บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

หงส์เหิน (*Globba* spp.) เป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae, Tribe Globbeae ชื่อไทยเรียกกันหลายอย่างตามท้องถิ่น เช่น ดอกเข้าพรรษา ยูงทอง พรม 3 หน้า เกศนกยูง (ณัฐพล, 2524) ข่าลอง กล้วยจั่น กล้วยเครือคำ และกระทือลิง เป็นต้น (จำลองและคณะ, 2539) ในประเทศพม่าเรียกว่า ดอกพเด็งโง (อรดี, 2542)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไป (อดิศร, 2541)

ราก ระบบรากเป็นรากฝอย ด้านนอกเป็นสีน้ำตาลอ่อน เมื่อผ่าดูเนื้อเยื่อภายในมีสีขาว

หัว หัวเป็นแบบเหง้า (rhizome) ที่มีรากสะสมอาหาร (storage root) ติดอยู่เป็นกระจุก หัวแปรรูปมาจากลำต้นใต้ดิน มีลักษณะเป็นเหง้าสั้นๆ มีการแตกสาขาขนานไปกับผิวดิน

ลำต้น เป็นลำต้นใต้ดินที่มีเหง้าขนานไปกับผิวดิน ด้านนอกของลำต้นมีสีน้ำตาลอ่อน ด้านในมีสีขาวและมีกลิ่นหอม เมื่อถึงระยะแทงช่อดอกมีการยืดตัวของลำต้นใต้ดินขึ้นมาเหนือดิน แต่ละปล้องมีกาบใบหุ้ม ปลายสุดของลำต้นเป็นก้านช่อดอก

ใบ ใบเป็นใบเดี่ยว แยกออกเป็นสองแนวตรงกันข้ามในระนาบเดียวกัน แผ่นใบบาง ใบเป็นรูปหอก ปลายใบเรียวแหลม ขอบใบเรียบ เส้นใบเป็นแบบขนาน เส้นกลางใบเด่นชัด

ช่อดอก ช่อดอกเกิดที่ปลายยอด มีลักษณะเป็นช่อดอกโค้งลง บริเวณก้านช่อดอกมีกลีบประดับ ซึ่งมีลักษณะบางเป็นรูปขอบขนานถึงรูปหอก ปลายใบแหลม ฐานเป็นรูปลิ่มขอบเรียบทั้งสองด้าน มีดอกย่อยเกิดที่ซอกของใบประดับ ดอกจริงมีลักษณะห้อยลงด้านล่างก่อนเมื่อถึงเวลาบานจะตั้งขึ้น

ดอก ดอกเป็นดอกสมบรูณ์เพศ มีเกสรตัวผู้ 1 อันบริเวณด้านข้างมีรยางค์ (triangular appendage) ก้านชูอับละอองเรณูลักษณะโค้ง ก้านชูเกสรตัวเมียยาวคล้ายเส้นด้าย (filiform)

ผล ผลเป็นแบบแห้งแตก (capsule)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลล์พันธุศาสตร์

Larsen (1972) ได้ศึกษาจำนวนโครโมโซมโดยใช้อับละอองเรณูของพืชในสกุล *Globba* ในประเทศไทยจำนวน 13 ชนิด พบว่ามีจำนวนโครโมโซม n = 16, 17 และ 2n = 24, 28, 32, 48 และ 64 นอกจากนั้น กำปั่น (2541) ได้รายงานผลการศึกษาจำนวนโครโมโซมจากปลายรากของหงส์เหินจำนวน 3 ชนิด พบว่า มีจำนวนโครโมโซม 2n = 32 และ 48

วงจรการเจริญเติบโต

นิตยา (2544) ได้ศึกษาวงจรการเจริญเติบโตของหงส์เหินพันธุ์ช่อขาวยาว พบว่า เริ่มการเจริญเติบโตโดยการแทงหน่อใบขึ้นมาก่อน ต่อมาหน่อใบยืดตัวมากขึ้นและเริ่มเห็นใบอ่อน หลังจากใบอ่อนยืดตัว ปล้องของลำต้นเจริญเติบโตสูงขึ้น ใบทยอยกันเจริญเติบโตออกมาเรื่อยๆ จนมีจำนวนใบต่อต้นคงที่ คือ 5-6 ใบต่อต้น หลังจากนั้นช่อดอกมีการเจริญเติบโต มีการยืดตัวของก้านช่อดอกและการขยายขนาดของช่อดอกจนกระทั่งดอกบาน โดยดอกทยอยกันบานจากโคนช่อไปหาปลายช่อ และมีการติดฝักตามธรรมชาติของดอก จากนั้นดอกเริ่มโรยและช่อดอกเริ่มหมดอายุ ในขณะที่ช่อดอกมีการเจริญเติบโตต้นจะเริ่มสร้างส่วนสะสมอาหารใหม่บริเวณโคนราก การเจริญเติบโตดำเนินไปเรื่อยๆ จนใบเริ่มเหลืองแห้งและเป็นสีน้ำตาล ลำต้นแห้งและหลุดออกจากหัวใหม่ ซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นการพักตัวของหัว ในวงจรการเจริญเติบโตหนึ่งๆต้นหงส์เหินจะมีช่วงการเจริญเติบโตประมาณ 7-8 เดือน โดยเริ่มเติบโตในเดือนพฤษภาคม และเข้าสู่ระยะพักตัวในเดือนพฤศจิกายน พักตัวเป็นเวลา 4-5 เดือน และเริ่มงอกใหม่ในเดือนพฤษภาคมของปีถัดไป

การจำแนกพันธุ์พืชโดยวิธีการทางชีวเคมีและชีวโมเลกุล

การจำแนกพันธุ์พืชโดยทั่วไปพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชชนิดนั้น แต่ในปัจจุบันเนื่องจากได้มีลูกผสมต่างๆเกิดขึ้นมากมาย ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แสดงออกมักมีความแตกต่างจากต้นพ่อแม่เล็กน้อยทำให้เกิดความสับสน จึงได้มีการนำเทคนิคหรือวิธีการอื่นมาช่วยในการจำแนกลูกผสม และ/หรือสายพันธุ์พืช Larsen (1968) พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พืชแสดงออกให้เห็นในธรรมชาติ มีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์นั้นย่อมมีความแตกต่างกันในทางชีวเคมี แต่ความแตกต่างกันทางชีวเคมีไม่จำเป็นเสมอไปที่พืชจะมีลักษณะแตกต่างกันในทางสัณฐานวิทยา การใช้เครื่องหมายทางโมเลกุล (molecular marker) ซึ่งประกอบด้วยการใช้เครื่องหมายทางโปรตีน (protein marker) ได้แก่ รูปแบบของแถบไอโซไซม์ (isozyme banding pattern) และการใช้เครื่องหมายทางดีเอ็นเอ (DNA marker) เช่น randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction fragment length polymorphism (RFLP), amplified frangment length polymorphism (AFLP), DNA sequencing และ microsatellites (สุรินทร์, 2540)

การใช้เครื่องหมายทางโปรตีนโดยการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาและวิจัยทางด้านพันธุศาสตร์ เนื่องจากไอโซไซม์มีผลเกี่ยวข้องกับยีนโดยตรง เอนไซม์คือโปรตีนซึ่งถือได้ว่าเป็นผลผลิตปฐมภูมิที่เกิดจากการแสดงกิจกรรมของยีน มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาเคมี ประกอบด้วยกรดอะมิโน โดยลำดับของกรดอะมิโนที่ประกอบกันเป็นโปรตีนถูกควบคุมด้วยลำดับของนิวคลีโอไทด์ในหน่วยพันธุกรรมหรือยีน เมื่อเอนไซม์ใดมียีนต้นแบบมาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กว่าหนึ่งยีน จะทำให้ได้เอนไซม์ที่มีองค์ประกอบต่างกัน มีโครงสร้างโมเลกุลได้หลายรูปแบบ และมีคุณสมบัติทางไฟฟ้าต่างกันแต่กระตุ้นปฏิกิริยาเคมีเดียวกัน โดยสามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่จำเพาะออกมาเหมือนกันเมื่อทำปฏิกิริยากับสารเริ่มต้นที่เหมาะสม เรียกเอนไซม์ที่มีรูปแบบโมเลกุลหลายรูปแบบแต่สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาเดียวกัน หรือมีความจำเพาะของสารเริ่มต้นเหมือนกันนี้ว่า isozyme หรือ isoenzyme จากคุณสมบัติข้างต้นของไอโซไซม์ทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์กับงานทางด้านชีวเคมี โดยอาศัยเทคนิคทางอีเล็กโตรโฟรีซีส (สมิต และ ประวิทย์, 2533)

อิเล็กโตรโฟรีซีสเป็นเทคนิคที่แยกและวิเคราะห์สารประกอบ อาศัยหลักการคือสารที่มีประจุไฟฟ้าจะเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้า โดยเคลื่อนที่ไปยังขั้วไฟฟ้าที่มีประจุตรงข้ามกัน (สารที่มีประจุบวกเคลื่อนที่ไปหาขั้วลบ ส่วนสารที่มีประจุลบเคลื่อนที่ไปหาขั้วบวก) สารที่มีประจุไฟฟ้าต่างกันย่อมมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกันและโมเลกุลขนาดเล็กมักเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีประจุเท่ากัน และอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ (electrophoretic mobility) จะไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับปริมาณประจุสุทธิบนโมเลกุลของสาร (อาภัสสรา, 2537) เทคนิคนี้เริ่มใช้สำหรับแยกโปรตีนเป็นครั้งแรกในสารละลายเรียกว่า moving bounding electrophoresis และได้รับการพัฒนาขึ้นมาเรื่อยๆ ให้มีอำนาจในการจำแนกสูงขึ้นด้วย โดยให้การแยกเกิดขึ้นในตัวกลางที่มีสถานะแข็งขึ้น เช่น กระดาษกรอง เซลลูโลส หรือวุ้นพวกอะกาโรส และโพลีอคริลาไมด์ สารที่ถูกแยกปรากฏเป็นแถบเรียกว่า zone electrophoresis (สุกัญญา , 2538)

เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) คือการใช้อะกาโรสและโพลีอคริลาไมด์เป็นตัวกลาง มีขนาดรูพรุนที่ยอมให้สารชีวโมเลกุลผ่านไปได้ ขนาดรูพรุนมีบทบาทในการคัดกรองโมเลกุลเหล่านี้ การเคลื่อนที่ของโมเลกุลในระบบนี้ขึ้นกับ 2 ปัจจัย คือขนาดและชนิดของประจุ ขนาดของอะกาโรสที่มีขนาดใหญ่กว่ามักนิยมใช้กับโปรตีนที่มีขนาดใหญ่มากและกับกรดนิวคลีอิก เช่น อะกาโรสความเข้มข้น 0.8 % ใช้แยกกรดนิวคลีอิกขนาด 50,000 กิโลดาลตัน ส่วนโพลีอคริลาไมด์ซึ่งเป็นที่นิยมในงานของโปรตีนมากที่สุด เพราะสามารถปรับขนาดรูพรุนของเจลให้สอดคล้องกับโปรตีนที่เราสนใจได้โดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของอคริลาไมด์ โพลีอคริลาไมด์เป็นโพลิเมอร์ที่เกิดจากการต่อโมโนเมอร์ของอคริลาไมด์ให้เป็นสาย แล้วเชื่อมระหว่างสายด้วย N,N' methylenebisacrylamide ปฏิกิริยานี้ต้องการอนุมูลอิสระ (free radical) ที่ได้จากการสลายของแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) โดยมี TEMED (N,N,N',N' tetramethylethylenediamine) เป็นตัวรักษาอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น จึงเร่งการเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชั่นได้ ความเข้มข้นเป็นร้อยละของอคริลาไมด์ทั้ง 2 ชนิดรวมกัน (Total concentration, %T) เป็นปัจจัยที่กำหนดขนาดของรูพรุน เช่น % T สูงจะให้รูพรุนขนาดเล็ก จึงเหมาะต่อการคัดกรองโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่มีขนาดเล็ก คือ 10 % T มักใช้แยกโปรตีนระหว่าง 15,000 – 100,000 ดาลตัน หลังจากเกิดปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชั่น สารละลายใสจะกลายเป็นเนื้อวุ้น พร้อมที่จะใช้เป็นตัวกลางในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสต่อไป ทั้งนี้อาจทำได้ทั้งในรูปของแท่งเจล (cylindrical gel) หรือ แบบแผ่น (slab gel) ในเนื้อเจลและในระบบจะต้องควบคุมความเป็นกรดด่างของสารละลายไว้ด้วยบัฟเฟอร์ ซึ่งสัมผัสอยู่กับขั้วไฟฟ้าทั้งสอง ในเจลระบบต่างกันที่ pH ต่างกันจะทำให้โปรตีนมีประจุต่างกันไปด้วย ในการแยกโปรตีนจะเติมสารผสมที่ต้องการแยกลงไปบนเจล ซึ่งเจลขั้นบนเรียก stacking gel เพื่อช่วยทำให้สารตั้งต้นเข้มข้นขึ้น แถบสารตั้งต้นจึงปรากฏเป็นแถบแคบ เมื่อเคลื่อนตัวต่อไปยังเจลชั้นล่างที่เรียกว่า separating gel แถบของสารที่เกิดจากการแยกในขั้นนี้จึงแคบและแยกจากกันอย่างชัดเจน เมื่อให้กระแสไฟฟ้า โปรตีนจะเคลื่อนที่ไปได้ เมื่อสิ้นสุดการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส สามารถย้อมให้เห็นโปรตีนได้โดยใช้สีย้อม หรือถ้าเป็นเอนไซม์สามารถย้อมสีด้วยปฏิกิริยาเฉพาะของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยเลือกใช้สารตั้งต้นที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ และเมื่อถูกเปลี่ยนให้เห็นผลิตภัณฑ์ได้จึงให้แถบสีที่ชัดเจน (สุกัญญา , 2538)

การศึกษาโมเลกุลของโปรตีนหรือเอนไซม์ภายในต้นพืช เป็นวิธีการหนึ่งที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างต้นพืชได้ว่าเหมือนหรือแตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างหรือความคล้ายคลึงของเอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ถึงความแตกต่างหรือความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม พืชที่มีแบบแผนของการเรียงของแถบไอโซไซม์เหมือนกันอาจมีพันธุกรรมเหมือนกัน แต่ถ้ามีข้อแตกต่างกันแสดงว่าพืชชนิดนั้นมีพันธุกรรมต่างกัน หรือไม่ก็เกิดจากสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน ทำให้กระบวนการทางชีวเคมีในการสร้างเอนไซม์หรือไอโซไซม์แตกต่างกันได้ (เสาวณี, 2538)

Gasic *et al.* (2000) ได้ศึกษาการแสดงความหลากหลายของรูปแบบไอโซไซม์ ของต้นท้อจำนวน 33 พันธุ์ ที่มาจากประเทศ สหรัฐอเมริกา อิตาลี จีน และญี่ปุ่น ใช้เทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส สกัดโปรตีนจากส่วนใบ ทดสอบด้วย เอนไซม์ 32 ระบบ พบว่าเอนไซม์ 11 ระบบ แสดงลักษณะรูปแบบไอโซไซม์ที่ไม่แตกต่างกัน ส่วนอีก 21 ระบบ แสดง ลักษณะรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีตำแหน่งยีนควบคุม 31 loci เมื่อวิเคราะห์ด้วย UPGMA สามารถแยกท้อทั้ง 33 พันธุ์ ออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มาจากประเทศสหรัฐอเมริกาและอิตาลี (Western cultivar) ซึ่งมีความใกล้ชิดกันมากจำนวน 25 พันธุ์ ส่วนอีกกลุ่มมาจากประเทศจีนและญี่ปุ่น (Asian cultivar) ซึ่งแยกออกจากกลุ่มของ Western cultivar อย่างเห็นได้ชัด จำนวน 8 พันธุ์ โดย 2 พันธุ์จากประเทศญี่ปุ่น ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของ Western cultivar

Agarwal *et al.* (2001) ได้ศึกษาคุณลักษณะของต้นท้อ (*Prunus persica* L.) จำนวน 12 ชนิด ด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส ใช้สารสกัดจากชิ้นส่วนใบวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ 6 ระบบ พบความแปรปรวนของแต่ละสายพันธุ์ได้จากเอนไซม์ 4 ชนิด คือ peroxidase (POX),

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

isocitrate dehydrogenase (IDH), acid phosphatase (ACP) และ alkaline phosphatase (ALP) โดยมีตำแหน่งยีนควบคุมทั้งหมด 15 loci ซึ่ง 9 loci แสดงลักษณะ monomorphic และอีก 6 loci แสดงลักษณะ polymorphic เมื่อทำการจัดกลุ่มด้วยการเขียนแผนภาพ Dendrogram แสดงให้เห็นถึงการจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่มใหญ่ และยังสามารถระบุถึงความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นในแต่ละพันธุ์ของท้อโดยดูจากค่า genetic distance value

ความแตกต่างของไอโซไซม์ที่แสดงออกมาอาจเกิดจากการที่ไอโซไซม์มีความจำเพาะต่อชนิดของเนื้อเยื่อ และระยะการเจริญเติบโตของพืช (Markert and Moller, 1959) สุรพงษ์ (2534) ศึกษารูปแบบไซโมแกรม EST ของกล้าถั่วฝักยาวพันธุ์การค้าจากชิ้นส่วนเหนือใบเลี้ยง ใบเลี้ยง ใต้ใบเลี้ยง และรากอายุ 3, 5 และ 7 วัน ด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส แบบเจลแผ่น พบความแตกต่างของรูปแบบไซโมแกรมของชิ้นส่วนที่นำมาสกัดเอนไซม์ทั้ง 4 ชิ้นส่วน และพบว่ามีความแตกต่างของตำแหน่งแถบสีในชิ้นส่วนที่อายุต่างกัน โดยส่วนเหนือใบเลี้ยงอายุ 7 วัน เป็นชิ้นส่วนที่มีแถบเอนไซม์จำนวนมากและชัดเจน

Weeden and Lamb (1985) ได้จำแนกสายพันธุ์แอปเปิลโดยสกัดเอนไซม์จากส่วนของกลีบดอก ละอองเรณู ใบแก่ และใบอ่อน ใช้เอนไซม์ 6 ระบบคือ aspartate aminotransferase (AAT), glucosephosphate isomerase (GPI), triose phosphate isomerase (TPI), diaphorase (DIA), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) และ IDH พบว่าเนื้อเยื่อที่ต่างกันให้รูปแบบไอโซไซม์เหมือนกัน โดยแถบสีที่ได้จากใบอ่อนมีความเข้มและคมชัดที่สุด ดังนั้นจึงใช้สารสกัดจากใบอ่อนมาจำแนกแอปเปิลจำนวน 54 สายพันธุ์ออกจากกัน

เพิ่มพงษ์ และคณะ (2530) ได้ศึกษาไอโซไซม์ POX ในใบและเปลือกหุ้มกิ่งมะม่วงพันธุ์ไทย ด้วยวิธีโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีสชนิดแท่ง พบว่ารูปแบบของไอโซไซม์ POX ที่ตรวจจับได้มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของชิ้นส่วนและอายุของเนื้อเยื่อมะม่วงเป็นสำคัญ พบว่าแถบของเอนไซม์ที่ตรวจพบจากส่วนใบมี 8-18 แถบ และเปลือกหุ้มกิ่งมี 6-15 แถบ ปริมาณเอนไซม์ในใบมีมากขึ้นเมื่อใบมีอายุมากขึ้น ดังนั้นใบมะม่วงที่นำมาศึกษาหาความแตกต่างในแต่ละพันธุ์ควรมีอายุ 3-4 เดือนหลังจากแตกใบอ่อน

ศิริลักษณ์ และนิยะดา (2540) ศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ POX, EST, ACP และ alcohol dehydrogenase (ADH) จากชิ้นส่วนของดอกบาน ใบอ่อน และใบแก่ ของต้นเข็ม พบว่าชิ้นส่วนทั้ง 3 ชนิด เกิดแถบไอโซไซม์แบบเดียวกันแต่มีความเข้มของแถบสีมากน้อยต่างกัน โดยดอกบานให้แถบสีคมชัดที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซีสมาใช้ในการศึกษาไอโซไซม์ของพืชทั้งในด้านการปรับปรุงพืช การศึกษาทางด้านสรีรวิทยา โรคพืช การจำแนกพันธุ์พืช และการจัดหมวดหมู่พืชหลายชนิด ซึ่งถือว่าเป็นวิธีที่กระทำได้รวดเร็ว ไม่สิ้นเปลืองเวลาในการศึกษา และสามารถตรวจสอบผลซ้ำได้ เทคนิคนี้เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเทคนิคทาง DNA marker พบว่ามีข้อได้เปรียบคือ ค่าใช้จ่ายถูกกว่า สามารถอธิบายผลได้ง่าย เป็นเทคนิคที่ไม่ซับซ้อนและยังสามารถใช้ได้ผล (Obara-Okeyo *et al.*,1998)

การศึกษาไอโซไซม์เพื่อการจำแนกพันธุ์มีรายงานการศึกษา และประสบความสำเร็จในพืชหลายชนิดได้แก่

Kuhns and Fretz (1978) จำแนกสายพันธุ์ลูกผสมของกุหลาบที่มีความใกล้ชิดกันจำนวน 8 สายพันธุ์ ซึ่งมีนิสัยการเจริญเติบโตและการออกดอกต่างกัน ด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส ใช้ใบอ่อนตำแหน่งที่ 3 มาสกัดเอนไซม์ และย้อม total protein, POX, EST, malate dehydrogenase (MDH), cytochrome oxidase, phenoloxidase และ polyphenoloxidase เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการจำแนกสายพันธุ์ พบว่าข้อมูลของแถบไอโซไซม์ที่ได้เมื่อนำมาหาค่าความคล้ายคลึงกัน (coefficient of similarity values) และเขียนแผนผังในการแยกกลุ่มของสายพันธุ์สามารถจำแนกทุกสายพันธุ์ออกจากกันได้ โดยอาศัยรูปแบบที่แตกต่างกันของเอนไซม์หลายๆ ระบบ

Grossi *et al.*, (1997) ได้ศึกษาความหลากหลายของรูปแบบของไอโซไซม์ในพันธุ์ต่างๆ ของกุหลาบป่าโดยใช้ใบอ่อน ด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส วิเคราะห์จากเอนไซม์ 3 ระบบ คือ EST, leucin aminopeptidase (LAP) และ superoxide dismutase (SOD) เพื่อตรวจสอบอัตราการเกิดและความคงที่ของรูปแบบ พบว่าแต่ละเอนไซม์ให้จำนวนแถบที่แตกต่างกันและสิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลต่อการเกิดรูปแบบที่ต่างกัน เมื่อนำมาจัดกลุ่มสามารถจำแนกสายพันธุ์กุหลาบป่าออกจากกันได้ โดยอาศัยลักษณะนิสัยของพืชร่วมด้วย

หลังจากนั้น Grossi *et al.* (1998) ได้จัดหมวดหมู่ของกุหลาบจำนวน 4 หมู่ในสกุล *Rosa* คือ หมู่ Carolinae, Cinnamomeae, Pimpinellifoliae และ Synstylae รวมทั้งสิ้น 67 สายพันธุ์ ทำการศึกษา phenolic metabolism โดยใช้ชิ้นส่วนดอก และศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ 3 ระบบ คือ EST, LAP และ SOD โดยใช้สารสกัดจากชิ้นส่วนใบ วิเคราะห์โดยใช้ค่า mean of flavonoid และ enzyme polymorphisms พบว่า flavonoids และ รูปแบบไอโซไซม์ SOD สามารถจำแนกแต่ละหมู่ออกจากกัน และยังบ่งบอกว่ากุหลาบในหมู่ Pimpinellifoliae บางชนิดมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับ หมู่ Synstylae ส่วน หมู่ Cinnamomae สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่แสดงสายพันธุ์ดั้งเดิมของกุหลาบป่า และกลุ่มที่มีสายพันธุ์ซึ่งได้รับการพัฒนาแล้ว นอกจากนั้นหมู่ Carolinae

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มีความสัมพันธ์กับกลุ่มแรกของ หมู่ Cinnamomeae ซึ่งพบว่าเป็นบรรพบุรุษของ หมู่ Cavolinaeโดยอาศัยสมมุติฐานของระดับพลอยดี่ที่มีจำนวนมากกว่าหมู่ Carolinae แสดงว่ามีวิวัฒนาการที่ยาวนานกว่า

Apavatjrut *et al.* (1999) ได้ศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ของพืชสกุล *Curcuma* โดยใช้สารสกัดจากใบอ่อนของกลุ่มกระเจียวพันธุ์เบาที่ได้จากภาคใต้ของประเทศไทยจำนวน 7 ชนิด ซึ่งมีลักษณะดอกและสีกลีบประดับคล้ายคลึงกัน ด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส จากการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์ 8 ระบบ คือ aconitase (ACO), phosphoglucomutase (PGM), EST, glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), DIA, LAP, IDH และ shikimate dehydrogenase (SKD) พบว่าแบบแผนของไอโซไซม์สามารถแสดงความแตกต่างระหว่างชนิดและแสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของพืชสกุลกระเจียวพันธุ์เบาได้

หลังจากนั้น Paisooksantivatana *et al.* (2001) ได้ศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายของรูปแบบไอโซไซม์ในประชากร *Curcuma alismatifolia* Gagnep. จากประเทศไทย โดยใช้ใบอ่อนที่ยังไม่คลี่มาวิเคราะห์ไอโซไซม์เพื่อแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ที่เกิดตามธรรมชาติ กับสายพันธุ์ที่นำมาปลูกเป็นการค้า ด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส วิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ 7 ระบบ คือ alcohol dehydrogenase (ADH), DIA, EST, glutamate dehydrogenase (GDH), LAP, glucose-6-phosphate isomerase (GPI) และ PGM พบว่าไอโซไซม์ 5 ชนิด คือ ADH, GDH, LAP, GPI และ PGM ให้แถบสีมีรูปแบบที่แน่นอนและคมชัด เมื่อจัดกลุ่มด้วย UPGMA สามารถแยกสายพันธุ์ที่เกิดตามธรรมชาติ และสายพันธุ์ทางการค้าออกจากกันได้อย่างเด่นชัด

Chokthaweepanich and Paisooksantivatana (2002) จัดกลุ่มพืช 17 ชนิด โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและรูปแบบไอโซไซม์ ได้แก่ พืชสกุล *Curcuma* จำนวน 16 ชนิด และ *Smithatris* 1 ชนิด ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจัดกลุ่ม *Smithatris* รวมอยู่ในกลุ่มของ *Curcuma* เมื่อศึกษารูปแบบไอโซไซม์ 8 ชนิด คือ ADH, PGM, LAP, GDH, GOT, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), MDH และ EST ด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส พบว่าทุกเอนไซม์แสดงลักษณะ polymorphism และใช้รูปแบบไอโซไซม์ของ G6PDH, MDH และ EST จำแนกพืชทุกชนิดได้ เมื่อนำมาจัดกลุ่มโดยการวิเคราะห์ค่าระยะทางพันธุกรรม (genetic distance) และหาความสัมพันธ์ด้วยวิธี UPGMA พบว่า สามารถแยกพืชสกุล *Smithatris* ออกจากพืชสกุล *Curcuma* และจำแนกพืชสกุล *Curcuma* ได้อีก 2 กลุ่ม

Booy *et al.* (1993) ศึกษาการแสดงรูปแบบที่แตกต่างกันของไอโซไซม์ในทิวลิป (*Tulipa gesneriana*) และพันธุ์ลูกผสม Darwin hybrid โดยใช้สารสกัดจากชิ้นส่วนหัวแห้ง จำนวน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

91 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (native PAGE) เพื่อจำแนกสายพันธุ์ทิวลิปจำนวนมากออกจากกันโดยใช้เอนไซม์ EST พบว่า 78 สายพันธุ์ ให้รูปแบบที่แสดงลักษณะเฉพาะของแต่ละสายพันธุ์ ส่วนในกลุ่มพันธุ์ลูกผสม Darwin hybrid สามารถแสดงรูปแบบของแถบเหมือนกัน แสดงว่ามีโอกาสที่มาจากพ่อแม่เดียวกัน ส่วนพันธุ์ที่มาจากการกลายพันธุ์ไม่สามารถจำแนกออกได้ และยังพบว่าสภาพดินที่ใช้ในการปลูก สภาพของหัว และตำแหน่งของกลีบหัวไม่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของรูปแบบไอโซไซม์ EST

Reis and Frederico (2001) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วฝักยาว โดยใช้สายพันธุ์ถั่วฝักยาว *(Vigna unguiculata)* จำนวน 20 หมายเลขที่มาจากต่างเมืองกัน ซึ่งจัดได้เป็นจำนวน 3 กลุ่มพันธุ์ คือ *V. unguiculata* ssp. *unguiculata* cv. gr. unguiculata, cv. gr. sesquipedalis และ cv. gr. biflora ด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยใช้สารสกัดของใบอ่อนในการวิเคราะห์เอนไซม์ ACP, ADH, MDH, malic enzyme (ME), POX และ SOD และส่วนของรากที่ได้จากเมล็ดกำลังงอกมาวิเคราะห์เอนไซม์ EST และ G6PDH รวมทั้งหมด 8 เอนไซม์ เพื่อจำแนกและแสดงความสัมพันธ์ของทั้ง 3 กลุ่มพันธุ์ พบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำมาก โดยทุกเอนไซม์แสดงลักษณะ monomorphic ยกเว้นระบบเอนไซม์ EST แสดงลักษณะ polymorphic ซึ่งสามารถจำแนกบางหมายเลขออกจากกันได้ แต่การวิจัยนี้ไม่สามารถจำแนกทั้ง 3 กลุ่มพันธุ์ออกจากกันได้ แต่ความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับสูง ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี amplified polymorphic DNA

Chen (1999) ได้ศึกษาแหล่งที่มาของ buckwheat พันธุ์พื้นเมืองของจีน จำนวน 16 หมายเลข จากพันธุ์ที่มีการปรับปรุง และชนิดพันธุ์ป่าจากพืชพื้นเมืองของ ทิเบต เสฉวน กุนซู และยูนนาน ได้แก่สายพันธุ์ *Fagopyrun esculentum, F. tataricum, F. pleioramosum* และ *F. gracilipes* ซึ่ง 3 ชนิดแรกเป็น diploid (2n = 16) และชนิดสุดท้ายเป็น tetraploid (2n = 32) นอกจากนี้ยังศึกษาชนิดที่พบใหม่อีก 3 ชนิด คือ *F. zuogongense, F. megaspartanium* และ *F. pilus* ชนิดแรกเป็น tetraploid อีก 2 ชนิดเป็น diploid โดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา อนุกรมวิธาน กระบวนการสืบพันธุ์ จำนวนโครโมโซม และ รูปแบบไอโซไซม์ EST เพื่อบ่งบอกถึงต้นกำเนิด การจัดกลุ่ม และวิวัฒนาการของสายพันธุ์ พบว่า ชนิดใหม่ทั้ง 3 ชนิดให้รูปแบบเอนไซม์ EST ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน เมื่อเขียนแผนภาพของไอโซไซม์ดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า *F. megaspartanium* และ *F. pilus* ให้รูปแบบไอโซไซม์คล้ายกับ *F. esculentum* และ *F. tataricum* ส่วน *F. gracillipes* ซึ่งเป็นกลุ่มเล็กๆของสกุลนี้ให้รูปแบบที่แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆซึ่งเป็นกลุ่มใหญ่กว่า นอกจากนั้นยังพบว่า *F. pilus* และ *F. megaspartanuim* อาจเป็นบรรพบุรุษของพันธุ์ buckwheat ที่ได้มีการปรับปรุงพันธุ์แล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Garkava *et al.* (2000) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของพืชสกุล *Chaenomeles (Rosaceae)* 4 ชนิด คือ *Chaenomeles cathayensis, C. japonica, C. speciosa* และ *C. x superba* มีลักษณะ จีโนไทป์ทั้งสิ้น 42 แบบ เมื่อใช้เทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส วิเคราะห์เอนไซม์ 6 ระบบ คือ ACP, SOD, ME และ EST พบว่า สามารถจำแนกและจัดกลุ่มออกเป็น 3 กลุ่มหลัก คือกลุ่ม *C. cathayensis*, กลุ่ม *C. japonica* และกลุ่มที่รวม *C. speciosa* และ *C. x superba* อยู่รวมกันโดยกลุ่ม *C. japonica* มีความสัมพันธ์กับกลุ่ม *C. cathayensis* น้อยที่สุด ขณะที่กลุ่ม *C. speciosa* และ *C. x superba* มีความสัมพันธ์อยู่ระหว่างกลุ่ม *C. japonica* และกลุ่ม *C. cathayensis* โดยกลุ่ม *C. cathayensis* มีความแปรปรวนของรูปแบบไอโซไซม์ในระดับต่ำ สำหรับการจัดกลุ่มภายในชนิดเดียวกัน (intraspecific) การใช้ข้อมูลทางไอโซไซม์มีประสิทธิภาพน้อย ดังนั้นจึงศึกษาร่วมกับเทคนิค RAPD พบว่า สามารถจำแนกบางต้นที่อยู่ในกลุ่ม *C. speciosa* และ *C. x superba* ออกมารวมอยู่ในกลุ่มของ *C. cathayensis* ได้

Kim and Ko (1997) จำแนกสายพันธุ์พลับ (*Diospyros kaki* Thumb.) จำนวน 141 สายพันธุ์ ซึ่งประกอบด้วยสายพันธุ์พื้นเมืองของเกาหลีและญี่ปุ่นจำนวน 110 และ 31 สายพันธุ์ตามลำดับ โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเจลแป้ง วิเคราะห์เอนไซม์ 7 ระบบ พบว่า phosphoglucose isomerase (GPI), MDH, POR และ PGM แสดงรูปแบบของแถบที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยการจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยใช้แผนภาพ Dendrogram สามารถจำแนกออกได้เป็น 11 กลุ่มย่อย เมื่อทำการจัดกลุ่มแบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยกลุ่มที่มีรูปร่างของผลเป็นแบบ triangular มีจำนวนสมาชิกในกลุ่มมากกว่า และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีรูปร่างของผลเป็นแบบ non-triangular

Manganaris and Karayiannis (1999) ได้ตรวจสอบสายพันธุ์แอพริคอทจำนวน 17 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเจลแป้งและอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเจล วิเคราะห์เอนไซม์ 20 ระบบ โดยใช้ใบแก่ พบว่า มีเอนไซม์ที่เกิด polymorphic bands ทั้งหมด 15 ระบบ โดยมีการทำงานของยีน ซึ่งแสดงความแตกต่างของรูปแบบทั้งหมด 18 แถบ และพบว่า 13 สายพันธุ์ แสดงรูปแบบของไอโซไซม์ที่มีลักษณะเฉพาะในแต่ละสายพันธุ์ ยกเว้นพันธุ์ Bebecou และ Pella ซึ่งพบว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกัน เนื่องจากแสดงรูปแบบของเอนไซม์ที่เหมือนกัน จึงมีข้อสันนิษฐานว่าพันธุ์ Pella คือพันธุ์ที่กลายพันธุ์มาจากพันธุ์ Bebecou ส่วนพันธุ์ Koliopoulou มีต้นกำเนิดมาจากพันธุ์ Hasiotiko ซึ่งถือว่าเป็นพันธุ์เดียวกัน

ปนัดดา และเกศิณี (2541) ได้จำแนกลำไยจำนวน 16 พันธุ์ และพันธุ์ดอ 8 สายต้น โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส สกัดไอโซไซม์จากใบแก่ด้วยน้ำยาสกัด 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.4 ย้อมด้วยเอนไซม์ POX, ACP และ EST พบว่าลำไย 16 พันธุ์สามารถจำแนกออกจากกันได้ด้วยเอนไซม์ทั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3 ระบบ และเมื่อนำไปจำแนกลำไยพันธุ์ดอ 8 สายต้น พบว่าสามารถจำแนกออกจากกันได้ทั้งหมด ด้วยเอนไซม์ 2 ระบบ คือ POX และ ACP

Aradhya *et al.* (1995) ได้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) จำนวน 49 หมายเลข โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบเจลแป้ง โดยใช้สารสกัดจากชิ้นส่วนของใบ วิเคราะห์เอนไซม์ 8 ระบบ คือ IDH, MDH, POX, PGI, PGM, SKD, TPI และ UGPP เพื่อจัดกลุ่มลิ้นจี่โดยอาศัยการแสดงความแตกต่างของรูปแบบไอโซไซม์ และประเมินถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรม พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ 8 ระบบ มีตำแหน่งยีนควบคุม 12 loci แสดงให้เห็นว่ามีความแปรปรวนของยีนในระดับสูง การจัดกลุ่มด้วย cluster analysis จากทั้งหมด 49 หมายเลข สามารถจำแนกได้ 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย 40 หมายเลข ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมต่างกัน สามารถจำแนกได้ 3 กลุ่มย่อย ซึ่งแสดงค่าความถี่ของยีนในตำแหน่งยีนที่ต่างกันของแต่ละกลุ่มย่อย กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 6 หมายเลข และกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย 2 หมายเลข เมื่อทำการเปรียบเทียบลายพิมพ์ไอโซไซม์ พบว่า ลิ้นจี่บางหมายเลขมีชื่อพันธุ์ต่างกันแต่ให้รูปแบบไอโซไซม์เดียวกัน และชื่อพันธุ์เหมือนกัน แต่ให้รูปแบบไอโซไซม์ที่ต่างกัน

ชินวัฒน์ และเกศิณี (2542) ได้ศึกษาการจำแนกลิ้นจี่จำนวน 19 พันธุ์ พบว่า การจำแนกพันธุ์โดยวิธีสัณฐานวิทยา โดยการสังเกตและวัดค่าทางปริมาณและคุณภาพของโครงสร้างใบ ดอก ผล และเมล็ดของลิ้นจี่แต่ละพันธุ์ พบว่า สามารถจัดทำรูปวิธานเพื่อจำแนกพันธุ์ได้ เมื่อนำไปจำแนกพันธุ์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส สกัดไอโซไซม์จากใบแก่ด้วยน้ำยาสกัด 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.4 ย้อมด้วยเอนไซม์ POX และ ACP พบว่า เมื่อย้อมด้วยเอนไซม์ POX สามารถจำแนกลิ้นจี่ 19 พันธุ์ออกได้เป็น 14 กลุ่ม และเมื่อนำลิ้นจี่ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันไปจำแนกต่อด้วยเอนไซม์ ACP สามารถจำแนกพันธุ์ลิ้นจี่ออกจากกันได้ทั้งหมด

Rahman *et al.* (2001) ได้จำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์พืชสกุลส้ม (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) โดยใช้สารสกัดจากใบแก่ของพันธุ์ " Yuzu" และพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันรวมทั้งหมด 27 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส วิเคราะห์เอนไซม์ 2 ชนิด คือ GOT และ SKD พบว่า ส้ม 16 พันธุ์มีรูปแบบไอโซไซม์ที่เฉพาะตัว สามารถแยกออกจากพันธุ์อื่นๆ ได้ ที่เหลืออีก 11 พันธุ์จำแนกได้ 4 กลุ่มแต่ละกลุ่มประกอบด้วย 2-4 พันธุ์ ส่วนพันธุ์ที่มีจุดกำเนิดมาจากการกลายของพันธุ์เดิมไม่สามารถแยกออกมาได้ด้วยเทคนิคนี้

ปฐมา และธวัชชัย (2544) สกัดเอนไซม์จากใบแก่อายุ 7 เดือนของมะม่วงแก้วจำนวน 52 สายต้น จาก 8 จังหวัดภาคเหนือตอนบน ด้วยน้ำยาสกัด Tris-buffer 0.1 M, pH 8.2 โดยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส และวิเคราะห์เอนไซม์ 3 ระบบ คือ ACP, EST และ POX พบว่าสามารถจำแนกสายต้นมะม่วงแก้วออกเป็น 10, 4 และ 15 กลุ่มตามลำดับ เมื่อนำไอโซไซม์ทั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3 ระบบ มาวิเคราะห์ร่วมกันทำให้จำแนกมะม่วงแก้วทั้ง 52 สายต้นออกได้เป็น 20 สายต้น และอีก 9 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มที่ได้มีจำนวนตั้งแต่ 2-9 สายต้น

Lange and Schifino-Wittmann (2000) ศึกษาความแปรปรวนของรูปแบบไอโซไซม์ของพืชสกุล *Trifolium L.* (Leguminosae) จำนวน 36 หมายเลข จาก 8 ชนิดซึ่งรวบรวมมาจากทางตอนใต้ของบราซิล คือ *Trifolium incarnatum, T. polymorphum, T. pratens, T. repens, T. resupinatum, T. riograndense, T. subterraneum* และ *T. vesiculosum* โดยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส เพื่อวิเคราะห์ 4 ระบบ เอนไซม์ 4 ระบบ คือ MDH, PGI, EST และ SOD จากชิ้นส่วนใบอ่อน พบว่า ในแต่ละเอนไซม์ให้จำนวนแถบที่ต่างกันในแต่ละชนิด และรูปแบบไอโซไซม์ที่ได้ในแต่ละหมายเลขจะคล้ายกันเมื่อได้มาจากชนิดเดียวกัน นำผลมาจัดกลุ่มวิเคราะห์ด้วยวิธี UPGMA พบว่า ค่าความคล้ายคลึงกันระหว่างชนิดมีค่าต่ำ ($J \leq 0.351$) แสดงว่ามีความหลากหลายระหว่างชนิดสูง เมื่อนำมาเขียนภาพ Dendrogram สามารถจัดกลุ่มได้จำนวน 8 กลุ่มซึ่งตรงกับการจัดกลุ่มตามชนิดในเบื้องต้น และยังพบว่าต้นที่อยู่ในชนิดเดียวกันเกือบทุกหมายเลขมีค่าความคล้ายกันที่สูง ($J \geq 0.50$) ยกเว้น *T. riograndense, T. repens* และ *T. pratense* ซึ่งทั้ง 3 ชนิดนี้ต้นในแต่ละหมายเลขนั้นมีค่าความคล้ายคลึงกันที่ต่ำ แสดงให้เห็นว่ามีความหลากหลายภายในแต่ละชนิดที่ค่อนข้างสูง

Vyas *et al.* (2002) จำแนกพันธุ์ที่แตกต่างกันของวอลนัท (*Juglans* spp.) คือ *Juglans nigra* และพันธุ์ที่ได้มาจาก *J. regia* จำนวน 8 พันธุ์ ได้แก่พันธุ์ ACO 38853, Blackmore, Gobind, Hartley, KX Giant, Lake English, Payne และ Tutle โดยใช้ชิ้นส่วนของใบที่สมบูรณ์ กับเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส เพื่อศึกษารูปแบบไอโซไซม์จากเอนไซม์ 5 ระบบ คือ EST, ACP, MDH, POX และ polyphenoloxidase พบว่ามียีนควบคุม 24 อัลลีล อยู่บนตำแหน่งยีนควบคุม 31 loci ซึ่ง 8 loci แสดงลักษณะ polymorphic ทำให้ *J. nigra* มีการแสดงออกของ heterozygosity มากกว่า *J. regia* เมื่อนำค่าความคล้ายคลึงกันมาเขียนแผนภาพ Dendrogram แสดงให้เห็นว่า *J. regia* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก และยังพบว่าพันธุ์ Blackmore และพันธุ์ Payne แสดงความใกล้ชิดกันมากที่สุด ส่วนพันธุ์ Tutle และ Blackmore แสดงความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากที่สุด ในขณะที่ *J. nigra* แสดงลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ ผลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการกำหนดสายพันธุ์ที่ใช้ในการผสมพันธุ์ และยังใช้จำแนกสายพันธุ์ใหม่ รวมถึงแสดงให้เห็นความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม ซึ่งใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่ดีเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้สายพันธุ์ใหม่ๆ

Ashcroft and sheffield (1999) ศึกษา subspecies ใหม่ของเฟิร์นชื่อ *Pteridium aquilinum* subspecies *altanticum* ซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกในปี คศ. 1989 การจัดกลุ่มอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของใบ สภาพแวดล้อม และ ลักษณะของดินในการเจริญ ซึ่งผลที่ได้มีความไม่แน่นอน แต่การ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จัดกลุ่มโดยอาศัยการวิเคราะห์ไอโซไซม์ให้ผลที่ชัดเจนกว่า โดยใช้สารสกัดจากส่วนใบ ด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเจลแป้ง ศึกษาจากเอนไซม์ 15 ระบบ พบว่ามีตำแหน่งยีนควบคุม 24 loci โดยทุกเอนไซม์แสดงรูปแบบไอโซไซม์ในแต่ละระบบแบบเดียวกัน แสดงว่าเฟิร์น subspecies ใหม่นั้นเป็นเฟิร์นที่พบได้โดยทั่วๆไป (subspecies *aquilinum* var. *aquilinum*) ซึ่งปัจจุบัน subspecies *atlanticum* เปลี่ยนมาใช้ชื่อ subspecies *aquilinum* ส่วนการแสดงออกทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันนั้นอาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อม

Gonzalez-Andres *et al.* (1999) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไม้ป่าสกุลสนสามใบ จำนวน 7 ชนิด คือ *Pinus canariensis, P. halepensis, P. pinaster, P. pinea, P. nigra, P. uncinata* และ *P. sylvestris* จาก Iberian Penniasula และ Canary Islands ด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยใช้สารสกัดจากเมล็ด วิเคราะห์เอนไซม์ 4 ระบบคือ ACP, EST, GOT และ SOD เพื่อจำแนกประชากรที่แตกต่างกันของแต่ชนิด โดยวิเคราะห์จากรูปแบบของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ ACP, GOT และ SOD สามารถจำแนก *P. canariensis, P. pinaster* และ *P. pinea* ออกจากกลุ่มที่ประกอบด้วย *P. nigra, P. uncinata* และ *P. sylvestris* และเอนไซม์ EST สามารถจำแนกกลุ่มที่ประกอบด้วย *P. nigra, P. uncinata* และ *P. sylvestris* จากกันได้ เมื่อวิเคราะห์การจัดกลุ่มและนำมาเขียนแผนภาพ dendrogram พบว่า *P. nigra, P. uncinata,* และ *P. sylvestris* มีความสัมพันธ์ ที่ใกล้ชิดกัน และพบว่า *P. pinaster* และ *P. halepensis* มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมที่ต่ำทำให้แยกออกเป็นกลุ่มเดี่ยวๆ การศึกษาในครั้งนี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์และจำแนกประชากรของไม้ป่าที่มีความแตกต่างกันทางสัณฐานวิทยา อันเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน หรือระยะเวลาในการเจริญเติบโตที่ต่างกัน เพื่อเป็นข้อมูลในการอนุรักษ์สายพันธุ์ไม้ป่า

Toumi and Lumaret (2001) ศึกษาคุณลักษณะของอัลโลไซม์ที่ตรวจสอบในต้นโอ๊ค (*Quercus*) ที่มาจากแถบเมดิเตอร์เรเนียน จำนวน 4 ชนิด คือ *Quercus ilex, Q. coccifera, Q. alnifolia* และ *Q. suber* และมาจากทิเบต จำนวน 2 ชนิด คือ *Q. semicarpifolia* และ *Q. aquifolioides* รวมทั้งหมด 6 ชนิด โดยใช้เทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส กับชิ้นส่วนใบ ด้วยเอนไซม์ 7 ระบบ เพื่อเปรียบเทียบความแปรปรวนของยีนในแต่ละชนิด พบว่า มีการแสดงความหลากหลายของรูปแบบไอโซไซม์ที่เกิดจากตำแหน่งยีนควบคุม 11 loci นำข้อมูลที่ได้มาจัดกลุ่มโดยใช้ค่า % ความแตกต่างที่ระดับ 73 % สามารถจัดกลุ่มให้สายพันธุ์ที่มาจากแถบเมดิเตอร์เรเนียนจำนวน 3 ชนิด คือ *Q. ilex ,Q. coccifera, Q. alnifolia* อยู่ในกลุ่มเดียวกับสายพันธุ์ที่มาจากทิเบต 1 ชนิด คือ *Q. aquifolioides* และพบว่าที่ระดับความแตกต่างต่ำกว่า 50 % *Q. coccifera* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดที่สุดกับ *Q. ilex* ส่วนอีก 2 ชนิด คือ *Q. semicarpifolia* และ *Q.suber* แสดงลักษณะทางพันธุกรรมที่เฉพาะกว่า 4 ชนิด จึงแยกออกเป็นแต่ละชนิดได้อย่างเด่นชัด ในการจัดกลุ่มที่ผ่านมาในอดีตของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Schwartz (1936) พบว่าผลที่ได้ไม่แน่นอนเนื่องจากอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว ดังนั้นความแปรปรวนทางอัลโลไซม์จึงมีประโยชน์ในการจัดกลุ่มของต้นโอ๊คได้อย่างถูกต้อง

Kim and Byrne (1996) ตรวจสอบต้นกำเนิดของลูกผสมกุหลาบจำนวน 23 ต้น ประกอบด้วยต้นที่ได้จากการผสมข้ามชนิด 15 ต้น ต้นที่สงสัยว่าเป็นต้นที่ได้จากการผสมข้ามชนิดจำนวน 3 ต้น และต้นที่มีการระบุชื่อที่แน่ชัดซึ่งสงสัยว่าเป็นสายพันธุ์ของพ่อแม่จำนวน 5 ต้น ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยใช้สารสกัดจากชิ้นส่วนใบ เพื่อตรวจสอบ 3 ระบบเอนไซม์ ได้แก่ ACP, MDH และ PGI พบว่า ทุกเอนไซม์ให้ผลในการพิสูจน์ความเป็นลูกผสม ซึ่งวิธีการนี้จะมีประสิทธิภาพถ้ามีข้อมูลทางพันธุกรรมของพ่อแม่ และมีการแสดงถึงรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกัน

Sharma and Jones (1999) ตรวจสอบลูกผสมของกล้วยไม้ที่ได้จากการผสมข้ามชนิดของ *Pterostylis alveata* และ *P. ophioglossa* ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเจลแป้ง เพื่อศึกษา 4 ระบบเอนไซม์คือ GPI, uridine diphosphogluconic pyrophosphatase (UDP), ME และ LAP พบว่ารูปแบบเอนไซม์ที่ได้เป็นรูปแบบของลูกผสม (heterozygote) ซึ่งเป็นการพิสูจน์ว่ามีอัลลีลที่ได้จากทั้งพ่อและแม่ และสามารถจำแนกยีนที่เป็นลูกผสมออกจากยีนของพ่อแม่ได้

Sharma *et al.* (2001) ศึกษาความหลากหลายของรูปแบบอัลโลไซม์และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงวิวัฒนาการของพืชวงศ์ Orchidaceae; series *Grandiflorae* จากกล้วยไม้สกุล *Pterostylis* จำนวน 6 ชนิดได้แก่ *Pterostylis rogersii, P.aspera, P.angusta, P.hamiltonii, P.scabra* และ *P.* aff. *alata* จำนวน 35 ประชากร ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเจลแป้ง เมื่อใช้สารสกัดจากชิ้นส่วนใบ เพื่อวิเคราะห์จากเอนไซม์ 12 ระบบ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของการผสมพันธุ์ภายในชนิด และการผสมพันธุ์ระหว่างชนิด พร้อมกับวิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์ของชนิด พบว่า เอนไซม์ทั้ง 12 มีตำแหน่งยีนควบคุม 15 loci เมื่อเขียนแผนภาพ dendrogram แสดงให้เห็นว่าประชากรแต่ละชนิดสามารถจำแนกออกจากกันได้ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของแต่ละชนิดพบว่า ทุกชนิดมีค่าความคล้ายคลึงกันสูง ยกเว้น *P.* aff. *alata* ซึ่งมีลักษณะเฉพาะและสามารถจำแนกออกจากกลุ่มอื่นได้

Hancock and Iezzoni (1988) ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของพืชสกุล *Prunus* จำนวน 7 ชนิด โดยการผสมระหว่างชนิด (interspecific) ระหว่างเชอร์รี่ 3 ชนิด คือ *Prunus cerasus, P. avium* และ *P. fruticosa* และจากรุ่นลูกที่ได้จากการผสมข้ามชนิดระหว่าง *P.mahaleb, P.incisa, P.caneseens* และ *P.subhirtella* ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเจลแป้ง โดยศึกษาลักษณะการเกิดรูปแบบไอโซไซม์ MDH จากสารสกัดของใบ พบว่า มีการแสดงออกของยีนร่วมกันระหว่าง *P. avium* และ *P. fruticosa* ซึ่งสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่า *P. cerasus* เป็นผลมาจากการผสมข้ามของทั้ง 2 ชนิด ส่วนลูกผสมที่ได้จากการผสมข้าม 4 ชนิด แสดงรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Jintanawongse and Changtragoon (2000) ได้จำแนกมะม่วง 4 พันธุ์ ได้แก่ เขียวเสวย น้ำดอกไม้ หนังกลางวัน และ แรด และยังระบุลูกผสมที่ได้จากการผสมข้ามพันธุ์จำนวน 20 คู่ผสม จากมะม่วง 4 พันธุ์ดังกล่าว ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเจลแป้ง โดยใช้สารสกัดจากใบอ่อน ศึกษารูปแบบไอโซไซม์จาก 11 ระบบ พบว่ามีเอนไซม์ 2 ชนิด คือ DIA และ IDH สามารถจำแนกมะม่วงทั้ง 4 สายพันธุ์ ออกจากกัน และสามารถระบุลูกผสมที่ได้ว่ามาจากการผสมข้ามหรือเป็นต้นที่มีต้นกำเนิดมาจากต้นแม่ (nucellus seedling)

Elisiario *et al.* (1999) ศึกษาต้นกำเนิดของส้มแมนดารินพันธุ์ Carvalhais ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเจลแป้ง โดยใช้สารสกัดจากใบที่ได้จากต้นโตเต็มที่ จากต้นกล้าที่ปลูกในถุงพลาสติก จากต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากเมล็ด และจากต้นที่เป็นลูกผสมของพันธุ์ Carvalhais วิเคราะห์เอนไซม์ 6 ระบบได้แก่ MDH, IDH, GOT, PGM, PGI และ LAP พบว่าแต่ละเอนไซม์ให้รูปแบบไอโซไซม์ที่ไม่ต่างกัน จึงสามารถระบุได้ว่าพันธุ์ Carvalhais มีจุดกำเนิดมาจากสายต้นเดียว (single clone) และยังพบว่าพันธุ์นี้มีจุดกำเนิดมาจากการสืบพันธุ์ชนิดที่ไม่มีการผสมของเซลล์สืบพันธุ์ (apomixis)

ปราโมทย์ (2544) จำแนกสายพันธุ์สตรอเบอรี่ลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ และศึกษาความสัมพันธ์ของพันธุ์ แม่ พ่อ และลูกผสมชั่วที่ 1 โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและศึกษารูปแบบเอนไซม์ด้วย โพลีอคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยใช้สารสกัดจากใบที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ วิเคราะห์เอนไซม์ 3 ระบบ ได้แก่ LAP, EST และ SKD พบว่าการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการสังเกต และวัดค่าทางปริมาณรวมทั้งคุณภาพของโครงสร้างใบ ดอก และผล ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ชัดเจน เมื่อใช้รูปแบบไอโซไซม์พบว่า สามารถจำแนกลูกผสมบางหมายเลขออกจากพันธุ์แม่หรือพันธุ์พ่อ หรือระหว่างลูกผสมด้วยกันเองออกจากกันได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved