# บทที่ 5
# วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางสายพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ข้าว โดยทั่วไปสามารถทำการตรวจสอบโดยการดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทางสรีรวิทยา ทางเซลล์วิทยา และคุณสมบัติทางเคมีภายใน ในการทดลองนี้ได้นำเทคนิค electrophoresis ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบทางชีวเคมีมาใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางสายพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ข้าวจำนวนสองสายพันธุ์ คือ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ชัยนาท 1 โดยอาศัยคุณลักษณะที่แตกต่างกันของรูปแบบทางไอโซไซม์ที่มีอยู่ภายในสายพันธุ์แต่ละสายพันธุ์ ดังนั้น การนำเทคนิค electrophoresis มาประยุกต์ในการทดสอบความบริสุทธิ์ทางสายพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ข้าวจึงเป็นที่น่าสนใจ เนื่องจากการใช้เทคนิค electrophoresis โดยทั่วไปจะนำไปใช้ประโยชน์เพียงการจำแนกกลุ่มพันธุ์ของพืชต่างๆรวมทั้งข้าว (ป่าน, 2539 และ ปณิตา, 2540)

ในการเตรียมต้นกล้าเพื่อนำมาทดสอบสายพันธุ์ด้วยเทคนิค electrophoresis ในการทดลองนี้ จะทำการเพาะในสภาพแวดล้อมแบบจำกัดที่ อุณหภูมิห้อง มีฉากกันน้ำฝน ให้น้ำทุกเช้าและเย็นในปริมาณเท่ากันทุกวัน ทรายที่นำมาใช้เพาะได้ผ่านการอบฆ่าเชื้อมาแล้ว เพื่อควบคุมสภาพแวดล้อมให้แก่เมล็ดข้าวทั้งสองพันธุ์ให้อยู่ในสภาพเดียวกัน

ในงานทดลองนี้ทำการทดสอบในเมล็ดพันธุ์ข้าว 2 สายพันธุ์คือ เมล็ดพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และเมล็ดพันธุ์ข้าวชัยนาท 1 โดยใช้เอนไซม์ esterase, glutamate oxaloacetate trasaminase, leucine amino peptidese, malate dehydrogenase และ malic enzyme มาตรวจสอบหารูปแบบไอโซไซม์ของทั้งสองสายพันธุ์ เนื่องจากเอนไซม์ทั้ง 5 ตัวนี้ได้มีการนำมาตรวจสอบเพื่อจำแนกกลุ่มพันธุ์ในข้าว โดยทั่วไป esterase ถูกใช้อย่างกว้างขวางในข้าว (หทัยรัตน์ และคณะ, 2535; สุปราณี, 2538; ป่าน, 2539) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้ esterase enzyme มาตรวจสอบ esterase activity โดยวิธี Poly Acrylamide Gel Electrophoresis และยังศึกษา enzyme purification ด้วยการใช้ SDS-PAGE และสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่อ่อนแอ และสายพันธุ์ต้านทานในพืช *Diabrotica virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) ออกจากกันได้อย่างชัดเจน (Xuguo ., *et al.,* 2003) และเนื่องจากเอนไซม์ esterase เป็นโปรตีนที่มีการเรียงลำดับของกรดอะมิโน chymotrypsin และ trypsin ที่มี homologous สูง และเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา hydrolysis ระหว่าง aliphatic และ aromatic esters จึงมีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการ metabolism ของเอนไซม์ชนิดนี้อย่างกว้างขวาง (White and Hope, 1981)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ไอโซไซม์ จะมีความแตกต่างกันระหว่างพืชแต่ละชนิดและแต่ละสายพันธุ์ จากความแตกต่างนี้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการประเมินความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวที่รวบรวมได้จากแถบ เอเชียใต้, ประเทศจีน และ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้มากถึง 511 แบบ และสามารถแยกกลุ่มได้เป็น 2 กลุ่ม คือ indica หรือ tropical, japonica หรือ temperate (Zhikang L.I. และ Rutger J.N., 1998) และ กลุ่มเล็กๆที่พบทางแถบ himalayas

Esterase Isozyme เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่พบในเซลล์พืชชั้นสูง และนิยมนำมาศึกษารูปแบบเพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางอิเลคโทรโฟรีซิส เช่น การศึกษา esterase isozyme ในเมล็ดที่กำลังงอกของ *Brassica* ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างในรูปแบบของไอโซไซม์ระหว่างสายพันธุ์ต่างๆ (Nakai, 1970) นอกจากนี้ยังพบการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ esterase, malate dehydrogenase, leucine aminopeptidase, glutamate oxaloacetate transaminase, malic enzyme และ alcohol dehydrogenase ของข้าวจำนวน 70 ตัวอย่างแล้วพบว่าสามารถจำแนกตัวอย่างข้าวและแสดงความแตกต่างของพันธุ์ข้าวได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะไอโซไซม์ malic enzyme สามารถจำแนกข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และพันธุ์กข. 6 ออกจากกันได้อย่างชัดเจน (ปณิตา, 2540) ไอโซไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง พบรายงานการนำโปรตีนที่เป็นอาหารสำรองมาตรวจสอบ แต่วิธีการทาง electrophoresis แตกต่างไปจากการใช้ต้นกล้า นั่นคือการสกัดโปรตีนยากกว่า เนื่องจากต้องใช้ โปรตีนที่เป็นอาหารสำรองในเมล็ดข้าวซึ่งพบในปริมาณที่น้อยมาก แต่การสกัด ไอโซไซม์ จากต้นกล้านั้นพบไอโซไซม์ในปริมาณที่มากกว่า

เอนไซม์ malic enzyme พบว่ามีการแสดงออกของแถบสีที่มีจำนวนแถบมากและง่ายต่อการจำแนกรูปแบบไอโซไซม์ในข้าวขึ้นน้ำและข้าวไร่ การศึกษา protein enzyme โดยวิธี electrophoresis เพื่อดูความแตกต่างทางพันธุกรรมของ *Cerastium arvense* (Caryophyllaceae) และสามารถตรวจสอบไอโซไซม์ โดยใช้ malic enzyme และสามารถแสดงรูปแบบที่ชัดเจนได้ (Maria ., *et al.*, 2002) และยังพบว่าเอนไซม์ทั้ง 5 ตัวนี้สามารถแสดงรูปแบบไอโซไซม์ และแสดงแถบสีที่ชัดเจน ในเมล็ดพันธุ์ข้าวสายพันธุ์ต่างๆรวมทั้งพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วย (ป่าน, 2539) และ พบว่าในการใช้เอนไซม์ alcohol dehydrogenase ในพืชตระกูลถั่วสายพันธุ์ *Vigna angaicalata*, V. *ambacensis*, V. *luteola* และ V. *racemosa* พบการปรากฏแถบสีที่จาง แต่ใน V. *gracilis*, V. *frutescens*, V. *membranacea*, V. *reticulata* และ V. *vexillata* พบการปรากฏแถบสีที่ชัดเจน (Remy., *et al.*, 1999) และยังพบว่าสามารถใช้เอนไซม์ malate dehydrogenase จำแนกสายพันธุ์ถั่วลิสง สายพันธุ์พื้นเมืองออกจากกันได้อย่างชัดเจน แต่บางรายงานไม่สามารถพบการปรากฏแถบสีของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ในการตรวจสอบสายพันธุ์ข้าวได้ (ปณิตา, 2540)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเปลี่ยนแปลงรูปแบบไอโซไซม์ เกี่ยวข้องกับพันธุกรรมพืชโดยตรง โดยมีการแสดงแถบสีในหลายๆตำแหน่ง (polymorphic) ของไอโซไซม์แต่ละชนิดและเกี่ยวข้องกับจำนวนโลกัส (locus) รูปแบบของยีนหรืออัลลีล (allele) ต่อโลกัสและโครงสร้างของเอนไซม์ (quarteranry structure of enzyme) (อัญชลี, 2536) โดยเอนไซม์ malic enzyme สามารถแสดงการปรากฏของแถบสีได้มากถึง 6 แถบสี เนื่องจากมีลักษณะของ polymorphic ที่มีจำนวนแถบสีมาก ในขณะที่เอนไซม์ esterase แสดงการปรากฏแถบสี 4 ตำแหน่ง สำหรับเอนไซม์ glutamate oxaloacetate trasaminase, leucine amino peptidase และ malate dehydrogenase มีจำนวนแถบสีเพียง 2 ตำแหน่ง แต่หลังจากทำการย้อมสีเอนไซม์ พบว่า การปรากฏแถบสีของเอนไซม์ esterase และ malic enzyme จะจางกว่าการย้อมด้วยเอนไซม์ glutamate oxaloacetate trasaminase, leucine amino peptidase และ malate dehydrogenase สาเหตุเพราะในการทดลองครั้งนี้ ผู้ทดลองได้ทำการเก็บตัวอย่างสดไว้โดยแช่ในตู้เย็น –20 องศาเซลเซียส เพื่อความสะดวกต่อการนำมาใช้ รวมทั้งทำการบดตัวอย่างสดในไนโตรเจนเหลวและเก็บไว้ที่ตู้เย็น –20 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกันแล้วจึงทยอยนำตัวอย่างออกมาทำการทดลอง ซึ่งการที่สีจางลงอาจเป็นเพราะกิจกรรมของเอนไซม์ลดลง และในการทำ electrophoresis แต่ละครั้งไม่ได้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนก่อน อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณโปรตีนไม่เท่ากัน จึงทำให้ความคมชัดของแถบสีแต่ละเอนไซม์แตกต่างกัน

การเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ซึ่งมีลักษณะที่แตกต่างกันนั้น เป็นผลโดยตรงจากลักษณะพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (Crawford, 1983) ดังนั้นในกรณีที่พืชมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระคล้ายคลึงกันทำให้ไม่สามารถเห็นความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ชัดเจน และพืชพันธุ์เดียวกันจะมีรูปแบบไอโซไซม์จำเพาะของพืชพันธุ์นั้นๆไม่ว่าจะทำกี่ครั้งก็ตามได้มีการใช้รูปแบบนี้ในการจำแนกพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) มีเอนไซม์ที่ได้รับการศึกษาอย่างละเอียดถึง 16 ชนิด ในจำนวนนี้พบว่ามี 25 ยีนที่ปรากฏในระยะแตกกอและออกดอก และยังมีการศึกษาในถั่วดำ (*Phaseolus vulgaris* L.) ที่มีความใกล้ชิดกันทางสายพันธุ์มาก ลักษณะของเมล็ดจะมีความคล้ายคลึงกันมากจึงทำให้ยากแก่การพิจารณา เมื่อนำส่วนเมล็ด, ลำต้นอ่อน, รากหรือใบมาสกัดเอนไซม์แล้วศึกษาความแตกต่างรูปแบบไอโซไซม์ ซึ่งช่วยให้ง่ายแก่การพิจารณาการจำแนกสายพันธุ์ (Driedger *et al.*, 1994) นอกจากการศึกษาไอโซไซม์เพื่อจำแนกพืชในระดับพันธุ์แล้ว ยังมีการศึกษาเพื่อแสดงความแตกต่างระหว่างพืชในระดับสกุล ชนิด หรือสายต้น (clone) จากการศึกษาของ Oka (1988) สามารถจำแนกข้าว O. rufigon ออกเป็นประเภท india, indochina, china, indonesia และ O. sativar ออกเป็นประเภท indica, sativa โดยอาศัยรูปแบบไอโซไซม์

พบรายงานการศึกษาเรื่องการใช้ ไอโซไซม์ มาตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์ข้าวอีกมากมาย ดังรายงานที่สามารถจำแนกพันธุ์ข้าวจาก 283 สายพันธุ์ซึ่งเก็บรวบรวมจาก Burkina fuso (Sahelian area of Africa) โดยการใช้ isozyme polymorphism และสามารถแสดง loci ได้ 15 loci และนำมาจำแนกพันธุ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้าวได้ (Glaszmann ., 1987a) และยังพบความแตกต่างของข้าวสายพันธุ์พื้นเมืองในประเทศอิหร่าน ซึ่งมีคุณภาพในการหุงต้มที่ดี (ปริมาณอะมิโลสปานกลาง และความเหนียวปานกลาง) สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ Sadri, Champa และ Gerdeh ตามลักษณะการแสดงออกทางสัณฐานวิทยา โดยทำการวิเคราะห์ isozyme ด้วยเทคนิค electrophoresis (Glaszmann ., 1987b) นอกจากนี้ในเมล็ดพันธุ์ข้าวที่มีการพักตัวอยู่ก็สามารถนำเทคนิคการตรวจสอบ ไอโซไซม์นี้มาตรวจสอบ การแสดงออกทางลักษณะทางพันธุกรรมได้ รายงานที่ทำในเมล็ดพันธุ์ข้าวสายพันธุ์ Japonica โดยทดสอบ genetic loci ของเมล็ดพันธุ์ข้าวที่พักตัวโดยการตรวจสอบ ไอโซไซม์ (Wan ., *et al*., 1997)

รูปแบบไอโซไซม์ของข้าวระยะ one-leaf stage (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) ด้วยเอนไซม์ Glutathion S. transferase และระยะ early watergrass หลังจาก treat ด้วยสาร pretilachlor และ fenclovim เพื่อทดสอบการเปลี่ยนแปลงของ enzyme activity และศึกษาความแตกต่างที่เกิดขึ้นระหว่างรูปแบบไอโซไซม์ ของเอนไซม์ GST ในข้าวทั้งสองระยะ และในการใช้สาร pretilachlor ในระยะ early watergrass สามารถพบการเปลี่ยนแปลงของ GST activity เมื่อทดสอบโดยวิธีการตรวจสอบไอโซไซม์ได้ (Kenji, *et al*., 2001) นอกจากนี้ ได้มีการตรวจสอบรูปแบบไอโซไซม์ตัวอื่นๆ เช่น lipoxygenase (LOX-3) ในเมล็ดพันธุ์ข้าวที่กำลังงอก เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ enzyme activity ขณะที่เมล็ดมีการพัฒนารวมทั้งขณะเมล็ดมีการเสื่อมสภาพ (Yasuhiro suzuki and Ushio matsukura, 1997) Isozyme นั้นเป็น marker ตัวสำคัญทางชีวเคมีสำหรับการแสดง genetic mapping ในข้าว และสามารถนำมาตรวจสอบ enzyme activity ต่างๆได้โดยวิธี Poly Acrylamid Gel Electrophoresis เช่น เอนไซม์ fructose-1,6-diphosphatase (FDP), xanthine dehydrogenase (XDH) และ diaphorase (DIA) (B.G. delos Reyes *et al*., 2001) เป็นต้น จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าได้มีการนำ ไอโซไซม์ มาใช้ประโยชน์อย่างมากมายเพื่อตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์พืช ทั้งข้าวและพืชเศรษฐกิจอื่นๆ และการนำประโยชน์จากรายงานต่างๆนี้มาประยุกต์ใช้ในงานทดลองนี้เพื่อสามารถหา ไอโซไซม์ ที่มีความจำเพาะและสามารถแยกความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ออกจากข้าวทั้งสองสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจนจึงเป็นประโยชน์ที่จะนำไปพัฒนาเทคนิคเพื่อใช้การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ได้ต่อไปในอนาคต

ปัจจุบันเทคนิค electrophoresis ได้พัฒนาไปมาก นอกจากการนำไอโซไซม์มาตรวจสอบแล้ว ในระดับ DNA และ RNA ของพืชชนิดต่างๆ ก็สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกสายพันธุ์ได้ด้วย ดังรายงานการนำข้าวซึ่งเป็นพันธุ์วัชพืชและสามารถจำแนกได้ถึง 26 สายพันธุ์โดยการใช้เทคนิค amplified fragment length polymorphism หรือ AFLP (Maria, *et al*., 2001) ซึ่งเป็นเทคนิคทาง electrophoresis เช่นกัน แต่เนื่องจากการสกัด DNA ใช้เวลานานและวิธีการยาก สารเคมีที่ใช้ราคาแพง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การใช้ ไอโซไซม์ จึงเป็นวิธีที่ประหยัดและสะดวกกว่า ในการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ทางสายพันธุ์ยังให้ความแม่นยำได้เช่นกัน

ประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัยนี้คือ สามารถนำหลักการนี้ไปพัฒนาเพื่อการยืนยันความแม่นยำของงานวิจัยเรื่องอื่นต่อไป โดยการวิเคราะห์ตัวอย่างแบบ minimum replication คือการรวมตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยกันหมด แล้วลดสัดส่วนตัวอย่างที่เป็นสายพันธุ์ปลอมปนลงทีละน้อย เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่มีสายพันธุ์บริสุทธิ์เพียงตัวอย่างเดียว แล้วนำไปวิเคราะห์ความแม่นยำ โดยอาศัยหลักการคือ แถบไอโซไซม์แต่ละแถบจะมีความเข้มและความหนาของแถบในแต่ละซ้ำที่อยู่ในสายพันธุ์เดียวกันเท่ากันหมด ในเอนไซม์ esterase เมื่อพิจารณาข้าวพันธุ์ชัยนาท 1 ไม่มีการปรากฏแถบ ณ ตำแหน่งที่ 2 แต่ในพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ปรากฏแถบ เมื่อวิเคราะห์ตัวอย่างที่รวมกันทั้ง 2 สายพันธุ์ก็จะพบว่าที่ตำแหน่งที่ 2 นี้จะปรากฏแถบลดลงตามสัดส่วนที่ลดลงในการรวมตัวอย่างนั่นเอง หากเป็นไปตามสมมุติฐานจะสามารถนำไปพัฒนางานวิจัยอื่นต่อไปได้ นอกจากนี้งานวิจัยอื่นที่สามารถยืนยันความแม่นยำงานวิจัยนี้คือ การนำตัวอย่างทั้ง 2 พันธุ์ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอื่น เช่น วัดความเข้มสีของเมล็ดหลังการหุงต้มแล้วบดก่อนนำไปตรวจสอบสีด้วยเครื่อง Minolta Chromameter CR – 300 ที่สามารถจำแนกความแตกต่างทางสายพันธุ์พืชด้วยการเปรียบเทียบความเข้มและความสว่างของพื้นผิวแป้งมันฝรั่งได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved