ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

พืชสวน | พืชสวน

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การจำแนกสายพันธุ์แตงกวาโดยการวิเคราะห์ โปรตีนในเมล็ดด้วยเทคนิค Ultrathin Layer Isoelectric Focusing

Varietal Identification of Cucumber Using Seed Protein Analysis *via* Ultrathin Layer Isoelectric Focusing Technique

นามผู้วิจัย นายดำรงวุฒิ อ่อนวิมล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธรรมศักดิ์ ทองเกตุ, Ph.D.)

กรรมการ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์กฤษณา กฤษณพุกต์, D.Agr.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, Ph.D.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การจำแนกสายพันธุ์แตงกวาโดยการวิเคราะห์ โปรตีนในเมล็ดด้วยเทคนิค Ultrathin Layer Isoelectric Focusing

Varietal Identification of Cucumber Using Seed Protein Analysis via Ultrathin Layer Isoelectric Focusing Technique

โดย

นายดำรงวุฒิ อ่อนวิมล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดำรงวุฒิ อ่อนวิมล 2553: การจำแนกสายพันธุ์แตงกวาโดยการวิเคราะห์ โปรตีนในเมล็ดด้วยเทคนิค Ultrathin Layer Isoelectric Focusing ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาพืชสวน ภาควิชาพืชสวน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธรรมศักดิ์ ทองเกตุ, Ph.D. 113 หน้า

การศึกษาตัวทำละลายสำหรับสกัดโปรตีนที่สะสมในเมล็ด และช่วง pH ของเจลที่เหมาะสม เพื่อใช้แยกความแตกต่างของพันธุ์แตงกวาลูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์การค้า 4 พันธุ์ปลูก คือ พันธุ์ไมโครซี พันธุ์บิ๊กซี พันธุ์โชคดี และพันธุ์บุษบา 2005 ด้วยเทคนิค Ultrathin-layer Isoelectric Focusing (UTLIEF) โดยใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 4 ชนิด คือ น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ไดโซเดียม อีดีทีเอ (Na_2EDTA) และ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร่วมกับการใช้ช่วง pH ของเจล 2 ช่วง ได้แก่ pH 2-11 และ pH 4-5/3-10 รวมเป็น 8 กรรมวิธี พบว่ามีเพียงกรรมวิธีการใช้น้ำสกัดโปรตีนในเมล็ดร่วมกับการใช้ pH ของเจล 2-11 ในการทำ UTLIEF ให้แถบโปรตีนที่ใช้จำแนกพันธุ์ทั้ง 4 พันธุ์ออกจากกันได้ทั้งหมด จึงนำกรรมวิธีไปทดสอบจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์แตงกวาอีก 8 พันธุ์ปลูก พบว่ากรรมวิธีดังกล่าวสามารถจำแนกพันธุ์แตงกวาทั้ง 8 พันธุ์ปลูกออกจากกันได้ 25 คู่พันธุ์จาก 28 คู่พันธุ์ในการเปรียบเทียบทีละคู่พันธุ์ และเมื่อนำวิธีการไปใช้ทดสอบความเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 ของสายพันธุ์แตงกวาลูกผสม 10 สายพันธุ์ พบว่าสามารถแยกความเป็นลูกผสมได้ 8 สายพันธุ์

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Danrongwoot Onwimol 2010: Varietal Identification of Cucumber Using Seed Protein Analysis via Ultrathin Layer Isoelectric Focusing Technique. Master of Science (Agriculture), Major Field: Horticulture, Department of Horticulture. Thesis Advisor: Assistant Professor Thammasak Thongket, Ph.D. 113 pages.

The suitable solvent and gel pH-gradient for varietal identification of cucumber *via* Ultrathin-layer isoelectric focusing (UTLIEF) technique was studied using 4 commercial cultivars of F-1 hybrids namely; Micro C, Big C, Chokedee and Bussaba2005. Four different solvents; water, phosphate buffer, Disodium ethylenediamine tetraacetate (Na_2EDTA) and Sodium chloride (NaCl) and two different gel pH of 2-11 and pH 4-5/3-10 forming 8 treatment combinations were compared. The results demonstrated that only the treatment combination between water as protein extract solvent and gel pH 2-11 gave the protein band markers that could differentiate all four cucumber cultivars from each other. Therefore, this finding protocol was used to identify other 8 commercial cultivars (3 commercial cultivars and 5 cucumber accessions) and found that it could differentiate 25 out of 28 cultivars pairs in pairwise comparison. In hybrid purity test, it could detect F-1 hybrid purity of 8 out of 10 F-1 hybrid lines.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธรรมศักดิ์ ทองเกตุ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ซึ่งกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนความช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เสริมศิริ จันทร์เปรม กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง ที่กรุณาร่วมให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณครอบครัวอ่อนวิมล สำหรับกำลังใจที่ดีที่สุดเสมอมา พร้อมทั้งคอยผลักดันให้ข้าพเจ้าศึกษามาจนถึงวันนี้ และขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน หนังสือทุกเล่ม ที่ได้ให้ความรู้ แนวคิด ตลอดจนคำชี้แนะต่าง ๆ แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่มอบทุนอุดหนุนสำหรับการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ บริษัท ที เอส เอ จำกัด (Thai Seed & Agriculture Co.,Ltd.) ที่อนุเคราะห์เชื้อพันธุ์สำหรับการทำวิจัย และ เจ้าหน้าที่จากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (AG-BIO/PERDO-CHE, Thailand) ทุกท่าน รวมทั้งพี่ เพื่อน และน้อง ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการที่ช่วยเหลือให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมารวมทั้งสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี

ดำรงวุฒิ อ่อนวิมล

พฤษภาคม 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(9)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	30
ผลและวิจารณ์	41
สรุป	83
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	84
ภาคผนวก	93
ภาคผนวก ก ส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้สำหรับทำ UTLIEF	94
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการ Bradford protein assay	98
ภาคผนวก ค ต้นทุนในการทำ UTLIEF	111
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	113

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	วิธีการจำแนกความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดด้วยวิธีการต่าง ๆ	12
2	ตัวอย่างรายชื่อ good carrier ampholyte และ poor carrier ampholyte	26
3	ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวาด้วยน้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์ และ NaCl 5 มิลลิโมลาร์	42
4	จำนวนแถบโปรตีนที่บอกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ และประสิทธิภาพในการจำแนกเมื่อทำการเปรียบเทียบเป็นคู่ ของ 8 กรรมวิธีที่ทดสอบ	55
5	จำนวนแถบโปรตีนที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแตงกวาทั้ง 8 พันธุ์ปลูกทีละคู่	62
6	ลักษณะปรากฏของสายพันธุ์ #01	79

ตารางผนวกที่

1	ปริมาตรของสารละลายที่ใช้เตรียมตัวอย่างสารละลาย BSA โปรตีน เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A595) ด้วยเครื่อง spectrophotometer จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปสร้าง BSA Standard curve	99
2	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดแตงกวาพันธุ์การค้า 4 พันธุ์ โดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์ และ NaCl 5 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวทำละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	101
3	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา สำหรับนำมาทดสอบประสิทธิภาพ 8 พันธุ์ปลูก โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	102
4	ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดแตงกวา 10 สายพันธุ์โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	103

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
5	ผลการคำนวณหาปริมาณโปรตีนรวมของเมล็ดพันธุ์แตงกวาพันธุ์การค้า 4 พันธุ์โดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์ และ NaCl 5 มิลลิโมลาร์ ในการสกัดโปรตีน	105
6	ผลการคำนวณหาปริมาณโปรตีนรวม ของเมล็ดพันธุ์แตงกวาสำหรับนำมาทดสอบประสิทธิภาพ 8 พันธุ์ปลูกโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย	106
7	ผลการคำนวณหาปริมาณโปรตีนรวม ของสายพันธุ์แตงกวาโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย เพื่อนำไปตรวจสอบความเป็นลูกผสม	107
8	ปริมาตรของสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ และปริมาตรน้ำที่ใช้ในการหยดลงในแต่ละหลุมสำหรับการทำ electrophoresis ด้วยวิธี UTLIEF	109

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ชนิดของโปรตีนที่สะสมอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดแตงกวา	16
2	จุดไอโซอิเล็คทริก (isoelectric point) หรือจุดไอโซไอออนิก (isoionic point) ซึ่งมีประจุสุทธิของโปรตีนเท่ากับศูนย์ ค่า pH = pI	19
3	amphotheric molecule :ซึ่งสามารถเก็บและแลกเปลี่ยนประจุได้ เมื่อเข้าสู่ระบบจะเคลื่อนที่เข้าสู่จุด equilibrium (pH = pI) ซึ่งเป็นจุดที่ครึ่งหนึ่งของโมเลกุลทั้งหมดมีประจุสุทธิเป็นศูนย์	25
4	การเคลื่อนที่ของ ampholytes ก่อนและหลังให้กระแสไฟฟ้า ทำให้เกิด pH gradiant บนเจล	27
5	การเคลื่อนที่ของโปรตีนซึ่งเป็น amphoteric compound ไปยังจุดไอโซอิเล็คทริก (isoelectric point, pH = pI)	27
6	ตำแหน่งการวางอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการทำ electrophoresis โดยใช้เครื่อง IEF-SYS® (Scie-Plus)	34
7	ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เป็นลูกผสมอย่างแท้จริง (ลำดับการหยดสารละลายโปรตีนเพื่อการทดสอบความเป็นลูกผสม ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ **F1** คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1)	38
8	ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เกิดจากสายพันธุ์แม่ผสมตัวเอง (ลำดับการหยดสารละลายโปรตีนเพื่อการทดสอบความเป็นลูกผสม ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ **F1** คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1)	38
9	ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ไม่ทราบสายพันธุ์ (ลำดับการหยดสารละลายโปรตีนเพื่อการทดสอบความเป็นลูกผสม ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ **F1** คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1)	39
10	ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์ปลูก (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วยน้ำและทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 2-11 ขวา : แถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ซึ่งพบในแต่ละพันธุ์ ⊕= anode ⊖= cathode	45

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์ปลูก (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 2-11 ขวา : แถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ซึ่งพบในแต่ละพันธุ์ ⊕ = anode ⊖= cathode	46
12	ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์ปลูก (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วย Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์ และทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 2-11 ขวา : แถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ซึ่งพบในแต่ละพันธุ์ ⊕ = anode ⊖= cathode	47
13	ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์ปลูก (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วย NaCl 5 มิลลิโมลาร์ และทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 2-11 ขวา : แถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ซึ่งพบในแต่ละพันธุ์ ⊕ = anode ⊖= cathode	48
14	ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์ปลูก (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วยน้ำ และทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 4-5/3-10 ขวา : แถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ซึ่งพบในแต่ละพันธุ์ ⊕ = anode ⊖ = cathode	50
15	ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์ปลูก (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 4-5/3-10 ขวา : แถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ซึ่งพบในแต่ละพันธุ์ ⊕ = anode ⊖= cathode	51
16	ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์ปลูก (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วย Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์ และทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 4-5/3-10 ขวา : แถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ซึ่งพบในแต่ละพันธุ์ ⊕ = anode ⊖= cathode	52

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์ปลูก (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วย NaCl 5 มิลลิโมลาร์ และทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 4-5/3-10 ขวา : ไม่พบแถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ ⊕= anode ⊖= cathode	53
18	แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวา 8 พันธุ์ปลูก คือพันธุ์ไฉไล ภูฟ้า บิงโก CS017 CS018 CS054 CS059 และ CS091 ด้วยน้ำแล้ว แยกโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างกัน)	60
19	แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #01 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อ)	65
20	แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #02 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อหรือสายพันธุ์แม่)	66
21	แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #03 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์แม่)	67

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #04 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อหรือสายพันธุ์แม่)	70
23	แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #05 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อหรือสายพันธุ์แม่)	71
24	แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #06 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อหรือสายพันธุ์แม่)	72
25	แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #07 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อหรือสายพันธุ์แม่)	73
26	แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #08 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อหรือสายพันธุ์แม่)	75

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

27 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #09 ด้วยน้ำ แล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อ) 76

28 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #10 ด้วยน้ำ แล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 77

29 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #03 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์แล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 5-8/2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อ) 80

30 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #10 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์แล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 5-8/2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์แม่) 81

ภาพผนวกที่

1 Standard curve ของ Bovine Serum Albumin (BSA)โปรตีน ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย BSAโปรตีน ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร 100

2 ปริมาณโปรตีนรวมจากเมล็ดแตงกวาเมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลายทั้ง 10 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ #01 #02 #03 #04 #05 #06 #07 #08 #09 และ #10 109

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AFLP	=	amplified fragment length polymorphism
AOSA	=	Association of Official Seed Analysis
APS	=	ammonium peroxydisulphate
BSA	=	Bovine Serum Albumin
DTE	=	dithioerythritol
EDTA	=	ethylene diamine tetra acetic acid
IEF	=	isoelectric focusing
ISTA	=	International Seed Testing Association
PAGE	=	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PCR	=	polymerase chain reaction
pH	=	logarithm of reciprocal of hydrogen (H^+) ion concentration
pI	=	isoelectric point
RAPDs	=	random amplified polymorphic DNAs
RFLP	=	restriction fragment length polymorphism
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
SSLP	=	simple sequence length polymorphism
STS	=	sequence tagged site
TCA	=	trichloroacetic acid
TEMED	=	N N N' N'- Tetramethylethylenediamine
UTLIEF	=	Ultrathin-layer isoelectric focusing

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การจำแนกสายพันธุ์แตงกวาโดยการวิเคราะห์โปรตีนในเมล็ดด้วยเทคนิค Ultrathin Layer Isoelectric Focusing

Varietal Identification of Cucumber Using Seed Protein Analysis via Ultrathin Layer Isoelectric Focusing Technique

คำนำ

ธุรกิจการผลิตเมล็ดพันธุ์เป็นอีกภาคส่วนที่สร้างมูลค่าให้กับเศรษฐกิจของประเทศเป็นจำนวนหลายพันล้านบาทต่อปี ปัจจุบันธุรกิจการผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกมีแนวโน้มเติบโตเพิ่มมากขึ้น ในปี พ.ศ. 2550 ส่งออกจำนวน 14,836.21 ตัน มูลค่าราว 1,895.21 ล้านบาท โดยเฉพาะเมล็ดพันธุ์แตงกวาที่มีการส่งออกราว 59.48 ตัน มูลค่าการส่งออก 162.03 ล้านบาท คิดเป็นร้อยละ 8.55 ของมูลค่าการส่งออก ซึ่งส่วนใหญ่ส่งออกไปยังประเทศอินเดีย (สำนักควบคุมพืชและวัสดุเกษตร, 2551) จะเห็นได้ว่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์แตงกวามีปริมาณน้อยแต่มูลค่าต่อน้ำหนักสูงเพราะส่วนใหญ่เป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสม เมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสมชั่วที่ 1 มีข้อเด่นที่ให้ผลผลิตต่อไร่สูงทั้งผลผลิตที่ได้ยังมีคุณภาพดี รวมไปถึงความสามารถในการต้านทานต่อโรคและแมลงได้ดีเหนือกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ (heterosis effect) ดังนั้นเมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสมชั่วที่ 1 จึงเป็นที่ต้องการของตลาดอย่างมากและมีการใช้เพิ่มมากขึ้น แม้ว่าราคาของเมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสมจะมีราคาสูง แต่เกษตรกรมีความต้องการที่จะใช้เมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสมชั่วที่ 1 มากกว่าลูกผสมเปิด เนื่องจากทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพต่อไร่สูงขึ้น ส่งผลให้เกษตรกรมีรายได้สูงขึ้น ดังนั้นเพื่อเป็นการสร้างความเชื่อมั่นให้กับผู้ใช้เมล็ดพันธุ์ ผู้ผลิตจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ และความเป็นลูกผสมซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของเมล็ดพันธุ์ เพื่อเป็นการยืนยันและสร้างความเชื่อมั่นต่อเกษตรกรว่าเมล็ดพันธุ์ที่ได้มีคุณภาพดีและตรงตามพันธุ์อย่างแท้จริง ด้วยเหตุผลดังกล่าวส่งผลให้การตรวจสอบความบริสุทธิ์และความตรงต่อสายพันธุ์ทวีความสำคัญมากขึ้น ข้อดีของการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมและความเป็นลูกผสมคือ เกษตรกรผู้เพาะปลูกได้เมล็ดที่ตรงตามสายพันธุ์ ขณะที่บริษัทเจ้าของพันธุ์ใช้เป็นหลักฐานสำหรับซื้อคืนเมล็ดพันธุ์จากเกษตรกรลูกไร่ (วันชัย, 2542)

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์มีหลายวิธี เช่น การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาเป็นการตรวจสอบทางด้าน สี ขนาด รูปร่างของเมล็ดพันธุ์ หรือตรวจสอบลักษณะของต้นกล้า โดย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใช้วิธี grow-out test หรือ field test ซึ่งการตรวจสอบด้วยวิธีนี้จะต้องนำเมล็ดไปทดลองปลูกในแปลง ทำให้ต้องใช้เวลานานและใช้พื้นที่ค่อนข้างมากในการตรวจสอบ ในบางครั้งให้ผลไม่แม่นยำ เพราะมีสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง (Arus, 1983; McDonald, 1998) สำหรับการตรวจสอบทางชีววิทยาโมเลกุล เป็นการตรวจสอบในระดับ DNA ที่ใช้เวลาในการตรวจสอบเร็วกว่าวิธีการแรก และมีความแม่นยำสูง สามารถตรวจสอบได้ทุกส่วนของพืชแต่มีข้อด้อยคือค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบสูง และวิธีการสกัด DNA ยังยุ่งยากไม่คุ้มค่าที่จะนำมาใช้ในลักษณะของงานประจำ (ธรรมศักดิ์ และ เสริมศิริ, 2549) ส่วนการตรวจสอบทางชีวเคมีในระดับเอนไซม์ มีความยุ่งยากในการเตรียมตัวอย่างของเอนไซม์ และแต่ละระยะของการเจริญเติบโตพืชจะผลิตเอนไซม์ที่แตกต่างกันออกไป

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคเพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์โดยใช้การแยกความแตกต่างของโปรตีนที่สะสมในเมล็ด (seed storage protein) ด้วยเทคนิค ultrathin layer isoelectric focusing (UTLIEF) เทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการแยกชนิดของโปรตีนสูง สามารถแยกโปรตีนที่มีค่า isoelectric point ที่ต่างกันเพียงเล็กน้อยได้ดี ข้อดีของเทคนิคนี้คือ ใช้เวลาในการตรวจสอบน้อย อีกทั้งยังง่ายต่อการปรับเปลี่ยนค่า pH gradients ของเจลให้เหมาะสมสำหรับโปรตีนในพืชแต่ละชนิด และเจลที่ใช้ในการทำ electrophoresis มีความบางมาก จัดเป็นแบบ ultrathin layer ซึ่งนอกจากจะทำให้มีต้นทุนในการตรวจสอบถูกกว่าวิธีอื่น ๆ แล้วยังสามารถทำให้เจลแห้งและเก็บรักษาเจลจริงในรูปของเอกสารได้เป็นเวลานาน ที่สำคัญคือโปรตีนที่ใช้ในการตรวจสอบ เป็นโปรตีนที่พืชสะสมไว้ในเมล็ดซึ่งมีความคงตัวสูง มีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากสภาพแวดล้อมและระยะการเจริญเติบโตน้อยกว่าโปรตีนทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ (Van den Berg, 1990, 1991) จึงทำให้เทคนิคนี้มีความถูกต้องแม่นยำสูงกว่า

เทคนิค UTLIEF ถูกนำไปใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมและพิสูจน์ความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์พืชชนิดต่าง ๆ มากมาย เช่น ข้าวไรย์ (Nakamura, 1979) พืชวงศ์หญ้า (Spoor and Hay, 1979) ข้าวโอต (Gavriljuk *et al*., 1984) ข้าวบาร์เรย์ (Chauhan *et al*., 1985) ถั่วเหลือง (Chauhan *et al*., 1985) แอปเปิ้ล (Berger *et al*., 1985) ข้าวสาลี (Van De Weghe, 1991) พริกไทย (Lucchese *et al*., 1999) มะเขือเทศ (Wang *et al*., 2000) ข้าว (Yan *et al*., 2006) ฯลฯ นอกจากนี้เทคนิคนี้ได้รับการยอมรับจาก International Seed Testing Association (ISTA) ให้เป็นเทคนิคมาตรฐานในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุ์กรรมของพืช 2 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพดไร่ และทานตะวัน (ISTA, 2007) แต่ยังขาดข้อมูลในอีกหลาย ๆ พืช

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หลักการทำงานของ UTLIEF นั้นเป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนแต่ละชนิดออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของโปรตีนที่เคลื่อนที่บน pH gradient ซึ่งสร้างขึ้นจาก carrier ampholytes ในสนามไฟฟ้า โปรตีนแต่ละชนิดมีจุด isoionic point (pI) หรือจุดที่มีประจุสุทธิเป็นศูนย์เฉพาะตัว เมื่อโปรตีนแต่ละโมเลกุลเคลื่อนที่ผ่าน pH gradient จะสูญเสียประจุสุทธิไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งประจุสุทธิเป็นศูนย์ที่ตำแหน่งนี้โปรตีนจะหยุดการเคลื่อนที่และรวมตัวกันเป็นแถบเข้มข้น ซึ่งแถบโปรตีนดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ได้ (Cooke, 1995; Noli, 2004) แต่การที่จะนำเทคนิคนี้ไปใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชชนิดใด ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพและแม่นยำ จำเป็นต้องทราบปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการตรวจสอบด้วยเทคนิคนี้ เช่น ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีนและช่วงค่า pH gradient ของเจลเสียก่อน แม้แตงกวาจะเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและนิยมบริโภคกันแพร่หลาย แต่ปัจจุบันยังไม่พบรายงานการใช้เทคนิคดังกล่าวกับแตงกวา ด้วยเหตุนี้จึงสนใจศึกษาการนำเทคนิค UTLIEF มาประยุกต์ใช้กับแตงกวา

การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงทดลองใช้เทคนิค UTLIEF จำแนกสายพันธุ์และตรวจพิสูจน์ความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์แตงกวา โดยเน้นศึกษาปัจจัยหลักสองปัจจัยที่มีผลต่อการตรวจสอบด้วยเทคนิคดังกล่าวได้แก่ ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีนและช่วงค่า pH gradient ของเจล เพื่อให้ทราบถึงศักยภาพและความเหมาะสมสำหรับการที่จะพัฒนาเทคนิคดังกล่าวเพื่อใช้ในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์แตงกวา ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในด้านการลดต้นทุนและระยะเวลาในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม (genetic purity test) และความเป็นลูกผสม (hybrids test) ของเมล็ดพันธุ์แตงกวา สำหรับธุรกิจการผลิตเมล็ดพันธุ์และเกษตรกรโดยทั่วไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

ศึกษาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีนและช่วงค่า pH gradient ของเจล ที่เหมาะสม เพื่อให้ทราบปัจจัยที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการจำแนกพันธุ์แตงกวา และตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์แตงกวา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. แตงกวา (Cucumber)

จัดอยู่ในวงศ์ (Family) Cucurbitaceae มีจำนวนโครโมโซม 2n=14 เป็นพืชผสมข้ามโดยธรรมชาติ (cross pollinated crop) (จานุลักษณ์, 2535)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาผล

แตงกวาเป็นพืชที่การแสดงออกของเพศหลากหลาย ขึ้นกับทั้งพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม สามารถแบ่งการแสดงของเพศออกเป็นประเภทต่าง ๆ ได้เป็น 7 ประเภทดังนี้ (George, 1999)

1. hermaphroditic คือลักษณะต้นที่มีดอกสมบูรณ์เพศทั้งหมด
2. monoecious คือลักษณะต้นที่มีดอกเพศผู้และเพศเมียอยู่บนต้นเดียวกัน
3. gynomonoecious คือลักษณะต้นที่มีดอกสมบูรณ์เพศและดอกเพศเมียอยู่บนต้นเดียวกัน
4. andromonoecious คือลักษณะต้นที่มีดอกสมบูรณ์เพศและดอกเพศผู้อยู่บนต้นเดียวกัน
5. trimonoecious คือลักษณะต้นที่มีดอกสมบูรณ์เพศ ดอกเพศผู้ และดอกเพศเมียอยู่บนต้นเดียวกัน
6. androecious คือลักษณะต้นที่มีดอกเพศผู้ทั้งหมด
7. gynoecious คือลักษณะต้นที่มีดอกเพศเมียทั้งหมด

การแสดงเพศของแตงกวาตามธรรมชาติมักมี 3 ระยะ ในระยะแรกดอกที่เกิดจะเป็นดอกเพศผู้ทั้งหมด จากนั้นจะมีการแสดงดอกเพศผู้สลับดอกเพศเมีย และในช่วงท้ายของการพัฒนาจะแสดงเฉพาะดอกเพศเมียซึ่งมักจะเกิดในกิ่งแขนง ในปัจจุบันแตงกวาได้รับการพัฒนาโดยเฉพาะลักษณะการแสดงออกของเพศเมีย (gynoecious) มากขึ้น ปัจจุบันพันธุ์การค้าและสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมมักมีลักษณะการแสดงเพศของดอกเพศเมีย เพราะให้ผลผลิตสูง การแสดงเพศของดอกเพศเมียแบ่งออกเป็น 4 ชนิด (สมศักดิ์, 2535) คือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. Gynoecious main vine type คือ แสดงดอกเพศเมียและติดผลเฉพาะกิ่งหลัก

2. Gynoecious main and lateral vine type คือ แสดงดอกเพศเมียและติดผลเฉพาะในกิ่งหลัก และกิ่งแขนง โดยแตกกิ่งในตำแหน่งที่ติดผลในกิ่งหลัก

3. Quasi-gynoecious main and lateral vine type คือ แสดงดอกเพศเมียและติดผลได้ในกิ่งหลักและกิ่งแขนง ซึ่งกิ่งแขนงสามารถเจริญเติบโตได้จากทุกตำแหน่งบนกิ่งหลัก

4. Quasi-gynoecious lateral vine type คือ แสดงดอกเพศเมียและติดผลได้เฉพาะในกิ่งแขนงเท่านั้น

หลังการถ่ายละอองเกสรและเกิดการปฏิสนธิ กลีบเลี้ยงและกลีบดอกจะร่วงภายใน 2 วัน จากนั้นผลจะเจริญต่อโดยมีการเพิ่มขนาดทั้งความกว้างและความยาว ผลอ่อนที่เก็บเกี่ยวได้จะมีขนาดกว้าง 2-4 เซนติเมตร ยาว 8-10 เซนติเมตรขึ้นกับพันธุ์ของแตงกวา เปลือกมีสีเขียวเข้มตรงขั้วผลและมีสีเขียวอ่อนเป็นทางตลอดความยาวผล (Robinson, 1997) ผลอ่อนของแตงกวาที่ปลูกในเมืองไทยมักมีหนามสีดำ ขณะที่พันธุ์ในเขตหนาวมีสีขาว

สุเทวี (2522) จำแนกแตงกวาโดยลักษณะการบริโภคออกเป็น 2 ชนิดคือ

1. พวกที่ใช้รับประทานสด เป็นพันธุ์ที่มีเนื้อบาง ไส้ใหญ่ สีเปลือกไม่เขียวเข้ม ได้แก่ แตงกวาที่นิยมปลูกในประเทศไทย

2. พวกที่ใช้ดอง เป็นพันธุ์ที่มีเนื้อหนา ไส้เล็ก บางพันธุ์ไม่มีไส้เลย เปลือกสีเขียวเข้ม เมื่อนำไปดองจะคงรูป ไม่เหี่ยว

การผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมแตงกวา

แตงกวาเป็นพืชผสมข้ามโดยธรรมชาติ ส่งผลให้ลูกผสมชั่วที่ 1 แตงกวามีความดีเด่นเหนือพ่อแม่ในหลาย ๆ ลักษณะ (สมเกียรติ, 2527; สมศักดิ์, 2535; เอนก, 2529) จานุลักษณ์ (2528) อธิบายว่าปรากฏการณ์ดังกล่าวอาจเกิดจาก 2 ทฤษฎีหลัก ได้แก่ ทฤษฎีการข่ม (dominance theory) ที่อธิบายว่าลูกผสมจะมี gene ด้อยที่อยู่ในสภาพ homozygous น้อยกว่าพ่อแม่ จึงทำให้ลูกผสมดีเด่นกว่าพ่อแม่เนื่องจากมีลักษณะ dominance มากกว่า และ ทฤษฎีการข่มเกิน (over dominance theory)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ว่าความดีเด่นเหนือพ่อแม่เกิดจากการรวมตัวของ gene ที่มีความแตกต่างกันมากเข้ามาอยู่รวมกันในสภาพ heterozygous โดย gene แต่ละคู่จะสนับสนุนซึ่งกันและกัน ส่งผลให้ลักษณะเด่นซึ่งเป็นผลรวมของ gene เหล่านั้นแสดงออกเหนือพ่อแม่ เหตุดังกล่าวจึงเหมาะที่จะผลิตแตงกวาเป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (F1 hybrid) พันธุ์แตงกวาที่เกษตรกรนิยมปลูกเพื่อนำไปจำหน่ายสำหรับรับประทานผลสดมักเป็นพันธุ์ที่มีการแสดงออกของเพศเมียมากเพราะให้ผลผลผิตสูง รสชาติไม่ขม รวมทั้งมีลักษณะต้านทานอื่น ๆ ที่ทำให้เกษตรกรผู้ปลูกสามารถใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำที่สุดและขายผลผลิตได้กำไรมากที่สุด การปรับปรุงพันธุ์ให้ได้พันธุ์ที่มีลักษณะซึ่งเป็นที่ต้องการเหล่านี้เป็นภาระของนักปรับปรุงพันธุ์ที่ต้องปรับปรุงพันธุ์ให้ทันกับความต้องการที่เปลี่ยนแปลงอยู่เสมอของเกษตรกร ปัจจุบันโครงการ Cucumber Genome Initiative (CuGI) ซึ่งเป็นโครงการวิจัยที่เกิดจากการร่วมมือกัน 4 ประเทศ ได้แก่ จีน ออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา และ เนเธอร์แลนด์ โครงการวิจัยดังกล่าวได้พยายามศึกษาวิจัยและรวบรวมข้อมูลจีโนม (genome) แตงกวาจนประสบผลสำเร็จ ผลการศึกษาของโครงการดังกล่าวเป็นประโยชน์อย่างมากสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจากให้ข้อมูลเชิงลึกของ gene ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกทางเพศของแตงกวา การต้านทานโรค วิวัฒนาการ และสายธารชีวสังเคราะห์ (biosynthetic pathways) โดยที่ข้อมูลดังกล่าวสามารถใช้ประโยชน์ได้ผ่านทางเว็บไซต์ Cucurbit Genomics Database (Huang *et al*., 2009)

การผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมแตงกวาโดยทั่วไปสำหรับประเทศไทยมักส่งเสริมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากมีอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่เหมาะสมในระหว่างเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม ซึ่งเป็นช่วงผสมเกสร หลังจากเกษตรกรลูกไร่ (contract farmer) ได้รับเมล็ดพันธุ์ขยาย (registered seed) จากนักปรับปรุงพันธุ์ จะเริ่มทำการผลิตเมล็ดพันธุ์จำหน่าย (certified seed) โดยการเพาะกล้าซึ่งมักกระทำช่วงต้นเดือนพฤศจิกายน ทำการย้ายปลูกเมื่อต้นกล้าอายุ 15 วัน หลังจากย้ายปลูกประมาณ 25 วันจึงผสมเกสร และเก็บเกี่ยวผลในช่วงต้นเดือนกุมภาพันธ์ถึงปลายเดือนมีนาคม ระยะเวลาปฏิบัติงานประมาณ 100-110 วัน (จานุลักษณ์, 2535)

การผลิตเมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสมแตกต่างจากการผลิตเมล็ดพันธุ์ผสมปล่อยพอสมควร เมล็ดพันธุ์ผสมปล่อยนิยมผลิตโดยใช้วิธีเดียวกับการปลูกเพื่อผลิตผลสดที่ไม่ขึ้นค้างและปล่อยให้ผสมเกสรเองตามธรรมชาติ ขณะที่ขั้นตอนการผลิตเมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสมนิยมปลูกแบบขึ้นค้าง

ขั้นตอนการเตรียมกล้าควรให้อัตราส่วนของต้นพ่อต่อต้นแม่ เท่ากับ 1:6 โดยทำการเพาะกล้า ต้นพ่อก่อน 7-10 วัน เพราะดอกเพศผู้มักบานก่อนดอกเพศเมีย ระยะห่างที่เหมาะสมสำหรับการแยกปลูก (isolation) ควรปลูกให้ห่างกันอย่างน้อย 400 เมตรขึ้นไป สำหรับเมล็ดพันธุ์ขยาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(registered seed) (จานุลักษณ์, 2535) ระยะห่างระหว่างหลุม 40 เซนติเมตร ระยะห่างระหว่างแถว 70 เซนติเมตร หลังย้ายปลูกประมาณ 25 วันจะเป็นระยะเริ่มผสมเกสร ก่อนการผสมเกสรควรเตรียมเกสรเพศเมียโดยคลุมดอกเพศเมียตั้งแต่ข้อที่ 5 ขึ้นไป โดยเลือกดอกที่กำลังจะบานในวันรุ่งขึ้น สังเกตได้จากดอกตูมที่มีกลีบสีเหลืองอ่อน การคลุมดอกอาจใช้ลวดอะลูมิเนียมรัดกลีบดอกหรือใช้ถุงกระดาษสีคลุมเพื่อไม่ให้ดอกบานก่อนได้รับการผสม หลังจากนั้นทำเครื่องหมายเพื่อให้สังเกตตำแหน่งดอกที่จะผสมเกสรได้ง่าย ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผสมเกสรคือระหว่าง 7.00-11.00 นาฬิกา อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 15-27 องศาเซลเซียส ผสมโดยนำดอกเพศผู้จากต้นพ่อฉีกกลีบออกให้เหลือเฉพาะอับละอองเกสรเพศผู้และก้านชูดอก หลังจากนั้นถอดลวดที่รัดกลีบดอกเพศเมียออก แตะอับละอองเกสรเพศผู้ลงบนยอดเกสรเพศเมีย โดยใช้อัตราส่วนดอกเพศผู้ต่อดอกเพศเมีย 1:1 หรือ 1:2 (George, 1999)

ระยะเวลาในการผสมเกสรจะปฏิบัติประมาณ 7-10 วัน ผสม 6-10 ดอกต่อต้น หลังจากติดผลแล้วเลือกผลที่สมบูรณ์ไว้ 6-8 ผลต่อต้น เริ่มไว้ผลตั้งแต่กิ่งแขนงในข้อที่ 5-10 โดยปล่อยให้ติดผล 1-2 ผลต่อกิ่งแขนง ไว้ใบ 1-2 ใบต่อกิ่งระหว่างข้อที่ 11-25 ตัดยอดออกตั้งแต่ข้อที่ 25 โดยทั่วไประยะแก่ของเมล็ดแตงกวา (physiological maturity) อยู่ที่ประมาณ 21 วันหลังผสมติด จึงเริ่มเก็บเกี่ยวเมื่อสีผลเปลี่ยนเป็นสีเหลืองที่ 28-30 วันหลังจากผสมติด หลังทำการเก็บเกี่ยวนำมาบ่มในร่ม 5-7 วัน จากนั้นนำเมล็ดไปหมัก 24-48 ชั่วโมง จากนั้นทำความสะอาดเพื่อเตรียมเข้าสู่ขั้นตอนการปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์ต่อไป (George, 1999; Robinson, 1999)

การตรวจสอบต้นที่มีลักษณะผิดปกติ ทั้งในต้นพ่อและต้นแม่พันธุ์ กำหนดให้พันธุ์ปน (off type) ในแปลงปลูกเมล็ดพันธุ์หลัก (foundation seed) ซึ่งยอมให้มีได้ 1 ต้นจากจำนวนต้นที่ปลูก 500 ต้น (0.2 เปอร์เซ็นต์) และ 1 ต้นจากจำนวนต้นที่ปลูก 250 ต้น (0.4 เปอร์เซ็นต์) สำหรับแปลงปลูกพันธุ์ขยายและพันธุ์จำหน่าย สามารถทำได้ 4 ระยะ (จานุลักษณ์, 2535) คือ

ระยะก่อนการย้ายปลูก สังเกตได้จากใบ สีใบ และลักษณะการเจริญเติบโตเป็นต้น

ระยะก่อนการผสมเกสร สังเกตจากสีดอก ลักษณะการแสดงออกของเพศ ลักษณะสีผลและสีหนาม

ระยะผสมเกสร สังเกตสีผล ลักษณะผลและหนามเป็นต้น

ระยะก่อนการเก็บเกี่ยว สังเกตลักษณะผล สีผล และลักษณะตาข่าย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเท็จจริงที่ว่าประเทศไทยมีศักยภาพในการแข่งขัน และความเป็นเจ้าของพันธุ์ซึ่งมีฐานการวิจัยและพัฒนาที่เข้มแข็งอยู่แล้ว ทำให้ทั้งภาครัฐและเอกชนตระหนักถึงความสำคัญและกำลังร่วมมือกันจัดทำแผนยุทธศาสตร์ด้านการวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมเมล็ดพันธุ์ โดยมีเป้าหมายให้ประเทศไทยเปลี่ยนบทบาทจากการรับจ้างผลิตเมล็ดพันธุ์มาเป็นผู้พัฒนาพันธุ์และส่งออกแทน (ประกาย, 2550ก) ธุรกิจการส่งออกเมล็ดพันธุ์แตงกวาที่ผลิตเพื่อการส่งออกมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะเมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสมชั่วที่ 1 โดยเฉลี่ยแล้วในแต่ละปีสามารถสร้างรายได้ให้กับผู้ประกอบกิจการเป็นจำนวนหลายล้านบาท เนื่องจากเมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสมชั่วที่ 1 ให้ผลผลิตที่มีคุณภาพต่อไร่สูงกว่าเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเปิด ขณะที่ใช้ปัจจัยการผลิตไม่ต่างกัน ส่งผลให้เกษตรกรมีรายได้สูงขึ้น ดังนั้นก่อนที่ผู้ผลิตจะทำการจำหน่ายหรือส่งออกเมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสมชั่วที่ 1 ผลผลิตที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องผ่านระบบการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่เรียกว่าการตรวจสอบความเป็นลูกผสมหรือความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม ให้ผ่านมาตรฐานที่กำหนดไว้ เพื่อเป็นการยืนยันและสร้างความเชื่อมั่นต่อเกษตรกรผู้ใช้เมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 ว่าเมล็ดพันธุ์ที่ผลิตได้นั้นมีคุณภาพดีและเป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมที่แท้จริงตรงตามพันธุ์ที่ต้องการ (ประกาย, 2550ข) ขณะที่บริษัทเจ้าของพันธุ์ใช้เป็นหลักฐานสำหรับซื้อเมล็ดพันธุ์จำหน่าย (certified seed) คืนจากเกษตรกรลูกไร่

2. การตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (seed testing)

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ เป็นการตรวจสอบเพื่อให้ทราบว่าเมล็ดพันธุ์มีคุณภาพดีมากน้อยเพียงใด อันจะเป็นข้อมูลเพื่อใช้สำหรับการควบคุมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล เพื่อควบคุมการนำเข้าและส่งออก ตลอดไปจนถึงการกำหนดมาตรฐานและกฎเกณฑ์ต่าง ๆ ของคู่ค้า

การตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์นั้น นิยมใช้กฎของการตรวจสอบคุณภาพที่ใช้กันอยู่ 2 หน่วยงานคือ กฎของการตรวจสอบคุณภาพที่บัญญัติขึ้นโดย International Seed Testing Association (ISTA) สำนักงานใหญ่ตั้งอยู่ที่ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ และกฎบัญญัติขึ้นโดย Association of Official Seed Analysts (AOSA) ตั้งอยู่ในสหรัฐอเมริกา กฎของการตรวจสอบคุณภาพที่บัญญัติขึ้นโดยสถาบันทั้งสองแห่งนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างกันในรายละเอียดและขั้นตอนในการปฏิบัติงานบางประการ ในการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์นั้นจะปฏิบัติตามกฎของสถาบันหนึ่งสถาบันใดก็ได้ ขึ้นอยู่กับความประสงค์ของผู้ปฏิบัติงาน แต่โดยทั่วไปในประเทศแถบยุโรป เอเชียและละตินอเมริกา เช่น เนเธอร์แลนด์ บราซิล ฟิลิปปินส์ อินเดีย เหล่านี้เป็นต้น มัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นิยมใช้กฎของ ISTA ซึ่งใช้กันมาก สำหรับประเทศอเมริกาและแคนนาดานั้นใช้กฎของ AOSA สำหรับการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่ปฏิบัติกันอยู่ในห้องปฏิบัติการตรวจสอบคุณภาพของภาครัฐและเอกชนของประเทศไทยขณะนี้ส่วนใหญ่ยึดตามกฎของ ISTA เป็นหลัก (จวงจันทร์, 2529)

3. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรม

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์มีวัตถุประสงค์เพื่อการรับรองเมล็ดพันธุ์ คือตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ในล๊อตว่ามีความบริสุทธิ์มากน้อยเพียงใด มีพันธุ์ปนหรือไม่ ในบางกรณีการตรวจสอบอาจเพื่อยืนยันว่าพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์นั้นเป็นพันธุ์ใหม่ที่แท้จริง ไม่ใช่พันธุ์เดิมที่เคยมีอยู่แล้ว หรือมีพันธุกรรมซ้ำกับพันธุ์ที่มีอยู่ ซึ่งการตรวจสอบพันธุ์ในบริบทนี้นับวันจะยิ่งทวีความสำคัญมากขึ้นเพราะสามารถรองรับกฎหมายคุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ. 2542 หมวดที่ 3 การคุ้มครองพันธุ์พืชใหม่ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในมาตรา 15 และมาตรา 19 ในเรื่องของการขอจดทะเบียนพันธุ์พืชใหม่ให้เป็นไปตามหลักเกณฑ์และวิธีการที่กำหนดในกฎกระทรวง ซึ่งจำเป็นต้องมีรายละเอียดแสดงที่มาของพันธุ์ใหม่และการตรวจสอบพันธุ์ (สำนักคุ้มครองพันธุ์พืช แห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2542)

ในอุตสาหกรรมผลิตเมล็ดพันธุ์ การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์จำเป็นต้องกระทำให้เป็นไปตามความประสงค์ของคู่ค้า แม้ว่าสาเหตุหลักที่บริษัทคู่ค้าหรือผู้ซื้อไม่รับซื้อเมล็ด ส่วนใหญ่เป็นเพราะเมล็ดล๊อตนั้นมีคุณภาพต่ำ อาทิ อัตราการงอกต่ำ และงอกไม่สม่ำเสมอก็ตาม กระนั้นความตรงต่อสายพันธุ์ก็ยังเป็นเหตุผลแรกสุดที่บริษัทคู่ค้าหรือผู้ใช้เมล็ดพันธุ์เพื่อผลิตพืชใช้พิจารณาในการสั่งหรือเลือกซื้อเมล็ดล๊อตนั้น ๆ จากผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์ จึงเป็นธุรกรรมที่เปล่าประโยชน์หากเมล็ดพันธุ์ที่ซื้อมีอัตราการงอกที่สูงและงอกได้อย่างสม่ำเสมอแต่ลักษณะทางพันธุกรรมไม่ตรงตามสายพันธุ์ที่ต้องการและไม่เป็นที่ต้องการของตลาด (ณัฏยา และคณะ, 2546) ด้วยเหตุนี้การตรวจสอบพันธุ์หรือการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์จะกระทำในระหว่างรอการปรับปรุงสภาพเมล็ดพันธุ์โดยการสุ่มตัวอย่างตามหลักวิชาการให้ได้ตัวแทนที่ดีนำมาวิเคราะห์ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ เมื่อตรวจสอบว่าผ่านมาตรฐานที่กำหนดจึงจะนำเมล็ดล๊อตนั้น ๆ ไปปรับปรุงสภาพต่อไป การนำเมล็ดเข้าปรับปรุงสภาพทั้ง ๆ ยังไม่ทราบผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์นั้นเสี่ยงต่อการสูญเสียทรัพยากร เวลา แรงงาน และค่าเสื่อมราคาของเครื่องจักรของบริษัทไปโดยเปล่าประโยชน์ อีกทั้งการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ระหว่างรอการปรับปรุงสภาพเมล็ดเป็นไปได้ยาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เนื่องจากเมล็ดอยู่ในสภาพแวดล้อมเปิด ดังนั้นในการทำงานควรใช้เวลาในช่วงนี้ให้น้อยที่สุด เพื่อไม่ให้เมล็ดเสื่อมสภาพลงไปกว่าที่เป็นอยู่ การเลือกวิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์จึงควรคำนึงถึงข้อพิจารณาที่ว่า วิธีการที่จะเลือกใช้นั้นมีประสิทธิภาพสูง แม่นยำ ประหยัดค่าใช้จ่าย และรวดเร็วมากน้อยเพียงไร (วันชัย, 2542)

วิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์แตงกวาที่นิยมใช้โดยทั่วไป ได้แก่วิธีการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานและลักษณะทางพืชสวน (morphological and horticultural characteristics) ซึ่งต้องนำเมล็ดมาปลูกเพื่อสังเกตลักษณะต่าง ๆ ระหว่างการเจริญเติบโตบางครั้งต้องตรวจสอบจนถึงระยะที่พืชแก่ อีกทั้งการปลูกทดสอบต้องปลูกให้มีประชากรมากพอ ส่งผลให้มีค่าใช้จ่าย แรงงานและพื้นที่มาก นอกจากนี้ในหลาย ๆ กรณีผลการตรวจสอบที่ได้กลับมีความแม่นยำน้อย เพราะการแสดงออกของพืชแปรปรวนไปตามสภาพแวดล้อม ปัจจุบันการผลิตพันธุ์พืชแต่ละชนิดมีจำนวนพันธุ์เพิ่มมากขึ้น วิธีการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานจึงปฏิบัติกันน้อยลง เว้นเสียแต่ต้องการยืนยันผลกับวิธีการอื่น หรือพันธุ์ที่นำมาตรวจสอบไม่มีทางเลือกอื่นนอกจากต้องตรวจสอบด้วยวิธีนี้เท่านั้น ดังนั้นการค้นคว้าวิจัยเพื่อหาวิธีการที่รวดเร็ว มีประสิทธิผลและไม่แพงจนเกินไปนั้นจึงได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะวิธีทางชีวเคมี (biochemical marker) และเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) (นุชจรี และคณะ, 2550)

วันชัย (2542) จำแนกวิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมและการจำแนกพันธุ์วิธีต่าง ๆ ที่ได้มีผู้ศึกษาวิจัยไว้ ดังแสดงในตารางที่ 1 วิธีการในตารางนี้ส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้เพียงวิธีเดียวในการแยกพันธุ์ได้อย่างเบ็ดเสร็จ การจำแนกพันธุ์ที่ดีต้องใช้หลายวิธีประกอบการตัดสินใจ สามารถแบ่งรูปแบบการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ออกเป็น 4 แนวทางด้วยกัน คือ 1. การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา (morphological methods) อาทิ การจำแนกตามรูปร่างและขนาดของเมล็ดพันธุ์ และตามลักษณะสัณฐานของต้นกล้าเป็นต้น 2. การตรวจสอบทางสรีรวิทยา (physiological methods) อาทิ การจำแนกตามความสามารถในการดูดน้ำของเมล็ด การตอบสนองต่อฮอร์โมน และความอ่อนแอต่อสารเคมีกำจัดวัชพืชเป็นต้น 3. วิธีทางโรคพืช (pathological methods) อาทิ จำแนกตามความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และแมลงเป็นต้น 4. วิธีทางเคมี (chemical composition methods) อาทิ การจำแนกโดยอาศัยสารประกอบบางประเภท (กรดไขมัน สารประกอบฟีโนลิกส์ เป็นต้น) และการจำแนกโดยวิธีทางอิเล็กโทรโฟลิซิส (โปรตีนและดีเอ็นเอ เป็นต้น)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 วิธีการจำแนกความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดด้วยวิธีการต่าง ๆ

categories	methods
morphological	shape or size (geometry or weight), seed coat characteristics, pubescence of seedling, pigmentation, fruit colors
physiological	germination vigor, swelling capacity, response to phytohormones, sensitivity to herbicides, phenol test, fluorescence, seed coat peroxidase activity
pathological	resistance to fungal infection, resistance to bacterial, viral or insect infection
chemical composition	gas-liquid chromatography thin layer chromatography electrophoresis of general seed storage proteins isozymes in seeds leaf isozymes DNA marker restriction fragment length polymorphism using DNA into chloroplast and mitochondria using DNA into nucleus

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

categories	methods
chemical composition	polymerase chain reaction techniques
	specific primer
	sequence-tagged site
	simple sequence length polymorphism
	random primer
	amplified fragment length polymorphism
	random amplified polymorphic DNAs

ที่มา: วันชัย (2542)

วิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์ที่นิยมกระทำกันโดยทั่วไปสำหรับธุรกิจเมล็ดพันธุ์แบ่งออกเป็น 3 วิธี ได้แก่ การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา การตรวจสอบทางชีววิทยาโมเลกุล และการตรวจสอบทางด้านชีวเคมี เป็นต้น

3.1 การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา (morphological marker)

การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาเป็นการตรวจสอบที่ต้องนำตัวอย่างของเมล็ดพืชไปทดลองปลูกเรียกว่า grow out test ซึ่งเป็นวิธีการที่อาศัยหลักการตรวจสอบจากลักษณะภายนอกที่ปรากฏในระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตของพืช เช่น ลักษณะของต้นกล้า ใบ ดอก ผล การตรวจสอบด้วยวิธีนี้จำเป็นต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์และมีความชำนาญสูงในการสังเกตผลและต้องใช้เวลาหลายเดือน เสียค่าใช้จ่ายและแรงงานในการดำเนินงานสูงอีกทั้งขาดความถูกต้องแม่นยำเนื่องจากลักษณะภายนอกของพืชที่ใช้สังเกตไม่ใช่ผลจากพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว หากเป็นผลร่วมจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมกับสภาพแวดล้อมที่พืชขึ้นอยู่ (Arus, 1983; McDonald, 1998) นอกจากนี้ลักษณะทางสัณฐานบางประการ เช่น ลักษณะของต้น สี การเจริญของต้นและมือพัน (tendril) ไม่สามารถนำมาจัดจำแนกแตงกวาบางสายพันธุ์ออกจากกันได้ (อรพรรณ, 2548)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 การตรวจสอบทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular markers) (อภิชาติ, ม.ป.ป.)

การตรวจสอบทางชีววิทยาโมเลกุลเป็นการใช้ดีเอ็นเอมาเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบถึงความแตกต่างในระดับของ gene หรือดีเอ็นเอในพืชที่ทำการศึกษา ตัวอย่างเช่น

3.2.1 restriction fragment length polymorphism (RFLP) เป็นวิธีการตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอหลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอ มาทำการแยกด้วย agarose gel electrophoresis ก็จะสามารถแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอได้และจะทำให้ทราบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ที่เกิดขึ้นได้

3.2.2 polymerase chain reaction (PCR) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอขึ้นในหลอดทดลองด้วยการทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ในการทำปฏิกิริยา เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้รับการพัฒนามาจากเทคนิค PCR สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

3.2.2.1 ประเภทที่มีไพรเมอร์ชนิดจำเพาะเจาะจง (specific primer) เครื่องหมายชนิดนี้ได้แก่ Sequence-tagged site (STS) และ SSLP (simple sequence length polymorphism) หรือ micro satellite เป็นต้น

3.2.2.2 ประเภทที่มีไพรเมอร์ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง (random primer) ได้แก่ RAPDs (random amplified polymorphic DNAs) และ AFLP (amplified fragment length polymorphism) เป็นต้น

แม้การตรวจสอบทางชีววิทยาโมเลกุลเป็นวิธีการที่สามารถตรวจสอบได้เร็วกว่าวิธีทางสัณฐานวิทยา ผลที่ได้มีความถูกต้องแม่นยำสูง ใช้แรงงานน้อย เนื่องจากเป็นการตรวจสอบในระดับ DNA สามารถตรวจสอบได้ในทุกส่วนของพืช และทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช แต่มีข้อจำกัดคือ มีค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบแต่ละครั้งค่อนข้างสูง ใช้ระยะเวลานาน และวิธีการสกัด DNA ซับซ้อนและยุ่งยาก (ณัฏยา และคณะ, 2546; นุชจรี และคณะ, 2550; สุรินทร์, 2545)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 การตรวจสอบทางด้านชีวเคมี (biochemical markers)

เป็นวิธีการตรวจสอบในระดับโปรตีน หรือเอนไซม์ที่พืชสร้างขึ้น โดยโปรตีนหรือเอนไซม์เหล่านี้มีหลายชนิดรวมกัน สามารถแยกออกจากกันด้วยวิธี electrophoresis ในการจำแนกสายพันธุ์พืชสามารถใช้การตรวจสอบทางเอนไซม์ได้โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า isozymes ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ โดยอาศัยความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละกลุ่มกับสารตั้งต้นที่เหมาะสม ซึ่งแม้ว่าวิธีนี้มีประสิทธิภาพ ในการจำแนกสายพันธุ์พืชได้สูงพอสมควรและเชื่อถือได้ (Payne, 1987) แต่มีข้อจำกัดคือ ในการเตรียมตัวอย่างของเอนไซม์ค่อนข้างยุ่งยาก และในแต่ละระยะของการเจริญเติบโตของพืชจะผลิตเอนไซม์ที่มีความแตกต่างกันจึงต้องเลือกตัวอย่างที่นำมาทดสอบให้อยู่ในระยะการเจริญเติบโตที่เหมือนกัน และอยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน เนื่องจากสภาพแวดล้อมมีผลต่อการแสดงออก ข้อด้อยดังกล่าวของการใช้เอนไซม์ในการจำแนกสายพันธุ์พืชทำให้เกิดแนวคิดที่ต้องการนำโปรตีนสะสม (storage protein) มาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์แทน ราวทศวรรษ 1980 จึงได้มีการพัฒนาเทคนิค ultrathin layer isoelectric focusing (UTLIEF) เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์โดยทดสอบกับโปรตีนที่พืชสะสมไว้ เนื่องจากโปรตีนที่พืชสะสมไว้ เป็นโปรตีนที่มีความคงตัวสูงและเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าเอนไซม์ เทคนิคนี้มีประสิทธิภาพสูง ในการแยกโปรตีนที่มีค่า isoelectric piont ที่แตกต่างกันได้ดี (Eckersall and Conner, 1984; Gorg *et al*., 1980; Radola, 1980)

4. โปรตีนสะสมในเมล็ด (seed storage protein)

ชนิดของโปรตีนที่สะสมในเมล็ดสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ (Peter and Casey, 1999) คือ albumins globulins glutelins และ prolamins (ภาพที่ 1) ซึ่งโปรตีนทั้ง 4 กลุ่มมีคุณสมบัติของการละลายที่แตกต่างกัน (Osborne classification) ดังนี้

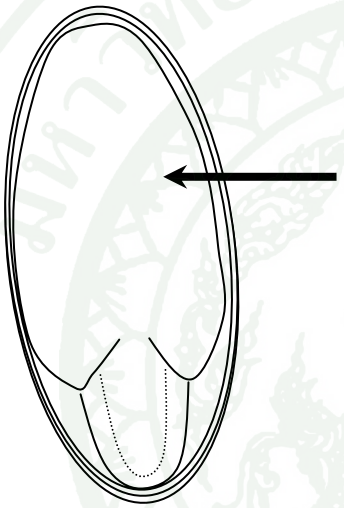
albumins เป็นโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำ และจะเสื่อมสภาพเมื่อได้รับความร้อน สามารถพบได้ในเมล็ดพืชบางชนิด หรือ ในเมล็ดธัญพืช โปรตีนชนิดนี้ส่วนใหญ่จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ จะสะสมอยู่ในเอ็มบริโอ (embryo) และ ใบเลี้ยง (cotyledon) ของเมล็ดพืช

globulins สามารถละลายได้เล็กน้อยในน้ำแต่จะละลายได้ดีในสารละลายเกลือ สามารถพบได้ในเมล็ดพืชหลายชนิด เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์เมมเบรน หรือเป็นโปรตีนสะสมใน aleurone layer หรือ เอ็มบริโอของเมล็ดพืช

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

glutelins ไม่สามารถละลายได้ในสารละลายเกลือหรือแอลกอฮอล์ แต่ว่าจะละลายได้ใน alkali เป็นกลุ่มโปรตีนที่พบมาก และสะสมอยู่ในชั้น endosperm ในเมล็ดข้าว ข้าวสาลี และข้าวโพด

prolamins ละลายได้ในแอลกอฮอล์เข้มข้น (60-70% v/v) แต่ไม่ละลายในน้ำหรือในสารละลายเกลือ เป็นกลุ่มโปรตีนที่พบมากโดยสะสมอยู่ในชั้น endosperm ในเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวหรือข้าวสาลี



ภาพที่ 1 ชนิดของโปรตีนที่สะสมอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของเมล็ดแตงกวา (ที่มา: Hara-Nishimura *et al.*, 1998)

ต่อมาพบว่าในพืชบางชนิด เช่น ข้าวสาลี (wheat) ข้าวบาร์เลย์ (barley) และ ข้าวโพด (maize) มีโครงสร้างของ glutelins คล้ายคลึงกับ prolamins ทำให้การจำแนกด้วยสมบัติดังกล่าวไม่ครอบคลุมจึงได้ปรับปรุงหลักการจำแนกใหม่โดยพิจารณาคุณสมบัติการละลายดังกล่าวร่วมกับสัมประสิทธิ์การตกตะกอน (Sedimentation coefficient; S_{20w}) ทำให้ได้โปรตีนสะสมที่จำแนกตามหลักการนี้ 4 กลุ่ม (modified Osborne classification) ได้แก่ prolamins 2S albumins 7S และ 11S globulins ซึ่งโปรตีนทั้ง 4 กลุ่มมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ดังนี้

prolamins เป็นโปรตีนที่พบได้ในหลาย ๆ โครงสร้าง มวลโมเลกุลประมาณ 10,000–100,000 เกิดจากหลาย monomer มายึดกันด้วยพันธะ disulphide ภายในประกอบด้วยการจัดเรียงตัว (domain) ซ้ำ ๆ อุดมไปด้วย proline และ glutamine ในหลายกรณีพบว่ามี lysine tryptophan

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

threonine และ methionine อยู่แต่มีปริมาณน้อย ไม่พบว่าผ่านกระบวนการ glycosylation และ proteolytic สามารถละลายได้ใน สารละลายน้ำกับแอลกอฮอล์

2S albumins ละลายได้ในน้ำ มวลโมเลกุลประมาณ 10,000–15,000 อุดมไปด้วย methionine มีพันธะ disulphide เชื่อมระหว่าง 2 large subunits ไม่ผ่านกระบวนการ glycosylation

7S globulins ละลายได้ในสารละลายเกลือเจือจาง เป็น trimeric โปรตีน มวลโมเลกุล ประมาณ 40,000–80,000 ผ่านกระบวนการ glycosylation และ proteolytic พบ cystein และ methionine ในปริมาณน้อย

11S globulins ละลายได้ในสารละลายเกลือเจือจาง เป็น hexameric โปรตีน มวลโมเลกุล ประมาณ 300,000–450,000 มีพันธะ disulphide 1 พันธะ พบ cystein และ methionine ในปริมาณน้อย และผ่านกระบวนการ glycosylation

กลุ่มของโปรตีนที่ต้องการศึกษามีความสำคัญต่อการเลือกตัวทำละลาย ซึ่งโดยทั่วไปการใช้เทคนิค UTLIEF ในการแยกสายพันธุ์พืชมักจะใช้ 2-chloroethanol ในการสกัดโปรตีน (Cooke and Draper, 1986; Hahn and Schoberlein, 1999; Wang *et al*., 2001; Yan *et al*., 2006) เนื่องจากเป็นตัวทำละลายที่สามารถละลายโปรตีนได้หลายกลุ่มและเป็นตัวทำละลายที่ ISTA แนะนำในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุ์กรรมโดยเทคนิค UTLIEF ของพืช 2 ชนิด ได้แก่ ข้าวโพดไร่ และทานตะวัน (ISTA, 2007) แต่ 2-chloroethanol เป็นสารที่มีอันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมค่อนข้างมาก (ประกาย, 2550ค) นอกจากนี้ยังเป็นสารเคมีที่ต้องกำกัดอยู่ในบัญชีรายชื่อยุทธภัณฑ์ของกรมการอุตสาหกรรมทหาร กระทรวงกลาโหม (กรมศุลกากร, 2550) ทำให้การนำมาใช้ต้องขออนุญาตเป็นการเฉพาะ ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมที่จะนำสารเคมีชนิดนี้มาใช้ในประเทศไทย เหตุดังกล่าวจึงเป็นที่มาของหลาย ๆ งานวิจัยที่ต้องการหาตัวทำละลายชนิดใหม่ที่มีความเหมาะสมในแง่ที่เป็นตัวทำละลายที่ดี มีต้นทุนการวิเคราะห์ที่ต่ำ และมีผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าการใช้ 2-chloroethanol สำหรับพืชแต่ละชนิด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

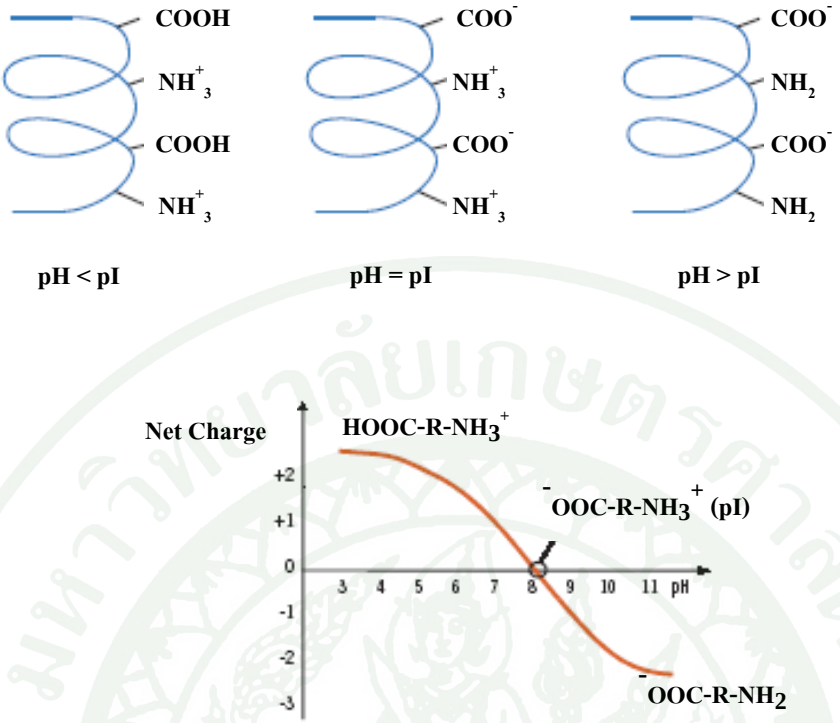
5. หลักการเบื้องต้นของเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส (electrophoresis) ในการจำแนกพันธุ์พืช

อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นคำที่ใช้อธิบายการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าในสนามไฟฟ้า มหัพโมเลกุลทางชีวภาพ (biological macromolecule) ส่วนใหญ่มีประจุจึงสามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้โดยอาศัยคุณสมบัติดังกล่าวนี้ เทคนิค electrophoresis จึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของมหัพโมเลกุล เช่น โปรตีน และกรดนิวคลิอิก เป็นต้น

ขณะที่ isoelectric focusing (IEF) เป็นการทำ electrophoresis แบบหนึ่งที่พอลีเมอร์ทางชีวภาพที่มีประจุดังกล่าว เคลื่อนที่ไปบน pH gradient ซึ่งเกิดจากการผสมกันของสาร zwitter ion เรียกสารดังกล่าวว่า ampholytes (Ö. Gaál, 1980) ซึ่งสาร ampholytes เตรียมได้จากสารผสมของกรดและเบสโมเลกุลเล็ก ๆ (amphoteric compound) ทำหน้าที่สร้าง pH gradient แบบ linear (Dunn, 1993) เมื่อโปรตีนตัวอย่างที่มีประจุไฟฟ้าเคลื่อนที่ผ่าน pH gradient บนเจล (electrophoretic migration) จะสูญเสียประจุระหว่างทางไปจนถึงจุดที่ pH บนเจลมีค่าเท่ากับ pI ของโปรตีนตัวอย่าง เมื่อสูญเสียประจุอย่างสมบูรณ์หรือมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ (ปริมาณประจุบวกเท่ากับปริมาณประจุลบ) (Hawcroft, 1997) ดังแสดงในภาพที่ 2 ณ จุดนี้โปรตีนจะหยุดการเคลื่อนที่ (focusing) และสะสมมากขึ้นทำให้เห็นโปรตีนรวมตัวเป็นแถบ

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการทำ electrophoresis มีหลายปัจจัย อาทิ ขนาดอนุภาคของโปรตีนในเมล็ด ตัวทำละลายและอุณหภูมิของตัวทำละลาย ระบบและความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของเจลที่เตรียม รูปแบบของช่องบน application strip pH ของเจล กระแสและความต่างศักย์ไฟฟ้า อุณหภูมิขณะทำการทดลอง และช่วงเวลาที่ใช้ในการทดลอง เหล่านี้เป็นต้น (Leist and Knobluch, 2003) มีการตั้งข้อสังเกตว่าการจะทำ electrophoresis ให้ประสบความสำเร็จนั้นขึ้นกับการพัฒนาและประยุกต์ใช้ปัจจัยต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับการทดลองในแต่ละครั้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 จุดไอโซอิเล็คทริก (isoelectric point) หรือจุดไอโซไอออนิก (isoionic point) ซึ่งมีประจุสุทธิของโปรตีนเท่ากับศูนย์ ค่า pH = pI (ที่มา: Anonymous, 2006; Dunn, 1993)

การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค electrophoresis นั้นสามารถทำได้หลายรูปแบบตามคุณสมบัติของมหัพโมเลกุลที่นำมาแยกและขึ้นกับวัตถุประสงค์ในการจำแนก เช่น แยกตามขนาด (size) ประจุ (charge) หน้าที่ (function) และแยกตามขนาดร่วมกับประจุ (size and charge) การทำ electrophoresis ส่วนใหญ่การทดลองแยกโปรตีนจะทำบนตัวกลางค้ำจุน (gel media) ประเภทวุ้นแป้ง (agarose) และ polyacrylamide การทำ electrophoresis ที่ใช้ตัวกลางค้ำจุนประเภท polyacrylamide เรียกเทคนิคดังกล่าวว่า Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) เทคนิค PAGE เป็นเทคนิคที่นิยมใช้กันมากเพราะ polyacrylamide เป็นสารที่มีความบริสุทธิ์สูง เฉื่อยต่อสารตัวอย่างที่ต้องการแยก เสถียรในช่วง pH และอุณหภูมิที่กว้าง และโปร่งแสง ทั้งสามารถเตรียมเจลที่มีรูพรุนขนาดต่าง ๆ ได้ ต่างกับเจลแป้งที่มีขนาดรูพรุนจำกัด ส่งผลให้เทคนิค PAGE มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการแยกโปรตีน (Righetti *et al.*, 1990) ตัวกลางของ PAGE เกิดจากปฏิกิริยาการสร้างพอลิเมอร์ (polymerization) ระหว่าง acrylamide และ bisacrylamide (N'N'-methylenebisacrylamide, BIS) มีลักษณะเป็นตาข่ายหรือรูพรุน ขนาดของรูถูกกำหนดโดยปริมาณของ acrylamide และ bisacrylamide ตามสมการที่ (1) และ (2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$\%T = \frac{A+B}{V} \times 100 \qquad \text{_____(1)}$$

$$\%C = \frac{B}{A+B} \times 100 \qquad \text{_____(2)}$$

เมื่อ T คือ ปริมาณของ acrylamide และ bisacrylamide C คือ ปริมาณของ bisacrylamide เมื่อเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของ acrylamide และ bisacrylamide A คือปริมาณ acrylamide (กรัม) B คือปริมาณ bisacrylamide (กรัม) และ V คือ ปริมาตรสุดท้ายทั้งหมดที่ได้ (มิลลิลิตร) การเพิ่มความเข้มข้นของสารทั้ง 2 จะทำให้เจลแข็งกระด้างและแตกหักง่าย แต่ถ้าลดความเข้มข้นลงจะทำให้เจลอ่อนและยืดหยุ่นขึ้น (อาภัสสรา, 2537ข; Janson and Ryden, 1998) โดยทั่วสำหรับการแยกชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค isoelectric focusing มักใช้ %T ที่ 5–15 เปอร์เซ็นต์ และ %C ประมาณ 2–4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าต่ำเมื่อเทียบกับการทำ PAGE ของดีเอ็นเอที่ใช้ %T ที่ 20–40 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้ปริมาณต่ำก็เพื่อเป็นการลดผลกระทบจากขนาดโมเลกุล (molecular sieving effect) เพราะเทคนิค isoelectric focusing ใช้ประจุในการแยกโมเลกุลออกจากกัน (อภิชาติ, ม.ป.ป.; Dunn, 1989)

เนื่องจาก electrophoresis เป็นเทคนิคที่มีไฟฟ้าเข้ามาเกี่ยวข้อง การทำความเข้าใจเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของ ความต้านทาน ความต่างศักย์ และกระแสไฟฟ้านับว่าเป็นสิ่งสำคัญ ความสัมพันธ์ดังกล่าวแสดงไว้ในสมการ (3) และ (4)

$$I = E/R \qquad \text{_____(3)}$$

$$P = EI \qquad \text{_____(4)}$$

เมื่อ I คือ กระแสไฟฟ้า E คือ ความต่างศักย์ (โวลต์) R คือ ความต้านทาน (โอห์ม) และ P คือ กำลังไฟฟ้า (วัตต์) (Janson and Ryden, 1998)

จากสมการ (3) และ (4) ทำให้ทราบว่า หากให้กระแสไฟฟ้าสูง เมื่อทำการทดลองจะทำให้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของประจุในสนามไฟฟ้าคงที่ ขณะที่การใช้ความต่างศักย์ที่สูงจะส่งผลให้ความเร็วในการเคลื่อนที่ของประจุในสนามไฟฟ้าเพิ่มขึ้นแต่ก็ทำให้มีความร้อนเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย หลายครั้งความต่างศักย์ที่ใช้สูงประมาณ 1000–3000 โวลต์ ทำให้เกิดความร้อนสูง ซึ่งจะมีผลต่อการเสียสภาพของโปรตีนที่ทดสอบ ดังนั้นระบบควบคุมความเย็นให้กับเจลมีความสำคัญมาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพราะต้องระบายความร้อนที่เกิดขึ้นออกจากระบบอย่างสม่ำเสมอ มิเช่นนั้นจะเกิดความร้อนสูงเกินไป โปรตีนอาจจะเสียสภาพส่งผลให้แยกความแตกต่างไม่ได้ชัดเจน และอาจทำให้เจลไหม้ได้ (อาภัสสรา, 2537ก; John, Jr. and Switzer, 1997)

การใช้เทคนิค electrophoresis เพื่อการจำแนกโปรตีนสามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภท ดังนี้

5.1. การจำแนกโปรตีนตามหน้าที่ทางชีวภาพโดยใช้เทคนิคไอโซไซม์ หรือ ไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme)

ไอโซไซม์ หรือ ไอโซเอนไซม์ หมายถึง เอนไซม์ที่มีรูปร่างโมเลกุลหลายแบบ แต่เร่งปฏิกิริยาเดียวกันในสิ่งมีชีวิตเดียวกัน ซึ่งไอโซไซม์มีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อระยะการเจริญเติบโตและชนิดของสิ่งมีชีวิต (Leist and Knoblauch, 2003) การศึกษาไอโซไซม์เพื่อการจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิค electrophoresis อาศัยหลักการที่สำคัญคือ ไอโซไซม์เป็นสายโพลีเปปไทด์ (polypeptides) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) เรียงกันอยู่ ลำดับของกรดอะมิโนนี้จะแปลมาจากรหัสพันธุกรรม (gene) บนสายนิวคลีโอไทด์ (nucleotides) ไอโซไซม์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนแตกต่างกันจะมีประจุสุทธิ ขนาดและรูปร่างของโมเลกุลแตกต่างกันด้วย เมื่อนำไอโซไซม์มาแยกบนตัวกลางที่เหมาะสมด้วยเทคนิค electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกอนุภาคซึ่งมีประจุในสนามไฟฟ้าโมเลกุลของเอนไซม์จะเคลื่อนที่ในอัตราที่ต่างกัน หลังจากที่ทำการย้อมสีด้วยปฏิกิริยาจำเพาะสำหรับไอโซไซม์แต่ละชนิดก็จะเห็นสีของเอนไซม์รูปแบบต่าง ๆ (Bailey, 1983) แถบสีที่ปรากฏนี้เรียกว่ารูปแบบของไอโซไซม์ (isozyme patterns) ซึ่งไอโซไซม์ที่มีประจุสุทธิมากกว่าจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าไอโซไซม์ที่มีประจุสุทธิน้อยกว่า อนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกด้วยอัตราการเคลื่อนที่ที่ขึ้นอยู่กับความเข้มในสนามไฟฟ้าและจำนวนประจุไฟฟ้ารวมของอนุภาค การเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันนั้นจึงเป็นผลโดยตรงจากลักษณะพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (Crawford, 1983)

5.2. การจำแนกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิของโปรตีน โดยใช้เทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (isoelectric focusing)

Isoelectric focusing เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนแต่ละชนิดออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิโดยใช้กระแสไฟฟ้า โปรตีนเป็นสารที่มีประจุซึ่งเกิดจากการแตกตัวของหมู่อะมิโน และหมู่คาร์บอกซิลที่ปลายเส้นโพลิเปปไทด์ และอาจเกิดจากการแตกตัวของ R group

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ซึ่งการแตกตัวของหมู่ดังกล่าวจะทำให้ประจุรวมของโมเลกุลโปรตีนเป็นบวก ลบ หรือเป็นกลาง ขึ้นอยู่กับค่า pH ของสารละลายโปรตีนขณะนั้น ระบบจะมีการเติมสารผสม ที่เรียกว่า carrier ampholytes เข้าไป สารผสมนี้มีลักษณะเป็น amphotheric molecule ขนาดประมาณ 300–600 ดาลตัน เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าสู่ระบบ สารนี้จะจัดเรียงตัวทำให้เกิดการเรียงของ carrier ampholytes ที่มี pH ต่ำทางด้านขั้วบวกไปยัง carrier ampholytes ที่มี pH สูงทางด้านขั้วลบ เรียกว่า pH gradient (สุกัญญา, 2538) เมื่อโปรตีนอยู่ในระบบ โปรตีนที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ โปรตีนที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวก ขณะที่โปรตีนเคลื่อนที่ผ่าน pH gradient จะสูญเสียประจุไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งถึงจุด isoelectric point (pH=pI) ของตัวมันเอง ซึ่งเป็นจุดที่มีประจุสุทธิเป็นศูนย์ ตำแหน่งนี้โปรตีนจะหยุดการเคลื่อนที่และรวมตัวกันเป็นแถบเข้มข้น จากการปรากฏของแถบโปรตีนที่มีตำแหน่งต่างกันสามารถคาดเดาได้ว่าเป็นโปรตีนต่างชนิดกัน

5.3. การจำแนกโปรตีนตามมวลโมเลกุลโดยใช้เทคนิค SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis เป็นเทคนิคที่ใช้อีเล็กโตรโฟรีซิส และ anionic detergent ชนิดหนึ่ง คือ sodium dodecyl sulphate (SDS) ช่วยหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ทำได้โดยนำโปรตีนมาผสมกับ SDS ซึ่งจับกับโปรตีน ในลักษณะ non covalent ในอัตราส่วน 1.4 กรัมของ SDS ต่อโปรตีน 1 กรัม ทำให้โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นลบ จำนวนประจุลบจึงเท่ากับจำนวนกรดอะมิโนในโปรตีน ในขณะเดียวกันโปรตีนจะเสียสภาพธรรมชาติและเปลี่ยนรูปร่างเป็นทรงแท่ง (rod shape) ที่มีความยาวเป็นสัดส่วนกับจำนวนกรดอะมิโนทำให้อัตราการเคลื่อนที่ภายในเจลขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลเพียงประการเดียว ระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่ไปบนเจลเป็นสัดส่วนกับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล ดังนั้นเมื่อทำ electrophoresis ก็สามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนตัวอย่างโดยวัดระยะทางหรือตำแหน่งของแถบโปรตีนบนเจล โดยเปรียบเทียบกับอัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล เช่น Bromphenol blue เป็นต้น (ชิษณุสรร, 2530; วันชัย, 2542)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.4. การจำแนกโปรตีนตามประจุสุทธิ และ มวลโมเลกุล โดยใช้เทคนิค 2-dimension gel electrophoresis

เทคนิค 2-dimension gel electrophoresis ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อแยกโปรตีนแต่ละชนิดออกจากกันโดยอาศัย 2 เทคนิครวมกันคือการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของประจุสุทธิ หรือค่า pI นั่นคือใช้เทคนิค isoelectric focusing ร่วมกับเทคนิค SDS-PAGE ซึ่งเป็นการแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุล เนื่องจากเทคนิคนี้มีปัญหาสำคัญ คือการวิเคราะห์ผลที่ซับซ้อนจึงไม่เป็นที่นิยมใช้ในการตรวจสอบโดยทั่วไป (อาภัสสรา, 2537ก)

6. การแยกชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค isoelectric focusing

Isoelectric focusing เป็นการประยุกต์ใช้เทคนิค PAGE สำหรับแยกมหัพโมเลกุลทางชีวภาพที่มีความแตกต่างของจุดไอโซอิเล็คทริก (isoelectric point) หรือค่า pI โดยอาศัยปรากฏการณ์การเคลื่อนที่ของพอลีเมอร์ทางชีวภาพที่มีประจุไฟฟ้าในสนามไฟฟ้า ซึ่งเป็นองค์ความรู้ที่มีมานานกว่า 170 ปี (Mosher *et al*., 1992) แต่กลไกของการเคลื่อนที่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดจนกระทั่งการทดลองของ Tiselius ช่วงปลายทศวรรษ 1920 ที่ทำการแยกโปรตีนและคอลลอยด์ออกจากกันในสารละลายบัฟเฟอร์ (Dunn, 1986) จากนั้นเทคนิคนี้ได้รับการพัฒนาเรื่อยมา ในระยะหลังเทคนิคนี้ได้รับการปรับปรุงให้สามารถแยกโปรตีน โพลีเปปไทด์ และกรดนิวคลีอิกที่มีค่า pI ต่างกันเพียง 0.02 หน่วย pH ได้ ซึ่งประสิทธิภาพของวิธีการสามารถพิจาณาได้จากระยะห่างระหว่างหน่วย pH (Δ pI) เป็นไปตามสมการที่ (5)

$$\Delta \text{ pI} = \sqrt{\frac{\text{pH gradient}}{\text{voltage gradient}}} \qquad \text{_____(5)}$$

กล่าวคือ ความต่างศักย์ (voltage gradient) ที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย เนื่องจากสามารถแยกมหัพโมเลกุลทางชีวภาพที่มีจุดไอโซอิเล็คทริกความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยได้ (Deutscher, 1990; Unlu and Minden, 2002) นอกจากนี้การใช้ความต่างศักย์ที่สูงยังช่วยลดระยะเวลาในการปฏิบัติงานลงเนื่องจากโมเลกุลที่มีประจุสุทธิ q เมื่อเข้าสู่สนามไฟฟ้าจะเกิดแรง F แรงดังกล่าวสัมพันธ์กับความต่างศักย์ระหว่างขั้วไฟฟ้าและประจุสุทธิของแต่ละโมเลกุลเป็นไปตามสมการ (6) (อาภัสสรา, 2537ก)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$F = \frac{E}{d} q \qquad \text{_____(6)}$$

เมื่อ E คือ ความต่างศักย์ระหว่างขั้วไฟฟ้า (โวลต์) d คือ ระยะห่างระหว่างขั้วไฟฟ้า (เซนติเมตร) แต่ในสารละลาย การเคลื่อนที่ของโมเลกุลจะมีแรงเสียดทาน (F') เข้ามาเกี่ยวข้อง แรงนี้ขึ้นกับขนาดและรูปร่างของโมเลกุล รวมทั้งความหนืดของตัวกลางดังสมการ (7)

$$F' = 6\P\eta rv \qquad \text{_____(7)}$$

เมื่อ F' คือ แรงเสียดทานของโมเลกุลทรงกลม ŋ คือ สัมประสิทธิ์ความหนืดของสารละลาย (พาสคาลวินาที, PaS) r คือ รัศมีของโมเลกุล (เมตร) และ v คือ ความเร็วในการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า (เมตร/วินาที, m/s) เมื่อโมเลกุลเคลื่อนที่มาถึง isoelectric point แรงที่เกิดจากสนามไฟฟ้าจะเท่ากับแรงเสียดทาน (F = F') (อาภัสสรา, 2537ก) ทำให้

$$\frac{E}{d} q = 6\P\eta rv \qquad \text{หรือ}$$

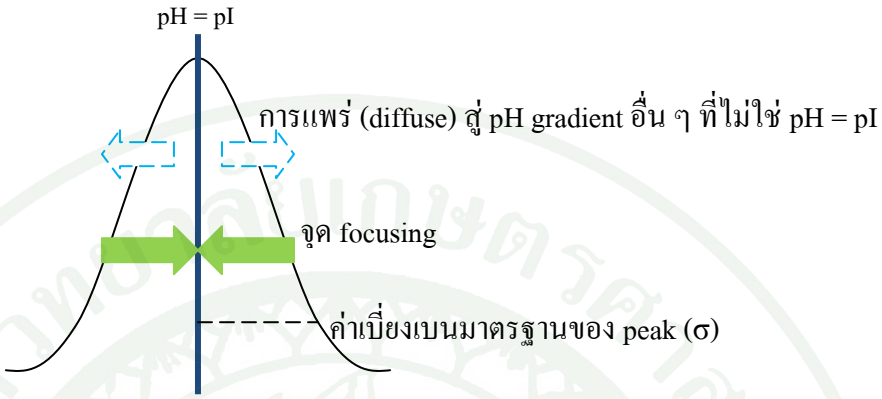
$$v = \frac{Eq}{d6\P\eta r} \qquad \text{_____(8)}$$

จากสมการที่ (8) กล่าวได้ว่าความเร็วของการเคลื่อนที่ของแต่ละโมเลกุลในสารละลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อความต่างศักย์เพิ่มขึ้น แต่การใช้ความต่างศักย์ที่สูงจะส่งผลให้ความร้อนของระบบสูงขึ้น จำเป็นต้องหาจุดสมดุลของระบบซึ่งโดยทั่วไปจะใช้ความต่างศักย์ประมาณ 100-200 V/cm. (อาภัสสรา, 2537ข; Janson and Ryden, 1998)

บริเวณ isoelectric point ซึ่งเป็นจุดที่โปรตีนจะหยุดการเคลื่อนที่และสะสมขึ้นเป็นแถบโปรตีน ในแต่ละแถบของโปรตีนอาจมีโปรตีนชนิดเดียวหรือหลายชนิดก็ได้ เนื่องจากโปรตีนต่างชนิดกันอาจมีค่า pI ที่เท่ากัน จึงทำให้เคลื่อนที่ไปสะสมอยู่ในตำแหน่งเดียวกัน ดังนั้นการแยกโปรตีนโดยวิธีนี้จึงไม่สามารถบอกได้ว่าในแต่ละแถบของโปรตีนคือโปรตีนชนิดใด มีขนาดเท่าใด แต่สามารถพิจารณาเบื้องต้นได้ว่าโปรตีนตำแหน่งนั้นมีค่า pI อยู่ระหว่างช่วง pH ที่เท่าไหร่ ถ้าโปรตีนมีค่า pI ที่อยู่ในช่วง pH ที่ต่างกันมาก ๆ สันนิษฐานได้ว่าอาจจะเป็นโปรตีนที่ต่างชนิดกัน นอกจากนี้ในแต่ละแถบอาจมีโปรตีนที่มีค่า pI ที่ไม่เท่ากันสะสมอยู่ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับเวลาที่ใช้ในการปฏิบัติงาน และการเลือกใช้ carrier ampholyte (Righetti *et al*., 1990) carrier ampholyte ที่ดีจะเพิ่ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประสิทธิภาพในการปฏิบัติงาน แต่การปฏิบัติที่นานขึ้นอันเนื่องมาจากการใช้ความต่างศักย์ต่ำ จะส่งผลให้แถบโปรตีนมีการแพร่และซ้อนทับกันมากขึ้น (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 amphotheric molecule :ซึ่งสามารถเก็บและแลกเปลี่ยนประจุได้ เมื่อเข้าสู่ระบบจะเคลื่อนที่เข้าสู่จุด equilibrium (pH = pI) ซึ่งเป็นจุดที่ครึ่งหนึ่งของโมเลกุลทั้งหมดมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ (ที่มา: Righetti *et al.*, 1990)

เหตุดังกล่าวส่งผลให้การเตรียม carrier ampholyte ใช้เองควรคำนึงถึง ‘carrier ampholyte ที่ดี (good carrier ampholyte)’ และ ‘carrier ampholyte ที่เลว (poor carrier ampholyte)’ carrier ampholyte ที่ดีคือ carrier ampholyte ที่มี pI (pK_1) ต่ำ สามารถนำไฟฟ้า และมีสมรรถนะในการจุไฟฟ้าสูง ส่งผลให้ รอบ ๆ pI ของ ampholyte ประเภทนี้จะมี curve ของ pH ที่แคบ (flat) นำไปใช้ในการแยกแถบโปรตีนที่ติดกันได้ดี แต่ควรใช้ในปริมาณต่ำ (ประมาณ 0.005-0.05 โมลาร์) ตรงกันข้ามกับ carrier ampholyte ที่เลว โดยรอบ ๆ pI ของ ampholyte ประเภทนี้จะมี curve ของ pH ที่กว้าง (broad plateaux) นำไปใช้ในการชะลอการ focusing ปริมาณที่ใช้ควรสูงกว่า carrier ampholyte ที่ดี (ใช้ประมาณ 0.2-1 โมลาร์) ตัวอย่างรายชื่อของ ampholyte ทั้ง 2 ลักษณะแสดงไว้ในตารางที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

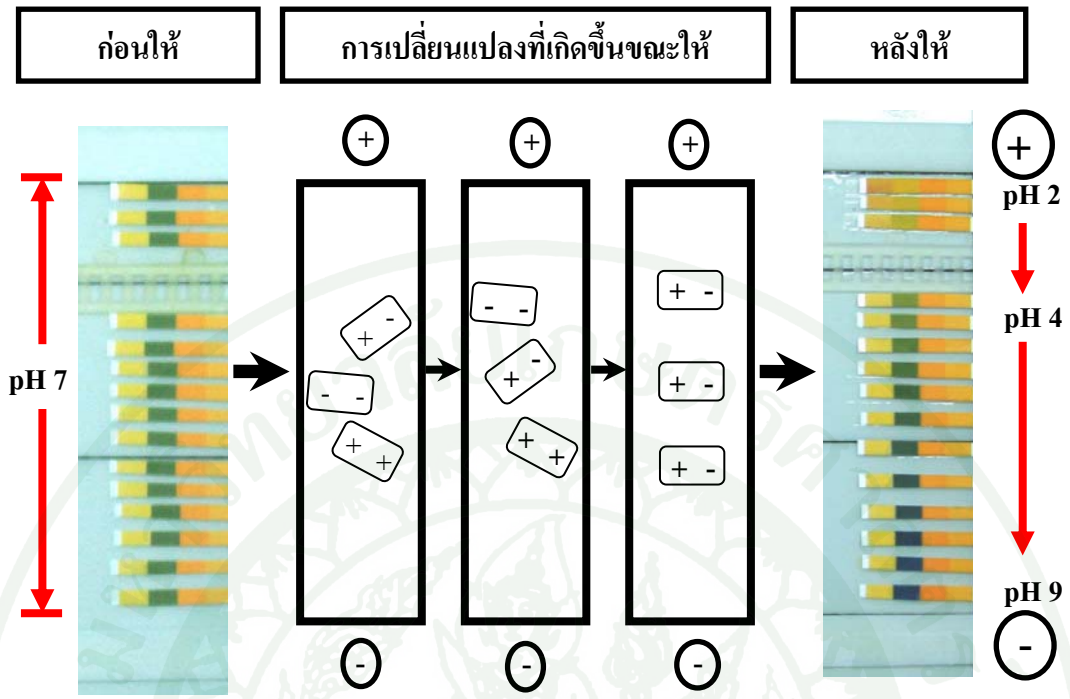
ตารางที่ 2 ตัวอย่างรายชื่อ good carrier ampholyte และ poor carrier ampholyte

good carrier ampholyte	**pI**		
Aspartic acid	2.77		
Glutamic acid	3.22		
Pentaglycine	5.32		
Arginine	0.76		
poor carrier ampholyte	**pK_1**	**pK_2**	**pI**
β-Alanine	3.55	10.24	6.9
γ-Aminobutyric acid	4.03	10.56	7.3
δ-Aminovaleric acid	4.26	10.77	7.52
ε-Aminocaproic acid	4.42	11.66	8.04

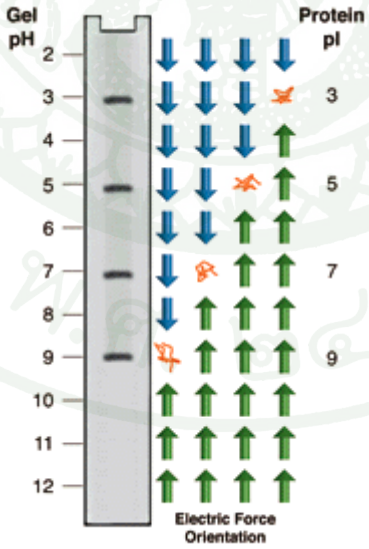
ที่มา: Righetti *et al*. (1990)

เมื่อเริ่มต้นทำ Isoelectric focusing เจลที่มีสาร ampholytes ผสมอยู่จะมี pH ที่สม่ำเสมอซึ่งมีค่าเท่ากับค่าเฉลี่ยของ pI ของ ampholytes แต่การเกิดเกรเดียนต์ของ pH จะเกิดขึ้นเมื่อมีการให้กระแสไฟฟ้า ซึ่งเมื่อวางขั้วลบ (cathode) ในสารละลายที่เป็นด่างแก่ และขั้วบวก (anode) ในสารละลายกรดแก่ และบริเวณช่องว่างระหว่างขั้วทั้งสองมีสารละลายของ ampholytes ผสมอยู่ในเจล เมื่อให้สนามไฟฟ้าจะทำให้สาร ampholytes ที่เป็นกรดเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกทำให้บริเวณขั้วบวกมีค่า pH ต่ำในขณะที่ ampholytes ที่เป็นด่างทำให้บริเวณขั้วลบมีค่า pH สูง เมื่อให้กระแสไฟฟ้าจนกระทั่ง ampholytes ทุกโมเลกุลที่มีการจัดเรียงตามค่า pI ของแต่ละโมเลกุล ampholytes ที่เป็นด่างมากที่สุดจะอยู่ใกล้ขั้วลบมากที่สุด และจะมีการจัดเรียงตามค่า pI ที่เพิ่มขึ้นเรื่อยมาจนกระทั่งสิ้นสุดด้วย ampholytes ที่เป็นกรดมากที่สุดจะอยู่ใกล้ขั้วบวกมากที่สุด ทำให้เกิดลักษณะของ pH gradient บนแผ่นเจลนั้น (ภาพที่ 4) เมื่อเติมโปรตีนลงบนเจล โปรตีนที่มีประจุสุทธิเป็นบวกจะเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบ ส่วนโปรตีนที่มีประจุเป็นลบจะเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก และในระหว่างที่โปรตีนเคลื่อนที่ไปนั้นก็จะสูญเสียประจุเนื่องจากถูกสะเทินประจุโดย H^+ และ/หรือ OH^- จาก pH gradient จนกระทั่งประจุสุทธิของตัวมันเองเป็นศูนย์ ปริมาณประจุบวกเท่ากับปริมาณประจุลบหรือถึงจุด ที่ pH = pI โปรตีนก็จะหยุดการเคลื่อนที่ (ภาพที่ 5)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 การเคลื่อนที่ของ ampholytes ก่อนและหลังให้กระแสไฟฟ้า ทำให้เกิด pH gradiant บนเจล (ที่มา: ประกาย, 2550ค)



ภาพที่ 5 การเคลื่อนที่ของโปรตีนซึ่งเป็น amphoteric compound ไปยังจุดไอโซอิเล็คทริก (isoelectric point, pH = pI)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อดีของเทคนิค isoelectric focusing (อาภัสสรา, 2537ก) คือ

1. ใช้สารเคมีน้อยชนิด และวิธีการไม่ยุ่งยากสามารถทำเสร็จสมบูรณ์ได้ภายใน 2-3 ชั่วโมง

2. ให้ผลการแยกโปรตีนที่ดีมากสามารถแยกโปรตีนที่มีค่า pI ต่างกันเพียง 0.02 หน่วย pH เท่านั้นและแถบของโปรตีนมีความคมชัด

3. สามารถหาค่า pI ของโปรตีนได้โดยการวัด pH ในเจลตรงตำแหน่งของแถบโปรตีนที่ปรากฏ

4. เนื่องจากโปรตีนเคลื่อนที่จากจุดต่าง ๆ ไปสู่ตำแหน่ง pI ของมันจึงไม่คำนึงถึงตำแหน่งที่หยดสารตัวอย่าง และสามารถใช้สารตัวอย่างที่เจือจางได้

7. เทคนิค Ultrathin-layer isoelectric focusing (UTLIEF)

UTLIEF เป็นเทคนิคย่อยของ isoelectric focusing ใช้ในการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของคุณสมบัติเรื่องค่า isoelectric point ของโปรตีนโดยใช้แผ่นเจล polyacrylamide ที่บางมากเพียงประมาณ 0.1-0.2 มิลลิเมตร ทำให้เทคนิค UTLIEF นี้มีข้อดีเด่นเหนือเทคนิค isoelectric focusing โดยทั่วไปคือเจลมีขนาดบางมากสามารถทำให้แห้งแล้วเก็บในรูปแบบของเอกสารได้ และมีค่าใช้จ่ายต่อเจลต่ำกว่าเจลปกติ (ธรรมศักดิ์ และ เสริมศิริ, 2549; Massi, *et al.*, 1979)

ข้อดีของการใช้ UTLIEF ในการจำแนกพันธุ์

1. เป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำสูงกว่าวิธีการจำแนกพันธุ์แบบการปลูกทดสอบในแปลง เพราะชนิดของโปรตีนที่สะสมในเมล็ดไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อมและการดูแลรักษา

2. เป็นเทคนิคที่ปฏิบัติได้ง่าย และรวดเร็ว ทราบผลภายใน 4 ชั่วโมง เร็วกว่าการปลูกทดสอบในแปลง และการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อการคัดเลือก

3. เป็นเทคนิคที่เสียค่าใช้จ่ายต่ำกว่าวิธีอื่น ๆ เช่น ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) และการปลูกทดสอบในแปลง ที่ต้องใช้พื้นที่ เวลาและแรงงานในการดูแลรักษา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัจจุบันได้มีรายงานผลการทดลองที่นำเทคนิค UTLIEF ไปประยุกต์ใช้ได้ประสบผลสำเร็จ เช่น

Wang *et al*. (2000) ได้ทดลองใช้ UTLIEF ในการแยกพันธุ์ปลูกของมะเขือเทศ 11 พันธุ์ โดยสกัดโปรตีนในเมล็ดด้วยตัวทำละลาย NaCl ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ จากนั้นแยกแถบโปรตีนโดยใช้ช่วง pH 4-8 พบว่า มะเขือเทศทั้ง 11 พันธุ์มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม โดยพบความแตกต่างของแถบโปรตีน 8 ตำแหน่ง

Zhao *et al*. (2003) ได้ทดสอบความเป็นไปได้ที่จะตรวจความเป็นลูกผสมของข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 โดยใช้เมล็ดข้าวหนึ่งเมล็ด ที่ถูกตัดแบ่งเป็นสองส่วน คือส่วนแรกจะเป็นส่วนที่เป็น endosperm (ไม่มีเอ็มบริโออยู่) นำมาสกัดโปรตีนในเมล็ดและแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF จากนั้นนำส่วนที่มีเอ็มบริโอไปทดสอบการงอกด้วยวิธี grow-out test พบว่า ผลที่ได้จากการตรวจสอบทั้งสองวิธีตรงกัน จึงสรุปได้ว่าสามารถใช้เมล็ดข้าว 1 เมล็ดในการตรวจสอบทั้งสองวิธีได้ด้วยการตัดแบ่งครึ่งเมล็ด

Noli (2004) ได้ทำการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของมะเขือเทศ พริกไทย และมะเขือยาวโดยเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค UTLIEF-PAGE กับวิธี grow-out test พบว่าเมล็ดชุดที่ทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค UTLIEF-PAGE มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ขณะที่การตรวจสอบด้วยวิธี grow-out test ไม่สามารถบอกความแตกต่างได้ จึงแนะนำว่าสามารถใช้เทคนิค UTLIEF-PAGE เพื่อยืนยันผลการวิเคราะห์ของวิธี grow-out test ได้สำหรับพืชทั้ง 3 ชนิด

Yan *et al*. (2006) ได้ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับความเป็นไปได้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของข้าวสองพันธุ์ก่อนถึงช่วงระยะเก็บเกี่ยวด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้โปรตีนในเมล็ด โดยจะศึกษาในรูปแบบของ male marker bands ซึ่งถูกพัฒนาใช้ในข้าวพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 จากการทดลองพบว่า สามารถใช้เทคนิค UTLIEF ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมก่อนถึงช่วงระยะการเก็บเกี่ยวได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

ในการศึกษาวิธีการจำแนกสายพันธุ์แตงกวาโดยการวิเคราะห์ โปรตีนในเมล็ดด้วยเทคนิค Ultrathin Layer Isoelectric Focusing (UTLIEF) แบ่งการวิจัยออกเป็น 2 การศึกษา

1. การศึกษาตัวทำละลาย และ pH ของเจล acrylamide ที่มีผลต่อการแยกโปรตีนในเมล็ดพันธุ์แตงกวาด้วยเทคนิค UTLIEF เพื่อใช้แยกความแตกต่างของพันธุ์

ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรตีนในเมล็ดพันธุ์ด้วยเทคนิค UTLIEF เพื่อการแยกความแตกต่างของพันธุ์ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัย 2 ปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF ได้แก่ 1) ชนิดของตัวทำละลาย และ 2) pH ของเจล acrylamide สำหรับทำ electrophoresis ที่เหมาะสม ดังนี้

1.1 เมล็ดพันธุ์แตงกวาที่นำมาทดลอง

ในการศึกษานี้ใช้เมล็ดพันธุ์แตงกวาลูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์การค้า 4 พันธุ์ปลูก ได้แก่ พันธุ์ไมโครซี (Micro C) และพันธุ์บิ๊กซี (Big C) ของบริษัท อีสท์ เวสท์ ซีด จำกัด พันธุ์โชคดี ของบริษัท ที ทรอปิโค จำกัด และพันธุ์บุษบา 2005 ของบริษัท ซีด เทค มาร์เก็ตติ้ง จำกัด

1.2 กรรมวิธีการศึกษา

เนื่องจากโปรตีนต่างชนิด จะละลายได้ในตัวทำละลายที่แตกต่างกันในการทดลองนี้จึงใช้ตัวทำละลายทุกชนิดที่ละลายโปรตีนได้ ได้แก่ น้ำ สารละลายเกลือเจือจางสารละลายด่างเจือจาง ยกเว้นแอลกอฮอล์เข้มข้น (60-70 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งผลการทดลองเบื้องต้นพบว่าตัวทำละลายจำพวกแอลกอฮอล์เข้มข้นจะละเหยออกไปจาก application strip จนหมดในระหว่างการทำ electrophoresis

สำหรับการเลือกค่า pH ของเจลได้เลือกใช้ช่วง pH ของเจลที่กว้าง เพื่อครอบคลุม pI ของโปรตีนส่วนใหญ่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในการศึกษาผลของตัวทำละลายและ pH ของเจลต่อการแยกโปรตีนในเมล็ดแตงกวา เพื่อการจำแนกพันธุ์ จึงใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ น้ำ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ Na_2EDTA 0.005 โมลาร์ (5 มิลลิโมลาร์, mM) และ เกลือแกง (NaCl) 0.005 โมลาร์ และความเหมาะสมของ pH ของเจล 2 ช่วง คือ 2-11 และ 4-5/3-10 ในการทดสอบประสิทธิภาพของปัจจัยทั้ง 2 ปัจจัย เมื่อศึกษาทั้งสองปัจจัยรวมกันได้เป็นกรรมวิธี 8 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายร่วมกับการใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 2-11
กรรมวิธีที่ 2 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลายร่วมกับการใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 2-11
กรรมวิธีที่ 3 ใช้ Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์เป็นตัวทำละลายร่วมกับการใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 2-11
กรรมวิธีที่ 4 ใช้ NaCl 5 มิลลิโมลาร์เป็นตัวทำละลายร่วมกับการใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 2-11
กรรมวิธีที่ 5 ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายร่วมกับการใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 4-5/3-10
กรรมวิธีที่ 6 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลายร่วมกับการใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 4-5/3-10
กรรมวิธีที่ 7 ใช้ Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์เป็นตัวทำละลายร่วมกับการใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 4-5/3-10
กรรมวิธีที่ 8 ใช้ NaCl 5 มิลลิโมลาร์เป็นตัวทำละลายร่วมกับการใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 4-5/3-10

1.3 การเตรียมตัวทำละลาย

ในการศึกษาถึงผลของตัวทำละลายในการสกัดโปรตีนในเมล็ดพันธุ์แตงกวาด้วยเทคนิค UTLIEF เพื่อการแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ ทำการเลือกตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ น้ำ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์ และ เกลือแกง 5 มิลลิโมลาร์ การเตรียมตัวทำละลายแต่ละชนิดมีวิธีการดังนี้

- ตัวทำละลายน้ำเตรียมโดยนำน้ำขจัดไอออน (deionised water) ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

- ฟอสเฟสบัฟเฟอร์เตรียมโดยใช้ K_2HPO_4 น้ำหนัก 0.194 กรัม KH_2PO_4 น้ำหนัก 0.528 กรัม EDTA น้ำหนัก 0.38 กรัม และ DTE 1 กรัมตามลำดับ ร่วมกับ glycerin 25 มิลลิลิตร จากนั้นใช้น้ำปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

- ตัวทำละลาย Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยใช้ Na_2EDTA (UNIVAR) 1.861 กรัมนำมาละลายน้ำ ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

- ตัวทำละลายเกลือแกง 5 มิลลิโมลาร์ เตรียมโดยใช้ NaCl (UNIVAR) 0.29 กรัมนำมาละลายน้ำปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

1.4 การสกัดโปรตีนในเมล็ด

สกัดโปรตีนในเมล็ดโดยกะเทาะเปลือกเมล็ดด้วยเครื่องบด (RT-02 150g high speed grinder) จากนั้นชั่งเมล็ดให้ได้ปริมาณ 200 มิลลิกรัม เติมตัวทำละลาย 500 ไมโครลิตร แช่เมล็ดที่บดในตัวทำละลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง โดย vortex ทุก ๆ 20 นาที เมื่อครบตามเวลานำไปปั่นเหวี่ยง (MIKRO 20) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แยกส่วนใสใส่หลอดใหม่ แบ่งส่วนใสที่ได้เป็น 2 ส่วนเพื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976) และอีกส่วนหนึ่งสำหรับนำไปทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค UTLIEF

1.5 วิธีการทดสอบความเข้มข้นของโปรตีน

วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิด ตามวิธีการของ Bradford (1976) เพื่อให้ทราบปริมาณโปรตีนรวมในเมล็ดแตงกวาและเปรียบเทียบความ สามารถในการสกัดโปรตีนของตัวทำละลายแต่ละชนิด โดยใช้ BSA ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัม เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยนำ BSA ปริมาตร 0.5 1 5 10 15 และ 20 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย Bradford ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข)

1.6 การเตรียม UTLIEF เจล

เตรียมสารละลายเจลสำหรับ 10 เจลตามวิธีการของ Radola (1980) ซึ่งประกอบด้วย ทอรีน 1.5 กรัม สารละลาย acrylamide (acrylamide solution) 50 มิลลิลิตร (%T = 6.8 เปอร์เซ็นต์ และ %C = 2.5 เปอร์เซ็นต์) ampholytes (SINUS, Germany) สำหรับศึกษาถึงผลของ pH ของเจล

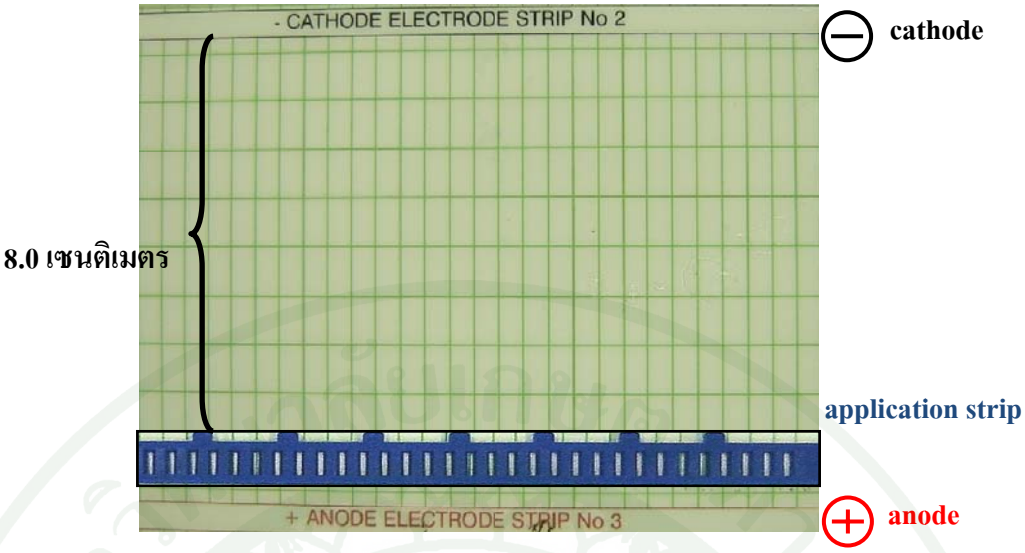
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

acrylamide สำหรับทำ electrophoresis เพื่อใช้แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ ด้วยเทคนิค UTLIEF โดยเลือก pH ของเจล 2 ช่วง คือ pH ที่อยู่ในช่วง 2-11 และ 4-5/3-10 ปริมาตรช่วง pH ละ 4.4 มิลลิลิตร N N N'N'-tetramethylenediamine (TEMED) 50 ไมโครลิตร และ ammonium peroxydisulphate (APS : ความเข้มข้น 20% 350 ไมโครลิตร ซึ่งเตรียมจาก การละลาย ammonium persulphate 2.0 กรัม ในน้ำ 10 มิลลิลิตร) ผสมรวมกัน จากนั้นแบ่งสารละลายเจลปริมาตร 6 มิลลิลิตร เทลงบน polyester support film ขนาด 240 × 180 × 0.12 มิลลิเมตร ที่วางบนกระจก ใช้เทปพันสายไฟปิดทับสองด้านของขอบกระจกอีกแผ่นที่ใช้ในการปิดเจลเพื่อเป็น spacer สำหรับกำหนดความหนาของเจล เคลือบผิวกระจกนี้ด้วย Gel – slick®(Serva) เพื่อป้องกันกระจกติดกับเจล หลังจากเจลแข็งตัว ปิดกระจกนี้ทับลงบนแผ่น polyester support film ที่มีสารละลายเจลอยู่ให้น้ำหนักกระจกกดทับให้สารละลายเจล กระจายตัวเต็มแผ่นฟิล์มวางเจลไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จึงแกะกระจกด้านบนออก จากนั้นลอกเอาแผ่นฟิล์มที่มีเจลบาง ๆ ติดอยู่ด้านบนนำไปใช้ในการทำ electrophoresis

1.7 การทำ electrophoresis

นำโปรตีนที่สกัดได้จากข้อ 1.4 มาทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค isoelectric focusing โดยนำแผ่นเจลวางบนเครื่อง IEF-SYS®(Scie-Plus) ซึ่งเชื่อมต่อกับเครื่องทำความเย็นด้วยระบบน้ำหล่อเย็น (HARVEST SC-972®) โดยปรับอุณหภูมิที่ผิวหน้าเจลให้ได้ 7-8 องศาเซลเซียส ตัดกระดาษ 3 MM® ขนาด 1 x 25 เซนติเมตร เพื่อใช้เป็นแผ่น anode และแผ่น cathode หยดสารละลาย anode และ cathode ให้ชุ่มแผ่นกระดาษนั้น (แยกชนิดสารละลายชนิดละแผ่น) วางแผ่น anode ที่ขอบเจล ด้านล่าง และแผ่น cathode ที่ขอบเจล ด้านบน จากนั้นวาง application strip ขนาด 52 หลุม ลงบนแผ่นเจลให้ห่างจากแผ่น anode ประมาณ 1.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 6) และหยดสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ 8 ไมโครลิตร และน้ำ 12 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม จากนั้นประกอบขั้วไฟฟ้าเพื่อทำ electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 ตำแหน่งการวางอุปกรณ์ต่าง ๆ ในการทำ electrophoresis โดยใช้เครื่อง IEF-SYS® (Scie-Plus)

เมื่อครบตามเวลานำแผ่น polyester support film ที่มีเจลติดอยู่มาตรึงโปรตีนด้วยสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 12% (w/v) เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปย้อมแถบโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue (Coomassie R250 (SERVA) 0.15 กรัม Coomassie G250 (SERVA) 0.45 กรัม acetic acid 99% 110 มิลลิลิตร ethanol 95% 180 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร) นาน 15 นาที จากนั้นนำไปล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วย destaining solution (ethanol 95% 300 มิลลิลิตร acetic acid 99% 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร) นานประมาณ 10 นาที จึงนำไปล้างด้วยน้ำอีก 5 นาที นำเจลไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแห้งติดอยู่กับแผ่นฟิล์ม จึงปิดทับเจลด้วยสติ๊กเกอร์ใสเพื่อการเก็บรักษาเจล

1.8 วิธีการวิเคราะห์ผล

1.8.1 การวิเคราะห์แถบโปรตีน (electrophoretogram)

วิเคราะห์ผลเพื่อตัดสินใจเลือกกรรมวิธีที่เหมาะสมโดยเปรียบเทียบลักษณะแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นด้วยตาเปล่า ซึ่งจะมีจำนวนแถบและลักษณะของแถบผันแปรไปตามตัวทำละลายร่วมกับ pH ของเจลที่ใช้ โดยที่กรรมวิธีที่มีประสิทธิผลจะให้ภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) ของแถบโปรตีนที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้โดยลักษณะความคมชัดของแถบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โปรตีน จำนวนแถบโปรตีนทั้งหมด และจำนวนแถบโปรตีนที่สามารถใช้เป็นเอกลักษณ์ของแต่ละพันธุ์

1.8.2 วิเคราะห์ประสิทธิภาพของตัวทำละลายและช่วง pH ในการแยกความแตกต่างของพันธุ์แตงกวา

ทำการวิเคราะห์แถบโปรตีนที่แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์โดยเฉลี่ยต่อเจลของแต่ละช่วง pH ได้โดยเฉลี่ยจำนวนแถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ของทั้ง 4 ตัวทำละลายในแต่ละช่วง pH ดังสมการที่ 9

$$\text{แถบโปรตีนเฉลี่ย} = \frac{\sum P}{4} \qquad \text{(9)}$$

เมื่อ P คือ จำนวนแถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ ของทั้ง 4 ตัวทำละลายในแต่ละช่วง pH ที่นำมาทดลอง

และพิจารณาประสิทธิภาพในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์เป็นคู่ด้วยแถบโปรตีนโดยอาศัยหลักที่ว่า พันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบทั้ง 2 พันธุ์จะแยกออกจากกันได้ออกจากกันได้ต้องมีแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง โดยทั้ง 4 พันธุ์ปลูกที่นำมาทดสอบ สามารถเปรียบเทียบเป็นคู่ได้ทั้งหมด 6 คู่ ซึ่งคำนวณได้ดังสมการที่ 10

$$\text{จำนวนคู่ที่นำมาเปรียบเทียบ} = \frac{C!}{(C-2)!\,2!} \text{ คู่} \qquad \text{(10)}$$

เมื่อ C คือจำนวนพันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบ (4 พันธุ์ปลูก)

โดยที่ประสิทธิภาพในการจำแนกนั้นพิจารณาจาก อัตราการแยกพันธุ์ที่นำมาทดสอบทั้ง 6 คู่ออกจากกันได้ ยกตัวอย่างเช่น ถ้ากรรมวิธีที่ 1 พบแถบโปรตีนที่สามารถแยกพันธุ์ที่นำมาทดสอบทั้ง 6 คู่ออกจากกันได้ 3 คู่ ดังนั้นในกรณีนี้กรรมวิธีดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพในการจำแนกคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค UTLIEF ในการจำแนกสายพันธุ์แตงกวา

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค UTLIEF ในการจำแนกแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ

หลังจากศึกษาหาตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนในเมล็ดของแตงกวาเพื่อการจำแนกพันธุ์ และช่วง pH ของเจลในการทำ electrophoresis ที่เหมาะสมแล้วในการทดลองนี้จึงนำวิธีการมาทดสอบจำแนกแตงกวาพันธุ์การค้าที่มีจำหน่ายโดยทั่วไปรวมทั้งหมดจำนวน 8 พันธุ์ ปลูก ได้แก่เมล็ดพันธุ์ลูกผสมพันธุ์ไฉไลและพันธุ์ภูฟ้า ของบริษัท เจียไต๋ จำกัด และพันธุ์บิงโก ของบริษัท ที เอส เอ จำกัด รวมทั้งเมล็ดพันธุ์ผสมปล่อย 5 พันธุ์ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน ได้แก่พันธุ์ CS017 CS018 CS054 CS059 และ CS091 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของตัวทำละลายและ pH ของเจลที่พัฒนาขึ้น โดยนำตัวอย่างแตงกวาแต่ละพันธุ์มาบดให้ละเอียดด้วยวิธีบดรวมเมล็ด โดยสกัดโปรตีนที่สะสมในเมล็ดตามวิธีการในข้อ 1.4 จากนั้นนำมาทดสอบความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการ 1.5 เพื่อปรับปริมาณตัวอย่างสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดพันธุ์แต่ละพันธุ์ให้ใกล้เคียงกัน แล้วจึงนำมาแยกความแตกต่างของโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF ตามวิธี 1.7 หลังจากการทำ electrophoresis เรียบร้อยแล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของวิธีการในการแยกความแตกต่างของพันธุ์แตงกวาโดยพิจารณาประสิทธิภาพในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์เป็นคู่ตามวิธีการ 1.8.2 เพื่อยืนยันว่าตัวทำละลายและ pH ของเจลดังกล่าวมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้แยกความแตกต่างของพันธุ์หรือสายพันธุ์แตงกวาด้วยเทคนิค UTLIEF ได้

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค UTLIEF ในการทดสอบความเป็นลูกผสม (hybridity test) ของแตงกวา

นำตัวทำละลายที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนในเมล็ดแตงกวา และช่วง pH ของเจลที่เหมาะสมในการทำ electrophoresis มาทดสอบประสิทธิภาพในการทดสอบความเป็นลูกผสม (hybridity) ของพันธุ์แตงกวาโดยใช้สายพันธุ์แท้ (inbreed line) ของ พ่อ-แม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ #01 #02 #03 #04 #05 #06 #07 #08 #09 และ #10 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เชื้อพันธุ์จากบริษัท ที เอส เอ จำกัด (Thai Seed & Agriculture Co.,Ltd.) ทำการจำแนกโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF นำเมล็ดแตงกวาดังกล่าวมาบดแบบเมล็ดเดี่ยวทั้งเมล็ด (single seed) จากนั้นนำไปสกัดโปรตีนด้วยตัวทำละลายและทำ electrophoresis ด้วย pH ของเจลที่ได้ศึกษาไว้ในการทดลองที่ 1 ปรับปริมาตรตัวทำละลายให้เหมาะสมโดยคำนวณจากสัดส่วนเมล็ดแตงกวาที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บดเรียบร้อยแล้ว 200 มิลลิกรัมต่อตัวทำละลาย 500 ไมโครลิตร โดยใช้วิธีการตามข้อ 1.5 โดยใช้ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford เพื่อปรับความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันสำหรับหยดลงในแต่ละหลุมบน application strip (ภาพผนวกที่ 2 และ ตารางผนวกที่ 8)

เมื่อปรับปริมาณของสารละลายโปรตีนแล้ว นำไปทำ electrophoresis ตามวิธี 1.7 โดยหยดสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ลงไปเรียงตามลำดับจากซ้ายไปขวา คือ สายพันธุ์แม่ สายพันธุ์ที่ต้องการทดสอบความเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 และสายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์ละ 5 10 และ 5 หลุมตามลำดับ สารละลายโปรตีนที่หยดใน 1 หลุมมาจาก 1 เมล็ด

การวิเคราะห์ผลการทดสอบความเป็นลูกผสม

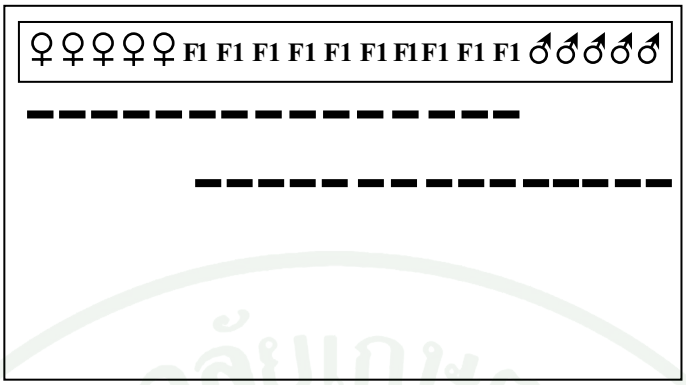
วิเคราะห์ความเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 ของเมล็ดพันธุ์ที่สกัดโปรตีนมาหยดในแต่ละหลุมโดยใช้เกณฑ์การพิจารณาดังนี้

1. ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เป็นลูกผสมอย่างแท้จริง จะมีแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อซึ่งสายพันธุ์แม่ไม่มี และที่ได้จากสายพันธุ์แม่ที่พ่อไม่มี (ภาพที่ 7)

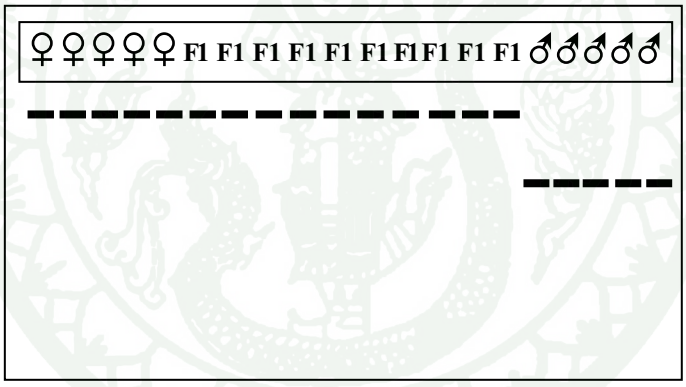
2. ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เกิดจากสายพันธุ์แม่ผสมตัวเอง (self pollination) โดยจะมีแถบโปรตีนเหมือนสายพันธุ์แม่ทุกประการ (ภาพที่ 8)

3. ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ไม่ทราบสายพันธุ์ เนื่องจากไม่มีแถบโปรตีนที่ได้จากสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่ (ภาพที่ 9)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

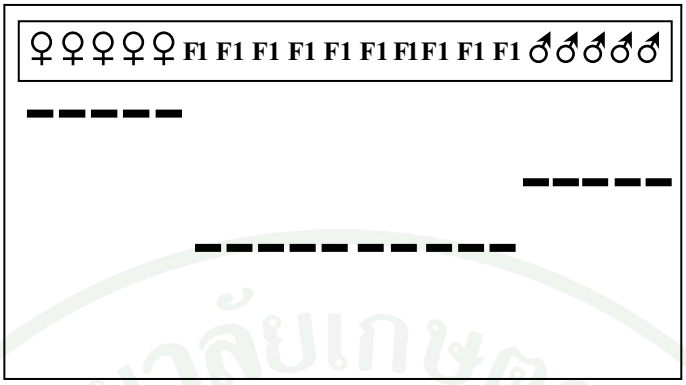


ภาพที่ 7 ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เป็นลูกผสมอย่างแท้จริง (ลำดับการหยดสารละลายโปรตีนเพื่อการทดสอบความเป็นลูกผสม♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ **F1** คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1)



ภาพที่ 8 ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่เกิดจากสายพันธุ์แม่ผสมตัวเอง (ลำดับการหยดสารละลายโปรตีนเพื่อการทดสอบความเป็นลูกผสม♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ **F1** คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 ลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ไม่ทราบสายพันธุ์ (ลำดับการหยดสารละลายโปรตีนเพื่อการทดสอบความเป็นลูกผสม ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ **F1** คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชและการถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาทำการวิจัย

ตุลาคม พ.ศ. 2551 ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2552

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

การทำ electrophoresis กับโปรตีนในเมล็ดด้วยเทคนิค UTLIEF เป็นการแยกโปรตีนในเมล็ดบนแผ่นเจลที่มีความหนาเพียง 0.15 มิลลิเมตร โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่มีประจุสุทธิเป็นบวกหรือลบเข้าหาขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงกันข้ามบนแผ่นเจลที่มี pH gradient ที่กำหนด โปรตีนจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อถึงจุดที่ค่า pH บนแผ่นเจลมีค่าเท่ากับ pI ของโปรตีนที่ประจุสุทธิเป็นศูนย์ โปรตีนต่างชนิดกันมีค่า pI ต่างกันจึงหยุดเคลื่อนที่ตำแหน่งต่างกัน ทำให้เกิดการแยกออกจากกันบนแผ่นเจลได้ พันธุ์พืชต่างสายพันธุ์มีโอกาสจะมีโปรตีนสะสมในเมล็ดต่างชนิดกัน เมื่อทำการแยกโปรตีนบนแผ่นเจล จึงมีโอกาสได้เอกลักษณ์โปรตีนที่ต่างกันทำให้จำแนกสายพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการจำแนกขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ระยะเวลาในการทำ electrophoresis กระแสไฟฟ้าที่ใช้ขณะทำ electrophoresis ชนิดของตัวทำละลาย และ pH gradient ของเจล เหล่านี้เป็นต้น (Leist and Knobluch, 2003) ซึ่งการทำการทดลองในครั้งนี้เลือกทำการศึกษาปัจจัยตัวทำละลาย และ ช่วง pH ของเจลเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมของปัจจัยทั้งสองในการจำแนกสายพันธุ์แตงกวา

1. การศึกษาตัวทำละลาย และ pH ของเจล acrylamide ที่มีผลต่อการแยกโปรตีนในเมล็ดพันธุ์แตงกวาด้วยเทคนิค UTLIEF เพื่อใช้แยกความแตกต่างของพันธุ์

1.1 ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการ Bradford protein assay

เมื่อนำโปรตีนที่ได้จากการสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด คือ ได้แก่ น้ำ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์ และ เกลือแกง 5 มิลลิโมลาร์ มาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการ Bradford protein assay ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 3

ผลดังกล่าวสอดคล้องกับคุณสมบัติการละลายของโปรตีนคือโปรตีนโดยทั่วไปสามารถละลายน้ำได้ดี และจะละลายได้ดีขึ้นเมื่อเติมเกลืออนินทรีย์ลงไปเล็กน้อย (salting in) เนื่องจากในสภาพดังกล่าวไอออนของเกลือจะมีโมเลกุลของน้ำติดอยู่ และเมื่อไอออนของเกลือเข้าไปล้อมรอบโปรตีนจะทำให้โปรตีนจับกับน้ำและละลายน้ำได้ดีขึ้น แต่ถ้าความเข้มข้นของเกลือมีมากเกินไปจะส่งผลให้การละลายของโปรตีนลดลงเพราะเกิดการแย่งน้ำระหว่างไอออนของเกลือและโมเลกุลของโปรตีนเป็นผลให้การละลายของโปรตีนลดลง (salting out) ดังนั้นความเข้มข้นของเกลือจึงมีผล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อย่างมากต่อการละลายของโปรตีน (อาภัสสรา, 2537(ก); Deutscher, 1990; Janson and Ryden, 1998) จากผลการทดลองจึงเห็นได้ว่าฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่มีเกลืออนินทรีย์ผสมอยู่มาก สามารถละลายโปรตีนออกมาได้มากกว่าน้ำ รวมทั้ง Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์ และ NaCl 5 มิลลิโมลาร์ซึ่งเป็นเกลือกลาง (neutral salt) ที่ต้องเข้มข้น 0.5-1 โมลาร์จึงจะส่งผลให้การละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นตามทฤษฎี นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนที่สกัดได้จากแตงกวาที่นำมาทดสอบในทุกตัวทำละลายมีค่ามากกว่าความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนที่สกัดได้จากข้าวโพดหวานซึ่งใช้วิธีการสกัดโปรตีนใกล้เคียงกันเล็กน้อย (ประกาย, 2550ค) โดยความเข้มข้นเฉลี่ยของโปรตีนที่สกัดได้จากแตงกวาและข้าวโพดหวานเท่ากับ 2.72 และ 1.45 ไมโครกรัม / ไมโครลิตร ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวาด้วยน้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์ และ NaCl 5 มิลลิโมลาร์

พันธุ์ปลูก	ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ (ไมโครกรัม / ไมโครลิตร)			
	น้ำ	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์	NaCl 5 มิลลิโมลาร์
ไมโครซี	2.67	2.77	2.65	2.59
บิ๊กซี	3.13	2.67	2.39	2.26
โชคดี	2.51	3.93	2.27	2.32
บุษบา 2005	2.25	4.64	2.57	1.92

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 ผลการแยกแถบโปรตีนโดยทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค UTLIEF ของทั้ง 8 กรรมวิธี

การศึกษาในครั้งนี้เลือกศึกษาปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือตัวทำละลายและช่วง pH ของเจล ตัวทำละลายที่ดีคือตัวทำละลายที่สามารถสกัดโปรตีนชนิดที่ให้ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ ขณะที่ช่วง pH ของเจลที่เหมาะสมคือช่วง pH ที่ทำให้เกิดการแยกของแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ได้ ในการศึกษาเลือกใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ น้ำ ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์และ เกลือแกง 5 มิลลิโมลาร์ และศึกษาช่วง pH ของเจล ในการทำ electrophoresis 2 ช่วงคือ 2-11 และ 4-5/3-10 ซึ่งเมื่อรวม 2 ปัจจัยเข้าด้วยกันได้เป็น 8 กรรมวิธี นำไปทดสอบการแยกโปรตีนในเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์การค้า (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดีและบุษบา 2005) ซึ่งมีผลการทดลองดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1 ใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 2-11 ร่วมกับการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย พบแถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ จำนวน 7 ตำแหน่ง โดยพันธุ์ไมโครซีพบแถบโปรตีนครบทุกตำแหน่งยกเว้นตำแหน่งที่ 3 พันธุ์บิ๊กซีพบแถบโปรตีนที่ตำแหน่ง 3 และ 6 พันธุ์โชคดีพบที่ตำแหน่ง 2 4 5 และ 6 ขณะที่พันธุ์บุษบา 2005 พบที่ตำแหน่ง 2 4 5 และ 7 ลักษณะดังกล่าวทำให้สามารถแยกทั้ง 4 พันธุ์ที่นำมาทดสอบออกจากกันได้ (ภาพที่ 10)

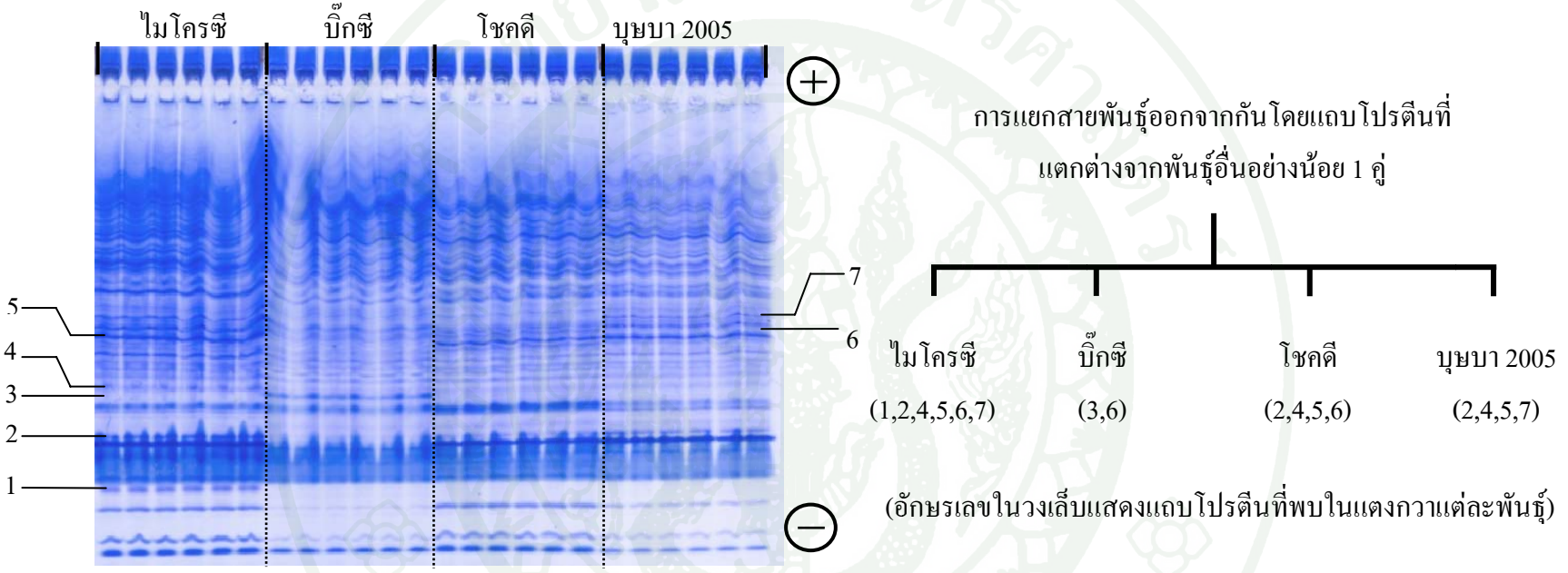
กรรมวิธีที่ 2 ใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 2-11 ร่วมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลาย พบแถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ จำนวน 4 ตำแหน่ง โดยพันธุ์ไมโครซีและพันธุ์บุษบา 2005 พบแถบโปรตีนครบทุกตำแหน่ง พันธุ์โชคดีพบที่ตำแหน่ง 2 3 และ 4 ขณะที่พันธุ์บิ๊กซีไม่พบแถบโปรตีนที่ตำแหน่งใด ๆ เหล่านี้ทำให้สามารถแยกทั้ง 4 พันธุ์ที่นำมาทดสอบออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่พันธุ์บิ๊กซี พันธุ์โชคดี และกลุ่มของพันธุ์ไมโครซีกับพันธุ์บุษบา 2005 ที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ (ภาพที่ 11)

กรรมวิธีที่ 3 ใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 2-11 ร่วมกับการใช้ Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์เป็นตัวทำละลาย พบแถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ จำนวน 2 ตำแหน่ง โดยพันธุ์ไมโครซีและพันธุ์บุษบา 2005 พบแถบโปรตีนครบทุกตำแหน่ง ขณะที่พันธุ์บิ๊กซีและพันธุ์โชคดีไม่พบแถบโปรตีนที่ตำแหน่งใด ๆ เลย ทำให้สามารถแยกทั้ง 4 พันธุ์ที่นำมาทดสอบออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มของพันธุ์ไมโครซีและพันธุ์บุษบา 2005 กับกลุ่มของพันธุ์บิ๊กซีและพันธุ์โชคดี (ภาพที่ 12)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

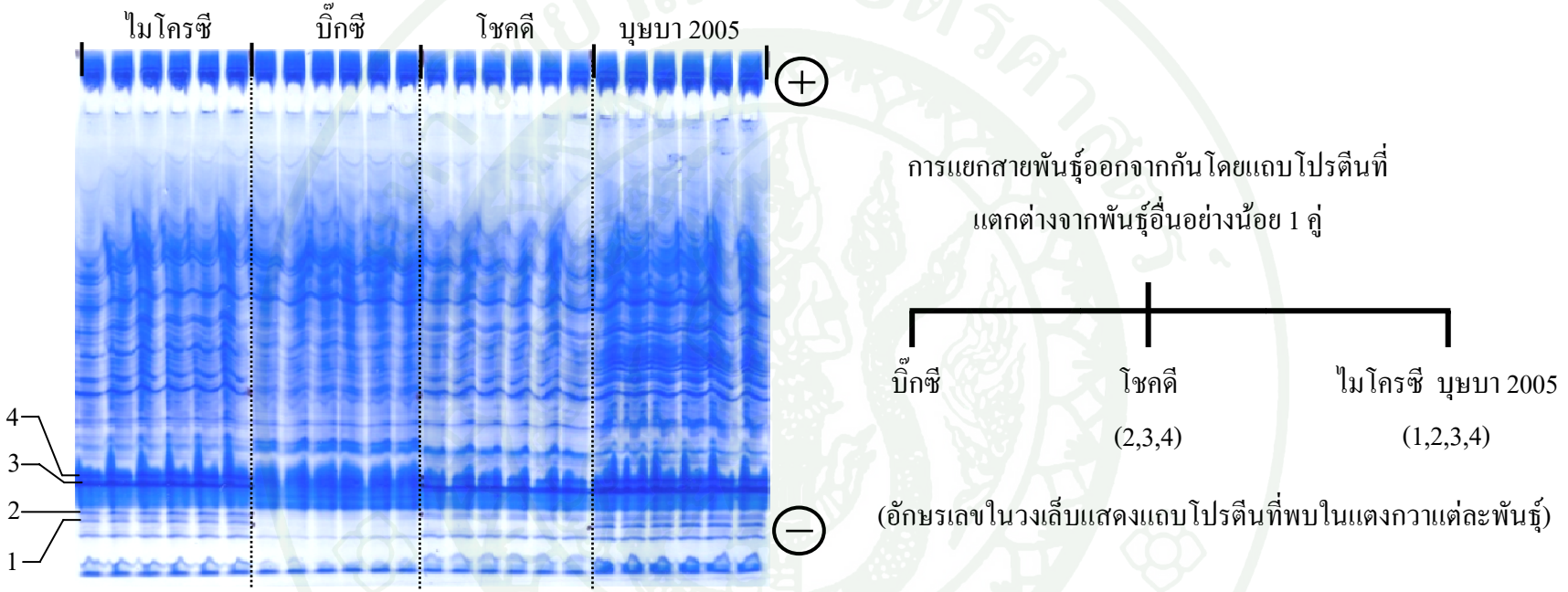
กรรมวิธีที่ 4 ใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 2-11 ร่วมกับการใช้ NaCl 5 มิลลิโมลาร์เป็นตัวทำละลาย พบแถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ จำนวน 2 ตำแหน่ง โดยพันธุ์ไมโครซี พันธุ์โชคดีและพันธุ์บุษบา 2005 พบแถบโปรตีนที่ตำแหน่ง 1 2 3 และ 5 ขณะที่พันธุ์บิ๊กซีพบแถบโปรตีนในตำแหน่งที่ 4 ทำให้สามารถแยกทั้ง 4 พันธุ์ที่นำมาทดสอบออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ พันธุ์บิ๊กซี และกลุ่มของพันธุ์ไมโครซี พันธุ์โชคดีและพันธุ์บุษบา 2005 ที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ (ภาพที่ 13)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



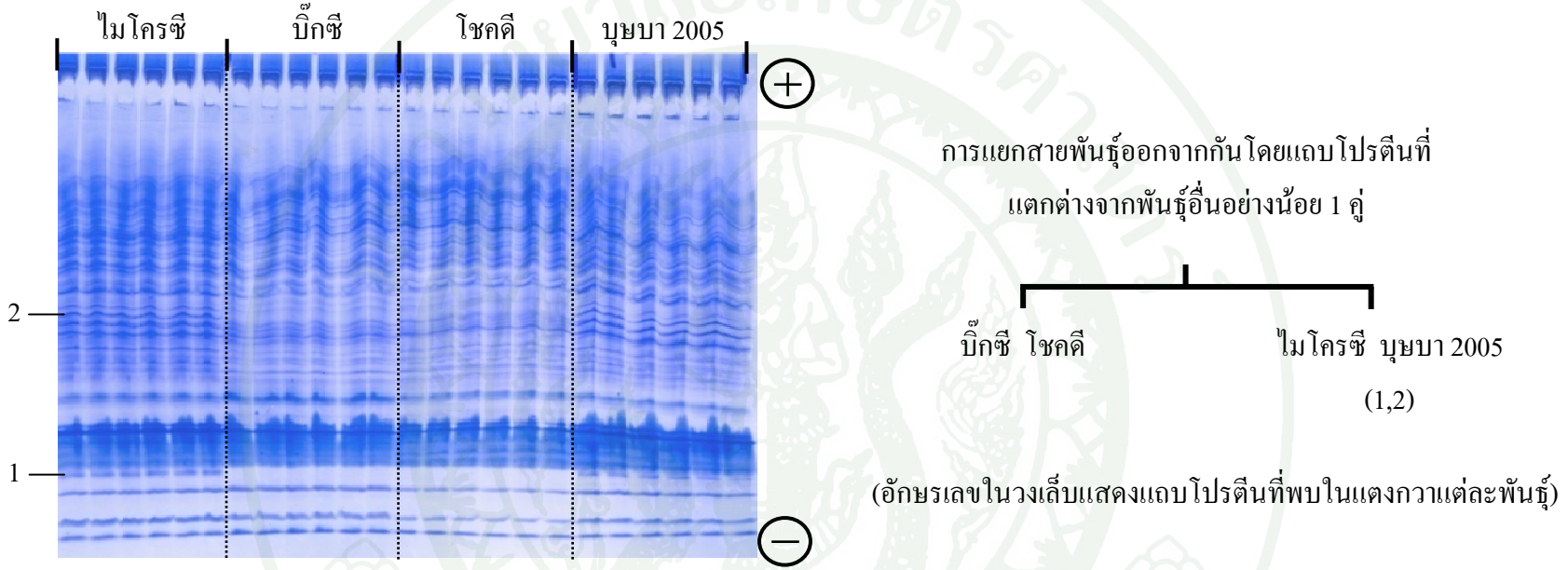
ภาพที่ 10 ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์ปลูก (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วยน้ำและทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 2-11 ขวา : แถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ซึ่งพบในแต่ละพันธุ์ ⊕ = anod ⊖ = cathode

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



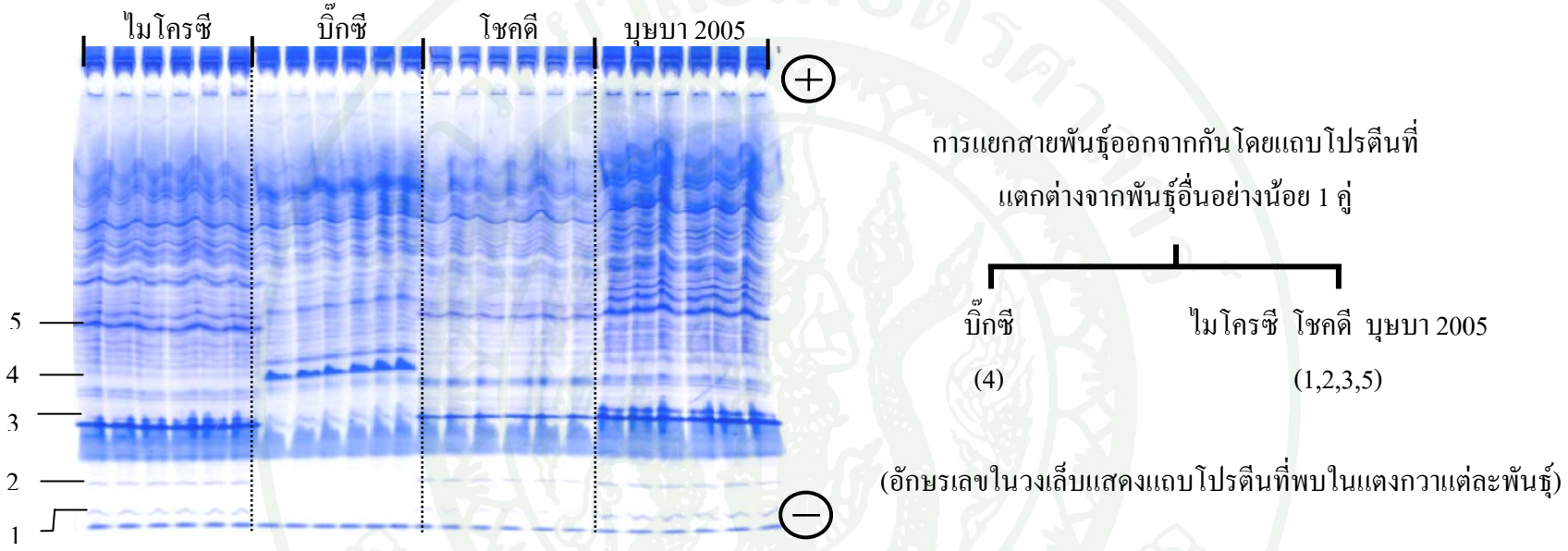
ภาพที่ 11 ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์ปลูก (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 2-11 ขวา : แถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ซึ่งพบในแต่ละพันธุ์⊕ = anode⊖ = cathode

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 12 ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์ปลูก (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วย Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์ และทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 2-11 ขวา : แถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ซึ่งพบในแต่ละพันธุ์ ⊕ = anode ⊖ = cathode

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 13 ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์ปลูก (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วย NaCl 5 มิลลิโมลาร์ และทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 2-11 ขวา : แถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ซึ่งพบในแต่ละพันธุ์ ⊕ anode ⊖= cathode

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

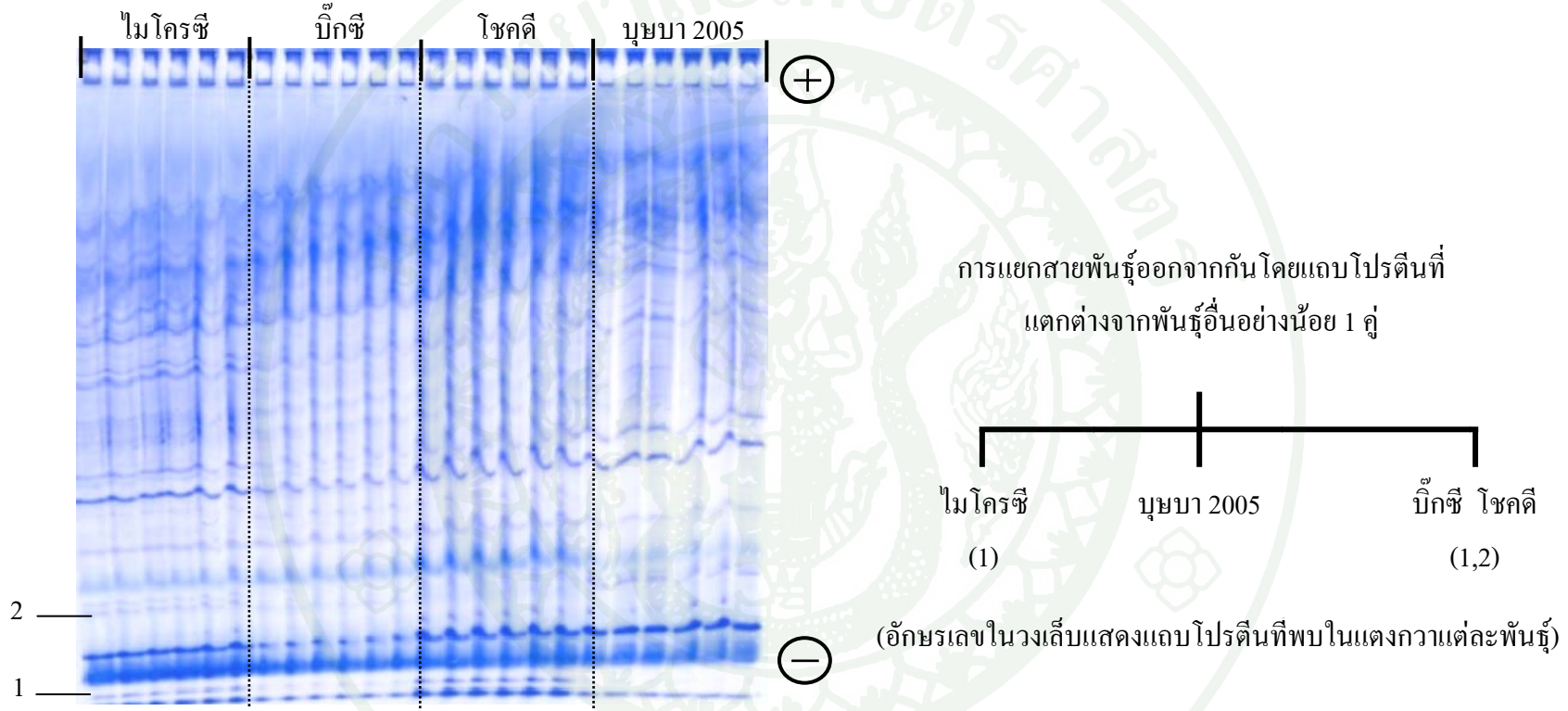
กรรมวิธีที่ 5 ใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 4-5/3-10 ร่วมกับการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย พบแถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ จำนวน 2 ตำแหน่ง โดยพันธุ์บิ๊กซีและพันธุ์โชคดี พบแถบโปรตีนครบทุกตำแหน่ง พันธุ์ไมโครซีพบที่ตำแหน่ง 1 ขณะที่พันธุ์บุษบา 2005 ไม่พบแถบโปรตีนที่ตำแหน่งใด ๆ เหล่านี้ทำให้สามารถแยกทั้ง 4 พันธุ์ที่นำมาทดสอบออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ พันธุ์ไมโครซี พันธุ์บุษบา 2005 และกลุ่มของพันธุ์บิ๊กซี และพันธุ์โชคดีที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ (ภาพที่ 14)

กรรมวิธีที่ 6 ใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 4-5/3-10 ร่วมกับการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลาย พบแถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ จำนวน 3 ตำแหน่ง โดยพันธุ์ไมโครซี พันธุ์โชคดีและพันธุ์บิ๊กซี พบแถบโปรตีนที่ตำแหน่ง 1 2 และ 3 ขณะที่พันธุ์บุษบา 2005 ไม่พบแถบโปรตีนในตำแหน่งใด ๆ ทำให้สามารถแยกทั้ง 4 พันธุ์ที่นำมาทดสอบออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่พันธุ์บุษบา 2005 และกลุ่มของพันธุ์ไมโครซี พันธุ์โชคดีและพันธุ์บิ๊กซี ที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ (ภาพที่ 15)

กรรมวิธีที่ 7 ใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 4-5/3-10 ร่วมกับการใช้ Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์เป็นตัวทำละลาย พบแถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ จำนวน 1 ตำแหน่ง โดยแถบโปรตีนดังกล่าวพบเฉพาะในพันธุ์ไมโครซี ขณะที่พันธุ์บิ๊กซี พันธุ์โชคดี และพันธุ์บุษบา 2005 ไม่พบแถบโปรตีนในตำแหน่งใด ๆ ทำให้สามารถแยกทั้ง 4 พันธุ์ที่นำมาทดสอบออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่พันธุ์ไมโครซี และกลุ่มของพันธุ์บิ๊กซี พันธุ์โชคดีและพันธุ์บุษบา 2005 ที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ (ภาพที่ 16)

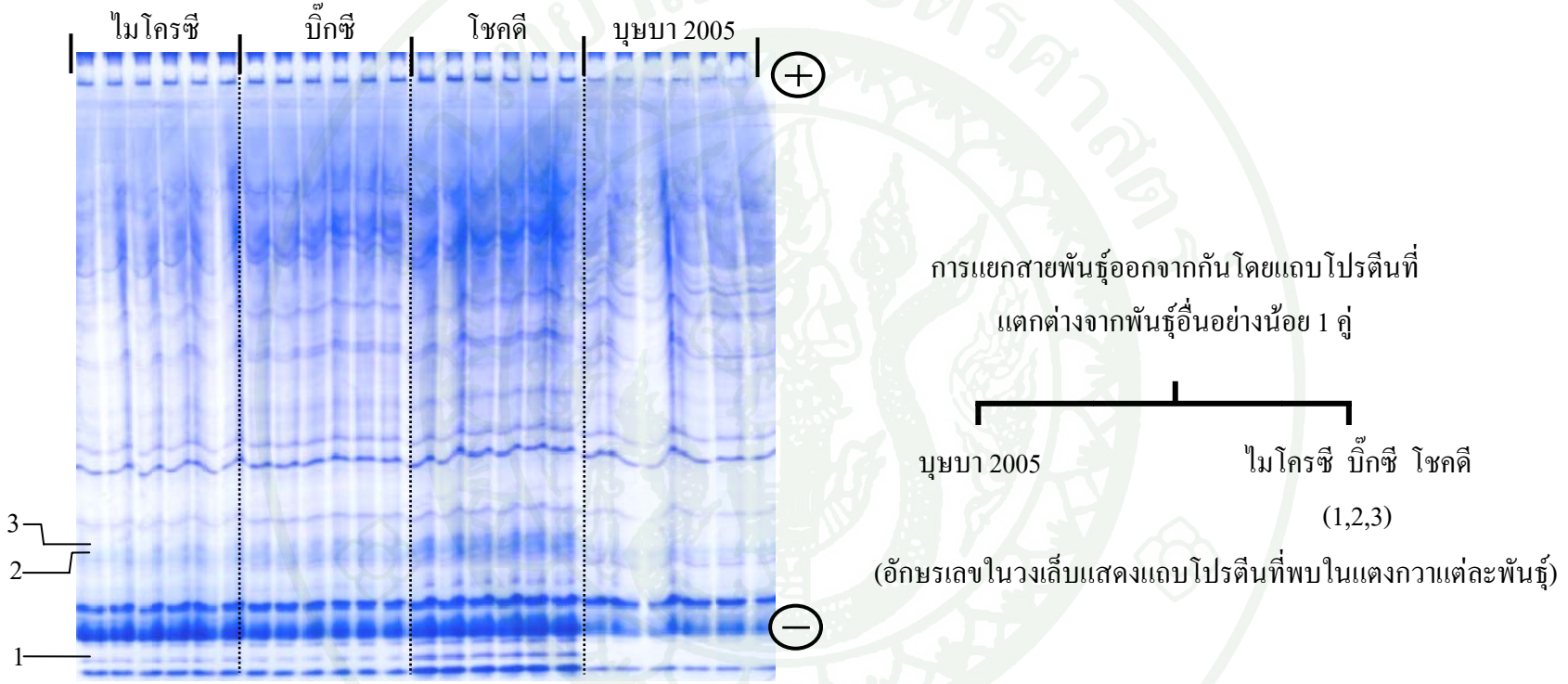
กรรมวิธีที่ 8 ใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 4-5/3-10 ร่วมกับการใช้ NaCl 5 มิลลิโมลาร์เป็นตัวทำละลาย ไม่พบความแตกต่างของแถบโปรตีน จึงไม่สามารถแยกทั้ง 4 พันธุ์ที่นำมาทดสอบออกจากกันได้ (ภาพที่ 17)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



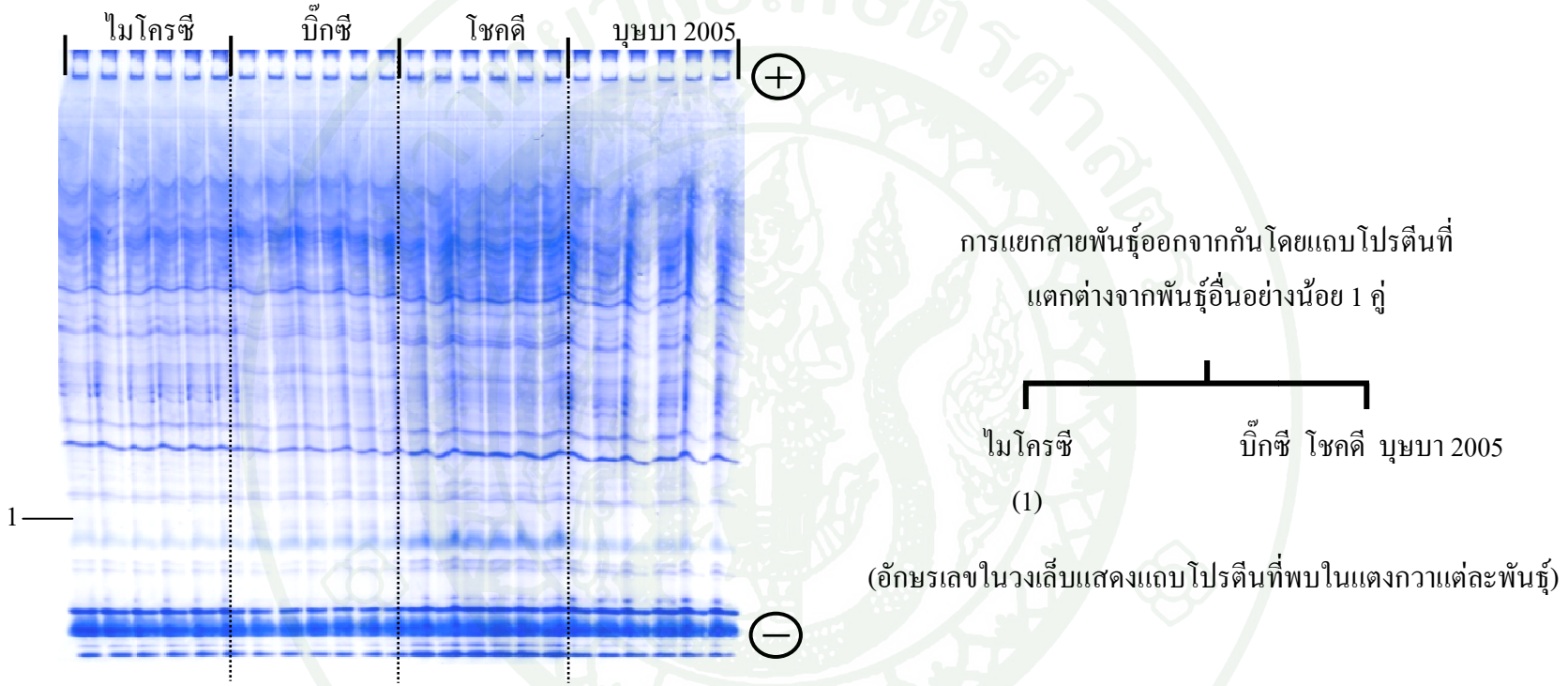
ภาพที่ 14 ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 ปลูกพันธุ์ (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วยน้ำ และทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 4-5/3-10 ขวา : แถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ซึ่งพบในแต่ละพันธุ์ ⊕ = anode ⊖ = cathode

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



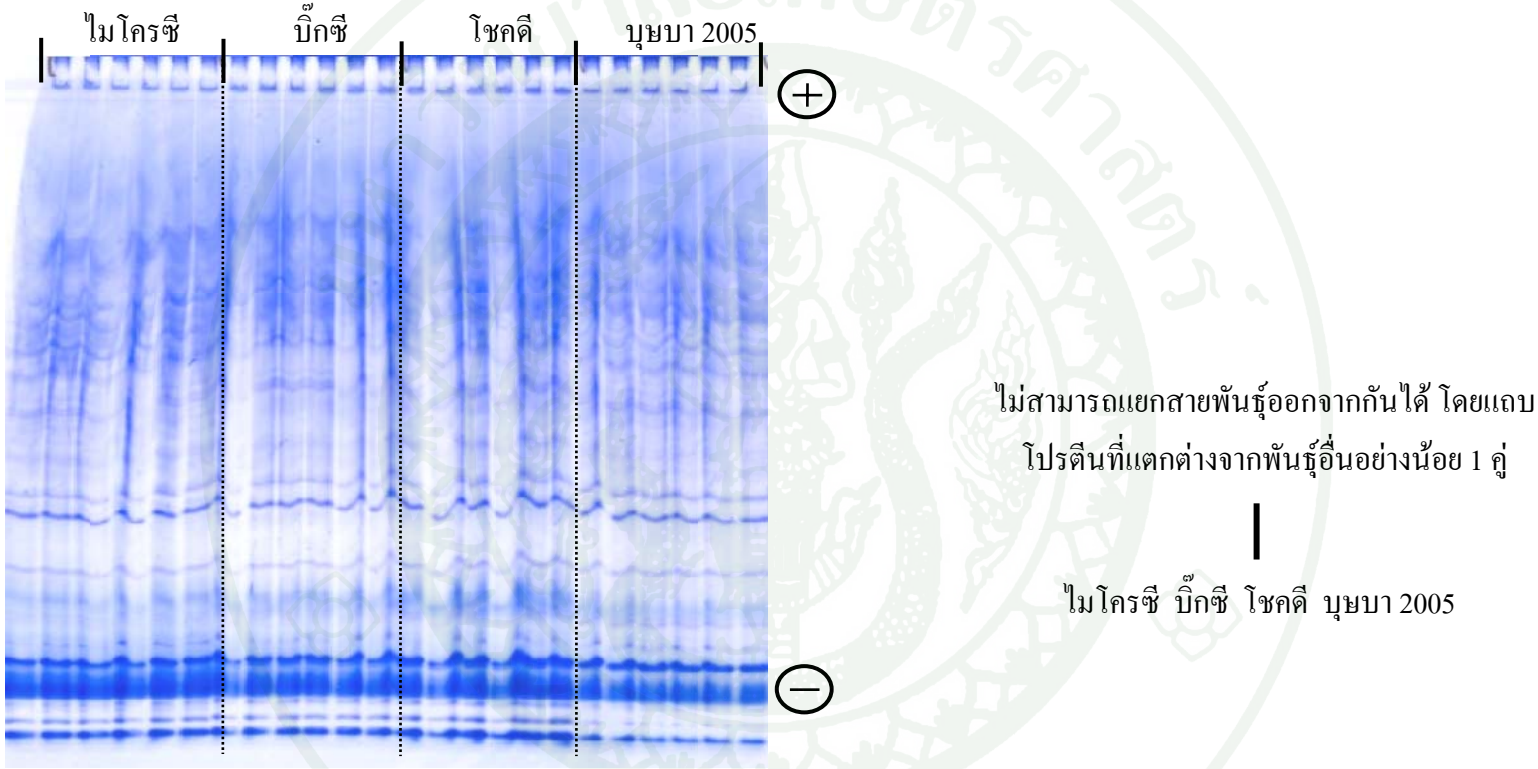
ภาพที่ 15 ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์ปลูก (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 4-5/3-10 ขวา : แถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ซึ่งพบในแต่ละพันธุ์ ⊕= anode ⊖ = cathode

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์ปลูก (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วย Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์ และทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 4-5/3-10 ขวา : แถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ซึ่งพบในแต่ละพันธุ์ ⊕ = anode ⊖ = cathode

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 17 ซ้าย : แถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา 4 พันธุ์ปลูก (ไมโครซี บิ๊กซี โชคดี และ บุษบา 2005) ซึ่งสกัดโปรตีนด้วย NaCl 5 มิลลิโมลาร์และทำ UTLIEF ด้วยช่วง pH บนเจล 4-5/3-10 ขวา : ไม่พบแถบโปรตีนที่แตกต่างจากพันธุ์อื่นอย่างน้อย 1 คู่ ⊕= anode ⊖= cathode

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อเปรียบเทียบผลของ pH ของเจลระหว่าง pH 2-11 (กรรมวิธีที่ 1-4) กับ pH 4-5/3-10 (กรรมวิธีที่ 5-8) พบว่าทั้งสองช่วง pH ให้จำนวนแถบโปรตีนทั้งหมดใกล้เคียงกัน (25-30 แถบ) แต่กรรมวิธีที่ใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 2-11 ให้ความคมชัดและจำนวนแถบโปรตีนที่สามารถใช้เป็นเอกลักษณ์ของแต่ละพันธุ์ได้มากกว่ากรรมวิธีที่ใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 4-5/3-10 โดยเจลที่ใช้ช่วงค่า pH 2-11 พบแถบโปรตีนที่บอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์เฉลี่ย 5.75 แถบต่อเจล ขณะที่การใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 4-5/3-10 มี 1.50 แถบต่อเจลโดยเฉลี่ย (สมการที่ 9)

พิจารณาประสิทธิภาพในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์เป็นคู่ ด้วยแถบโปรตีนโดยอาศัยหลักที่ว่าการแยกพันธุ์ 2 พันธุ์ออกจากกันได้ พันธุ์ทั้งสองต้องมีแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง พบว่าที่กรรมวิธีที่ 1 สามารถแยกแตงกวา 4 พันธุ์ที่นำมาเปรียบเทียบกันเป็นคู่ ๆ ได้ทั้งหมด 6 คู่ (สมการที่ 10) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งกรรมวิธีดังกล่าวสามารถแยกแตงกวาทั้ง 4 พันธุ์ที่นำมาทดสอบออกจากกันได้ทั้งหมด ทำให้กรรมวิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการจำแนกคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กรรมวิธีที่ 2 สามารถแยก 4 พันธุ์ที่นำมาทดสอบออกจากกันได้ 5 คู่จากทั้งหมด 6 คู่ ทำให้ประสิทธิภาพในการจำแนกคิดเป็น 83.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกรรมวิธีที่เหลืออื่น ๆ แสดงผลดังตารางที่ 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 จำนวนแถบโปรตีนที่บอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ และประสิทธิภาพในการจำแนกเมื่อทำการเปรียบเทียบเป็นคู่ ของ 8 กรรมวิธีที่ทดสอบ

กรรมวิธี	โปรตีนที่มีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์	ประสิทธิภาพการจำแนกเมื่อเปรียบเทียบเป็นคู่ (เปอร์เซ็นต์)
1 น้ำ ร่วมกับ pH 2-11	7	100
2 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ร่วมกับ pH 2-11	4	83.33
3 Na_2EDTA ร่วมกับ pH 2-11	2	66.66
4 NaCl ร่วมกับ pH 2-11	5	50.00
5 น้ำ ร่วมกับ pH 4-5/3-10	2	83.33
6 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ร่วมกับ pH 4-5/3-10	3	50.00
7 Na_2EDTA ร่วมกับ pH 4-5/3-10	1	50.00
8 NaCl ร่วมกับ pH 4-5/3-10	0	0.00

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โปรตีนที่สะสมในเมล็ดพืชวงศ์แตงส่วนใหญ่คือ globulin (Vickery *et al.,* 1941) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายในสารละลายเกลือเจือจาง อาจเป็นเหตุให้ตัวทำละลายที่มีเกลืออนินทรีย์ผสมอยู่จะละลาย globulin ซึ่งมีอยู่โดยทั่วไปในเมล็ดพันธุ์แตงกวาที่นำมาทดลองทั้ง 4 พันธุ์ปลูก ทำให้พบแถบโปรตีนที่บอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์น้อย ต่างกับน้ำที่ละลายโปรตีนออกมาได้น้อยกว่าการใช้ตัวทำละลายที่มีเกลืออนินทรีย์ผสมอยู่ แต่แถบโปรตีนที่ได้สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์แตงกวาที่ทดสอบได้มากกว่า ทั้งนี้ตัวทำละลายที่เหมาะสมสำหรับการสกัดโปรตีนเพื่อนำมาใช้จำแนกพันธุ์หรือสายพันธุ์พืชโดยอาศัยความแตกต่างของแถบโปรตีนนั้นไม่จำเป็นจะต้องละลายโปรตีนออกมาได้มากเสมอไป แต่ควรจะละลายโปรตีนชนิดที่มีความจำเพาะของแต่ละพันธุ์เพื่อให้สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างของพันธุ์ได้ชัดเจน ดังนั้นการเลือกใช้ตัวทำละลายในการสกัดโปรตีนจึงมีความสำคัญมาก เพราะถ้าเลือกตัวทำละลายไม่เหมาะสมแม้จะสามารถละลายโปรตีนออกมาได้จำนวนมากแต่ก็ไม่สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ได้ จากการทดลองชี้ว่าโปรตีนที่ให้ความแตกต่างของพันธุ์แตงกวาที่นำมาทดสอบได้อาจเป็นโปรตีนจำพวก albumin เนื่องจากเป็นกลุ่มโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Degtyarenko *et al.* (1986) ที่ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของแตงกวาจำนวน 20 พันธุ์จากโปรตีนกลุ่ม globulin และ albumin พบว่าโปรตีนกลุ่ม albumin ให้แถบโปรตีนที่ได้สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์แตงกวาที่นำมาทดสอบได้ดีกว่า ซึ่งโดยทั่วไปในเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตงจะสะสม albumin ไว้ภายในใบเลี้ยง (Hara-Nishimura *et al.*, 1998) จากการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าสามารถใช้น้ำเป็นตัวทำละลายโปรตีนสำหรับการจำแนกความแตกต่างของพันธุ์แตงกวาด้วยเทคนิค UTLIEF ได้นอกจากนี้น้ำยังมีต้นทุนการวิเคราะห์ที่ต่ำ และมีผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าการใช้ 2-chloroethanol

การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค isoelectric focusing เป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของประจุของโปรตีน จุดที่โปรตีนหยุดเคลื่อนที่แล้วรวมกันเป็นแถบเข้มข้น ซึ่งจุดนี้เรียกว่าจุด isoelectric point เป็นจุดที่ pH มีค่าเท่ากับ pI ของสารละลายโปรตีนขณะนั้น (Righetti *et al*., 1990) เหตุนี้จึงสามารถพิจารณาค่า pI ของแถบโปรตีนจาก pH บนเจลได้ จากผลการวิเคราะห์แถบโปรตีนพบว่าโปรตีนที่สะสมอยู่ในเมล็ดพันธุ์แตงกวาส่วนใหญ่มีค่า pI อยู่ในช่วง pH 2-11 เพราะมีการกระจายตัวของแถบโปรตีนได้ดีในช่วง pH ของเจลดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่าช่วง pH ที่มักพบความแตกต่างของแถบโปรตีนที่สะสมอยู่ในเมล็ดพันธุ์แตงกวามากกว่าช่วงอื่น ๆ คือ บริเวณช่วง pH 7-10 สำหรับในพืชชนิดอื่น ๆ อาจจะมีโปรตีนที่ต่างกันออกไปทั้งชนิดและปริมาณ ซึ่งจะมีค่า pI ที่แตกต่างกันออกไปด้วยขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนที่สะสมอยู่ในเมล็ดพืชแต่ละชนิด เช่นในข้าว พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่มีค่า pI อยู่ในช่วง pH 5-8 (Wang *et al*., 2001) ข้าวสาลี และข้าว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บาเลย์ โปรตีนส่วนใหญ่มีค่า pI อยู่ในช่วง pH 3-10 และมีความถี่มากอยู่ในช่วง pH 4-5 สำหรับข้าวโพดไร่ และข้าวโพดหวานโปรตีนส่วนใหญ่มีค่า pI อยู่ในช่วง pH 2-9 (ประกาย, 2550ค; Leist and Knoblauch, 2003) หรือในมะเขือเทศ ที่พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่ มีค่า pI อยู่ในช่วง pH 4-8 เป็นต้น (Van den Berg, 1990, 1991; Wang *et al*., 2000) ดังนั้นการเลือกใช้ช่วง pH ของเจล จึงต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมกับชนิดของโปรตีนที่สะสมในเมล็ดของพืชชนิดนั้น ๆ สำหรับแตงกวาแนะนำว่าหากต้องการแยกพันธุ์แตงกวาโดยวิธีการทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค UTLIEF ควรให้ความสนใจกับเจลที่มีช่วง pH ระหว่าง 7-10 มากเป็นพิเศษ

การที่เจลช่วงค่า pH 4-5/3-10 ให้ประสิทธิภาพในการแยกต่ำ อาจเป็นเพราะช่วง pH ดังกล่าวมีการขยายช่วง 4-5 มากขึ้นทำให้ไปเบียดช่วง pH ข้างเคียงให้ชิดติดกัน รวมทั้งช่วง pH ระหว่าง 7-10 ส่งผลให้ไม่สามารถสังเกตเห็นแถบโปรตีนที่แตกต่างกันของแต่ละพันธุ์ในบริเวณดังกล่าวได้ ต่างกับการใช้เจลช่วงค่า pH 2-11 ที่ pH gradient มีการจัดเรียงตัวอย่างสม่ำเสมอทำให้การวิเคราะห์ผลโดยใช้สายตาทำได้ง่าย หรืออีกกรณีที่โดยปกติการใช้เจลที่มีช่วง pH ผสม เช่น 5-8/2-11 หรือ 4-5/3-10 เป็นต้น ควรเติม urea ที่มีความเข้มข้นไม่เกิน 8 โมลาร์ลงไปเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการจำแนก (resolution) ของเจล เพราะ urea จะช่วยให้ carrier ampholyte ที่ pH ต่างๆ รวมเข้าด้วยกันได้ดีขึ้น (Dunn, 1989) แต่การเติม urea แม้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพดังกล่าว แต่การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค isoelectric focusing เป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของประจุของโปรตีน เทคนิคนี้จึงไวต่อประจุในระบบมาก ระบบที่ดีควรจะมีประจุให้น้อยที่สุด แต่การใส่ urea ลงในเจลจะทำให้ระบบมีประจุมากขึ้น เพราะ urea จะแตกตัวเป็น ammonium และ isocyanate ซึ่งไวต่อการการทำปฏิกิริยากับ หมู่ amine ในโปรตีน ทำให้เกิดขบวนการ carbamylation ซึ่งสารประกอบที่เกิดขึ้นใหม่ดังกล่าวจะไม่เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า หรือถ้าเคลื่อนก็จะเพี้ยนไปส่งผลให้เจลเสียหายจนไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้ (Janson and Ryden, 1998; Unlu and Minden, 2002) ตรงกันข้ามกับเจลที่มีช่วงค่า pH ที่ไม่ผสม เช่น 3-10 2-9 และ 2-11 ซึ่งเจลที่มีช่วงค่า pH เหล่านี้จะมีประสิทธิภาพการจำแนกสูงโดยไม่จำเป็นต้องเติม urea เหตุนี้กรรมวิธีที่ใช้เจล ช่วงค่า pH 2-11 จึงให้ผลการวิเคราะห์ดีกว่า

เมื่อเปรียบเทียบความคมชัดและความเข้มของแถบโปรตีนของทั้ง 8 กรรมวิธีที่ทำการทดสอบพบว่าแถบโปรตีนที่ได้จากสกัดด้วยน้ำร่วมกับการใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 2-11 (กรรมวิธีที่ 1) ในการทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค UTLIEF ให้แถบโปรตีนที่มีความคมชัด และสามารถแยกพันธุ์แตงกวาที่นำมาทดสอบได้ดีที่สุด จึงเลือกใช้กรรมวิธีดังกล่าวในการทดสอบกับแตงกวา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จำนวน 8 พันธุ์ รวมทั้งการทดสอบความเป็นลูกผสมของแตงกวาเพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้ต่อไป

2. ทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค UTLIEF ในการจำแนกสายพันธุ์แตงกวา

2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค UTLIEF ในการจำแนกแตงกวาพันธุ์ต่าง ๆ

หลังจากได้ตัวทำละลาย และ pH ของเจล ที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 1 คือการใช้น้ำในการสกัดโปรตีนร่วมกับการใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 2-11 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของกรรมวิธีดังกล่าวจึงนำไปทดสอบกับสายพันธุ์แตงกวาอีก 8 พันธุ์ปลูก ได้แก่ เมล็ดพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 พันธุ์ไฉไลและพันธุ์ภูฟ้า ของบริษัท เจียไต๋ จำกัด และพันธุ์บิงโก ของบริษัท ที เอส เอ จำกัด รวมทั้งเมล็ดพันธุ์ผสมปล่อยอีก 5 พันธุ์ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน แห่งมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ กำแพงแสน ได้แก่พันธุ์ CS017 CS018 CS054 CS059 และ CS091 เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของตัวทำละลายและ pH ของเจลที่พัฒนาขึ้น

จากผลการศึกษาความเข้มข้นโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวาทั้ง 8 พันธุ์ปลูก ทำให้ทราบว่า ความเข้มข้นของโปรตีนของเมล็ดพันธุ์แตงกวาทั้ง 8 พันธุ์ปลูกมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 2.16-3.36 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (ตารางผนวกที่ 6) ในการทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค UTLIEF ด้วยกรรมวิธีดังกล่าว (ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย และ pH ของเจลช่วง 2-11) จึงใช้ปริมาณตัวอย่างสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดพันธุ์แต่ละพันธุ์ที่เท่ากัน คือสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ 8 ไมโครลิตร เจือจางกับน้ำ 12 ไมโครลิตรต่อหนึ่งหลุมบน application strip

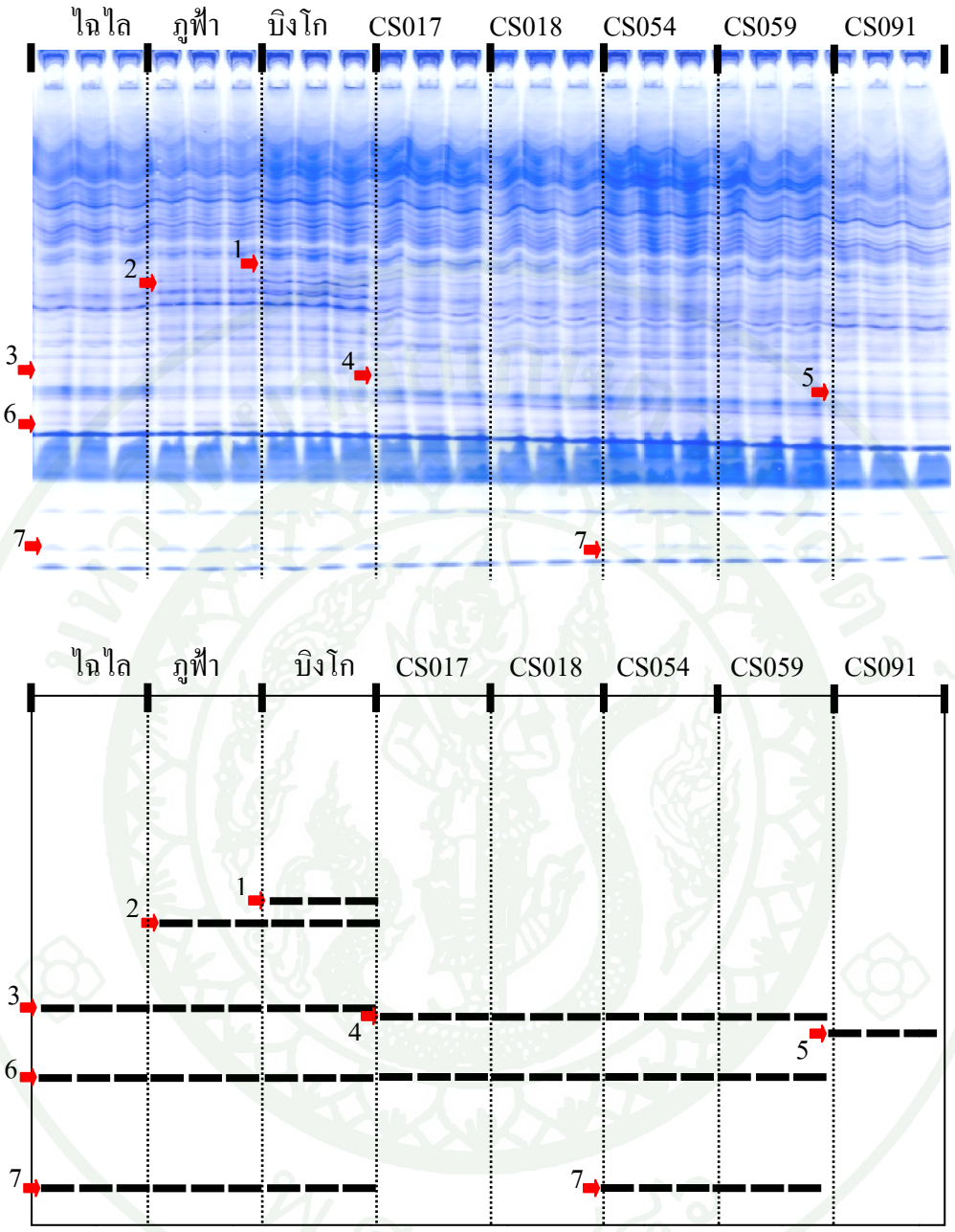
ผลการเปรียบเทียบแถบโปรตีนของเมล็ดพันธุ์แตงกวาทั้ง 8 พันธุ์ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ และทำ electrophoresis ที่ pH เจล 2-11 พบแถบโปรตีนที่มีความต่างกันอย่างน้อย 1 คู่พันธุ์ จำนวน 7 ตำแหน่งดังนี้ (ภาพที่ 18)

ตำแหน่งที่ 1 พบเฉพาะในพันธุ์ บิงโก เท่านั้น
ตำแหน่งที่ 2 พบเฉพาะในพันธุ์ ภูฟ้า และ บิงโก
ตำแหน่งที่ 3 พบเฉพาะในพันธุ์ ไฉไล ภูฟ้า และ บิงโก
ตำแหน่งที่ 4 พบเฉพาะในพันธุ์ CS017 CS018 CS054 และ CS059
ตำแหน่งที่ 5 พบเฉพาะในพันธุ์ CS091 เท่านั้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตำแหน่งที่ 6 พบเฉพาะในพันธุ์ ไฉไล ภูฟ้า บิงโก CS017 CS018 CS054 และ CS059
ตำแหน่งที่ 7 พบเฉพาะในพันธุ์ ไฉไล ภูฟ้า บิงโก CS054 และ CS059

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 18 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวา 8 พันธุ์ปลูก คือพันธุ์ไฉไล ภูฟ้า บิงโก CS017 CS018 CS054 CS059 และ CS091 ด้วยน้ำแล้ว แยกโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างกัน)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการสกัดโปรตีนในเมล็ดแตงกวา 8 พันธุ์ปลูกด้วยน้ำ และวิธีการแยกโปรตีนบนเจลที่มีช่วง pH 2-11 ซึ่งพบแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างน้อย 1 คู่พันธุ์ จำนวน 7 ตำแหน่ง เป็นจำนวนที่ใกล้เคียงรายงานการทดสอบจำแนกพันธุ์ด้วยเทคนิค UTLIEF ในมะเขือเทศจำนวน 11 พันธุ์โดยใช้ NaCl 4 มิลลิโมลาร์ในการสกัดร่วมกับการใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 4-8 ที่พบแถบโปรตีนที่สามารถแยกความแตกต่างได้ทั้งหมดจำนวน 8 ตำแหน่ง (Wang *et al*., 2000) และแถบโปรตีนที่ใช้แยกความแตกต่างของพันธุ์ข้าวโพดหวาน 6 พันธุ์ที่ใช้น้ำในการสกัดร่วมกับการใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 2-9 ซึ่งมีแถบโปรตีนที่แตกต่างกันทั้งหมด 6 ตำแหน่ง (ประกาย, 2550ค) แสดงให้เห็นว่าน้ำมีประสิทธิภาพในการจำแนกใกล้เคียงกันกับตัวทำละลายอื่น

เมื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของแถบโปรตีนทีละคู่ ซึ่งทั้ง 8 พันธุ์จะได้การเปรียบเทียบทั้งหมด 28 คู่ (สมการที่ 10) เปรียบเทียบความแตกต่างโดยอาศัยหลักที่ว่าการแยกพันธุ์ 2 พันธุ์ออกจากกันได้ พันธุ์ทั้งสองต้องมีแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง พบว่าวิธีการทำ UTLIEF สำหรับเมล็ดพันธุ์แตงกวาด้วยการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายและทำ electrophoresis บนเจลที่มีค่า pH 2-11 สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์แตงกวาทั้ง 8 พันธุ์ออกจากกันได้ทั้งหมด 25 คู่จาก 28 คู่หรือคิดเป็น 89.29 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นเพียง 3 คู่พันธุ์คือ พันธุ์บิงโกกับภูฟ้า พันธุ์ CS017 กับ CS018 และพันธุ์ CS054 กับ CS059 (ตารางที่ 5) จึงเห็นได้ว่าวิธีการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายเพื่อสกัดโปรตีนและการใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 น่าจะเป็นกรรมวิธีที่มีปะสิทธิภาพในการจำแนกพันธุ์แตงกวา

กรณี 3 คู่พันธุ์ที่ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ คือ พันธุ์บิงโกกับภูฟ้า พันธุ์ CS017 กับ CS018 และพันธุ์ CS054 กับ CS059 แสดงว่าทั้ง 3 คู่พันธุ์นี้มีโปรตีน albumin ซึ่งละลายได้ในน้ำที่ไม่แตกต่างกัน (Peter and Casey, 1999) การแยกความแตกต่างของ 3 คู่พันธุ์ดังกล่าว อาจต้องใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น เช่น สารละลายที่ละลายโปรตีนกลุ่มอื่น เช่น prolamin หรือ glutelin ซึ่งอาจแสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของทั้ง 3 คู่พันธุ์ได้ดีกว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 จำนวนแถบโปรตีนที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแตงกวาทั้ง 8 พันธุ์ปลูกทีละคู่

	ไฉไล	ภูฟ้า	บิงโก	CS017	CS018	CS054	CS059	CS091
ไฉไล	0							
ภูฟ้า	1	0						
บิงโก	2	0	0					
CS017	3	4	5	0				
CS018	3	4	5	0	0			
CS054	2	3	4	1	1	0		
CS059	2	3	4	1	1	0	0	
CS091	4	5	6	3	4	4	4	0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค UTLIEF ในการทดสอบความเป็นลูกผสม (hybridity test) ของแตงกวา

ในการทดสอบประสิทธิภาพของการใช้น้ำเป็นตัวสกัดโปรตีน และการแยกโปรตีนบนเจลที่มีช่วง pH 2-11 โดยใช้แตงกวาลูกผสมชั่วที่ 1 (F-1 hybrid) จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ #01 #02 #03 #04 #05 #06 #07 #08 #09 และ #10 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เชื้อพันธุ์จากบริษัท ที เอส เอ จำกัด

และในการพิสูจน์ความเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 โดยการเปรียบเทียบโปรตีนกับสายพันธุ์พ่อ-แม่ โดยที่สายพันธุ์พ่อต้องมีแถบโปรตีนที่สายพันธุ์แม่ไม่มีอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง และสายพันธุ์แม่ต้องมีแถบโปรตีนที่สายพันธุ์พ่อไม่มีอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง และลูกผสมชั่วที่ 1 ของสายพันธุ์พ่อ-แม่ดังกล่าวต้องมีแถบโปรตีนที่เป็นเอกลักษณ์ของพ่อและแม่ทั้งหมดไว้ด้วยกัน เมื่อนำหลักการนี้ไปพิจารณาทดสอบความเป็นลูกผสมของสายพันธุ์แตงกวาลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้ง 10 สายพันธุ์มีผลการทดลองดังนี้

การทดสอบความเป็นลูกผสมของสายพันธุ์ #01

เมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อและแม่ พบว่าสายพันธุ์พ่อมีแถบโปรตีนเอกลักษณ์ที่สายพันธุ์แม่ไม่มีอยู่ 1 ตำแหน่ง (แถบสีดำ ลูกศรชี้) แต่ไม่พบแถบโปรตีนเอกลักษณ์ของแม่ที่สายพันธุ์พ่อไม่มี เมื่อพิจารณาดูแถบโปรตีนของเมล็ดพันธุ์ที่เป็นลูกผสม พบว่าทุกเมล็ด (ช่อง 6-15) มีแถบโปรตีนที่มีเอกลักษณ์เหมือนพ่อทุกประการ ในกรณีนี้หากพิจารณาว่าลูกผสมที่ได้เกิดบนต้นแม่ที่กำหนดและรับการผสมจากสายพันธุ์พ่อที่กำหนดทุกเมล็ด ดังนั้นเมล็ดนี้จึงควรเป็นลูกผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ที่ทดสอบ (ภาพที่ 19)

การทดสอบความเป็นลูกผสมของสายพันธุ์ #02

เมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อและแม่ พบว่าสายพันธุ์พ่อมีแถบโปรตีนเอกลักษณ์ที่สายพันธุ์แม่ไม่มีอยู่ 3 ตำแหน่ง (แถบสีดำ) และพบแถบโปรตีนเอกลักษณ์ของสายพันธุ์แม่ที่สายพันธุ์พ่อไม่มีจำนวน 1 ตำแหน่ง (แถบสีแดง) เมื่อพิจารณาดูแถบโปรตีนของเมล็ดพันธุ์ที่เป็นลูกผสม พบว่าทุกเมล็ด (ช่อง 6-15) มีแถบโปรตีนเป็นเอกลักษณ์ของพ่อและแม่ทั้งหมดไว้ด้วยกัน กรณีนี้จึงสามารถบอกได้ว่าลูกผสมทุกเมล็ดเกิดจากการผสมของสายพันธุ์พ่อ-แม่ และเป็น

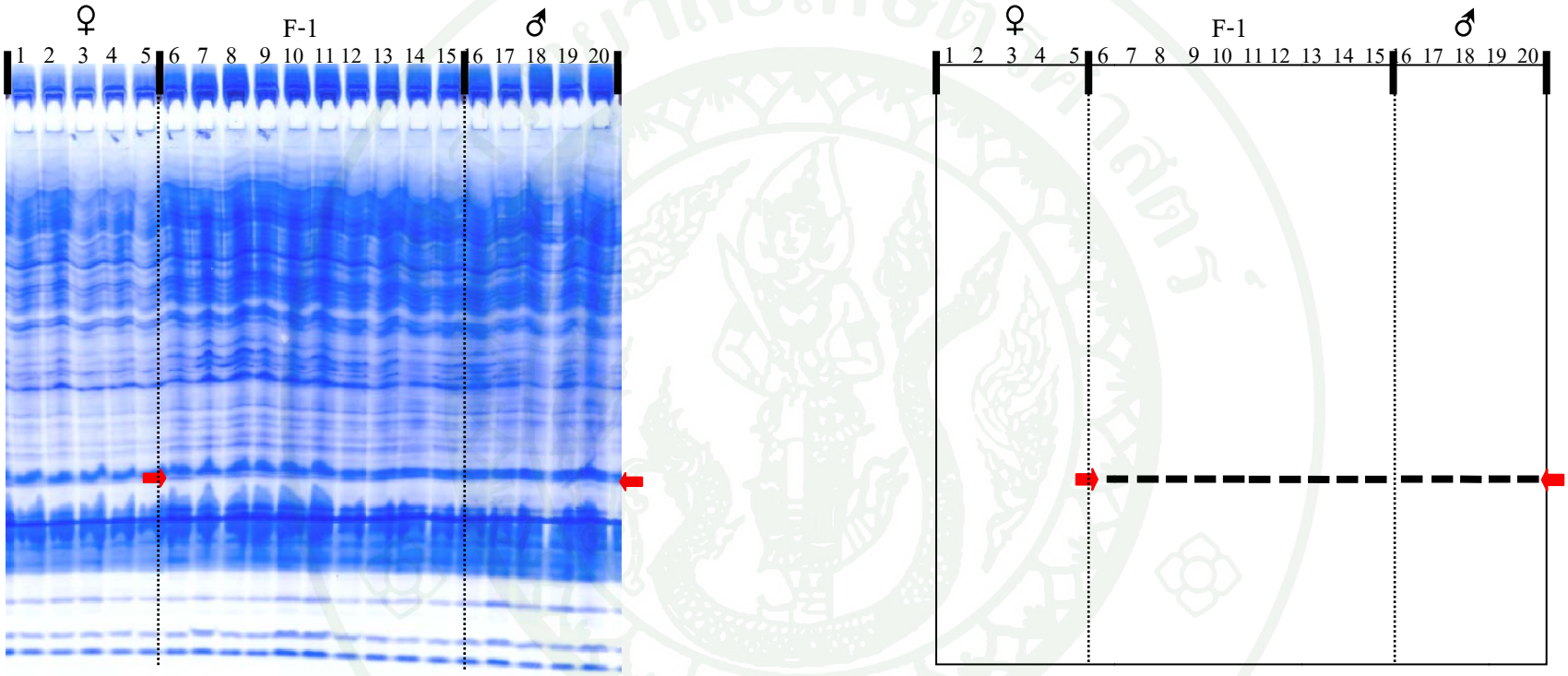
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลูกผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ที่ทดสอบ (ภาพที่ 20) นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนจำนวน 1 ตำแหน่งที่พบในสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 เท่านั้น (แถบสีเขียว) ลักษณะดังกล่าวสันนิษฐานว่าเกิดจากการที่แถบโปรตีนของลูกผสมเข้มข้นมากกว่าสายพันธุ์พ่อ-แม่ สามารถตรวจสอบได้โดยการนำมาทำ electrophoresis อีกครั้งโดยปรับปริมาณตัวอย่างสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดพันธุ์สายพันธุ์พ่อและแม่ให้มากกว่าสายพันธุ์ลูกประมาณ 2 เท่า เพื่อให้มีความเข้มข้นของโปรตีนที่ใกล้เคียงกันก่อน

การทดสอบความเป็นลูกผสมของสายพันธุ์ #03

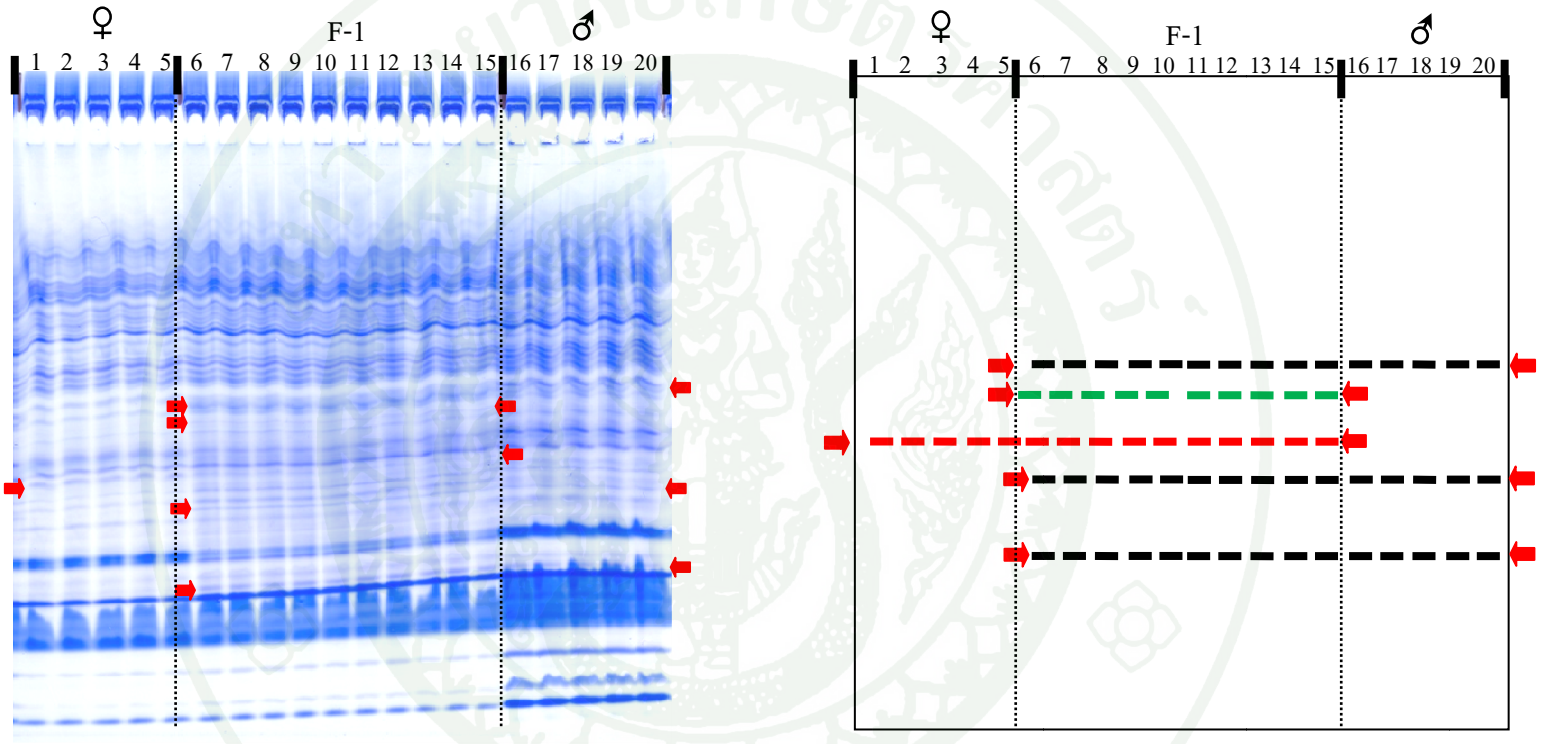
เมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อและแม่ พบแถบโปรตีนเอกลักษณ์ของสายพันธุ์แม่ที่สายพันธุ์พ่อไม่มีจำนวน 1 ตำแหน่ง (แถบสีแดง) แต่ไม่พบแถบโปรตีนเอกลักษณ์ของพ่อที่สายพันธุ์แม่ไม่มี เมื่อพิจารณาดูแถบโปรตีนของเมล็ดพันธุ์ที่เป็นลูกผสม พบว่าทุกเมล็ด (ช่อง 6-15) มีแถบโปรตีนที่มีเอกลักษณ์เหมือนแม่ทุกประการ กรณีนี้จึงไม่สามารถบอกได้ว่าเมล็ดลูกผสมเหล่านั้นเป็นลูกผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ที่ทดสอบ นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนจำนวน 1 ตำแหน่งที่พบในสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 เท่านั้น (แถบสีเขียว) ลักษณะดังกล่าวสันนิษฐานว่าเกิดจากการที่แถบโปรตีนของลูกผสมเข้มข้นมากกว่าสายพันธุ์พ่อ-แม่ ตรวจสอบได้โดยการนำสายพันธุ์คู่นี้มาทำ electrophoresis โดยปรับปริมาณตัวอย่างสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดพันธุ์สายพันธุ์พ่อและแม่ให้มากกว่าสายพันธุ์ลูกประมาณ 2 เท่าเพื่อให้มีความเข้มข้นของโปรตีนที่ใกล้เคียงกันก่อน (ภาพที่ 21)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



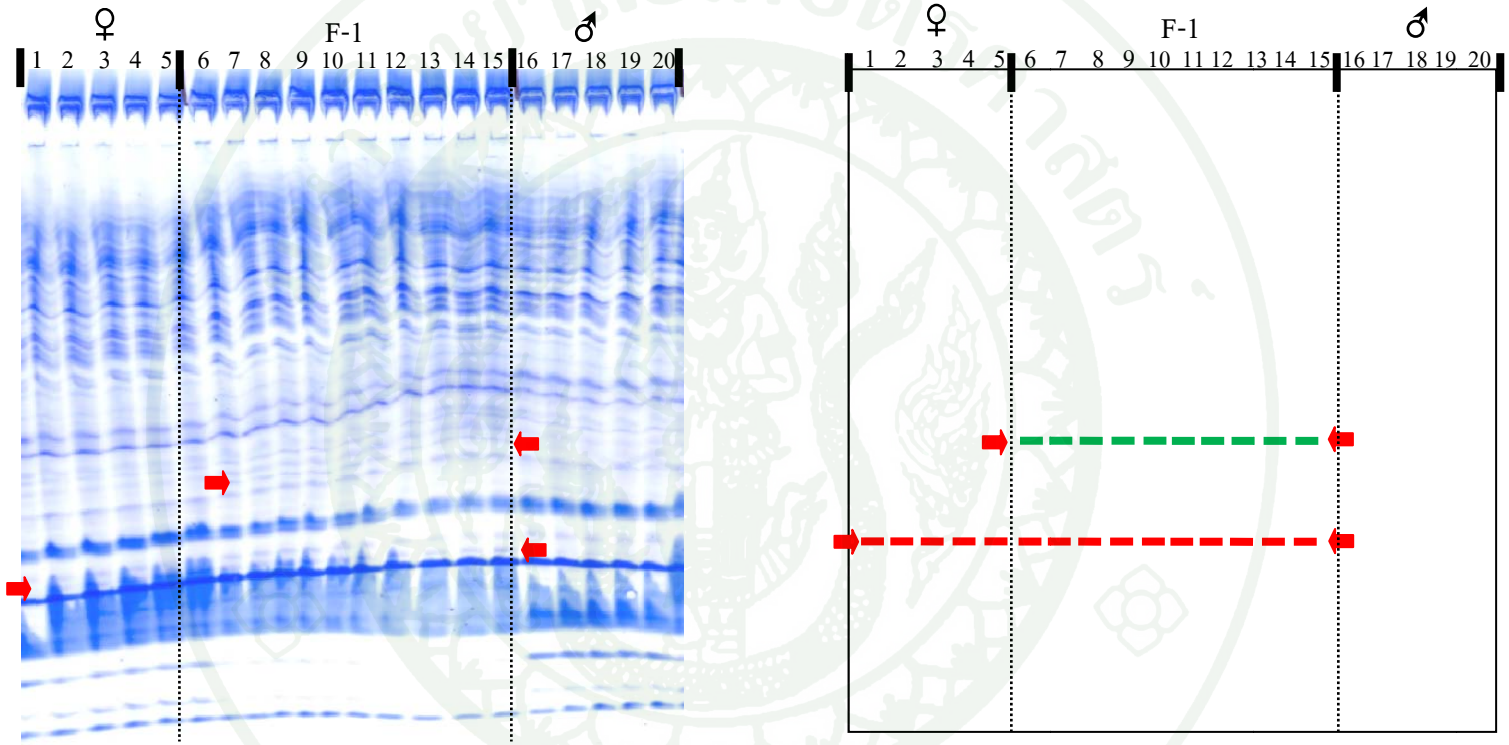
ภาพที่ 19 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #01 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 20 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #02 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อหรือสายพันธุ์แม่)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 21 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #03 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์แม่)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดสอบความเป็นลูกผสมของสายพันธุ์ #04

เมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อและแม่ พบว่าสายพันธุ์พ่อมีแถบโปรตีนเอกลักษณ์ที่สายพันธุ์แม่ไม่มีอยู่ 1 ตำแหน่ง (แถบสีดำ) และพบแถบโปรตีนเอกลักษณ์ของสายพันธุ์แม่ที่สายพันธุ์พ่อไม่มีจำนวน 6 ตำแหน่ง (แถบสีแดง) เมื่อพิจารณาดูแถบโปรตีนของเมล็ดพันธุ์ที่เป็นลูกผสม พบว่าทุกเมล็ด (ช่อง 6-15) มีแถบโปรตีนเป็นเอกลักษณ์ของพ่อและแม่ทั้งหมดไว้ด้วยกัน กรณีนี้สามารถบอกได้ว่าลูกผสมทุกเมล็ดเกิดจากการผสมของสายพันธุ์พ่อ-แม่ และเป็นลูกผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ที่ทดสอบ (ภาพที่ 22)

การทดสอบความเป็นลูกผสมของสายพันธุ์ #05

เมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อและแม่ พบว่าสายพันธุ์พ่อมีแถบโปรตีนเอกลักษณ์ที่สายพันธุ์แม่ไม่มีอยู่ 1 ตำแหน่ง (แถบสีดำ) และพบแถบโปรตีนเอกลักษณ์ของสายพันธุ์แม่ที่สายพันธุ์พ่อไม่มีจำนวน 1 ตำแหน่ง (แถบสีแดง) เมื่อพิจารณาดูแถบโปรตีนของเมล็ดพันธุ์ที่เป็นลูกผสม พบว่าทุกเมล็ด (ช่อง 6-15) มีแถบโปรตีนเป็นเอกลักษณ์ของพ่อและแม่ทั้งหมดไว้ด้วยกัน กรณีนี้สามารถบอกได้ว่าลูกผสมทุกเมล็ดเกิดจากการผสมของสายพันธุ์พ่อ-แม่ และเป็นลูกผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ที่ทดสอบ (ภาพที่ 23)

การทดสอบความเป็นลูกผสมของสายพันธุ์ #06

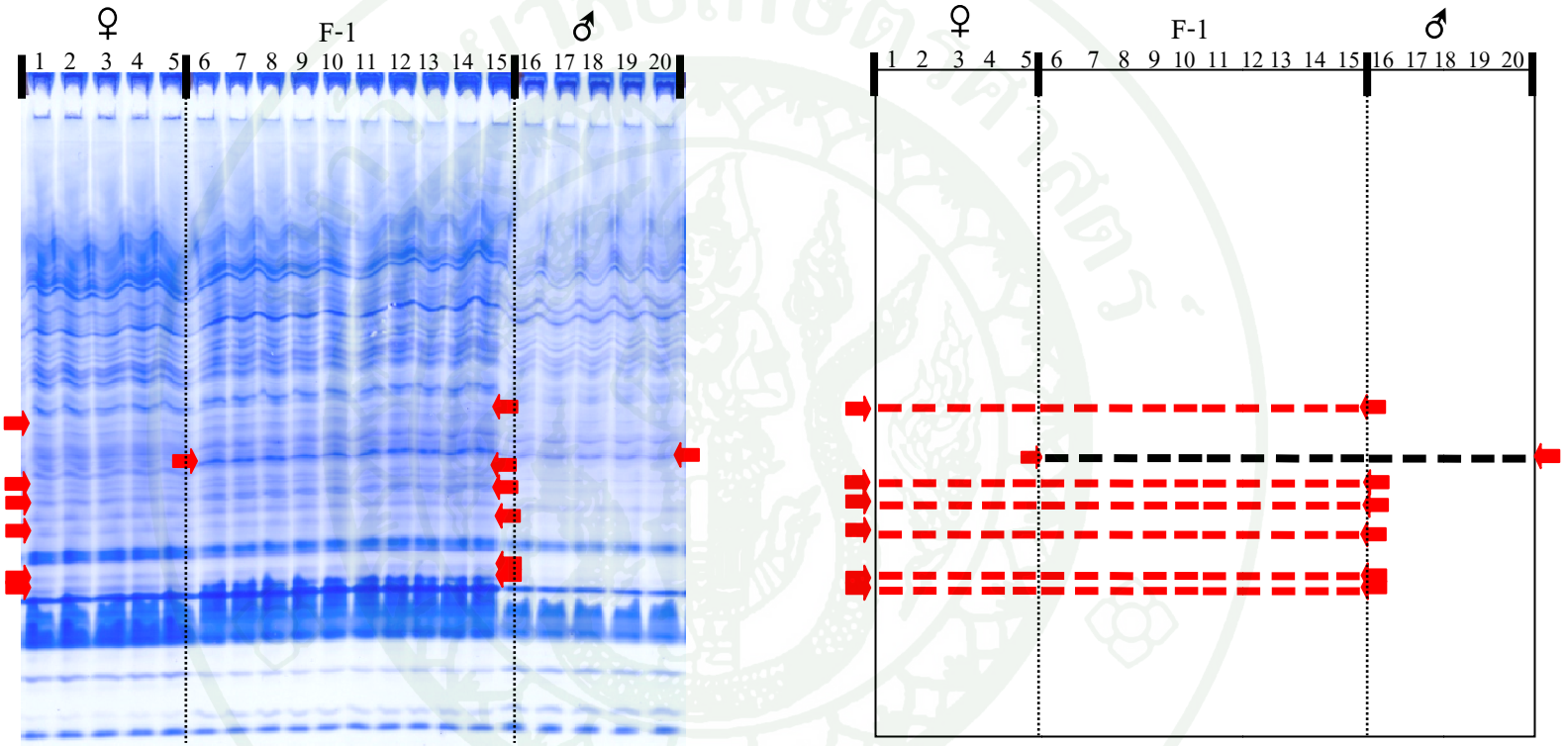
เมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อและแม่ พบว่าสายพันธุ์พ่อมีแถบโปรตีนเอกลักษณ์ที่สายพันธุ์แม่ไม่มีอยู่ 2 ตำแหน่ง (แถบสีดำ) และพบแถบโปรตีนเอกลักษณ์ของสายพันธุ์แม่ที่สายพันธุ์พ่อไม่มีจำนวน 2 ตำแหน่ง (แถบสีแดง) เมื่อพิจารณาดูแถบโปรตีนของเมล็ดพันธุ์ที่เป็นลูกผสม พบว่าทุกเมล็ด (ช่อง 6-15) มีแถบโปรตีนเป็นเอกลักษณ์ของพ่อและแม่ทั้งหมดไว้ด้วยกัน กรณีนี้สามารถบอกได้ว่าลูกผสมทุกเมล็ดเกิดจากการผสมของสายพันธุ์พ่อ-แม่ และเป็นลูกผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ที่ทดสอบ (ภาพที่ 24) นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนจำนวน 2 ตำแหน่งที่พบในสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 เท่านั้น (แถบสีเขียว) ลักษณะดังกล่าวสันนิษฐานว่าเกิดจากการที่แถบโปรตีนของลูกผสมเข้มข้นมากกว่าสายพันธุ์พ่อ-แม่ สามารถตรวจสอบได้โดยการนำมาทำ electrophoresis โดยปรับปริมาณตัวอย่างสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดพันธุ์สายพันธุ์พ่อและแม่ให้มากกว่าสายพันธุ์ลูกประมาณ 2 เท่า

การทดสอบความเป็นลูกผสมของสายพันธุ์ #07

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

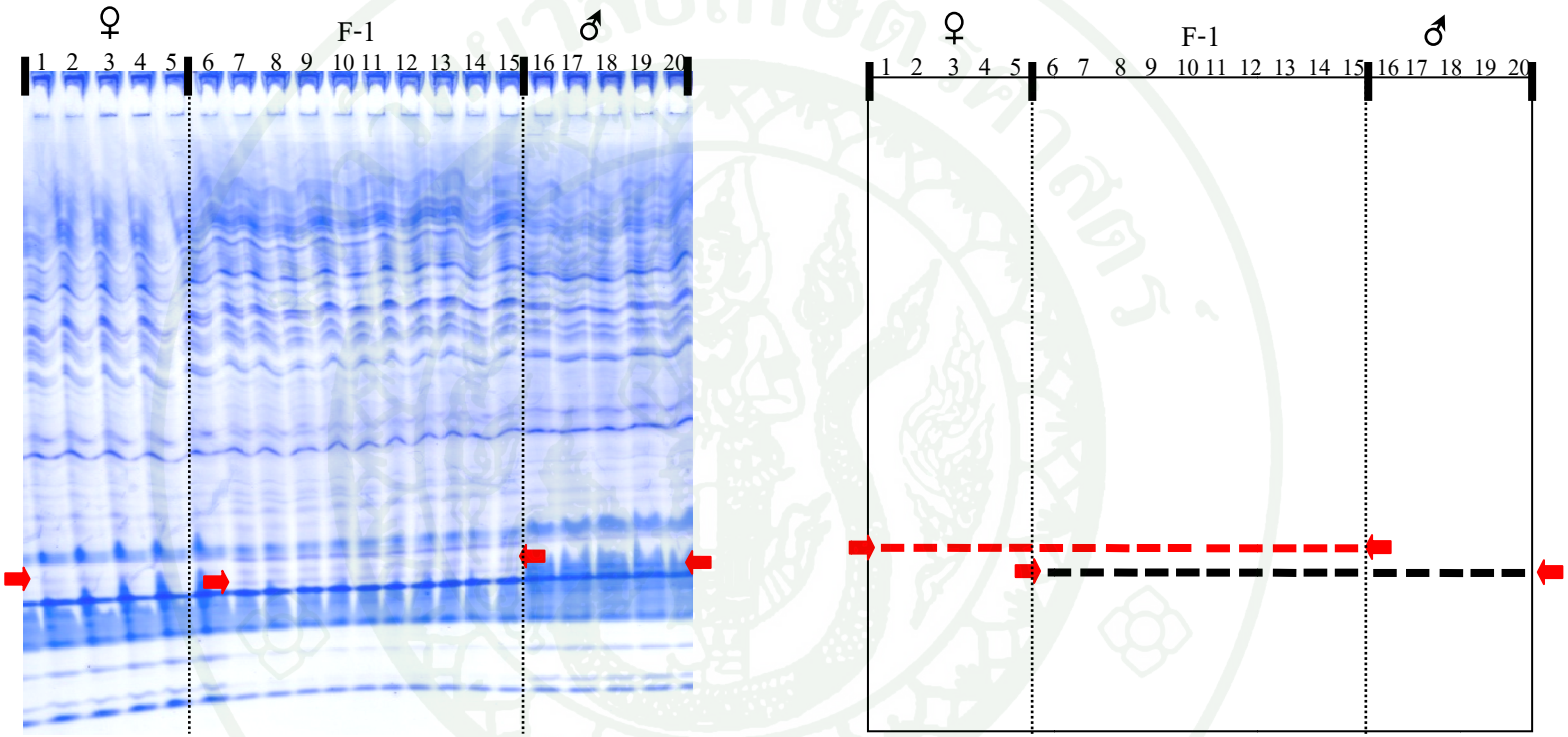
เมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อและแม่ พบว่าสายพันธุ์พ่อมีแถบโปรตีนเอกลักษณ์ที่สายพันธุ์แม่ไม่มีอยู่ 1 ตำแหน่ง (แถบสีดำ) และพบแถบโปรตีนเอกลักษณ์ของสายพันธุ์แม่ที่สายพันธุ์พ่อไม่มีจำนวน 1 ตำแหน่ง (แถบสีแดง) เมื่อพิจารณาดูแถบโปรตีนของเมล็ดพันธุ์ที่เป็นลูกผสม พบว่าทุกเมล็ด (ช่อง 6-15) มีแถบโปรตีนเป็นเอกลักษณ์ของพ่อและแม่ทั้งหมดไว้ด้วยกัน กรณีนี้สามารถบอกได้ว่าลูกผสมทุกเมล็ดเกิดจากการผสมของสายพันธุ์พ่อ-แม่ และเป็นลูกผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ที่ทดสอบ (ภาพที่ 25) นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนจำนวน 1 ตำแหน่งที่พบในสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 เท่านั้น (แถบสีเขียว) ลักษณะดังกล่าวสันนิษฐานว่าเกิดจากการที่แถบโปรตีนของลูกผสมเข้มข้นมากกว่าสายพันธุ์พ่อ-แม่ สามารถตรวจสอบได้โดยการนำมาทำ electrophoresis โดยปรับปริมาณตัวอย่างสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดพันธุ์สายพันธุ์พ่อและแม่ให้มากกว่าสายพันธุ์ลูกประมาณ 2 เท่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



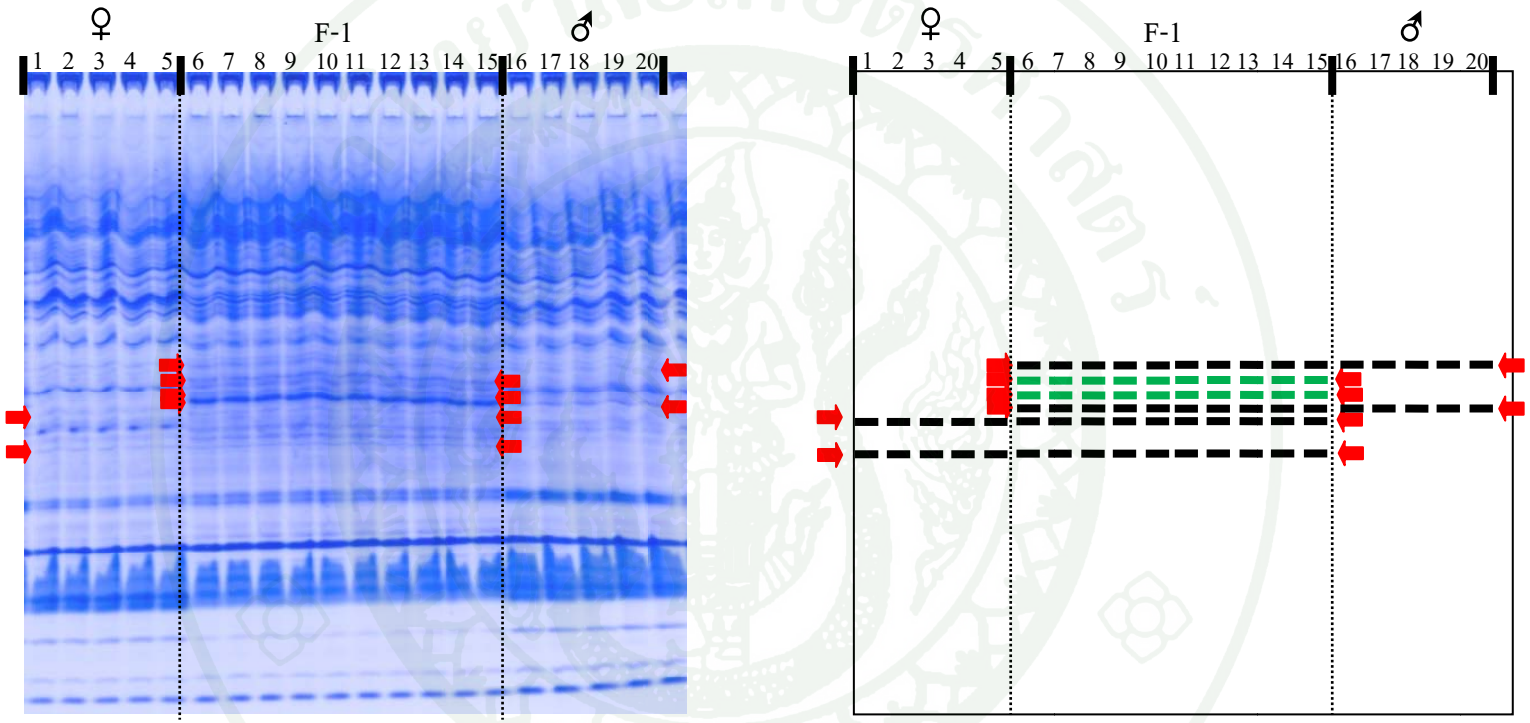
ภาพที่ 22 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #04 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโม♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อหรือสายพันธุ์แม่)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



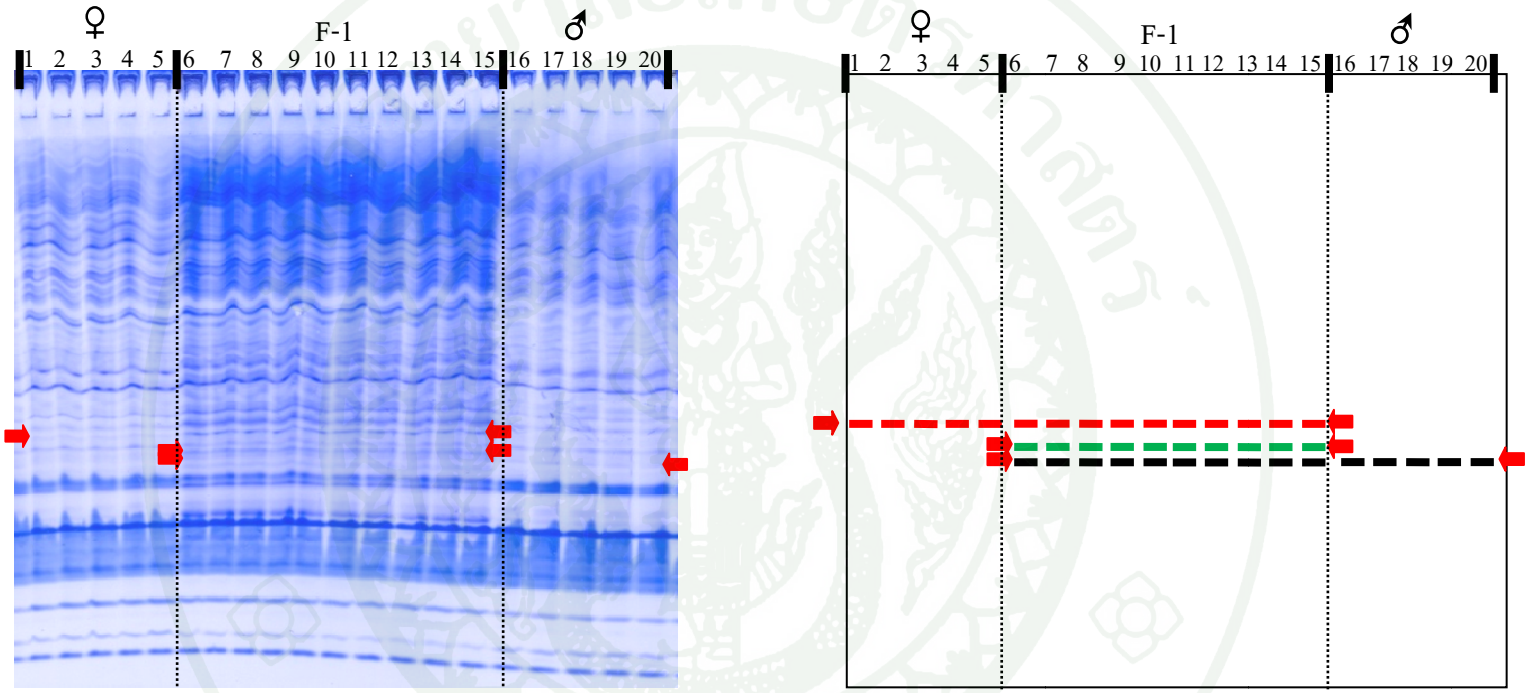
ภาพที่ 23 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #05 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่ง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อหรือสายพันธุ์แม่)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 24 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #06 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อหรือสายพันธุ์แม่)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 25 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #07 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อหรือสายพันธุ์แม่)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดสอบความเป็นลูกผสมของสายพันธุ์ #08

เมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อและแม่ พบว่าสายพันธุ์พ่อมีแถบโปรตีนเอกลักษณ์ที่สายพันธุ์แม่ไม่มีอยู่ 1 ตำแหน่ง (แถบสีดำ) และพบแถบโปรตีนเอกลักษณ์ของสายพันธุ์แม่ที่สายพันธุ์พ่อไม่มีจำนวน 1 ตำแหน่ง (แถบสีแดง) เมื่อพิจารณาดูแถบโปรตีนของเมล็ดพันธุ์ที่เป็นลูกผสม พบว่าทุกเมล็ด (ช่อง 6-15) มีแถบโปรตีนเป็นเอกลักษณ์ของพ่อและแม่ทั้งหมดไว้ด้วยกัน กรณีนี้สามารถบอกได้ว่าลูกผสมทุกเมล็ดเกิดจากการผสมของสายพันธุ์พ่อ-แม่ และเป็นลูกผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ที่ทดสอบ (ภาพที่ 26) นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนจำนวน 2 ตำแหน่งที่พบในสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 เท่านั้น (แถบสีเขียว) ลักษณะดังกล่าวสันนิษฐานว่าเกิดจากการที่แถบโปรตีนของลูกผสมเข้มข้นมากกว่าสายพันธุ์พ่อ-แม่ สามารถตรวจสอบได้โดยการนำมาทำ electrophoresis โดยปรับปริมาณตัวอย่างสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดพันธุ์สายพันธุ์พ่อและแม่ให้มากกว่าสายพันธุ์ลูกประมาณ 2 เท่า

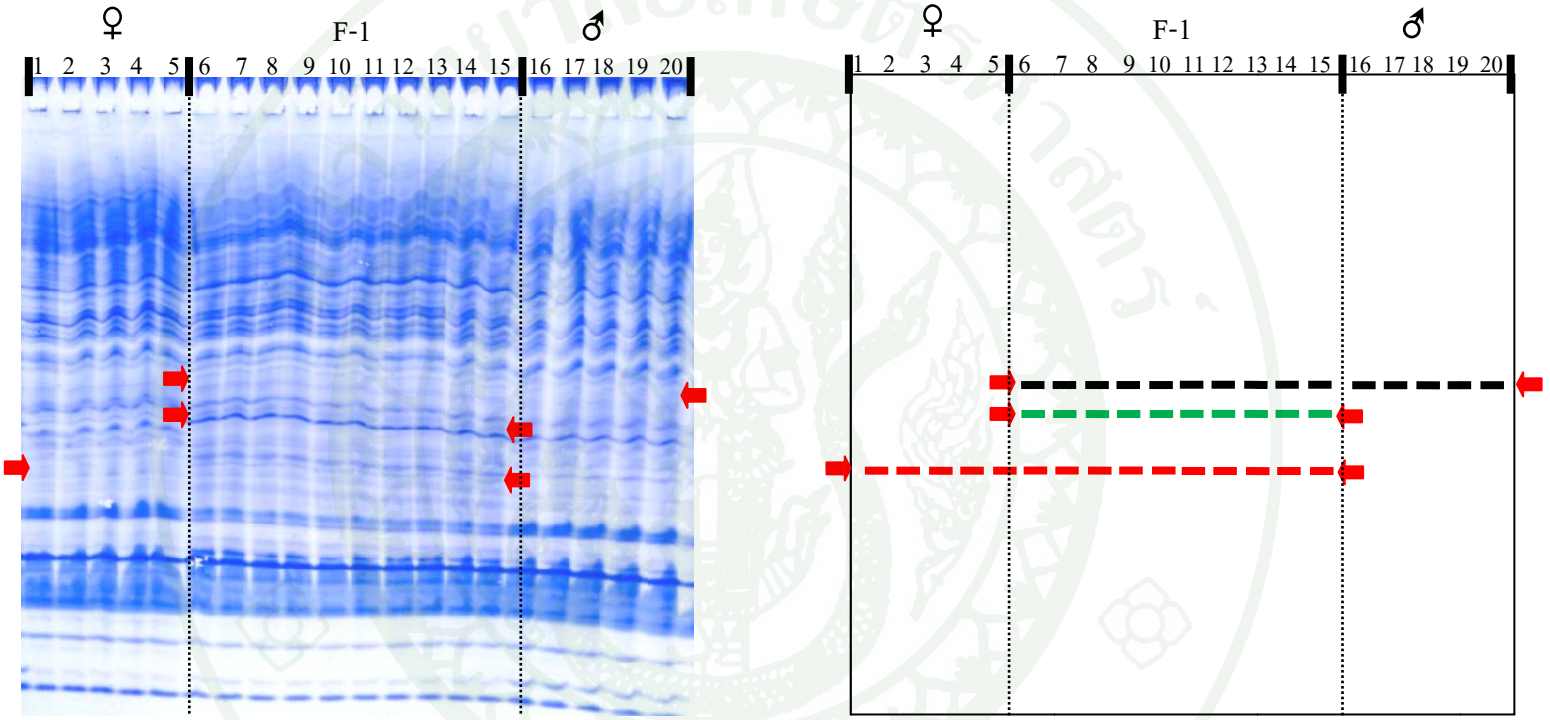
การทดสอบความเป็นลูกผสมของสายพันธุ์ #09

เมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อและแม่ พบว่าสายพันธุ์พ่อมีแถบโปรตีนเอกลักษณ์ที่สายพันธุ์แม่ไม่มีอยู่ 2 ตำแหน่ง (แถบสีดำ) แต่ไม่พบแถบโปรตีนเอกลักษณ์ของแม่ที่สายพันธุ์พ่อไม่มี เมื่อพิจารณาดูแถบโปรตีนของเมล็ดพันธุ์ที่เป็นลูกผสม พบว่าทุกเมล็ด (ช่อง 6-15) มีแถบโปรตีนที่มีเอกลักษณ์เหมือนพ่อทุกประการ ซึ่งในกรณีนี้เชื่อว่าลูกผสมที่ได้เกิดบนต้นแม่ได้รับการผสมจากสายพันธุ์พ่อทุกเมล็ด และเป็นลูกผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ที่ทดสอบ (ภาพที่ 27)

การทดสอบความเป็นลูกผสมของสายพันธุ์ #10

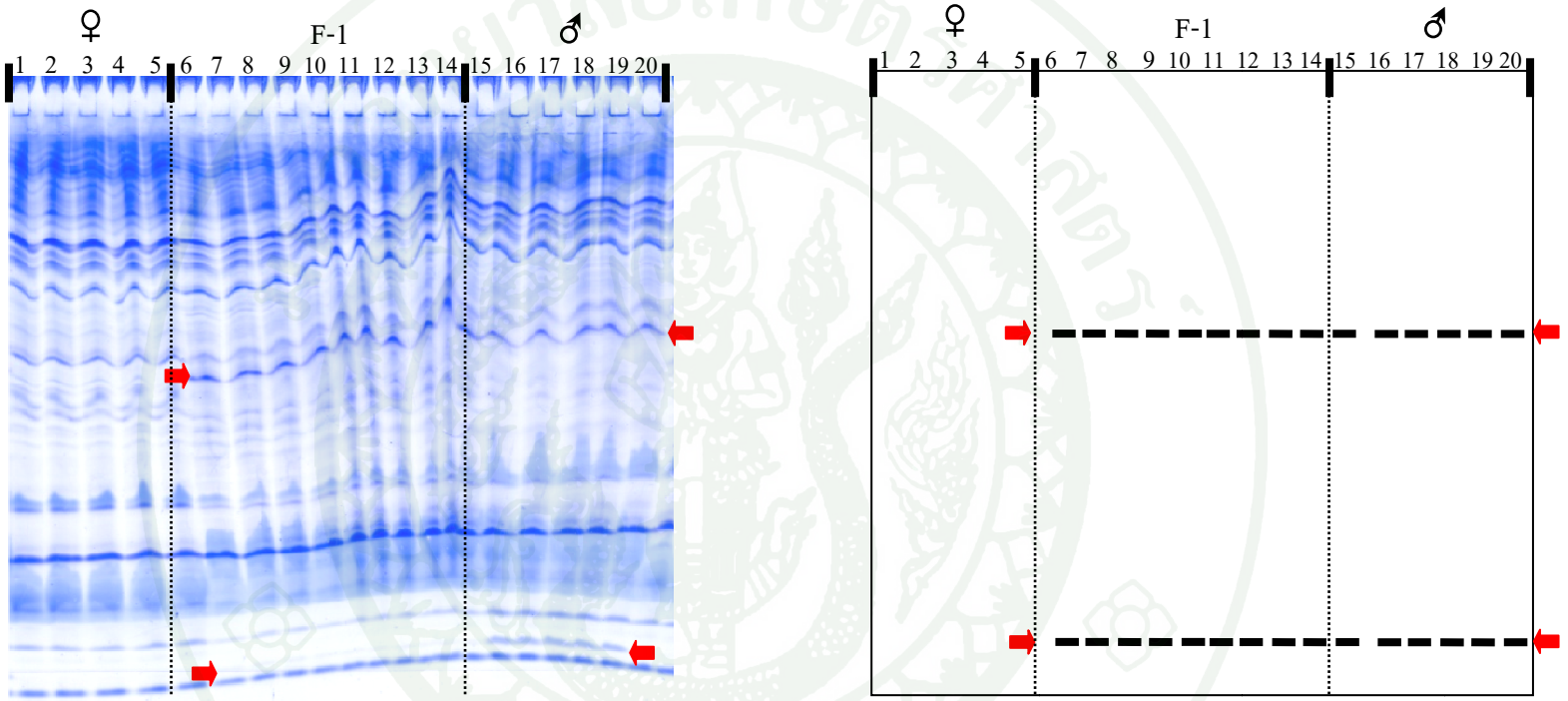
ไม่พบแถบโปรตีนที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 (ภาพที่ 28) กรณีนี้ไม่สามารถทดสอบความเป็นลูกผสมของสายพันธุ์นี้ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



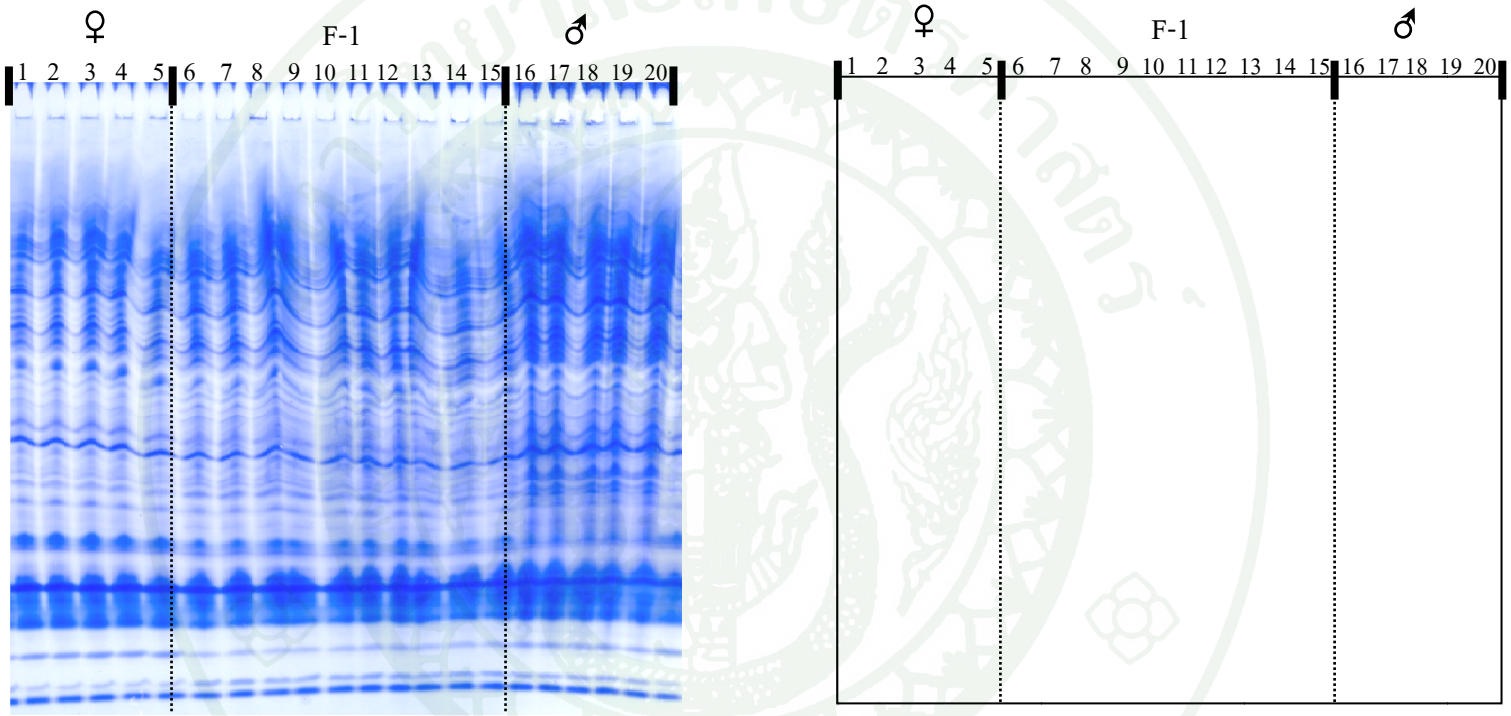
ภาพที่ 26 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #08 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อหรือสายพันธุ์แม่)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 27 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #09 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 28 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #10 ด้วยน้ำแล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการทดลองความเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 ของแตงกวาด้วย UTLIEF โดยใช้น้ำเป็นตัวสกัดโปรตีน และใช้ pH ของเจลช่วง 2-11 สามารถพิสูจน์ความเป็นลูกผสมได้ 8 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ #01 #02 #04 #05 #06 #07 #08 และ #09) จากทั้งหมด 10 สายพันธุ์ หรือประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ มีเพียง 2 สายพันธุ์ (สายพันธุ์ #03 และ #10) ซึ่งไม่สามารถใช้วิธีการนี้พิสูจน์ความเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 ได้ เนื่องจากวิธีการนี้ไม่พบความแตกต่างของแถบโปรตีนระหว่างสายพันธุ์พ่อและแม่ อาจเป็นเพราะสายพันธุ์พ่อ-แม่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมาก หรืออาจเป็นเพราะวิธีการนี้ยังไม่สามารถสกัดโปรตีนที่ให้ความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์พ่อ–แม่ได้ สอดคล้องกับผลการทดสอบประสิทธิภาพการจำแนกสายพันธุ์แตงกวาด้วยวิธีการนี้ ที่พบว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์แตงกวาได้ประมาณ 89.29 เปอร์เซ็นต์ แต่ยังมีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ที่วิธีการนี้ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ ซึ่งแสดงว่าวิธีการใช้น้ำเป็นตัวสกัดโปรตีน และใช้ pH ของเจลช่วง 2-11 ยังไม่มีประสิทธิภาพถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ในการจำแนกสายพันธุ์ และทดสอบความเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 ของเมล็ดพันธุ์แตงกวา อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพที่พบ (89.29 เปอร์เซ็นต์สามารถจำแนกสายพันธุ์ และ 80 เปอร์เซ็นต์สามารถพิสูจน์ความเป็นลูกผสมชั่วที่ 1) ก็ยังถือว่ามีประสิทธิภาพที่สูง

วิธีการนี้จึงน่าจะมีความเหมาะสมในการตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์และใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของแตงกวาได้ ทั้งนี้ในหลาย ๆ สายพันธุ์ เช่น สายพันธุ์ #02 และ #04 เป็นต้น จะพบแถบโปรตีนที่ใช้ทดสอบความเป็นลูกผสมของลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อหรือสายพันธุ์แม่มากกว่า 1 แถบ แต่เนื่องจากข้อพิจารณาการตรวจสอบความเป็นลูกผสมนั้นแม้จะพบแถบโปรตีนที่ใช้ทดสอบความเป็นลูกผสมซึ่งได้มาจากสายพันธุ์พ่อหรือสายพันธุ์แม่เพียงหนึ่งตำแหน่งก็ถือว่าเพียงพอสำหรับการตรวจสอบความเป็นลูกผสม (Arus, 1983)

อนึ่งในกรณีสายพันธุ์ #01 ที่มีแถบโปรตีนที่ใช้ทดสอบความเป็นลูกผสมของลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อเพียงอย่างเดียวนั้นสันนิษฐานว่าแถบโปรตีนดังกล่าวเป็นแถบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของสีผล ที่แยกได้ด้วยการสกัดด้วยน้ำและเจลที่มีช่วงค่า pH 2-11 เนื่องจากทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันของลักษณะปรากฏ (phenotype) ลักษณะหนึ่งที่เด่นชัดระหว่างสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่ โดยที่สายพันธุ์พ่อของสายพันธุ์ #01 มีผลสีเขียว ขณะที่ผลของสายพันธุ์แม่มีสีขาว (ตาราง 6) แสดงถึงการไม่มี gene สำหรับสร้างคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) ในผล ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะด้อย ฉะนั้นกรณีที่สายพันธุ์ #01 ที่มีแถบโปรตีนที่ใช้ทดสอบความเป็นลูกผสมของลูกผสมชั่วที่ 1 ซึ่งได้มาจากสายพันธุ์พ่อเพียงอย่างเดียว จึงสามารถสรุปได้ว่าลูกผสมของสายพันธุ์ #01 เป็นลูกผสมที่ได้จากสายพันธุ์พ่อและแม่ของสายพันธุ์นั้น ๆ จริง

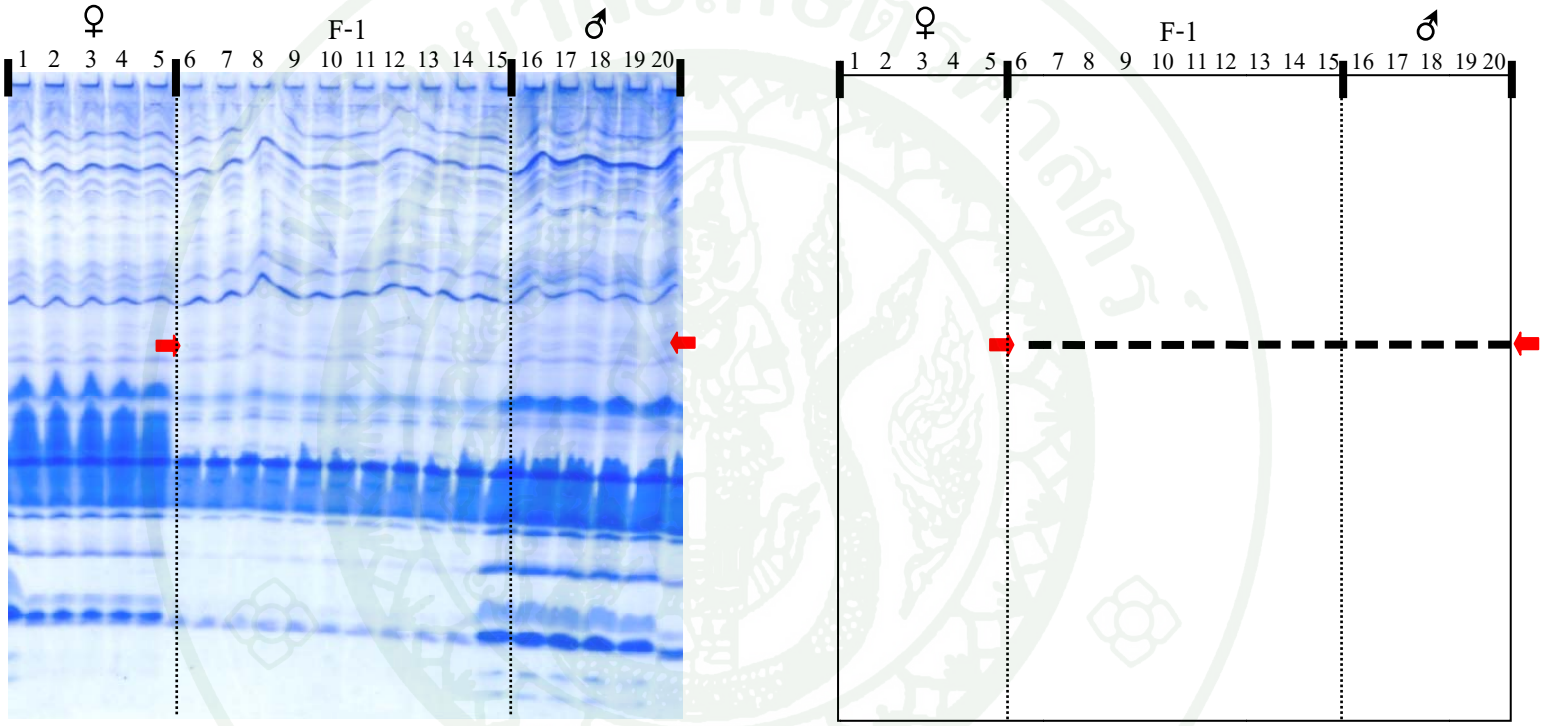
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ #03 ที่พบแค่แถบโปรตีนสำหรับใช้ทดสอบความเป็นลูกผสมที่ได้มาจากสายพันธุ์แม่เพียงอย่างเดียว และสายพันธุ์ #10 ที่ไม่พบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ และลูกผสม จึงยังสรุปไม่ได้ว่าลูกผสมของสายพันธุ์ #03 และสายพันธุ์ #10 เป็นลูกผสมที่ได้จากสายพันธุ์พ่อและแม่สายพันธุ์นั้น ๆ จริง แม้จะมีความแตกต่างกันลักษณะปรากฏของผลในสายพันธุ์พ่อและสายพันธุ์แม่คล้ายกับสายพันธุ์ #01 แต่เมื่อทดลองแยกทั้ง 2 สายพันธุ์โดยการสกัดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์และเจลที่มีช่วงค่า pH 5-8/2-11 โดยหวังว่าโปรตีนในกลุ่ม globulin ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากในพืชวงศ์นี้ (Vladova *et al*., 2004, 2008) และละลายได้ดีในสารละลายเกลือเจือจางจะให้ผลการวิเคราะห์ได้ดีกว่าน้ำ ผลการทดลองปรากฏว่าสายพันธุ์ #03 พบแถบโปรตีนสำหรับใช้ทดสอบความเป็นลูกผสมของลูกผสมชั่วที่ 1 มีแถบโปรตีนที่ได้เอกลักษณ์มาจากสายพันธุ์พ่อทุกประการ เนื่องจากลูกผสมที่ได้เกิดบนต้นแม่ที่กำหนดและรับการผสมจากสายพันธุ์พ่อที่กำหนดทุกเมล็ด ดังนั้นเมล็ดนี้จึงควรเป็นลูกผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อ-แม่ที่ทดสอบทำให้สามารถสรุปได้ว่าลูกผสมสายพันธุ์ #03 เป็นลูกผสมที่ได้จากสายพันธุ์พ่อและแม่ที่นำมาทดสอบจริง (ภาพที่ 29) ขณะที่สายพันธุ์ #10 พบแค่แถบโปรตีนสำหรับใช้ทดสอบความเป็นลูกผสมที่ได้มาจากสายพันธุ์แม่เท่านั้น (ภาพที่ 30)

ตารางที่ 6 ลักษณะปรากฏของสายพันธุ์ #01

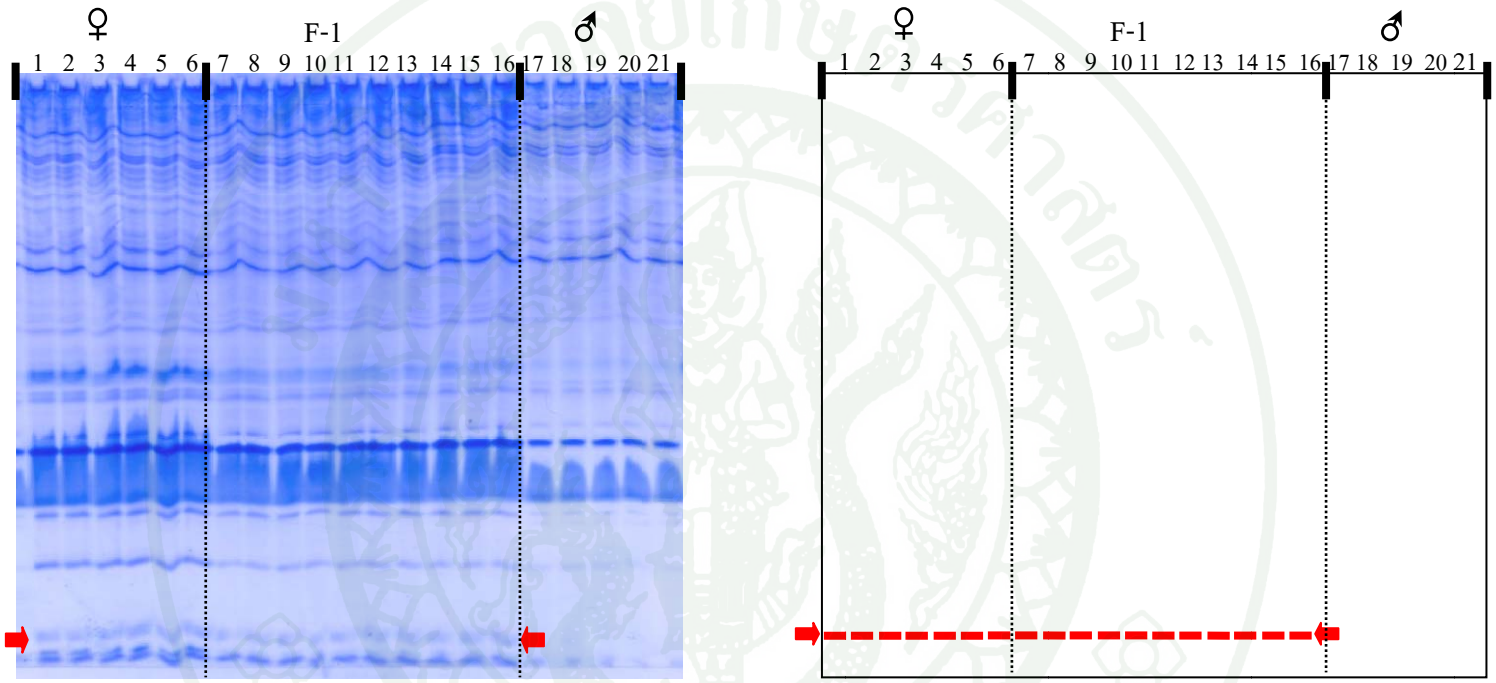
สายพันธุ์	ลักษณะปรากฏ
สายพันธุ์พ่อ #01	ผลสั้น สีเขียว (ยาวประมาณ 9 เซนติเมตร)
สายพันธุ์แม่ #01	ผลสั้น สีขาว (ยาวประมาณ 9 เซนติเมตร)
สายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 #01	ผลสั้น สีเขียว (ยาวประมาณ 9 เซนติเมตร)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 29 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #03 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์แล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 5-8/2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 30 แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดแตงกวาของสายพันธุ์ #10 ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์แล้วแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วง pH 5-8/2-11 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 1,500 โวลต์ เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ♀ คือสายพันธุ์แม่ ♂ คือสายพันธุ์พ่อ และ F1 คือสายพันธุ์ลูกผสมชั่วที่ 1 (ศรชี้คือตำแหน่งแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์แม่)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำนอกจากจะใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดโปรตีนสะสมในเมล็ดของแตงกวาเพื่อนำไปตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์ด้วยเทคนิค UTLIEF ได้แล้วยังสามารถใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมได้ แม้จะมีงานวิจัยเพียง 1-2 งานที่ใช้น้ำเป็นตัวสกัดโปรตีนสะสมเพื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค UTLIEF เช่น งานวิจัยของ Degtyarenko *et al.* (1986) เป็นต้น และในการสกัดโปรตีนสะสมเพื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค UTLIEF ส่วนใหญ่มักจะใช้ 2-chloroethanol แต่เนื่องจาก 2-chloroethanol เป็นสารอันตรายและต้องกำกัดอยู่ในบัญชีรายชื่อยุทธภัณฑ์ของกรมการอุตสาหกรรมทหาร กระทรวงกลาโหมทำให้การนำมาใช้มีข้อจำกัดสูงดังที่กล่าวไปแล้ว ดังนั้นน้ำมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดแทน 2-chloroethanol เพื่อสกัดโปรตีนสะสมในเมล็ดพันธุ์แตงกวาและนำไปตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์ด้วยเทคนิค UTLIEF ทั้งในแง่ของการเป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพ ต้นทุนการวิเคราะห์ต่ำ และมีผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมน้อยกว่าการใช้ 2-chloroethanol

จากผลการทดลองที่ได้นี้อาจกล่าวได้ว่าเทคนิค UTLIEF เป็นอีกเทคนิคหนึ่งที่สามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสม และแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ หรือนำไปศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในพืชได้ ซึ่งข้อดีของวิธีนี้คือต้นทุนของสารเคมีที่ใช้ รวมถึงเวลาในการตรวจสอบน้อยกว่าวิธีการอื่น ๆ (ภาคผนวก ค) โดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจสอบแบบดั้งเดิม เช่น การปลูกทดสอบในแปลง นอกจากนี้เทคนิคนี้ยังได้รับการรับรองจาก International Seed Testing Association ให้เป็นเทคนิคมาตรฐานในการตรวจสอบความตรงต่อพันธุ์และความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์พืชหลายชนิดอีกด้วย แต่ในการทดลองที่ใช้กับพืชชนิดอื่นที่ไม่เคยมีผู้ทดลองมาก่อนนั้นอาจต้องพิจารณาคัดเลือกตัวทำละลายรวมทั้ง pH ของเจลที่ใช้ ให้มีความเหมาะสมเพื่อให้ได้ผลที่ชัดเจนแม่นยำเป็นการเฉพาะสำหรับพืชชนิดนั้น ๆ ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุป

จากการทดลองสกัดโปรตีนในเมล็ดแตงกวา 4 พันธุ์ ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด คือน้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ Na_2EDTA เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และ NaCl เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำมาแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF ที่กระทำบนเจลที่มีค่า pH gradient แตกต่างกัน 2 ช่วง คือ pH 2-11 และ 4-5/3-10 รวมเป็น 8 กรรมวิธี พบว่ามีเพียงกรรมวิธีการสกัดโปรตีนด้วยน้ำร่วมกับการใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 2-11 เท่านั้นที่ให้แถบโปรตีนที่มีความคมชัด และสามารถจำแนกทั้ง 4 สายพันธุ์ที่นำมาทดลองออกจากกันได้ทั้งหมด จึงนำกรรมวิธีนี้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์แตงกวาสายพันธุ์อื่น ๆ อีก 8 สายพันธุ์ พบว่ากรรมวิธีดังกล่าวสามารถจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ดี โดยพบแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ทั้งหมด 7 ตำแหน่ง เมื่อทำการเปรียบเทียบเป็นคู่ทีละคู่ ให้ประสิทธิภาพในการจำแนก 25 คู่จากทั้งหมด 28 คู่คิดเป็น 89.29 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำวิธีการนี้ไปทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 ของเมล็ดพันธุ์แตงกวา 10 สายพันธุ์ พบว่าสามารถพิสูจน์ความเป็นลูกผสมชั่วที่ 1 ได้ 8 สายพันธุ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมศุลกากร. 2550. **บัญชีรายชื่อยุทธภัณฑ์: สารเคมี, วัตถุระเบิดและสารเคมีที่ใช้เป็นวัตถุระเบิดและสารชีวะ**. แหล่งที่มา: http://www.customs.go.th/Prohibit/4.pdf, วันที่ 6 ตุลาคม 2552.

จวงจันทร์ ดวงพัตรา. 2529. **การตรวจสอบและการวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดพันธุ์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กลุ่มหนังสือเกษตร. กรุงเทพฯ.

จานุลักษณ์ ขนบดี. 2528. **สมรรถนะการผสมของแตงกวา 5 พันธุ์ สำหรับทำแตงกวาดอง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

_____. 2535. **การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก.** ครั้งที่ 1. โอ เอส พริ้นติ้ง เฮ้าส์, กรุงเทพฯ.

ชิษณุสรร สวัสดิวัตน์, ม.ร.ว. 2530. กรดอะมิโนและโปรตีน, น. 107-145. *ใน* มนตรี จุฬาวัฒนทล, บรรณาธิการ. **ชีวเคมี.** มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

ณัฏยา ศรีสวัสดิ์, พนิดา ฐาตุจิรางค์กูล, ฉัฐพร คุ้นวงศ์ และจุลภาค คุ้นวงศ์. 2546. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศลูกผสมโดยการใช้เครื่องหมาย Microsatellite. **วิทยาศาสตร์เกษตร** 34 (4-6): 121-128.

ธรรมศักดิ์ ทองเกตุ และ เสริมศิริ จันทร์เปรม. 2549. การจำแนกพันธุ์พืชด้วยโปรตีนในเมล็ดโดยเทคนิค UTLIEF. **ข่าวสารเมล็ดพันธุ์พืช** 13 (3): 12-15.

นุชจรี วัชรวงษ์ไพบูรณ์, สมศักดิ์ เพรียบพร้อม และ จุลภาค คุ้นวงศ์. 2550. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด microsatellite ตรวจสอบความบริสุทธิ์ทางพันธุกรรมแตงกวา และการวิเคราะห์ต้นทุนการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSLP. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร** 38 (2) : 179-189.

ประกาย กิจธิคุณ. 2550(ก). ความสัมพันธ์ทางการเกษตรไทย-ญี่ปุ่น : ข้อคิดในการพัฒนารูปแบบการผลิตสินค้าเกษตรของไทย. **วารสารเศรษฐกิจการเกษตร** 4: 71-74

.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประกาย มานำ. 2550(ข). **การตรวจสอบโปรตีนในเมล็ดข้าวโพดหวาน ด้วยเทคนิค Ultrathin Layer Isoelectric Focusing โดยใช้บางส่วนของเมล็ด.** ปัญหาพิเศษปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม.

_____. 2550(ค). **การแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ข้าวโพดหวานโดย การวิเคราะห์โปรตีนในเมล็ดด้วยเทคนิค Ultrathin-layer Isoelectric Focusing.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม.

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2542. **เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์พืชไร่**. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สมเกียรติ จันทรกระจ่าง. 2527. **การศึกษาสมรรถนะการรวมตัวของแตงกวาสายพันธุ์แท้ห้าสายพันธุ์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สมศักดิ์ รัตนยิ่งยง. 2535. **การสกัดสายพันธุ์ดอกตัวเมียสูงในแตงกวาผลเล็ก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุกัญญา สุนทรส. 2538. เทคนิคการศึกษาโปรตีนระดับโมเลกุล. น. 54. *ใน* ภาควิชาเคมี. **วิทยาการความก้าวหน้าของโปรตีน**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุเทวี ศุขปราการ. 2522. **ผักฤดูร้อน**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สำนักควบคุมพืชและวัสดุเกษตร. 2551. **ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุม ประจำปี 2550.** ข้อมูลการนำเข้า-ส่งออกประจำปี 2550. แหล่งที่มา**:** http://210.246.186.28/ard/, 30 เมษายน 2551.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำนักคุ้มครองพันธุ์พืชแห่งชาติ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2542. พระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืช พ.ศ. 2542. กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ.

อภิชาติ วรรณวิจิตร. ม.ป.ป. **คู่มือการสอนวิชา 003579 ชีวโมเลกุลในการปรับปรุงพันธุ์.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม. (อัดสำเนา)

อรพรรณ ศังขจันทรานนท์. 2548. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของพืชวงศ์แตง, น. 71-72. *ใน* **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนปีที่ 3 ฉบับพิเศษ (สาขาพืช)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537(ก). **เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ รั้วเขียว. กรุงเทพฯ.

_____. 2537(ข). **คู่มือทางชีวเคมี**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ รั้วเขียว. กรุงเทพฯ.

เอนก บางข่า. 2529. **การคัดเลือกในชั่วแรก ๆ ในการปรับปรุงพันธุ์แตงกวาพื้นเมืองให้เป็นแตงกวาดองสายพันธุ์ตัวเมีย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Anonymous. 2006. **2-D Electrophoresis using immobilized pH gradients principles & methods.** Proteomic Resource Facility. The University of Georgia. Available Source: www.prf.uga.edu/assets/docs/2dgelsmanual.pdf, January 25, 2006.

Arus, P. 1983. Genetic purity of commercial seed lots (Part A). pp. 415-423. *In* S.D. Tanksley and T.J. Orton, eds. **Isozymes in Plant Genetics and Breeding**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Bailey, D.C. 1983. Isozymic variation and plant breeders rights (Part A). pp. 425- 441. *In* S.D. Tanksley and T.J. Orton, eds. **Isozymes in Plant Genetics and Breeding**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Berger, R.G., F. Drawert, A. Kinzkofer, C. Kunz and B.J. Radola. 1985. Proteins and Peroxidase in Callus and Suspension Cultures of Apple. **Plant Physiology** 77: 211-214.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72 : 248-254.

Chauhan, K.P.S., M.C. Gopinathan and C.R. Babu. 1985. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology** 13: 629-641.

Cooke, R.J. and S.R. Draper. 1986. The identification of wild oat species by electrophoresis. **Seed Science and Technology** 144: 157-167.

_____. 1995. Gel Electrophoresis for the Identification of Plant Varieties. **Journal of Chromatography A** 698: 281-299.

Crawford, D.J. 1983. Phylogenetic and systematic interferences from electrophoresic studies (Part A). pp. 257-287. *In* S.D. Tanksley and T.J. Orton, eds. **Isozymes in Plant Genetics and Breeding**. Elsevier Science Publishers, Amsterdam.

Degtyarenko, L.V., P.F. Kononkov and T.I. Odintsova. 1986. An investigation of protein heterogeneity in cucumber seeds using electrophoresis. **Vestnik Sel'skokho zyaĭstvennoĭ Nauki** 12: 51-57.

Deutscher, P.D. 1990. **Guide to Protein Purification : Method in Enzymology volume 182.** 1st ed. Academic Press, New York.

Dunn, M.J. 1986. **Gel Electrophoresis of Protein.** 1st ed. J.W. Arrowsmith Ltd., Oxford.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dunn, M.J. 1989. Determination oe total protein concentration, pp. 11-40. *In* E.L.V. Harris and S. Angle, eds. **Protein purification methods: a practical approach.** Oxford University Press, Oxford.

_____. 1993. **Gel Electrophoresis: Proteins.** 1st ed. BIOS Scientific Publishers Limited., Oxford.

Eckersall, P.D. and J.G. Conner. 1984. The Prevention of Distortion in Ultrathin-Layer Polyacrylamide Gel Isoelectric Focusing. **Annual Biochemist** 138: 52-56.

Gavriljuk, I.P., N.K. Gubarena and V.G. Konarev. 1984. Electrophoresis of oat fatuoids and hybrids. **Seed Science and Technology** 12: 529-233.

George, R.A.T. 1999. **Vegetable Seed Production**, 2rd ed. CABI Publishing, Oxfordshire.

Gorg, A., W. Postel, R. Westermeier, E. Gianazza and P.G. Righetti. 1980. Gel Gradient Electrophoresis, Isoelectric Focusing and Two-Dimensional Techniques in Horizontal, Ultrathin Polyacrylamide Layers. **Journal Biochemist Biophysics Methods** 3: 273-284.

Hahn, H. and W. Schoberlein. 1999. Idenification of *Festuca pratensis* varieties by sodiumdodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and ultrathin-layer isoelectric fousing (UTLIEF). **Seed Science & Technology** 27: 559-578.

Hara-Nishimura, I., T. Shimada, K. Hatano, Y. Takeuchi and M. Nishimura. 1998. Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. **The Plant Cell** 10: 825–836.

Hawcroft, D.M. 1997. **Electrophoresis The Basics.** 1st ed. Oxford University Press Inc., New York.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Huang, S., R. Li, Z. Zhang, L. Li, X. Gu, W. Fan, W.J. Lucas, X. Wang, B. Xie1, P. Ni, Y. Ren, H. Zhu, J. Li, K. Lin, W. Jin, Z. Fei, G. Li, J. Staub, A. Kilian, E.A.G Vossen, Y. Wu, J. Guo, J. He, Z. Jia, Y. Ren, G. Tian, Y. Lu, J. Ruan, W. Qian, M. Wang, Q. Huang, B. Li, Z. Xuan, J. Cao, Asan, Z. Wu, J. Zhang, Q. Cai, Y. Bai, B. Zhao, Y. Han, Y. Li, X. Li, S. Wang, Q. Shi, S. Liu, W. K. Cho, J.Y. Kim, Y. Xu, K.H. Uszynska, H. Miao, Z. Cheng, S. Zhang, J. Wu, Y. Yang, H. Kang, M. Li, H. Liang, X. Ren, Z. Shi, M. Wen, M. Jian, H. Yang, G. Zhang, Z. Yang, R.Chen, S. Liu, J. Li, L. Ma, H. Liu, Y. Zhou, J. Zhao, X. Fang, G. Li, L. Fang, Y. Li, D. Liu, H. Zheng, Y. Zhang, N. Qin, Z. Li, G. Yang, S. Yang, L. Bolund, K. Kristiansen, H. Zheng, S. Li , X. Zhang, H. Yang, J. Wang, R. Sun, B. Zhang, S.i Jiang, J. Wang, Y. Du and S. Li. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. **Nature Genetics** 41: 1275-1283.

International Seed Testing Association. 2007. **International Rules for Seed Testing Edition 2007.** 1st ed. International Seed Testing Association. Bassersdorf.

Janson, J.C. and L. Ryden. 1998. **Protein Purification.** 2nd ed. A John Wiley & Sons. Inc, New York.

John, M.C., Jr. and R.L. Switzer. 1997. **Experimental biochemistry.** W. H. Freeman and Company. U.S.A.

Leist, N. and R. Knoblauch. 2003. Electrophoretic methods for varietal verification (Part I). pp. 32-39. *In* Proceedings of the ISTA/FAO workshop. **International Seed Testing Association**. Augustenberg, Germany.

Lucchese, C., G. Dinelli, A. Miggiano and A. Lovato. 1999. Identification of pepper (*Capsicum* spp.) cultivars by field and electrophoresis tests. **Seed Science and Technology** 27: 37-47.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Massi, G., A. Fabiano, D. Ragusa and P. Auconi. 1979. Characterization of Alpha-1-Antitrypsin by Isoelectric Focusing on an Ultrathin Polyacrylamide Gel Layer: An Economic High-Resolution System for Determining PiM Subtypes. **Human Genetic** 53: 91-95.

McDonald, M.B. 1998. Seed quality assessment. **Seed Science Research** 8: 265-275.

Mosher, R.A., D.A. Saville and W. Thormann. 1992. **The Dynamics of Electrophoresis.** 1st ed. Federal Republics of Germany and VCH Publishers, Inc., New York.

Nakamura, S. 1979. Separation of ryegrass species using electrophoretic pattern of seed proteins and enzymes. **Seed Science and Technology** 7: 161-168.

Noli, E. 2004. Analysis of Genetic Quality of Tomato, Pepper and Eggplant Seeds by Means of Seed Storage Protein Electrophoresis. **Sementi Elette** 50: 67-74.

Ö. Gaál, G.A., A Medgyesi and L. Vereczkey. 1980. **Electrophoresis in the Seperation of Biological Macromolecules.** 1st ed. Akadémiai Kiadó, Budapest.

Payne, R.C. 1987. Seed and Cultivar Identification. **Seed Science and Technology** 15: 641-644.

Peter, R.S. and R. Casey. 1999. **Seed Protein**. Kluwer Academic Publishers. Drenthe.

Radola, B.J. 1980. Ultrathin-layer isoelectric focusing in 50-100 μm polyacrylamide gels on silanized glass plates or polyester films. **Electrophoresis** 1: 43-56.

Righetti, P.G., E. Gianazza, C. Gelfi and M. Chiari. 1990. Isoelectric focusing, pp. 149-216. *In* B.D. Hames and D. Rickwood, eds. **Gel Electrophoresis of Proteins : A Practical Approach.** Oxford University Press, New York.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Robinson, R.W. 1997. **Cucurbits**. 1st ed. CAB International. Oxfordshire.

_____. 1999. Rationale and method for producing hybrid cucurbit seed, pp. 1-48. *In* A.S. Basra, ed. **Hybrid seed production in vegetables.** Food Products Press, New York.

Spoor, W. and J.M. Hay. 1979. Identification of *Poa pratensis* lines using electrophoresis of seed extracts. **Seed Science and Technology** 7: 467-474.

Unlu, M. and J. Minden. 2002. Proteomics: Difference gel electrophoresis, pp. 228-243. *In* G.C. Howard and W.E. Brown, eds. **Modern protein chemistry: practical aspects.** CRC Press, New York.

Van den Berg, B.M. 1990. Inbred testing of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) F1 varieties by ultrathin-layer isoelectric focusing of seed protein. **Electrophoresis** 11: 824-829.

_____. 1991. A rapid and economical method for hybrid purity testing of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) F1 hybrids using ultrathin-layer isoelectric focusing of alcohol dehydrogenase variants from seeds. **Electrophoresis** 12: 64-69.

Van De Weghe, L. 1991. Comparative study of electrophoretic methods for cultivar identificati on of wheat and triticale. **Seed Science and Technology** 19: 41-50.

Vickery, H.B., E.L. Smith, R.B. Hubbell and L.S. Nolan. 1941. Cucurbit seed globulins. **The Journal of Biological Chemistry** 28: 613-624.

Vladova, R., V. Tsanev and K. Petcolicheva. 2004. Seed storage proteins in *Solanaceae* and *Cucurbitaceae* species. **Biologia Plantarum** 48: 601-603.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Vladova, R., M. Zamfirova, T. Andreev and L. Krasteva. 2008. Electrophoretic spectra of seed storage protein *in Cucumis melo* and *Citrullus lanatus* as a tool for cultivar differentiation, pp. 323-326. *In* M. Pitrat, ed. **Proceedings of the IXth Cucurbitaceae 2008**. EUCARPIA genetics and breeding of Cucurbitaceae, INRA, Avignon, France.

Wang, X.F., R. Knoblauch and N. Leist. 2000. Varietal discrimination of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) by ultrathin-layer isoelectric focusing of seed protein. **Seed Science and Technology** 28: 521-526.

_____, _____ and _____. 2001. Identification of varieties and testing of hybrid purity of rice by ultrathin-layer isoelectric focusing of seed protein. **International Rice Research Note** 26: 18-19.

Yan, M., H. Ye and X.F. Wang. 2006. Investigation into the feasibility of assessing the hybridity of immature rice grains. **Seed Science and Technology** 34: 1-8.

Zhao, T., M.Yan, Y.P. Lu, F. Yang, J. Huang and X.F. Wang. 2003. Genetic purity testing of two-line hybrid rice seeds by ultrathin-layer isoelectric focusing of proteins. **Seed Science and Technology** 33: 45-52.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

ส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้สำหรับทำ UTLIEF

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้สำหรับทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค UTLIEF (Leist and Knoblauch, 2003)

1. Acrylamide solution

สารเคมี	ปริมาณ	
acrylamide (4x)	33.14	กรัม
bisacrylamide (2x)	0.86	กรัม
ละลายน้ำและปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ	500	มิลลิลิตร

2. 20% APS solution

สารเคมี	ปริมาณ	
ammonium persulphate	2.0	กรัม
ละลายน้ำและปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ	10	มิลลิลิตร

3. Anode buffer

สารเคมี	ปริมาณ	
L-asparagine anhydrous	0.8	กรัม
L-glutamine	0.92	กรัม
ละลายน้ำและปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ	250	มิลลิลิตร

4. Cathode buffer

สารเคมี	ปริมาณ	
L-arginine	1.18	กรัม
L-lysine	0.91	กรัม
ethylene-diamine	30.0	มิลลิลิตร
ละลายน้ำและปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ	250	มิลลิลิตร

5. 12% TCA solution

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารเคมี	ปริมาณ	
Trichloroacetic acid	266.67	กรัม
ละลายน้ำและปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

6. Staining solution

สารเคมี	ปริมาณ	
Coomassie R250	0.15	กรัม
Coomassie G250	0.45	กรัม
glacial acetic acid	110	มิลลิลิตร
ethanol 95%	180	มิลลิลิตร
ละลายน้ำและปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

7. Destaining solution

สารเคมี	ปริมาณ	
ethanol 95%	300	มิลลิลิตร
glacial acetic acid	50	มิลลิลิตร
ละลายน้ำและปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

8. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

สารเคมี	ปริมาณ	
K_2HPO_4	0.194	กรัม
KH_2PO_4	0.528	กรัม
EDTA	0.38	กรัม
DTE	1	กรัม
glycerin	25	มิลลิลิตร
ละลายน้ำและปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

9. การเตรียมสารละลาย Na_2EDTA ความเข้มข้น 0.005 โมลาร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารเคมี	ปริมาณ	
Na_2EDTA	1.861	กรัม
ละลายน้ำและปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

10. การเตรียมสารละลายเกลือแกงความเข้มข้น 0.005 โมลาร์

สารเคมี	ปริมาณ	
NaCl	0.29	กรัม
ละลายน้ำและปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ครบ	1,000	มิลลิลิตร

หมายเหตุ สำหรับ acrylamide solution 20% APS solution Anode buffer Cathode buffer ฟอสเฟบัฟเฟอร์ และ ยูเรีย เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ APS ไม่ควรเตรียมไว้นานเกิน 2 สัปดาห์ สำหรับ 12% TCA solution staining solution และ destaining solution เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการ Bradford protein assay

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

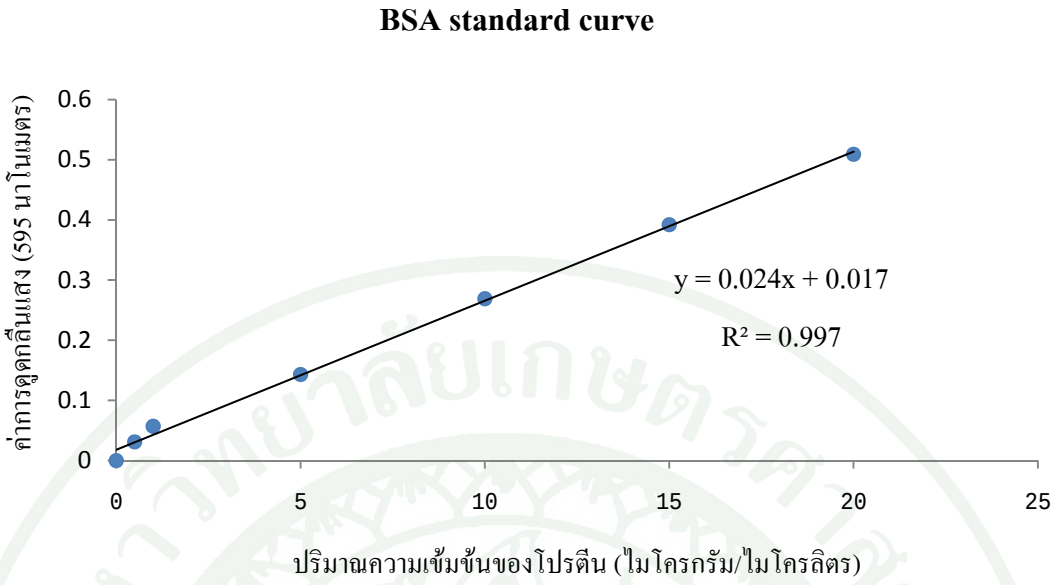
วิธีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการ Bradford protein assay (1976)

1. เตรียมตัวอย่าง Bovine Serum Albumin (BSA) โปรตีน เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อใช้สำหรับเตรียมหาความเข้มข้นของโปรตีนในเมล็ดแตงกวาสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้ตัวอย่างสารละลายโปรตีน BSA ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ นำมาหาค่าเฉลี่ย จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปสร้าง BSA standard curve (ตารางผนวกที่ 1 และ ภาพผนวกที่ 1)

ตารางผนวกที่ 1 ปริมาตรของสารละลายที่ใช้เตรียมตัวอย่างสารละลาย BSA โปรตีน เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (A595) ด้วยเครื่อง spectrophotometer จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปสร้าง BSA Standard curve

ปริมาตรสารละลายโปรตีน (ไมโครลิตร)	ปริมาตรน้ำ (ไมโครลิตร)	สารละลาย Bradford (ไมโครลิตร)	A595		
			ซ้ำ1	ซ้ำ2	ค่าเฉลี่ย
0	0	1000	0.000	0.000	0.000
0.5	19.5	880	0.020	0.031	0.025
1	19	880	0.020	0.057	0.038
5	15	880	0.131	0.143	0.137
10	10	880	0.252	0.269	0.261
15	5	880	0.365	0.392	0.378
20	0	880	0.475	0.509	0.492

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ 1 Standard curve ของ Bovine Serum Albumin (BSA) โปรตีน ที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย BSA โปรตีน ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

2. เตรียมตัวอย่างโปรตีนของเมล็ดแตงกวาแต่ละสายพันธุ์ เพื่อทดสอบหาปริมาตรของโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยทดลองใช้ตัวอย่างสารละลายโปรตีนของเมล็ดแตงกวาในปริมาตรต่าง ๆ กัน คือ 1 2 และ 3 ไมโครลิตร โดยใช้ตัวอย่างสารละลายโปรตีนปริมาตรละ 2 ซ้ำ จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

3. หลังจากนำตัวอย่างโปรตีนไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร พบว่าแตงกวาใช้สารละลายโปรตีนในปริมาตร 2 ไมโครลิตรจะได้ค่าการดูดกลืนแสงที่อยู่ในช่วง BSA standard curve มากที่สุด ดังนั้นสำหรับแตงกวาจึงเลือกใช้ตัวอย่างสารละลายโปรตีนในปริมาตร 2 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเตรียมตัวอย่างสารละลายโปรตีนของเมล็ดแตงกวา เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร (ตารางผนวกที่ 2 3 และ 4) และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม/เมล็ด) (ตารางผนวกที่ 5 6 และ 7)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 2 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดแตงกวาพันธุ์การค้า 4 พันธุ์ โดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์ และ NaCl 5 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวทำละลายด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

พันธุ์แตงกวา	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร					
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 4	ซ้ำ 5	ค่าเฉลี่ย
สกัดด้วยน้ำ						
ไมโครซี	0.642	0.603	0.648	0.601	0.611	0.621
บิ๊กซี	0.563	0.638	0.703	0.583	0.63	0.623
โชคดี	0.531	0.529	0.537	0.611	0.541	0.549
บุษบา 2005	0.535	0.566	0.538	0.568	0.545	0.550
สกัดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์						
ไมโครซี	0.946	0.976	0.762	0.758	0.636	0.816
บิ๊กซี	0.634	0.629	0.626	0.628	0.748	0.653
โชคดี	0.812	0.831	0.993	1.023	0.999	0.932
บุษบา 2005	0.974	1.005	1.001	1.025	0.882	0.977
สกัดด้วย Na_2EDTA (5 mM)						
ไมโครซี	0.643	0.636	0.617	0.611	0.602	0.622
บิ๊กซี	0.585	0.603	0.547	0.583	0.554	0.574
โชคดี	0.527	0.508	0.53	0.504	0.591	0.532
บุษบา 2005	0.654	0.645	0.541	0.534	0.575	0.589
สกัดด้วย NaCl (5 mM)						
ไมโครซี	0.642	0.627	0.61	0.593	0.592	0.613
บิ๊กซี	0.628	0.606	0.683	0.666	0.561	0.629
โชคดี	0.493	0.474	0.546	0.533	0.503	0.510
บุษบา 2005	0.506	0.495	0.586	0.571	0.596	0.551

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 3 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดพันธุ์แตงกวา สำหรับนำมาทดสอบประสิทธิภาพ 8 สายพันธุ์ โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

พันธุ์แตงกวา	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร					
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 4	ซ้ำ 5	ค่าเฉลี่ย
ไฉไล	0.630	0.642	0.703	0.603	0.608	0.637
ภูฟ้า	0.563	0.587	0.648	0.583	0.611	0.598
บิงโก	0.465	0.453	0.517	0.476	0.661	0.514
CS017	0.623	0.594	0.581	0.593	0.604	0.599
CS018	0.564	0.589	0.635	0.579	0.594	0.592
CS054	0.601	0.591	0.772	0.725	0.657	0.669
CS059	0.511	0.593	0.6	0.576	0.583	0.573
CS091	0.514	0.563	0.598	0.523	0.556	0.551

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 4 ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดแตงกวา 10 สายพันธุ์โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

พันธุ์แตงกวา	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร				
	เมล็ดที่ 1	เมล็ดที่ 2	เมล็ดที่ 3	เมล็ดที่ 4	ค่าเฉลี่ย
สายพันธุ์ #01					
พันธุ์พ่อ	0.263	0.262	0.306	0.232	0.266
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.265	0.268	0.395	0.304	0.308
พันธุ์แม่	0.362	0.236	0.331	0.405	0.333
สายพันธุ์ #02					
พันธุ์พ่อ	0.317	0.387	0.297	0.331	0.333
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.253	0.373	0.253	0.281	0.290
พันธุ์แม่	0.338	0.321	0.237	0.235	0.283
สายพันธุ์ #03					
พันธุ์พ่อ	0.352	0.385	0.327	0.262	0.332
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.317	0.340	0.277	0.307	0.310
พันธุ์แม่	0.311	0.256	0.240	0.249	0.264
สายพันธุ์ #04					
พันธุ์พ่อ	0.240	0.343	0.251	0.262	0.274
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.276	0.230	0.282	0.235	0.256
พันธุ์แม่	0.231	0.245	0.405	0.360	0.310
สายพันธุ์ #05					
พันธุ์พ่อ	0.207	0.228	0.244	0.197	0.219
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.285	0.256	0.464	0.279	0.321
พันธุ์แม่	0.242	0.271	0.237	0.215	0.241

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

พันธุ์แตงกวา	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร				
	เมล็ดที่ 1	เมล็ดที่ 2	เมล็ดที่ 3	เมล็ดที่ 4	ค่าเฉลี่ย
สายพันธุ์ #06					
พันธุ์พ่อ	0.233	0.249	0.405	0.250	0.284
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.242	0.284	0.388	0.265	0.295
พันธุ์แม่	0.363	0.265	0.275	0.290	0.298
สายพันธุ์ #07					
พันธุ์พ่อ	0.287	0.441	0.271	0.256	0.314
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.461	0.302	0.306	0.349	0.355
พันธุ์แม่	0.275	0.226	0.279	0.236	0.254
สายพันธุ์ #08					
พันธุ์พ่อ	0.251	0.245	0.261	0.282	0.259
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.254	0.294	0.257	0.269	0.268
พันธุ์แม่	0.287	0.300	0.283	0.328	0.299
สายพันธุ์ #09					
พันธุ์พ่อ	0.240	0.241	0.230	0.263	0.243
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.223	0.282	0.236	0.234	0.244
พันธุ์แม่	0.254	0.251	0.298	0.229	0.258
สายพันธุ์ #10					
พันธุ์พ่อ	0.242	0.329	0.244	0.293	0.277
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.341	0.259	0.217	0.254	0.268
พันธุ์แม่	0.347	0.297	0.269	0.281	0.299

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 5 ผลการคำนวณหาปริมาณโปรตีนรวมของเมล็ดพันธุ์แตงกวาพันธุ์การค้า 4 พันธุ์ โดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิด คือ น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ Na_2EDTA 5 มิลลิโมลาร์ และ NaCl 5 มิลลิโมลาร์ ในการสกัดโปรตีน

พันธุ์แตงกวา	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ (ไมโครลิตร)	ปริมาณโปรตีนรวม (มิลลิกรัม/เมล็ด)
สกัดด้วยน้ำ				
ไมโครซี	0.621	0.043	78	2.67
บิ๊กซี	0.624	0.043	91	3.13
โชคดี	0.549	0.040	78	2.51
บุษบา 2005	0.550	0.040	70	2.25
สกัดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์				
ไมโครซี	0.816	0.051	54	2.77
บิ๊กซี	0.653	0.044	60	2.67
โชคดี	0.932	0.056	70	3.93
บุษบา 2005	0.977	0.058	80	4.64
สกัดด้วย Na_2EDTA (5 mM)				
ไมโครซี	0.622	0.043	62	2.65
บิ๊กซี	0.574	0.041	55	2.39
โชคดี	0.532	0.039	59	2.27
บุษบา 2005	0.589	0.042	64	2.57
สกัดด้วย NaCl (5 mM)				
ไมโครซี	0.613	0.043	60	2.59
บิ๊กซี	0.629	0.043	55	2.26
โชคดี	0.509	0.038	59	2.32
บุษบา 2005	0.551	0.040	46	1.92

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 6 ผลการคำนวณหาปริมาณโปรตีนรวม ของเมล็ดพันธุ์แตงกวาสำหรับนำมาทดสอบประสิทธิภาพ 8 สายพันธุ์โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

พันธุ์แตงกวา	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ (ไมโครลิตร)	ปริมาณโปรตีนรวม (มิลลิกรัม/ เมล็ด)
ไฉไล	0.637	0.032	84	2.71
ภูฟ้า	0.598	0.031	78	2.45
บิงโก	0.514	0.029	92	2.70
CS017	0.599	0.031	69	2.16
CS018	0.592	0.031	73	2.28
CS054	0.669	0.033	80	2.64
CS059	0.573	0.031	86	2.63
CS091	0.551	0.030	111	3.36

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 7 ผลการคำนวณหาปริมาณโปรตีนรวม ของสายพันธุ์แตงกวาโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย เพื่อนำไปตรวจสอบความเป็นลูกผสม

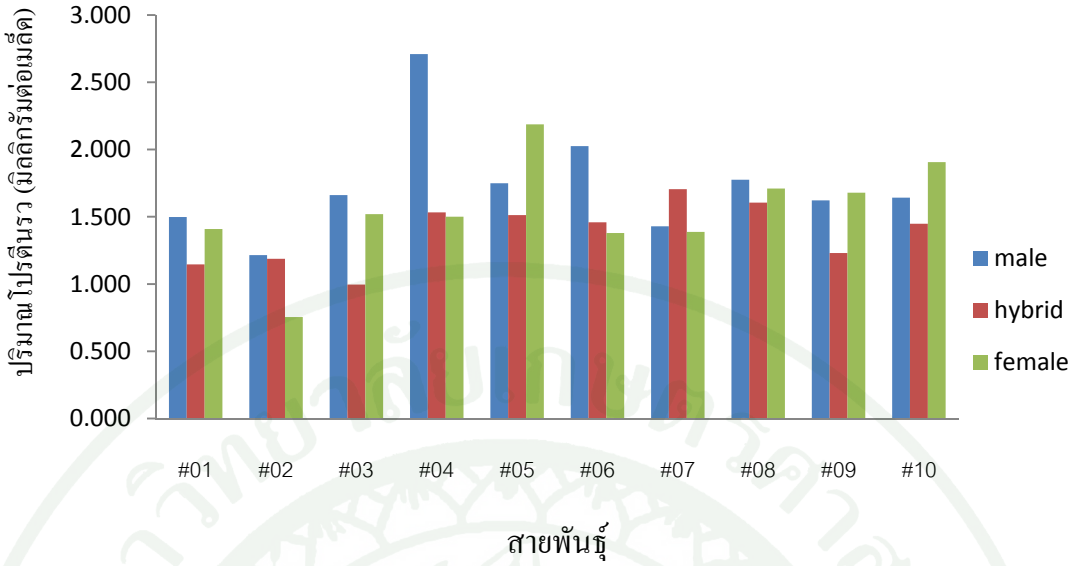
สายพันธุ์แตงกวา	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ (ไมโครลิตร)	ปริมาณโปรตีนรวม (มิลลิกรัม/ เมล็ด)
สายพันธุ์ #01				
พันธุ์พ่อ	0.266	0.023	32	1.50
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.308	0.024	23	1.14
พันธุ์แม่	0.334	0.025	28	1.42
สายพันธุ์ #02				
พันธุ์พ่อ	0.333	0.025	24	1.22
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.290	0.024	25	1.18
พันธุ์แม่	0.283	0.024	16	0.77
สายพันธุ์ #03				
พันธุ์พ่อ	0.332	0.025	34	1.67
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.310	0.024	20	1.00
พันธุ์แม่	0.264	0.023	33	1.52
สายพันธุ์ #04				
พันธุ์พ่อ	0.274	0.024	57	2.71
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.256	0.023	33	1.53
พันธุ์แม่	0.310	0.024	31	1.49
สายพันธุ์ #05				
พันธุ์พ่อ	0.219	0.022	39	1.75
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.321	0.025	31	1.51
พันธุ์แม่	0.241	0.023	48	2.19

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 7 (ต่อ)

สายพันธุ์แตงกวา	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้น (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ปริมาตรสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ (ไมโครลิตร)	ปริมาณโปรตีนรวม (มิลลิกรัม/ เมล็ด)
สายพันธุ์ #06				
พันธุ์พ่อ	0.284	0.024	42	2.01
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.295	0.024	30	1.46
พันธุ์แม่	0.298	0.024	29	1.40
สายพันธุ์ #07				
พันธุ์พ่อ	0.314	0.025	29	1.42
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.355	0.026	34	1.71
พันธุ์แม่	0.254	0.023	30	1.39
สายพันธุ์ #08				
พันธุ์พ่อ	0.260	0.023	38	1.78
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.269	0.023	34	1.61
พันธุ์แม่	0.300	0.024	35	1.71
สายพันธุ์ #09				
พันธุ์พ่อ	0.244	0.023	35	1.62
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.244	0.023	27	1.23
พันธุ์แม่	0.258	0.023	36	1.68
สายพันธุ์ #10				
พันธุ์พ่อ	0.277	0.024	35	1.64
ลูกผสมชั่วที่ 1	0.268	0.023	31	1.46
พันธุ์แม่	0.299	0.024	40	1.91

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ 2 ปริมาณโปรตีนรวมจากเมล็ดแตงกวาเมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลายทั้ง 10 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ #01 #02 #03 #04 #05 #06 #07 #08 #09 และ #10

ตารางผนวกที่ 8 ปริมาตรของสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ และปริมาตรน้ำที่ใช้ในการหยดลงในแต่ละหลุมสำหรับการทำ electrophoresis ด้วยวิธี UTLIEF

สายพันธุ์แตงกวา	ปริมาตรที่ใช้ในการทำ electrophoresis (ไมโครลิตร)	
	สารละลายโปรตีน	น้ำ
สายพันธุ์ #01		
พันธุ์พ่อ	8.0	12.0
ลูกผสมชั่วที่ 1	8.4	11.6
พันธุ์แม่	8.1	11.9
สายพันธุ์ #02		
พันธุ์พ่อ	8.0	12.0
ลูกผสมชั่วที่ 1	8.0	12.0
พันธุ์แม่	8.5	11.5
สายพันธุ์ #03		
พันธุ์พ่อ	8.0	12.0
ลูกผสมชั่วที่ 1	8.7	11.3
พันธุ์แม่	8.1	11.9

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 8 (ต่อ)

สายพันธุ์แตงกวา	ปริมาตรที่ใช้ในการทำ electrophoresis (ไมโครลิตร)	
	สารละลายโปรตีน	น้ำ
สายพันธุ์ #04		
พันธุ์พ่อ	8.0	12.0
ลูกผสมชั่วที่ 1	9.2	10.8
พันธุ์แม่	9.2	10.8
สายพันธุ์ #05		
พันธุ์พ่อ	8.4	11.6
ลูกผสมชั่วที่ 1	8.7	11.3
พันธุ์แม่	8.0	12.0
สายพันธุ์ #06		
พันธุ์พ่อ	8.0	12.0
ลูกผสมชั่วที่ 1	8.6	11.4
พันธุ์แม่	8.6	11.4
สายพันธุ์ #07		
พันธุ์พ่อ	8.3	11.7
ลูกผสมชั่วที่ 1	8.0	12.0
พันธุ์แม่	8.3	11.7
สายพันธุ์ #08		
พันธุ์พ่อ	8.0	12.0
ลูกผสมชั่วที่ 1	8.2	11.8
พันธุ์แม่	8.1	11.9
สายพันธุ์ #09		
พันธุ์พ่อ	8.1	11.9
ลูกผสมชั่วที่ 1	8.4	11.6
พันธุ์แม่	8.0	12.0
สายพันธุ์ #10		
พันธุ์พ่อ	8.3	11.7
ลูกผสมชั่วที่ 1	8.5	11.5
พันธุ์แม่	8.0	12.0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

ต้นทุนในการทำ UTLIEF

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต้นทุนในการทำ UTLIEF

คำนวณในรูปแบบของต้นทุนผันแปร โดยคำนึงถึง ต้นทุนที่เป็นเงินสด และต้นทุนที่ไม่เป็นเงินสด ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วนดังนี้

1. ค่าจ้างแรงงานรายวัน
2. ค่าวัสดุสิ้นเปลืองและสารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
3. ค่าใช้จ่ายอื่น เช่น ค่าน้ำ ค่าไฟ และค่าเสียโอกาสต่างๆ

ต้นทุนในการทำ UTLIEF ต่อการตรวจสอบตัวอย่าง 1 เมล็ดโดยทำการตรวจสอบ 52 เมล็ด ในระยะเวลา 4 ชั่วโมง

รายการ	ราคา (บาท)	ต้นทุนต่อ 1 เมล็ด
ต้นทุนผันแปร		
1. แรงงาน	267	5.13
2. วัสดุปัจจัย		
2.1 สารเคมี		
2.1.1 Ampholyte	113	2.17
2.1.2 Acetate sheet	200	3.85
2.1.3 สารเคมีอื่นๆ	200	3.85
2.2 อุปกรณ์	50	0.96
3. ค่าน้ำและค่าไฟ	9	0.17
รวม	839	16.13
ต้นทุนคงที่		
1. ค่าเสื่อมเครื่องมือ และอุปกรณ์	44	0.85
รวมต้นทุนทั้งหมดต่อ 52 เมล็ด	883	16.98

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายดำรงวุฒิ อ่อนวิมล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	21 มีนาคม 2527
สถานที่เกิด	จังหวัดสุพรรณบุรี
ประวัติการศึกษา	- จบการศึกษาระดับมัธยมปลาย ปีการศึกษา 2544 โรงเรียนกรรณสูตศึกษาลัย จังหวัดสุพรรณบุรี - จบการศึกษาระดับปริญญาตรี ปีการศึกษา 2548 สาขาวิชาวนวัฒนวิทยา คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ ประจำปีงบประมาณ 2552 สำหรับนิสิตที่ส่งโครงการวิทยานิพนธ์แล้ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์