ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

พืชไร่นา | พืชไร่นา

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์และการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ในพืชน้ำมันบางชนิดโดยวิธี Ultrathin-layer Isoelectric Focusing

Seed Purity Testing and Varietal Identification of Certain Oil Crops using Ultrathin-layer Isoelectric Focusing

นามผู้วิจัย นางสาวธัญมาศ นิยมญาติ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทร์เปรม, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์บุบผา คงสมัย, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทร์เปรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์และการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ในพืชน้ำมันบางชนิดโดยวิธี Ultrathin-layer Isoelectric Focusing

Seed Purity Testing and Varietal Identification of Certain Oil Crops using Ultrathin-layer Isoelectric Focusing

โดย

นางสาวธัญมาศ นิยมญาติ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2552

ธัญมาศ นิยมญาติ 2552: การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์และการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ในพืชน้ำมันบางชนิดโดยวิธี Ultrathin-layer Isoelectric Focusing ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาพืชไร่นา ภาควิชาพืชไร่นา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สนธิชัย จันทร์เปรม, Ph.D.
51 หน้า

ได้ทดลองแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ของเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน 4 พันธุ์ ถั่วลิสง 6 พันธุ์ และงา 2 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค ultrathin-layer isoelectric focusing (UTLIEF) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีนจากเมล็ดเพื่อใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์และแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ในทานตะวัน ถั่วลิสง และงา และศึกษาปริมาณเมล็ดที่เหมาะสมในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์โดยวิธี UTLIEF ใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ แล้วนำมาแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2500 โวลต์ พบว่า น้ำเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดสำหรับนำไปใช้ในการสกัดและแยกโปรตีนและแยกสายพันธุ์ในเมล็ดทานตะวันและเมล็ดงา ในเมล็ดถั่วลิสงตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ ในเมล็ดงาน้ำเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมที่สุดสำหรับนำไปใช้ในการสกัดโปรตีนและแยกสายพันธุ์ เมื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์พบว่า น้ำเป็นตัวทำละลายที่มีความเหมาะสมที่ใช้ในการสกัดโปรตีนและตรวจสอบในเมล็ดทานตะวัน และเมล็ดงา การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของทานตะวันและถั่วลิสงโดยทดสอบเมล็ดที่ตัดแบ่งเป็น 1/2 1/3 และ1/4 ของเมล็ด พบว่าสามารถนำส่วนที่แบ่งเป็น 1/2 ของเมล็ดพันธุ์ทานตะวันมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ได้ และเมื่อทดสอบจำนวนเมล็ดงาที่ใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ พบว่า ต้องใช้เมล็ดงาอย่างน้อยที่สุด 6 เมล็ด จึงจะเพียงพอสำหรับการตรวจสอบพันธุ์

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Tanyamart Niyomyard 2009: Seed Purity Testing and Varietal Identification of Certain Oil Crops using Ultrathin-layer Isoelectric Focusing. Master of Science (Agriculture), Major Field: Agronomy, Department of Agronomy. Thesis Advisor: Associate Professor Sontichai Chanprame, Ph.D. 51 pages.

Varietal identification of 4 sunflower, 6 groundnut and 2 sesame varieties using ultrathin-layer isoelectric focusing (UTLIEF) was carried out. The objective of this study was to determine the suitable sovents for seed purity testing and varietal identification of sunflower, groundnut and sesame and to determine the least quantity of seeds needed for varieties testing. Three different sovents, water, 4 M urea and 3.8 mM phosphate buffer, were tested. The extracted seed storage proteins were separated in polyacrylamide gel with a pH-gradient of the matrix ranges from 2-9 at 8°C with 2500 v. It was found that water was the most suitable sovent for seed storage protein extraction and identification in sunflower and sesame. In groundnut, all three tested sovents did not show the different between the varieties tested. For hybrid seed purity testing, it was found that water was the most suitable sovent for seed storage protein extraction and identification in sunflower and sesame. The various portions of endosperm 1/2 1/3 and 1/4 were used for sunflower variety identification. The results showed that half-seed endosperm yielded the best protein bands pattern followed by the 1/3 and 1/4 of seed, respectively. It was also found that at least 6 seeds of sesame were needed for varietal identification.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร สนธิชัย จันทร์เปรม ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร. บุบผา คงสมัย กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ดร. นงลักษณ์ เทียนเสรี ประธานการสอบ และดร. อัญชีรา วิบูลย์จันทร์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำเรื่องการเรียน การวางแผนงานวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์นี้จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ ที่อนุเคราะห์สถานที่รวมทั้งเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ขอขอบพระคุณพี่ เพื่อน และน้อง ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการที่คอยช่วยเหลือในการทำแปลงทดลองให้คำปรึกษาและแนะนำปัญหาต่างๆ และเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าด้วยดีตลอดมา ขอกราบขอบพระคุณแม่ และพ่อ ที่คอยเป็นกำลังใจเสมอมา

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ท้ายที่สุดนี้ขอกราบขอบพระคุณบูรพาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาความรู้ด้านต่างๆ ให้แก่ข้าพเจ้าตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

ธัญมาศ นิยมญาติ

พฤษภาคม 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	16
อุปกรณ์	16
วิธีการ	17
ผลและวิจารณ์	21
สรุปและข้อเสนอแนะ	43
สรุป	43
ข้อเสนอแนะ	43
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	44
ภาคผนวก	47
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	51

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดถั่วลิสงโดยใช้น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย	25
2	ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดงาโดยใช้น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดทานตะวันลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ Pacific 55 × PI 323281 และสายพันธุ์พ่อ-แม่โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)	28
3	ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดทานตะวันลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ Pacific 55 × PI 380874 และสายพันธุ์พ่อ-แม่โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)	31
4	ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดทานตะวันลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ Pacific 55 × PI 402586 และสายพันธุ์พ่อ-แม่โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)	32
5	ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดงาลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์นครสวรรค์ และมก 19 และสายพันธุ์พ่อ-แม่ โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)	33
6	ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดทานตะวันที่แบ่งเป็น 1/2 1/3 และ1/4 ของเมล็ดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)	36
7	ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดทานตะวันที่แบ่งเป็น 1/2 1/3 และ1/4 ของเมล็ดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)	37

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
8	ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดงาขาวพันธุ์ มก 19 จำนวนตั้งแต่ 1 ถึง 10 เมล็ด ด้วยน้ำ วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)	42

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แถบโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดทานตะวัน 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ Pacific55 323281 380874 และ 402586 โดยใช้ ก.) น้ำ ข.) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และ ค.) ยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย ใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2500 โวลต์ ลูกศรที่ชี้คือการแสดงตำแหน่งแถบโปรตีนที่มีความแตกต่าง	23
2	แถบโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดถั่วลิสง 6 พันธุ์ คือ โดยใช้ ก.) น้ำ ข.) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และ ค.) ยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย ใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2500 โวลต์ ลูกศรที่ชี้คือการแสดงตำแหน่งแถบโปรตีนที่มีความแตกต่าง ก2 คือ กาฬสินธุ์ 2 ข60-1 คือ ขอนแก่น 60-1 ข60-2 คือ ขอนแก่น 60-2 ข4 คือ ขอนแก่น 4 ข5 คือ ขอนแก่น 5 ข6 คือ ขอนแก่น	26
3	แถบโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดงา 2 พันธุ์ คือ งาดำพันธุ์นครสวรรค์ และงาขาวพันธุ์ มก 19 โดยใช้ ก.) น้ำ ข.) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และค.) ยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย ใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2500 โวลต์ ลูกศรที่ชี้คือการแสดงตำแหน่งแถบโปรตีนที่มีความแตกต่าง	29
4	แถบโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ของทานตะวัน เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่ โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องศาเซลซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2500 โวลต์ ลูกศรที่ชี้คือการแสดงตำแหน่งแถบโปรตีนที่มีความแตกต่าง	34
5	แถบโปรตีนที่สกัดจากลูกผสมชั่วที่ 1 ของเมล็ดงาโดยเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อ (พันธุ์นครสวรรค์) สายพันธุ์แม่ (พันธุ์ มก 19) โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องศาเซลซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2500 โวลต์ ลูกศรที่ชี้คือการแสดงตำแหน่งแถบโปรตีนที่มีความแตกต่าง	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
6	แถบโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดทานตะวัน 1/2 1/3 และ 1/4 ของเมล็ด ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องศาเซลซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2500 โวลต์	39
7	การทดสอบความงอกของเมล็ดทานตะวันที่แบ่งเป็น 1/2 1/3 และ 1/4 ของเมล็ด เปรียบเทียบกับเมล็ดทานตะวันปกติ ทดสอบที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน	40
8	แถบโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดงาขาวพันธุ์ มก 19 โดยใช้จำนวนเมล็ดต่าง ๆ และใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องศาเซลซียส ความต่างศักย์ ไฟฟ้า 2500 โวลต์	41

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

APS	=	ammonium peroxydisulphate
BSA	=	bovine serum albumin
DTE	=	dithioerythritol
EDTA	=	ethylene diamine tetra acetic acid
IEF	=	isoelectric focusing
ISTA	=	International Seed Testing Association
pH	=	logarithm of reciprocal of hydrogen (H^+) ion concentration
pI	=	isoelectric point
TCA	=	trichloroacetic acid
TEMED	=	N N N'N'-Tetramethylethylenediamine
UTLIEF	=	ultrathin-layer isoelectric focusing

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์และการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ในพืชน้ำมันบางชนิด โดยวิธี Ultrathin-layer Isoelectric Focusing

Seed Purity Testing and Varietal Identification of Certain Oil Crops using Ultrathin-layer Isoelectric Focusing

คำนำ

พืชพันธุ์ที่ได้รับการส่งเสริมในปัจจุบันและในอนาคต รวมทั้งพืชพันธุ์พื้นเมืองดั้งเดิม พืชเอกลักษณ์ประจำถิ่น จัดเป็นทรัพยากรที่มีค่าของชาติ จำเป็นต้องได้รับการปกปักรักษาเอาไว้ ในทางกฎหมายแล้วการทวงสิทธิเป็นเจ้าของจำเป็นต้องมีหลักฐานยืนยัน การได้มาซึ่งหลักฐานยืนยันเอกลักษณ์ของพืชอาจทำโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาของพืช แต่ลักษณะดังกล่าวอาจไม่เพียงพอเสียแล้วในปัจจุบัน หลักฐานยืนยันที่เป็นที่ยอมรับกันมากที่สุดในปัจจุบันคือลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชนั้น เนื่องจากเป็นลักษณะที่จำเพาะเจาะจงมาก ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ (ถ้าเปลี่ยนแปลงหมายถึงการเปลี่ยนแปลงพันธุ์พืช)

การตรวจสอบเอกลักษณ์พันธุ์พืชโดยการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคหลายชนิด เช่น RAPD (random amplified polymorphic DNA) microsatellites หรือ simple sequence repeat polymorphism (SSRP) amplified fragment length polymorphism (AFLP) arbitrarily primed PCR (AP-PCR) (Chawla, 2000) มีค่าใช้จ่ายสูง โดยค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจะประมาณตัวอย่างละ 20 บาท เมื่อใช้เทคนิค SSRP หรือ 75 บาท เมื่อใช้เทคนิค isozyme ในการตรวจสอบ (Wang *et al*., 2001)

ในขณะนี้ได้มีการใช้เทคนิคใหม่ในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์เรียกว่า ultrathin-layer isoelectric focusing (UTLIEF) วิธีนี้ใช้การตรวจสอบโปรตีนในเมล็ดซึ่งเสียค่าใช้จ่ายน้อยกว่า (ISTA, 1999) และเป็นวิธีการมาตรฐานวิธีหนึ่งของ International Seed Testing Association (ISTA) หลักการของวิธีแยกโปรตีนโดยวิธี isoelectric focusing คือ การแยกสาร (โปรตีน) ชนิดต่าง ๆ ที่ปะปนกันอยู่และละลายได้ในน้ำหรือตัวทำละลายอื่นออกจากกันตามคุณสมบัติของค่า isoelectric ของโปรตีนแต่ละชนิด โปรตีนแต่ละชนิดที่แยกได้จะถูกป้องกันไม่ให้กลับเข้ามาผสมรวมกันใหม่อีกโดยการผสมตัวกลางหรือตัวพา (carrier) บางชนิดเข้าไปก่อนการแยก เช่น agar หรือ

polyacrylamine gel เป็นต้น จากนั้นจึงให้กระแสไฟฟ้า ซึ่งจะทำให้เกิด pH-gradient ขึ้นระหว่างขั้วไฟฟ้าทั้งสอง โปรตีนผสมทั้งหลายจะเคลื่อนที่ผ่าน pH-gradient จนกระทั่งถึงจุดที่มีค่าเท่ากับ isoelectric point ของโปรตีนชนิดนั้น ๆ ก็จะหยุดเคลื่อนที่ทำให้เกิดการแยกของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ออกจากกันได้ (Leist *et al*., 2003) วิธีการดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชบางชนิดได้ เช่น ข้าว (Wang *et al*., 2001) ข้าวโพด (Leist *et al*., 2003) แต่ยังไม่มีรายงานการใช้เทคนิคนี้ในพืชตระกูลถั่ว หรือพืชผักต่าง ๆ

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีนจากเมล็ด เพื่อใช้ในการตรวจ สอบความบริสุทธิ์และแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ในทานตะวัน ถั่วลิสง และงา

2. ศึกษาปริมาณเมล็ดที่เหมาะสมในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์โดยวิธี UTLIEF

การตรวจเอกสาร

1. ทานตะวัน (sunflower)

ทานตะวัน (sunflower) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus annuus* L. จัดเป็นพืชน้ำมันที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง มีไขมันร้อยละ 22-40โปรตีนร้อยละ 22-30 น้ำมันทานตะวันมีคุณภาพสูง มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง และประกอบด้วยวิตามินหลายชนิด กากทานตะวันเป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ มีการปลูกทานตะวันกันมากในทวีปยุโรป สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย และแอฟริกาใต้ การปลูกทานตะวันเป็นการค้ายังค่อนข้างใหม่สำหรับประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2512 ได้มีการส่งเสริมให้ปลูกในเขตจังหวัดนครสวรรค์และเพชรบูรณ์ แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ ต่อมาได้มีบริษัทเอกชนนำเมล็ดพันธุ์ทานตะวันลูกผสมจากต่างประเทศมาส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกในเขตจังหวัดสระบุรี ลพบุรี และนครสวรรค์ แต่ให้ผลผลิตไม่ดีนักและแปรปรวนมาก เนื่องจากการปลูกทานตะวันในประเทศไทยเป็นการนำเมล็ดพันธุ์เข้าจากต่างประเทศมาส่งเสริมให้เกษตรกรปลูก มีการประกันราคาและรับซื้อคืน ดังนั้นความต้องการเมล็ดพันธุ์ทานตะวันของเกษตรกรจึงยังไม่ใช่ความต้องการที่แท้จริง และยังไม่มีการผลิตเมล็ดพันธุ์หลักและเมล็ดพันธุ์จำหน่ายของหน่วยงานราชการแต่อย่างใด (วันชัย, 2542)

ปัจจุบันการผลิตทานตะวันยังไม่เพียงพอกับความต้องการใช้ภายในประเทศ แม้ว่าจะใช้เฉพาะในอุตสาหกรรมผลิตน้ำมันเท่านั้น ประเทศไทยนำเข้าเมล็ดและกากทานตะวัน โดยเฉพาะกากทานตะวันมีแนวโน้มที่จะนำเข้ามากขึ้น รัฐบาลจึงส่งเสริมการปลูกทานตะวันในเขตจังหวัดลพบุรี และสระบุรี ในปีเพาะปลูก 2529/30 โดยมีธนาคารเพื่อการเกษตรและสหกรณ์การเกษตรร่วมกับบริษัทเอกชน ส่งเสริมการปลูกทานตะวันเป็นพืชปลายฝนหรือพืชที่สองเพื่อเสริมรายได้ โดยกรมส่งเสริมการเกษตรเป็นผู้คัดเลือกเกษตรกรเข้าร่วมโครงการ สนับสนุนเมล็ดพันธุ์ทานตะวันพันธุ์ลูกผสมและจัดหาปัจจัยการผลิตอื่น ให้บริษัทเอกชนรับซื้อผลผลิตเมล็ดคืนจากเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการทั้งหมด (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา, 2542)

2. ถั่วลิสง (groundnut)

ถั่วลิสง (groundnut) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Arachis hypogaea* จัดเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยพืชหนึ่ง ที่ใช้เมล็ดเป็นอาหารสำหรับมนุษย์ เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูง คือเป็นแหล่งอาหารโปรตีนและไขมัน ถั่งลิสงจัดเป็นพืชน้ำมันเพราะในเมล็ดแห้งประกอบด้วยน้ำมันร้อยละ 45-55 ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าในพืชตระกูลถั่วชนิดอื่น ๆ และมีโปรตีนร้อยละ 25-26

สำหรับการปลูกถั่วลิสงในประเทศไทย เข้าใจว่าชาวโปรตุเกสหรือสเปนเป็นผู้นำเข้ามาเผยแพร่ในสมัยกรุงศรีอยุธยาตอนปลายและมีหลักฐานกล่าวถึงถั่วลิสงคือ หม่อมเจ้าสิทธิพร กฤดากร ได้เขียนจดหมายเหตุจากฟาร์มบางเบิดว่า ในพ.ศ. 2472-73 ประเทศไทยผลิตถั่วลิสงไม่เพียงพอต้องนำเข้าจากประเทศอื่น แสดงว่าได้มีการปลูกถั่วลิสงมาแล้วไม่น้อยกว่า 60-70 ปี และใน พ.ศ. 2505 สถานีกสิกรรมร้อยเอ็ด กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เริ่มดำเนินงานด้านการปรับปรุงพันธุ์และการเขตกรรม โดยรวบรวมพันธุ์ถั่วลิสงจำนวนจำนวน 60 พันธุ์มาปลูกศึกษา จากนั้นการศึกษาเกี่ยวกับการปลูกถั่วลิสงในประเทศไทยจึงก้าวหน้าเรื่อยมา แหล่งผลิตถั่วลิสงกว่าครึ่งหนึ่งของปริมาณการผลิตทั้งโลกอยู่ในทวีปเอเชีย ประเทศผู้ผลิตที่สำคัญได้แก่ อินเดีย และสาธารณรัฐประชาชนจีน รองลงมาคือประเทศในทวีปแอฟริกาได้แก่ ซูดาน เซนีกัล และไนจีเรีย ส่วนแหล่งปลูกถั่วลิสงส่วนใหญ่ของไทยอยู่ทางเหนือเป็นส่วนใหญ่ รองลงมาคือภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา, 2542) โดยการผลิตเมล็ดพันธุ์หลักถั่วลิสงเป็นหน้าที่ของสถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร พันธุ์ถั่วลิสงที่กรมวิชาการเกษตรผลิต ได้แก่ ไทนาน9 ขอนแก่น60-1 ขอนแก่น60-2 ขอนแก่น60-3 สข. 38 ขอนแก่น4 (วันชัย, 2542)

3. งา (sesame)

งา (sesame) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Sesamum indicum* จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญในเขตที่มีปริมาณน้ำน้อย สามารถปลูกได้ทุกภาคของประเทศ ทั้งนี้เพราะงาทนต่อสภาพความแห้งแล้งได้ดีพอสมควร แต่ไม่ทนต่อสภาพน้ำขังแฉะ ดินเค็ม หรือดินที่เป็นกรดจัด ปลูกง่าย ลงทุนน้อย มีตลาดกว้าง และราคาดีมาโดยตลอด จึงเหมาะสำหรับใช้ปลูกเป็นพืชเสริมรายได้ โดยปลูกก่อนหรือหลังการปลูกพืชเศรษฐกิจ เช่น ข้าว ข้าวโพด และถั่วต่าง ๆ การปลูกงานอกจากจะเป็นการช่วยเพิ่ม

รายได้แก่เกษตรกรแล้ว ยังช่วยลดความเสี่ยงในการปลูกพืชเศรษฐกิจหลัก เมื่อประสบภาวะจากภัยธรรมชาติหรือราคาผลผลิตตกต่ำอีกด้วย (คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา, 2542)

งาเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อคนไทยมาแต่โบราณ เป็นส่วนผสมของอาหารและขนมมากมายที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวิตและประเพณีไทยมาแต่อดีต แสดงให้เห็นว่าคนไทยรู้คุณค่าของงามานานหลายศตวรรษ งาเป็นพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีน้ำมันร้อยละ 50 ซึ่งเป็นน้ำมันที่มีคุณภาพสูงกว่าน้ำมันพืชชนิดอื่น มีคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 25 โปรตีนร้อยละ 17 แคลเซียมร้อยละ 0.75 และฟอสฟอรัสร้อยละ 0.61 และยังประกอบไปด้วย ธาตุเหล็ก โซเดียม โพแทสเซียม วิตามินเอ ไธอามีน ไรโบฟลาวีน และไนอาซีน สารอาหารเหล่านี้ล้วนมีประโยชน์ต่อร่างกาย งาจึงจัดว่าเป็นอาหารสุขภาพที่กำลังได้รับความนิยม รับประทานเป็นอาหารเสริมกันทั่วไป งาปลูกกันมากในประเทศอินเดีย ซูดาน พม่า และจีน ทั้ง 4 ประเทศนี้ผลิตงาประมาณร้อยละ 60 ของผลผลิตโลก ประเทศไทยมีการปลูกงาอยู่ในทุกภาคของประเทศ แต่ภาคที่ปลูกมากที่สุดคือภาคเหนือ จังหวัดที่ปลูกมากได้แก่เพชรบูรณ์ (วันชัย, 2542)

เมล็ดงาเป็นสินค้าที่มีความต้องการทั่วโลก และมีการสั่งไปใช้กันปริมาณมากในประเทศยุโรปต่าง ๆ ในเอเชียประเทศที่สั่งเป็นสินค้าเข้ามาก ได้แก่ จีน ญี่ปุ่น ฮ่องกง อิสราเอล มาเลเซีย ซาอุดีอาระเบีย และไต้หวัน ในแอฟริกาได้แก่ อียิปต์ งาเป็นพืชที่แตกต่างจากพืชน้ำมันอื่น ๆ ตรงที่สินค้าส่วนใหญ่จะขายกันในรูปของเมล็ด (กฤษฎา, 2537)

4. การตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (seed quality testing)

การตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์มีความสำคัญทางการเกษตรมาก ทั้งในด้านการค้าและการปลูก เพราะจะทำให้ทราบคุณภาพและศักยภาพในการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ดพันธุ์ ผลการตรวจสอบใช้ประกันและรับรองคุณภาพสินค้า ซึ่งวิธีการตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์ควรเป็นวิธีที่ง่าย ไม่ยุ่งยากจนเกินไป เที่ยงตรง แม่นยำ และเป็นสากล การตรวจสอบพื้นฐาน เช่น การตรวจ สอบความบริสุทธิ์ (purity test) การตรวจสอบความงอก (germination test) การตรวจสอบความชื้น (seed moisture test) เป็นต้น มักไม่มีปัญหายุ่งยาก (วันชัย, 2542) การตรวจสอบคุณภาพเมล็ดพันธุ์นั้น มีกฎมาตรฐานที่ใช้กันอยู่ 2 ระบบคือ กฎสากลในการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (International Rules for Seed Testing) ซึ่งบัญญัติขึ้นโดยสมาคมผู้ตรวจสอบเมล็ดพันธุ์นานาชาติ (International Seed Testing Association) ซึ่งมีชื่อย่อว่า ISTA และกฎสำหรับการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (Rules for Testing Seeds) ซึ่งบัญญัติขึ้นโดยสมาคมผู้ตรวจสอบ

คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ (Association of Official Seed Analysis) ซึ่งมีชื่อย่อว่า AOSA กฎมาตรฐานที่บัญญัติขึ้นโดยสถาบันทั้งสองแห่งนี้มีลักษณะที่คล้ายกันแต่แตกต่างกันในด้านขั้นตอนการปฏิบัติงาน โดยทั่วไปหากตรวจสอบเพื่อการนำเข้าหรือส่งออกหรือเป็นการค้า มักนิยมใช้กฎของ ISTA ซึ่งใช้กันมากในประเทศแถบยุโรป ส่วนในอเมริกานั้นใช้กฎของ AOSA สำหรับการตรวจสอบคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ที่ปฏิบัติกันอยู่ในประเทศไทยขณะนี้หน่วยงานบางแห่งได้ยึดกฎของ ISTA เป็นหลัก (จวงจันทร์, 2529 ข)

5. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ (seed purity test)

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) หาอัตราส่วนองค์ประกอบต่าง ๆ ของกองเมล็ดเป็นร้อยละโดยน้ำหนัก 2) ตรวจสอบเมล็ดพืชชนิดอื่นและสิ่งเจือปนอื่น ๆ ที่ปะปนมา (วันชัย, 2542)

การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์เป็นการตรวจวิเคราะห์ว่าเมล็ดพันธุ์มีความบริสุทธิ์มากเพียงใด เช่น มีเมล็ดพันธุ์พืชที่ระบุไว้กี่เปอร์เซ็นต์ มีเมล็ดพันธุ์พืชอื่นปะปนมากน้อยเพียงใด เพื่อเป็นข้อมูลให้เกษตรกรผู้ใช้เมล็ดพันธุ์ หรือผู้ที่จะนำเมล็ดพันธุ์ไปใช้ ทั้งนี้เมล็ดพันธุ์ที่ดีควรมีความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์สูง เมล็ดพันธุ์ที่ใช้ตรวจสอบจะต้องสุ่มมาจากกองเมล็ดพันธุ์โดยถูกต้องตามวิธีการที่กำหนดไว้ และต้องมีน้ำหนักไม่ต่ำกว่าที่กำหนดไว้ ขนาดของตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ที่ใช้ในการตรวจสอบจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช (จวงจันทร์, 2529 ก)

6. การตรวจสอบพันธุ์ (varietal test หรือ cultivar verification)

การตรวจสอบพันธุ์มีวัตถุประสงค์เพื่อการรับรองเมล็ดพันธุ์ คือตรวจสอบว่าพันธุ์บริสุทธิ์หรือไม่ มีพันธุ์ปนหรือไม่ ในบางกรณีการตรวจสอบพันธุ์อาจมุ่งหมายเพื่อยืนยันว่าพันธุ์ใหม่ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์เป็นพันธุ์ใหม่ที่แท้จริง ไม่ใช่พันธุ์เดิมที่เคยมีอยู่แล้ว หรือมีพันธุกรรมซ้ำกับพันธุ์ที่เคยมีอยู่ ซึ่งการตรวจสอบพันธุ์ตามความมุ่งหมายนี้นับวันจะยิ่งสำคัญขึ้นเพราะสามารถรองรับกฎหมายคุ้มครองพันธุ์พืช ได้แก่การจดทะเบียนพันธุ์ และสิทธิบัตรพันธุ์พืชได้ (วันชัย, 2542)

วิธีการตรวจสอบพันธุ์ที่ใช้กัน คือวิธีตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพืชไร่ (morphological and agronomic characters) ซึ่งต้องนำเมล็ดมาปลูกเพื่อสังเกตลักษณะต่าง ๆ

ระหว่างการเจริญเติบโตบางครั้งต้องตรวจสอบจนถึงระยะที่พืชแก่ และต้องปลูกให้มีประชากรมากเพียงพอเพื่อให้มีความมั่นใจในผลของการตรวจสอบ วิธีนี้ใช้เวลานานกว่าจะทราบผล เสียค่าใช้จ่ายมาก และต้องการพื้นที่กว้าง ยิ่งไปกว่านั้น การแสดงออกของพืชอาจแปรปรวนได้เนื่องจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อม และในปัจจุบันนี้ พืชแต่ละชนิดก็มีจำนวนพันธุ์มากขึ้น วิธีนี้จึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นการค้นคว้าวิจัย เพื่อหาเทคนิควิธีที่รวดเร็วมีประสิทธิภาพและไม่แพงจนเกินไป จึงได้รับความสนใจกันมาก โดยเฉพาะวิธีทางชีวเคมี (วันชัย, 2542)

เทคนิควิธีตรวจสอบพันธุ์วิธีต่าง ๆ ที่ได้มีผู้ทดลองใช้จำแนกพันธุ์ส่วนใหญ่ไม่มีวิธีใดที่สามารถใช้เพียงวิธีเดียวในการจำแนกพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต้องใช้หลายวิธีประกอบการตัดสินซึ่งแบ่งกว้าง ๆ ออกเป็น 5 แนวทางด้วยกัน ได้แก่

1) วิธีทางสัณฐานวิทยา (morphological methods) เช่น การจำแนกตามรูปร่างและขนาดของเมล็ดพันธุ์ ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาของต้นกล้า เป็นต้น (Coolbear and Hill, 1988) เป็นการตรวจสอบที่ต้องนำตัวอย่างของเมล็ดพืชไปทดลองปลูก ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยหลักการการตรวจสอบจากลักษณะภายนอกในระยะต่าง ๆ ของการเจริญเติบโตของพืช เช่น ใบ ดอก ผล ดังนั้นจำเป็นต้องอาศัยผู้มีความชำนาญสูงในการสังเกต และต้องใช้เวลานาน เสียค่าใช้จ่ายและแรงงานในการดำเนินงานสูงและขาดความแม่นยำ เนื่องจากลักษณะภายนอกของพืชที่สังเกตอาจมีผลมาจากสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งไม่ได้มาจากลักษณะทางพันธุกรรมเพียงอย่างเดียว (Arus 1983; McDonald, 1998)

2) วิธีทางสรีรวิทยา (physiological methods) เช่น จำแนกตามความสามารถในการดูดน้ำของเมล็ด การตอบสนองต่อฮอร์โมน และความอ่อนแอต่อสารเคมีกำจัดวัชพืช เป็นต้น (Coolbear and Hill, 1988)

3) วิธีทางโรคพืช (pathological methods) เช่น จำแนกตามความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อรา และความต้านทานต่อบักเตรี วิสา หรือ แมลง เป็นต้น (Coolbear and Hill, 1988)

4) วิธีทางเคมี (chemical composition methods) เช่น จำแนกโดยอาศัยสารประกอบบางประเภทเช่น กรดไขมัน สารประกอบฟีโนลิกส์ เป็นต้น และจำแนกโดยใช้เทคนิค electrophoresis (Coolbear and Hill, 1988) เป็นวิธีการตรวจสอบในระดับโปรตีนหรือเอนไซม์ที่พืชสร้างขึ้น โดยโปรตีนหรือเอนไซม์เหล่านี้มักจะมีหลายชนิด และสามารถแยกออกจากกันด้วยวิธี electrophoresis

ในการจำ แนกสายพันธุ์พืชสามารถใช้การตรวจสอบทางเอ็นไซม์ได้เช่นกัน โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า isozymes ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โดยอาศัยความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละกลุ่มกับสารตั้งต้นที่เหมาะสม ซึ่งแม้ว่าวิธีนี้มีประสิทธิภาพในการจำแนกสายพันธุ์พืชได้สูงพอสมควรและเชื่อถือได้ (Payne, 1987) แต่มีข้อจำกัดคือในการเตรียมตัวอย่างของเอนไซม์ค่อนข้างจะยุ่งยาก และในแต่ละระยะของการเจริญเติบโตของพืชจะผลิตเอนไซม์ที่มีความแตกต่างกัน จึงต้องเลือกตัวอย่างที่นำมาทดสอบให้อยู่ในระยะการเจริญเติบโตที่เหมือนกันและอยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน เนื่องจากสภาพแวดล้อมมีผลต่อการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ด้วย ดังนั้น Radola (1980) ได้พัฒนาเทคนิค ultrathin layer isoelectric focusing (UTLIEF) โดยทดสอบโปรตีนที่พืชสะสมไว้ (storage protein) เนื่องจากโปรตีนที่พืชสะสมไว้เป็นโปรตีนที่มีความคงตัวสูง และเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าเอนไซม์ เทคนิคนี้มีประสิทธิภาพสูงในการแยกโปรตีนที่มีค่า isoelectric point ที่แตกต่างได้ดี (วันชัย, 2542)

5) วิธีทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular methods) เป็นวิธีการที่สามารถตรวจสอบได้เร็วกว่าวิธีแรก และถูกต้องแม่นยำสูงมาก ใช้แรงงานน้อย เนื่องจากเป็นการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ สามารถตรวจสอบได้ในทุกส่วนของพืช และทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช แต่มีข้อจำกัดคือมีค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบแต่ละครั้งค่อนข้างสูง และวิธีการสกัดดีเอ็นเอซับซ้อนและยุ่งยาก (Coolbear and Hill, 1988)

การตรวจสอบพันธุ์โดยใช้ชีววิทยาโมเลกุลแบ่งเป็นวิธี biochemical marker และ molecular marker ปัจจุบันการตรวจสอบพันธุ์โดยวิธีทั้ง 2 แบบ มีความสำคัญขึ้นและมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นเรื่อย ๆ ความก้าวหน้าที่รวดเร็วเกิดจากการใช้ polyacrylamide gel electrophoresis ในการตรวจสอบโปรตีนสะสม (storage protein) และการใช้ isoelectric focusing (IEF) ในการวิเคราะห์ isozyme ยิ่งไปกว่านั้น ความก้าวหน้าล่าสุดในการใช้ระบบ molecular marker ทำให้สามารถแยกพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (วันชัย, 2542)

5.1 biochemical marker การใช้ biochemical marker ส่วนใหญ่ใช้โปรตีน (หรือเอนไซม์) เป็นหลัก เช่น esterases และ peroxidases (isozymes) กับ gliadins และ glutenins ซึ่งเป็นโปรตีนสะสม การแยกโมเลกุลของโปรตีนปกติใช้เทคนิคทาง electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกตามประจุของอนุภาคที่เคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าประกอบกับการใช้ polyacrylamide gel หรือที่เรียกย่อว่า PAGE วุ้นหรือ gel นี้มีลักษณะเป็นรูพรุนโดยที่ขนาดของรูพรุนจะถูกกำหนดด้วยความเข้มข้นของ acrylamide ที่ใช้ ดังนั้นโปรตีนต่าง ๆ จะเคลื่อนที่ไปในวุ้นด้วยอัตราที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับ 1)

น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (แยกโดยขนาดของรูพรุน) และ2) ประจุไฟฟ้าของโปรตีน (แยกโดยสนามไฟฟ้า)

electrophoresis อาจควบคุมให้แยกโดยน้ำหนักโมเลกุลเพียงอย่างเดียวได้ เช่น ใน SDS-PAGE ทำได้โดยนำส่วนผสมของโปรตีนที่สกัดได้ใส่ใน sodium dodecyl sulphate ที่มากเกินพอ และ reducing agent เช่น 2-mercaptoethanol และเพิ่มอุณหภูมิให้สูงกว่า 100 องศาเซลเซียส สาร sodium dodecyl sulphate เป็นสารที่สามารถแตกตัวเป็นประจุและช่วยให้สายพอลิเพปไทด์แยกออกจากกัน (ionic dissociating agent) และเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาเซลเซียสก็จะรวมตัวกับโปรตีนในอัตราส่วนโดยน้ำหนักที่คงที่ ประจุของโปรตีนก็จะหมดความหมายไปเมื่อปรับกับประจุลบของ sodium dodecyl sulphate ดังนั้นสาร ประกอบโปรตีนที่รวมกับ SDS (protein-SDS complexes) ทั้งหมดก็จะมีประจุเป็นลบ ดังนั้นอัตรา เร็วของการเคลื่อนที่ของโปรตีนจึงขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลเพียงประการเดียวเท่านั้น ตามกฎของ สโตคส์ (Stokes law) นั้น ระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่ไปในวุ้น เป็นสัดส่วนกับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล ดังนั้นจึงสามารถคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ได้โดยวัดระยะทางหรือตำแหน่งของแถบโปรตีนบนวุ้น โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (standard marker) ที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (วันชัย, 2542)

นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบพันธุ์โดยวิธี isoelectric focusing (IEF) ซึ่งเป็นการตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค electrophoresis ที่ปรับปรุงให้มีความแม่นยำ อย่างไรก็ตาม การใช้ electrophoresis กับโปรตีนมีข้อจำกัดเนื่องจาก ปริมาณและชนิดของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมได้

5.2 molecular marker คือการใช้ marker ในระดับดีเอ็นเอเป็นตัวตรวจสอบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ ได้แก่วิธีต่อไปนี้

1) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ก็คือ ลำดับของดีเอ็นเอที่ถูกสร้าง (generate) โดยการย่อยดีเอ็นเอของพืชด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เมื่อนำ restriction fragment มาผ่านวุ้น ก็จะสามารถแยกความแตกต่างของดีเอ็นเอได้ จะทำให้ทราบว่ามีความแตกต่างระหว่างพันธุ์หรือไม่ วิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถจำแนกพันธุ์พืชได้ดีทั้งพืชผสมข้ามเช่น ข้าวโพด และพืชผสมตัวเอง เช่น ข้าวสาลี อย่างไรก็ตาม RFLP เป็นวิธีที่ใช้เวลาในการตรวจสอบนาน เสียค่าใช้จ่ายสูงและเทคนิคยุ่งยาก เป็นวิธีที่ต้องใช้ตัวอย่างพืชมาก และการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดแห้งไม่สะดวกในทางปฏิบัติ

2) Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นวิธีการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะขึ้นในหลอดทดลอง เป็นวิธีที่รวดเร็ว ง่าย และต้องการตัวอย่างพืชน้อย และมีศักยภาพที่จะให้ marker จำนวนมากได้ PCR และโดยทางทฤษฎีแล้ว สามารถเริ่มต้นจากชิ้นดีเอ็นเอเพียงชิ้นเดียวได้ แต่ก็มีข้อควรระวังอยู่พอสมควร

วิธีการตรวจสอบพันธุ์ที่อาศัยเทคนิค PCR มีอยู่หลายวิธี วิธีที่นิยมได้แก่

- Sequence Tagged Sites (STS)
- Microsatellite หรือ Simple Sequence Repeats (SSR)
- Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)
- Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

การใช้ระบบ marker ในการตรวจสอบพันธุ์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ความรวดเร็วในการตรวจสอบ ค่าใช้จ่าย ความปลอดภัย ระดับของ polymorphism ที่สามารถตรวจสอบ จำนวนของ marker ที่มี และปริมาณของตัวอย่างพืชที่ต้องใช้ ระบบ marker ควรเป็นระบบที่ง่ายไม่ยุ่งยากเที่ยงตรง แม่นยำ และมีมาตรฐาน ควรพัฒนาให้สามารถใช้เมล็ดแห้งตรวจสอบได้ ศึกษาหาวิธีสกัดโปรตีนหรือเอ็นไซม์หรือดีเอ็นเอที่ไม่ต้องทำลายเมล็ด เพื่อให้สามารถนำเมล็ดไปใช้ได้อีก และถ้ามี co-dominant marker ก็จะช่วยให้เป็นประโยชน์ในการตรวจสอบยิ่งขึ้น (วันชัย, 2542)

7. โปรตีนสะสมในเมล็ด (seed storage protein)

โปรตีนเป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจน มีโมเลกุลขนาดใหญ่และโครงสร้างซับซ้อน โปรตีนในเมล็ดมีความสำคัญมากทั้งเป็นส่วนประกอบของโครงสร้าง โปรตีนที่ทำปฏิกิริยาเพื่อการดำรงชีพ เช่น เอนไซม์ และกรดนิวคลิอิกในยีนหรือสารพันธุกรรม และโปรตีนที่เป็นอาหารสะสม โปรตีนที่สะสมในเมล็ดอยู่รวมกันเป็นเม็ดเรียกว่า เม็ดอะลูโรน (aleurone grain) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 ไมครอน

ชนิดของโปรตีนในเมล็ดสามารถแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ (Peter and Casey, 1999) คือ albumins globulins glutelins และ prolamins ซึ่งโปรตีนทั้ง 4 กลุ่มนี้มีคุณสมบัติของการละลายที่แตกต่างกันคือ

1. Albumins เป็นโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำและจะเสียสภาพเมื่อได้รับความร้อน พบได้ในเมล็ดพืชบางชนิด หรือในเมล็ดธัญพืช โปรตีนชนิดนี้ส่วนใหญ่จะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ จะสะสมอยู่ในคัพภะของเมล็ดพืช

2. Globulins สามารถละลายได้ในน้ำแต่จะละลายได้ดีในสารละลายเกลือ พบในเมล็ดพืชหลายชนิด เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์เมมเบรน หรือเป็นโปรตีนสะสมใน aleurone layer หรือคัพภะของเมล็ดพืช

3. Glutelins ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ สารละลายเกลือหรือแอลกอฮอล์ แต่ละลายได้ในสาร ละลายที่เป็นด่าง เป็นกลุ่มโปรตีนที่พบมาก และจะสะสมอยู่ในชั้นเอนโดสเปิร์มในเมล็ดข้าว ข้าวสาลี และข้าวโพด

4. Prolamins ละลายได้ในแอลกอฮอล์เข้มข้น (60-70%v/v) แต่ไม่ละลายในน้ำหรือในสารละลายเกลือ เป็นกลุ่มโปรตีนที่พบมาก โดยพบสะสมอยู่ในชั้นเอนโดสเปิร์มในเมล็ดธัญพืช เช่นข้าว หรือข้าวสาลี

โปรตีนที่สะสมอยู่ในเมล็ดจะอยู่ในรูปโปรตีนบอดี้ (protein body) ซึ่งเป็นก้อนหรือเม็ดโปรตีนที่พบสะสมอยู่ในเซลล์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 ถึง 2 ไมครอน มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ห่อหุ้มไว้ด้วย lipoprotein unit membrane เม็ดโปรตีนบรรจุ inclusin 2 ชนิด คือ crystalloids กับ globoids สำหรับ crystalloids เป็นโปรตีนโดยตัวของมันเอง มีลักษณะเป็นผลึก ส่วน globoids ไม่เป็นผลึก มีลักษณะกลม เป็นส่วนที่มี phytin สะสมอยู่ protein body ที่อยู่ในเอนโดสเปิร์มของเมล็ดธัญพืชจะไม่พบ globoids แต่จะพบ globoids ใน aleurone grain globoids อาจสะสมโปรตีนหรือเอนไซม์ได้ในบางกรณี เช่น เอนไซม์ phosphatase ใน globoids ของเมล็ดฝ้าย

สำหรับเมล็ดธัญพืช การสะสมโปรตีนในเอนโดสเปิร์มจะมีปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับพืชตระกูลถั่วที่มีการสะสมโปรตีนในใบเลี้ยงค่อนข้างมาก ปริมาณโปรตีนในเมล็ดขึ้นอยู่กับพันธุ์ ความอุดมสมบูรณ์ของดิน และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ เช่น แสง อุณหภูมิ และความชื้น ในเมล็ดธัญพืช การให้ปุ๋ยไนโตรเจนเร็ว (ในระยะที่พืชยังเล็กอยู่) จะทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นแต่ปริมาณโปรตีนต่อเมล็ดไม่เพิ่ม แต่ถ้าให้ปุ๋ยล่าช้าออกไปจะช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนได้ เนื่องจากมีการสังเคราะห์ prolamins และ glutelins เพิ่มขึ้นแต่คุณภาพของโปรตีนจะต่ำ ในเมล็ดธัญพืชยังพบว่ามี glutelins สูง เช่น oryzenin ในเมล็ดข้าว และ glutelins ในเมล็ดข้าวสาลี ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่ทำให้

แป้งข้าวสาลีมีคุณสมบัติใช้ทำขนมปังได้ สำหรับ globulins นั้น พบว่ามีมากในใบเลี้ยงของเมล็ดพืชตระกูลถั่ว ในชั้นของ aleurone layer ของเอนโดสเปอร์มของเมล็ดธัญพืช นับว่าเป็นส่วนสำคัญของการสะสมโปรตีน ในเมล็ดข้าวสาลีนั้น ใน aleurone layer จะพบว่ามี arginine อยู่ในสัดส่วนที่สูงมาก ซึ่ง arginine จัดเป็นโปรตีนชนิด globulins ดังนั้นถ้าสามารถสกัดโปรตีนจาก aleurone layer ล้วน ๆ ก็จะเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพสูงกว่าโปรตีนจากส่วนของเอนโดสเปิร์ม (วันชัย, 2537)

8. การแยกชนิดของโปรตีนด้วยเทคนิค isoelectric focusing

เทคนิค isoelectric focusing เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของโปรตีน และเพปไทด์โดยอาศัยความแตกต่างของจุดไอโซอิเล็คทริก (isoelectric point) หรือจุดไอโซไอออนิก (isoionic point) หรือค่า pI เทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการแยกสารสูง สามารถแยกโปรตีนที่มีค่า pI ต่างกันประมาณ 0.01-0.02 หน่วย pH ได้ เมื่อให้สนามไฟฟ้ากับตัวกลางค้ำจุลที่เป็นเจลที่เป็นสารแอมโฟไลท์ (ampholyte) ซึ่งสารแอมโฟไลท์นี้เตรียมมาจากสารผสมของสารที่เป็นทั้งกรดและเบสโมเลกุลเล็ก ๆ (amphoteric compound) จะทำหน้าที่สร้าง gradient ของ pH แบบ linear เมื่อสารตัวอย่างที่มีประจุเคลื่อนที่ผ่าน gradient ของ pH บนเจลจะสูญเสียประจุระหว่างทางไปจนถึงจุดที่บนเจลมีค่า pH เท่ากับ pI ของสารตัวอย่าง จะทำให้สารตัวอย่างสูญเสียประจุอย่างสมบูรณ์หรือมีประจุสุทธิเป็นศูนย์ (ปริมาณประจุบวกเท่ากับปริมาณประจุลบ) ที่จุดนี้โปรตีนจะหยุดการเคลื่อนที่และสะสมอยู่ทำให้เห็นโปรตีนรวมตัวเป็นแถบแคบๆ ในแต่ละแถบของโปรตีนอาจมีโปรตีนชนิดเดียว หรือหลายชนิดก็ได้ และอาจจะมีขนาดที่แตกต่างกันได้ด้วย เนื่องจากโปรตีนต่างชนิดกันอาจจะมีค่า pI ที่เท่ากัน จึงทำให้เคลื่อนที่ไปสะสมอยู่ในจุดเดียวกัน ดังนั้น การแยกโดยวิธีนี้จึงไม่สามารถบอกได้ว่าในแต่ละแถบของโปรตีนคือโปรตีนชนิดใดและมีขนาดเท่าใด แต่สามารถบอกเบื้องต้นว่าโปรตีนส่วนใหญ่มีค่า pI อยู่ระหว่างช่วง pH ที่เท่าไหร่ ถ้าโปรตีนมีค่า pI ที่อยู่ในช่วง pH ที่ต่างกันมาก ๆ ก็น่าจะเป็นโปรตีนที่ต่างชนิดกัน (อาภัสสรา, 2537; John and Switzer, 1997)

เมื่อเริ่มต้นทำ isoelectric focusing นั้น เจลที่มีสารแอมโฟไลท์ผสมอยู่จะมี pH ที่สม่ำเสมอ ซึ่งมีค่าเท่ากับค่าเฉลี่ยของ pH ของแอมโฟไลท์ การเกิด gradient ของ pH จะเกิดขึ้นเมื่อมีการให้สนามไฟฟ้า ซึ่งเมื่อวางขั้วลบ (cathode) ในสารละลายที่เป็นด่างแก่ และขั้วบวก (anode) ในสารละลายกรดแก่ และบริเวณช่องว่างระหว่างขั้วทั้ง 2 มีสารละลายของแอมโฟไลท์ผสมอยู่ในเจล เมื่อให้สนามไฟฟ้าจะทำให้สารแอมโฟไลท์ที่เป็นกรดเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกทำให้บริเวณขั้วบวกมีค่า pH ต่ำในขณะที่แอมโฟไลท์ที่เป็นด่างทำให้บริเวณขั้วลบมีค่า pH สูง เมื่อให้กระแสไฟฟ้าจนกระทั่ง

แอมโฟไลท์ทุกโมเลกุลที่มีการจัดตัวเองตามลำดับตามค่า pI ของแต่ละโมเลกุล แอมโฟไลท์ที่เป็นด่างมากที่สุดจะอยู่ใกล้ขั้วลบมากที่สุด และจะมีการเรียงตามค่า pI ที่เพิ่มขึ้นเรื่อยมาจนกระทั่งสิ้นสุดด้วยแอมโฟไลท์ที่เป็นกรดมากที่สุดจะอยู่ใกล้ขั้วบวกมากที่สุด ทำให้เกิดลักษณะ gradient ของ pH ขึ้นบนแผ่นเจลนั้น เมื่อเติมโปรตีนลงบนเจลแล้วผ่านกระแสไฟฟ้าเข้าไปโปรตีนที่มีประจุสุทธิเป็นบวกจะเคลื่อนที่ไปทางขั้วลบ ส่วนโปรตีนที่มีประจุเป็นลบจะเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก และในระหว่างที่โปรตีนเคลื่อนที่ไปนั้นก็จะสูญเสียประจุไปด้วยจนกระทั้งประจุสุทธิของตัวเองเป็นศูนย์ ปริมาณประจุบวกเท่ากับปริมาณประจุลบ หรือถึงจุด pI โปรตีนก็จะหยุดการเคลื่อนที่

การแยกชนิดของโปรตีนโดยเทคนิค isoelectric focusing นี้ ระบบทำความเย็นให้กับเจลมีความสำคัญมาก เพราะใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์สูงประมาณ 2500-3000 โวลต์ จึงมีผลทำให้เกิดความร้อนสูง ซึ่งจะมีผลต่อการเสียสภาพของโปรตีนที่ทดสอบ จึงจำเป็นที่จะต้องระบายความร้อนที่เกิดขึ้นออกจากระบบไปอย่างสม่ำเสมอ มิเช่นนั้นจะเกิดความร้อนสูงเกินไป โปรตีนอาจจะเสียสภาพแยกความแตกต่างไม่ได้ชัดเจน และยังอาจจะทำให้เจลไหม้ได้ (อาภัสสรา, 2537; John and Switzer, 1997)

ข้อดีของเทคนิค isoelectric focusing คือ

1. ใช้สารเคมีน้อย สามารถปฏิบัติงานได้เสร็จสมบรูณ์ภายใน 2-3 ชั่วโมง
2. ให้ผลการแยกโปรตีนที่ดีมากได้แถบของโปรตีนคมชัดสามารถแยกโปรตีนที่มีค่า pI ต่างกันเพียง 0.02 หน่วย pH ได้
3. สามารถหาค่า pI ของโปรตีนได้โดยการวัด pH ของเจลตรงตำแหน่งของแถบโปรตีนที่ปรากฏได้
4. เนื่องจากโปรตีนเคลื่อนที่จากจุดต่าง ๆไปสู่ตำแหน่งที่มีค่า pH ของเจลเท่ากับ pI ของโปรตีนนั้น ทำให้ตำแหน่งที่หยอดโปรตีนไม่มีความสำคัญต่อตำแหน่งของโปรตีนที่ ปรากฏขึ้น

9. งานวิจัยที่ได้นำเทคนิค UTLIEF ไปประยุกต์ใช้

Wang *et* al. (2000) ได้ใช้ UTLIEF การแยกสายพันธุ์ของมะเขือเทศ 11 สายพันธุ์ สกัดโปรตีนโดยใช้ตัวทำละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ แยกแถบโปรตีนโดยใช้ช่วง pH 4-8 จากการทดลองพบว่า มะเขือเทศ 11 สายพันธุ์มีความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยพบความแตกต่างของแถบโปรตีน 8 ตำแหน่ง

Zhao *et* al. (2005) ตรวจสอบพันธุ์ของข้าวลูกผสมโดยเปรียบเทียบเมล็ดข้าวที่ถูกตัดแบ่งออกเป็น 1/2 1/3 และ1/4 ของเมล็ดเป็นส่วนที่ไม่มีคัพภะ นำมาสกัดโปรตีนและแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF และนำส่วนที่มีคัพภะของแต่ละส่วนไปทดสอบความงอกด้วยวิธี grow-out test พบว่าสามารถใช้เมล็ดข้าวเพียง 1 เมล็ดโดยนำส่วนที่ไม่มีคัพภะมาตรวจสอบพันธุ์ได้และส่วนทีมีคัพภะสามารถทดสอบความงอกได้ด้วยวิธี grow-out test

Yan *et* al. (2006) ได้ใช้ UTLIEF ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของข้าว 2 สายพันธุ์ก่อนถึงช่วงระยะเวลาการเก็บเกี่ยว ใช้โปรตีนในเมล็ดจะศึกษารูปแบบของ male marker bands ซึ่งถูกพัฒนาในข้าวลูกผสมชั่วที่ 1 จากการทดลองพบว่า สามารถใช้เทคนิค UTLIEF ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของข้าวก่อนถึงช่วงระยะเวลาการเก็บเกี่ยวได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ด้วยเทคนิค UTLIEF

1. เครื่อง electrophoresis ชนิด UTLIEF (Desaphor HF210)
2. เครื่อง power supply (Consort E833)
3. เครื่องทำความเย็น (Boss Tech Scientific Instrument)
4. เครื่องเขย่า (shaker) (SL350)
5. เครื่องดูดควัน (fume hood operation) (Prolab model 2000)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge) (MIKRO 20)
7. เครื่องบดเมล็ดพืช รุ่น RT-02 (150g high speed grinder)
8. เครื่องผสมสาร (vortex)
9. acrylamide
10. bisacrylamide (BIS) (specially purified for electrophoresis)
11. แอมโฟไลท์ pH 2-9 (ampholytes) (SINUS,Germany)
12. ammonium peroxydisulphate (APS)
13. N N N' N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)
14. urea
15. anodes solution (L-asparatic acid, L-glutamin acid)
16. cathode solution (L-arginine, L-lysine, ethylene-diamine)
17. trichloroacetic acid (TCA)
18. Coomassie Brilliant Blue G250
19. Coomassie Brilliant Blue R250
20. ethanol (95%)
21. acetic acid (99%)
22. 'Gel-Slick' (หรือ 'Repelsilane' หรือเทียบเท่า)

วิธีการ

1. การเตรียมพืชที่ใช้ในการทดลอง

เมล็ดพันธุ์ทานตะวันลูกผสมชั่วที่ 1 จำนวน 3 คู่ผสมคือ Pacific55 × PI 323281 ต้นหมายเลข 2 และต้นหมายเลข 4 Pacific55 × PI 380874 และ Pacific55 × PI 402586 โดยสายพันธุ์แม่คือ Pacific55 และ สายพันธุ์พ่อคือ PI 323281 PI 380874 และ PI 402586 เป็นเชื้อพันธุกรรมที่ได้รับจาก NCRPIS, Arues, Iowa USA

เมล็ดพันธุ์ถั่วลิสง 6 พันธุ์คือ กาฬสินธุ์ 2 ขอนแก่น 60-1 ขอนแก่น 60-2 ขอนแก่น 4 ขอนแก่น 5 ขอนแก่น 6 และเมล็ดลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามทั้ง 6 พันธุ์

เมล็ดพันธุ์งา 2 พันธุ์คือ งาดำ พันธุ์นครสวรรค์ และงาขาว พันธุ์มก 19 และเมล็ดลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามทั้ง 2 พันธุ์

2. ชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมต่อการแยกสกัดโปรตีนจากเมล็ดและแยกความแตกต่างของสายพันธุ์

ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากเมล็ด 3 ชนิดคือ น้ำ (H_2O), ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ (PO^{-}_4) และ ยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์

นำตัวอย่างเมล็ด 50 เมล็ดมาบดรวมกัน จากนั้นผสมกับตัวทำละลายแต่ละชนิดในอัตราส่วนตัวอย่าง 200 มิลลิกรัมต่อตัวทำละลาย 500 ไมโครลิตร ใช้เวลาในการสกัดตัวอย่าง 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (vortex ทุก ๆ 20 นาที) เมื่อครบตามเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่ใสใส่หลอดใหม่เพื่อเตรียมนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้และนำไปแยกความแตกต่างของโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดตามวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้ BSA ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร เป็นโปรตีนมาตรฐาน โดยนำ BSA ปริมาตร 0.5 1 5 10 15 และ 20 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 20 ไมโครลิตรทุก

ปริมาตร ผสมกับสารละลาย Bradford ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

ค่า pH ของเจลจะใช้ช่วงค่า pH ที่อยู่ในช่วง 2-9 (SINUS, Germany)

การเตรียมสารละลายเจล (สำหรับเตรียมเจล 10 เจล) ใช้ยูเรีย 16 กรัมเติมสารผสม acrylamide 50 ไมโครลิตร (acrylamide 33.14 กรัม + bis-acrylamide 0.86 กรัม ปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร) แอมโฟไลท์ 4.4 มิลลิลิตร N N N' N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) 50 ไมโครลิตรและ ammonium peroxydisulphate (APS) ความเข้มข้น 20% 350 ไมโครลิตร) นำสารละลายเจลที่ได้มาเกลี่ยลงบน polyester support films (Gel-Fix, Serva) ใช้เทปกาวพันสายไฟฟ้าปิดทับไปบนกระจกที่ใช้สำหรับปิดเจลแล้วปิดกระจกนี้ทับลงบนแผ่นฟิล์มที่มีสารละลายเจลอยู่แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง จึงลอกเอาเฉพาะแผ่นฟิล์มที่มีเจลบาง ๆ อยู่ด้านบนนำไปใช้ในการทำ electrophoresis

หลังจากเตรียมเจลเสร็จแล้วนำเจลมาทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค isoelectric focusing โดยนำแผ่นเจลวางบนเครื่อง Desaga Horizontal Electrophoresis Unit (Desaphor HF210) ซึ่งเชื่อมต่อกับเครื่องทำความเย็นตั้งอุณหภูมิที่ 8 องศาเซลเซียส จากนั้นวาง anode และ cathode strip และ application strip (52 wells) ลงบนแผ่นเจลและหยดสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ลงไปบน application strip ช่องละ 22 ไมโครลิตร การทำ electrophoresis จะใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 2500 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำเจลมา fix ด้วย trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 12% เป็นเวลา 20 นาที นำไปย้อมด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue (Coomassie R250 0.15 กรัม Coomassie G250 0.45 กรัม acetic acid 99% 110 มิลลิลิตร ethanol 95% 180 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร) นาน 15 นาที และนำไปล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยสารละลาย destain (ethanol 95% 300 มิลลิลิตร acetic acid 99% 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร) นาน 10 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำอีก 5 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ปิดทับเจลด้วยสติกเกอร์ใส เพื่อเก็บรักษาเจลและนำไปวิเคราะห์ผล

3. การตรวจสอบแถบโปรตีนของสายพันธุ์

สกัดโปรตีนจากเมล็ดของสายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่ของพืชทั้ง 3 ชนิดด้วยตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด และวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้โดยใช้วิธีการตามข้อ 2 จากนั้นนำมาแยกความแตกต่างของพันธุ์โดยวิธี UTLIEF และนำไปวิเคราะห์ผลโดยเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้โดยพิจารณาจากลักษณะความคมชัดของแถบโปรตีนที่สามารถใช้เป็นลักษณะของแต่ละพันธุ์ได้ เพื่อใช้เป็นการตัดสินใจในการเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม

4. การตรวจสอบความเป็นลูกผสม

นำปัจจัยที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3 มาตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์โดยสกัดโปรตีนจากเมล็ดลูกผสมปรับปริมาตรตัวทำละลายให้เหมาะสมโดยคำนวณจากสัดส่วนเมล็ดที่บดแล้ว 200 มิลลิกรัม ต่อตัวทำละลาย 500 ไมโครลิตร ในเมล็ดทานตะวันและถั่วลิสงบดแยกเมล็ด (single seed)และในเมล็ดงาบดโดยใช้เมล็ดจาก 1 ฝัก และวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้โดยใช้วิธีการตามข้อ 2 และแยกความแตกต่างของโปรตีนโดยวิธี UTLIEF เปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 และวิเคราะห์ประสิทธิภาพของวิธีการในการตรวจสอบ

5. การตรวจสอบพันธุ์โดยใช้เพียงบางส่วนของเมล็ด

นำปัจจัยที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3 มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยนำตัวอย่างเมล็ดของทานตะวันและถั่วลิสงมาตัดแบ่งเป็น 1/2 1/3 1/4 ของเมล็ด นำส่วนที่ติดเอ็มบริโอมาทดสอบความงอก และนำส่วนที่ถูกแบ่งแต่ละส่วนนั้นมาใช้ในการสกัดโปรตีนโดยปรับปริมาตรตัวทำละลายให้เหมาะสม และวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้โดยใช้วิธีการตามข้อ 2 เปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดที่ถูกแบ่งเป็นส่วนขนาดต่าง ๆ และวิเคราะห์ประสิทธิภาพของวิธีการในการตรวจสอบ

6. การหาจำนวนเมล็ดที่น้อยที่สุดที่เพียงพอต่อการตรวจสอบพันธุ์งา

นำปัจจัยที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3 มาทดสอบหาจำนวนเมล็ดงาที่น้อยที่สุดที่เพียงพอต่อการตรวจสอบพันธุ์โดยใช้งาขาวพันธุ์ มก 19 จำนวนตั้งแต่ 1 ถึง 10 เมล็ดมาสกัดโปรตีนและ

วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้โดยใช้วิธีการตามข้อ 2 แล้วแยกชนิดของโปรตีนสะสมในเมล็ดโดยวิธี UTLIEF เปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดงาจำนวนต่าง ๆ

ระยะเวลาทำงานวิจัย

เริ่มทำการทดลองในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2549 ถึง เดือนกันยายน พ.ศ. 2551

แหล่งทุนสนับสนุน

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

การทดสอบตัวทำละลายที่เหมาะสมที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากเมล็ดสำหรับแยกความแตกต่างของสายพันธุ์

ทานตะวัน

เมื่อนำโปรตีนที่สกัดได้จากทานตะวัน 4 พันธุ์ โดยใช้ตัวทำละลายที่มีความแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ ทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 2-9 เปรียบเทียบแถบโปรตีนที่เกิดขึ้น พบว่า น้ำสามารถสกัดโปรตีนที่ใช้แยกความแตกต่างของทานตะวันได้ดี โดยพบแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ทั้งหมด 8 ตำแหน่ง และแถบโปรตีนมีความคมชัดมากกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย (ภาพที่ 1)

เมื่อใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวทำละลายพบว่า สามารถสกัดโปรตีนที่ใช้แยกความแตกต่างของพันธุ์ทานตะวันได้ โดยพบแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ 2 ตำแหน่ง (ภาพที่ 1)

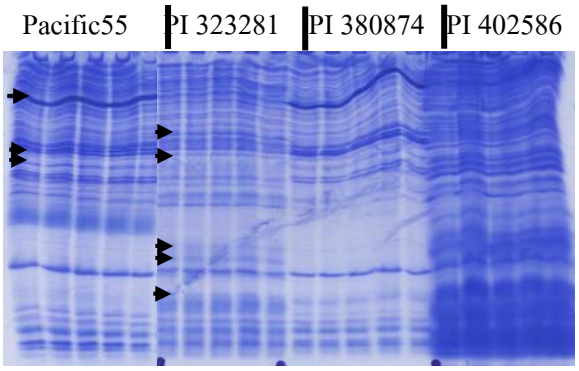
เมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย พบว่า สามารถสกัดโปรตีนที่ใช้แยกความแตกต่างของทานตะวันได้เช่นเดียวกัน โดยพบแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ 3 ตำแหน่ง แต่ลักษณะแถบโปรตีนมีความคมชัดน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดโปรตีนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ (ภาพที่ 1)

จากการแยกแถบโปรตีนในเมล็ดทานตะวัน 4 พันธุ์ ด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้ตัวทำละลายที่มีความแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ พบว่าได้แถบโปรตีนจำนวนมาก และในแต่ละพันธุ์นั้นมีความเข้มข้นของแถบโปรตีนแต่ละตำแหน่งแตกต่างกัน ซึ่งบอกความเป็นไปได้ว่ามีการละลายของโปรตีนหลายชนิดที่มีประจุและปริมาณที่ต่างกันออกไป ซึ่งสอดคล้องกับหลักการการละลายของโปรตีน โปรตีนส่วนใหญ่ละลายได้ดีในน้ำหรือสารละลายเกลือเจือจาง โดยสารละลายเกลือที่ใช้ในการทดลองนี้คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ ถึงแม้ว่าตัวทำละลาย

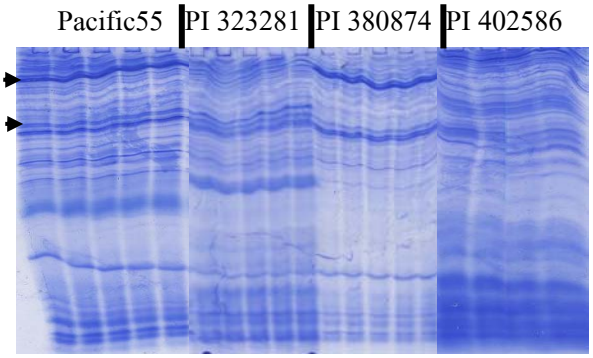
ทั้ง 2 มีคุณสมบัติที่เหมือนกันแต่ก็อาจทำละลายโปรตีนได้ต่างกัน ทำให้แถบโปรตีนที่ได้แตกต่างกันและสามารถนำมาใช้ในการแยกความแตกต่างของพันธุ์ได้

โปรตีนที่สกัดจากเมล็ดทานตะวัน 4 พันธุ์โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายนั้นให้จำนวนแถบโปรตีนที่พบให้ความแตกต่างมากกว่าจำนวนแถบโปรตีนที่ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากในเมล็ดทานตะวันมี globulin และ albumins เป็นโปรตีนสะสมอยู่ซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำ (Jacques *et al*., 1996) ดังนั้นในเมล็ดทานตะวัน 4 พันธุ์มีปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันจึงสามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ ส่วนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ ที่ใช้เป็นตัวทำละลายนั้นมีคุณสมบัติเป็นสารละลายเกลือ พบจำนวนแถบโปรตีนที่ให้ความแตกต่างน้อยกว่า เนื่องจากเมล็ดทานตะวัน 4 พันธุ์ มีโปรตีนชนิดอื่นที่สามารถละลายได้ในสารละลายเกลืออยู่ในปริมาณน้อย

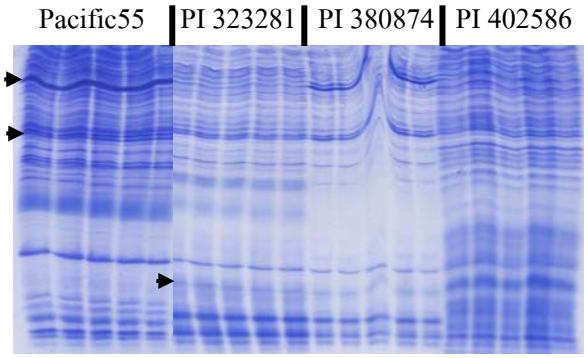
จากการทดลองพบว่า ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดที่ทดสอบสามารถแยกความแตกต่างของทานตะวันทั้ง 4 พันธุ์ได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบความคมชัดของแถบโปรตีน พบว่าแถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำมีความคมชัดและมีแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของทานตะวัน



ก.



ข.



ค.

ภาพที่ 1 แถบโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดทานตะวัน 4 พันธุ์ คือ พันธุ์ Pacific55 PI 323281 PI 380874 และ PI 402586 โดยใช้ ก.) น้ำ ข.) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และ ค.) ยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย ใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2,500 โวลต์ ลูกศรที่ชี้คือการแสดงตำแหน่งแถบโปรตีนที่มีความแตกต่าง

ถั่วลิสง

เมื่อนำโปรตีนที่สกัดได้จากถั่วลิสงทั้ง 6 พันธุ์โดยใช้ตัวทำละลายที่มีความแตกต่างกัน 3 ชนิด ไปทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค UTLIEF โดยใช้เจลที่มีช่วงค่า pH 2-9 พบว่าไม่สามารถแยกแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างกันได้ (ภาพที่ 2)

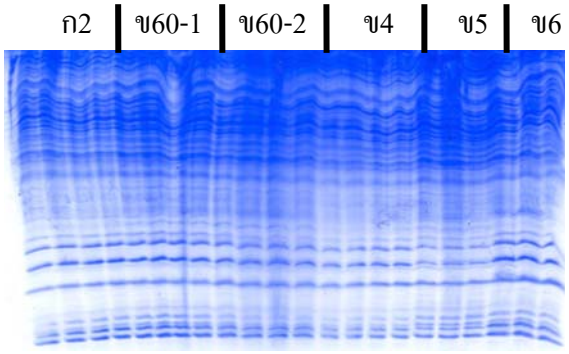
โปรตีนที่สกัดจากเมล็ดถั่วลิสง 6 พันธุ์ โดยใช้ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ อาจเนื่องจากในถั่วลิสงแต่ละพันธุ์มีชนิดของกรดอะมิโนที่พบคือ เมทไธโอนีน (methionine) ทรีโอนีน (theonine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนมีหมู่ฟังก์ชั่นมีขั้ว ไม่มีประจุ และชอบน้ำ (hydrophilic) ละลายในน้ำได้แต่พบในปริมาณที่ต่ำจึงเป็นสาเหตุที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ และนอกจากนั้นยังพบกรดอะมิโนไลซีน (lysine) ปริมาณที่ต่ำเช่นกันซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีหมู่ฟังก์ชั่นเป็นประจุบวกโดยจะแตกตัวที่ให้ประจุบวกที่ pH 7 ดังนั้นน่าจะเป็นอีกสาเหตุที่ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ได้เนื่องจากค่า pH ของเจลใช้ช่วงค่า pH 2-9 จึงมีการกระจายตัวของแถบโปรตีนได้ในช่วงที่แคบและไม่ชัดเจน (Jacques *et al*., 1996)

เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดถั่วลิสง 6 พันธุ์จะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ สามารถละลายโปรตีนออกมาได้มากกว่าการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และน้ำเป็นตัวทำละลาย ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน (ตารางที่ 1) โดยพบว่าโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ มีความเข้มข้นมากที่สุด รองลงมาคือการสกัดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และการสกัดด้วยน้ำตามลำดับ ยกเว้นในพันธุ์ ขอนแก่น5 และขอนแก่น 6 พบว่าโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ มีความเข้มข้นมากที่สุด รองลงมาคือการสกัดด้วยน้ำ และการสกัดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

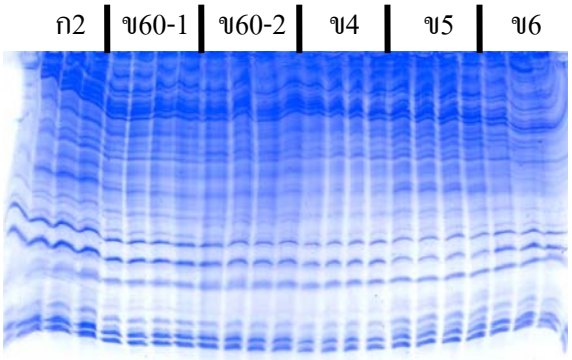
ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดถั่วลิสงโดยใช้น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย

ชื่อพันธุ์	ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ (มิลลิกรัม/เมล็ด)		
	น้ำ	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	ยูเรีย
กาฬสินธุ์2	103.73	129.17	510.33
ขอนแก่น60-1	161.63	284.36	297.11
ขอนแก่น60-2	183.12	202.60	447.80
ขอนแก่น4	131.56	179.49	523.26
ขอนแก่น5	250.76	195.17	336.30
ขอนแก่น6	196.03	109.82	182.13

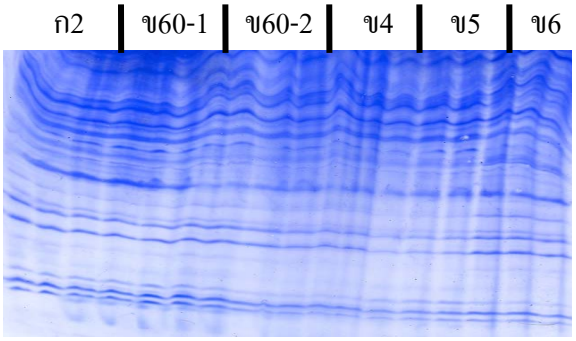
จากการทดลองพบว่าตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดที่ทดสอบไม่สามารถแยกความแตกต่างของถั่วลิสงทั้ง 6 พันธุ์ได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสม



ก.



ข.



ค.

ภาพที่ 2 แถบโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดถั่วลิสง 6 พันธุ์ คือ โดยใช้ ก.) น้ำ ข.) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และ ค.) ยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย ใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2500 โวลต์ ลูกศรที่ชี้คือการแสดงตำแหน่งแถบโปรตีนที่มีความแตกต่าง

ก2 คือ กาฬสินธุ์ 2 ข60-1 คือ ขอนแก่น 60-1 ข60-2 คือ ขอนแก่น 60-2
ข4 คือ ขอนแก่น 4 ข5 คือ ขอนแก่น 5 ข6 คือ ขอนแก่น

เมื่อนำโปรตีนที่สกัดได้จากงา 2 พันธุ์ โดยใช้ตัวทำละลายที่มีความแตกต่างกัน 3 ชนิด และเมื่อนำไปทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค UTLIEF พบว่า แถบโปรตีนที่ความแตกต่างกันโดยน้ำสามารถสกัดโปรตีนที่ใช้แยกความแตกต่างของงาได้ดี พบแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ทั้งหมด 3 ตำแหน่ง และลักษณะของแถบโปรตีนมีความคมชัดมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการสกัดโปรตีนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ (ภาพที่ 3)

เมื่อใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวทำละลาย พบว่า สามารถสกัดโปรตีนที่ใช้แยกความแตกต่างของงาได้ โดยพบแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์ 1 ตำแหน่ง และลักษณะของแถบโปรตีนมีความคมชัดน้อยมากเมื่อเทียบกับการใช้ยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย (ภาพที่ 3) และเมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย พบว่าสามารถสกัดโปรตีนที่ใช้แยกความแตกต่างของงาได้เช่นเดียวกัน พบแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างระหว่างพันธุ์เพียง 1 ตำแหน่ง และลักษณะของแถบโปรตีนมีความคมชัดน้อย (ภาพที่ 3)

จากการวิเคราะห์แถบโปรตีนพบว่า เมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลายให้จำนวนแถบโปรตีนที่พบให้ความแตกต่างมากกว่าจำนวนแถบโปรตีนที่ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากในเมล็ดงามี 7S vicilin ซึ่งเป็นโปรตีนสะสมในเมล็ดที่อยู่ในกลุ่ม globulin และ albumins เป็นโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำ นอกจากนั้นในเมล็ดงายังพบกรดอะมิโนเมทไธโอนีน (methionine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดไม่มีประจุและชอบน้ำ (hydrophilic) จึงละลายในน้ำได้ดี (Beyer *et al*., 2002)

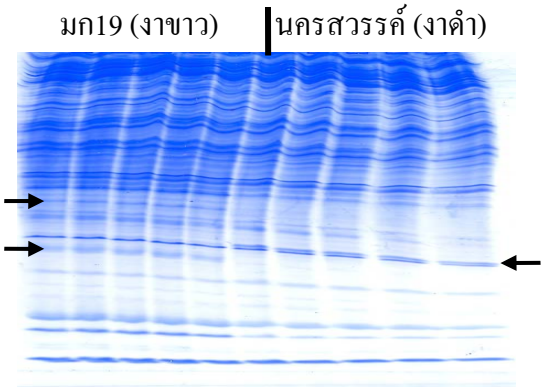
เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดงาทั้ง 2 พันธุ์จะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนที่ได้จากตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิด มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยน้ำสามารถละลายโปรตีนออกมาได้น้อยกว่าการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลายซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน (ตารางที่ 2) โดยพบว่าโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ มีความเข้มข้นมากที่สุด รองลงมาคือการสกัดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และการสกัดด้วยน้ำตามลำดับ

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดงาโดยใช้น้ำ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย

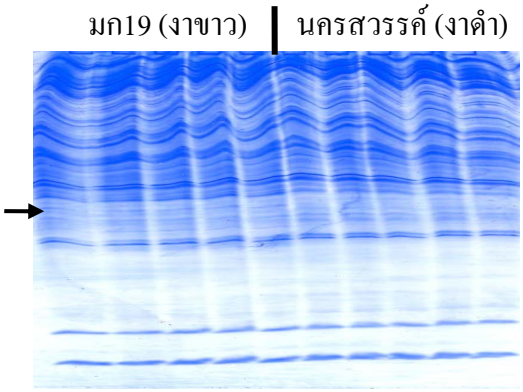
ชื่อพันธุ์	ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ (มิลลิกรัม/ฝัก)		
	น้ำ	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	ยูเรีย
มก 19 (งาขาว)	17.71	12.63	117.06
นครสวรรค์ (งาดำ)	14.22	12.34	207.86

ถึงแม้ว่าน้ำจะเป็นตัวทำละลายโปรตีนออกมาได้น้อยกว่าการใช้ตัวทำละลายตัวอื่นๆ แต่แถบโปรตีนที่ได้สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์งาที่ทดสอบได้มากกว่าการใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น โดยในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์จะอาศัยความแตกต่างของแถบโปรตีนที่มีความจำเพาะของแต่ละสายพันธุ์ เพื่อสามารถนำมาใช้ในการแยกความแตกต่างของพันธุ์ได้อย่างชัดเจน

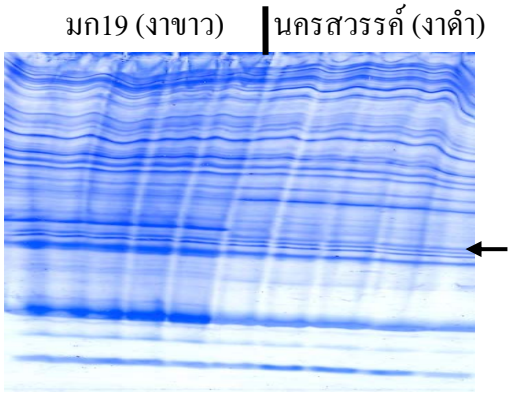
จากการทดลองพบว่า ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดที่ทดสอบสามารถแยกความแตกต่างของงาทั้ง 2 พันธุ์ได้ แต่เมื่อเปรียบเทียบความคมชัดของแถบโปรตีน พบว่า แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำมีความคมชัดและมีแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างกันมากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการตรวจสอบความเป็นลูกผสม



ก.



ข.



ค.

ภาพที่ 3 แถบโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดงา 2 พันธุ์ คือ งาดำพันธุ์นครสวรรค์ และงาขาวพันธุ์มก 19 โดยใช้ ก.) น้ำ ข.) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 3.8 มิลลิโมลาร์ และค.) ยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์ เป็นตัวทำละลาย ใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2500 โวลต์ ลูกศรที่ชี้คือการแสดงตำแหน่งแถบโปรตีนที่มีความแตกต่าง

การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์โดยเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อสายพันธุ์แม่และลูกผสมชั่วที่ 1

ทานตะวัน

เมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดโปรตีนจากเมล็ดทานตะวัน และนำมาตรวจสอบความเป็นลูกผสมของทานตะวันโดยใช้ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ Pacific 55 × 323281 ต้นหมายเลข 2 และหมายเลข 4 ลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ Pacific 55 × 380874 และลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่าง Pacific 55× 402586 การตรวจสอบนี้ใช้วิธีการโดยบดแยกเมล็ด (single seed) แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)

การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน โดยเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่และลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ Pacific × 323281 ต้นหมายเลข 2 และหมายเลข 4 พบแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อ 2 ตำแหน่ง แถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์แม่ 4 ตำแหน่ง (ภาพที่ 4ก)

เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ของพันธุ์ Pacific × 323281 ต้นหมายเลข 2 และหมายเลข 4 จะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย จากทั้งสองต้นมีปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกัน และพบว่าเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ต้นหมายเลข 2 มีปริมาณโปรตีนมากกว่าปริมาณโปรตีนในสายพันธุ์พ่อ แต่น้อยกว่าปริมาณโปรตีนในสายพันธุ์แม่ ส่วนในต้นหมายเลข 4 มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าปริมาณโปรตีนในสายพันธุ์พ่อ และสายพันธุ์แม่ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดทานตะวันลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ Pacific 55 × 323281 และสายพันธุ์พ่อ-แม่โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	น้ำหนักเมล็ด (มิลลิกรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/เมล็ด)
สายพันธุ์พ่อ 323281	7825.51	0.047	7.82
สายพันธุ์แม่ Pacific 55	9951.21	0.049	9.95
ลูกผสมชั่วที่ 1			
ต้นหมายเลข 2	8334.01	0.037	8.33
ต้นหมายเลข 4	7717.67	0.043	7.71

การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์ทานตะวันโดยเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่และลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ Pacific × 380874 พบแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อ 2 ตำแหน่ง แต่แถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์แม่ไม่สามารถแยกได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4ข)

เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ Pacific × 380874 จะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนที่ได้จากการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย โดยมีปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ โปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าปริมาณโปรตีนในสายพันธุ์พ่อ แต่มากกว่าปริมาณโปรตีนในสายพันธุ์แม่ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดทานตะวันลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ Pacific 55× 380874 และสายพันธุ์พ่อ-แม่โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	น้ำหนักเมล็ด (มิลลิกรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/เมล็ด)
สายพันธุ์พ่อ 380874	12193.78	0.072	12.19
สายพันธุ์แม่ Pacific 55	9951.21	0.049	9.95
ลูกผสมชั่วที่ 1	11589.53	0.056	11.58

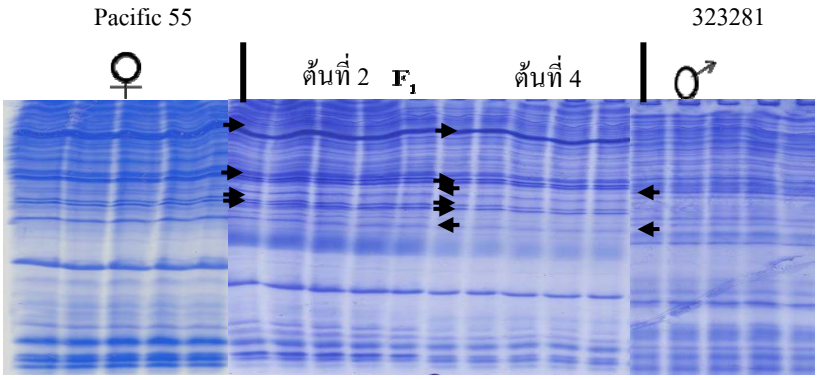
การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน โดยเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่และลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ Pacific 55 × 402586 พบแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อ 2 ตำแหน่ง แถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์แม่ 1 ตำแหน่ง (ภาพที่ 4ค)

เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ Pacific 55 × 402586 จะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนที่ได้จากการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย มีปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ โปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 มีปริมาณโปรตีนมากกว่าปริมาณโปรตีนในสายพันธุ์พ่อ แต่น้อยกว่าปริมาณโปรตีนในสายพันธุ์แม่ (ตารางที่ 5)

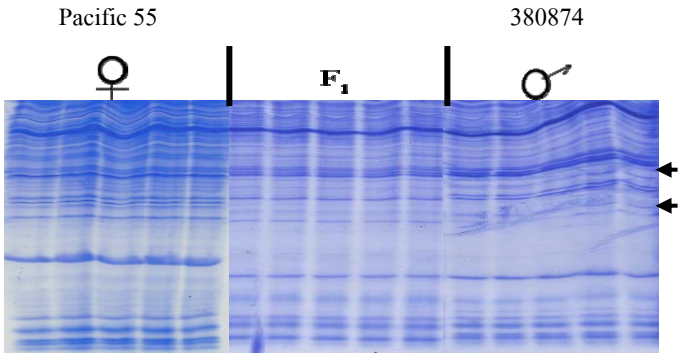
ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดทานตะวันลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ Pacific 55× 402586 และสายพันธุ์พ่อ-แม่โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	น้ำหนักเมล็ด (มิลลิกรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/เมล็ด)
สายพันธุ์พ่อ 402586	8004.23	0.035	8.00
สายพันธุ์แม่ Pacific 55	9951.21	0.049	9.95
ลูกผสมชั่วที่ 1	8241.05	0.054	8.24

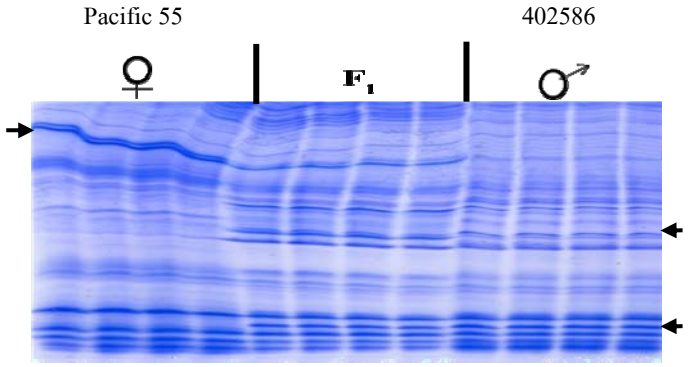
จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำสามารถใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดโปรตีนในเมล็ดทานตะวันเพื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิคนี้ได้ โดยความเข้มข้นของโปรตีนของลูกผสมชั่วที่ 1 ที่ได้มีค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่มีปริมาณที่มากน้อยแตกต่างกันตามสายพันธุ์ บางพันธุ์มีปริมาณโปรตีนที่มากกว่าสายพันธุ์พ่อแต่น้อยกว่าสายพันธุ์แม่ หรืออาจน้อยกว่าสายพันธุ์พ่อแต่มากกว่าสายพันธุ์แม่ เช่นในลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างพันธุ์ Pacific × 380874 พบว่า โปรตีนที่ได้ปริมาณโปรตีนน้อยกว่าปริมาณโปรตีนในสายพันธุ์พ่อ แต่มากว่าปริมาณโปรตีนในสายพันธุ์แม่ โดยปริมาณโปรตีนในลูกผสมชั่วที่ 1 มีความใกล้เคียงกับปริมาณโปรตีนจากสายพันธุ์พ่อ เนื่องจากพบแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อ 2 ตำแหน่ง แต่แถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์แม่ไม่สามารถแยกได้อย่างชัดเจน อาจเป็นสาเหตุมาจากปริมาณโปรตีนในลูกผสมชั่วที่ 1 น้อยกว่าสายพันธุ์พ่อแต่น้อยกว่าสายพันธุ์แม่ก็เป็นได้



ก.



ข.



ค.

ภาพที่ 4 แถบโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 ของทานตะวัน เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่ โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องศาเซลซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2500 โวลต์ ลูกศรที่ชี้คือการแสดงตำแหน่งแถบโปรตีนที่มีความแตกต่าง

ก. ลูกผสมต้นที่ 2 และ 4 เกิดจากสายพันธุ์พ่อคือ 323281 สายพันธุ์แม่คือ Pacific 55

ข. ลูกผสมชั่วที่ 1 เกิดจากสายพันธุ์พ่อคือ 380874 สายพันธุ์แม่คือ Pacific 55

ค. ลูกผสมชั่วที่ 1 เกิดจากสายพันธุ์พ่อคือ 402586 สายพันธุ์แม่คือ Pacific 55

ถั่วลิสง

เนื่องจากตัวทำละลายโปรตีนทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ถั่วลิสงทั้ง 6 พันธุ์ได้ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมาตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์ได้

งา

เมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในการสกัดโปรตีนจากเมล็ดงาแล้วนำมาตรวจสอบความเป็นลูกผสมของงา โดยใช้ลูกผสมระหว่างสายพันธุ์พ่อ นครสวรรค์ และสายพันธุ์แม่ มก 19 การตรวจสอบนี้ใช้วิธีการบดโดยใช้งา 1 ฝัก แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)

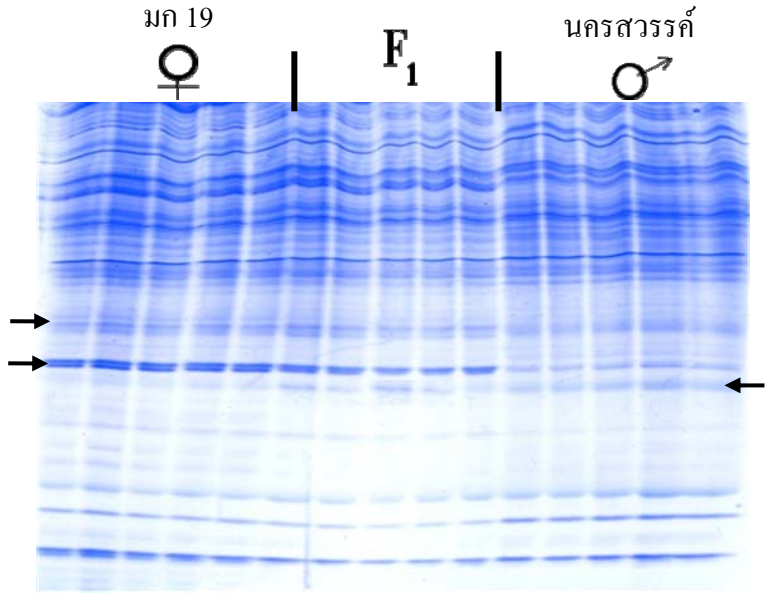
การตรวจสอบความเป็นลูกผสมของเมล็ดพันธุ์งา โดยเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อ สายพันธุ์แม่และลูกผสมชั่วที่ 1 พบแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์พ่อ 1 ตำแหน่ง และแถบโปรตีนที่ได้มาจากสายพันธุ์แม่ 2 ตำแหน่ง (ภาพที่ 5)

เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 เมื่อใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย พบว่าโปรตีนที่ได้จากการสกัดมีปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ โปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 มีปริมาณโปรตีนมากกว่าปริมาณโปรตีนในสายพันธุ์พ่อ และสายพันธุ์แม่ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดงาลูกผสมชั่วที่ 1 ระหว่างสายพันธุ์นครสวรรค์ และมก 19 และสายพันธุ์พ่อ-แม่โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	น้ำหนักเมล็ด (มิลลิกรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/ฝัก)
สายพันธุ์พ่อ นครสวรรค์	9211.14	0.131	9.21
สายพันธุ์แม่ มก 19	18608.36	0.125	18.60
ลูกผสมชั่วที่ 1	25321.95	0.207	25.32

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำสามารถใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดโปรตีนจากเมล็ดงาเพื่อตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิคนี้ได้เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 5 แถบโปรตีนที่สกัดจากลูกผสมชั่วที่ 1 ของเมล็ดงาโดยเปรียบเทียบแถบโปรตีนของสายพันธุ์พ่อ (พันธุ์นครสวรรค์) สายพันธุ์แม่ (พันธุ์ มก 19) โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องศาเซลซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2500 โวลต์ ลูกศรที่ชี้คือการแสดงตำแหน่งแถบโปรตีนที่มีความแตกต่าง

การตรวจสอบพันธุ์โดยใช้เพียงบางส่วนของเมล็ด

ทานตะวัน

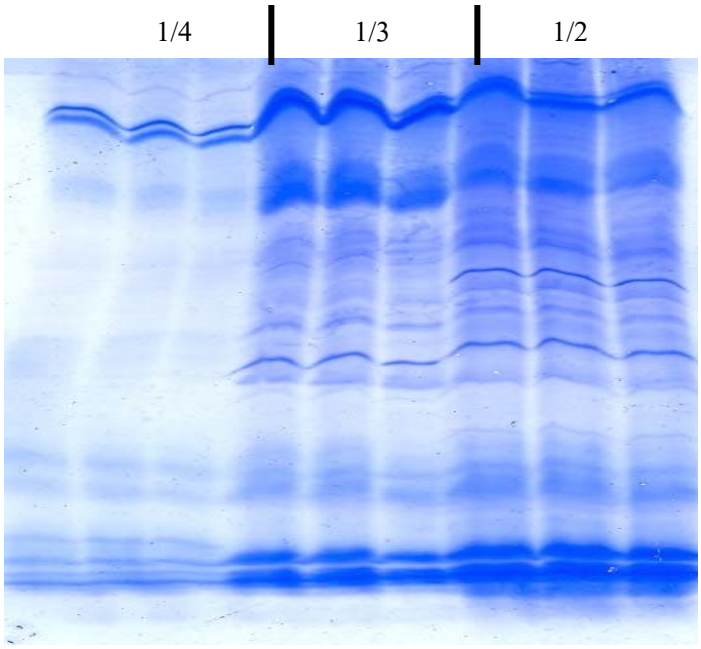
การตรวจสอบพันธุ์โดยนำตัวอย่างเมล็ดทานตะวัน ที่ถูกตัดแบ่งเป็น 1/2 1/3 และ1/4 ของเมล็ดไปสกัดโปรตีน โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976) จากนั้นตรวจสอบพันธุ์โดยวิธี UTLIEF พบว่า แถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดจากส่วนที่แบ่งเป็น 1/2 1/3 และ1/4 ของเมล็ดจะปรากฏแถบโปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยส่วนที่แบ่งเป็น1/2 ของเมล็ดจะปรากฏแถบโปรตีนครบทุกแถบและมีความคมชัดมากที่สุด รองลงมาคือส่วนที่แบ่งเป็น 1/3 ของเมล็ด และส่วนที่แบ่งเป็น 1/4 ของเมล็ดตามลำดับ (ภาพที่ 6)

เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดทานตะวันที่แบ่งเป็น 1/2 1/3 และ1/4 ของเมล็ด จะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัดส่วนที่แบ่งเป็น 1/2 1/3 และ1/4 ของเมล็ดทานตะวันมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยส่วนที่แบ่งเป็น1/2 ของเมล็ด จะมีปริมาณโปรตีนที่มากที่สุด รองลงมาคือส่วนที่แบ่งเป็น 1/3 ของเมล็ด และส่วนที่แบ่งเป็น 1/4 ของเมล็ดตามลำดับ (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดทานตะวันที่แบ่งเป็น 1/2 1/3 และ 1/4 ของเมล็ดโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)

ส่วนของเมล็ด	ความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	น้ำหนักชิ้นส่วนเมล็ด (มิลลิกรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/ชิ้นส่วน)
1/2	6252.96	0.068	6.25
1/3	3575.74	0.042	3.57
1/4	925.43	0.014	0.92

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดทานตะวันที่แบ่งเป็น 1/2 ของเมล็ด สามารถนำมาตรวจสอบพันธุ์ได้ เนื่องจากปรากฏแถบโปรตีนครบทุกแถบ ดังนั้นในการตรวจสอบพันธุ์จึงสามารถนำบางส่วนของเมล็ดมาใช้ในการตรวจสอบได้ ในกรณีที่มีจำนวนเมล็ดที่จำกัด หรือเมล็ดที่นำมาทดสอบมีความไม่สมบูรณ์ โดยในการตรวจสอบพันธุ์นั้นมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณของชิ้นส่วนที่ถูกแบ่ง โดยส่วนที่แบ่งเป็น 1/2 ของเมล็ดที่นำมาสกัดโปรตีนนั้นมีปริมาณของชิ้นส่วนที่มีขนาดใหญ่กว่าชิ้นส่วนแบ่งอื่น จึงปรากฏแถบโปรตีนได้ชัดเจนกว่า และต้องคำนึงถึงขนาดของเมล็ดที่นำมาตรวจสอบ ซึ่งเมล็ดที่นำมาตรวจสอบไม่ควรมีขนาดเล็กเกินไป การใช้เทคนิค UTLIEF ในการตรวจสอบพันธุ์โดยทดสอบส่วนที่แบ่งเป็น 1/2 1/3 และ 1/4 ของเมล็ดพบว่าสามารถนำไปทดสอบในพืชอื่นได้เช่นเดียวกัน เช่น การศึกษาในข้าวลูกผสมโดย Zhao *et al.* (2005) ได้ตรวจสอบพันธุ์ของข้าวลูกผสมโดยเปรียบเทียบเมล็ดข้าวที่ถูกตัดแบ่งออกเป็น 1/2 1/3 และ1/4 ของเมล็ดเป็นส่วนที่ไม่มีคัพภะ นำมาสกัดโปรตีนและแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF และนำส่วนที่มีคัพภะของแต่ละส่วนไปทดสอบความงอกด้วยวิธี grow-out test พบว่าสามารถใช้เมล็ดข้าวเพียง 1 เมล็ดโดยนำส่วนที่ไม่มีคัพภะมาตรวจสอบพันธุ์ได้และส่วนทีมีคัพภะสามารถทดสอบความงอกได้ด้วยวิธี grow-out test และ การศึกษาในข้าวโพดลูกผสมโดย Manum *et al.* (2007) ได้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของข้าวโพดลูกผสมโดยเปรียบเทียบเมล็ดข้าวโพดที่ถูกตัดแบ่งออกเป็น 1/2 1/3 1/4 ของเมล็ดเป็นส่วนที่ไม่มีคัพภะ นำมาสกัดโปรตีนและแยกแถบโปรตีนด้วยเทคนิค UTLIEF พบว่า เมล็ดที่ถูกตัดแบ่งเป็น1/2 ปรากฏแถบโปรตีนที่ชัดเจนกว่า 1/3 และ 1/4 ของเมล็ด และนำส่วนที่มีคัพภะของแต่ละส่วนไปทดสอบความงอกที่อุณหภูมิห้อง 5 วัน พบว่าส่วนที่นำมาทดสอบความงอกนั้นสามารถงอกเป็นต้นกล้าได้โดยส่วนที่แบ่งที่มีขนาดใหญ่กว่าจะมีรากยาวและมากกว่าส่วนที่แบ่งที่มีขนาดเล็ก



ภาพที่ 6 แถบโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดทานตะวัน 1/2 1/3 และ 1/4 ของเมล็ด ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องศาเซลซียส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 2500 โวลต์

การทดสอบความงอกของเมล็ดทานตะวันที่แบ่งเป็น 1/2 1/3 และ 1/4 ของเมล็ด โดยเพาะในกระดาษที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ส่วนที่แบ่งเป็น 1/3 และ 1/4 ของเมล็ดสามารถงอกเป็นต้นกล้าได้ดีกว่าส่วนที่แบ่งเป็น 1/2 ของเมล็ด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของเมล็ดที่นำมาทอสอบด้วย (ภาพที่ 7)

ภาพที่ 7 การทดสอบความงอกของเมล็ดทานตะวันที่แบ่งเป็น 1/2 (ข.) 1/3 (ค.) และ 1/4 (ค.) ของเมล็ด เปรียบเทียบกับเมล็ดทานตะวันปกติ (ก.) ทดสอบที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน

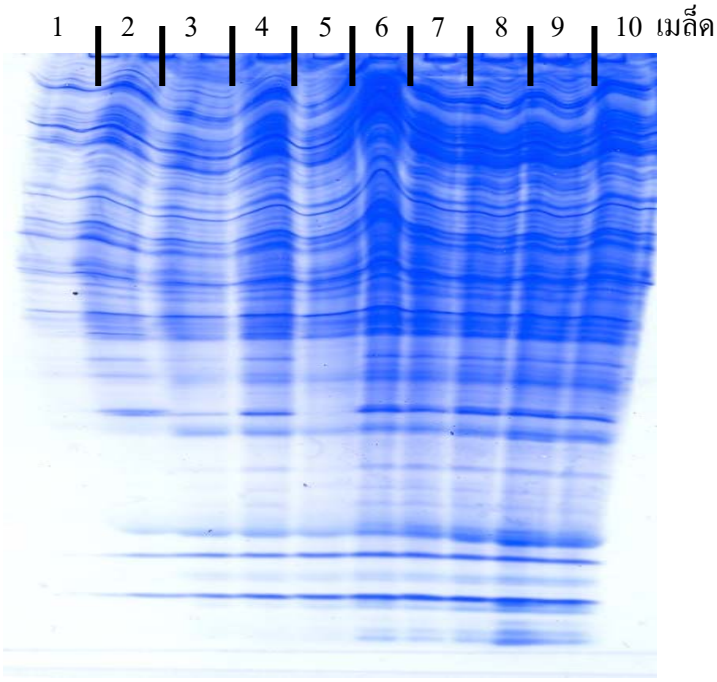
ถั่วลิสง

เนื่องจากตัวทำละลายโปรตีนทั้ง 3 ชนิดไม่สามารถแยกความแตกต่างของพันธุ์ถั่วลิสงทั้ง 6 พันธุ์ได้ดังนั้นจึงไม่สามารถนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยใช้ส่วนที่แบ่งเป็น 1/2 1/3 และ 1/4 ของเมล็ดพันธุ์ได้

การหาจำนวนเมล็ดที่น้อยที่สุดที่เพียงพอต่อการตรวจสอบพันธุ์งา

เนื่องจากงามีขนาดเล็ก การแบ่งเมล็ดออกเป็นส่วน ๆ เช่นเดียวกับเมล็ดทานตะวัน หรือถั่วลิสงทำได้ยากในทางปฏิบัติ ดังนั้นจึงใช้วิธีหาจำนวนเมล็ดที่น้อยที่สุดที่เพียงพอต่อการสกัดโปรตีน และโปรตีนที่สกัดได้สามารถบ่งบอกความแตกต่างของพันธุ์ได้ด้วย โดยใช้งาขาวพันธุ์ มก 19 จำนวนตั้งแต่ 1 ถึง 10 เมล็ด ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย เนื่องจากน้ำเป็นตัวทำละลายที่เหมาะสมในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976) แล้วเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้จากเมล็ดงาจำนวนต่าง ๆ

การตรวจสอบจำนวนเมล็ดงาขาวพันธุ์ มก 19 ในการสกัดโปรตีนโดยเปรียบเทียบแถบโปรตีนของแต่ละจำนวนเมล็ด พบแถบโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากเมล็ดงาจำนวน 6 เมล็ดขึ้นไปที่สามารถนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ได้ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 แถบโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดงาขาวพันธุ์ มก 19 โดยใช้จำนวนเมล็ดต่าง ๆ และใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ใช้เจล pH 2-9 อุณหภูมิ 8 องศาเซลซียส ความต่างศักย์ ไฟฟ้า 2500 โวลต์

เมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นของโปรตีนจากเมล็ดงาขาวพันธุ์ มก 19 จำนวนตั้งแต่ 1 ถึง 10 เมล็ด จะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนที่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัดเมล็ดงาจำนวนตั้งแต่ 1 ถึง 10 เมล็ด มีความแตกต่างกันโดยพบว่าเมื่อใช้จำนวนเมล็ดงามากขึ้น ปริมาณโปรตีนเฉลี่ยต่อเมล็ดจะน้อยกว่าโปรตีนที่สกัดได้จากเมล็ดเพียงเมล็ดเดียว ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณโปรตีนที่ได้จากเมล็ดงามากกว่า 1 เมล็ด จะเป็นค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีนจากทุกเมล็ดที่นำมาสกัดโปรตีน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีเมล็ดงาจำนวนหนึ่งที่ไม่สมบูรณ์ ทำให้โปรตีนที่สกัดได้มีน้อย หรืออาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนในกระบวนการบดและสกัดโปรตีน (ตารางที่ 8)

เมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้จากโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดงาจำนวนต่างกัน พบว่าเมื่อใช้เมล็ดงาเพียงเมล็ดเดียวก็เกิดแถบโปรตีนแต่ไม่ปรากฏทุกแถบ เนื่องจากเมล็ดงามีขนาดเล็กจึงมีปริมาณโปรตีนที่สะสมแต่ละชนิดในเมล็ดต่อน้ำหนักเมล็ดต่ำจึงต้องใช้จำนวนเมล็ดที่มากขึ้น โดยจำนวนของเมล็ดที่ต้องการนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และความสมบูรณ์ของเมล็ดพันธุ์พืชชนิดนั้นด้วย จากการทดสอบต้องใช้จำนวนเมล็ดงา 6 เมล็ดขึ้นไปจึงจะปรากฏแถบโปรตีนครบทุกแถบและสามารถนำมาตรวจสอบพันธุ์ได้

ตารางที่ 8 ความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่สกัดจากเมล็ดงาขาวพันธุ์ มก 19 จำนวนตั้งแต่ 1 ถึง 10 เมล็ด ด้วยน้ำ วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976)

จำนวนเมล็ด	ความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/เมล็ด)
1	596.88	0.59
2	536.98	0.265
3	1134.45	0.376
4	1202.50	0.3
5	1091.87	0.218
6	1200.03	0.2
7	1146.68	0.162
8	1662.15	0.2075
9	1866.48	0.206
10	2051.49	0.205

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การใช้เทคนิค ultrathin-layer isoelectric focusing เพื่อตรวจสอบสายพันธุ์พืชนั้นสามารถทำได้ในพืชบางชนิด โดยน้ำเป็นตัวทำละลายที่มีความเหมาะสมที่ใช้ในการสกัดโปรตีนจากเมล็ดทานตะวัน และเมล็ดงาเพื่อใช้ในการตรวจสอบพันธุ์และสามารถตรวจสอบความเป็นลูกผสมของพันธุ์ได้ เนื่องจากจำนวนแถบโปรตีนที่ได้มีความแตกต่างกันหลายตำแหน่ง ในกรณีของถั่วลิสงนั้นอาจจำเป็นต้องปรับเทคนิคที่เกี่ยวข้อง เช่น ชนิดของสารละลาย หรือ ความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้สกัดโปรตีนสะสมในเมล็ด เพื่อสกัดโปรตีนออกให้ได้มากที่สุด แม้จะเป็นชนิดที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดก็ตาม เพราะโปรตีนเหล่านี้อาจสามารถใช้บอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ การตรวจสอบพันธุ์โดยใช้เพียงบางส่วนของเมล็ดของทานตะวันและถั่วลิสง พบว่าส่วนที่แบ่งเป็น 1/2 ของเมล็ดพันธุ์ทานตะวัน สามารถนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ด และนำอีกส่วนที่มีคัพภะไปทดสอบความงอก พบว่าส่วนที่ถูกแบ่ง 1/3 และ 1/4 ของเมล็ดสามารถงอกเป็นต้นกล้าได้ดีกว่าส่วนที่ถูกแบ่งเป็น 1/2 และการหาจำนวนเมล็ดที่น้อยที่สุดที่ต้องการสำหรับตรวจสอบพันธุ์งาต้องใช้อย่างน้อย 6 เมล็ดจึงจะที่สามารถนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์ด้วยวิธีนี้

ข้อเสนอแนะ

สำหรับในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเมล็ดพันธุ์นั้น ในขั้นตอนการสกัดโปรตีนโดยใช้วิธีแบบบดแยกเมล็ด (single seed) ในการตรวจสอบความเป็นลูกผสมของพันธุ์ทานตะวันและงานั้น ควรเลือกเมล็ดที่นำมาสกัดโปรตีนมีขนาดน้ำหนักที่ใกล้เคียงกัน และพิจารณาถึงความสมบูรณ์ของเมล็ด เพื่อที่จะมีความคลาดเคลื่อนในการนำมาหาความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนที่ได้น้อยที่สุด ส่วนในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์โดยใช้เพียงบางส่วนของเมล็ด ควรเลือกเมล็ดที่นำมาทดสอบในการแบ่งส่วนต่าง ๆ มีขนาดน้ำหนักที่ใกล้เคียงกัน และมีความสมบูรณ์ของเมล็ดที่เหมือนกันโดยเมล็ดจะต้องไม่ลีบ หรือแคระแกร็น เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนที่เพียงพอต่อการทำ electrophoresis แบบ UTLIEF และส่วนของเมล็ดที่เหลือยังสามารถงอกได้ตามปกติ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษฎา สัมพันธารักษ์. 2537. **พืชไร่**. พิมพ์ครั้งที่ 3. โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิชจำกัด. กรุงเทพฯ.

คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา. 2542. **พืชเศรษฐกิจ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

จวงจันทร์ ดวงพัฒนา. 2529 ก. **เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กลุ่มหนังสือเกษตร. กรุงเทพฯ. 209น.

_____ . 2529 ข. **การตรวจสอบและการวิเคราะห์คุณภาพเมล็ดพันธุ์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กลุ่มหนังสือเกษตร. กรุงเทพฯ. 194 น.

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2542. **เทคโนโลยีเมล็ดพันธุ์พืช**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 276 น.

วันชัย จันทร์ประเสริฐ. 2537. **สรีรวิทยาเมล็ดพันธุ์.** พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยา ลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 213 น.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. **เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส**. พิมพ์ครั้งที่1. สำนักพิมพ์รั้วเขียว. กรุงเทพฯ. 85 น.

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

Beyer K., L. Bardina, G. Grishina and H.A. Sampson. 2002. Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens. **J. Allergy Clin Immunol**. 110 (1) : 154-159. แหล่งที่มา http:///www.ncbi. nlm.nih .gov/pubmed/ 12110835.

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

Chawla, H.S. 2000. **Introduction to Plant Biotechnology**. Science Publishers. Inc. Enfield, NH. U.S.A.

Coolbear, P. and M. J. Hill. 1988. Seed quality control. pp. 331-342. *In* **"Rice Seed Health",** International Rice Germplasm Center**,** IRRI, Manila, Philippines.

International Seed Testing Association (ISTA). 1999. International rules for seed testing. **Seed Sci. Technol**. 27. Supplement. 333 p.

Jacques, G., Y. Popineau, I. N. Anisimova, R. J. Fido, P. R. Shewry and A. S. Tatham. 1996. Functionality of the 2S albumin seed storage proteins from sunflower (*Helianthus annuus* L.). **J. Agric. Food Chem**. 44 (5): 1184-1189. แหล่งที่มา http://pubs.acs.org/doi/full /10.1021/jf950683f?cookie Set=1.

John M.C., Jr. and R.L. Switzer. 1997. **Experimental Biochemistry**. W.H. Freeman and Company. U.S.A. 335 p.

Leist, N., E. Noli, R. Knoblauch and T. Thongket. 2003**. ISTA/FAO Workshop on Electrophoretic and PCR-based Methods for Varietal Verification and GMO Detection**. 25-29 Nov. 2003. Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus.

Manum, P., T. Thongket and S. Chanprame. 2007. Sweet Corn Seed Protein Testing by UTLIEF Technique Using Partial Seed Part, pp. 50**.** In **AgBiotech Graduate Conference III at The 4th KU-KPS Conference.** 7-8 Dec. Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus Nakhon pathom.

McDonald, M.B. 1998. Seed quality assessment. **Seed Sci Res**. 8: 265-275.

Pater R.S. and R. Casey. 1999. **Seed Protein.** Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 883 p.

Payne, R.C. 1987. Seed and cultivar identification. **Seed Sci. Technol**. 15: 641-644.

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

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

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

Zhao, T., M. Yan., Y. P. Lu, F. Yang, J. Huahg, and X.F. Wang 2005. Genetic purity testing of two-line hybrid rice seeds by ultrathin-layer isoelectric focusing of proteins. **Seed Sci. Technol.** 33:45-52.

ภาคผนวก

ส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้สำหรับทำ electrophoresis ด้วยเทคนิค UTLIEF

(Leist, N., E. Noli, R. Knoblauch and T. Thongket. 2003**. ISTA/FAO Workshop on Electrophoretic and PCR-based Methods for Varietal Verification and GMO Detection**. 25-29 Nov. 2003. Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus**)**

Acrylamide solution

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

20 % APS solution

สารเคมี	**ปริมาณ**
ammonium persulphate	2 กรัม
ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรให้ครบ	10 มิลลิลิตร

Anode buffer

สารเคมี	**ปริมาณ**
L-asparagine anhydrous	0.8 กรัม
L-glutamine	0.92 กรัม
ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรให้ครบ	10 มิลลิลิตร

Cathode buffer

สารเคมี	**ปริมาณ**
L-arginine	1.18 กรัม
L-lysine	0.91 กรัม

ethylene-diamine	30 มิลลิลิตร
ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรให้ครบ	250 มิลลิลิตร

12%TCA solution

สารเคมี	**ปริมาณ**
trichloroacetic acid	266.67 กรัม
ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

Staining solution

สารเคมี	**ปริมาณ**
coomassie R250	0.15 กรัม
coomassie G250	0.45 กรัม
glacial acetic acid	110 มิลลิลิตร
ethanol 95%	180 มิลลิลิตร
ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

Destaining solution

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

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
ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรให้ครบ	1,000 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายยูเรียความเข้มข้น 4 โมลาร์

สารเคมี	**ปริมาณ**
ยูเรีย	0.24 กรัม
ละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรให้ครบ	1 มิลลิลิตร

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวธัญมาศ นิยมญาติ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	25 มกราคม 2526
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
ประวัติการศึกษา	จบปริญญาตรีจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงานวิจัยบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์