

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ผักกาดหัว (Chinese radish, *Raphanus sativus* var. *longipinnatus* Linn.) เป็นพืชตระกูลกะหล่ำ (Cruciferae) พืชในตระกูลนี้จำแนกเป็น 51 สกุล 218 ชนิด และมีชนิดย่อยหรือพันธุ์มากกว่า 300 ชนิด มีถิ่นกำเนิดทางทิศตะวันออกของชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียน (จานูลักษณ์, 2535) ผักกาดหัวมีช่อดอกแบบ raceme ช่อดอกเกิดตรงปลายสุดของลำต้นและกิ่งแขนง จัดเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ดอกประกอบด้วย กลีบเลี้ยงสีเขียวสี่กลีบ กลีบดอกสีกลีบ มีทั้งสีขาว สีม่วง หรือขาวสลับม่วง อับละอองเกสรห่อหุ้ม ก้านชูเกสรตัวเมียหนึ่งอัน และยอดเกสรตัวเมียหนึ่งอัน รังไข่เป็นแบบ superior (Wivutvongvana, 1980) ถึงแม้ว่าดอกของผักกาดหัวเป็นดอกสมบูรณ์เพศ แต่โดยธรรมชาติแล้วเป็นพืชผสมข้ามและมีการผสมตัวเองไม่ติดชนิด sporophytic system ซึ่งควบคุมโดย S-alleles (Hanata, 1981) การเจริญเติบโตในระยะแรกมีการเจริญเติบโตทางราก ลำต้นและใบ ส่วนในระยะที่สองเกี่ยวข้องกับระยะการสืบพันธุ์ ต้องการอุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียสในการกระตุ้นตาดอก และช่วงแสงวันสั้นมีผลในการกระตุ้นการพัฒนาตาดอก มีการออกดอกแบบต่อเนื่องโดยดอกบานจากโคนช่อดอกไปปลายดอก ดอกบานตอนเช้าประมาณ 8.00 น. เกสรตัวเมียพร้อมรับการผสมในระยะก่อนและหลังดอกบานสองถึงสามวัน กลีบดอกและกลีบเลี้ยงเริ่มร่วงและผักเริ่มพัฒนา ผักมีขนาดยาว 2-6 เซนติเมตร การแก่ของผักจากด้านล่างขึ้นด้านบน ผักแก่มีสีน้ำตาลอ่อนหรือเหลือง มีเมล็ด 1-20 เมล็ดต่อผัก เมล็ดมีลักษณะกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร สีน้ำตาลถึงน้ำตาลแดง บางชนิดมีสีเหลือง (จานูลักษณ์, 2535)

ผักกาดหัวสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ (เมืองทองและสุริรัตน์, 2525)

1. กลุ่มยุโรป (Radish) นิยมปลูกและบริโภคในเขตอบอุ่น เช่น ยุโรป อเมริกา อายุการเก็บเกี่ยวสั้น ส่วนของรากมีขนาดเล็ก ผิวสีแดงเข้ม บางชนิดมีสีดำ แต่เนื้อภายในจะมีสีขาว
2. กลุ่มเอเชีย (Chinese Radish หรือ Japanese Radish) ปลูกมากแถบเอเชีย ส่วนของรากมีขนาดใหญ่ รูปร่างแบบกลมและยาว ปกติผิวของรากมีสีขาว แต่บางพันธุ์อาจมีสีแดง เนื้อภายในมีสีขาว สามารถแยกเป็น 2 ชนิด คือ

- พันธุ์แบบญี่ปุ่น (Japanese Type) ลักษณะใบมีขอบหยักลึกเข้าไปในใบตลอด ใบจะถี่มากขึ้นกับชนิดพันธุ์ มีทั้งพวงอายุสองปีและอายุปีเดียว

- พันธุ์แบบจีน (Chinese Type) ลักษณะใบเรียบ ไม่มีรอยหยักหรือมีน้อยมาก เป็นผักอายุปีเดียว

2.2 การปรับปรุงพันธุ์

ในการปรับปรุงพันธุ์ผักกาดหัวใช้วิธีพื้นฐานของการปรับปรุงพันธุ์พืชผสมข้ามทั่วๆ ไป ได้แก่

1. การคัดเลือกพันธุ์ (เกดนีและวิรัตน์, 2522)

1.1 การคัดเลือกพันธุ์หมู่ (mass selection) เป็นวิธีที่ง่ายและใช้กันมาตั้งแต่มนุษย์รู้จักการปลูกพืช คัดเลือกพืชโดยดูจากลักษณะภายนอกหรือฟีโนไทป์ที่มีลักษณะที่ต้องการ เก็บเกี่ยวแล้วนำมารวมกันเพื่อใช้ปลูกและคัดเลือกพันธุ์ในรุ่นต่อไป การคัดเลือกนี้มิได้มีการทดสอบว่าต้นที่เราเลือกมานั้นดีจริงอย่างที่เรามองเห็นหรือไม่ โอกาสที่จะสำเร็จขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการถ่ายทอดลักษณะนั้น ๆ

1.2 การคัดเลือกรวมโดยมีการทดสอบรุ่นลูก (progeny selection) เป็นการคัดเลือกเพื่อวัดให้แน่นอนว่าลักษณะดีที่เรามองเห็นนั้นเกิดขึ้นเนื่องจากสภาพแวดล้อม หรือเนื่องจากสภาพทางพันธุกรรมของพืช ทำได้โดยการทดสอบดูจากรุ่นลูกดังนี้

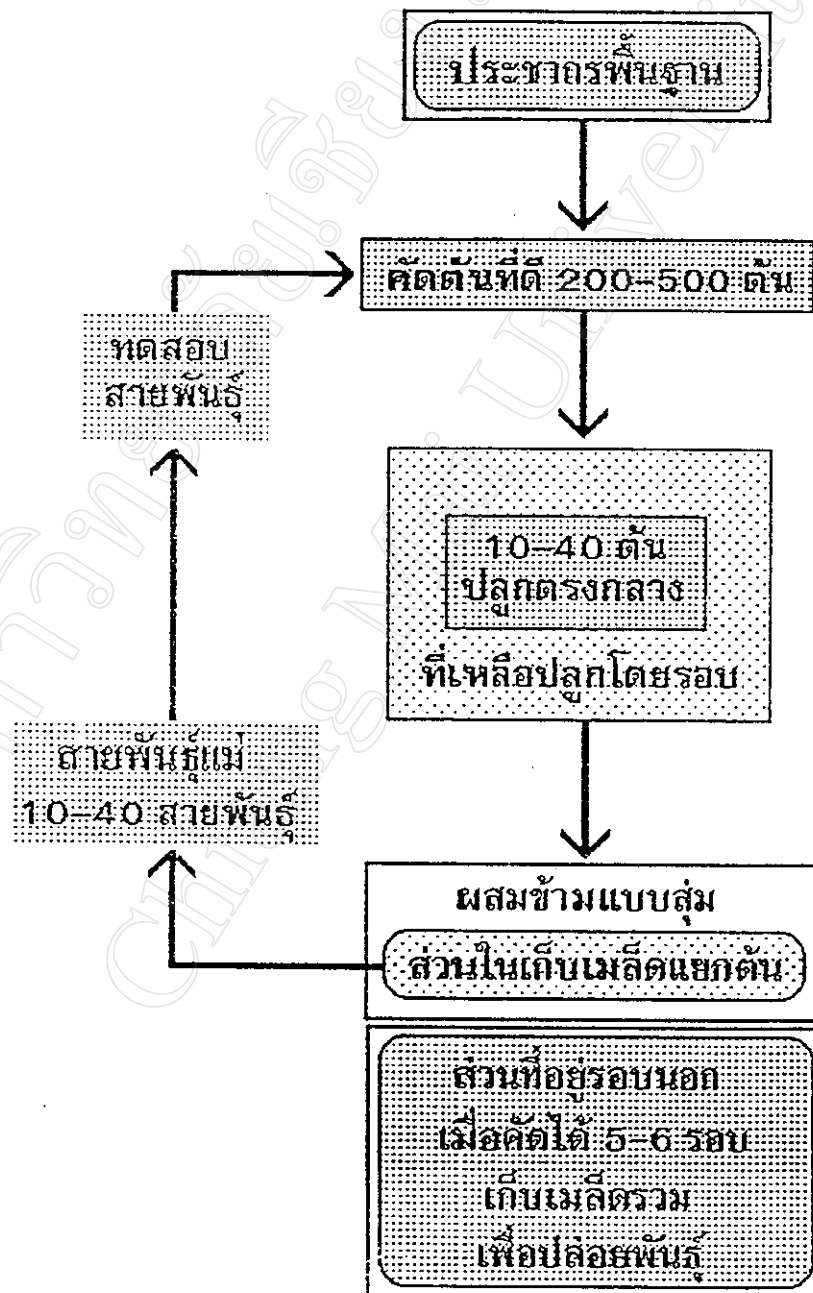
ขั้นที่ 1 ใช้เมล็ดบางส่วนจากต้นที่ได้รับการคัดเลือก แล้วนำไปปลูกเพื่อประเมินคุณค่าในการที่จะนำไปใช้ในการผสมพันธุ์ต่อไป ควรปลูกหลาย ๆ ซ้ำ เพื่อให้การวัดผลแน่นอนยิ่งขึ้น

ขั้นที่ 2 เมื่อพืชให้เมล็ดแล้ว คัดเลือกเอาเฉพาะต้นที่ให้เมล็ดปริมาณมากและเก็บไว้เพื่อทดสอบต่อไป

ขั้นที่ 3 นำเมล็ดแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปปลูกเพื่อวัดผลผลิตและคุณภาพ ส่วนที่สองนำไปปลูกเพื่อใช้ผลิตเมล็ดพันธุ์ในปีต่อไป

ขั้นที่ 4 ต้นที่ได้จากการคัดเลือกในปีที่สามนำมาปลูกเพื่อขยายพันธุ์ต่อไป

1.3 การคัดเลือกพันธุ์แบบสายพันธุ์แม่ (maternal line selection) (กมล, 2536) เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับใช้ปรับปรุงพันธุ์ผักโดยเฉพาะในตระกูลกะหล่ำ เช่น กะหล่ำปลี บร็อคโคลี ผักกาดขาวปลี ผักกาดหัว คะน้า เป็นต้น ขั้นตอนการคัดเลือกแสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 การคัดเลือกพันธุ์แบบสายพันธุ์แม่

ฤดูที่ 1 เริ่มจากประชากรพื้นฐาน จะคัดเลือกก่อนการผสมเกสรโดยดูจากลักษณะภายนอก ด้วยสายตาตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้ แล้วแบ่งต้นที่คัดเลือกออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ที่ดีที่สุดเป็นจำนวน 10-50 ต้น และกลุ่มที่ด้อยลงไปทั้งหมด 190-450 ต้น แล้วนำมาปลูกในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ในลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมซ้อนกันสองชั้น ชั้นในเป็นต้นที่ดีที่สุด ชั้นนอกเป็นต้นที่ด้อยลงมา แล้วปล่อยให้ผสมแบบสุ่ม เก็บเมล็ดพันธุ์จากชั้นในแยกต้นใช้เป็นสายพันธุ์แม่

ฤดูที่ 2 นำสายพันธุ์แม่ที่ได้ไปปลูกทดสอบ แล้วคัดเลือกพันธุ์เข้าเหมือนกับการคัดเลือกในฤดูแรก ในแต่ละรอบของการคัดเลือกพันธุ์ที่ผ่านไปจะได้ประชากรที่มีลักษณะต่างๆ ดีขึ้นเป็นลำดับ เมื่อปรับปรุงพันธุ์ไปได้ 5-6 รอบหรือเห็นว่ามีความแตกต่างๆ ที่มองเห็นด้วยตาเปล่าสม่ำเสมอเพียงพอแล้ว ก็ปล่อยให้ผสมเปิดให้เกษตรกร โดยเก็บเมล็ดพันธุ์จากต้นที่ปลูกชั้นนอกรวมกัน

1.4 การคัดเลือกแบบวงจร (recurrent selection) (เกคินีและวิรัตน์, 2522) เป็นการคัดเลือกแบบที่ต้องมีการผสมตัวเองสลับกับการผสมแบบพบกันหมด โดยที่อาจมีหรือไม่มีการทดสอบประสิทธิภาพในการให้ลูกผสมก็ได้ การคัดเลือกทำได้ดังนี้

ขั้นที่ 1 ทำการผสมตัวเองของพืชในพันธุ์ผสมปล่อยและพิจารณาถึงลักษณะที่ต้องการ

ขั้นที่ 2 ทำการทดสอบสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยการผสมกับตัวทดสอบ พืชที่ไม่ต้องการจะถูกตัดทิ้งไป

ขั้นที่ 3 นำเมล็ดที่ได้จากการผสมตัวเองมาปลูกและทำการผสมข้ามแบบพบกันหมด

ขั้นที่ 4 เมล็ดที่ได้จากการผสมจะใช้ในการคัดเลือกในรอบต่อไป

2. การผสมพันธุ์ (ไพศาล, 2526) เพื่อรวมเอายีน (gene) ของพ่อและแม่เข้าไว้ด้วยกัน ดังนั้นเพื่อที่จะรักษาลักษณะที่ต้องการให้เป็น homozygous จากลูกผสมดังกล่าว จึงจำเป็นต้องทำการผสมตัวเองหลังจากที่ทำการผสมพันธุ์แล้วเสมอ และขณะที่ทำการผสมพันธุ์นั้นจะต้องทำการคัดเลือกพันธุ์ควบคุมกันไปด้วย แบ่งเป็น

2.1 ลูกผสม (hybrid) ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์แท้หรือสายพันธุ์บริสุทธิ์ หรือระหว่างพันธุ์ผสมปล่อยที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน การผลิตลูกผสมทำได้ดังนี้

- ขั้นที่ 1 หาพันธุ์ที่ดีที่เป็นที่นิยมของตลาด ให้ผลผลิตสูง มีความต้านทานโรคแมลงและ
สิ่งแวดล้อม ซึ่งหาได้โดยการคัดเลือกในแปลงปลูก
- ขั้นที่ 2 นำพันธุ์ที่ได้จากขั้นที่หนึ่งปลูกสองสายพันธุ์ เพื่อหาลักษณะที่มีความสม่ำเสมอและ
ทำการคัดเลือกต้นที่เห็นว่าดี อาจทำได้โดยการคัดเลือกโดยไม่มีการทดสอบรุ่นลูก
- ขั้นที่ 3 นำพันธุ์ในขั้นที่สองมาทำการปลูกแบ่งเป็นสองสายพันธุ์ แล้วคัดเลือกตามวิธีการ
เดิม เพื่อให้เกิดความสม่ำเสมอในพันธุ์มากขึ้น และตรวจสอบลักษณะการผสม
ตัวเองไม่ติดไปพร้อมกันด้วย
- ขั้นที่ 4 นำพันธุ์ที่ได้จากการคัดเลือกในขั้นที่สามที่มีลักษณะที่ดีมีความสม่ำเสมอในพันธุ์สูง
ทั้งสองสายพันธุ์ ทำการผสมระหว่างสองสายพันธุ์
- ขั้นที่ 5 คัดเลือกต้นที่มีความสม่ำเสมอภายในพันธุ์ เพื่อนำไปทดสอบคุณภาพของเมล็ด
ปลูกขยายพันธุ์เมล็ดที่ดีที่มีความสม่ำเสมอ

การผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกาดหัวได้รับการสนับสนุนจากโครงการ International Development Research Centre (IDRC) ที่มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ใช้เมล็ดที่ทำการผสมตัวเองแล้ว 3 ชั่ว จำนวน 7 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ Everset , KU1 , Meilon , Mino Early Sakata Improved , Minowase , Ta Mei Hua และ Taiwanese ในการผลิตลูกผสม มีการทดสอบ General Combining Ability (GCA) , Specific Combining Ability (SCA) , Cross Combination ของคู่ผสม 54 คู่เปรียบเทียบกับพันธุ์การค้า ได้แก่ พันธุ์ เจียไต๋ , ตราช้าง , Everest และตราสิงโต ในฤดูหนาวปี พ.ศ. 2533 คู่ผสมที่มีลักษณะที่ดีทางพืชสวน และให้ผลผลิตสูงจำนวน 15 คู่ถูกเลือกมาประเมินค่าต่อไป และมีการทดสอบระดับการผสมตัวเอง ไม่ติดของสายพันธุ์พ่อแม่ จากการประเมินคู่ผสมเหล่านี้เปรียบเทียบกับพันธุ์การค้าจะเห็นว่า คู่ผสม 34-4 x 118-1 , 54-3 x 18-1 , 54-4 x 55-2 และ 55-2 x 54-4 ให้ผลผลิตและคุณภาพของผลผลิตดีกว่า พันธุ์การค้า (Nikornpon, 1988-92)

2.2 พันธุ์สังเคราะห์ (synthetic variety) (กมล, 2536) หมายถึงพันธุ์พืชที่ใช้เป็นการค้า ที่สร้างขึ้นมาจากการผสมข้ามแบบพบกันหมดภายในกลุ่มของสายพันธุ์แท้ โคลน (clone) หรือพันธุ์ พืชที่ผ่านการทดสอบว่ามีความสามารถในการรวมตัวทั่วไปดี แล้วนำเมล็ดมารวมกัน พันธุ์พืชชนิดนี้ สามารถใช้ขยายพันธุ์ต่ออีก 2-3 รุ่น

สถานีทดลองพืชสวนฝาง อ.ฝาง จ.เชียงใหม่ เริ่มปรับปรุงผักกาดหัวพันธุ์หนักเมื่อปี 2515 เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์หลักที่มีคุณภาพสูงให้แก่กรมส่งเสริมการเกษตร โดยทำการปลูกคัดเลือกพันธุ์ด้วยวิธีคัดเลือกสายพันธุ์แม่ (maternal line selection) คัดเลือกสายพันธุ์ดีเด่นของผักกาดหัวพันธุ์ฝาง เบอร์ 2 ดอกสีขาวไว 7 สายพันธุ์ และดอกสีม่วง 6 สายพันธุ์ (มานิช และ คณะ, 2524) อารันต์และถาวร (2525) ศึกษาพันธุ์ผักกาดหัวจำนวน 42 พันธุ์ พบว่าพันธุ์ Everest No.150 พันธุ์ข้างเคียนพันธุ์ฝาง และพันธุ์Minowase ให้ผลผลิตสูง คัดเลือกต้นที่มีลักษณะหัวดีในพันธุ์เหล่านี้มาปลูกแบบผสมเปิดสองชั่วแล้วคัดเลือกสายพันธุ์แม่ Maneesinthu *et al.* (1989) ศึกษาการติดเมล็ดจากการผสมผักกาดหัวที่ผสมตัวเองไม่ติดจำนวน 5 พันธุ์ ที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ศึกษาจากลูกผสมชั่วที่หนึ่งของผักกาดหัวที่ผสมตัวเองไม่ติดที่มี S-allele ต่างกัน แสดงออกโดยลูกผสมที่เป็นพืชผสมข้ามจะมีใบเส้นสุดที่ปลาย (determinate) พบว่าลูกผสม KU 1-2-12 x OW 1-7-3, OW1-7-3 x KU 1-2-12, OW 1-7-7 x Kow Puey 3/7, KU1-2-12 x OW 1-7-7, KU 1-2-12 x Kow Puey 3/7 และ Kow Puey x OW 1-7-3 มีค่า seed set สูง คือ 5.2, 3.2, 3.2, 3.0, 2.8 และ 2.3 ตามลำดับ Choomsai and Piluck (1984) ใช้เทคนิคการผสมดอกอ่อนและการผสมเปิดในการปรับปรุงผักกาดหัวพันธุ์ของบริษัทเจียไต๋ ได้พันธุ์ KU-1 ซึ่งให้ผลผลิต 5920 กก./ไร่ Tonguthaisri (1984) ใช้วิธีคัดเลือกสายพันธุ์แม่และการคัดเลือกหมู่ในการผลิตผักกาดหัวพันธุ์ OVV-1 ซึ่งเป็นพันธุ์เบาลักษณะหัวยาว (cylindrical) Lin and Li (1993) ทำการปรับปรุงผักกาดหัวพันธุ์ Man Tang Hong โดยการผสมระหว่างพันธุ์ P233-43-3231 กับพันธุ์ 8506-167-1 ทำให้รากมีสีแดงมากขึ้น ผลผลิต 52 t/ha คุณภาพหัวดี รสหวาน และกรอบ มีน้ำตาล 4.2 % วิตามินซี 43.36 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักสด 100 กรัม Sirohi *et al.* (1994) คัดเลือก heterozygous material จาก Old Sabzi Mandi และ Delhi โดยวิธีการคัดเลือกหมู่ พบว่า พันธุ์ Pusa Desi ให้ผลผลิตสูงกว่าอีก 5 พันธุ์ที่ทดสอบ Wei and Song (1995) ทำการผสมข้ามระหว่างพันธุ์ Zhe 3A กับพันธุ์ Qiao Tou Qing ได้พันธุ์ Zheluo1 ซึ่งให้ผลผลิตสูงกว่าพันธุ์ Zhe 3A ถึง 26.3% น้ำหนักหัวเฉลี่ย 3.2 กก. อายุปลูก 90-100 วัน Zhang *et al.* (1996) ทำการทดลองเปรียบเทียบการผลิตเมล็ดพันธุ์ผักกาดหัวที่ย้ายปลูกในฤดูหนาวและฤดูใบไม้ผลิ พบว่าผักกาดหัวที่ย้ายปลูกในช่วงฤดูหนาวมีจำนวนฝักสูงกว่าที่ย้ายปลูกในช่วงฤดูใบไม้ผลิ แต่จำนวนเมล็ดต่อต้นและน้ำหนัก 1000 เมล็ดต่ำกว่า การออกดอกและการสุกแก่จะช้ากว่า

2.3 ลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด

ผักกาดหัวเป็นพืชผสมข้ามและมีการผสมตัวเองไม่ติด คือ ละอองเกสรตัวผู้ไม่อาจเข้าผสมกับไข่ในดอกเดียวกันหรือต้นที่มีจีโนไทป์เหมือนกัน เนื่องจากละอองเกสรตัวผู้ไม่เจริญ ไม่สามารถส่งท่อละอองเกสรผ่านยอดเกสรตัวเมียหรือก้านชูเกสรตัวเมียลงไปได้ กลไกนี้เป็นการป้องกันการถดถอยทางพันธุกรรม (inbreeding depression) และทำให้พืชต้องมีการผสมข้าม ทำให้ยีนมีการจัดกลุ่มตลอดเวลา (จานุลักษณ์, 2535) Kakizaki (1922) รายงานลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดในผักกาดขาวปลีเป็นครั้งแรก และพบว่าเป็นลักษณะที่ควบคุมโดยพันธุกรรม จากการสำรวจพืชในวงศ์กะหล่ำ 180 ชนิด พบว่าเป็นพวกผสมตัวเองไม่ติด 80 ชนิด ผสมตัวเองติด 100 ชนิด การผสมตัวเองไม่ติดเกิดจากอิทธิพลของพันธุ์พ่อ (sporophytic incompatibility) เกิดจากการควบคุมของยีน 1 ตำแหน่งและหลายอัลลีล (Bateman, 1955) การผสมตัวเองไม่ติดเป็นปฏิกิริยาระหว่าง papilla cell ของยอดเกสรตัวเมียซึ่งเป็นแบบ dry stigma มีการสร้างของเหลว (stigma fluid) ที่ยอดเกสรตัวเมียน้อยหรือไม่มีเลยในขณะที่ใช้พร้อมรับการผสมเกสร ผิวนอกของยอดเกสรตัวเมียเป็นตุ่มยื่นขึ้นมาจากผิว ยอดเกสรตัวเมียเรียงตัวกันแน่นและผนังประกอบด้วย pectin-cellulose อยู่ชั้นใน และ cuticle อยู่ชั้นนอก เมื่อมีการถ่ายละอองเกสร การทำงานของ S-gene จะมีบทบาทต่อการที่เกสรตัวเมียยอมให้เกสรตัวผู้งอกผ่านถ้าจีโนไทป์ของ S-gene ในเกสรทั้งสองเหมือนกันจะเกิดการยับยั้งการเข้าผสมของเซลล์สืบพันธุ์ ปฏิกิริยาการยับยั้งการผสมเกิดขึ้นที่หลอดเกสรตัวผู้เริ่มงอกบริเวณยอดเกสรตัวเมีย การยับยั้งการงอกของเกสรตัวผู้จะเกิดสูงสุดในระยะดอกบาน แต่ในระยะดอกตูมก่อนบาน 2-3 วันและหลังดอกบาน เกสรตัวผู้สามารถงอกผ่านได้และทำให้เกิดการปฏิสนธิได้ ดังนั้นในการขยายสายพันธุ์เพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมสามารถทำได้โดยการผสมดอกอ่อน (จานุลักษณ์, 2535) Verma et al. (1989) กล่าวว่า การผสมตัวเองไม่ติดของผักพันธุ์พื้นเมือง *Raphanus raphanistrum* มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากผสมเกสรจะมีการยับยั้งการงอกของเกสรตัวผู้บริเวณผิว papilla

Haruta (1962) ศึกษาลักษณะพันธุกรรมการผสมตัวเองไม่ติดในกะหล่ำดาว กะหล่ำปลี บรอกโคลี ผักกาดขาวปลี เทอร์นิพ และผักกาดหัว พบว่าลักษณะพันธุกรรมที่ควบคุมการผสมตัวเองไม่ติดมี 4 ประเภทคือ (รูปที่ 2.2)

1. ประเภทที่ 1

จีโนไทป์มี 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม A และ C ซึ่งภายในกลุ่มเดียวกันผสมตัวเองไม่ติด และภายในกลุ่ม C ผสมข้ามระหว่างกันไม่ติด แต่สามารถผสมข้ามสลับกันต่างกลุ่มได้ กลุ่ม A มีจีโนไทป์ SaSa แต่กลุ่ม C มีจีโนไทป์ 2 ประเภทคือ SbSb และ SaSb ลักษณะการแสดงออกของยีนในต้นแม่และต้นพ่อ คือ ยีน Sb ซ้ำยีน Sa ($Sa < Sb$) อัตราส่วนของจีโนไทป์เมื่อมีการผสมข้ามกันแบบสุ่ม คือ SaSa : SaSb : SbSb เท่ากับ 1 : 3 : 0 การผสมติดเมล็ดเท่ากับ 67 เปอร์เซ็นต์ หรือ 4 : 6

2. ประเภทที่ 2

จีโนไทป์มี 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม ABC ภายในกลุ่มเดียวกันผสมกันไม่ติด การผสมข้ามกันติดระหว่างกลุ่ม A กับ B ระหว่างกลุ่ม B กับ C ผสมสลับกันไม่ติด การผสมระหว่างกลุ่ม A กับ C (กลุ่ม A เป็นต้นแม่) การผสมระหว่างกลุ่ม C กับ A ผสมกันไม่ติด กลุ่ม A มีจีโนไทป์ SaSa กลุ่ม B มีจีโนไทป์ SbSb และกลุ่ม C มีจีโนไทป์ SaSb ลักษณะการแสดงออกของยีนในต้นแม่คือ ยีน Sa และยีน Sb แสดงออกร่วมกัน ($Sa = Sb$) และต้นพ่อคือ $Sa < Sb$ อัตราส่วนของจีโนไทป์เมื่อมีการผสมข้ามกันแบบสุ่ม คือ SaSa : SaSb : SbSb เท่ากับ 0.5 : 2.5 : 0 การผสมติดเมล็ดเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ 3 : 6

3. ประเภทที่ 3

จีโนไทป์มี 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม ABC และผสมตัวเองภายในกลุ่มไม่ติด กลุ่ม A และ B ผสมสลับกันติด แต่กลุ่ม B กับ 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 ลักษณะการแสดงออกของยีนในต้นแม่คือ $Sa < Sb$ และในต้นพ่อคือ $Sa = Sb$ อัตราส่วนของจีโนไทป์เมื่อมีการผสมข้ามกันแบบสุ่ม คือ SaSa : SaSb : SbSb เท่ากับ 0.5 : 2.5 : 0 การผสมติดเมล็ดเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ หรือ 3 : 6

4. ประเภทที่ 4

จีโนไทป์มี 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม ABC และผสมตัวเองภายในกลุ่มไม่ติด กลุ่ม A และ B ผสมสลับกันติด แต่กลุ่ม B กับ C ผสมสลับกันไม่ติด และการผสมข้ามสลับระหว่างกลุ่ม A กับ C ไม่ติด ซึ่งตรงกันข้ามกับประเภทที่ 1 กลุ่ม A และ B มีจีโนไทป์ SaSa และ SbSb กลุ่ม C มีจีโนไทป์ SaSb

ลักษณะการแสดงออกของยีนในต้นแม่และต้นพ่อคือ $Sa = Sb$ อัตราส่วนของจีโนไทป์เมื่อมีการผสมข้ามกันแบบสุ่ม คือ $SaSa : SaSb : SbSb$ เท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์ หรือ 2 : 6

ลักษณะประเภทของพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด

	1	2	3	4
การแสดงออกของยีน				
ต้นแม่	$Sa < Sb$	$Sa = Sb$	$Sa < Sb$	$Sa = Sb$
ต้นพ่อ	$Sa < Sb$	$Sa < Sb$	$Sa = Sb$	$Sa = Sb$
อัตราส่วนการผสมติด (%)	4 : 8 67	3 : 6 50	3 : 6 50	2 : 6 33
อัตราส่วนของจีโนไทป์	$SaSa$ $SaSb$ $SbSb$	$SaSa$ $SaSb$ $SbSb$	$SaSa$ $SaSb$ $SbSb$	$SaSa$ $SaSb$ $SbSb$
เมื่อผสมแบบสุ่ม				
$SaSa \rightleftharpoons SbSb$	0 : 2 : 0	0 : 2 : 0	0 : 2 : 0	0 : 2 : 0
$SaSa \rightleftharpoons SaSb$	1 : 1 : 0	0.5 : 0.5 : 0	0.5 : 0.5 : 0	0 : 0 : 0
$SbSb \rightleftharpoons SaSb$	0 : 0 : 0	0 : 0 : 0	0 : 0 : 0	0 : 0 : 0
รวม	1 : 3 : 0	0.5 : 2.5 : 0	0.5 : 2.5 : 0	0 : 2 : 0

—————> = การผสมตัวเองติดเมล็ด

———> = การผสมตัวเองไม่ติดเมล็ด

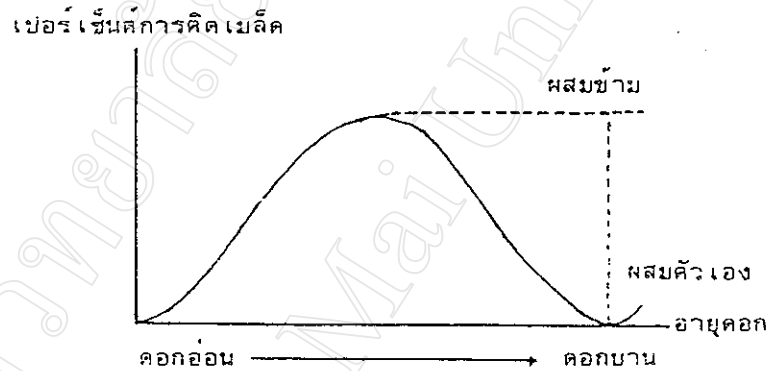
รูปที่ 2.2 ลักษณะประเภทของพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด

2.4 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด ได้แก่ (Hanata, 1981)

1. อายุดอก

ในระยะดอกตูมสามารถทำการผสมตัวเองได้ (Kakizaki, 1930) เรียกว่า bud pollination เทคนิคนี้ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์จากการผสมตัวเอง เปอร์เซ็นต์ของจำนวนเมล็ดภายใน 1 ผลทำให้ทราบถึงความสามารถในการติดเมล็ด โดยทั่วไปเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดจะแสดงได้ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดในการผสมตัวเองและผสมข้ามในดอก
ที่ระยะการเจริญเติบโตต่างกัน

ในระยะแรกๆ ของดอกตูมเกสรตัวเมียยังไม่สมบูรณ์พอที่จะติดเมล็ด ระยะต่อมาเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดทั้งการผสมตัวเองและผสมข้ามจะสูงขึ้น ต่อมาก่อนที่ดอกจะบาน 2-3 วัน เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดโดยการผสมตัวเองจะลดลงเนื่องจากการผสมตัวเองไม่ติด แต่การผสมข้ามจะไม่ลดลงก่อนดอกบานหนึ่งวันหรือวันที่ดอกบานจะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดจะมีความแตกต่างสูงสุดระหว่างการผสมตัวเองและผสมข้าม หลังจากดอกบาน 2-3 วันจะมีเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดเพียงเล็กน้อยในการผสมตัวเอง ปกติเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดจะเกิดขึ้นดังที่กล่าวข้างต้น แต่บางครั้งอาจสังเกตเห็นว่ามีค่าแปรปรวนไปจากปกติ ทั้งนี้เนื่องจากการผันแปรของปัจจัยทางพันธุกรรมและ

สิ่งแวดล้อม เพอร์เซ็นต์การติดเมล็ดในระยะดอกบานเป็นสิ่งที่ชี้ให้เห็นถึงความสามารถตามธรรมชาติของการผสมตัวเอง นอกจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดแล้วยังมีปัจจัยทางพันธุกรรมมาเกี่ยวข้องอย่างมาก ซึ่งเป็นผลมาจาก S-gene นั้นเอง (ฮัสนีย์, 2535)

2. อุณหภูมิ

ถ้าอุณหภูมิสูงในระยะผสมเกสรจะทำให้ดอกที่ผสมตัวเองสามารถติดเมล็ดได้ (Richards and Thurling, 1973) เนื่องจากอุณหภูมิรบกวนการสังเคราะห์โปรตีนที่เจาะจงกับ S-gene ของ papilla cell (Nasrallah and Wallace, 1968) Matsubara (1980) กล่าวว่า การทดสอบเกสรตัวเมียของผักกาดหัวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 25 นาที สามารถลดความสามารถของการผสมตัวเองไม่ติดให้ลดลงได้ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะสังเกตเห็นเกสรตัวผู้ และหลอดเกสรตัวผู้บนผิว papilla

3. ความชื้น

ความชื้นสัมพัทธ์ 98% และอุณหภูมิ 22-23 องศาเซลเซียสทำให้ละอองเกสรตัวผู้งอกในปริมาณเพิ่มขึ้น ดังนั้นโอกาสที่จะออกผ่านยอดเกสรตัวเมียมีเพิ่มขึ้น (Hanata, 1981)

4. สภาพอากาศในบรรยากาศ

การให้คาร์บอนไดออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ในระยะหลังการผสมเกสร 2 ชั่วโมง สามารถลดการผสมตัวเองไม่ติด แต่อัตราการผสมติดเมล็ดยังไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับพันธุกรรม (Nakanishi and Hanata, 1973)

2.5 การตรวจสอบลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด

การตรวจสอบลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด ทำได้ 2 วิธีคือ (จานุลักษณะ, 2535)

1. วิธีผสมดอกตูมและดอกบานในข้อเดียวกัน

เป็นวิธีที่นิยมที่สุดและได้ผลถูกต้องแน่นอน มีขั้นตอนการทำดังนี้ (Shinohara, 1981)

1. เลือกข้อดอกที่ดอกกลางบานเต็มที่ แต่ละข้อมีอัตราการเติบโตพอ ๆ กันอย่าใช้ลำต้นหลัก ตัดดอกบานทิ้งคลุมดอกตูมด้วยถุงกระดาษ

2. ต่อมาอีก 2 วันผสมดอกบานทั้งหมดและผสมดอกตูมอีก 10 ดอกพร้อม ๆ กัน ตัดดอกเล็กที่เหลือข้างบนทิ้ง ทำเครื่องหมายตรงรอยต่อระหว่างดอกตูมกับดอกบาน

3. ตรวจสอบจำนวนเมล็ดในแต่ละฝัก ปกติใช้ข้อดอก 3 ข้อเพื่อทดสอบการผสมตัวเอง และถ้าทดสอบการผสมข้ามจะใช้ 2-3 ข้อ หลังจากนั้นเลือกฝักที่ติดเมล็ดมากอย่างต่อเนื่องมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การผสมติดเมล็ดอย่างละ 5 ฝัก

$$\text{เปอร์เซ็นต์การติดเมล็ด} = \frac{\text{ผลรวมของจำนวนเมล็ดจาก 5 ฝักของดอกบาน จำนวน 3 ข้อ}}{\text{ผลรวมของจำนวนเมล็ดจาก 5 ฝักของดอกตูม จำนวน 3 ข้อ}} \times 100$$

จากการตรวจนับมีเกณฑ์ตัดสินดังนี้ ผสมตัวเองติดเมื่อเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดมากกว่า 75 % ผสมตัวเองไม่ติดเมื่อเปอร์เซ็นต์การติดเมล็ดน้อยกว่า 50 %

2. วิธีตรวจสอบหลอดเกสรตัวผู้ในก้านชูเกสรตัวเมีย

เป็นวิธีที่รวดเร็วและภาพที่ได้มีความผิดพลาดน้อย เพราะตรวจสอบการงอกเกสรตัวผู้โดยดูหลอดเกสรตัวผู้ภายในก้านชูเกสรตัวเมียโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสงฟลูออเรสเซนซ์ ดอกบานของพันธุ์ที่ผสมตัวเองไม่ติดจะไม่มีหลอดเกสรตัวผู้ภายในก้านชูเกสรตัวเมีย แต่ดอกบานของพันธุ์ที่ผสมตัวเองติดจะมีหลอดเกสรตัวผู้ภายในก้านชูเกสรตัวเมีย (มานี, 2538)

Kho and Baer (1968) ทำการตรวจหาการเจริญของหลอดเกสรตัวผู้ในก้านชูเกสรตัวเมียโดยใช้ fluorescent microscope พบว่าในผนังของหลอดเกสรตัวผู้เนื้อเยื่อส่วนใหญ่จะมีสาร callose ซึ่งไม่พบในเนื้อเยื่อของก้านชูเกสรตัวเมียที่ล้อมรอบเนื้อเยื่อนี้ และจะติดเฉพาะสี aniline จึงต้องใช้แสงฟลูออเรสเซนซ์หรืออุลตราไวโอเลต โดย callose จะแสดงแสงสีเหลืองเขียวที่สว่างตัดกับพื้นสีดำอย่างเห็นได้ชัด อัสนีย์ (2535) ใช้เทคนิค fluorescent microscope ตรวจหาสายพันธุ์ที่ผสมตัวเองไม่ติดของ

ผักกาดหัวจำนวน 10 พันธุ์ Hadj-Arab (1990) ใช้วิธี scanning electron microscopy และวิธี fluorescent microscopy เพื่อศึกษากระบวนการที่ทำให้เกิดการผสมตัวเองไม่ติดใน *Brassica oleracea* พบว่าเกิดจากการที่หลอดเกสรตัวผู้ไม่สามารถแทงทะลุผ่าน papilla ของยอดเกสรตัวเมียไปได้ เมื่อใช้วิธี fluorescent microscopy พบว่าการแทงผ่านของหลอดเกสรตัวผู้นั้นถูกยับยั้งโดยสาร callose ซึ่งสะสมอยู่บริเวณจุดเชื่อมระหว่าง papilla และหลอดเกสรตัวผู้ จานูลักษณ์ (2535) รายงานเกี่ยวกับการตรวจสอบลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดหลังจากระยะผสมเกสร 1-2 วัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยนำดอกอ่อนและดอกบานภายในข้อเดียวกันมาแยกเอาเฉพาะส่วนเกสรตัวเมียแช่ในไฮเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 45 นาทีเพื่อให้เนื้อเยื่อนิ่ม หลังจากนั้นนำไปย้อมสีในสารละลาย อะนีนีนบลู 0.2 % ผสมกับโปรตัสเซียมฟอสเฟต 2 % ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ในสภาพแสงอุลตราไวโอเลต ลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดแสดงโดยหลอดเกสรตัวผู้ไม่สามารถงอกผ่านยอดเกสรตัวเมียได้ Sampon (1967) ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจนับละอองเกสรตัวผู้ในยอดเกสรตัวเมียของผักกาดหัวหลังจากการถ่ายละอองเกสรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใช้ fluorescent microscopy ในการตรวจหาความถี่และการกระจายตัวของ alleles ที่ผสมตัวเองไม่ติดใน *Raphanus raphanistrum*

การทดสอบระดับการผสมตัวเองของผักกาดหัว(S₂) จำนวน 85 พันธุ์จากพันธุ์การค้า 6 พันธุ์ ในระหว่างฤดูหนาวเมื่อปีพ.ศ. 2533 ที่มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พบว่าสายพันธุ์ส่วนใหญ่ของพันธุ์ KU 1 และ 2 สายพันธุ์ของ Ta Mei Hua แสดงลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดในระดับสูง (strong self incompatibility) ขณะที่พันธุ์ที่มาจาก Minowase, Mino Early Sakata's Improved, Meilon และ Ta Mei Hua บางพันธุ์แสดงลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดในระดับปานกลาง ในปีพ.ศ. 2534 และ 2535 มีการทดสอบระดับการผสมตัวเองไม่ติดที่มหาวิทยาลัยเชียงใหม่อีกครั้ง โดยวิธีตรวจสอบหลอดเกสรตัวผู้ในก้านชูเกสรตัวเมีย และวิธีผสมดอกตูมและดอกบานในข้อเดียวกัน พบว่ามีความแตกต่างของระดับการผสมตัวเองไม่ติดในสายพันธุ์ กล่าวคือ สายพันธุ์แท้ 18-1-1 ซึ่งมีลักษณะการผสมตัวเองไม่ติด เมื่อทดสอบโดยวิธีตรวจสอบหลอดเกสรตัวผู้ในก้านชูเกสรตัวเมีย ในปีพ.ศ. 2534 พบว่าจาก 10 สายพันธุ์ มี 4 สายพันธุ์ที่มีระดับการผสมตัวเองไม่ติดสูง 2 สายพันธุ์มีการผสมตัวเองไม่ติดระดับปานกลาง และอีก 4 สายพันธุ์มีลักษณะผสมตัวเองติด ซึ่งแสดงว่ามีความแปรปรวนทางพันธุกรรมของการผสมตัวเองของสายพันธุ์ที่เป็น homogeneous จากการตรวจสอบโดยวิธีตรวจสอบหลอดเกสรตัวผู้ในก้านชู

เกสรตัวเมีย พบว่าสายพันธุ์แท้มากกว่า 60 พันธุ์ มีลักษณะการผสมตัวเองไม่ติดในระดับสูง แต่ในการตรวจสอบโดยวิธีผสมดอกตูมและดอกบานในข้อเดียวกัน พบสายพันธุ์แท้ประมาณ 30-40 พันธุ์ที่มีลักษณะผสมตัวเองไม่ติดในระดับสูง ดังนั้นจึงควรใช้ผลการตรวจสอบจากทั้งสองวิธีร่วมกันในการพิจารณา สายพันธุ์แท้ที่มีโอกาสสูงที่จะใช้เป็นสายพันธุ์พ่อแม่ ได้แก่ 27-3-3-5 , 27-3-3-7 , 30-1-8 , 54-10-5 , 59-10-8 , 62-2-2 , 62-2-6 , 62-9-4 , 75-2-8 , 84-1-1 และ 84-1-8 (Na-Lumpang *et al*, 1990-91)

2.6 อิเล็กโทรโฟรีซิส

ในการจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์นั้น วิธีที่นิยมใช้คืออิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งเป็นวิธีทางชีวเคมีที่อาศัยคุณสมบัติของสารประกอบที่มีอยู่ในพืชมาเป็นเกณฑ์ในการจัดหมวดหมู่ของพืช (มณฑล, 2531) เพ็ญพงษ์ (2530) รายงานว่าการใช้เทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิสในการแยกและวิเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์ซึ่งเป็น primary และ secondary product จากการแสดงกิจกรรมของยีนจะมีความคงตัวของรูปแบบเสมอจนกว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้นที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน (nucleotide sequence of gene) หรือ ลำดับของรหัสเบส (coding base sequence) จึงมีผลต่อการสร้างโปรตีนให้มีโครงสร้างทางโมเลกุลของกรดอะมิโนที่เรียงลำดับแตกต่างกันและส่งผลไปถึงการมีประจุไฟฟ้ารวม ขนาด และรูปร่างของโมเลกุลที่ไม่เหมือนกัน เมื่อถูกนำมาแยกในตัวกลางที่เหมาะสมตามวิธีการอิเล็กโทรโฟรีซิสจะทำให้โมเลกุลเหล่านั้นเคลื่อนที่ในอัตราต่างกัน เมื่อถูกนำมาย้อมสีก็จะเกิดแถบสีของโปรตีนที่เรียกว่า Zymogram เป็นลักษณะเฉพาะของพืชนั้นๆ และสามารถนำไปจำแนกความแตกต่างระหว่างพืชได้ เนื่องจากการวิเคราะห์โปรตีนในพืชค่อนข้างมีปัญหาเนื่องจากในเนื้อเยื่อพืชมีโปรตีนอยู่หลายชนิด เมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจะเกิดแถบสีของโปรตีนมากมายทำให้ยากต่อการวิเคราะห์ผล จึงมีการศึกษาเอนไซม์โดยเฉพาะพวกไอโซไซม์ (Isozyme) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างโมเลกุลหลาย ๆ รูปแบบ แต่สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่จำเพาะออกมาเหมือนกันเมื่อทำปฏิกิริยากับ substrate ที่เหมาะสม

ชนิดของอิเล็กโทรโฟรีซิสที่เกี่ยวข้องกับการจำแนกสายพันธุ์พืช ได้แก่ (ชวนพิศ, 3538)

1. Gel electrophoresis เป็นแบบที่มีสารตัวกลางจำพวกเจลหรือสารกึ่งแข็ง ได้แก่ แป้ง (starch) อะกาโรส (agarose) โพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) การแยกของโมเลกุลสารอาศัยสภาพของเนื้อเจล (pore size) ที่เตรียมไว้ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยทั่วไปความเข้มข้นของเจลที่ใช้อยู่ระหว่าง 2-20 % ในอดีต gel electrophoresis ที่นำมาใช้ในงานไอโซไซม์ส่วนใหญ่จะ

เป็น strach gel ซึ่งเหมาะกับการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ แต่บางครั้งขนาดของตัวอย่างที่ต้องการศึกษาเอนไซม์มีจำกัด ทำให้ผลที่ได้ไม่ชัดเจน จึงทำให้มีการนำ polyacrylamide gel มาแทนที่

2. Isoelectric focusing หรือ electro focusing เป็นวิธีที่ใช้สำหรับแยกสารหรือโมเลกุลที่มีคุณสมบัติเป็น ampholyte ได้แก่ กรดอะมิโน และโปรตีนซึ่งมีลักษณะเป็น dipolar คือมีประจุบวกและลบในโครงสร้างโมเลกุล โมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิดมีค่า isoelectric pH ต่างๆ กัน ดังนั้นถ้าตัวอย่างสกัดถูกหยอดลงในตัวกลางที่มีการจัดลำดับของ pH ต่างกัน เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าจะทำให้โปรตีนแต่ละชนิดเคลื่อนที่ตามชนิดและจำนวนประจุบนโมเลกุล และหยุดเคลื่อนที่เมื่อถึงบริเวณที่มี pH เท่ากับ isoelectric pH ของโปรตีนนั้นๆ ซึ่งเป็นจุดที่มีประจุรวมเป็นศูนย์

3. Disc electrophoresis เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ และจำแนกชนิดของโปรตีนที่ปะปนกันอยู่ได้อย่างละเอียด ทำให้ได้ผลของแถบสีคมชัดที่สุด

ปัจจุบันนิยมใช้ polyacrylamide gel ในการแยกโปรตีน เนื่องจากการเตรียมเจลซึ่งเป็นโพลีเมอร์สังเคราะห์จาก acrylamide monomer สามารถทำให้ได้รูปทรงที่สม่ำเสมอ โดยคงสภาพ polymerization ให้คงที่ สารประกอบต่างๆ ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยา polymerization สามารถหาซื้อได้สะดวก ราคาไม่แพงนักและมีความบริสุทธิ์สูง สำหรับเนื้อเจลเมื่อแข็งตัวแล้วมีข้อดีคือ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นได้ง่าย มีความคงตัวในช่วงกว้างต่อสภาพ pH อุณหภูมิ และมีเนื้อเจลใส ข้อเสียคือสารละลาย acrylamide monomer หรือผง acrylamide เป็นพิษต่อสมองและอาจก่อมะเร็ง (ดวงพร, 2538) John and Whitney (1983) ใช้แบบแผนของโปรตีน Globulins ที่ได้จาก embryo ของข้าวโพด จำแนกความแตกต่างของพันธุ์แท้ Mo₁₇ และ B₇₃ กับลูกผสม B₇₃ x Mo₁₇ Kim and Park (1984) ใช้แบบแผนเอนไซม์ malate dehydrogenase และ acid phosphatase ของใบเลี้ยงผักกาดหัวที่มีอายุเพียง 2-3 วัน จำแนกความแตกต่างของพันธุ์แท้ ลูกผสมชั่วที่ 1 (F₁) ลูกผสมชั่วที่ 2 (F₂) และลูกผสมกลับ Dong et al. (1986) ใช้แบบแผนเอนไซม์ phosphoglucomutase ของใบเลี้ยง squash อายุ 3 วัน จำแนกความแตกต่างของลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 3 เบอร์ และสายพันธุ์แท้อีก 6 เบอร์ Lee and Park (1986) ใช้แบบแผนเอนไซม์ 6 ชนิด คือ Acid phosphatase, Malate dehydrogenase, Phosphoglucomutase,

Phosphoglucose isomerase, Malic enzyme และ 6-Phosphogluconate dehydrogenase ที่สกัดได้จาก
ใบเลี้ยงแตงกวา ในการจำแนกความแตกต่างของลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 3 เบอร์และพันธุ์แท้ 6 เบอร์