958) หลักการสำคัญในการถ่ายเรณูขณะดอกอ่อน คือ การเลือกอายุของดอกให้เหมาะสม ควรเลือกดอกที่มีอายุประมาณ 2 หรือ 3 วันก่อนดอกบาน ซึ่งดอกอ่อนจะมีสีเหลืองบริเวณปลายดอก โดยดอกในระยะนี้เหมาะสำหรับการถ่ายเรณูขณะดอกอ่อนมากที่สุด ทำให้ติดเมล็ดได้ดี ถ้าถ่ายเรณูในระยะดอกบาน ฝักที่ติดจะลีบและไม่มีเมล็ด นอกจากนี้ การเปรียบเทียบการติดเมล็ดจากการถ่ายเรณูในต้นเดียวกันของกะหล่ำดาวในระยะดอกอ่อนและดอกบาน พบว่า จำนวนเมล็ดจากการถ่ายเรณูต่อดอกและจำนวนเมล็ดรวมจากการถ่ายเรณูในต้นเดียวกันในระยะดอกอ่อนมากกว่าระยะดอกบาน

2. การใช้พู่กันขนเหล็กป้ายละอองเรณูในการถ่ายเรณู (steel-brush pollination) Roggen and Van Dijk (1972, 1973) ได้อาศัยหลักการการทำลายยอดเกสรเพศเมียให้หยุดทำงานในระหว่างการถ่ายเรณู โดยใช้พู่กันที่มีขนเป็นเส้นโลหะป้ายละอองเรณูลงบนยอดเกสรเพศเมีย ทำให้ไม่เกิดกลไกการยับยั้งบริเวณยอดเกสรเพศเมีย มีการติดเมล็ดจากการถ่ายเรณูด้วยวิธีนี้เพิ่มขึ้น

3. การใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้นขณะทำการถ่ายเรณู (electric aided pollination) วิธีการนี้เสนอขึ้นโดย Roggen *et al.* (1972) และ Roggen and Van Dijk (1973) มีหลักการ คือ ทำให้

เรณูกับเกสรเพศเมียมีขั้วไฟฟ้าต่างกัน โดยใช้ไฟฟ้ากระแสตรงประมาณ 100 โวลต์ ต่อขั้วลบเข้ากับก้านดอกที่ใกล้กับดอกที่จะถ่ายเรณูและแตะขั้วบวกกับเรณู แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่านขณะทำการป้ายละอองเรณูเป็นเวลา 1 - 3 วินาที ผลปรากฏว่า ทำให้อัตราการติดเมล็ดจากการถ่ายเรณูในต้นเดียวกันของกะหล่ำปลีสูงขึ้น ซึ่งอาจเป็นเพราะสาเหตุต่อไปนี้

- แรงการดึงดูดของไฟฟ้า จะทำให้ละอองเรณูเข้ามาสัมผัสติดกับปุ่มเล็ก ซึ่งมีขั้วไฟฟ้าต่างกันมีมากขึ้น ทำให้เกิด sticking reaction

- ชั้นไข (wax layer) เสียหาย (บางทีอาจเกิดจากความร้อนประมาณ 0.5 แคลอรี่ ขณะทำการถ่ายเรณู) หรือโครงสร้างเปลี่ยนแปลง

- ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้นในผนังเซลล์ อาจทำให้ permeability เปลี่ยนแปลง

4. การใช้อุณหภูมิสูงในช่วงการถ่ายเรณู (high temperature treatment) การเพิ่มอุณหภูมิจาก 17 องศาเซลเซียส เป็น 25 องศาเซลเซียสในการถ่ายเรณูข้าม จำนวนเมล็ดเฉลี่ยต่อฝักและจำนวนเมล็ดรวมทั้งหมดจะลดลง แต่ในการถ่ายเรณูในต้นเดียวกันจะทำให้การติดเมล็ดเพิ่มขึ้นในผักกาดหัว และลักษณะผสมตัวเองไม่ได้จะถูกลบล้างจากการใช้อุณหภูมิ แต่ก็ไม่เป็นผลดีต่อการติดเมล็ดตามปกติ (Murabaa, 1957) Roggen and Van Dijk (1976) ได้ทดลองใช้อุณหภูมิสูงกับกะหล่ำปลี พบว่าอุณหภูมิ 70 และ 80 องศาเซลเซียส ทำให้การติดเมล็ดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้อุณหภูมิสูงกับ *Lilium longiflorum* สามารถทำลายลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ลง (Hopper *et al.*, 1967 ; Matsubara, 1981) Visser (1977) ได้ทดลองการใช้อุณหภูมิสลับกับกะหล่ำดาว เพื่อตรวจดูจำนวนของหลอดเรณูที่พบในก้านเกสรเพศเมีย ซึ่งยังไม่ได้ผลดีกับพันธุ์ที่มีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้อย่างแรง Matsubara (1984) พบว่าการใช้อุณหภูมิสูงในผักกาดหัวสามารถเพิ่มการติดเมล็ดได้ดี

5. การเพิ่มความชื้นขณะทำการถ่ายเรณู (increased humidity treatment) ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 55 - 60 % และอุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส ทำให้จำนวนหลอดเรณูที่แทงผ่านและการติดเมล็ดมีปริมาณเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับการถ่ายเรณูขณะดอกอ่อน โดยให้ความชื้นหลังจากมีการถ่ายเรณูอย่างรวดเร็ว และนานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Carter and McNeilly, 1975) และการแทงผ่านของหลอดเรณูจะพบเป็นจำนวนมากในสายพันธุ์ที่มีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้อย่างอ่อน ในสภาพความชื้นสูง (Opena *et al.*, 1988)

6. การเพิ่มปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ (CO_2 gas treatment) Nakanishi and Hinata (1975) ได้ศึกษาถึงการติดเมล็ดของกะหล่ำปลี พบว่า การใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หลังการถ่ายเรณู สามารถทำให้การติดเมล็ดสูงทุกวิธี ไม่ว่าจะเป็นการถ่ายเรณูในต้นเดียวกัน การถ่ายเรณูข้ามและการถ่ายเรณูขณะดอกอ่อน ซึ่งยังสูงกว่าทุกวิธีในกลุ่มควบคุม

อีกด้วย Lee (1981) ได้ศึกษาอิทธิพลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้น 5 % หลังจากการถ่ายเรณูแล้ว 5 ชั่วโมง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง Aneja and Gianfagna (1992, 1994) พบว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สามารถทำลายกลไกลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ในโกโก้

7. การพ่นสารละลายเกลือ (NaCl treatment) มีการศึกษาทดลองการใช้สารละลายเกลือเพื่อทำลายลักษณะผสมตัวเองไม่ได้หลายการทดลอง Yang *et al.* (1996) ได้ใช้สารละลายเกลือที่ความเข้มข้น และเวลาที่พ่นสารละลายเกลือต่างกันในการทดลองกับผักกาดขาวปลี โดยใช้ผึ้งช่วยถ่ายเรณู พบว่า ความเข้มข้น 3 % และเวลา 9.30 น. ได้ผลดีที่สุด ซึ่ง Kucera (1990) ได้ใช้สารละลายเกลือความเข้มข้น 3 % พ่นหลังจากการถ่ายเรณูแล้ว ½ - 1 ชั่วโมง พบว่า ติดเมล็ดสูงกว่ากลุ่มควบคุมถึง 95.6 % ในกะหล่ำดอก นอกจากนี้ Carafa and Carratu (1997) ยังได้ศึกษาในกะหล่ำปลีและกะหล่ำปมอีกด้วย

8. การใช้สารเคมี (chemical treatment) Mutsubara (1984) ได้ทดลองใช้ฮอร์โมนพืช กรดอะมิโน และวิตามิน ในการทำลายลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ของผักกาดหัว ทำให้การติดฝักและเมล็ดสูงขึ้น แต่สารเหล่านี้ก็สามารถทำให้เกิดผลเทียมได้โดยเฉพาะ GA_3 Scutt *et al.* (1994) ได้ใช้สาร okadic acid (OA) เพื่อให้ลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ในคะน้าไม่ทำงาน โดยจะไปยับยั้งการสร้างโปรตีน คือ serine หรือ threonine

9. การใช้เลเซอร์ (lazer treatment) การฉายรังสีจาก helium-neon lazer ให้กับเรณูของกะหล่ำปลีที่ 2.5 mW เป็นเวลา 10 - 20 นาที ซึ่งสามารถทำให้ลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ไม่ทำงาน (Ilieva and Alipieva, 1996)

การผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ผักกาดขาวปลี มีลักษณะการผลิตและวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกัน สามารถแบ่งออกได้ 2 วิธี คือ (ดังรูปที่ 2.6)

1. การผลิตเมล็ดพันธุ์ด้วยต้นแม่ที่เข้าปลี

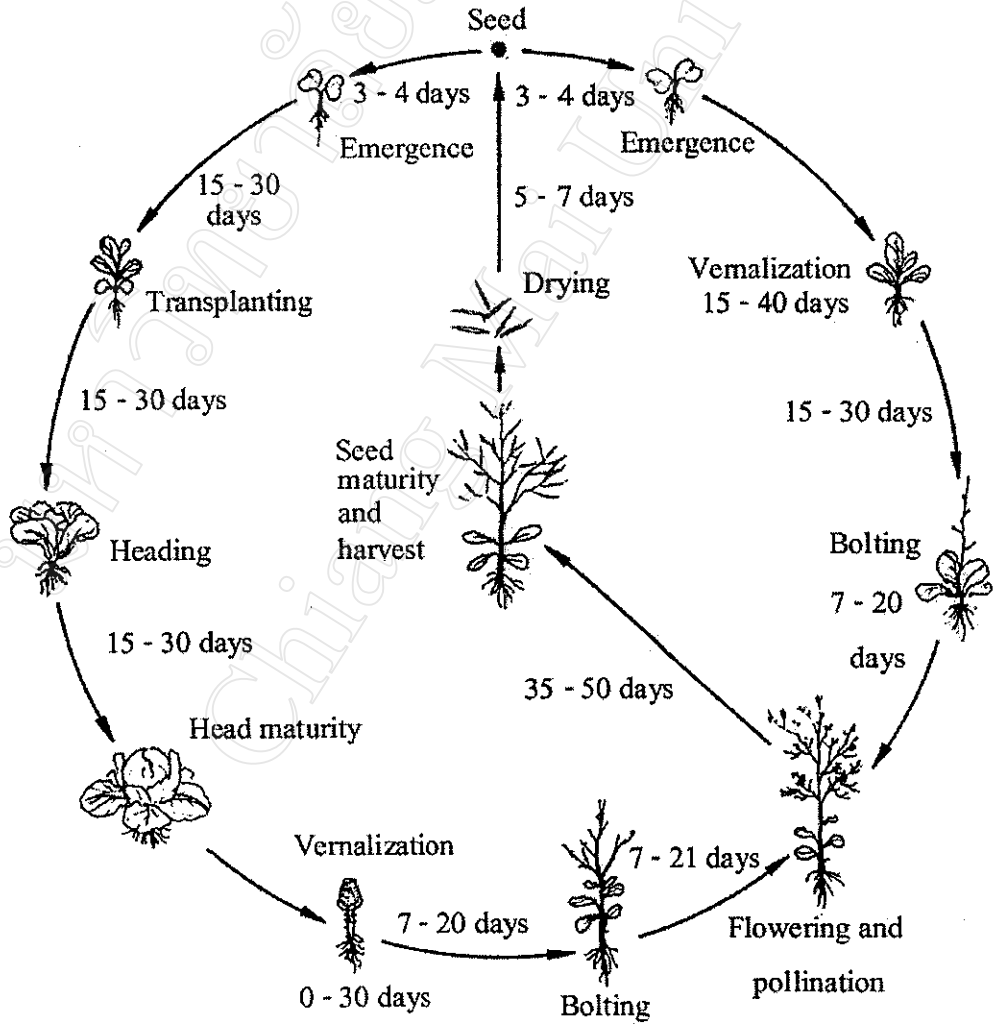
วิธีการนี้ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อพัฒนาสายพันธุ์พ่อแม่ และกำหนดการรวมตัวของลูกผสมเพื่อตรวจสอบการให้ลูกผสมที่ดีหรือผลิตเมล็ดพันธุ์คัด และเมล็ดพันธุ์ขยายของพันธุ์ผสมเปิด ต้นแม่ที่ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ถูกปลูก และดูแลจนเข้าปลีเหมือนกับการปลูกพันธุ์การค้าทั่วไป เพื่อคัดเลือกต้นที่มีลักษณะที่ดี ซึ่งการผลิตเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีนี้จะไม่ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์จำนวนมากเพราะต้องใช้ระยะเวลานานมาก แต่ใช้ผลิตเมล็ดพันธุ์ขยายของพ่อแม่สายพันธุ์แท้เสมอเพราะเมล็ดพันธุ์ที่ใช้ผลิตเมล็ดพันธุ์ต้องมีพันธุกรรมที่บริสุทธิ์มาก

การคัดเลือกสายพันธุ์พ่อแม่จะตรวจสอบลักษณะของปลี เช่น รูปร่าง ขนาด และความแน่นของปลี อายุการเก็บเกี่ยว เช่น พันธุ์เบา พันธุ์กลาง และพันธุ์หนัก และลักษณะของใบ เช่น

สี ความย่น และขนสั้นนุ่ม (pubescence) เพื่อบันทึกเป็นลักษณะมาตรฐานของพันธุ์ โดยจะคัดเลือกต้นที่มีลักษณะดีมา 2 - 5 % จากจำนวนประชากรทั้งหมด

2. การผลิตเมล็ดพันธุ์ด้วยต้นแม่ที่ไม่เข้าปลี

การผลิตเมล็ดพันธุ์การค้านำเอาวิธีนี้มาใช้เสมอ เมล็ดพันธุ์จะถูกผลิตจากต้นแม่ที่ถูกชักนำให้แทงช่อดอกและติดเมล็ดโดยไม่ต้องผ่านการเข้าปลี ประโยชน์จากการใช้วิธีนี้ คือ การใช้พื้นที่อย่างมีประสิทธิภาพทั้งเวลาและระยะปลูก และผลผลิตต่อพื้นที่สูงเพราะผลกระทบจากโรคเน่าเละ (soft rot) ต่ำ แต่การคัดเลือกต้นแม่เพื่อดูลักษณะต่างๆ ไม่สามารถทำได้ด้วยวิธีนี้ ดังนั้นเมล็ดพันธุ์คัดที่จะทำการเพิ่มจำนวนผลผลิตต้องมีพันธุกรรมที่บริสุทธิ์ ก่อนที่จะทำการผลิตเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีนี้ (Shinohara, 1984 : Opena *et al.*,1988)



รูปที่ 2.6 ความสัมพันธ์ของการผสมพันธุ์และผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกาดขาวปลีใน 2 วงจร

การปรับปรุงพันธุ์ในปัจจุบัน

วัตถุประสงค์สำคัญของการปรับปรุงพันธุ์ในปัจจุบัน มีอยู่ 3 ประการ คือ

1. เพื่อผลผลิต (yield)

2. เพื่อคุณภาพ (quality)

3. เพื่อความต้านทานโรค

การปรับปรุงพันธุ์พืชในเรื่องผลผลิตอาจจะทำการปรับปรุงโดยตรงกับผลผลิตและองค์ประกอบของผลผลิต เช่น การเพิ่มจำนวนรวงต่อกอในพืชไร่ หรืออาจจะปรับปรุงทางอ้อม เช่น ความต้านทานต่อโรคและแมลง ส่วนในเรื่องของคุณภาพนั้นไม่สามารถที่จะอธิบายได้โดยใช้ความรู้ทางพันธุศาสตร์ง่ายๆ นอกจากนี้ คุณภาพยังขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะความต้องการของมนุษย์อีกด้วยซึ่งอาจจะเปลี่ยนแปลงไปตามสถานที่

การวางแผนปรับปรุงพันธุ์ โดยการสำรวจถึงแหล่งพันธุกรรมเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพื่อสำรวจดูว่าพืชชนิดนั้นมีในแหล่งพันธุกรรมไหนบ้าง แล้วนำมาปรับปรุงให้เหมาะสมขึ้น เช่น ผักกาดขาวปลีถูกเก็บรวบรวมพันธุ์ไว้ที่ AVRDC ประเทศไต้หวัน ซึ่งอาจหาตัวอย่างพืชเพื่อใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ได้ หรือนักปรับปรุงพันธุ์อาจจะทำการเก็บสะสม และรวบรวมพันธุ์ไว้ใช้เองก็ได้ ความจำเป็นที่จะต้องสร้างประชากรขึ้นใหม่ที่มี genetic variability ก็ต่อเมื่อไม่สามารถหาชนิดหรือแหล่งพันธุ์นั้นได้แล้ว การปรับปรุงพันธุ์มีกระบวนการต่างๆ ดังนี้

1. การรวบรวมพันธุ์และการนำเข้า (collection และ introduction)

2. การผสมพันธุ์ (hybridization)

3. การคัดเลือก (selection)

4. การกระตุ้นการผ่าเหล่า (induce mutation)

5. การกระตุ้นโพลีพลอยดี (induce polyploidy) (ดำเนิน, 2541)

Opena *et al.* (1988) ได้กล่าวถึงจุดมุ่งหมายในการปรับปรุงพันธุ์ผักกาดขาวปลี เพื่อสร้างพันธุ์พืชให้มีลักษณะดังนี้ คือ

1. ผลผลิตสูง ความสม่ำเสมอ และอายุการเก็บเกี่ยวเร็ว

2. ต้านทานต่อโรค

3. ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เครียด

4. คุณภาพ และลักษณะที่ตลาดต้องการ

5. ทนต่อสภาพอากาศร้อน

โดยวิธีการปรับปรุงพันธุ์ผักกาดขาวปลีมีอยู่หลายวิธี คือ

1. การคัดเลือกแบบรวม (mass selection)
2. การคัดเลือกแบบกลุ่ม (family selection)
3. การคัดเลือกสายพันธุ์แม่ (maternal line selection)
4. การคัดเลือกแบบวงจร (recurrent selection)
5. การผสมกลับ (backcross method)
6. การผสมพันธุ์ (hybridization)

การสร้างลูกผสมจะนำเอาสายพันธุ์แท้มาผสมกันซึ่งมีหลายวิธี แต่ที่นิยมกันโดยทั่วไป ดังตารางที่ 2.3 (ดำเนิน, 2541)

สำหรับการที่จะปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมชนิดไหนนั้น ขึ้นอยู่กับสถานที่ทดลองและนักปรับปรุงพันธุ์เอง ในสมัยก่อนนั้นลักษณะลูกผสมแบบสี่ทางและสามทางเป็นที่นิยมอย่างกว้างขวาง แต่ปัจจุบันพบว่า ลูกผสมเดี่ยวนั้นจะแสดงความดีเด่นกว่าลูกผสมชนิดอื่นทั้งหมด อีกทั้งวิทยาการอื่นๆ มีส่วนเกื้อกูลในการติดเมล็ดของลูกผสม (seed production) ให้พอเพียงที่จะใช้ขยายเป็นพันธุ์ส่งเสริมได้ ดังนั้นลักษณะของลูกผสมเดี่ยวจึงเข้ามาแทนที่ลูกผสมแบบอื่นๆ

ตารางที่ 2.3 ลักษณะของชนิดลูกผสม

Category	Type	Pedigree
Simple	Single cross	A/B
Special	Sister lines	AxA_1/BxB_1
Complex	Three way	AxB/C
	Double cross	AxB/CxD
	Multiple cross	(ABCD)/(EFGH)
	Back cross	(AxB)A/(CxD)C
	Single Backcross	(AxB)/(CXD)C
	Variety cross	Syn B^+/Syn B^*
	Single topcross	AxB/Syn C

หมายเหตุ : A B C D E F G H หมายถึง สายพันธุ์แท้ A B C D E F G H

A_1 B_1 หมายถึง สายพันธุ์ที่เป็นพี่น้องกันของสายพันธุ์แท้ A และ B

Syn B^+ Syn B^* Sny C หมายถึง พันธุ์สังเคราะห์ (synthetic variety)

พันธุ์ลูกผสม (hybrid variety) เป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง (F_1 hybrid) ซึ่งได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อแม่ที่มีจีโนไทป์ต่างกัน ซึ่งอาจเป็นพันธุ์แท้ (inbred line) หรือ พันธุ์แท้บางส่วน (partial inbred line) หรือกลุ่มประชากรที่ผสมพันธุ์โดยการสุ่ม (random mating population) หรือลูกผสมเดี่ยว (single cross) ก็ได้ คุณลักษณะพื้นฐานจะต้องเป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่งเท่านั้น การใช้ลูกผสมนี้เพื่อเมล็ดพันธุ์ในชั่วต่อไป (F_2) ย่อมหมายถึง การลดลงของความสามารถประจำพันธุ์ ซึ่งมีสาเหตุเนื่องมาจากปรากฏการณ์การถดถอยทางกรรมพันธุ์เนื่องจากการผสมตัวเอง (inbreeding depression) และการลดลงของความสม่ำเสมอ (uniformity) อันเนื่องมาจากการกระจายตัวของยีน (gene segregation) ลักษณะโดยทั่วไปของพันธุ์ลูกผสม (ดังตารางที่ 2.3) จะมีองค์ประกอบของประชากรที่เป็น 2 ลักษณะ คือ

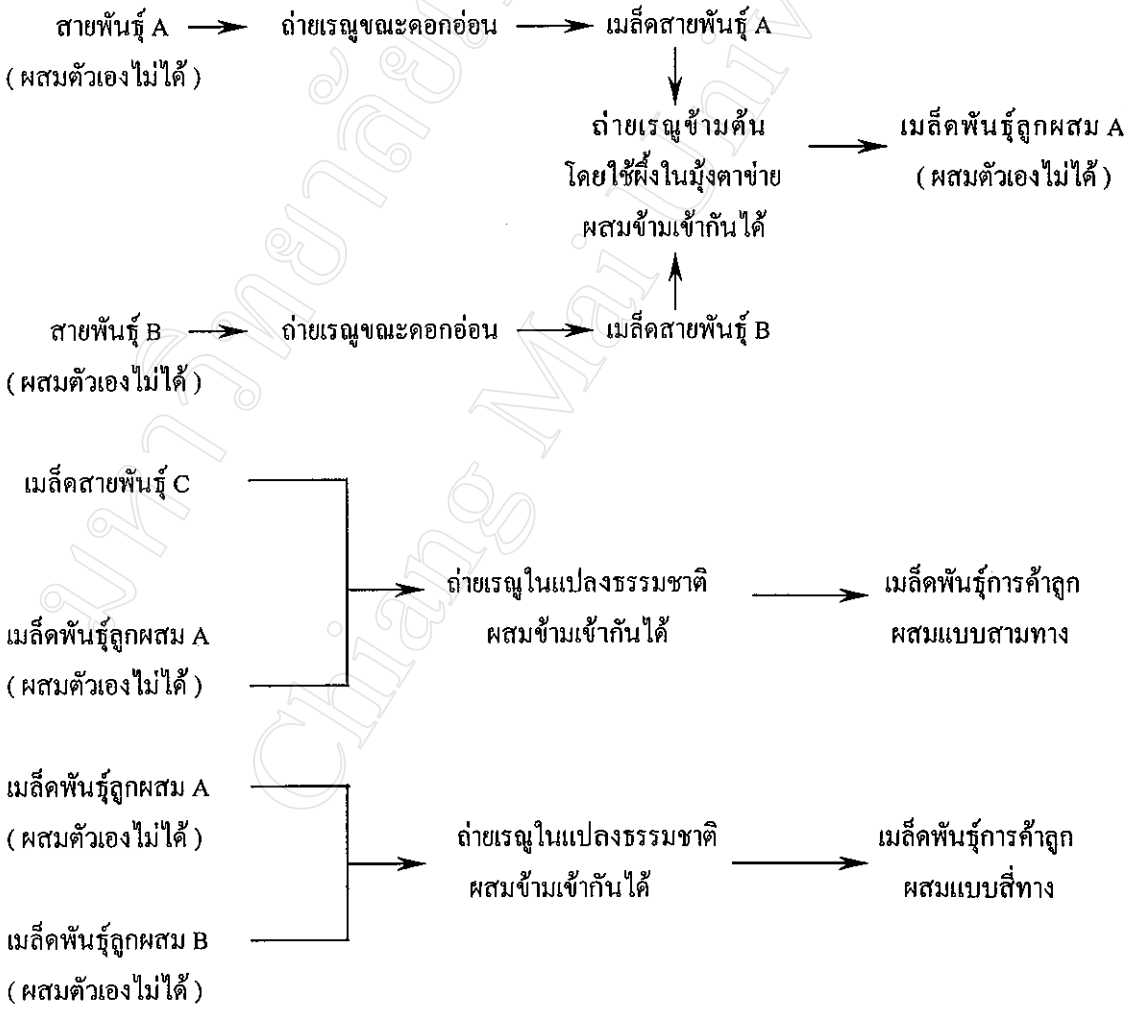
1. เป็นประชากรที่เป็น genetically identical แต่มีต้นพืชในประชากรเป็น heterozygous

2. เป็นประชากรที่เป็น genetically heterozygous homogeneous และต้นพืชในประชากรเป็น heterozygous (ดำเนิน, 2541)

นอกจากนี้ ยังมีงานทดลองที่เป็นการปรับปรุงพันธุ์ลูกผสมและการประเมินพันธุ์ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงพันธุ์พืชวงศ์กะหล่ำ โดย Liu *et al.* (1997) ผลิตผักกาดขาวปลีพันธุ์ลูกผสม Zhengbai 4 ซึ่งถูกพัฒนามาจากการใช้สายพันธุ์ที่มีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ มีความต้านทานต่อโรคหลายชนิด ผลผลิตสูง ปลีมีคุณภาพดี สีเหลืองขาวและปลีแน่นซึ่งเป็นลักษณะดี Xu *et al.* (1995) ปลูกทดสอบผักกาดขาวปลีพันธุ์ลูกผสม Beijing 75 ที่ได้จากการถ่ายเรณูข้ามของสายพันธุ์ 181 x Xia 2 ซึ่งมีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ Chen *et al.* (1991) ผลิตพันธุ์ลูกผสมผักกาดขาวปลี Taoyuan Yashu 2 ที่ได้จากการถ่ายเรณูข้ามระหว่างสายพันธุ์ PL1 x N4-2-41Cb13Ago1(3)-6-1-1-4-2-41 Han (1997) ผลิตผักกาดขาวปลีพันธุ์ลูกผสม Hanhung 3 ที่ได้จากการถ่ายเรณูข้ามจากสายพันธุ์ที่มีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ Li *et al.* (1995) ปลูกทดสอบผักกาดขาวปลีพันธุ์ลูกผสม Lu Chun Bai 1 ซึ่งจะให้ปลีคุณภาพสูง ต้านทานต่อเชื้อ *Peronospora parasitica, Erwinia carotovora* และไวรัส Wang *et al.* (1996) ปลูกทดสอบผักกาดขาวปลีพันธุ์ลูกผสม Zhongbai 1 ซึ่งต้านทานต่อเชื้อ *Xantomonas campestris*, *P. parasitica*, *E. carotovora, Alternaria brassicicola* และไวรัส Song and Wei (1997) ได้ถ่ายเรณูข้ามในผักกาดขาวปลีระหว่างสายพันธุ์ Xiao Qing Kou x Lu Da Xiao Gen และผสมกลับด้วยพันธุ์ Tong Xiang Huang Ya Cai ได้เป็นพันธุ์ลูกผสม Huang Ya 14-1 Suh *et al.* (1995) ผลิตผักกาดขาวปลีพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากการถ่ายเรณูข้ามระหว่างสายพันธุ์ 0-2 ซึ่งต้านทานต่อเชื้อ turnip mosaic potyvirus (TuMV) สายพันธุ์ C1, C2, C3, C4 และ C5 กับสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเชื้อไวรัสนี้ จำนวน 4 พันธุ์ คือ Seoul (SE), SSD31 (SS), Cheongbang และ Yaki 1 ho

การถ่ายทอดยีนต้านทานของพันธุ์ 0-2 ถูกเปลี่ยนแปลงตามสายพันธุ์พ่อแม่ที่อ่อนแอ คู่ผสม SS x 0-2 และคู่ผสม SE x 0-2 จะต้านทานต่อ TuMV สายพันธุ์ C3 หรือ C5 ซึ่งการทดสอบด้วยวิธี ELISA test ชี้ให้เห็นว่ายีนเด่นยับยั้งการเคลื่อนที่ของไวรัสมากกว่าการเพิ่มจำนวนไวรัส Gower (1974) ผลิต swede พันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่งจากคู่ผสมที่ได้จากสายพันธุ์ที่มีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้จำนวน 6 พันธุ์

Shinohara (1984) ได้อธิบายการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมแบบผสม 3 ทาง (triple cross) และผสม 4 ทาง (double cross) เพื่อใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกาดขาวปลีเป็นการค้า โดยอาศัยลักษณะการผสมตัวเองไม่ได้มาใช้ ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 วิธีการผลิตเมล็ดผักกาดขาวปลีพันธุ์ลูกผสมแบบสามทางและสี่ทาง

Chu and Xin (1993) ผลิตกะหล่ำปลีพันธุ์ลูกผสม Qiu Lan ที่ได้จากการถ่ายเรณูข้ามระหว่างสายพันธุ์ 73 Qiu 6-4-1 x 20-2-5 ซึ่งมีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ Chen *et al.* (1997) ผลิตกะหล่ำปลีพันธุ์ลูกผสม Xiyuan 4 ที่ได้จากการถ่ายเรณูข้ามระหว่างสายพันธุ์ที่มีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ที่นำมาจากประเทศญี่ปุ่น คือ สายพันธุ์ 7817-5-10-3-3-3 และ 83281-3-1-8-9-1 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่คัดเลือกจากพันธุ์ท้องถิ่น โดยจะต้านทานต่อเชื้อ *X. campestris* และ TuMV ผลผลิตมากกว่าพันธุ์ท้องถิ่น 20.5-27.1 % Chen *et al.* (1997) ผลิต pak choi พันธุ์ลูกผสม Beijing Xiao Za 60 ที่ได้จากการถ่ายเรณูข้ามระหว่างสายพันธุ์ Xia 2 x Cheng 2 ซึ่งมีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ที่นำมาจากประเทศญี่ปุ่น และจังหวัด Shandong ของจีน ตามลำดับ Bauch and Joseph (1990) ผลิตกะหล่ำปลีพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากสายพันธุ์ที่มีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้นำมาเปรียบเทียบกับพันธุ์ผสมเปิด โดยพันธุ์ลูกผสมที่ผลิตเป็นชนิดลูกผสมเดี่ยว [A x B] , ลูกผสมเดี่ยวระหว่างพี่น้อง [sib-line single cross ; (A1 x A2) x (B1 x B2)], ลูกผสมเดี่ยวดัดแปลง [modified single cross ; (A1 x A2)x (A x B)], ลูกผสม 3 ทางดัดแปลง [modified 3-way cross ; (A x B)x (A x C)] และ modified topcross [(A1 x A2) x variety] Ding *et al.* (1995) ผลิตกะหล่ำปลีพันธุ์ลูกผสม Chunlei ที่ได้จากการถ่ายเรณูข้ามระหว่างพันธุ์ 8201-3-3-1-3 x 7202-11-2-6-5-3 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะ ผสมตัวเองไม่ได้

Yin *et al.* (1997) ผลิตกะหล่ำปลีพันธุ์ลูกผสม Chunbao จากการถ่ายเรณูข้ามระหว่างสายพันธุ์ 441591 และ 87123 ซึ่งมีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ อายุการเก็บเกี่ยวเร็ว ปลีมีลักษณะแหลมและคุณภาพดี Shi *et al.* (1997) ผลิตกะหล่ำปลีพันธุ์ลูกผสม Yanchun ซึ่งเป็นพันธุ์ early spring จากสายพันธุ์ที่มีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ระหว่างพันธุ์ D1-5-2-5-4 และ H1-6-1-1-10 ซึ่งมีลักษณะของปลีแตกต่างกัน Fang *et al.* (1997) ผลิตกะหล่ำปลีพันธุ์ลูกผสม 8398 ที่ได้จากการคัดเลือกคู่ผสมระหว่างพันธุ์ 8101-2-20-2 x 8180-1-2-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ผสมตัวเองไม่ได้ พบว่า พันธุ์ลูกผสมมีความสามารถในการผลิตสูงมาก Alipieva and Nankova (1996) ผลิตกะหล่ำปลีพันธุ์ลูกผสม 136 x 134, 136 x 111 และ 136 x M3 ที่ได้จากถ่ายเรณูข้ามจากสายพันธุ์ที่ผสมตัวเองไม่ได้ โดยพันธุ์ลูกผสม 136 x 134 มีชื่อว่า Karino (Nankova and Alipieva, 1996) Liu *et al.* (1997) คัดเลือกพันธุ์กะหล่ำปลีลูกผสม Zhonggan 9 โดยปลีมีน้ำหนักเฉลี่ย 3 กิโลกรัม ผลผลิต 13,200 – 14,400 กิโลกรัมต่อไร่ อายุการเก็บเกี่ยวประมาณ 85 วัน หลังจากย้ายปลูก ปลีมีสีเขียวเข้ม ขนาดพอเหมาะใบบางและอ่อน มีรสชาดและคุณภาพการเก็บรักษาดี

Lei *et al.* (1995) ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะต่างๆ ของกะหล่ำปลี 5 ลักษณะ คือ เส้นผ่าศูนย์กลางตามยาวและตามขวางของปลี ความแน่นของปลี น้ำหนักปลี และความยาวของลำต้น ซึ่งได้จากการถ่ายเรณูข้ามด้วยวิธี diallele ของสายพันธุ์แท้ 5 พันธุ์ พบว่าปฏิกิริยาแบบ additive

dominance ควบคุมลักษณะเส้นผ่าศูนย์กลางตามขวางและน้ำหนักปลี การแสดงออกแบบข่มข้ามคู่ (epistasis) อาจควบคุมลักษณะเส้นผ่าศูนย์กลางตามยาวและความยาวของลำต้น และปฏิกิริยาแบบข่มเกิน (overdominance) จะควบคุมทั้ง 5 ลักษณะ โดยเส้นผ่าศูนย์กลางตามยาว ถูกควบคุมด้วยยีนเด่นอย่างน้อยที่สุด 4 คู่ ความแน่นของปลีกับความยาวของลำต้น และเส้นผ่าศูนย์กลางตามขวางกับน้ำหนักถูกควบคุมด้วยยีนเด่น 1 และ 2 คู่ ตามลำดับ Liu *et al.* (1997) ปรับปรุงพันธุ์กะหล่ำปลี 5 พันธุ์ ที่มีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ด้วยวิธี diallele เพื่อศึกษาความสามารถการรวมตัวทั่วไป (general combining ability ; GCA) และ ความสามารถการรวมตัวแบบเฉพาะเจาะจง (specific combining ability ; SCA) ในเรื่องน้ำหนักปลี ขนาดปลี ความยาวลำต้นและขนาดต้น พบว่าสายพันธุ์ 8498-2 เป็นพ่อแม่ดีที่สุด สายพันธุ์ 94126-1 รองลงมา และความแปรปรวนของ SCA ใน 7 ลักษณะทั้งหมดจะสูงกว่า GCA ซึ่งชี้ให้เห็นว่าปฏิกิริยาแบบ nonadditive มีมากกว่า

More and Wallace (1990) ได้คัดเลือกกะหล่ำปลี สายพันธุ์แท้จำนวน 10 พันธุ์ จากคู่ผสมของ Reed' Hybrid 8 x Green Winter เพื่อศึกษาสมรรถนะการรวมตัว (combining ability) และ heterosis จากการใช้ลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ พบว่าสายพันธุ์แท้ 662 และ 668 เป็นสายพันธุ์ที่ดีในการศึกษาลักษณะทั้งหมด โดยพันธุ์ลูกผสม 662 x 668 เหมาะสำหรับผลิตเป็นการค้า พันธุ์ลูกผสม 665 x 666, 665 x 679 และ 666 x 972 เหมาะสำหรับการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม 4 ทาง Maneesinthu *et al.* (1990) ศึกษาการติดเมล็ดในผักกาดหัวพันธุ์ลูกผสม (*R. sativas*) ที่ได้จากสายพันธุ์ที่มีลักษณะผสมตัวเองไม่ได้ จำนวน 5 พันธุ์ คือ KU 1-2-12, OW1-7-3, OW1-7-7, Kow Puey 3/7 และ Kow Puey 3/5

การจำแนกพันธุ์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis)

การใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นการเคลื่อนย้ายอนุภาคที่อยู่ในสารละลายด้วยกระแสไฟฟ้า โดยอาศัยคุณสมบัติของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าบวกหรือลบซึ่งจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบหรือขั้วบวกในสนามไฟฟ้าด้วยอัตราการเคลื่อนที่และความเร็วต่างกันไป ตามน้ำหนักโมเลกุลและชนิดของประจุบนอนุภาคนั้นๆ การเคลื่อนที่ของอนุภาคด้วยอัตราความเร็วที่ต่างกันนี้ช่วยในการจำแนกโมเลกุลต่างๆ ออกจากกันได้ และสามารถบ่งบอกถึงชนิด รูปร่าง ขนาดและน้ำหนักโมเลกุลของสารได้ รวมทั้งบอกถึงชนิดของประจุ การเปลี่ยนแปลงประจุของอนุมูลต่างๆ ในโมเลกุลแต่ละชนิดได้ (พิสสวรรณ, 2531) ในการจำแนกพันธุ์พืชหรือสายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวเคมีโดยใช้เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีประสิทธิภาพในการแยก และวิเคราะห์สารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน และ

เอนไซม์ มีหลักการที่สำคัญ คือ โปรตีนนั้นถือได้ว่าเป็น primary product ที่เกิดขึ้นจากการแสดงกิจกรรมของยีนซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่มีอยู่ในพืช โดยเฉพาะพวกโครงสร้างยีน (structural gene) ดังนั้น การเปลี่ยนแปลงใดๆ ที่เกิดขึ้นที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน (nucleotide sequence of gene) หรือ ลำดับเบส (coding base sequence) ย่อมมีผลต่อการสร้างโปรตีนหรือโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ที่มีโครงสร้างทางโมเลกุลของกรดอะมิโนที่เรียงลำดับแตกต่างกันไปด้วย ดังนั้น การวิเคราะห์โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนต่างๆ กันย่อมมีประจุไฟฟ้ารวม ขนาดและรูปร่างของโมเลกุลที่ไม่เหมือนกัน ซึ่งเมื่อนำมาแยกในตัวกลางที่เหมาะสมตามวิธีทางอิเล็กโทรโฟรีซิส โมเลกุลต่างๆ ก็จะเคลื่อนที่ในอัตราที่ต่างๆกัน เมื่อนำมาย้อมสีก็จะเกิดแถบสีของโปรตีนที่เรียกว่า zymogram ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชหรือสายพันธุ์พืชนั้นได้ (เพิ่มพงษ์, 2531)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าในสารละลายผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งๆ ได้แก่ (พิสสวรรณ, 2531 ; ชวนพิศ, 2538)

1. กระแสไฟฟ้าและแรงดันไฟฟ้า ในกระบวนการอิเล็กโทรโฟรีซิส เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าตรงไปในสารละลายที่มีอนุภาคต่างๆ ที่มีประจุไฟฟ้า อนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ และอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกด้วยอัตราการเคลื่อนที่ที่ขึ้นอยู่กับขนาดความเข้มของสนามไฟฟ้าและจำนวนไฟฟ้ารวมของอนุภาค ภายใต้อิทธิพลของแรงต้าน และความหนืดของสารละลายตัวกลาง เมื่อเพิ่มปริมาณกระแสไฟฟ้าหรือเพิ่มค่าแรงดันให้กับระบบ อัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของอนุภาคจะเพิ่มขึ้น ค่าความต้านทานของสารละลายในตัวกลางจะลดลง ขณะเดียวกันก็จะมีความร้อนเกิดขึ้นขณะปฏิบัติงาน ซึ่งอาจมีผลไปทำให้เกิดการระเหยของสารจากตัวกลางได้ สารประกอบโปรตีนและเอนไซม์จะมีการเสื่อมสภาพที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 - 50 องศาเซลเซียส และคุณสมบัติของโปรตีนและเอนไซม์จะลดลงจากเดิม ซึ่งทำให้การตรวจสอบไม่ชัดเจน

2. ค่าไอออนิกสเตรนจ์ (ionic strength) มีอิทธิพลต่อการละลายของสารละลาย เช่น เมื่อสารละลายมีค่าไอออนิกสเตรนจ์ต่ำ โปรตีนจะละลายได้มาก เมื่อค่าไอออนิกสเตรนจ์เพิ่มขึ้น โปรตีนจะละลายได้น้อยลง ถ้าค่าเพิ่มขึ้นอีกเรื่อยๆ ในที่สุดโปรตีนจะไม่ละลายและแยกตัวตกตะกอนออกมา เนื่องจากโมเลกุลของน้ำในโปรตีนถูกดึงออกมาสู่สารละลาย อย่างไรก็ตาม ถ้าค่าไอออนิกสเตรนจ์ของสารละลายมีค่าสูงก็จะทำให้อนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าเคลื่อนที่ช้าลง ขณะเดียวกันก็จะช่วยให้มีการแยกของโมเลกุลต่างชนิดได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ค่าไอออนิกสเตรนจ์ของสารละลาย บัฟเฟอร์ที่ใช้ในกระบวนการทางอิเล็กโทรโฟรีซิส มักจะมีค่าอยู่ระหว่าง 0.03 - 0.15 และที่นิยมใช้กันมาก คือ 0.05, 0.075 และ 0.1

3. pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ เนื่องจากประจุไฟฟ้ารวมของอนุภาคของสารบางชนิด เช่น โปรตีน จะขึ้นอยู่กับระดับของ pH เป็นสำคัญ pH ของสารละลายบัฟเฟอร์จึงมีอิทธิพลอย่างมากต่อทิศทางและอัตราการเคลื่อนที่ของอนุภาค

4. ชนิดของบัฟเฟอร์ ที่ระดับ pH เดียวกัน บัฟเฟอร์ต่างชนิดกันจะให้ผลในการแยกสารแตกต่างกัน บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ ได้แก่ tris - hydroxymethyl amino - methane, borate, phosphate, citrate และ acetate เป็นต้น

อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel electrophoresis ; PAGE) เป็นเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ใช้โพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) ในการแยกโปรตีนที่นิยมกันมากในปัจจุบัน ซึ่งมีโพลีอะคริลาไมด์เป็นสารสังเคราะห์พวกโมโนเมอร์ (monomer) ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ (hydrophilic) และสามารถทำให้ได้รูพรุนที่สม่ำเสมอ โดยคงสภาพโพลีเมอไรเซชัน (polymerization) ให้คงที่ การเกิดโพลีเมอไรเซชันเป็นเจลได้เมื่อละลายรวมกับ bisacrylamide ซึ่งเป็น co - monomer (cross - linking agent) โดยมีอนุมูลอิสระ (free radicle) ซึ่งได้จาก ammonium persulphate และมีตัวเร่งปฏิกิริยา คือ TEMED (N,N,N′,N′ - tetramethyl - ethylenediamine) การเกิดโพลีเมอไรเซชันเริ่มขึ้นภายใน 10 - 30 นาที และสมบูรณ์ในระยะเวลา 60 - 90 นาที ขึ้นอยู่กับปริมาณ TEMED ที่ใช้ นอกจากนี้ยังมีสารบางตัว เช่น riboflavin ที่สามารถใช้แทน ammonium persulphate ได้ แต่ปฏิกิริยาการโพลีเมอไรเซชันจะต้องใช้แสงช่วย (day light fluorescent) ซึ่งจะใช้เวลานานไม่น้อยกว่า 8 ชั่วโมง

คุณสมบัติที่ดีของเจลโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) ในการแยกสาร

1. มีเสถียรภาพในช่วงกว้างต่อสภาพ pH (ยกเว้น pH >10) อุณหภูมิ และค่าไอออนิกสเตรนจ์ นอกจากนั้นยังยืดหยุ่นได้

2. ไม่มีปฏิกิริยาทางเคมีกับสารที่ต้องการแยกในสนามไฟฟ้า

3. มีความใส สามารถอ่านความเข้มของ isozyme band ได้จากเครื่อง เช่น เครื่องวัดความทึบแสง (densitometer) หรือ spectrophotometer gel scanner

4. สามารถเตรียมเจลให้มีขนาดของรูภายในเจลได้ตามที่เราต้องการ โดยใช้อะคริลาไมด์และ bisacrylamide ในสัดส่วนที่พอเหมาะ

แต่ข้อเสียในการใช้โพลีอะคริลาไมด์ คือ ราคาค่อนข้างแพง มีความเป็นพิษต่อระบบประสาท อาจก่อมะเร็งด้วย และการเตรียมมีขั้นตอนและเทคนิคหลายประการ ถ้าหากจะให้ได้เจลที่สามารถโพลีเมอไรเซชัน 100 % ต้องใช้เวลานาน 2 – 8 ชั่วโมง กว่าจะใช้เจลได้ (เพิ่มพงษ์, 2531 ; ดวงพร, 2538)

Zheng and Yan (1995) ได้ทดสอบเมล็ดพันธุ์ผักกาดขาวปลีสายพันธุ์แท้ โดยใช้เอนไซม์ peroxidase และ esterase ซึ่งแบบแผนไอโซไซม์ peroxidase จะแยกความแตกต่างของลูกผสมชั่วที่หนึ่ง (F_1) จากสายพันธุ์แท้ได้ถึง 10 พันธุ์ และเอนไซม์ esterase แยกความแตกต่างได้ 9 พันธุ์ จากจำนวนลูกผสม 12 พันธุ์ Liang *et al.* (1995) ใช้อิเล็กโทรโฟรีซิสแบบโพลีอะคริลาไมด์เจล ศึกษาไอโซไซม์ peroxidase จากส่วนต่างๆ และทุกระยะการเจริญเติบโตของผักกาดขาวปลีที่เป็น allocytoplasmic male sterile 2 ชนิด ซึ่งมี nuclear background (AA, 2n = 20) เหมือนกัน แต่มีแหล่งของ cytoplasm ต่างกัน คือ Polina cytoplasm จาก *B. napus* และ Ogura cytoplasm จากผักกาดหัว พบว่าแบบแผนไอโซไซม์ peroxidase จากตาดอกเหมาะสมที่สุด Kanazawa *et al.* (1981)ได้ศึกษาวิเคราะห์แบบแผนไอโซไซม์ peroxidase และ esterase จากใบของผักกาดขาวปลี, กะหล่ำปลี และพันธุ์ลูกผสม B1 [*B. napus* x *B. campestris*] B2 [B1 x *B. campestris*] และ B3 [B2 x *B. campestris*] Nozaki *et al.* (1995 ; 1997) ได้วิเคราะห์ไอโซไซม์ ซึ่งได้แก่ acid phosphatase (ACP) esterase (EST) leucine aminopeptidase (LAP) glutamate oxaloacetate transminase (GOT) peroxidase (POX) phosphoglucoisomerase (PGI) และ phosphoglucomutase (PGM) ในประชากรรุ่นที่ 2 ของพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากผักกาดขาวปลีสายพันธุ์แท้กับ Mizu - na (*B. campestris* L. var *japonica*) และ pak choi พันธุ์ chingen - sai และประชากรรุ่นที่ 2 ของพันธุ์ลูกผสมที่ได้จากผักกาดขาวปลีกับ Mizu - na (*B. campestris* L. var *japonica*) Chevre *et al.* (1996) ได้วิเคราะห์และตั้งชื่อสำหรับระบบไอโซไซม์ 7 ชนิด ใน *B. nigra* (18 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ), *B. oleracea* (43 ตัวอย่าง ซึ่งประกอบด้วยกะหล่ำปม, กะหล่ำปลี และกะหล่ำดอกที่เป็นพันธุ์ท้องถิ่น และพันธุ์การค้าที่ได้มาจากประเทศฝรั่งเศส) และ *B. campestris* (12 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ)

Fitzgerald *et al.* (1997) ศึกษาวิเคราะห์การใช้เอนไซม์ acid phosphatase ในการแยกความแตกต่างในกะหล่ำดาวและกะหล่ำปลี Wood and Thurman (1976) ได้ใช้เอนไซม์ acid phosphatase แยกความแตกต่างระหว่างกะหล่ำดาวพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง กับพ่อแม่สายพันธุ์แท้ Ronis *et al.* (1990) ได้ทดสอบแบบแผนไอโซไซม์ในพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่งของพืชสกุล *Cupea* จำนวน 5 พันธุ์ ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างในพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง *C. viscosissima* x *C. lutea* , *C. lanceolata* x *C. viscosissima* และ *C. ignea* x *C. angustifolia* จากสายพันธุ์พ่อแม่ได้ชัดเจนด้วยเอนไซม์ phosphoglucomutase และ 6 - phosphogluconic สำหรับเอนไซม์ phosphoglucose isomerase และ shikimate dehydrogenase สามารถแยกความแตกต่างได้ในพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง *C. viscosissima* x *C. lutea* และ *C. lanceolata* x *C. viscosissima* ตามลำดับ นอกจากนี้

แบบแผนไอโซไซม์ของพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่ง *C. lanceolata* x *C. viscosissima* ถูกใช้ในการจำแนกพันธุ์ลูกผสมชั่วที่หนึ่งอื่นอีกด้วย

การประเมินศักยภาพของการใช้ไอโซไซม์เพื่อการจำแนกพันธุ์พืช อาศัยหลักการสำคัญ 4 ประการ คือ (เพิ่มพงษ์, 2531)

1. แบบแผนไอโซไซม์ที่ได้ต้องมาจากพืชทดสอบที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน

2.สามารถแสดงความแตกต่างของแบบแผนไอโซไซม์ระหว่างพันธุ์พืชได้อย่างชัดเจน ในทางคุณภาพและด้านปริมาณ

3. มีความแปรปรวนของแบบแผนไอโซไซม์ในพันธุ์เดียวกันน้อยที่สุด

4. เทคนิคการตรวจสอบที่ได้มาตรฐาน และสถิติที่เชื่อถือได้ ซึ่งเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสก์เป็นที่ยอมรับ

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University