บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กวาว (*Pueraria*) เป็นพันธุ์ไม้ที่ขึ้นตามป่าเบญจพรรณของประเทศไทย พบมากในป่าแถบภาคเหนือ ส่วนใหญ่เป็นไม้เถาเลื้อย (vine) มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่เป็นไม้พุ่ม (shrub) อยู่ใน Family Papilionaceae เป็นพืชตระกูลถั่ว มีทั้งชนิดที่รากสะสมอาหาร (tuberous root) และชนิดที่รากไม่สะสมอาหาร ส่วนใบประกอบด้วยใบย่อย 3 ใบ (trifoliate) บางชนิดอาจมีหูใบ (stipules) ที่ฐานของใบ การจัดเรียงตัวของใบที่ติดอยู่กับลำต้นจะอยู่เยื้องกันในแต่ละข้อ ทำให้การเรียงตัวบิดเป็นเกลียว รูปร่างของใบมีหลายแบบเช่น cordate, ovate, hastate,deltoid ขึ้นอยู่กับชนิดของกวาว มีขนปกคลุมแผ่นใบ ช่อดอกเป็นลักษณะที่สำคัญซึ่งใช้ในการจัดจำแนกกวาว ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นช่อดอกโปร่งมี 2 - 7 ดอกต่อข้อ มีก้านดอกสั้นหรือเกือบไม่มี สีดอกมีตั้งแต่น้ำเงินอ่อนจนถึงสีม่วง ในบางชนิดอาจมีรอยแต้มสีเขียวหรือเหลืองประปราย (Van der Mac san ,1985) การบานของดอกจะเริ่มบานจากส่วนโคนของช่อดอกไปหาปลายช่อดอก ดอกร่วงง่าย ฝักมีลักษณะเรียว ยาว แบน ปลายฝักอาจมนหรือแหลมขึ้นอยู่กับชนิด มีขนปกคลุมบริเวณฝัก ฝักอ่อนมีสีเขียว ฝักแก่มีสีน้ำตาล ภายในมี 1-20 เมล็ดต่อฝัก เมล็ดมีลักษณะมนไม่กลม การงอกของเมล็ดเป็นแบบ hypogeal โดย cotyledon กับ hypocotyl อยู่ใต้ดิน กวาวจะขึ้นได้ดีในดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูง มี pH ประมาณ 5.5

การจำแนกชนิดของกวาวในปัจจุบันจะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ในการจัดจำแนกจากการสำรวจพบว่ากวาวชนิดเดียวกัน อาจมีหลายชื่อแตกต่างกันตามท้องถิ่น ดังนั้นการนำเอาเทคนิคทางอณูชีววิทยามาช่วยในการจัดจำแนกจึงมีความสำคัญทำให้การเลือกชนิดของกวาวเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านสมุนไพรและด้านการเกษตรได้ผลที่ดียิ่งขึ้น ปัจจุบันนี้การศึกษาทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลต่างๆสามารถนำมาใช้ประโยชน์กับงานด้านการ

จำแนกพันธุ์พืชมากขึ้นซึ่งองค์ประกอบทางเคมีภายในต้นพืชเป็นสิ่งที่แสดงวิวัฒนาการของพืชได้ดีที่สุด(Abbott,1886) พืชต่างพันธุ์ที่พบในสภาพธรรมชาติอาจมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ที่เหมือนกันได้แต่ในทางชีวเคมีและชีวโมเลกุลพืชจะมีความแตกต่างกัน การประเมินความแตกต่างของพันธุ์พืชจึงต้องหาความแตกต่างทางชีวเคมีและชีวโมเลกุล (Larsen,1969) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของพืชที่ปรากฏนั้นเป็นผลเนื่องมาจากพันธุกรรมของพืช แต่พืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) แตกต่างกันอาจแสดงลักษณะทางสัณฐานเหมือนกันได้ (Gottlieb,1977) การศึกษาในระดับโมเลกุลของโปรตีนหรือเอนไซม์เป็นวิธีการหนึ่งที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างต้นพืชได้ว่าเหมือนหรือแตกต่างกัน เนื่องจากข้อมูลทางพันธุกรรมที่ถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่ลูกจะถูกแปลงเป็นโมเลกุลโปรตีนหรือเอนไซม์โดยตรงก่อนที่จะสร้างโมเลกุลอื่นๆเอนไซม์และโปรตีนจึงเป็นสารเริ่มแรก ที่ถูกถ่ายทอดโดยตรงจากยีน (gene) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรม เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงใดๆเกิดขึ้นที่ลำดับเบสของยีนก็จะมีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนแปลงซึ่งจะทำให้เกิดการความแตกต่างของระยะทางในการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าเมื่อเทียบกับโปรตีนเดิม (สุคันธรสและคณะ,2535) ดังนั้นลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ของพืชจึงใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ได้ซึ่งปัจจุบันการใช้เทคนิคที่เรียกว่า Polyacrylamide gel electrophoresis ในการตรวจสอบไอโซไซม์เป็นที่ยอมรับในสถานีทดสอบเมล็ดพันธุ์ในแถบประเทศยุโรปว่าสามารถใช้ยืนยันความแตกต่างของพันธุ์พืชใหม่กับพันธุ์เดิมที่มีอยู่ก่อนประกาศเป็นพันธุ์ใหม่ (Bailey,1983 and Cooper,1987) อย่างไรก็ตามการตรวจสอบในระดับเอนไซม์อาจจะมีอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องจึงมีการเปลี่ยนแนวไปสนใจในระดับ ดี เอ็น เอ (DNA) ซึ่งให้ผลที่แม่นยำกว่าโดยเฉพาะ เทคนิค Restriction Fragment Length Polymophism (RFLPs) ซึ่งวิธีการ RFLPs เป็นวิธีการที่ได้ผลดีในการแยกความแตกต่างของพืชแต่ในการปฏิบัติยุ่งยากซับซ้อนเพราะต้องผ่านขบวนการSouthern Blot (ภาณี, 2536) และต้องเกี่ยวข้องกับการใช้สารกัมตรังสี (วัชรีและมนตรี, 2536) ดังนั้นเพื่อเป็นการ

ลดขั้นตอน ประหยัดเวลา และค่าใช้จ่าย ได้มีการประยุกต์นำเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการเพิ่มปริมาณ DNA ไปปรับใช้เป็นเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (Williams *et. al.* ,1990 and Tingey *et al* ,1993)

เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ในการตรวจแยกสายพันธุ์พืช

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยา PCR โดยอาศัยการจับของ primer แบบสุ่ม (random primers)ในการเพิ่มขยาย ดี เอ็น เอ ให้มีปริมาณมาก RAPD ใช้หลักการที่ว่าใน ดี เอ็น เอ ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแต่ละพันธุ์นั้นจะมีความแตกต่างกันในการเรียงลำดับของเบส (base) (ได้แก่ Adenosine .(A),Thymine (T), Guanine (G), และCytosine (C)) จึงทำการสุ่มเอาตัวแทนบริเวณใดบริเวณหนึ่งบนสาย ดี เอ็น เอ มาเพิ่มปริมาณเช่นเดียวกับขบวนการ DNA replication ภายในเซลล์ จากนั้นนำ ดี เอ็น เอ ที่เพิ่มปริมาณแล้วมาทำอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) และนำเจลมาตรวจความแตกต่างแบบแผนของลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint) ภายใต้แสง UV ดังนั้นสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสแตกต่างกันย่อมจะมีแบบแผนของลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint) แตกต่างกันไปด้วย และสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันควรจะมีแบบแผนลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint) คล้ายคลึงกันซึ่งเทคนิค RAPDนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในบางขั้นตอนของการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์พืชและสามารถทำได้สำเร็จในพืชหลายชนิด(Castiglione *et. al.*,1993, Rafalki *et. al.*,1991 and Wilkie *et al.*,1993) ในการตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์พืชนั้นในปี ค.ศ.1991 Weish และคณะได้ใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบความแตกต่างของลูกผสมในข้าวโพด นอกจากนี้ยังได้มีการนำไปใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างของสายพันธุ์พืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกัพภะ (embryo culture)

เช่น Rapes โดยทดสอบในระยะ immature embryo ก่อนที่จะคัดเลือกให้เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ซึ่งสามารถใช้ ดี เอ็น เอ ในปริมาณต่ำได้

ส่วนสำคัญของเทคนิค RAPD ประกอบด้วย

1. ดี เอ็น เอ ต้นแบบ หรือ แม่พิมพ์ (template DNA) ได้แก่ ดี เอ็น เอ ของพืชโดยจะใช้ในปริมาณที่ต่ำมาก ประมาณ 10 - 25 ng

2. Primer เป็น ดี เอ็น เอ สายสั้นๆที่นำมาจับคู่แบบสุ่มกับ ดี เอ็น เอ ต้นแบบ (DNA template)ในกรณี RAPD จะใช้เพียงสายเดียวต่อปฏิกิริยา

Primer คือ oligonucleotide สายสั้นๆสายเดี่ยวที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น ประกอบด้วย เบส (base)จำนวนน้อย ในกรณีของ RAPD จะมีเพียง 10 ตัว (10 mers) เพื่อจะใช้เป็นตัวสุ่มจับกับ ดี เอ็น เอ ต้นแบบ (DNA template) ของพืช ดังนั้น Primer จึงถูกออกแบบให้มีความหลากหลายชนิดตามการเรียงตัวของลำดับเบส(base)ตามความเข้มข้นของเปอร์เซนต์ Guanine รวมกับ Cytosine

3. เอนไซม์ Taq polymerase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยให้มีการต่อเชื่อม Primer ด้วย dNTP ให้เกิดสาย ดี เอ็น เอ ตลอดแนว ดี เอ็น เอ ต้นแบบ (DNA template) เริ่มทำงานในช่วง Extension

4. นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) 4 ชนิดคือ dATP,dCTP,dGTP และ dTTP หรือเรียกโดยรวมว่า dNTP คือหน่วยย่อยของกรดนิวคลีอิกเพื่อเติมให้ได้เป็น ดี เอ็น เอ สายใหม่

5.ส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ $MgCl_2$ และบัฟเฟอร์

6. จำนวนรอบปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ในเทคนิค RAPD ประมาณ 35 - 40 รอบ

ปฏิกิริยา PCR

PCR (polymerase Chain Reaction) เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณของ ดี เอ็น เอ ในส่วนเฉพาะเจาะจงบนเส้นโครโมโซม การเพิ่มปริมาณนี้ต้องการ ดี เอ็น เอ ต้นแบบ (DNA template) จำนวนเล็กน้อย องค์ประกอบการสร้าง ดี เอ็น เอ ได้แก่ นิวคลีโอไทด์

(nucleotide) dATP , dCTP , dGTP และ dTTP การเพิ่มปริมาณของ ดี เอ็น เอ ทำเป็นรอบๆโดยแต่ละรอบมี 3 ขั้นตอนคือ

1.Denaturation: เป็นการคลายเกลียวคู่ของ ดี เอ็น เอ ต้นแบบ (DNA template)ให้เป็น ดี เอ็น เอ สายเดี่ยว ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นที่ อุณหภูมิ 90 ^{0}C - 95 ^{0}C ภายในเวลา 1 นาที

2.Annealing: เป็นการจับระหว่างสายของ Primer กับ ดี เอ็น เอ ต้นแบบ (DNA template) ด้วยการจับคู่แบบสุ่มตามลำดับการเรียงตัวของเบส 10 คู่ (A จับคู่กับ T และ G จับคู่กับ C) ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 36 - 60^{0}C ภายในเวลา 1 - 2 นาที

3.Extension และ Synthesis: เป็นการสังเคราะห์ ดี เอ็น เอ ให้สมบูรณ์ตลอดสายต่อเนื่องจากจุดที่ Primer เข้าจับ ดี เอ็น เอ ต้นแบบ (DNA template) ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 72^{0}C ภายในเวลา 1- 2 นาที ในกรณีที่ต้องการ ดี เอ็น เอ สายยาวอาจจะใช้เวลานานถึง 5 นาที

ในช่วง Extension นั้นเอนไซม์ Taq Polymerase จะเป็นตัวจักรสำคัญให้เกิดการต่อเนื่องของ ดี เอ็น เอ ด้วย dNTP ที่เติมเข้าไปโดยมี Mg เป็น cofactor ปฏิกิริยา PCR จะเรียงลำดับจาก Denaturation สู่ Annealing และ Extension แล้ววนกลับไปที่ Denaturation หมุนเวียนเช่นนี้จนครบจำนวนรอบที่ต้องการ

การตรวจสอบผล DNA ด้วย เจล อิเลคโตรโฟรีซีส (Gel Electrophoresis)

จาก ดี เอ็น เอ ที่มีปริมาณความเข้มข้นเพียง 10 - 25 ng หลังเพิ่มปริมาณโดยผ่านขบวนการ PCR แล้วสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีส(electrophoresis) โดยทั่วไปจะทำการตรวจสอบโดยใช้ Agarose gel electrophoresis แล้วทำการย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปตรวจสอบภายใต้แสง UV

ปัจจุบันนี้ได้มีการเทคนิค RAPD นำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดพืช ซึ่งเป็นผลที่เกิดจาก primer ที่ใช้เข้าคู่กับ ดี เอ็น เอ ต้นแบบ (DNA template)

ของพืชนั้นจะให้แบบแผนลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint) ที่เฉพาะในแต่ละพืช ซึ่งจะขึ้นอยู่กับชนิดของ primer ที่ใช้ และจะมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดในระหว่างชนิดพืช (ระหว่าง species) ซึ่งจากการจำแนกสายพันธุ์ของ *Allium* ที่เป็นพันธุ์ cultivars จำนวน 7 สายพันธุ์ โดยใช้ primer 20 ชนิด พบว่ามี primer 7 ชนิดที่สามารถจำแนกพันธุ์ของ *Allium* ได้ (Wilkie *et. al.*,1993) แต่ในพืชบางชนิดพบว่า การใช้ primer เพียง 2-3 ชนิด สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดพืชได้ เช่น การจำแนกบรอคโคลี่ 14 พันธุ์ และกะหล่ำดอก 12 พันธุ์ โดยเทคนิค RAPD ใช้ primer เพียง 4 ชนิด (ขนาดของ amplified DNA ในช่วง300-2500 base pair) ก็สามารถจำแนกพืชทั้ง 2 ชนิดได้อย่างชัดเจน และพบว่าต้นกล้าที่ได้จากบริษัทผลิตเมล็ดพันธุ์เดียวกันมีความแตกต่างแบบแผนของลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint) น้อยกว่าต้นกล้าที่ได้จากบริษัทเมล็ดพันธุ์ต่างบริษัทกัน (Hu and Quiros,1991)

การใช้เทคนิค RAPD เพื่อศึกษาความสัมพันธ์เมื่อทำการผสมพันธุ์ข้ามระหว่างชนิดพืช โดยทำการผสมข้ามระหว่างผักกวางตุ้งดอกกับผักกาดเขียวปลีพบว่าลูกผสมที่ได้จะแสดงแบบแผนลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint) ให้เห็นความเกี่ยวเนื่องกับพ่อแม่ โดยมีบางส่วนได้รับการสืบทอดจากแม่และบางส่วนได้รับจากพ่อซึ่งในการศึกษาความแตกต่างระหว่างพันธุ์พืช เมื่อนำผักกาดขาวปลีพันธุ์ต่างๆมาเปรียบเทียบกันพบว่า มีความเฉพาะของแบบแผนลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint) ในแต่ละชนิด ของprimer ที่ใช้ อย่างไรก็ตามจะพบความแตกต่างในบางแถบ (band) ซึ่งลักษณะดังกล่าวยืนยันได้โดยทำการทดลองหลายๆ ซ้ำ และพบว่ามี primer มากกว่า 1 ชนิด ที่บอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พืชได้ (ภาณีและคณะ, 2536) นอกจากนี้ได้มีการใช้เทคนิค RAPD จำแนกข้าวสาลี (*Triticum aestivum* L.) จำนวน 15 vareities โดยใช้ primer 40 ชนิด พบว่า 80 % ของ primers สามารถจำแนก varieties ของข้าวสาลีได้และนำผลที่ได้มาเขียนเป็น dendrogram เพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม(genotype)ของพืช ซึ่งนำไปใช้ประโยชน์ในการหาพันธุ์พ่อ-แม่เพื่อนำไปใช้ในการ

ปรับปรุงพันธุ์ต่อไป (Joshi and Nguyen, 1993) สำหรับการศึกษาความแตกต่างของสายพันธุ์ลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อ-แม่ในผักกาดขาวปลีโดยใช้ primer 60 ชนิด พบว่า มี primer 4 ชนิด ที่แสดงความแตกต่างของลูกผสมชั่วที่ 1 จากสายพันธุ์พ่อ-แม่ และแสดงความเกี่ยวเนื่องอย่างเด่นชัด ผลที่ได้ดังกล่าวแสดงออกในทุกๆครั้งของซ้ำการทดลอง เนื่องจากพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ที่ใช้มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก ดังนั้นจึงพบความแตกต่างระหว่างพันธุ์ใน primer เพียง 4 ชนิดเท่านั้น (ภาณี และคณะ,2536)

ในการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของพืชโดยใช้เทคนิค RAPD พบว่า *Brassica napus* L. กลุ่มที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์รุ่นเดียวกันจะแสดงลักษณะทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน และจะแตกต่างจากกลุ่มที่ปรับปรุงพันธุ์ต่างรุ่นกัน (Mailer *et. al* ,1994) และการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของ *Populus tremuloides* และ *Populus grandidentata* พบว่า *P. tremuloides* มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายใน species มากกว่า *P. grandidentata* (Lui and Furnier,1993) จะเห็นได้ว่าเทคนิค RAPD สามารถนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์พืชได้ดีแม้ว่าจะมีปัญหาเกี่ยวกับความ consitancy ของการทำปฏิกิริยา แต่การทดลองส่วนใหญ่ที่กล่าวมาข้างต้นก็ยืนยันได้ว่าแบบแผนลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint) ที่ได้จากเทคนิค RAPD มีความเฉพาะตัวในพืชแต่ละชนิด

การใช้ไอโซไซม์ในการตรวจแยกสายพันธุ์พืช

ไอโซไซม์หรือไอโซเอนไซม์ (Isoenzyme) หมายถึงเอนไซม์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลต่างกันแต่เร่งปฏิกิริยาเดียวกันในสิ่งมีชีวิตเดียวกัน(อาภัสรา ก,2537) ซึ่งรูปแบบของเอนไซม์มีความจำเพาะกับเนื้อเยื่อ ระยะเจริญเติบโต และชนิดของสิ่งมีชีวิต (Markert and Moller, 1959)การศึกษาไอโซไซม์เพื่อการจำแนกพันธุ์พืชโดยใช้เทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) แบบ non-denaturating polyacrylamide gel electrophoresis อาศัยหลักการที่สำคัญคือ ไอโซไซม์เป็นสายโพลีเปปไทด์(polypeptides) ซึ่งประกอบด้วยลำดับของกรดอะมิโน (amino acid) เรียงกันอยู่ ลำดับของกรดอะมิโนนี้จะแปลมาจากรหัสพันธุกรรม (gene)

บนสายนิวคลีโอไทด์สายยาว (polynuecleotides) ไอโซไซม์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนต่างกันจะมีประจุขนาดและรูปร่างของโมเลกุลแตกต่างกันด้วย เมื่อนำมาแยกบนตัวกลางที่เหมาะสมด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) โมเลกุลของเอนไซม์จะเคลื่อนที่ในอัตราที่ต่างกัน หลังจากทำการย้อมสีด้วยปฏิกิริยาจำเพาะสำหรับไอโซไซม์แต่ละชนิด ก็จะเห็นแถบ สีของเอนไซม์รูปแบบต่างๆ (อาภัสรา ข,2537 และ Bailey,1983) แถบสีที่ปรากฏนี้เรียกว่า รูปแบบของไอโซไซม์ (isozyme patterns) ซึ่งไอโซไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าไอโซไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก (Doehlert and Duke ,1983) การเคลื่อนที่ของไอโซไซม์ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันนั้นเป็นผลโดยตรงจากลักษณะพันธุกรรมที่แตกต่างกัน (Crawford,1983) ไอโซไซม์ที่ใช้ในการตรวจแยกสายพันธุ์พืช เช่น เอสเทอเรส (Esterase) , เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase) , แอซิด ฟอสฟาเทส (Acid phosphatase) , อัลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase) และกลูตาเมต ออกซาโลอะซีเตต ทรานสมิเนส (Glutamate oxaloaceate transminase) นอกจากนั้นยังได้เริ่มศึกษาเอนไซม์ชนิดอื่นที่ยังไม่มีการนำมาใช้เป็น genetic markers ในการตรวจสอบสายพันธุ์พืชมาก่อน และพบว่าเอนไซม์เฟอร์รีดอกซิน เอ็น เอ ดี พี รีดักเทส (Ferredoxin NADP reductase) สามารถใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์พืชได้ (สุคันธรส และคณะ,2535)

การศึกษาไอโซไซม์เป็นประโยชน์กับงานด้านการจำแนกพันธุ์พืชหลายชนิดที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) คล้ายคลึงหรือใกล้เคียงกัน โดยการนำรูปแบบของไอโซไซม์มาช่วยในการพิจารณาความแตกต่างระหว่างพันธุ์ได้ชัดเจนมากขึ้น จากการศึกษาใน Ioquat (*Eriobotrya japonica* (Thumb.) Lindl) พันธุ์ Akko 1, Akko 13 และ Zikim ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) คล้ายคลึงกันมากมักมีการจำแนกผิดอยู่เสมอพบว่าสามารถใช้รูปแบบของไอโซไซม์ชิคิเมทดีไฮโดรจีเนส (Shikimate dehydrogenase), เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase),และฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส (Phosphoglucoisomerase)ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์พืชทั้งสามได้ (Degani and Blumenfeld, 1986) นอก

จากนี้ยังพบว่ารูปแบบของไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดส(Peroxidase)และ เอสเทอเรส (Esterase) เพียง 2 ชนิดสามารถ จำแนกความแตกต่างของถั่วปากอ้า (*Vicia faba* L.) จำนวน 21 พันธุ์ ได้เกือบทั้งหมด มีเพียง 4 พันธุ์ เท่านั้นที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ (Bassiri and Rouhani, 1976) ขณะที่การจำแนกหญ้าอัลฟัลฟ่า (*Medicago sativa* L.) จำนวน 21 พันธุ์ได้อย่างชัดเจน จากการใช้รูปแบบของไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase), เอสเทอเรส (Esterase) และแอซิดฟอสฟาเทส (Acid phosphatase) ที่สกัดเอนไซม์จากส่วนของใบ (Quiros,1980) และยังพบว่ารูปแบบของไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดส(Peroxidase)เพียงชนิดเดียวสามารถใช้จำแนกอ้อยที่ปลูกเป็นการค้าจำนวน 59 พันธุ์ได้(Ruiz and Maribona,1983)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาไอโซไซม์เพื่อแสดงความแตกต่างระหว่างพืชในระดับสกุล (genus) , ชนิด (species) และโคลน (clone) โดยได้มีการตรวจสอบรูปแบบของไอโซไซม์เพอร์ออกซิเดส(Peroxidase)และเอสเทอร์เรส (Esterase)ของไผ่ 3 สกุล คือ *Arthrostylidium naibunensis,Chimonobambusa quadrangularis* และ *Dendrocalamus asper* พบว่าไผ่ทั้งสามสกุลมีรูปแบบของไอโซไซม์ ที่ต่างกัน (Chou and Hwang,1985) และการศึกษาความแตกต่างของพืชในระดับโคลน(clone) ใน apricot จำนวน 69 โคลน โดยใช้ไอโซไซม์ฟอสโฟกลูโคดีไฮโดรจีเนส (6-phosphoglucodehydrogenase),ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอเรส (Phosphoglucoisomerase) และฟอสโฟกลูโคมิวเทส (Phosphoglucomutase) พบว่ามีเพียง 7 โคลน ที่สามารถจำแนกความแตกต่างได้ชัดเจน (Byrne and Littleton, 1989)

การศึกษาไอโซไซม์ในพืชนั้นพบว่านอกจากจะมีชนิดและปริมาณของไอโซไซม์ที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของพืชแล้วยังมีความสัมพันธ์กับเนื้อเยื่อพืชที่นำมาสกัดเอนไซม์ด้วย ซึ่งจากการสกัดเอนไซม์จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของมันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) พบว่าเอนไซม์ที่สกัดจากส่วนตา (bud) แถบสีที่ปรากฏจะจาง ขณะที่เอนไซม์ที่สกัดจากส่วนยอดแถบสีมีความเข้มชัดแสดงว่าปริมาณของเอนไซม์มีความเกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อพืช (Ramirez*et. al*,1987) และจากการศึกษาในแอปเปิ้ล (*Malus domestica* Borkh) จำนวน

54 พันธุ์ โดยสกัดเอนไซม์จากส่วนของ กลีบดอก,ผล,ใบแก่ และใบอ่อน พบว่าจากไอโซไซม์ที่ทำการศึกษา 6 ชนิด มีรูปแบบของไอโซไซม์เหมือนกันแม้สกัดจากเนื้อเยื่อที่ต่างกัน แต่เอนไซม์ที่สกัดจากใบอ่อนเห็นแถบสีชัดเจนที่สุด แสดงให้เห็นว่าปริมาณของเอนไซม์ มีความเกี่ยวข้องกับ ชนิดของเนื้อเยื่อเช่นกัน (Weeden and Lamb , 1985) นอกจากนี้ยังมีการทดลองจำแนกพันธุ์ท้อ โดยใช้ไอโซไซม์ 10 ชนิด สามารถจำแนกได้สมบูรณ์ที่สุดในระยะต้นกล้าที่มีอายุ 1 เดือน ซึ่งรูปแบบของไอโซไซม์จะแสดงความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตด้วย (Mowrey and Werner,1990)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University