

การตรวจเอกสาร

การศึกษาสารประกอบทางเคมีของพืช เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เอนไซม์ และสารประกอบอื่นๆ มีวิธีการวิเคราะห์แตกต่างกันขึ้นอยู่กับ ชนิด และ วัตถุประสงค์ของการศึกษา เช่น การเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนจะใช้วิธีการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) การตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยา (serology) หรือการตรวจสอบเอนไซม์ เพื่อแยกความแตกต่างของลักษณะทางโมเลกุลโดยใช้วิธีทางชีวเคมี การทำโครมาโตกราฟี (chromatography) การทำเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) และวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส (electrophoresis)

อิเล็กโตรโฟเรซิส

อิเล็กโตรโฟเรซิสเป็นวิธีทางชีวเคมีที่แยกสารชีวโมเลกุลออกจากกันในสนามไฟฟ้าโดยอาศัยความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุโดยรวมถึงขนาดและรูปร่างของสารตัวอย่างที่ต้องการแยกด้วย

อิเล็กโตรโฟเรซิส แบ่งออกเป็น 2 ชนิด

1. Free electrophoresis อนุภาคที่มีประจุเคลื่อนที่ในตัวกลางที่เป็นสารละลายโดยไม่มีตัวกลาง ค้ำจุน

2. Zone electrophoresis อนุภาคที่มีประจุเคลื่อนที่ในตัวกลางที่เป็นสารละลาย ซึ่งถูกดูดซับอยู่บนตัวกลางค้ำจุนที่เป็นของแข็ง ในปัจจุบัน Zone electrophoresis มีการพัฒนาอย่างกว้างขวาง มีการเติมสารเพื่อเพิ่มความสามารถในการแยกสาร เช่น การเติม ampholyte ลงในตัวกลางค้ำจุนที่เป็น โพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) เพื่อแยกสารชีวโมเลกุลที่มี Isoelectric point (pI) แตกต่างกัน เป็นต้น

Zone electrophoresis จะมีการเรียกชื่อหลายแบบด้วยกัน โดยอาจแบ่งตามทิศทางของ Zone electrophoresis สารตัวอย่างที่ใช้แยก ลักษณะของตัวกลางค้ำจุนและสารที่เติมลงไปในตัวกลางค้ำจุน ตัวอย่างเช่น การเรียกชื่อตามทิศทางของการทำ Zone electrophoresis เช่น อิเล็กโตรโฟเรซิสแบบตั้ง (Vertical electrophoresis) อิเล็กโตรโฟเรซิสแบบนอน (Horizontal electrophoresis) การเรียกชื่อตามสารตัวอย่างที่แยก เช่น ซีรัมโปรตีนอิเล็กโตรโฟเรซิส (serum protein

electrophoresis) โลโบโปรตีนอิเล็กโตรโฟรีซิส (Lipoprotein electrophoresis) เป็นต้น หรือการเรียกชื่อตามตัวกลางค้ำจุนที่ใช้ เช่น สตาร์ชเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Starch gel electrophoresis) อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) เป็นต้น

อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า เป็นสัดส่วนโดยตรงกับกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ ระยะเวลาในการทำ อิเล็กโตรโฟรีซิส รวมทั้งประจุสุทธิ (net charge) ของอนุภาค ขนาดและรูปร่างของอนุภาค ความแรงของสนามไฟฟ้า (electric field strength) คุณสมบัติของตัวกลางค้ำจุน และความหนืดของสารละลายตัวกลาง เมื่อให้กระแสไฟฟ้ามากขึ้นโมเลกุลของสารจะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น แต่ผลเสียคือถ้าใช้กำลังไฟฟ้าสูงเกินไปจะทำให้เกิดความร้อนสูงขึ้น และเกิดการระเหยของสารละลายทำให้เกิดการแพร่ของโมเลกุล และผลของการแยกสารไม่ดี ความร้อนที่เกิดขึ้นสามารถสังเกตได้จากไอน้ำที่เกาะข้าง ๆ กล้องใส่บัฟเฟอร์ ในทางตรงข้ามถ้าใช้กำลังไฟฟ้าที่ต่ำเกินไป แม้จะช่วยลดปัญหาเรื่องความร้อน แต่ผลการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสจะไม่ดี เนื่องจากใช้เวลานานขึ้น และเป็นการเพิ่มอัตราการแพร่ของสารเช่นกัน ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลที่ดีควรเลือกใช้กระแสหรือความต่างศักย์ไฟฟ้าตามคุณสมบัติของตัวกลางค้ำจุนและความเข้มข้นของสารละลายตามความเหมาะสม

องค์ประกอบหลักในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

ในการทำ Zone electrophoresis จะมีองค์ประกอบสำคัญ 4 ประการ คือ สารตัวอย่าง บัฟเฟอร์ ตัวกลางค้ำจุน และสนามไฟฟ้า

1. สารตัวอย่าง

1.1 ชนิดและปริมาณของประจุ ชนิดของประจุของโมเลกุลจะเป็นตัวกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า เช่นโมเลกุลที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบในทางตรงข้าม โมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกของสนามไฟฟ้า ชนิดและปริมาณของประจุของโมเลกุลมีความสัมพันธ์โดยตรงกับสภาวะความเป็นกรด เป็นด่างของบัฟเฟอร์ของ สารตัวอย่างนั้น ๆ

1.2 ขนาดของโมเลกุล โมเลกุลขนาดใหญ่มีแรงเสียดทาน และ electro static force ซึ่งเกิดกับตัวกลางแวดล้อม (surrounding medium) สูงกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นการเคลื่อนที่ของโมเลกุลใหญ่จึงช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก

1.3 รูปร่างของโมเลกุล โมเลกุลที่มีรูปร่างต่างกันจะเคลื่อนที่ต่างกัน เช่นโมเลกุลที่มีรูปร่าง

กลมจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่ารูปร่าง

2. บัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์เป็นสารละลายที่ทำหน้าที่รักษาสภาวะเป็นกรด-ด่างของตัวกลางค้ำจุน (supporting medium) เป็นตัวทำละลายของสารตัวอย่าง และเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า คุณสมบัติของบัฟเฟอร์ประกอบด้วย

2.1 ความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ เนื่องจากสารชีวโมเลกุลทั่วไปมักมีหมู่ที่แสดงประจุบวกและลบอยู่ในโมเลกุล ซึ่งจะมีค่าการแตกตัว (dissociation constant, PK) ต่างกัน การแตกตัวของหมู่เหล่านี้จะขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลายนั้น ๆ เช่น ประจุสุทธิของไกลซีน จะเปลี่ยนไปเมื่ออยู่ในบัฟเฟอร์ที่มี pH ต่างกัน ดังนั้น pH ของบัฟเฟอร์จึงมีบทบาทสำคัญในการกำหนดชนิดและปริมาณของประจุของสาร

2.2 Ionic strength ของบัฟเฟอร์ การเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุในสนามไฟฟ้าแปรผกผันกับรากที่สองของ ionic strength นั่นคือสารชนิดเดียวกันจะเคลื่อนที่ในบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำได้ดีกว่าในบัฟเฟอร์ที่มีค่า ionic strength สูง ในขณะที่เดียวกันการทำไอเลคโตรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูงจะให้แถบที่คมชัด แต่จะมีความร้อนเกิดขึ้นสูงเช่นกัน ionic strength ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 0.05-0.10 โมล/ลิตร

ชนิดของบัฟเฟอร์

1. สะพานไฟฟ้า (electrode buffer) จะทำหน้าที่รักษาสภาวะความเป็นกรด-ด่างของตัวกลางค้ำจุน และเป็นตัวกลางในการเคลื่อนที่ของโมเลกุล

2 สารสกัดเอ็นไซม์ (extraction buffer) จะทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายของสารตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างต่างชนิดกัน หรือต่างวัตถุประสงค์กัน extraction buffer ก็จะมีสารเคมีแตกต่างกัน

3. ตัวกลางค้ำจุน

ในการแยกสารชีวโมเลกุลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ถ้าจะให้ได้ประสิทธิภาพสูงจะต้องเลือกชนิดของอิเล็กโตรโฟรีซิสที่เหมาะสม โดยหลักในการเลือกจะต้องมีความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของสารที่ต้องการแยกพร้อมทั้งเลือกตัวกลางค้ำจุนที่เหมาะสมกับชนิดของสาร โดยคุณสมบัติของตัวกลางค้ำจุนจะต้องไม่ไวต่อปฏิกิริยา ยอมให้สารตัวอย่าง

ผ่านได้โดยสะดวกและไม่เป็นตัวการที่ก่อให้เกิดความจำกัดของการเคลื่อนที่ของสาร สามารถแยกสารตัวอย่างได้ชัดเจน และประการสุดท้ายจะต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการแยก ตัวกลางต่างๆ ที่นิยมใช้ในงานทางอิเล็กโตรโฟเรซิส เช่น กระดาษกรอง เซลลูโลสอะซิเตต แป้ง อะกาโรส โพลีอะคริลาไมด์ ซึ่งตัวกลางแต่ละชนิดจะมีความเหมาะสมกับงานต่างชนิดกัน

กระดาษ เหมาะสำหรับงานในการแยก กรดอะมิโน เปปไทด์ นิวคลีโอไทด์ ทั้งนี้เนื่องจากมีราคาถูก ข้อเสียคือไม่สามารถทนต่อกรดหรือด่างสูงๆ ได้

เซลลูโลสอะซิเตต เหมาะกับการแยกสารในซีรัม เช่น โกลโคโปรตีน ไลโปโปรตีน ฮีโมโกลบิน และแอนติบอดีต่างๆ เนื่องจากเซลลูโลสอะซิเตตดูดซึมสารตัวอย่างได้ปริมาณน้อย การแยกแน่นอนและชัดเจน ทนต่อกระแสไฟฟ้าสูงๆ นิยมใช้ในงานทางการแพทย์

แป้ง เหมาะสำหรับการแยกสารชีวโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ เช่น โปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก เป็นต้น ข้อดี เนื่องจากแป้งเป็นโพลีแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะเป็นสายแตกแขนง สามารถเตรียมให้มีความเข้มข้นต่างๆ กันได้

อะกาโรส นิยมใช้กับสารจำพวก แอนติเจน แอนติบอดี ดีเอ็นเอ และ อาร์เอ็นเอ เป็นต้น

โพลีอะคริลาไมด์ ใช้ในการแยกสารชีวโมเลกุลเช่นเดียวกับแป้ง และอะกาโรส นอกจากนี้ยังนิยมใช้น้ำหนักโมเลกุลของสารอีกด้วย โพลีอะคริลาไมด์เป็นตัวกลางที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย ให้ผลการแยกที่ชัดเจนและสามารถปรับรูพรุนของเจลได้ มีความยืดหยุ่นดี สามารถทำให้แห้งเป็นแผ่นเพื่อทำการวัดรังสีในตัว (autoradiography) และวัดการเรืองแสง (fluorography) ได้

4. สนามไฟฟ้า

ในการทำอิเล็กโตรโฟเรซิส จำเป็นต้องใช้ไฟกระแสตรง ในระหว่างการทำงานกระแสไฟฟ้าจะไหลผ่านตัวกลางค้ำจุณผลที่ตามมาคือทำให้เกิดความร้อนโดยมีความสัมพันธ์กับเวลา กระแสไฟฟ้า และแรงเคลื่อนไฟฟ้า ความร้อนสูงที่เกิดขึ้นระหว่างการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสจะทำให้เกิดการแพร่ของโมเลกุลของสารตัวอย่าง ทำให้ผลการแยกไม่ดีเท่าที่ควร สารที่เสถียรภาพตามธรรมชาติได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน เช่น เอนไซม์ ซึ่งความร้อนที่เกิดขึ้นอาจทำให้เอนไซม์นั้นเสถียรภาพและหมดประสิทธิภาพในการทำงานได้

ขั้นตอนสุดท้ายหลังจากการแยกสารคือการทำให้ความแตกต่างของสารที่แยกได้ปรากฏขึ้น

โดยการย้อมด้วยสีเฉพาะสำหรับตัวอย่างที่นำมาศึกษา เช่นในการศึกษาโปรตีน สีที่ใช้ย้อมโปรตีน เช่น อะมิโนแบล็คบี (amino black B) หรือโคโอมัสซิบริลแลนท์บลูอาร์ (coomassie brilliant blue R) ถ้าเป็นการศึกษาดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอจะใช้เอทธิเดียมโบรไมด์ (ethyidium bromide) ส่วนเอนไซม์ต่างๆ จะใช้สีย้อมที่เป็นสีเฉพาะของแต่ละเอนไซม์ (specific activity stain)

ในปัจจุบันการศึกษาไอโซไซม์ของพืชโดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งในด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช การศึกษาทางด้านสรีรวิทยา โรคพืช พันธุศาสตร์ และการจัดหมวดหมู่พืช (systematics) (Peirce และ Brewbaker, 1973) เนื่องจากไอโซไซม์เป็นโปรตีนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่จำเพาะเจาะจง ดังนั้นเมื่อทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่เหมาะสม (enzyme-specific stain) จึงสามารถศึกษาเอนไซม์ได้หลายชนิดและหลายแบบ (เพิ่มพงษ์, 2530) และเนื่องจากยีนที่ควบคุมการแสดงออกของแถบจะแสดงปฏิกิริยาแบบข่มร่วม (co-dominant) และน้อยมากที่มีการแสดงแบบข่มข้ามคู่ (epistasis) ดังนั้นเมื่อมีการผสมระหว่างแถบที่แตกต่างกัน ลูกผสมจะมีแถบของพ่อแม่ปรากฏอยู่พร้อมกันและมีแถบที่เป็นแถบลูกผสม (hybrid band) เกิดขึ้น (Peirce และ Brewbaker, 1973) ถ้าเอนไซม์มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 2 เส้น เมื่อนำพ่อแม่มาสร้างลูกผสมและนำสายพันธุ์ลูกผสมมาศึกษาลักษณะของไอโซไซม์จะพบว่าแถบที่ปรากฏมี 3 แถบ โดยจะมีแถบที่เหมือนพ่อแม่และแม่ อย่างละ 1 แถบและจะปรากฏแถบที่เรียกว่า แถบลูกผสมอยู่ระหว่างแถบของพ่อแม่และแม่ แต่ถ้ามีโครงสร้างที่ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์มากกว่า 2 เส้นขึ้นไป แถบลูกผสมก็จะมีมากกว่า 1 แถบขึ้นไป (Pasteur *et al.*, 1988) ดังนั้นจึงสามารถเลือกแถบลูกผสมที่เกิดขึ้นเป็นเครื่องหมาย (marker) ในการแยกระหว่าง พันธุ์แท้ (homozygous) และพันธุ์ทาง (heterozygous) ได้

ไอโซไซม์ของพืช (plant isozyme)

ไอโซไซม์ คือ เอนไซม์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลต่างกัน แต่ทำหน้าที่เหมือนกันมีความจำเพาะเจาะจง และใช้สับสเตรทร่วมกัน (Morkert และ Moller, อ้างถึงใน Marino, 1992) เอนไซม์เหล่านี้อาจพบในเซลล์เดียวกันเนื้อเยื่อเดียวกัน หรือเนื้อเยื่อที่ต่างกัน (ปิยวรรณ, 2530) แต่ละสูตรโครงสร้างที่เรียกว่าไอโซไซม์สามารถแยกด้วยวิธีทางอิเล็กโตรโฟเรซิส ซึ่งวิธีการนี้จะยึดหลักของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีประจุไฟฟ้าในสนามไฟฟ้าซึ่งเกิดจากการให้ความต่างศักย์โดยให้โมเลกุลของเอนไซม์ที่ต้องการแยกเคลื่อนที่ผ่านตัวกลาง (medium) เช่น เจล กระดาษ เซลลูโลส ฯลฯ โมเลกุล

ที่มีขนาด รูปร่าง และประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางแตกต่างกัน ผลของการแยกความแตกต่างจะเกิดเป็นแถบ (band) บนตัวกลางและทำให้แถบนั้นปรากฏขึ้นโดยการย้อมด้วยสีเฉพาะ (specific dye) แถบที่ปรากฏขึ้นบนเจลเรียกว่าไซโมแกรม (zymogram)

ไอโซไซม์สามารถสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของพืชขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ เช่น ในถั่วที่อยู่ในสกุล *Phaseolus sp.* ถ้าต้องการศึกษาไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) และฟอสฟาเทส (phosphatase) สามารถสกัดเอนไซม์จากส่วนของใบอ่อน ลำต้นอ่อน และราก แต่ถ้าศึกษาไอโซไซม์เอสเตอเรส (esterase) ขึ้นส่วนที่เหมาะสม คือ ส่วนของใบและลำต้นอ่อน (Bassiri และ Adams, 1978) สำหรับแอปเปิ้ลพบว่าถ้าต้องการศึกษาไอโซไซม์กลูโคสฟอสเฟตไอโซเมอเรส (glucosephosphate isomerase) การสกัดเอนไซม์จากส่วนของคลอโรพลาสต์จะให้ผลดีที่สุดแต่ก็สามารถใช้ส่วนของใบอ่อนและละอองเกสรมาศึกษาได้เช่นกัน (Weeden และ Lamb, 1987)

เอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) ที่มีอยู่ในพืชจะพบทั้งในส่วนของไซโตพลาสซึม ผนังเซลล์ หน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับกระบวนการออกซิเดทิฟ (oxidative) (Birecka *et al.*, 1975) และพบว่าเอนไซม์เพอร์ออกซิเดสในพืชจะมีเป็นจำนวนมาก เช่น ในมะเขือเทศ และยาสูบ แต่ละชนิดจะมีไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดสมากกว่า 12 รูปแบบ (Lagrimini และ Rothstein, 1987) ซึ่งทำให้เป็นการยากที่จะชี้เฉพาะในหน้าที่ของเพอร์ออกซิเดสแต่ละตัว บางตัวมีหน้าที่ทางสรีรวิทยาที่ซับซ้อน เช่น Goldberg และคณะ (อ้างถึงใน Lagrimini *et al.*, 1992) พบว่ามีหน้าที่เกี่ยวกับการยึดของเซลล์ การครอสลิงคิง (cross-linking) ของโพลีแซคคาไรด์ในผนังเซลล์ (Fry, 1986) การสร้างลิกนิน (Grisebach, อ้างถึงใน Lagrimini *et al.*, 1992) การซ่อมแซมบาดแผล (Espelie *et al.*, 1986) และการต่อต้านการเข้าทำลายของเชื้อโรค (Hammerschmidt *et al.*, 1982; Vance *et al.*, 1976)

เอนไซม์กลูตาเมตออกซาลอะซิเตตทรานสอะมิเนส (glutamate oxaloacetate transaminase) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในส่วนของพลาสติด ไมโทคอนเดรีย ไมโครบอดี และส่วนของไซโตพลาสซึมหน้าที่ของเอนไซม์จะเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างและสลาย (metabolism) ของกรดอะมิโน (Gottlieb, 1982 ; Kephart, 1990)

เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (phosphoglucumutase) พบในไซโตพลาสซึมในส่วนของราก ลำต้น และเนื้อเยื่อใบ มีหน้าที่สำคัญของกระบวนการหายใจในไซโตพลาสซึม (Tanksley, 1979)

เอนไซม์กลูโคสฟอสเฟตไอโซเมอเรส (glucosephosphate isomerase) เป็นเอนไซม์ที่พบในส่วนของไซโตพลาสซึมและพลาสติด หน้าที่ของเอนไซม์ชนิดนี้ในคลอโรพลาสต์จะอยู่ในกระบวนการ

เปลี่ยน 3-ฟอสโฟกลีเซอเรท (3-phosphoglycerate) ไปเป็นแป้งในช่วงที่มีแสง ถ้าอยู่ในไซโตซอล (cytosol) จะทำหน้าที่ในขบวนการเบตาโอซิซึม และสร้างน้ำตาล (Gottlieb, 1982)

นอกจากการศึกษาไอโซไซม์ที่กล่าวมาแล้วยังมีเอนไซม์ คาตาเลส (catalase) เอสเทอเรส (esterase) ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) ฟอสฟาเทส (phosphatase) โพลีฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) (Peirce และ Brewbaker, 1973) ไดอะโฟเรส (diaphorase) กลูตาไธโอนรีดักเตส (glutathione reductase) มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malat dehydrogynase) และเอนไซม์อื่น ๆ อีก (Durham *et al.*, 1987)

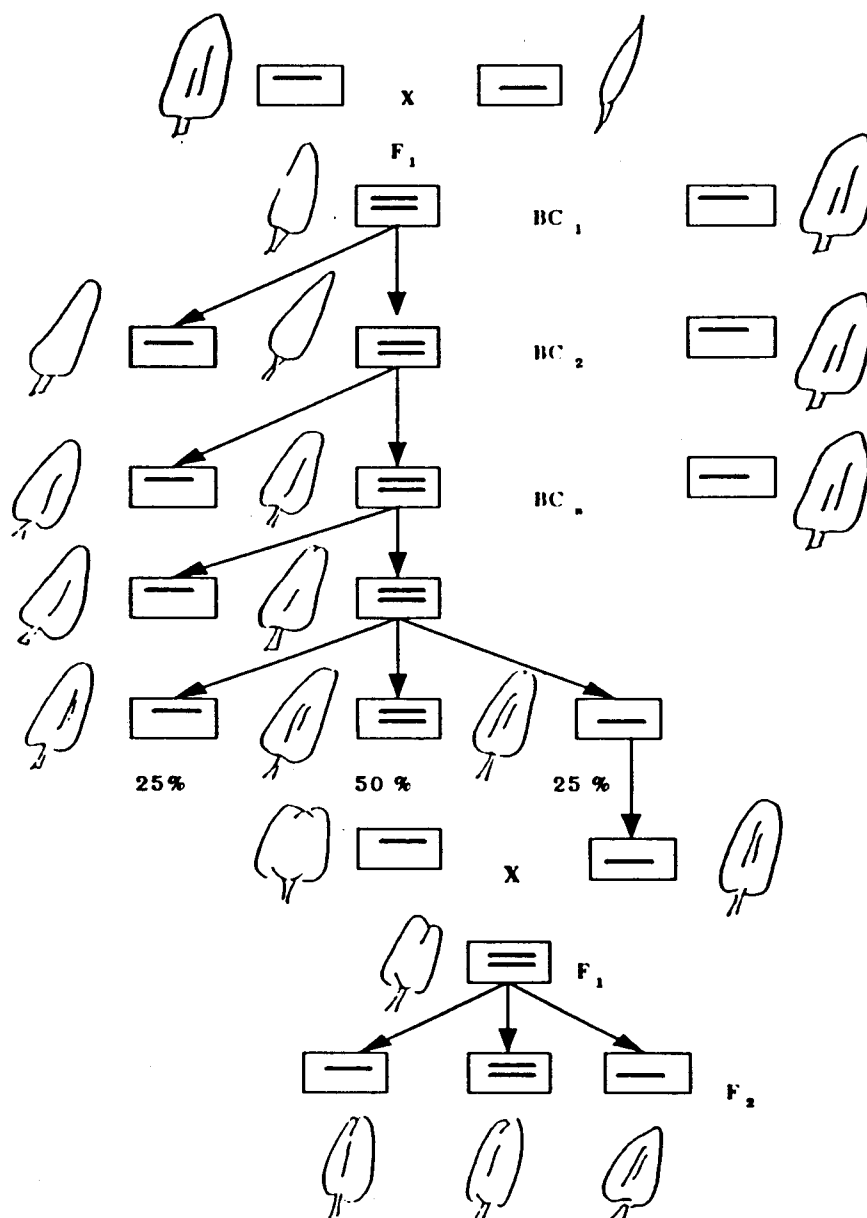
ไอโซไซม์กับงานปรับปรุงพันธุ์พืช (Isozyme in plant breeding)

ปัจจุบันการใช้ไอโซไซม์เป็นมาร์คเกอร์ในพืชได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางในงานปรับปรุงพันธุ์ทั้งในไม้ผล เช่น องุ่น (Weeden *et al.*, 1988) ท้อ (Durham *et al.*, 1987) แอปเปิ้ล (Weeden และ Lamb, 1987) รัสเบอร์รี่ (Cousineau และ Donnelly, 1992) สับปะรด (Dewald *et al.*, 1988) ในพืชผักเช่น มะเขือเทศ (Tanksley และ Rick, 1980b; Tanksley และ Rick, 1980b; Vallejas และ Tanksley, 1983) พริก (McLeod *et al.*, 1982 ; Popova และ Nikolov, 1973; Makova *et al.*, 1976 ; Popova และ Nikolov, 1977 ; McLeod, 1983 ; Andrzejewski, 1992 ; Belletti *et al.*, 1992 ; และ Tanksley, 1984) มันฝรั่ง (Martinez-zapater และ Oliver, 1984; Quiros และ McHale, 1985) ธัญพืชต่าง ๆ เช่น ข้าวบาร์เลย์ (Kahler และ Allard, 1970) ข้าว (Lin และ Ikehashi, 1993) ข้าวโพด (Schwartz และ Endo, 1966; Goodman *et al.*, 1980; Brettell *et al.*, 1986) สำหรับในไม้ผลซึ่งส่วนใหญ่เป็นพืชที่มีอายุยืนถ้าใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีธรรมชาติในการที่จะทราบว่าเป็นพันธุ์นั้น ๆ เกิดการผสมข้ามพันธุ์ (hybridization) หรือเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นจะต้องรอนจนกว่าพืชนั้นจะแสดงผลหรือลักษณะให้เห็นอย่างเด่นชัดจะต้องใช้เวลานาน Chaporro และคณะ (1987) ประสบความสำเร็จในการนำวิธีการวิเคราะห์ไอโซไซม์มาใช้จำแนกกลุ่มสมระหว่าง ท้อ และอัลมอนต์ในระยะที่เป็นกล้าโดยใช้ไอโซไซม์ ฟอสโฟกลูโคมิวเตส และ 6-ฟอสโฟกลูโคเนต การเปรียบเทียบลักษณะทางไอโซไซม์ในต้นตอ (rootstock) และต้นพันธุ์ดี (scion) ของแอปเปิ้ล (Vinterhalter และ dames, 1983; Weeden และ Lamb, 1985; Menendez *et al.*, 1986) และการศึกษาคุณสมบัติของท้อ 8 คู่ (Durham, 1987) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาระบบการสืบพันธุ์ (mating system) ในข้าวโพด (Brown และ Allard, 1970) การผสมข้ามตาม

ธรรมชาติของประชากร การกลายพันธุ์ การเกิดการเสื่อมเนื่องจากการลุ่ม (genetic drift) สิ่งเหล่านี้สามารถนำเอาประโยชน์ของไอโซไซม์มาใช้ได้ (Peirce และ Brewbaker, 1973) ในด้านการศึกษา รายละเอียดของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของไอโซไซม์พบว่าไอโซไซม์กลูโคสฟอสเฟตไอโซเมอเรส (Pgi) ในรีสเบอร์รี่ จะมี 2 โลไซคือ Pgi-1 และ Pgi-2 ที่ล็อกส Pgi-2 พบว่ามี 3 อัลลีล และเป็นไดเมอร์ริก (dimeric enzyme) แถบที่ปรากฏในพันธุ์แท้จะมีแถบเร็ว (fast band) ใช้สัญลักษณ์ FF หรือแถบช้า (slow band) แทนด้วย SS ส่วนไอโซไซม์ ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (Pgm) เป็นโมโนเมอร์ริก (monomeric enzyme) (Cousineau และ Donnelly, 1992) ไอโซไซม์กลูตาเมต ออกซาลอะซีเตต ทรานสอะมิเนส (GOT) ในมันฝรั่ง พบว่าแถบของไอโซไซม์ GOT-1 และ GOT-2 ควบคุมด้วยยีนหนึ่งตำแหน่งมี 2 อัลลีล ที่ GOT-2 ลักษณะของเอนไซม์จะเป็นไดเมอร์ริก (Jongedijk *et al.*, 1990)

การใช้ประโยชน์ของไอโซไซม์ในการศึกษาลักษณะทางไซโตจีนติก (cytogenetic) ของพืชที่เป็นโพลีพลอยด์ (polyploid) โดยศึกษาเฮกซาพลอยด์ (hexaploid) ในข้าวสาลี (Gottlieb, 1982) เตตราพลอยด์ (tetraploid) และดิพลอยด์ (dipliod) ของมันฝรั่ง (Mortinez-zapater และ Oliver, 1984; Quiros และ McHale, 1985)

ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยทั่วไปประชากรที่จะนำมาปรับปรุงพันธุ์จะต้องมีความแปรปรวนทางด้านพันธุกรรมในลักษณะที่ต้องการปรับปรุงจึงจะทำให้การปรับปรุงพันธุ์มีความก้าวหน้า เช่นเดียวกับไอโซไซม์ในการที่จะนำประโยชน์มาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชหรือการนำมาจำแนกพันธุ์ประชากรนั้น ๆ จะต้องมีความแปรปรวนในลักษณะของไอโซไซม์จึงจะสามารถนำประโยชน์ของไอโซไซม์มาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Bailey, 1983) เช่นในพืชสกุล *Capsicum* พบว่ามีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันมากมาย แต่ลักษณะของไอโซไซม์ที่เปลี่ยนแปลงไม่สัมพันธ์กับลักษณะภายนอกเสมอไป และพบว่าความแตกต่างของไอโซไซม์ในพริกมีน้อยมาก (Marino *et al.*, 1992) ดังนั้นการนำประโยชน์จากไอโซไซม์มาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พริกจึงต้องมีการสร้างความแปรปรวนทางไอโซไซม์ขึ้น Andrzejewski (1992) ได้สร้างความแปรปรวนของไอโซไซม์ในพริกหวาน (*Capsicum annuum*) ซึ่งเป็นพริกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยการผสมข้ามระหว่าง *C. annuum* กับ *C. baccatum* และ *C. chacoense* กับ *C. annuum* ซึ่งมีลักษณะทางไอโซไซม์แตกต่างกันและมีการผสมกลับเพื่อให้ได้พริกหวานที่มีลักษณะความแปรปรวนทางไอโซไซม์ ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 การสร้างความแปรปรวนของไอโซไซม์ในพริกหวาน (*Capsicum annuum*) โดยการผสม
กลับ (backcross)

ที่มา : Andrzejewski (1992)

การศึกษาลักษณะที่เชื่อมโยง (linkage) ระหว่างไอโซไซม์กับลักษณะต่าง ๆ เช่นในการศึกษาความสัมพันธ์ของไอโซไซม์แอสดีฟอสฟาเตส (Aps-1) กับยืนต้นทานไส้เดือนฝอย (Rick และ Fobes, อ้างถึงใน Tanksley และ Rick, 1980a) ความสัมพันธ์ของไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดส (Prx-2) กับยืนที่ควบคุมลักษณะความเป็นหมัน (ms-10) ในมะเขือเทศ (Rick, 1983) และความสัมพันธ์

ของไอโซไซม์กลูตาไธโอน-เอส-ทรานเฟอเรส (glutathion-s-transferase) กับการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดวัชพืชในข้าวโพด (Sari-Gorla *et al.*, 1993) รวมทั้งการตรวจสอบความเป็นหมันของเกสรตัวผู้ (male-sterile) ในพริก (Markova *et al.*, 1976) ซึ่งสิ่งเหล่านี้จะเป็นประโยชน์มากในการคัดเลือกพันธุ์

การทดสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ทางการค้าโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (genetic purity of commercial seed lots)

ความตรงต่อสายพันธุ์เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญของเมล็ดพันธุ์ เพราะถ้าเมล็ดพันธุ์ที่นำออกจำหน่ายไม่ตรงตามพันธุ์หรือมีการปนเปื้อนมาในเมล็ดพันธุ์นั้นๆ จะมีผลทำให้ ผลผลิต ความสม่ำเสมอของสายพันธุ์ รวมทั้งคุณภาพของผลผลิตไม่ได้มาตรฐาน การปนเปื้อนของเมล็ดพันธุ์อาจเกิดเนื่องมาจากขบวนการผลิตเมล็ดพันธุ์ตามขั้นตอนต่างๆ การปนเปื้อนจากละอองเกสรที่ไม่ใช่สายพันธุ์พ่อแม่ที่ต้องการ การผสมตัวเองของสายพันธุ์พ่อแม่ในการผลิตพันธุ์ลูกผสม รวมทั้งการบรรจุหีบห่อ ดังนั้นบริษัทที่ผลิตเมล็ดพันธุ์จึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ก่อนจะส่งเมล็ดพันธุ์ออกจำหน่าย การตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยทั่วไปจะทำโดยการสุ่มตัวอย่างเมล็ดนำไปปลูกในแปลงและมีการประเมินผลในระยะที่เจริญเติบโตและแสดงลักษณะของพันธุ์นั้นๆ ให้เห็น ซึ่งวิธีการดังกล่าวจะใช้เวลาทดสอบนาน นอกจากวิธีการดังกล่าวแล้วปัจจุบันได้มีการนำเอาวิธีการทางอิเล็กโตรโฟรีซิสมาใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์โดยใช้ไอโซไซม์ในพืชซึ่งวิธีนี้จะทำการตรวจสอบความตรงต่อสายพันธุ์ได้รวดเร็วและแม่นยำ

ในการนำไอโซไซม์มาใช้ในการทดสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสนั้น จะต้องมีการสุ่มตัวอย่างของประชากร 3 ประชากรคือ สายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่ และลูกผสม เพื่อศึกษาลักษณะของไอโซไซม์ที่ปรากฏ (Arus, 1983) สำหรับมะเขือเทศซึ่งเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในหลายๆ ประเทศ พันธุ์ส่วนใหญ่ที่นิยมปลูกจะเป็นสายพันธุ์ลูกผสม เช่นในสหรัฐอเมริกาเฉพาะรัฐแคลิฟอร์เนีย 75 % ของมะเขือเทศที่ปลูกเป็นสายพันธุ์ลูกผสม (Tanksley และ Jones, 1981) ดังนั้นความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์จึงเป็นสิ่งจำเป็นและได้มีการใช้ไอโซไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) มาใช้ทดสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ลูกผสมของมะเขือเทศ โดยพบความแตกต่างของสายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่ และลูกผสม ที่ตำแหน่ง Adh-1 (Tanksley และ Jones, 1981) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในพืชตระกูลกะหล่ำ โดยเฉพาะ

กะหล่ำปลี (*Brassica oleracea*) พบว่าเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนสูง ทั้งนี้เนื่องมาจากการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมในกะหล่ำปลีใช้ประโยชน์จากลักษณะทางพันธุกรรมของการผสมตัวเองไม่ติด (self incompatibility, SI) เปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนที่สูงอาจเนื่องมาจากการใช้ SI ที่ไม่คงตัวมีการเปลี่ยนแปลงตามสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนไปจึงทำให้มีโอกาสการผสมตัวเองสูง (Arus, 1983)

ความสัมพันธ์ระหว่างไอโซไซม์กับโรคพืช (Isozyme-pathogen relationship)

การศึกษาความสัมพันธ์ของโรคกับลักษณะที่แสดงออกทางรูปแบบของไอโซไซม์โดยมีการศึกษาในไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดส และไอโซไซม์ ฟีนอลเลส ในข้าวโพด ถั่วยาสูบ และพืชตระกูลพริก มะเขือเทศ (Peirce และ Brewbaker, 1973) ในมะเขือเทศได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ของไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดส กับการเข้าทำลายของไวรัสที่ทำให้เกิดโรคใบหงิกในมะเขือเทศ (Tomato Yellow Leaf Curl Virus, TYLCV) ผลที่ได้พบว่าความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นความสัมพันธ์ในทางบวก คือ ขณะที่ปริมาณของไอโซไซม์เพิ่มขึ้น ความต้านทานของโรคในเนื้อเยื่อหลังจากถูกเชื้อทำลายจะเพิ่มขึ้นด้วย (Udomprasert และ Attathom, 1991) การเพิ่มปริมาณของเพอร์ออกซิเดสในเนื้อเยื่อนอกจากจะมีผลจากการเข้าทำลายของเชื้อโรคแล้ว การเกิดสภาพความเครียดต่างๆ (stress) สารเคมี (Gasper *et al.*, อ้างถึงใน Udomprasert และ Attathom, 1991) การใช้ฮอร์โมนออกซิน (Auxin) และจิบเบอเรลลิก แอซิด (Gibberellic acid) (Ockerse *et al.*, 1966; Stuber และ Levings III, 1969) การเกิดบาดแผลและการซ่อมแซมส่วนของเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บ (Birecka *et al.*, 1975; Espelie *et al.*, 1986; Lagrimini และ Rothstein, 1987) รวมทั้งการสร้างลิกนิน (lignin) ขึ้นรอบ ๆ บริเวณที่มีการเข้าทำลายของเชื้อโรค (Vance *et al.*, 1976)

ไอโซไซม์กับการแยกลักษณะความแตกต่างของพืช (cultivar identification by isozyme)

การจำแนกพันธุ์พืชนอกจากจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจัดหมวดหมู่แล้วในปัจจุบันนำประโยชน์จากไอโซไซม์มาใช้เริ่มมีความสำคัญมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากในธรรมชาติพืชในสกุล (genus) เดียวกันแต่ต่างชนิด (species) กันอาจมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันมากแต่ยังมีลักษณะแตกต่างกันทางชีวเคมี (Larsen, 1969) เช่น การประเมินสายพันธุ์สับปะรด ซึ่งโดยปกติจะใช้ลักษณะของดอก ใบ และลักษณะผล แต่มีบางลักษณะที่ไม่แน่นอนทำให้การจัดหมวดหมู่เป็น

ไปได้ยาก นอกจากนี้สับปะรดยังมีปัญหาเกี่ยวกับการไม่ตรงตามพันธุ์เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การผสมข้ามสูงสาเหตุจากการผสมตัวเองไม่ติด (self-incompatibility) และการกลายพันธุ์ของหน่อ ดังนั้นการจำแนกพันธุ์ให้ถูกต้องจึงเป็นเรื่องสำคัญมาก DeWald และคณะ(1988) ได้ศึกษาการจำแนกพันธุ์ โดยใช้ไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดส และฟอสโฟกลูโคมิวเตส แยกพันธุ์สับปะรด 27 พันธุ์ โดยสามารถจัดเป็นกลุ่ม ได้ 20 กลุ่ม นอกจากนี้ยังมีพืชอื่น ๆ ได้แก่ แอปเปิ้ล (Weeden และ Lamb, 1985) ราสเบอร์รี่ (Cousineau และ Donnelly, 1989) สตรอเบอรี่ (Bringhurst et al., 1981) มาคาเดเมีย (Vithangage และ Winks, 1992) ถั่ว (Bassiri และRouhani, 1977) เรพ (Brassica napus) (Mundges et al., 1990) ข้าวสาลี (Wegne, 1991) มันเทศ (Kennedy และ Thompson, 1990) และพริก (McLeod et al., 1982) เป็นต้น ที่นำเอาประโยชน์ของไอโซไซม์มาใช้จำแนกพันธุ์

อย่างไรก็ตามการนำประโยชน์มาใช้อาจยังมีข้อจำกัด บางไอโซไซม์ที่นำมาใช้อาจไม่พบความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์แม้ว่าจะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างกัน ดังเช่นการศึกษาของ Andrzejewski (1992) โดยใช้ไอโซไซม์ 5 ชนิด คือซูเปอร์ออกไซด์ไดมิวเตส (superoxide dimutase, SOD) กลูตาเมตออกซาลอะซิเตททรานสอะมิเนส (GOT) ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (Pgm) ไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส (isocitrate dehydrogenase, IDH) และชิกิเมตดีไฮโดรจีเนส (shikimate dehydrogenase, SKDH) ในพริก 3 ชนิด คือ *Capsicum annuum* *C. baccatum* และ *C. chacoense* พบว่าไอโซไซม์ SOD สามารถแยกความแตกต่างของทั้ง 3 ชนิดได้ ในขณะที่ไอโซไซม์ GOT Pgm IDH และ SKDH สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพริก *C. annuum* กับ *C. chacoense* และ *C. baccatum* กับ *C. chacoense* แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของ *C. annuum* กับ *C. baccatum* ได้ ส่วนการศึกษาของ Durham (1987) ได้ศึกษาการใช้ไอโซไซม์ 38 ชนิด แยกคู่ผสมท้อ 8 คู่ จากการทดลองพบว่ามี ไอโซไซม์ 12 ชนิด คือ แอสปาร์เตตอะมิโนทรานสอะมิเนส (aspartate amino transaminase) ไดอะโฟเรส (diaphorase) เอสเตอเรส (esterase) กลูโคสฟอสเฟตไอโซเมอเรส กลูตาไรโอนีรีดักเตส ไอโซซิเตรตดีไฮโดรจีเนส ลูซีนอะมิโนเปปติเดส (leucine aminopeptidase) มาเลตดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) เพอร์ออกซิเดส ฟอสโฟกลูโคมิวเตส 6-ฟอสโฟกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส และ ชิกิเมตดีไฮโดรจีเนส ที่ให้แถบคมชัด และสามารถแยกความแตกต่างได้ ดังนั้นการใช้ไอโซไซม์หลายชนิดในการจำแนกพันธุ์อาจทำให้แยกพันธุ์ได้จำนวนมากและมีความถูกต้องยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นวิธีที่ดีกว่าการแยกพันธุ์โดย

ใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาอย่างเดียว และวิธีนี้จะมีประโยชน์มากในการขอสืบทิบัติพันธุ์ (Moore และ Collin, 1983)

ในปัจจุบันไอโซไซม์ได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางโดยอาศัยวิธีทางอิเล็กโตรโฟเรซิสเพื่อแยกความแตกต่างของไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นเพื่อใช้เป็นมาร์คเกอร์ ประโยชน์จากไอโซไซม์ถูกนำมาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์พืชการศึกษาด้านสรีรวิทยาและพัฒนาการของพืช การจำแนกชนิดและการจัดกลุ่มพืช รวมทั้งมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างไอโซไซม์กับการต้านทานโรค โดยเฉพาะในการปรับปรุงพันธุ์พืช การใช้ประโยชน์จากไอโซไซม์จะทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายจึงทำให้นักปรับปรุงพันธุ์สนใจที่จะนำวิธีการนี้มาใช้ เช่น ในการปรับปรุงพันธุ์ไม้ผลต่าง ๆ กลุ่มของธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโพด ในพืชผัก เช่น มะเขือเทศ มันฝรั่ง ส่วนพริกการนำประโยชน์ของไอโซไซม์มาใช้นั้นยังมีอยู่น้อย ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้เป็นแนวทางในการศึกษาต่อไปในอนาคต