บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (genetic purity) ของข้าวโพดโดยทั่วไปแล้วจะพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) สรีระวิทยา (physiology) เซลล์วิทยา (cytological) และความทนทานต่อศัตรูพืช ซึ่งวิธีการดังกล่าวต้องใช้ระยะเวลานาน เสียค่าใช้จ่ายมาก และในธรรมชาติข้าวโพดเป็นพืชผสมข้ามจึงมีความปรวนแปรในพันธุกรรมสูงและการแสดงออกของพืชอาจแปรปรวนได้เนื่องจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อม ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้นำเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบทางชีวเคมีมาใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม โดยอาศัยคุณลักษณะที่แตกต่างกันของรูปแบบไอโซไซม์ที่มีอยู่ในพันธุ์แต่ละพันธุ์ (อาภัสสรา, 2537)

ตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเอกชน และจากเกษตรกร ในการเตรียมต้นกล้าเพื่อใช้ในการทดลองจะทำการเพาะในสภาพแวดล้อมที่จำกัดที่ อุณหภูมิห้อง มีฉากกันน้ำฝน ให้น้ำทุกเช้าและเย็นในปริมาณเท่ากันทุกวัน ทรายที่นำมาใช้เพาะได้ผ่านการฆ่าเชื้อมาแล้ว เพื่อควบคุมสภาพแวดล้อมให้แก่เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ทดลองให้อยู่ในสภาพเดียวกัน การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาการจำแนกเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมพันธุ์ 2029S จากพันธุ์พ่อ แม่ โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส ทดสอบโดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิด คือ esterase (EST), peroxidase (PER) และ glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) เนื่องจากเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ ได้มีการนำมาใช้ในการจำแนกชนิดและพันธุ์ในข้าวโพดและธัญพืช (Zeng *et al*., 1997 ; Smith, 1998 ; Bonow *et al*., 2001 ; ป่าน, 2539 ; ปณิตา, 2540) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้เอนไซม์ esterase มาตรวจสอบ esterase activity โดยวิธี Polyacrylaminde Gel Electrophoresis (PAGE) และสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ที่อ่อนแอ และพันธุ์ต้านทานในพืช *Dibrotica virgifera* ออกจากกันได้อย่างชัดเจน (Xuguo *et al*., 2003)

เนื่องจาก esterase isozyme เป็นไอโซไซม์ชนิดหนึ่งที่พบในพืชชั้นสูง และนิยมนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส เช่น การศึกษา esterase isozyme ในใบอ่อนของ sweet potato ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างในรูปแบบของไอโซไซม์ระหว่างพันธุ์ต่าง ๆ (Kennedy and Thompson, 1991) นอกจากนี้ยังพบการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ esterase, glutamate oxaloaceatae transaminase, leucin amino peptidase, malic enzyme และ malate dehydrogenase

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 และชัยนาท 1 พบว่ามีเพียงไอโซไซม์ esterase ที่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าว 2 พันธุ์ได้อย่างชัดเจน (กนกวรรณ, 2548)

เอนไซม์ peroxidase มีการแสดงออกของแถบสีที่มีจำนวนมากและง่ายต่อการจำแนกรูปแบบไอโซไซม์ในข้าวโพดข้าวเหนียว (waxy maize) (Zeng *et al*., 1997) การศึกษา protein enzyme โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของ lovegrass (*Eragrostis curvula*) และสามารถตรวจสอบไอโซไซม์โดยใช้เอนไซม์ peroxidase และ esterase ซึ่งสามารถแสดงรูปแบบที่ชัดเจนได้ (Di Renzo *et al*., 1992) และยังพบว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถแสดงรูปแบบไอโซไซม์ และแสดงแถบสีที่ชัดเจนในข้าวโพดหวานพันธุ์ต่าง ๆ ได้ (Pedro, 1995) และพบว่าในการใช้เอนไซม์ esterase และ glutamate oxaloacetate transaminase ในละหุ่งลูกผสม (*Ricinus communis* L.) พบการปรากฏแถบสีที่จางของ glutamate oxaloacetate transaminase ขณะที่ปรากฏแถบสีของ esterase ชัดเจนซึ่งสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ (Varier *et al.,* 1999) ส่วนการศึกษาการจำแนกพันธุ์บัวอุบลชาติโดยการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ พบว่า glutamate oxaloacetate transaminase เกิดแถบสีเพียงเพียงสองแถบสี และไม่สามารถจำแนกพันธุ์ได้ (สุพัตรา, 2547)

เมื่อทดสอบเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดในข้าวโพดลูกผสม และพันธุ์พ่อ แม่ พบว่าสามารถปรากฏแถบสีได้ แต่ความคมชัดของแถบสีจากการย้อมของแต่ละเอนไซม์แตกต่างกัน ซึ่งความเข้มของแถบสีที่เกิดขึ้นนั้นเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์คือ แถบที่มีสีเข้มอาจแสดงถึงความสามารถทำงานได้ดีและเต็มที่กว่าแถบที่มีสีจางกว่า (Jaaska, 1983) โดยเอนไซม์ glutamate oxaloacetate transaminase แสดงผลการย้อมสีได้ชัดเจนที่สุดคือ มีสีน้ำเงินเข้ม รองลงมาคือ esterase และ peroxidase สาเหตุอาจเป็นเพราะในงานทดลองครั้งนี้ ผู้ทดลองได้ทำการเก็บตัวอย่างสดไว้โดยแช่ในตู้เย็นที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อความสะดวกในการใช้ รวมทั้งทำการบดตัวอย่างสดในไนโตรเจนเหลว ซึ่งการที่สีจางลงอาจเป็นเพราะกิจกรรมของเอนไซม์ลดลง และในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแต่ละครั้งไม่ได้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนก่อนอาจเป็นไปได้ว่าปริมาณโปรตีนไม่เท่ากัน

การเปลี่ยนแปลงรูปแบบไอโซไซม์ เกี่ยวข้องกับพันธุกรรมของพืชโดยตรงโดยมีการแสดงแถบสีในหลาย ๆ ตำแหน่ง (polymorphic) ของไอโซไซม์แต่ละชนิด และเกี่ยวข้องกับจำนวนโลกัส (locus) รูปแบบของยีนหรืออัลลีล (allele) ต่อโลกัสและโครงสร้างของเอนไซม์ (quarteranry structure of enzyme) (อัญชลี, 2536) โดยเอนไซม์ esterase สามารถแสดงการปรากฏของแถบสีได้มากถึง 11 แถบสี เช่นเดียวกับ ryegrass (Griffith and Banowetz, 1992) เนื่องจาก esterase เป็น non-specific enzyme ทำให้เกิด polymorphic bands มาก (ชวนพิศ, 2538) ในขณะที่เอนไซม์ peroxidase แสดงการปรากฏแถบสี 3 แถบสี และเอนไซม์ glutamate oxaloacetate transaminase

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แสดงการปรากฏแถบสีเพียง 2 แถบสีเท่านั้น และการปรากฏแถบสีของเอนไซม์ esterase ในข้าวโพดลูกผสมพบว่ามีลักษณะของพันธุ์พ่อแม่ร่วมกัน และเกิดแถบสีของลูกผสม (hybrid band) 1 แถบสี ในตำแหน่งแถบสีที่ 4 เนื่องจากยีนที่ควบคุมการแสดงออกของไอโซไซม์แสดงปฏิกิริยาแบบข่มร่วม (codominant) ดังนั้นลูกผสมจึงมีแถบของพ่อ แม่ ปรากฏอยู่ และมีแถบของลูกผสมเกิดขึ้น (ชวนพิศ, 2538; Bailey, 1983) เช่นเดียวกับผักกาดขาวปลีลูกผสม (ณภัทร, 2543) และสตรอเบอรี่ลูกผสม (ปราโมทย์ และเกศินี, 2544)

ผลจากการอ่านไซโมแกรมของข้าวโพดลูกผสม และพันธุ์พ่อ แม่ หลังจากย้อมด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด พบว่ามีเพียงเอนไซม์ esterase ที่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ส่วนเอนไซม์ peroxidase และ glutamate oxaloacetate transaminase ไม่สามารถแสดงความแตกต่างได้ เนื่องจากการปรากฏแถบสีมีลักษณะเป็น monomorphic มีค่า Rf เท่ากันจึงไม่เหมาะสมสำหรับการจำแนกพันธุ์พืชออกจากกัน เพราะไม่สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ แต่ก็มีประโยชน์ในการจัดกลุ่มพืชหากเป็นแถบร่วมของตัวอย่างส่วนใหญ่ที่นำมาทดสอบ (Vallejos, 1983) ถึงแม้ว่าเอนไซม์ glutamate oxaloacetate transaminase และ peroxidase ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสม จากพันธุ์พ่อแม่ได้ แต่เอนไซม์ glutamate oxaloacetate transaminase ก็เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญโดย Pooler and Simon (1993) กล่าวว่า glutamate oxaloacetate transaminase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในปฏิกิริยา transamination ในการกำจัดไนโตรเจน (N_2) ออกจากกรดอะมิโน และการฟอร์มตัวของ keto acid ในวัฏจักรเครป (Kreb 's cycle) และ gluconeogenesis และพบว่าโครงสร้างของ glutamate oxaloacetate transaminase ในข้าวโพดถูกควบคุมโดยยีน 3 loci

ส่วนเอนไซม์ peroxidase นั้นเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญเติบโตโดยไปขัดขวางปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ indoleacetic acid (IAA) และเกี่ยวข้องกับการสลายตัวของผนังเซลล์ นอกจากนั้น peroxidase ยังเป็นกลุ่มโปรตีนกลุ่มใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับการแลกเปลี่ยนประจุจากสารตั้งต้นที่ออกซิไดซ์ได้ เช่น phenol และ aromatic amine ให้เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งแถบสีของ peroxidase แสดงถึงการเกิด post translational modification จึงทำให้จำนวนแถบและความคมชัดของแถบมักไม่สม่ำเสมอในต้นกล้าหรือพืชที่กำลังพัฒนา (Durham *et al*., 1987) และในการทดลองที่ 1 ได้นำเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมพันธุ์ต่าง ๆ มาศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ esterase เพื่อเปรียบเทียบว่าเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดต่างพันธุ์กันจะมีการแสดงออกของรูปแบบไอโซไซม์ esterase แตกต่างกันหรือไม่ ผลการทดลองพบว่าข้าวโพดต่างพันธุ์กันมีรูปแบบไอโซไซม์ที่ต่างกันตั้งแต่ 2-9 แถบสี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับการทดลองที่ 2 เป็นการตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดพันธุ์และต้นกล้า ในส่วนของการตรวจสอบโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสนี้ใช้เอนไซม์ esterase ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ลูกผสมจากพันธุ์พ่อแม่ได้ โดยนำมาทดสอบกับตัวอย่างที่เก็บจากเกษตรกรและเปรียบเทียบกับพันธุ์ต้นแบบ พบว่า รูปแบบของแถบไอโซไซม์ esterase และผลจากการอ่านไซโมแกรมของตัวอย่างเมล็ดพันธุ์จากเกษตรกรและพันธุ์ต้นแบบนั้นมีรูปแบบเดียวกัน และเมื่อทำการทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ ก็ให้ผลการทดสอบเช่นเดิม และเมื่อเปรียบเทียบค่า Rf จากการทำซ้ำ พบว่ามีค่าคลาดเคลื่อนเล็กน้อยแต่ยังคงอยู่ในช่วง Rf ที่ใกล้เคียงกันซึ่งแสดงว่าตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ที่นำมาทดสอบนั้นตรงตามพันธุ์ สำหรับการตรวจสอบโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเมล็ดพันธุ์และต้นกล้าข้าวโพดที่อายุ 15 วัน พบว่าตัวอย่างจากเกษตรกรไม่มีความแตกต่างจากพันธุ์ต้นแบบเลย ไม่ว่าจะเป็นสีเมล็ด น้ำหนัก 100 เมล็ด และความสูงของต้นกล้า เป็นต้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการตรวจสอบลักษณะของเมล็ดพันธุ์และต้นกล้านั้นพืชยังเจริญเติบโตไม่สมบูรณ์ลักษณะประจำพันธุ์บางอย่างยังไม่ปรากฏ จึงไม่พบความแตกต่างของเมล็ดพันธุ์ และต้นกล้า ดังเช่นงานทดลองของ Smith and Wych (1986) ที่ตรวจสอบการปลอมปนพันธุ์ในเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมโดยพิจารณาจากการเจริญเติบโตของพืชที่ระยะ seedling, anthesis และ maturity พบว่าระยะ seedling, anthesis และ maturity ตรวจพบการปลอมปนพันธุ์ 0, 3 และ 12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาเรื่องการใช้ไอโซไซม์ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม การจำแนกพันธุ์และชนิดพืช รวมทั้งการยืนยันการเป็นลูกผสมในพืชต่าง ๆ อีกมากมาย ดังรายงานที่สามารถยืนยันการเป็นลูกผสมของมะเขือเทศ โดยใช้รูปแบบไอโซไซม์ esterase และ dehydrogenase และสามารถนำมาใช้เป็น marker ในการตรวจสอบการปลอมปนพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศได้ (Vodenicharova *et al*., 1999) และยังพบว่าสามารถใช้เอนไซม์ acid phosphatase isozyme ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางสายพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ *Brassica oleracea* var *botrytis* (Celso *et al.,* 2002) จากผลการศึกษาการใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในการตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมชี้ให้เห็นว่ารูปแบบไอโซไซม์ esterase สามารถใช้เป็น marker เพื่อนำไปตรวจสอบความตรงตามพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved