บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

ความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์

ข้าวสายพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML105) เป็นข้าวหอมที่มีชื่อเสียงมากที่สุดของไทยนอกจากจะมีความหอมแล้วยังมีคุณสมบัติในการหุงต้มที่ดีอีกด้วย จากการวิจัยพบว่ายีนที่ควบคุมลักษณะความหอมอยู่บนโครโมโซมที่ 8 ของจีโนมข้าว แผนที่จีโนมทางกายภาพ (physical mapping) ได้ถูกพัฒนาขึ้นจาก การนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาดใหญ่ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 มาวางซ้อนเหลื่อมกันอย่างต่อเนื่อง ครอบคลุมบริเวณยีนที่ควบคุมความหอม เพื่อเปิดทางให้การค้นหายีน ทำได้สะดวกมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 นี้ยังมีความเหมาะสมเฉพาะพื้นที่หรือมีความต้องการสภาพแวดล้อมเฉพาะ หากเป็นแหล่งปลูกที่เหมาะสมแล้วจะมีความหอมที่ชัดเจนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งถือเป็นพื้นที่ปลูกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 แหล่งที่ใหญ่ที่สุดในประเทศไทย ถึงแม้ว่าพื้นที่ปลูกส่วนใหญ่ต้องอาศัยน้ำฝน ที่ทำให้เกิดความแปรปรวนของผลผลิตสูง แต่ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกในพื้นที่นี้ยังคงมีคุณภาพความหอมสูงกว่าพื้นที่ภาคอื่นๆที่มีความอุดมสมบูรณ์ของดินสูงกว่า จากความไม่ชัดเจนของพันธุ์และลักษณะสภาพแวดล้อมที่มีความสัมพันธ์กับการสร้างและสะสมสารหอม 2AP การศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาไอโซไซม์ที่มีความจำเพาะในเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ชัยนาท 1 นี้ที่ได้จากแหล่งที่ปลูกต่างๆ

ปกติการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางสายพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ข้าวในประเทศไทย ดำเนินการโดยศูนย์วิจัยข้าวและสถานีทดลองข้าวต่างๆ ในสังกัดของสถาบันวิจัยข้าว ซึ่งอยู่ในความควบคุมดูแลของนักวิชาการและเจ้าหน้าที่ที่ทำงานเกี่ยวกับการผลิตเมล็ดพันธุ์ ซึ่งต้องผลิตเมล็ดพันธุ์ทั้งพันธุ์คัดและพันธุ์หลัก ให้มีความบริสุทธิ์ทางสายพันธุ์ถูกต้องตรงตามพันธุ์ กล่าวคือ พันธุ์ข้าวแต่ละพันธุ์ที่ผลิตขึ้นมานั้นต้องมีลักษณะถูกต้องตรงตามพันธุ์ตรงกับลักษณะพันธุ์นั้นๆ ที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชได้สร้างขึ้นมา ให้มีความบริสุทธิ์ทั้งภายในและภายนอก (เอกสงวน, 2544)

ความบริสุทธิ์ภายใน คือความบริสุทธิ์ในเชื้อพันธุ์หรือถูกต้องตรงตามพันธุ์ หมายความว่าเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้ เมื่อนำไปปลูกจะต้องให้ต้นข้าวที่มีรูปแบบเหมือนพันธุ์เดิมทุกประการ ไม่ว่าจะเป็นรูปแบบของต้น ความสูง ขนาดของต้น ใบ สีของต้น ใบ เวลาในการออกดอก ลักษณะของรวง สีของเมล็ด รวมถึงความต้านทานโรค แมลง ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมบางอย่าง และรูปแบบของไอโซไซม์ที่แสดงออกให้เห็นเมื่อทำการทดสอบโดยการย้อมสีเอนไซม์ต่างๆ สำหรับความบริสุทธิ์ภายนอกหรือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ความบริสุทธิ์ทางกายภาพ คือปราศจากสิ่งเจือปนมากับเมล็ดพันธุ์ เช่น ไม่มีเมล็ดข้าวพันธุ์อื่น ไม่มีเมล็ดวัชพืช ไม่มีสิ่งเจือปนรวมถึงไม่มีโรค แมลง ติดมากับเมล็ดพันธุ์

ดังนั้นเมล็ดพันธุ์ที่ดี จะต้องประกอบด้วยลักษณะหลายประการดังนี้ (เอกสงวน, 2544)

- เป็นเมล็ดพันธุ์ที่บริสุทธิ์ทางสายพันธุ์หรือเมล็ดพันธุ์แท้
- ไม่มีเมล็ดพันธุ์ข้าวอื่นปน
- ไม่มีเมล็ดข้าวแดง
- ไม่มีสิ่งอื่นๆปน
- ปราศจากโรค แมลง
- มีความงอกดี
- มีความชื้นต่ำ

มาตรฐานเมล็ดพันธุ์ข้าว

หลังจากเก็บเกี่ยว นวด ตาก ทำความสะอาดแล้ว ต้องทำการสุ่มตัวอย่างไปตรวจสอบวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดพันธุ์ ก่อนที่จะนำไปผลิตขั้นต่อไป หรือจำหน่ายจ่ายแจกเกษตรกร เมล็ดพันธุ์ที่ผ่านมาตรฐานเท่านั้นจึงจะนำไปใช้ได้ ทั้งนี้ เพื่อให้ได้เมล็ดพันธุ์ที่บริสุทธิ์ ตรงต่อพันธุ์ มีความงอกสูง เมื่อปลูกแล้วจะให้ผลผลิตสูงและคุณภาพดีตรงตามวัตถุประสงค์ มาตรฐานเมล็ดพันธุ์ข้าวของประเทศไทยแสดงไว้ในตาราง 1

ลักษณะประจำพันธุ์ข้าวที่ใช้ในการพิจารณาตรวจคัดข้าวปน

การผลิตเมล็ดพันธุ์ให้ได้คุณภาพดี ลักษณะที่ควรจำให้ได้คือรูปแบบหรือรูปทรงของต้นข้าวเช่น เป็นข้าวกอตั้งหรือข้าวกอแผ่ แตกกอดีหรือไม่ดี ขนาดของต้นและใบจัดอยู่ในพวกต้นใหญ่ใบใหญ่ หรือต้นเล็กใบเล็ก สีของต้นและใบเป็นสีเขียวหรือม่วง เป็นข้าวต้นเตี้ยหรือสูง มีอายุการเก็บเกี่ยวหรือเก็บเกี่ยวได้เมื่อไร ลักษณะของรวงเป็นแบบรวงกระจายหรือรวงแน่น การยึดของคอรวงอยู่ห่างมากหรือน้อย ระหว่างของโคนรวงกับข้อต่อของใบธง สีของเปลือกเมล็ดเป็นสีฟาง หรือสีฟางขีดน้ำตาล หรือฟางขีดดำ เป็นต้น ดังนั้นในการผลิตเมล็ดพันธุ์จึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องจำลักษณะพันธุ์ข้าวให้แม่นยำ โดยการเลือกลักษณะที่เหมือนกันของต้นข้าวส่วนใหญ่ไว้ ส่วนลักษณะที่ผิดแผกไปจากต้นข้าวส่วนใหญ่ ให้ถือว่าเป็นต้นข้าวปนหรือต้นข้าวกลายพันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 มาตรฐานการยอมรับเมล็ดพันธุ์ข้าว (เอกสงวน, 2544)

ที่	ประเภทเมล็ดพันธุ์	ความต้องการที่ยอมให้					
		เมล็ดพันธุ์แท้ (อย่างน้อย)	ข้าวแดง (ไม่เกิน)	ข้าวพันธุ์อื่นปน (ไม่เกิน)	สิ่งเจือปน (ไม่เกิน)	ความงอก อย่างน้อย	ความชื้น (ไม่เกิน)
1.	พันธุ์หลักข้าว (Foundation seed)	98 %	ไม่มี	1 เมล็ด ใน 1,000 กรัม	2 %	80 %	14 %
2.	พันธุ์ขยายข้าว (Stock seed)	98 %	ไม่มี	1 เมล็ด ใน 500 กรัม	2 %	80 %	14 %
3.	พันธุ์จำหน่ายข้าว (Multiplication seed)	98 %	1 เมล็ด ใน 1,000 กรัม	1 เมล็ด ใน 250 กรัม	2 %	80 %	14 %
4.	พันธุ์หลัก ธัญพืชเมืองหนาว (Temperate cereal foundation seed)	98 %	ไม่มี	1 เมล็ด ใน 1,000 กรัม	2 %	80 %	12 %

หมายเหตุ 1. สำหรับข้าวเหนียวยอมให้มีข้าวเจ้าปนได้ไม่เกิน 10 เมล็ด ใน 1,000 กรัม

2. ธัญพืชเมืองหนาวในปัจจุบันหมายถึงข้าวสาลีและข้าวบาร์เลย์เท่านั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ลักษณะต่างๆของพันธุ์ข้าวได้แก่

1. ทรงกอ (tiller) กอข้าวมีรูปแบบต่างๆกันเช่น กอตั้งตรง กอแผ่ และกอส่าย
2. ขนาดและความสูงของต้น (size of stem and hight) ข้าวบางพันธุ์มีขนาดลำต้นใหญ่ บางพันธุ์เล็ก ความสูงของแต่ละพันธุ์ก็ไม่เท่ากัน
3. ใบ (leaf) ข้าวแต่ละพันธุ์มีขนาดของใบไม่เท่ากัน ทั้งความกว้างและความยาวและลักษณะการชูใบก็ไม่เหมือนกัน คือ ใบตั้งตรง ใบแผ่ และใบตก นอกจากนี้สีของใบก็ยังมีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ด้วย เช่น สีเขียวเข้ม สีเขียวปานกลาง เขียวอ่อน สีม่วง หรือสีเขียวขอบม่วง เป็นต้น
4. สีของกาบใบ (leaf sheath) ข้อต่อใบ (collar) เขี้ยวใบ (auricle) และเยื่อกันน้ำฝน (ligule) จะมีสีแตกต่างกันระหว่างพันธุ์
5. ดอกและวันออกดอก เกสรตัวเมียของข้าวบางพันธุ์มีสีเห็นชัดเจน วันออกดอกของข้าวแต่ละพันธุ์แตกต่างกัน
6. รวง (panicle) มีความแตกต่างกันเกี่ยวกับความยาว ความถี่ห่างของระแง้ ความยาวของคอรวง ลักษณะการชูรวง การเรียงตัวของเมล็ดในรวง (รวงแน่นหรือรวงกระจาย) เป็นต้น
7. เมล็ด เมล็ดข้าวจะมีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์เกี่ยวกับ สีเปลือก สีข้าวกล้อง ขนาดรูปร่างเมล็ด ชนิดของ endosperm ปริมาณอมิโลส อุณหภูมิแป้งสุก และคุณสมบัติในการหุงต้มรับประทาน

ลักษณะทางกายภาพที่ใช้จำแนกพันธุ์ข้าว

สีของเมล็ดข้าวเปลือก สีของข้าวเปลือกเป็นลักษณะประจำพันธุ์ ซึ่งสมัยก่อนมีส่วนในการตั้งชื่อพันธุ์ข้าว เช่น ขาวพวง ขาวนางเนย เนื่องจากมีเปลือกสีฟาง หรือสีขาว หรือเหลืองข้างรั้ว เหลืองหอม เนื่องจากมีเปลือกสีน้ำตาล หรือสีเหลือง เป็นต้น เมื่อข้าวสุก (แก่) สีเปลือกจะแตกต่างจากเมล็ดอ่อนโดยสิ้นเชิง เมล็ดข้าวอ่อนที่มีเปลือกสีขาวเมื่อสุกอาจเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทอง น้ำตาลอ่อน น้ำตาลเข้ม ดำ หรือม่วงได้ ในทางตรงข้าม เมล็ดข้าวเมื่อยังอ่อนมีสีแตกต่างกัน พอเมล็ดแก่เปลือกอาจเปลี่ยนเป็นสีเดียวกันได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะการแสดงออกของ multiple gene ที่ควบคุมลักษณะนี้อยู่ นักพันธุศาสตร์ของ IRRI รายงานว่า เมื่อเมล็ดข้าวแก่ สีของเปลือกจะมีทั้งขาว (white) ฟาง (straw) น้ำตาลอ่อนถึงเข้ม (light to dark brown) ทอง (gold) ร่องน้ำตาล (brown furrows) กระน้ำตาล (brown spots) น้ำตาลแดง (reddish brown) ม่วงหรือดำ (shades of purple or sooty black) เป็นต้น สำหรับข้าวไทย ส่วนใหญ่มีเปลือกสีฟาง และน้ำตาล สีอื่นๆ เช่น สีดำ น้ำตาลแดง เขียวแกมเทา ก็มีบ้าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สีข้าวกล้อง ในเมล็ดข้าว สีข้าวกล้องจะแสดงออกที่เยื่อหุ้มผล (pericarp) ส่วน endosperm ของข้าวทุกชนิดมีสีขาวเสมอ ถึงแม้ข้าวกล้องจะเป็นสีอื่นๆก็ตาม ข้าวกล้องมีสีต่างๆกัน ตั้งแต่ ขาว แดง น้ำตาลเข้ม น้ำตาลเทา และม่วงถึงเกือบดำ สีข้าวกล้องถูกควบคุมโดย gene หลายคู่ ซึ่งแสดงออกในลักษณะต่างๆ ทั้ง complementary, duplicate และอื่นๆ ข้าวกล้องที่มีสีแดง และม่วง มีสารพวก anthocyanin pigment อยู่ที่เยื่อหุ้มผล จากการสำรวจข้าวพันธุ์ต่างๆในธนาคารเชื้อพันธุ์ของศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี พบว่ามีข้าวกล้องอยู่ 4 สี คือ ขาว น้ำตาล แดง และดำ (ม่วง) แต่ส่วนใหญ่มีสีขาว

ขนาดรูปร่างเมล็ด มีการปลูกข้าวในหลายทวีปของโลก ทั้งในอเมริกา ยุโรป ออสเตรเลีย อัฟริกา และเอเชีย แต่พื้นที่ปลูกส่วนใหญ่อยู่ในเอเชียแถบประเทศ อินเดีย พม่า ไทย เวียดนาม ญี่ปุ่น ไต้หวัน และเกาหลี เป็นต้น แต่ละประเทศมีภูมิประเทศ ภูมิอากาศ วิธีการเพาะปลูก และความชอบในการบริโภคข้าวแตกต่างกัน ดังนั้น ข้าวที่ปลูกอยู่ในแต่ละแห่งจึงมีลักษณะ รูปร่างเมล็ดแตกต่างกันด้วย ขนาดรูปร่างเมล็ด หมายถึงความยาว (length) ความกว้าง (width) ความหนา (thickness) และความป้อมหรือเรียว (shape) ของเมล็ด

พบว่าเมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางสรีรวิทยาที่คล้ายและใกล้เคียงกับเมล็ดข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ดังแสดงในตาราง 2

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 เปรียบเทียบลักษณะพันธุ์ข้าวเจ้าพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ชัยนาท 1 (ดัดแปลงจาก เอกสงวน, 2544)

พันธุ์	ความสูง (ซม.)	ระยะเมล็ดพักตัว (สัปดาห์)	เมล็ด			ลักษณะสำคัญบางประการ	ผลผลิตโดยประมาณ (กก./ไร่)	ปีที่ออกขยายพันธุ์ (พ.ศ.)
			สีเปลือก	ข้าวกล้อง				
				ความยาว (มม.)	รูปร่าง	ข้าวสุก		
ขาวดอกมะลิ 105	140	8	สีฟาง	7.4	เรียว	นุ่มหอม	ปลูกได้ในที่นาดอนทั่วไป ทนแล้ง ทนดินเปรี้ยว ทนดินเค็ม คุณภาพการหุงต้มดี มีกลิ่นหอม รสชาติดี ต้านทานไส้เดือนฝอยรากปม ไม่ต้านทานโรคไหม้ โรคขอบใบแห้ง โรคใบสีส้ม โรคใบหงิก เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จักจั่นสีเขียวและหนอนกอ	365	2502
ชัยนาท 1	120	8	สีฟาง	7.7	เรียว	ร่วนแข็ง	ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยกระโดดหลังขาว และโรคใบหงิก ค่อนข้างต้านทานโรคไหม้	725 - 754	2536

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เทคนิคการตรวจสอบสายพันธุ์

การตรวจสอบพันธุ์และชนิดพืช (veritification of cultivar and species) เป็นการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ ที่มีความสำคัญทางการเกษตรมากทั้งในด้านการค้าและการเพาะปลูก ผลการตรวจสอบใช้ประกันและรับรองคุณภาพสินค้า ซึ่งวิธีการตรวจสอบควรเป็นวิธีที่ง่ายไม่ยุ่งยากจนเกินไป เที่ยงตรง แม่นยำและเป็นสากล โดยทั่วไปการตรวจสอบพื้นฐานโดยสากล หลักการปฏิบัติสามารถเปิดคู่มือและปฏิบัติตามกฎสากลการตรวจสอบของสมาคมระหว่างประเทศ ISTA หรือ AOSA ได้ การตรวจสอบพันธุ์และชนิดพืชที่มีวิธีการละเอียดระบุอยู่ในกฎสากลการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ของ ISTA (ISTA, 1996)

การตรวจสอบพันธุ์และชนิดพืชมีวัตถุประสงค์เพื่อการรับรองเมล็ดพันธุ์ คือตรวจสอบว่าพันธุ์บริสุทธิหรือไม่ มีพันธุ์ปนหรือไม่ ในบางกรณีการตรวจสอบพันธุ์อาจมุ่งหมายเพื่อยืนยันว่าพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์เป็นพันธุ์ใหม่ที่แท้จริง ไม่ใช่พันธุ์เดิมที่เคยมีอยู่แล้ว หรือมีพันธุกรรมซ้ำกับที่เคยมีอยู่ ซึ่งการตรวจสอบพันธุ์ตามความมุ่งหมายนี้นับวันจะยิ่งสำคัญขึ้นเพราะสามารถรองรับกฎหมายคุ้มครองพันธุ์พืช ได้แก่ การจดทะเบียนพันธุ์ และสิทธิบัตรพันธุ์พืชได้ การตรวจสอบที่ถูกต้อง ต้องมีตัวอย่างของเมล็ดพันธุ์นั้นๆที่ตรงตามพันธุ์และเชื่อถือได้ เพื่อนำมาใช้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบด้วย ลักษณะที่สามารถใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อการจำแนกพันธุ์ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological character) ลักษณะทางสรีรวิทยา (physiological character) ลักษณะทางเซลล์วิทยา (cytological character) และลักษณะทางองค์ประกอบทางเคมี (chemical character)

วิธีการตรวจสอบพันธุ์ด้วยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพืชไร่ (morphological and agronomic characters) ซึ่งต้องนำเมล็ดมาปลูกเพื่อสังเกตลักษณะต่างๆ ระหว่างการเจริญเติบโต บางครั้งต้องตรวจสอบจนถึงระยะพืชแก่ และต้องปลูกให้มีประชากรมาก เพียงพอเพื่อให้ความมั่นใจในผลของการตรวจสอบ วิธีนี้ใช้เวลานานกว่าจะทราบผล เสียค่าใช้จ่ายมาก และต้องการพื้นที่กว้าง ยิ่งไปกว่านั้นการแสดงออกของพืชอาจแปรปรวนตามปัจจัยทางสภาพแวดล้อม และในปัจจุบันนี้ พืชแต่ละชนิดก็มีจำนวนพันธุ์มากขึ้น วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นการค้นคว้าวิจัย เพื่อหาเทคนิควิธีที่รวดเร็วมีประสิทธิภาพและไม่แพงจนเกินไป จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมากโดยเฉพาะวิธีทางชีวเคมี

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของพืช แต่เดิมจะเน้นวิธีการวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก ซึ่งวิธีการดังกล่าวยังคงมีความสำคัญในการจำแนกพันธุ์พืชที่ระดับสกุล (genus) และชนิด (species) แต่การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอในการจำแนกพันธุ์พืชภายในชนิดเดียวกัน เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยามีความผันแปรตามสภาพแวดล้อม ทำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ให้ขาดความแม่นยำ ปัจจุบันการจำแนกพันธุ์ภายในชนิดเดียวกันนิยมศึกษาเกี่ยวกับไอโซไซม์ โดยใช้เทคนิคของ electrophoresis ซึ่งลักษณะไอโซไซม์ไม่ผันแปรตามสภาพแวดล้อม และมีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และชนิดของสิ่งมีชีวิต (อัญชลี, 2536) ทำให้การจำแนกน่าเชื่อถือมากขึ้น ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมและการทำงานร่วมกันของยีนหลายตัว มีบทบาทเกี่ยวข้องต่อลักษณะการแสดงออกภายนอก (phenotype) ของข้าว

นอกจากนั้นการปรับปรุงพันธุ์ข้าวจะก่อให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ของข้าวขึ้นอย่างมากมาย ดังนั้น การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวในการจำแนกพันธุ์ข้าวนั้นยังไม่แม่นยำพอ ในปัจจุบันจึงมีการนำเทคนิคทาง electrophoresis มาช่วยในการจำแนกสายพันธุ์ เนื่องจากในธรรมชาติพืชที่ต่างพันธุ์กันอาจมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน แต่จะยังมีความแตกต่างกันในด้านชีวเคมีอยู่ และวิธีทางชีวเคมีเป็นการศึกษาโมเลกุลของโปรตีนหรือเอนไซม์โดยตรงก่อนที่จะสร้างโมเลกุลอื่น ดังนั้นลักษณะทางพันธุกรรมของพืชย่อมอาศัยเอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ได้

ปัจจุบันการตรวจสอบพันธุ์โดยวิธีใช้ biochemical marker และ molecular marker มีความสำคัญขึ้นและมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นเรื่อยๆ ความก้าวหน้าที่รวดเร็วเกิดจากการใช้ polyacrylamide gel electrophoresis ในการตรวจสอบโปรตีนที่เป็นอาหารสำรอง (storage protein) และการใช้ isoelectric focusing (IEF) ในการวิเคราะห์ไอโซไซม์ ยิ่งไปกว่านั้น ความก้าวหน้าล่าสุดในการใช้ระบบ molecular marker ทำให้สามารถแยกพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ สำหรับการใช้ biochemical marker ส่วนใหญ่ใช้โปรตีน (หรือเอนไซม์) เป็นหลัก เช่น esterase และ peroxidase (isozyme) การแยกโมเลกุลของโปรตีนปกติใช้เทคนิคทางอิเลคโทรโฟรีซิส ซึ่งเป็นการแยกตามประจุของอนุภาคที่เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบพันธุ์โดยวิธี Isoelectric focusing ซึ่งเป็นการตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิสที่ปรับปรุงให้มีความแม่นยำขึ้น

การจำแนกหมวดหมู่ของพืชตามการถ่ายทอดทางพันธุกรรมซึ่งทำให้เกิดความเหมือนหรือแตกต่างกันในลักษณะโครงสร้างนั้นสามารถจำแนกให้เป็นกลุ่มใหญ่ๆเท่านั้น สำหรับการจำแนกเป็นกลุ่มย่อยๆที่ระดับ genus และ species นั้นจำเป็นต้องอาศัยลักษณะหรือคุณสมบัติด้านอื่นๆมาพิจารณา การนำลักษณะทางพฤษเคมีมาช่วยในการจำแนกสายพันธุ์สาหร่ายโดยใช้เทคนิคทางอิเลคโทรโฟรีซิส ก็เป็นวิธีหนึ่งที่แยกวิเคราะห์สารชีวโมเลกุลจำพวกไอโซไซม์ ซึ่งเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างโมเลกุลหลายรูปแบบ สามารถสกัดจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตด้วยวิธีการธรรมดา เมื่อนำมาแยกในตัวกลางที่เหมาะสมตามวิธีทางอิเลคโทรโฟรีซิส ผลที่ได้นำไปทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่เหมาะสม กับเอนไซม์แล้วนำไปย้อมสี ก็สามารถเห็นแถบสีของไอโซไซม์ซึ่งมีระยะการเคลื่อนที่บนตัวกลางที่แตกต่างกันตามชนิดของประจุไฟฟ้าและน้ำหนักโมเลกุลของไอโซไซม์นั้นๆ รูปแบบของไอโซไซม์นี้เรียก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ว่า zymogram ลักษณะของ zymogram ที่ปรากฏสามารถนำไปใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชหรือสายพันธุ์พืชที่นำมาวิเคราะห์ได้ (Tanksley and Orton, 1983) ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทในการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมของประเทศในทุกด้านรวมทั้งด้านการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าว ซึ่งเป็นธัญญาหารของคนไทยและชาวโลกกว่า 4,000 ล้านคน ข้าวเป็นสินค้าที่ประเทศไทยส่งออกมากเป็นอันดับหนึ่งของโลก โดยคิดเป็นปริมาณส่งออกประมาณ 6 ล้านตันต่อปี จากปริมาณ 17-18 ล้านตัน ทั่วโลก สร้างรายได้ให้กับประเทศปีละประมาณ75,000 ล้านบาท ประเทศไทยจึงเป็น อู่ข้าวอู่น้ำของคนทั่วโลก และยังเป็นแหล่งกำเนิดหลากหลายพันธุ์ข้าวที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่ง ดังนั้นการวิจัยและพัฒนาด้านข้าว จึงเป็นพื้นฐานที่สำคัญที่จะช่วยยกระดับความสามารถและประสิทธิภาพในการผลิต และปรับปรุงพันธุ์ข้าว ได้แก่ การตรวจสอบสายพันธุ์แท้โดยวิธีตรวจสอบไอโซไซม์ และวิธีที่นิยมมากที่สุดคือเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส

การใช้เทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิสในปัจจุบัน สถานีวิจัยเมล็ดพันธุ์บางแห่งได้มีการนำมาใช้เพื่อการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์กันบ้างแล้ว แต่การพัฒนาเทคนิคนี้เพื่อสามารถนำไปใช้ได้รวดเร็ว สะดวกและง่ายขึ้นนั้นยังไม่มีการศึกษา ปัญหาอย่างหนึ่งของการใช้เทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส คือการใช้อุปกรณ์ที่มีราคาสูง เทคนิคซับซ้อนยุ่งยาก สารเคมีราคาแพง บางสถาบันไม่สามารถนำเทคนิคนี้มาใช้ได้ ดังนั้นการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคที่มีความสะดวกรวดเร็ว และประหยัดค่าใช้จ่าย จึงมีความจำเป็นที่จะนำมาใช้ ดังเช่น การศึกษา isozyme pattern ที่เป็น specific marker เพื่อสามารถนำไปใช้กับเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอสเซ (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) และสามารถนำไปดัดแปลงเพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ต่อไปได้

การจำแนกความแตกต่างของพันธุ์พืชโดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis หรือ PAGE นั้นพบว่ามีการศึกษากันมากมายดังเช่นการตรวจสอบ isoenzyme pattern ของสายพันธุ์ถั่ว *Phaseolus vulgaris* L. โดยใช้วิธี Horizontal polyacrylamide gel electrophoresis ด้วย buffer ที่ต่างกัน และระบบการย้อมสีที่ต่างกัน (Choer, 1999) หรือการศึกษาเพื่อตรวจสอบสายพันธุ์ melon โดยใช้วิธี Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ร่วมกับวิธี Capillary electrophoresis (CE) สำหรับดูความแตกต่างของโปรตีนที่เป็นอาหารสำรอง globulines และพบว่าวิธี CE ก็สามารถตรวจสอบได้ดีแต่ยังคงพบข้อผิดพลาดมากกว่าการใช้ SDS-PAGE (Bonfitto, 1999) นอกจากการใช้ PAGE แล้วยังมีการศึกษาหาวิธีการตรวจสอบที่แม่นยำยิ่งขึ้นไปอีกดังเช่น วิธี Ultrathin-layer isoelectrifocus (UTLIEF) เพื่อใช้ในการศึกษาการจำแนกวิเคราะห์ สายพันธุ์พริก (*Capsicum* spp.) โดยจำแนกโปรตีน และ urea detergent soluble ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Lucchese, 1999)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับการนำเทคนิค electrophoresis มาพัฒนาใช้ในการจำแนกพันธุ์ข้าว โดยทำการแยกโปรตีนที่สะสมในเมล็ดพันธุ์ข้าว โดยการใช้ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis ผลที่ได้พบว่า การทำ electrophoresis สามารถนำมาตรวจหา ลักษณะ polymorphism ต่างๆ ของโปรตีนในเมล็ดพันธุ์ข้าวที่สามารถปรับปรุงพันธุ์ข้าวท้องถิ่นเดิมให้มีคุณสมบัติที่ดีเท่าเทียมกับพันธุ์ปรับปรุงได้ (Ricardo *et. al.,* 1998) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาโปรตีนในเมล็ดพันธุ์พืชอื่นๆอีกมาก เช่น *Capsicum* sp. (Panda *et al*., 1986), *Ricinus communis* (Sathaiah and Reddy, 1985), *Manihot* sp. (Grattapaglia *et al*., 1987) และ *Arachis* sp. (Bianchi-Hall *et al*., 1993; Lanham *et al*., 1994) อย่างไรก็ตาม ยังพบว่าการแสดงออกทางสัณฐานวิทยา หรือทาง molecular polymorphisms ในบางกรณีไม่สามารถแสดงผลออกมาให้เห็นได้ชัดเจน ดังงานวิจัย ซึ่งไม่พบความแตกต่างทาง molecular ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ morphological variation, interspecifical หรือ intraspecifical (Damerral *et al.,*1987) สมมุติฐานนี้สามารถสนับสนุนได้ว่า molecular polymorphisms นั้นไม่มีบทบาทในการคัดเลือกตามธรรมชาติ (Kimura, 1968, 1993; Kimura and Ohta, 1971) และการพบความแปรปรวนทางพันธุกรรมในโปรตีนที่ได้ศึกษาจากการใช้เทคนิค two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) ของข้าวโพดจำนวน 5 สายพันธุ์ (Damerval *et al*., 1987) และการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการใช้ SDS-PAGE electrophoresis ต่อโปรตีนในเมล็ดพันธุ์ข้าวสายพันธุ์ Brazilian และการตรวจสอบนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาความสัมพันธ์ทางด้านพันธุศาสตร์และการกระจายพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ข้าวในบราซิลอีกด้วย (Montalvan *et al*., 1995)

นอกจากนี้มีการนำเทคนิคต่างๆมาใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลในพืช เช่น isozymes (Glaszman, 1986; Kochko, 1987) , DNA Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs) (Helentjaris *et al*., 1985) และ Random Amplified Polymorphic DNA (RAPDs) (Halward *et al*., 1992) แต่สำหรับการวิเคราะห์โปรตีนในเมล็ดพันธุ์ยังคงต้องใช้การกำหนด genetic homology ที่ระดับโมเลกุล ดังเช่น การวิเคราะห์โปรตีนในเมล็ดพันธุ์ข้าว (Aliaga-Morel *et al*., 1987)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การแสดงออกของไอโซไซม์

ไอโซไซม์ หมายถึง เอนไซม์ในพืชที่มีโครงสร้างทางโมเลกุลหลายรูปแบบ (multiple-molecular forms) ซึ่งต่างก็ควบคุมปฏิกิริยาชีวเคมีชนิดเดียวกัน มีความจำเพาะต่อ substrate ตัวเดียวกัน (หทัยรัตน์ และคณะ, 2536) ซึ่งไอโซไซม์จะมีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสิ่งมีชีวิต การศึกษาไอโซไซม์เพื่อการจำแนกพันธุ์โดยใช้เทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส อาศัยหลักการที่สำคัญคือ ไอโซไซม์เป็นสายโพลีเปปไทด์ (polypeptides) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) เรียงกันอยู่ลำดับของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน จะมีประจุสุทธิขนาดและรูปร่างของโมเลกุลแตกต่างกันด้วย เมื่อนำไอโซไซม์มาแยกบนตัวกลางที่เหมาะสมด้วยเทคนิคอิเลคโทรโฟรีซิส ซึ่งเป็นการแยกอนุภาคที่มีประจุในสนามไฟฟ้า โมเลกุลของเอนไซม์จะเคลื่อนที่ในอัตราที่ต่างกัน หลังจากที่ทำการย้อมสีด้วยปฏิกิริยาจำเพาะสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด ก็จะเห็นแถบสีเอนไซม์รูปแบบต่างๆ (Bailey, 1983)

ในชั้นของ aleurone layer ของเอนโดสเปอร์มของเมล็ดข้าวนับว่าเป็นส่วนสำคัญของการสะสมโปรตีน ในเมล็ดข้าวจะพบ โปรตีน albumin สูง โปรตีนที่สะสมอยู่ในเมล็ด จะอยู่ในรูปของโปรตีนบอดี้ (protein body) ซึ่งเป็นก้อนหรือเม็ดโปรตีนที่พบสะสมอยู่ในเซลล์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 1 ถึง 20 ไมโครเมตร มีรูปร่างกลมหรือ รูปไข่ ห่อหุ้มไว้ด้วย lipoprotein unit membrane เม็ดโปรตีนบรรจุ 2 ชนิด คือ crystalloids กับ globoids สำหรับ crystalloids เป็นโปรตีนโดยตัวของมันเอง มีลักษณะเป็นผลึก ส่วน globoids ไม่เป็นผลึกมีลักษณะกลม เป็นส่วนที่มี phytin สะสมอยู่ protein body ที่อยู่ในเอนโดสเปอร์มของเมล็ดธัญพืชจะไม่พบ globoids แต่จะพบใน aleurone grain และ globoids อาจสะสมโปรตีนหรือเอนไซม์ได้ในบางกรณี เช่น เอนไซม์ phosphatase (วันชัย, 2538)

การปรับปรุงการทดสอบโดยอาศัยหลักการของการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีให้มีความรวดเร็ว และความจำเพาะสูงขึ้นโดยการนำแอนติเจนหรือแอนติบอดีที่ติดฉลากไว้ด้วยสารต่างๆ เช่นสารเรืองแสง (fluorescent compound) สารกัมมันตภาพรังสี (radioisotope) มาใช้ในการทดสอบเหล่านั้น ถึงแม้การทดสอบดังกล่าวจะมีความไวสูง แต่ก็มีข้อจำกัดบางประการในการใช้ เช่น การใช้สารเรืองแสงและการใช้สารกัมมันตภาพรังสีต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง นอกจากนั้นยังต้องใช้ระบบควบคุมการใช้สารกัมมันตภาพรังสีที่ดีด้วย ดังนั้นในห้องปฏิบัติการเล็กๆส่วนมากไม่สามารถนำมาใช้ได้ จึงมีผู้พยายามคิดค้นสารอื่นที่สามารถใช้แทนได้ดี คือ เอนไซม์ (นภาธร, 2536) สำหรับเทคนิคเอนไซม์ลิงค์อิมมูโนซอร์เบนท์แอส เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถทดสอบกลไกการทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีและแบ่งออกได้เป็น 2 พวกคือ competitive ELISA ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบที่มักจะใช้สำหรับการตรวจหาแอนติเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (Avrameas, 1983) โดยอาศัยการใช้แอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ หรือใช้แอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์เป็นตัวกระทำ (reagent) ใน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดสอบก็ได้ และ non-competitive ELISA การทดสอบนี้มีทั้งใช้ในการตรวจหาแอนติเจนและแอนติบอดี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved