บทที่2

การตรวจเอกสาร

ลำไย (longan, lungan; *Euphoria longana* Lam.; *Euphoria longan* Steud.; *Nephelium longana* Cambress.; *Dimocarpus longan* Lour.) จัดอยู่ในตระกูล Sapindaceae เป็นไม้ผลยืนต้นขนาดกลางถึงขนาดใหญ่ ไม่ผลัดใบ ความสูง 10-12 เมตร มีถิ่นกำเนิดในบริเวณที่ราบต่ำของประเทศอินเดีย ศรีลังกา พม่า และจีนตอนใต้ แพร่กระจายในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนของโลก (เกศิณี,2546) ในส่วนของประเทศไทยนั้นมีแหล่งปลูกที่สำคัญอยู่ทางภาคเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ ลำพูน เชียงราย ลำปาง แพร่ น่าน และพะเยา นอกจากนี้ยังมีการปลูกในภาคตะวันออก เช่น อำเภอสอยดาว และอำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี ภาคกลางเช่น จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงคราม รวมถึงภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดเลย หนองคาย นครพนม และภาคใต้ เช่น จังหวัดพัทลุง สงขลา และนครศรีธรรมราชเป็นต้น (พาวิน,2543) การบริโภคลำไยนั้น ส่วนใหญ่นิยมบริโภคผลสด เนื่องจากมีรสชาติหวาน โดยมีปริมาณน้ำตาลเฉลี่ยสูงถึง 14-25% (พิชัย,2529) เนื้อมีกลิ่นหอม และมีคุณค่าทางอาหารสูง นอกจากนี้ยังมีการตรวจพบว่าในเมล็ดลำไยนั้นมีสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Gue *et al*.,2003) ในปัจจุบันได้มีการแปรรูปลำไยกันมากขึ้น ทั้งการทำลำไยแช่แข็ง ลำไยกระป๋อง ลำไยอบแห้ง รวมถึงการทำไวน์ลำไย เนื่องจากปริมาณการผลิตที่สูงขึ้น ประกอบกับความต้องการจากตลาดต่างประเทศมีมากขึ้นด้วย

ลำไยสามารถขยายพันธุ์ได้หลายวิธี ทั้งการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual) และแบบไม่อาศัยเพศ (asexual) (บุญรอด,2531) แต่วิธีการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการเพาะเมล็ดนั้นไม่เป็นที่นิยมทำกัน เนื่องจากลำต้นที่ได้จะสูงใหญ่ ยากต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิต ใช้เวลานานหลายปีกว่าจะให้ผลผลิต และต้นที่ได้นี้มักจะกลายพันธุ์ ดังนั้นวิธีการที่นิยมทำกันในปัจจุบันคือการขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ และวิธีการที่เกษตรกรชาวสวนส่วนใหญ่เลือกทำนั้น คือ การตอนกิ่ง (บุญรอด,2531) ซึ่งนอกจากจะได้ต้นที่ดีตรงตามพันธุ์แล้ว ยังมีขนาดต้นที่ไม่สูงใหญ่เกินไป สามารถให้ผลผลิตได้ภายใน 2-3 ปี แต่ปัญหาที่สำคัญของการขยายพันธุ์โดยการตอนกิ่งนี้คือ การโค่นล้มง่ายเมื่อเกิดลมพายุ เนื่องจากต้นลำไยที่ได้จากการตอนกิ่งจะไม่มีระบบรากแก้วนั่นเอง ซึ่งการป้องกันปัญหานี้อาจทำได้โดยใช้ต้นลำไยที่ได้จากการขยายพันธุ์โดยวิธีเสียบยอด

การขยายพันธุ์ลำไยโดยวิธีเสียบยอดนั้น เป็นการใช้ต้นตอที่ได้จากการเพาะเมล็ด จึงทำให้ได้ต้นลำไยที่มีระบบรากแก้ว สามารถหยั่งรากลงไปในดินได้ลึก ซึ่งจะมีผลดีในการป้องกันการโค่นล้มได้ดีกว่าต้นที่ได้จากการตอนกิ่ง นอกจากนี้ต้นที่มีระบบรากแก้วยังสามารถทนแล้งได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดีกว่าอีกด้วย (Hartmann *et al*., 2002) นอกจากผลดีที่จะได้รับนอกเหนือจากที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว ประโยชน์อีกด้านหนึ่งคือ อิทธิพลของต้นตอที่มีต่อกิ่งพันธุ์ดี เช่น อาจมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ดี และคุณภาพของผลผลิต (Warne and Wallace, 1935 ; Rom and Carlson, 1987) ในทางกลับกันยอดพันธุ์ก็มีอิทธิพลต่อต้นตอด้วย เช่น ยอดพันธุ์ที่เจริญเติบโตดีมีการส่งเสริมให้ต้นตอแข็งแรง และส่งเสริมการเจริญเติบโตของระบบรากของต้นตออีกด้วย (Hatton, 1939) นอกจากนี้ นันทิยา (2538) ยังได้กล่าวอีกว่า กิ่งพันธุ์ดีมีอิทธิพลต่อการกำหนดขนาดและลักษณะของรากของต้นตอที่เพาะจากเมล็ดอีกด้วย เช่น ในการติดตาแอปเปิลพันธุ์ Red Astrcham จะทำให้ต้นตอมีรากแขนงจำนวนมาก และมีรากแก้วเพียง 2-3 ราก แต่ถ้าติดตาด้วยพันธุ์ Oldenburg หรือ Fameuse ระบบรากของต้นตอจะมีรากแก้วที่แตกแขนงเพิ่มขึ้นมาอีก 2-3 แฉก

แต่ทั้งนี้ ต้องมั่นใจว่า ต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีที่นำมาเสียบต่อกันนั้น จะต้องเข้ากันได้ โดยในเบื้องต้นนี้ นันทิยา (2538) กล่าวว่า ถ้าเป็นพืชชนิด (species) เดียวกัน แม้จะอยู่ต่างสายพันธุ์ (variety) กันก็สามารถเข้ากันได้เกือบทั้งหมด ซึ่งตัวอย่างที่เห็นได้ชัดเจนที่สุด เช่น การติดตา ต่อกิ่งมะม่วงพันธุ์ต่างๆ (สุรินทร์, 2547) อย่างไรก็ตาม มีพืชบางชนิดที่ถึงแม้จะเป็นคนละชนิดแต่อยู่ในสกุล (genus) เดียวกันก็สามารถเข้ากันได้ เช่น การต่อกิ่งส้มชนิดต่างๆในสกุลเดียวกันมักจะสำเร็จเป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่า การต่อกิ่งอัลมอนด์ บ๊วย พลัมยุโรป และพลัมจีน ซึ่งทั้งหมดเป็นพืชต่างชนิดกัน บนต้นตอท้อ (peach) ก็สามารถเข้ากันได้ (มณเทียน, 2550) แต่อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า มีพืชบางชนิดที่สามารถเข้ากันได้แม้ว่าจะอยู่ต่างสกุลกัน เช่น ส้มสามใบ (*Poncirus trifoliata*) เสียบด้วยยอดของส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata*) (สุรินทร์, 2547)

สำหรับสาเหตุของการเข้ากันไม่ได้ (Incompatibility) ระหว่างต้นตอกับกิ่งพันธุ์ดีนั้น ยังไม่ทราบสาเหตุที่ชัดเจน โดยพบว่า ยิ่งเป็นพืชที่มีความห่างไกลกันทางพฤกษศาสตร์ จะยิ่งมีโอกาสของการเข้ากันไม่ได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า มีบางพืชที่ในช่วงแรกสามารถเชื่อมรอยต่อเข้ากันได้อย่างดี แต่ก็เกิดการแยกออกจากกันในภายหลัง (Delayed-incompatibility) (นันทิยา,2538) ตัวอย่างเช่น ต้นดอนย่าสีชมพูที่เสียบบนต้นตอของดอนย่าสีขาว (สุรินทร์,2547) หรือในตัวอย่างของการต่อกิ่งสาลี่พันธุ์ Conference บนต้นตอ Quince ซึ่งมีการประสานรอยต่อที่แข็งแรงและมีการเจริญเติบโตได้ดี แต่เมื่อเวลาผ่านไป 20 ปี พืชคู่นี้กลับมีรอยต่อที่อ่อนแอ และเข้ากันไม่ได้ในที่สุด (เกศิณี, 2522)

จากอาการของการเข้ากันไม่ได้นี้ จึงได้มีการค้นหาวิธีที่จะนำมาแก้ปัญหาดังกล่าว ซึ่งวิธีการที่นิยมทำกันมากคือ การใช้ต้นตอกลาง หรือต้นตอซ้อน (inter stock) โดยต้นตอกลางหรือต้นตอซ้อนนี้ มีการคิดค้นหาจนได้พันธุ์ที่มีคุณสมบัติเข้ากันได้กับทั้งต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เช่น สาลี่พันธุ์ Beurre Hardy ที่ถูกนำมาใช้เป็นต้นตอกลางเชื่อมระหว่างกิ่งสาลี่พันธุ์ Bristol Cross กับต้นตอ Quince (เกศิณี, 2522) และการใช้สาลี่พันธุ์ Old home มาเป็นต้นตอกลางระหว่างกิ่งสาลี่พันธุ์ Bartlett กับต้นตอ Quince (Mosse, 1958) เป็นต้น ในส่วนของท้อ นั้น มีการทดลองใช้ท้อพันธุ์ Akatsuki เป็นต้นตอกลาง พบว่า กิ่งพันธุ์ท้อใน subgenus *Amygdalus* สามารถเข้ากันได้กับต้นตอกลางพันธุ์ Akatsuki ส่วนกิ่งพันธุ์ท้อใน subgenus *Prunophora* ไม่สามารถเข้ากันได้กับต้นตอกลางพันธุ์ดังกล่าว (Yamaguchi *et al*., 2004) มีการศึกษาเพิ่มเติมถึงอิทธิพลของต้นตอกลางที่มีต่อการเจริญเติบโตของกิ่งพันธุ์ดี พบว่า สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของทรงพุ่ม และทำให้แก่ก่อนกำหนดได้ (Dana *et al*., 1963) นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าหากใช้ต้นตอกลางมีความยาวมากขึ้น ต้นก็จะยิ่งมีความสูงน้อยลง (Carlson, 1979 และ Carlson, 1981)

กลไกของการเชื่อมประสานรอยต่อ

สุรินทร์ (2547) ได้กล่าวถึงกระบวนการของการเชื่อมประสานรอยต่อไว้ว่า เริ่มจากมีการเชื่อมต่อระหว่างเนื้อเยื่อต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี สามารถลำเลียงน้ำและแร่ธาตุผ่านบริเวณรอยต่อได้ เนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อนี้เกิดจากเนื้อเยื่อของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีมาเรียงตัวอยู่ด้วยกันโดยไม่เกิดการรวมตัวของเซลล์ระหว่างพืชทั้งสองชนิด เนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นถูกสร้างขึ้นมาสมานแผลเป็นเซลล์พาเรนไคม่า (parenchyma) จำนวนมาก ประกอบกันเป็นเนื้อเยื่อแคลลัส (callus) เกิดขึ้นภายใน 2-3 วัน รอยแผลที่เกิดจากการเฉือนกิ่งจะมีส่วนที่ตายไป และมีการสร้างสารนิโครติก (nicrotic) เพื่อรักษาบาดแผล ส่วนมากสารเหล่านี้จะหายไปเมื่อเกิดการเชื่อมต่อกันดีแล้ว หรือยังอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ก็ได้ การเกิดรอยต่อได้นั้นต้องวางให้เนื้อเยื่อลำเลียง (cambium) ของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีอยู่แนบหรือใกล้กันมากที่สุด แล้วจะมีการสร้างเนื้อเยื่อแคลลัสใหม่เกิดขึ้นจากทั้งสองส่วนจนเต็มช่องว่างระหว่างกัน เรียกว่า แคลลัส บริดจ์ (callus bridge) ซึ่งจะมีการพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อเจริญ (vascular cambium) ภายใน 2-3 สัปดาห์ และมีการสร้างท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (phloem) เชื่อมกันต่อไป

อย่างไรก็ตาม มณเฑียน (2550) ได้กล่าวว่า กลไกในการเชื่อมประสานรอยต่อนี้ อาจมีกระบวนการ และระยะเวลาของพัฒนาการที่แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และปัจจัยภายนอกอื่นๆ ตัวอย่างพืชที่สามารถเชื่อมประสานรอยต่อกันได้ง่ายและรวดเร็ว เช่น แอปเปิล และมะม่วง ซึ่งพืชทั้งสองชนิดนี้จะมียาง (wound gum) มาอุดท่อน้ำบริเวณแผลที่ถูกเฉือน ทำให้เนื้อเยื่อไม่สูญเสียน้ำมาก และพืชบางชนิดที่การเชื่อมประสานรอยต่อเกิดขึ้นได้ยาก เช่น วอลนัท ซึ่งจะมียางมาอุดท่อน้ำช้ามาก ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำและเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อตายเป็นจำนวน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มาก เป็นต้น ส่วนปัจจัยภายนอกที่เกี่ยวข้องกับความสามารถเชื่อมประสานรอยต่อได้ช้าหรือเร็ว ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น ออกซิเจน ในระหว่างและภายหลังการต่อกิ่ง สภาพการเติบโตของต้นตอ เทคนิคและความชำนาญของผู้ต่อกิ่ง การติดเชื้อโรคและแมลงรบกวน สารควบคุมการเจริญเติบโต ทิศทางด้านโคนและด้านปลายในการต่อกิ่ง และ การเข้ากันไม่ได้ระหว่างต้นตอกับกิ่งพันธุ์ดี เป็นต้น (นันทิยา, 2538)

การตรวจสอบความเข้ากันไม่ได้

ปัจจุบัน วิธีการศึกษาเพื่อคาดคะเนถึงสภาวะการเข้ากันไม่ได้นั้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ (มณเฑียน,2550) คือ

1. การศึกษาจากสภาพภายในที่ควบคุมสภาพแวดล้อม (in vitro) โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น การเพาะเลี้ยงแคลลัส (callus cultures) การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (cell suspension) และการเพาะเมล็ดที่งอกในสภาพปลอดเชื้อ เป็นต้น ตัวอย่างงานทดลองในสถานที่ควบคุมสภาพแวดล้อมเพื่อศึกษาความเข้ากันไม่ได้ เช่น Poessel *et al*. (2002) ทดลองทำ micro grafting ในต้นสาลี่ (pear) และบ๊วย (apricot) พบว่า ความแตกต่างระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์คู่ที่เข้ากันได้กับคู่ที่เข้ากันไม่ได้นั้นอยู่ที่ความสามารถเชื่อมประสานของเนื้อเยื่อลำเลียง (vascular) ในระยะ 2-3 สัปดาห์หลังการเสียบยอด เช่นเดียวกับงานทดลองของ Errea *et al*. (1994) ซึ่งทดลองในบ๊วย (apricot) 2 พันธุ์ที่เข้ากันได้และเข้ากันไม่ได้กับต้นตอของ *Prunus cerasifera* พบว่าในต้นที่เข้ากันได้นั้น เนื้อเยื่อแคลลัสมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อลำเลียงได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่เข้ากันไม่ได้ที่การเจริญและพัฒนาของเนื้อเยื่อแคลลัสเกิดขึ้นช้าและไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ ในงานทดลองของ Musacchi *et al*. (2000) ซึ่งทำ micro grafting กิ่งสาลี่บนต้นตอควินซ์ คู่ที่เข้ากันไม่ได้ เปรียบเทียบกับคู่ที่เข้ากันได้ พบว่า ในคู่ที่เข้ากันไม่ได้นั้นมีความเข้มข้นของสารคาเตชิน (catechin) และอีพิคาเตชิน (epicatechin) ในปริมาณที่สูงกว่าคู่ที่เข้ากันได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในคู่ที่เข้ากันไม่ได้นั้นจะมีอัตราการสังเคราะห์แสงที่ลดลง ซึ่งผลนี้ไม่เกิดกับคู่ที่เข้ากันได้ และ Errea (1998) ยังได้รายงานว่า สารประกอบฟีนอล (phenolic compounds) สามารบอกความแตกต่างระหว่างต้นตอกับกิ่งพันธุ์ที่เข้ากันได้และเข้ากันไม่ได้ในไม้ผลได้อีกด้วย ซึ่งต่อมาได้มีการทดลองในบ๊วยเสียบยอดในต้นตอที่เข้ากันได้เปรียบเทียบกับต้นตอที่เข้ากันไม่ได้ พบว่า ในคู่ที่เข้ากันไม่ได้นั้นจะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลที่สูงกว่าในคู่ที่เข้ากันได้ และความแตกต่างนี้สามารถพบได้ตั้งแต่ระยะ 1 สัปดาห์หลังการเสียบยอด Errea *et al*.(2001) ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Feueht (1992) ที่รายงานจากการทดลองกับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Prunus cerasus ว่า ในต้นที่เข้ากันไม่ได้นั้น จะมีการปลดปล่อยสารประกอบฟีนอลในระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษ (toxic concentration) ในบริเวณรอยต่อ

2. การศึกษาสภาพแปลงปลูกภายนอกและในโรงเรือนเพาะเลี้ยง โดยการสังเกตอาการผิดปกติจากลักษณะภายนอก หรือลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ผิดปกติที่เกิดขึ้นหลังการต่อกิ่ง ซึ่งพัฒนาการของพืชที่เกิดจากอาการผิดปกติที่เห็นได้จากภายนอกนี้ ต้องใช้ระยะเวลานาน จนกว่าจะพบอาการที่ชัดเจนได้ ปัจจุบันจึงมีความพยายามคิดค้นเทคนิคและวิธีการใหม่ๆ เพื่อที่จะสามารถลดระยะเวลาการรอคอยสำหรับประเมินผลของการต่อกิ่ง เช่น การใช้กล้องจุลทรรศน์มาสังเกตอาการผิดปกติและพัฒนาการทางกายวิภาค ตลอดจนวิธีการศึกษาแบบแผนไอโซไซม์โดยวิธีการทางอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยนำเอาเนื้อเยื่อแคลลัสตรงบริเวณรอยต่อของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีคู่ที่ต้องการตรวจสอบมาวิเคราะห์และพิจารณา ซึ่งเป็นวิธีการที่ให้ผลการคาดคะเนได้รวดเร็วกว่าวิธีการอื่นๆ (Copes, 1987)

สำหรับข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาความเข้ากันไม่ได้ในลำไยนั้น จากการศึกษาต้นตอลำไยพันธุ์จูเหลียง (Chuliang) ในประเทศจีน พบว่าจะมีโอกาสเข้ากันไม่ได้กับพันธุ์อื่นๆถึง 36% (Liu and Ma,2000) นอกจากนี้แล้วยังไม่มีรายงานการเข้ากันไม่ได้ของลำไยพันธุ์อื่นๆเพิ่มเติม โดยมีรายงานการศึกษาต้นตอลำไยเพื่อใช้สำหรับการติดตาของบุญรอด(2531) พบว่า จากการใช้ลำไยพันธุ์ต่างๆมาเป็นต้นตอ ได้แก่ พันธุ์เบี้ยวเขียว อีแห้ว สีชมพู อีแดง อีดำ อีเหลือง ใบหด พื้นเมือง ลำไยป่า และอีดอ โดยใช้ยอดลำไยพันธุ์อีดอ อีแห้ว สีชมพู และเบี้ยวเขียวมาเสียบปรากฏว่าสามารถเชื่อมต่อกันได้ดี และพบว่าลำไยพันธุ์สีชมพูให้คุณสมบัติในด้านการเป็นต้นตอดีที่สุด แต่ทั้งนี้ ยังไม่เคยมีงานทดลองเปรียบเทียบระหว่างต้นตอลำไยพันธุ์ต่างๆกับลำไยเถามาก่อนเลย

ลำไยเถา (*Euphoria scandens* Winit Kerr.) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า *Dimocarpus longan* var. obtusus มีลำต้นบริเวณปลายกิ่งเลื้อยคล้ายเถาวัลย์ ทรงพุ่มคล้ายต้นเฟื่องฟ้า ลำต้นไม่มีแก่น (pith) ใบขนาดเล็กและสั้น ผลเล็ก ผิวผลสีชมพูปนน้ำตาล เมล็ดโต เนื้อผลบาง มีกลิ่นคล้ายกำมะถัน ในประเทศไทยจะพบได้ทั่วไปในแถบภาคตะวันออก เช่น ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด เป็นต้น ปลูกไว้สำหรับเป็นไม้ประดับมากกว่าเพื่อรับประทานผล (พาวิน,2543) โดยลักษณะเด่นเฉพาะของลำไยเถาบางประการคือ มีการออกดอก ติดผลแบบทวาย ดังจะพบว่าในต้นเดียวกันจะมีทั้งช่อที่กำลังออกดอก ช่อที่ดอกบานเต็มที่ ช่อที่ติดผลขนาดเล็ก และช่อที่ผลมีขนาดโตแล้ว นอกจากนี้ลำไยเถายังสามารถออกดอกได้โดยไม่อาศัยอุณหภูมิต่ำมากระตุ้น (พาวิน และ วินัย, 2543) ซึ่งถ้าหากว่าลักษณะเด่นเหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปสู่กิ่งพันธุ์ดีที่นำมาเสียบยอดได้ก็น่าจะเกิดผลดีต่อการผลิตลำไยในอนาคตต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เทคนิคทางอิเล็กโตรโฟรีซีส

การหารูปแบบไอโซไซม์ของพืชโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส เป็นวิธีการทางชีวเคมีวิธีหนึ่ง ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แยกและวิเคราะห์สาร โดยให้สารหรือโมเลกุลที่มีประจุเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าระหว่างขั้วบวกและขั้วลบ สารที่มีประจุไฟฟ้าต่างกันจะมีแรงเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าต่างกัน (รุ่งเกียรติ,2547) โปรตีนและเอ็นไซม์เป็นโมเลกุลที่มีประโยชน์มากในการศึกษาความแตกต่างหรือความสัมพันธ์ระหว่างต้นพืช เพราะข้อมูลทางพันธุกรรมที่ถ่ายทอดมาจากพ่อแม่จะถูกแปลออกมาเป็นโมเลกุลของโปรตีนหรือเอ็นไซม์โดยตรง เมื่อมีการศึกษาเปรียบเทียบโปรตีนหรือเอ็นไซม์โดยวิธีการอิเล็กโทรโฟรีซีส ก็จะแยกโมเลกุลที่มีความแตกต่างกันของประจุและน้ำหนักโมเลกุล โดยอาศัยการเคลื่อนย้ายของโมเลกุลนั้นๆในตัวกลางที่เป็นสารกึ่งแข็ง เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าในตัวกลางซึ่งแช่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ โมเลกุลของสารจะเคลื่อนที่บนตัวกลางดังกล่าวตามชนิด ขนาด และรูปร่างของโมเลกุลสาร เกิดเป็นแถบ (band หรือ zone) แล้วนำไปย้อมสีเพื่อตรวจจับ จะปรากฏแถบสีเฉพาะของสารนั้นๆ แล้วนำมาเปรียบเทียบเพื่อจำแนกพืชได้ (ชวนพิศ, 2538; มงคล, 2531; หทัยรัตน์, 2535)

พิสสวรรณ (2531), ดวงพร (2538) และ Pasteur *et al*. (1988) กล่าวว่า อิเล็กโทรโฟรีซีสแบบโพลีอะครีลาไมด์ เจล (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) เป็นเทคนิคแบบหนึ่งของการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสหลายๆวิธี ที่นิยมใช้ในงานวิเคราะห์โปรตีนและสารละลายโปรตีนผสม โดยใช้สารตัวกลางค้ำจุนจำพวกเจลที่เป็นสารกึ่งแข็ง (polyacrylamide gel) ซึ่งเฉื่อยต่อสารเคมีระหว่างเกิดกระบวนการแยก โดยอาศัยหลักการกรองโมเลกุล (molecular sieving effect) สามารถลดการแพร่และป้องกันการเกิดการพา ทำให้การแยกได้แถบที่คมชัด รวมทั้งเป็นตัวกลางที่มีรูพรุนสม่ำเสมอซึ่งทำหน้าที่เป็นตะแกรงร่อนโมเลกุลได้ เมื่อปรับขนาดของรูพรุนให้เหมาะสมมีผลให้โมเลกุลของโปรตีนหรือเอ็นไซม์เคลื่อนที่ได้อย่างอิสระ โดยอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่

โพลีอะครีลาไมด์ เจล เป็นผลผลิตจากปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชั่น (polymerization reaction) ของ อะคลีลาไมด์ โมโนเมอร์ (acrylamide monomer) โดยใช้สาร เอ็น,เอ็น-เมธิลีนบิสอะครีลาไมด์ (N,N-methylene-bisacrylamide) หรือเรียกย่อๆว่า บิสอะครีลาไมด์ (bisacrylamide) หรือ บิส (BIS) ทำหน้าที่เชื่อมโยงสายโพลีอะครีลาไมด์เป็นตาข่ายร่างแห ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้ต้องมีการกระตุ้น เริ่มต้นโดยสารตัวเร่งคือ แอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต (ammonium persulphate) หรือ ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ตัวใดตัวหนึ่ง และเติม N,N,N,N-tetramethyl ethelene diamine (TEMED) ช่วยเร่งปฏิกิริยา ในกรณีที่ใช้ไรโบฟลาวินจะต้องใช้แสงเป็นตัวช่วยกระตุ้นปฏิกิริยา (เพิ่มพงษ์, 2531; ชวนพิศ, 2538 และ ดวงพร, 2538)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาภัสสรา (2537) และ ดวงพร (2538) กล่าวว่า ขนาดของรูพรุนเป็นส่วนสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ความพรุนของเจลขึ้นอยู่กับสัดส่วนของ อะครีลาไมด์ และ บิส แสดงค่าเป็น %T และ %C โดย %T หมายถึงความเข้มข้นของโมโนเมอร์ทั้งหมด (อะครีลาไมด์+บิส) มีหน่วยเป็นกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (น้ำหนักต่อปริมาตร) และ %C หมายถึง น้ำหนักเป็นกรัมของบิสเมื่อเทียบเป็น % กับน้ำหนักของโมโนเมอร์ทั้งหมด ขนาดของรูพรุนจะเพิ่มขึ้นเมื่อ %T ลดลง Hames and Rickwood (1981) อ้างโดย อาภัสสรา (2537) รายงานว่า %T ที่เหมาะสมกับช่วงโมเลกุลของสาร คือ การเตรียมเจลที่ใช้ %T เท่ากับ 3-5 เหมาะสำหรับการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 100,000 ขึ้นไป %T เท่ากับ 5-12 เหมาะสำหรับการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 20,000–150,000 %T เท่ากับ 10-15 เหมาะสำหรับการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 10,000-80,000 และถ้า %T มากกว่า 15 เหมาะสำหรับการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 15,000

ปัจจุบันได้มีการนำวิธีการอิเล็กโตรโฟรีซีสมาใช้ในงานด้านต่างๆ ซึ่งส่วนมากจะใช้ในการจำแนกพันธุ์พืช เช่น เสาวณี (2538) ใช้วิเคราะห์เพื่อจำแนกพันธุ์มะขามหวานและมะขามเปรี้ยว โดยใช้ลักษณะไอโซไซม์ 3 ชนิดคือ peroxidaes esterase และ acid phosphatase แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของลักษณะแถบสี จำนวนแถบสี และตำแหน่งของแถบสีที่ปรากฏบนเจลในมะขามแต่ละพันธุ์ Kumer *et al*. (1995) ใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส แยกพุทรา 42 พันธุ์ พบว่า มี 40 พันธุ์ที่แสดงความแตกต่างระหว่างพันธุ์อย่างชัดเจน ส่วนอีก 2 พันธุ์ ไม่แสดงความแตกต่าง อำนวย (2522) ทำการตรวจสอบพันธุ์ของน้อยหน่าลูกผสมโดยพิจารณาแบบแผนของแถบโปรตีนในการทำดิสก์ อิเล็กโตรโฟรีซีส (disc electrophoresis) พบความสัมพันธ์ของลูกผสมและพ่อแม่พันธุ์นี้มีความสัมพันธ์ต่อกัน มณเทียน (2550) สามารถใช้รูปแบบการแสดงออกของเอ็นไซม์ peroxidase บอกความสามารถเข้ากันไม่ได้ระหว่างต้นตอน้อยหน่าอะเมซอนกับกิ่งอะติโมย่าพันธุ์แอฟริกันไพรด์ได้ จากการรายงานของ Santamour (1983) ที่กล่าวว่า สามารถนำวิธีการทางอิเล็กโตรโฟรีซีสมาใช้คาดคะเนพืชที่จะทำการต่อกิ่งว่ามีความสามารถเข้ากันได้หรือไม่ ซึ่งใช้ลักษณะการปรากฏแถบสีของเอ็นไซม์ peroxidase จากเนื้อเยื่อแคมเบียมของกิ่งพันธุ์ดีและต้นตอมาเปรียบเทียบการปรากฏและไม่ปรากฏแถบสี ซึ่งพบว่าแถบไอโซไซม์มีความจำเพาะเจาะจง ทั้งด้านปริมาณหรือคุณภาพที่แตกต่างกัน เป็นข้อมูลถึงความสัมพันธ์ทางสัณฐานวิทยาและเมตาบอลิซึมที่คล้ายคลึงกันของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีที่นำมาทดสอบได้ นอกจากนี้ Copes (1987) ยังได้รายงานผลการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงไอโซไซม์ peroxidase และ esterase ในการต่อกิ่ง Douglas fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb Franco) พบว่าเอ็นไซม์ esterase และ peroxidase มีกิจกรรมที่ทำงานได้เพิ่มขึ้นในต้นที่การต่อกิ่งเข้ากันไม่ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอ็นไซม์ peroxidase นั้น เป็นหนึ่งในเอ็นไซม์ที่ได้รับความสนใจอย่างมากในการวิเคราะห์โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้ในเนื้อเยื่อทั่วไป โดยจะพบในส่วนของไซโตพลาสซึม ผนังเซลล์ มีหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการออกซิเดทีฟ (oxidative) ที่ผนังเซลล์นั้นจะพบเอ็นไซม์ peroxidase ในรูปสารอิสระหรือจับอยู่กับส่วนประกอบของผนังเซลล์ (Ros *et al*., 1988) ความสำคัญของเอ็นไซม์ peroxidase มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการลิกนิฟิเคชั่น (lignification) หรือกระบวนการสร้างลิกนิน (lignin) ซึ่ง พวงผกา (2548) กล่าวว่า ลิกนินที่สะสมในผนังเซลล์มีหน้าที่ส่งเสริมความแข็งแรงของรอยต่อระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดี ช่วยสร้างเนื้อเยื่อเจริญเมื่อเกิดบาดแผลหรือเปลี่ยนเป็นเนื้อเยื่อแคมเบียม นอกจากนี้ Alexandre *et al*. (2002) ยังได้รายงานว่า กิจกรรมของเอ็นไซม์ peroxidase จะแสดงความสำคัญในการประสานตัวระหว่างต้นตอกับกิ่งพันธุ์ดีในพืชตระกูลพรุนนัท (*Prunus* spp.) ซึ่งสอดคล้องกับ Santamour *et al*. (1986) ที่รายงานว่า ลักษณะที่ปรากฏของไอโซไซม์ของต้นตอและกิ่งพันธุ์ดีที่มีความคล้ายคลึงกันจะสามารถต่อเข้ากันได้ ซึ่งกิ่งที่สามารถเข้ากันได้นี้จะมีการสร้างเนื้อเยื่อแคมเบียมจำนวนมากล้อมรอบบริเวณรอยต่อและสามารถสร้างท่อลำเลียงเชื่อมต่อกันได้อย่างต่อเนื่อง และยังพบว่าการปรากฏของแถบไอโซไซม์ที่แตกต่างกันจะมีการสร้างแคมเบียมเพียงเล็กน้อยที่ผิวหน้าบริเวณรอยต่อและไม่สามารถสร้างท่อลำเลียงเชื่อมต่อกันได้ การปรากฏแถบไอโซไซม์ของเอ็นไซม์ peroxidase นี้ยังสามารถใช้คาดคะเนความเข้ากันได้หรือไม่ได้ของพืชอื่นๆอีก เช่น โอ๊คแดง (*Quercus rubra* L.) และ เกาลัดจีน (*Castanea mollissimablume*) (Santamour, 1988) พืชตระกูลพรุน (Huang *et al*., 1984; Schmid and Feucht, 1985) และ องุ่น (Masa, 1986)

สำหรับบทบาทและความสำคัญของโปรตีนหรือเอ็นไซม์ที่พบในเนื้อเยื่อลำเลียงตรงบริเวณรอยต่อนั้น พบว่ามีความสัมพันธ์กันโดยตรง โดยจากการรายงานของ Tiedemann and Carsens-Behrens (1994) ที่กล่าวว่า ในช่วงของการพัฒนาจากเนื้อเยื่อแคมเบียมไปเป็นท่อลำเลียงนั้น จะมีการสังเคราะห์โปรตีนเกิดขึ้นในระยะนี้ ซึ่งพบหลักฐานจากการต่อกิ่งต้นแตงกวา (*Cucumis sativus*) กับฟักทอง (*Cucurbita* sp.) ว่า มีการเปลี่ยนแปลงแถบโปรตีน โดยมีการเคลื่อนที่ของ polypeptides symplastically ข้ามผ่านรอยต่อโดยทางกลุ่มท่อลำเลียง ซึ่งบ่งชี้ถึงความจำเป็นของโปรตีนในการเร่งกิจกรรมที่ต้องการ นอกจากนี้ Hartmann *et al*. (2002) ยังกล่าวอีกว่า การส่งผ่านสัญญาณโมเลกุลกับสาร polypeptides ในท่อลำเลียงอาหารอาจจะแตกต่างกันในการตอบสนองของเซลล์และความสามารถเข้ากันได้ระหว่างคู่ต่อกิ่งทั้งสองอีกด้วย ดังนั้น จึงสามารถเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างเอ็นไซม์กับเนื้อเยื่อแคมเบียมตรงบริเวณรอยต่อได้ ซึ่ง Ermel *et al*. (1997) ได้ทำการทดลองกับต้นสาลี่ที่ต่อกิ่งบนต้นตอควินซ์ และ Errea *et al*.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(1994) ทำการทดลองกับต้นป๊วยต่อกิ่งบนต้นตอพรุน พบว่า ความผิดปกติที่เกิดขึ้นตรงบริเวณรอยต่อเกิดจากการที่เนื้อเยื่อแคมเบียมใหม่เปลี่ยนแปลงสภาพไปเป็นท่อลำเลียงใหม่ไม่ได้ สอดคล้องกับ Hartmann *et al.* (2002) ที่กล่าวว่า ส่วนของเนื้อเยื่อแคลลัสในคู่ต่อกิ่งที่เข้ากันไม่ได้จะไม่สามารถเปลี่ยนแปลงสภาพแคมเบียมไปเป็นท่อลำเลียงได้ และพบว่ากิจกรรมการสร้างแคมเบียมมีการลดลงในบางส่วนของรอยต่อกิ่ง ส่งผลให้การสร้างท่อลำเลียงใหม่หยุดชะงัก และมีการสร้างเซลล์พาเร็นไคม่ามาขัดขวางการต่อเชื่อมของท่อลำเลียงอีกด้วย ดังนั้น การตรวจสอบเอ็นไซม์จากเนื้อเยื่อแคมเบียมตรงบริเวณรอยต่อจึงมีความสำคัญต่อการคาดคะเนความสามารถเข้ากันได้หรือไม่ได้ของคู่ต่อกิ่ง โดยอาศัยความเหมือนหรือแตกต่างกันของแถบไอโซไซม์ที่ปรากฏจากการนำเอาเนื้อเยื่อแคลลัสตรงบริเวณรอยต่อมาตรวจสอบ โดยมุ่งเน้นความสำคัญกับเอ็นไซม์ peroxidase ซึ่งมีความสำคัญและเหมาะสมสำหรับใช้ตรวจสอบในเนื้อเยื่อพืชตรงบริเวณรอยต่อ ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

ซึ่งจากหลักการนี้จึงอาศัยคุณสมบัติของสารประกอบที่มีอยู่ในพืชมาใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์และเปรียบเทียบลักษณะและการแลกเปลี่ยนสารเคมีของเนื้อเยื่อรอยต่อระหว่างต้นตอกับยอดพันธุ์แต่ละคู่ของต้นลำไยในการทดลองครั้งนี้ ที่ต้องการทดสอบว่ามีลักษณะเหมือนหรือต่างกันอย่างไรบ้าง และเมื่อใช้กิ่งพันธุ์กับต้นตอที่สามารถเข้ากันได้ (ในกรณีของงานวิจัยนี้ใช้ต้นตอลำไยพันธุ์สีชมพูเป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งมีรายงานการทดลองแล้วว่าลำไยพันธุ์สีชมพูสามารถเข้ากันได้กับลำไยพันธุ์อื่นๆ) ก็อาจนำผลที่ได้มาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการทำนายความสามารถเข้ากันได้หรือไม่ได้ของต้นตอและยอดพันธุ์ลำไยแต่ละคู่ที่ต้องการทดสอบ (โดยเฉพาะต้นตอลำไยเถา) แต่ทั้งนี้ ควรมีการศึกษาโดยใช้เทคนิคอื่นๆมาประกอบการพิจารณาด้วย ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้เทคนิคการตรวจสอบการเจริญเติบโตด้านสัณฐานวิทยา และศึกษาทางกายวิภาคศาสตร์จากภาพตัดขวางของลำต้นตรงบริเวณรอยต่อ มาใช้เพื่อประกอบการพิจารณาด้วย

เทคนิคการตัดตามขวาง (cross section) ของลำต้นลำไยตรงบริเวณรอยต่อเพื่อศึกษาลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์นั้นสามารถทำได้โดยใช้เครื่องตัดแบบเลื่อน (sliding microtome) ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วิธีการทำโดยตัดตัวอย่างตรงบริเวณรอยต่อให้มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร แช่ในสารละลาย FAA (Formalin-Acetic acid Alcohol) ซึ่งเป็นน้ำยาที่ใช้ฆ่าเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ เพื่อให้โปรโตพลาสซึม (protoplasm) ภายในเซลล์หยุดกระบวนการต่างๆ โดยที่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นน้อยที่สุด และสามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ในสภาพที่ใกล้เคียงเซลล์ปกติให้มากที่สุด (ฉันทนา,2547) จากนั้นนำไปต้มในสารละลายกลีเซอรีนเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง นำไปตัดโดยเครื่อง sliding microtome ที่ความหนาประมาณ 35-40 ไมโครเมตร นำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชิ้นส่วนตัวอย่างพืชที่ตัดได้ไปทำการดึงน้ำออกจากเซลล์และย้อมสีตามวิธีการของประศาสตร์(2537) (วิธีการตามภาคผนวก ก.) จากนั้นจึงนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมกับถ่ายภาพเพื่อนำมาเปรียบเทียบกันในแต่ละกรรมวิธีต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved