บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

1. ลำไย

1.1 ความสำคัญ

ลำไยจัดเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอันดับหนึ่ง ผลผลิตของลำไยสามารถส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศทั้งผลสด และอบแห้ง หรือแม้กระทั่งส่งในรูปของลำไยกระป๋อง ในแต่ละปีมีการส่งออกลำไยและผลิตภัณฑ์รวมมูลค่ามากกว่า 5,000 ล้านบาท และมีแนวโน้มว่าจะมีการส่งออกเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2545) สำหรับตลาดลำไยสดในต่างประเทศที่สำคัญได้แก่ ฮ่องกง รองลงมาตามลำดับคือ อินโดนีเซีย มาเลเซีย สิงคโปร์ จีน แคนาดา และประเทศอื่นๆ ส่วนประเทศที่นำเข้าลำไยอบแห้งมากที่สุด ได้แก่ จีน รองลงมาคือ ฮ่องกง เวียดนาม สิงคโปร์ และแคนาดา ตามลำดับ และประเทศที่นำเข้าลำไยกระป๋องมากที่สุดคือ มาเลเซีย รองลงมาคือ สิงคโปร์ สหรัฐอเมริกา อินโดนีเซีย ฝรั่งเศส และฮ่องกง ตามลำดับ (เพ็ญศรี และคณะ, 2543) ลำไยเป็นไม้ผลมีคุณค่าทางโภชนาการ เนื่องจากให้พลังงานสูง ทั้งนี้เพราะในเนื้อลำไยมีน้ำตาล 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส เนื้อผลลำไยสดและแห้งจะให้คุณค่าทางอาหารต่างๆ รวมทั้งแร่ธาตุที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น ทองแดง สังกะสี แมงกานีส เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าผลลำไยแห้งยังมีประโยชน์ในทางการแพทย์แผนโบราณจีน มีคุณสมบัติในการบำรุงหัวใจ บำรุงเลือด บำรุงประสาท ช่วยย่อยและเป็นอาหารบำรุงกำลัง จึงเหมาะที่จะใช้กับผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอ โดยเฉพาะหลังฟื้นจากโรคหรือหลังคลอดบุตร เพราะมีคุณสมบัติบำรุงเลือดและบำรุงกำลัง นอกจากนี้ยังเป็นยาบำรุงประสาท ขี้ลืม กระสับกระส่าย เหงื่อออกมาก ได้อีกด้วย (Nong and Li, 1989)

1.2 ประวัติความเป็นมาและถิ่นกำเนิด

ลำไยมีถิ่นกำเนิดในบริเวณที่ราบของ ศรีลังกา อินเดีย พม่า และจีนตอนใต้ ส่วนใหญ่ปลูกในเขตร้อนและกึ่งร้อน ต่อมามีการแพร่กระจายไปสู่ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย มาเลเซีย บางพื้นที่ของออสเตรเลีย รัฐฮาวาย และรัฐฟลอริดา ของประเทศสหรัฐอเมริกา รวมถึงหมู่เกาะอินดิสตะวันตก และมาดากัสการ์ แหล่งปลูกที่สำคัญในปัจจุบันคือ ประเทศไทย จีน และไต้หวัน (Subhadrabandhu, 1990)

สำหรับในประเทศไทยนั้น สันนิษฐานว่ามีการนำเข้าจากประเทศจีนตอนใต้ในปี พ.ศ.2439 โดยมีชาวจีนผู้หนึ่งนำกิ่งตอนของลำไยจากประเทศจีนจำนวนหนึ่ง มาถวายเจ้าดารารัศมี พระราช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ชายาในพระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว เจ้าดารารัศมีได้แบ่งบางส่วนไว้ปลูกที่กรุงเทพฯ ส่วนที่เหลือได้แบ่งให้เจ้าน้อยตั๋น ณ เชียงใหม่ ผู้เป็นน้องชายนำไปปลูกที่เชียงใหม่ ซึ่งเจ้าน้อยตั๋นได้นำไปปลูกที่ท่าขี้เหล็ก ต.สบแม่ข่า อ.หางดง จ.เชียงใหม่ ในเวลาต่อมาก็มีชาวจีนนำกิ่งตอนจากเมืองจีนมาปลูกที่เชียงใหม่และลำพูนอีก ทำให้การปลูกลำไยเป็นที่นิยมแพร่หลายและแพร่กระจายไปยังพื้นที่ในจังหวัดใกล้เคียงมากขึ้น (พิชัย, 2529)

1.3 แหล่งปลูก

แหล่งผลิตหลักของโลกได้แก่ ทางภาคเหนือของประเทศไทย ตอนใต้ของประเทศจีน และไต้หวัน ส่วนแหล่งผลิตรองลงมา ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย พม่า ลาว ฮ่องกง อินโดนีเซีย เวียดนาม และสหรัฐอเมริกา แหล่งปลูกลำไยในประเทศไทยที่สำคัญคือจังหวัดที่อยู่ในเขตภาคเหนือ ได้แก่ เชียงใหม่ ลำพูน เชียงราย ลำปาง แพร่ น่าน พะเยา ตาก แม่ฮ่องสอน และสุโขทัย รวมเป็นประมาณร้อยละ 90 ของพื้นที่ปลูกทั่วประเทศ นอกจากนี้ยังมีการปลูกในเขตภาคตะวันออก เช่นอำเภอสอยดาว และอำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี เขตภาคกลางเช่น จังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงคราม ปัจจุบันลำไยได้แพร่กระจายไปในจังหวัดต่างๆ ของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดเลย หนองคาย นครพนม มุกดาหาร และภาคใต้เช่น จังหวัดพัทลุง สงขลา และนครศรีธรรมราช เป็นต้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2545)

1.4 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำไยเป็นไม้ยืนต้น จัดอยู่ในตระกูล (family) Sapindaceae หรือ Soapbeny ไม้ตระกูลนี้มี 158 สกุล (genus) และประมาณ 2,230 ชนิด (species) มีทั้งไม้ในเขตร้อน (tropical) ไม้ในเขตอบอุ่น (sub-tropical) และรวมทั้งไม้ประดับในเขตหนาวบางชนิดด้วย แต่ไม้ที่อยู่ในเขตร้อนและเขตอบอุ่นเท่านั้นที่สามารถจะให้ผลได้ ลำไยมีชื่อวิทยาศาสตร์ อยู่หลายชื่อคือ *Euphoria longana* Lam.; *Euphoria longan* Strend.; *Nephelium longana* Camb. และ *Dimocarpus longan* Lour. พืชร่วมตระกูล ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้แก่ เงาะ (Rambutan : *Nephelium lappaceum* L.) ลิ้นจี่ (*Lychee; Litchi; Litchi chinensis* Sonn.; *Nephelium lichi* Camb.; *Scytalia chinensis* Gaertn. *Dimocarpus litchi* Lour.) นอกจากนี้ยังมีพืชที่ใกล้เคียงกัน แต่ไม่มีความสำคัญในแง่การเป็นไม้ผลเศรษฐกิจ ซึ่งอาจใช้ประโยชน์ในแง่การเป็นต้นตอไม้ผลทั้ง 3 ชนิดข้างต้น เช่น คอแลนทางภาคเหนือ และภาคกลาง (*Nephelium hypoleucum* Kurz.) คอแลนทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (*Xerospermum intermedium* Radlk.) ลำไยป่า (*Paranephelium longifoliolatum* Lec.) ลำไยเครือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หรือลำไยเถา (*Dimocarpus longan* var. *obtusus* Leenh. ; *Nephelium obovatum* L.) (Morton, 1987) ลำไยมีชื่อสามัญที่นิยมเรียกกันมากคือ longan หรือ lungan มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ดังต่อไปนี้

1. ส่วนของลำต้นและกิ่ง (stem หรือ trunk) ลำไยเป็นไม้ที่มีลำต้นสูงขนาดปานกลางถึงขนาดใหญ่ เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะมีทรงพุ่มสูงประมาณ 10-12 เมตร มีการแตกกิ่งก้านสาขาแผ่กระจายอย่างสวยงาม ทรงพุ่มแผ่กว้างประมาณ 6-8 เมตร เปลือกของลำต้นมีความขรุขระมีสีเทาหรือสีเทาปนน้ำตาลแตกเป็นสะเก็ด และเนื้อไม้ค่อนข้างเปราะ (Subhadrabandhu, 1990)

2. ใบ (leaf) ลำไยมีใบเป็นแบบ pinnately compound มีใบย่อย (leaflet) ประมาณ 3-5 คู่ แตกออกตรงกันข้าม (opposite) หรือ สลับ (alternate) ความยาวใบประมาณ 20-30 เซนติเมตร รูปร่างใบเป็นรูปรีหรือรูปหอก ส่วนปลายใบและฐานใบค่อนข้างป้าน ใบด้านบนมีสีเขียวเข้มเป็นมัน หรือมีสีเขียวอ่อนจนถึงสีเขียวแกมเทา ด้านล่างสาก ใบอ่อนที่แตกออกมามีสีน้ำตาลแดง (Subhadrabandhu, 1990) ขอบใบเรียบไม่มีหยัก ใบเป็นคลื่นเล็กน้อย และเห็นเส้นใบ (vein) แตกออกจากเส้นกลางใบชัดเจน (พิชัย, 2529)

3. ดอก (flower) ดอกของลำไยจะออกเป็นช่อ (inflorescence) มีช่อดอกแบบ panicle ดอกจะมีขนาดเล็กและเกิดขึ้นหนาแน่นใน terminal และ prillary panicle ออกดอกที่ปลายกิ่งหรือจากกิ่งทั้งที่มีใบและไม่มีใบ ดอกมีสีขาวค่อนข้างเหลือง (พิชัย, 2529) มีทั้งดอกตัวผู้และตัวเมีย ซึ่งดอกตัวผู้จะอยู่ด้านโคนช่อ และจะบานก่อนดอกตัวเมีย (เกียรติเกษตร และคณะ, 2530)

4. ผล (fruit) ผลของลำไยจะเกิดจากส่วนของช่อดอกที่อยู่ตรงปลายกิ่ง ซึ่งต้องเป็นกิ่งที่ได้รับแสงและอากาศเพียงพอเพื่อการเจริญเติบโต ผลค่อนข้างกลมหรือรูปไข่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 นิ้ว หรือ 2.5 นิ้ว เปลือกผลมีสีน้ำตาลอ่อน ผิวเปลือกเรียบ หรือเกือบเรียบ มีตุ่มแบนๆ ปกคลุมที่ผิวเปลือกด้านนอก (พิชัย, 2529)

5. เนื้อผล (aril) เนื้อผลของลำไยมีสีขาวคล้ายวุ้น มีรสหวาน และมีกลิ่นหอม เนื้อลำไยเป็นเนื้อเยื่อพาเรนไคมาที่เจริญล้อมรอบเมล็ด และอยู่ระหว่างเปลือกและเมล็ด มีน้ำหนักประมาณ 75% ของน้ำหนักผล (เกียรติเกษตร และคณะ, 2530 ; Sabhadrabandhu, 1990)

6. เมล็ด (seed) เมล็ดลำไยมีลักษณะกลมจนถึงกลมแบน เมื่อยังไม่แก่มีสีขาว แล้วค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีดำเข้มเป็นมัน ลักษณะคล้ายตามังกร (dragon's eye)(พิชัย, 2529) ส่วนของเมล็ดที่ติดกับขั้วผล (placenta) เป็นเนื้อเยื่อสีขาวๆ บนเมล็ด เมล็ดมีขนาดเล็กหรือใหญ่ต่างกันไปตามพันธุ์ เมื่อผลแก่จัดถ้าไม่เก็บเกี่ยว placenta จะใหญ่ขึ้น เนื่องจากมีการดึงอาหารจากเนื้อผลเพื่อไปเลี้ยงเมล็ด ทำให้เนื้อผลมีรสชาติจืดลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.5 นิเวศวิทยา

พิชัย (2529) เกียรติเกษตร และคณะ (2530) และพาวิน (2543) ได้รวบรวมผลงานเกี่ยวกับนิเวศวิทยาของลำไยไว้ดังนี้

1. ดิน ลำไยสามารถขึ้นได้ดีในดินแทบทุกชนิดที่มีความอุดมสมบูรณ์สูงและมีการระบายน้ำดี โดยเฉพาะดินร่วนปนทราย และดินตะกอน (alluvial soil) ดินที่มีความเหมาะสมในการปลูกลำไยควรมีค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) อยู่ระหว่าง 5.0-7.0

2. อุณหภูมิ ลำไยเป็นพืชที่ทนต่อสภาพดินฟ้าอากาศได้ดี โดยทั่วไปต้องการอุณหภูมิค่อนข้างต่ำ อุณหภูมิที่สามารถเจริญเติบโตได้อยู่ระหว่าง 4-30 องศาเซลเซียส และต้องการอุณหภูมิต่ำในช่วง 10-20 องศาเซลเซียสในฤดูหนาวช่วงหนึ่ง คือประมาณเดือนพฤศจิกายนถึงมกราคมเพื่อสร้างตาดอก

3. ปริมาณน้ำฝน มีความสำคัญในการเจริญเติบโตของต้นลำไย ลำไยจะออกดอกติดผลดีควรจะมีปริมาณน้ำฝนระหว่าง 1200-1400 มิลลิเมตรต่อปี จำนวนวันของฝนที่ตกและการกระจายของฝน เป็นสิ่งจำเป็นไม่น้อยไปกว่าปริมาณรวมของน้ำฝนที่ตกทั้งปี โดยทั่วไปควรมีการกระจายของฝนประมาณ 100-150 วันขึ้นไป

4. ระดับความสูงของพื้นที่ ลำไยปลูกได้ดีในที่ราบลุ่มจนถึงพื้นที่สูงกว่าระดับน้ำทะเลประมาณ 1,000 เมตร พื้นที่มีความลาดเอียง 10-15% และหน้าดินลึกมากกว่า 50 เซนติเมตร

5. แสง มีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างอาหาร และลำไยชอบที่กลางแจ้งที่มีแสงแดดส่องถึง

1.6 สรีรวิทยาของการเจริญเติบโต

ภาคการเจริญของลำไยสามารถแบ่งออกได้เป็นสองส่วนใหญ่ๆ ได้แก่ ส่วนการเจริญทางลำต้น และส่วนการเจริญทางการสืบพันธุ์ การเจริญเติบโตทางลำต้นนั้นพบว่า ลำไยที่อยู่ในระยะต้นกล้าและต้นลำไยที่ปลูกด้วยกิ่งตอนที่ยังไม่ให้ผลผลิตจะมีการผลิใบ 3-5 ครั้งต่อปี ส่วนต้นที่ให้ผลผลิตและมีอายุมาก จะมีการผลิใบก่อนการออกดอกประมาณ 1-2 ครั้ง คือ หลังการเก็บเกี่ยวผลผลิตประมาณ 3-4 สัปดาห์ ลำไยจะเริ่มผลิใบซึ่งจะตรงกับช่วงฤดูฝน ส่วนการผลิใบในครั้งที่สองอาจเกิดในช่วงฤดูหนาว ซึ่งใช้เวลานานกว่าครั้งแรกประมาณสองเท่า ส่วนการเจริญทางการสืบพันธุ์ ซึ่งก็ได้แก่การออกดอกนั้นพบว่า ลำไยที่ปลูกด้วยกิ่งตอนที่มีสภาพของต้นสมบูรณ์จะเริ่มออกดอกในปีที่สอง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ พื้นที่ปลูก และสภาพแวดล้อม รวมทั้งนิสัยการเกิดดอกของช่อลำไย ซึ่งมักออกดอกไม่สม่ำเสมอ (สุรนันต์, 2526 ; สมบูรณ์, 2534 ; ปฐม, 2535)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.7 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการออกดอกของลำไย

นักวิจัยหลายท่านได้อ้างอิงถึงปัจจัยที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการออกดอกของลำไยไว้ดังนี้

1. ความสมบูรณ์ของต้น (Tree Health) ลำไยเป็นพืชที่ใช้เวลาตั้งแต่ออกดอกถึงผลแก่ (reproductive growth) นานประมาณ 6-7 เดือน ทำให้มีการใช้อาหารในการเลี้ยงผลจำนวนมาก โดยเฉพาะในปีที่ติดผลดกทำให้มีระยะเวลาในการพักฟื้นและสะสมอาหารสั้น จึงต้องมีการดูแลรักษาและบำรุงเลี้ยงดูอย่างเหมาะสม เพราะถ้าต้นไม่สมบูรณ์ประกอบกับสภาพแวดล้อมไม่เอื้ออำนวยจะมีผลทำให้ออกดอกน้อยในปีถัดไป (Morton, 1989)

2. แสง (Light) ปกติลำไยจะออกดอกที่ปลายยอดบริเวณที่ได้รับแสง ส่วนกิ่งที่ไม่ได้รับแสงจะออกดอกน้อย แสงแดดมีบทบาทต่อการเจริญของต้นลำไย คือเกี่ยวข้องกับปริมาณคาร์โบไฮเดรทในต้น ซึ่งมีรายงานว่า ก่อนการออกดอกของลำไย ปริมาณคาร์โบไฮเดรทที่ไม่ใช่โครงสร้าง (total nonstructural carbohydrate หรือ TNC) ในยอดของลำไยจะสูง จากนั้น TNC จะลดลงเรื่อยๆ เมื่อลำไยเริ่มมีการแทงช่อดอก (มนตรี และคณะ, 2534)

3. พันธุ์ (Cultivar) พืชต่างพันธุ์กันมีความสามารถในการออกดอกไม่เท่ากัน แม้จะอยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน (สมบุญ, 2536) ลำไยแต่ละพันธุ์ก็มีความยากง่ายของการออกดอกที่แตกต่างกัน เช่นพันธุ์ใบดำ และอีดอ จะมีนิสัยการออกดอกที่ค่อนข้างสม่ำเสมอ ส่วนพันธุ์เบี้ยวเขียว และแห้ว มักออกดอกปีเว้นปี ลำไยบางพันธุ์มีนิสัยการออกดอกง่ายและออกดอกมากกว่าหนึ่งครั้งต่อปี เช่น พันธุ์เพชรสาครทะวาย (พาวิน, 2543)

4. อุณหภูมิ (Temperature) เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการเกิดตาดอกของลำไย พบว่าในปีที่มีอากาศหนาวเย็นมากและยาวนานจะสามารถชักนำให้ลำไยทั้งต้นที่สมบูรณ์และต้นที่โทรมออกดอกได้ แต่ถ้าในปีที่มีอุณหภูมิต่ำสลับกับอุณหภูมิสูง ลำไยจะออกดอกน้อยทั้งๆที่ต้นมีความสมบูรณ์ (Menzel *et al.*, 1990)

5. การเจริญทางกิ่งใบ (Vegetative Growth) โดยทั่วไปลำไยที่มีอายุมากจะผลิใบจำนวน 1 ครั้ง ก็สามารถออกดอกได้ (สมบูรณ์, 2534 ; ปฐม, 2535) แต่ถ้าเป็นต้นลำไยที่มีอายุน้อย อาจผลิใบใหม่ได้ถึง 2-3 ครั้ง ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นว่า ไม่ว่าต้นลำไยจะผลิใบ 1 ครั้งหรือหลายครั้งก็สามารถออกดอกได้ แต่สิ่งที่สำคัญคือจังหวะของการผลิใบอ่อนครั้งสุดท้าย ใบและยอดของลำไยจะต้องแก่ให้ทัน ก่อนที่อากาศหนาวเย็นจะมากระทบ จากรายงานของ เอนก (2539) พบว่าต้นลำไยที่ผลิใบอ่อนในช่วงฤดูหนาว ซึ่งเป็นระยะที่ใกล้เข้าสู่ช่วงเวลาของการออกดอก จะมีผลทำให้ต้นลำไยมีการออกดอกน้อย และออกดอกช้ากว่าต้นที่ไม่ผลิใบ ถึงแม้ว่าจะได้รับอุณหภูมิต่ำที่เหมาะสมในการชักนำการออกดอกก็ตาม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. ความชื้นในดิน (Soil moisture) มีความจำเป็นในช่วงการติดผล ลำไยต้องการความชื้นในดินสูงขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ ถึงมิถุนายน ซึ่งในช่วงนี้ถ้าลำไยขาดความชื้นในดิน ดอกที่ออกมามักจะแห้ง (เกียรติเกษตร และคณะ, 2530) พื้นที่ที่เหมาะสำหรับปลูกลำไยควรมีระดับน้ำใต้ดิน 2-4 เมตร (Sabhadrabandhu, 1990)

7. การขาดน้ำ (Water Stress) เชื่อกันว่าสภาพขาดน้ำจะช่วยส่งเสริมการออกดอกของลำไย โดยช่วยลดการผลิใบที่อาจเกิดขึ้นในช่วงฤดูหนาว (กลางเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม) สภาพที่มีความชื้นในดินต่ำจะมีผลต่อการดูดน้ำของพืช ซึ่งจะเป็นการลดการเคลื่อนย้ายธาตุไนโตรเจนที่จะละลายขึ้นไปกับน้ำ ซึ่งเป็นที่ทราบกันว่าธาตุไนโตรเจนจะช่วยส่งเสริมการเจริญทางกิ่งใบ และเมื่อไนโตรเจนต่ำลงจึงช่วยให้ต้นไม้มีโอกาสที่จะเจริญทางการออกดอกได้มากขึ้น (รวี, 2540)

8. ฮอร์โมนภายในต้น (Plant Hormones) มีรายงานถึงการศึกษาปริมาณฮอร์โมนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการออกดอกของลำไย โดย Huang (1996) พบว่าระดับฮอร์โมนภายในต้นลำไยที่เอื้อต่อการชักนำให้เกิดการสร้างตาดอก คือมีระดับของไซโตไคนิน (isopentenyladenosine) สูง แต่จะมีระดับของจิบเบอเรลลิน (GA_3) และแอบซิสสิคแอสิด (ABA) ต่ำ นอกจากนี้ Chen *et al.*,1997 ได้วิเคราะห์ปริมาณไซโตไคนินในยอดลำไยในระยะต่างๆ พบว่าปริมาณไซโตไคนินทั้งหมดต่ำในระยะที่ลำไยผลิใบอ่อน แต่จะสูงในระยะสร้างตาดอก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง zeatin, zeatin riboside, isopentenyladenosine และ isopentenyladenine ต่อมา นพพร (2539) ได้ศึกษาถึงปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในยอดลำไยก่อนการออกดอก พบว่าในช่วงก่อนออกดอกจะมีปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินลดลง และลดลงต่ำสุดจนไม่สามารถตรวจพบในสัปดาห์ที่มีการออกดอก อย่างไรก็ตามเคยมีผู้ทดลองใช้สารพาโคลบิวทราโซลซึ่งเป็นสารยับยั้งการสร้างจิบเบอเรลลินกลับไม่สามารถชักนำให้ลำไยออกดอกได้ (ประหยัด, 2529) แสดงให้เห็นว่าการลดระดับของจิบเบอเรลลินเพียงอย่างเดียวนั้นไม่สามารถชักนำให้ลำไยออกดอกได้ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการออกดอกของลำไยอาจถูกควบคุมด้วยสมดุลย์ของฮอร์โมนหลายชนิด

2. ปวยเล้ง

2.1 ความสำคัญ

ปวยเล้ง เป็นพืชที่มีความสำคัญและทำรายได้ให้กับเกษตรกรได้ดีชนิดหนึ่ง เนื่องจากราคาค่อนข้างสูง ทั้งยังเป็นที่ต้องการมากทั้งในตลาดภายในและต่างประเทศ ปวยเล้งจัดเป็นพืชกินใบสามารถนำไปประกอบอาหารได้หลากหลายรูปแบบ เป็นที่นิยมบริโภคกันมาก เพราะเชื่อว่านอกจากจะมีใยอาหารที่เป็นส่วนประกอบสำคัญแล้ว ยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ประกอบด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โปรตีน วิตามินเอ วิตามินซี และแร่ธาตุต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น เหล็ก ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม เป็นต้น (Duke and Ayensu, 1985)

2.2 ประวัติความเป็นมาและถิ่นกำเนิด

ปวยเล้ง มีถิ่นกำเนิดในแถบประเทศอิหร่านเมื่อประมาณกว่า 2000 ปีมาแล้ว ต่อมาในช่วงศตวรรตที่ 10 จึงมีการแพร่กระจายไปสู่ประเทศในแถบแอฟริกาเหนือ และยุโรป (Rubatzky and Yamaguchi, 1997) ส่วนการแพร่กระจายเข้าสู่ประเทศสหรัฐอเมริกานั้นไม่สามารถระบุช่วงเวลาได้แน่ชัด แต่พบว่ามีการปลูกปวยเล้งกันอย่างกว้างขวางตั้งแต่ต้นศตวรรตที่ 19 (George and McCollum, 1968)

2.3 แหล่งปลูก

แหล่งปลูกที่สำคัญในปัจจุบัน ได้แก่ อิตาลี ฝรั่งเศส เยอรมันนี เนเธอร์แลนด์ และสหรัฐอเมริกา (Rubatzky and Yamaguchi, 1997) สำหรับในประเทศไทยนั้นแหล่งปลูกที่สำคัญส่วนมากจะอยู่ทางภาคเหนือของประเทศ เช่น เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง เพชรบูรณ์ เป็นต้น (สฤษฏ์จรูญ, 2540)

2.4 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ปวยเล้ง เป็นพืชที่อยู่ในตระกูล (family) Chenopodiaceae พืชในตระกูลนี้มีทั้งหมด 75 สกุล (genus) ส่วนใหญ่เป็นพวกวัชพืช มีเพียงไม่กี่ชนิด (species) ที่เป็นพืชผัก ได้แก่ ปวยเล้ง (spinach), table beet, swiss chard, spinach beet หรือ palak และ orach (Rubatzky and Yamaguchi, 1997) ปวยเล้งมีชื่อสามัญว่า spinach จัดเป็นพืชกินใบ หรือ leafy vegetable มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Spinacia oleracea* L. มีลักษณะทางพฤกษศาสตร์ดังนี้

1. **ส่วนของต้นและใบ (Stem and leaf)** ปวยเล้งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ที่มีลักษณะทรงต้นเป็นพุ่ม ก้านใบเล็กและยาว ใบมีลักษณะกลมเกือบรี (ovate) จนถึงรูปสามเหลี่ยม (triangular) มีตาข้างบริเวณกาบใบ รากยาวและอวบน้ำ มีระบบรากตื้น ประกอบด้วยรากฝอยที่เจริญจากด้านข้างของราก มีหลายพันธุ์แต่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือกลุ่มที่มีใบเรียบ และกลุ่มที่มีใบหยิกเป็นคลื่น (Thompson and Kelly, 1957)

2. **ดอกและชนิดของดอก (Flower)** ลักษณะดอกปวยเล้งมีหลายชนิด คือมีทั้งที่เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียแยกอยู่คนละต้น และที่เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน แต่การผสมเกสรจะเป็นแบบผสมข้ามดอก ถึงแม้ว่าจะเป็นต้นที่มีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กันก็ตาม เนื่องจากเกสรตัวผู้จะพัฒนาและแก่ก่อนเกสรตัวเมียในดอกเดียวกัน การออกดอกจะตอบสนองต่อวันยาวและสภาพอุณหภูมิสูง (Splittstoesser, 1979)

3. เมล็ด (Seed) แบ่งตามลักษณะของเมล็ดได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ เมล็ดกลม หรือ round seeded spinach (*S. spinosa*) ซึ่งนิยมปลูกในเขตที่มีอากาศหนาวเย็น จัดเป็นเมล็ดแบบ winter type และเมล็ดหนาม หรือ prickly seeded spinach (*S. inermis*) ซึ่งนิยมปลูกในเขตอบอุ่น รวมทั้งในแถบเอเชีย จัดเป็นเมล็ดแบบ summer type (Rubatzky and Yamaguchi, 1997)

2.5 นิเวศวิทยา

1. ดิน ปวยเล้งจะเจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนปนทรายที่มีความอุดมสมบูรณ์สูง ความเป็นกรดด่างของดินประมาณ 6.0 - 6.8 มีการระบายน้ำดี (โครงการหลวง, 2533)

2. อุณหภูมิ ปวยเล้งเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศหนาวเย็น เมล็ดจะไม่งอกถ้าอยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ในสภาพอุณหภูมิสูงต้นปวยเล้งจะมีการเจริญเติบโตช้า เพราะอุณหภูมิสูงทำให้การเจริญเติบโตของลำต้นชะงัก ลำต้นจะสั้นและแคระแกร็น ปกติปวยเล้งจะเจริญเติบโตได้ดีที่ระดับอุณหภูมิ 15.6 – 18.3 องศาเซลเซียส (60 – 65 องศาฟาเรนไฮต์) นอกจากนี้ก็ยังสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิต่ำประมาณ 10 องศาเซลเซียส (50 องศาฟาเรนไฮต์) ส่วนต้นอ่อนของปวยเล้งยังสามารถขึ้นได้ในบริเวณที่เป็นน้ำแข็งอุณหภูมิ –9 องศาเซลเซียส (15 องศาฟาเรนไฮต์)(Yamaguchi, 1978)

3. ปริมาณน้ำฝน ปวยเล้งเป็นพืชที่ต้องการปริมาณน้ำฝนไม่มากนัก โดยจะเจริญเติบโตได้ดีเมื่อมีปริมาณน้ำฝนประมาณ 250 มิลลิเมตรต่อปี ทั้งนี้เพราะสามารถปลูกให้ผลได้ดีในสภาพอากาศหนาวเย็น จึงทำให้พืชจะมีการคายน้ำค่อนข้างช้า (Rubatzky and Yamaguchi, 1997)

4. ระดับความสูงของพื้นที่ การปลูกปวยเล้งสามารถปลูกได้ทุกฤดู แต่ปลูกได้ผลดีในฤดูหนาว ถ้าหากต้องการปลูกในฤดูร้อนและฤดูฝน ควรปลูกที่ระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล 1200 เมตรขึ้นไป (โครงการหลวง, 2533)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการออกดอกของปวยเล้ง

ที่สำคัญได้แก่ ความยาวของช่วงวัน และอุณหภูมิ เนื่องจากทั้งสองปัจจัยนี้สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพภูมิประเทศและฤดูกาล ความยาวของช่วงวันมีความสำคัญต่อการออกดอกของพืชหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชล้มลุก ค่าของจำนวนชั่วโมงที่พืชได้รับแสงแล้วทำให้พืชออกดอกหรือไม่นี้เรียกว่า ช่วงวันวิกฤติ (critical day length) ซึ่งค่าช่วงวันวิกฤตินี้จะต่างกันไปตามชนิดและพันธุ์ของพืช โดยพบว่าปวยเล้ง ซึ่งจัดเป็นพืชวันยาว จะออกดอกเมื่อได้รับแสงยาวนาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กว่าค่าช่วงวันวิกฤติ คือประมาณ 12.5-15 ชั่วโมงซึ่งถ้าหากได้รับช่วงแสงที่สั้น จะเป็นการชะลอการเจริญของดอก (Kim *et al.*, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าพฤติกรรมการออกดอกของพืชที่เกี่ยวข้องกับช่วงแสงนี้ยังมีปัจจัยในเรื่องของ อุณหภูมิ อายุ จำนวนรอบของการได้รับช่วงแสงชักนำ รวมทั้งความไวต่อการตอบสนองต่อช่วงแสงมาเกี่ยวข้องอีกด้วย โดยจะส่งผลให้การตอบสนองเปลี่ยนไปได้ ซึ่งก็พบว่าป่วยเล้งนั้นเป็นพืชที่มีความไวต่อการตอบสนองของช่วงแสงสูงมาก (Berry and Bjorkman, 1980)

3. กระบวนการออกดอกของพืชทั่วไป

เมื่อพืชมีการเจริญเติบโตในส่วนที่ไม่เกี่ยวกับการสืบพันธุ์ เช่น ลำต้น กิ่ง ใบ ไปได้ระยะหนึ่ง จะมีความพร้อมในการออกดอก คือ เนื้อเยื่อเจริญซึ่งเดิมจะเจริญไปเป็นตาใบหรือตากิ่ง จะเปลี่ยนเป็นเจริญไปเป็นตาดอก การเปลี่ยนแปลงเช่นนี้แสดงว่าพืชเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตของส่วนที่ใช้สืบพันธุ์ การออกดอกของพืชอาจเป็นสัญญาณว่าพืชได้เข้าสู่ระยะชรา (senescence) แล้ว เพราะพืชบางชนิดโดยเฉพาะพืชล้มลุก และพืชที่ออกดอกครั้งเดียว เช่น ป่วยเล้ง จะตายภายหลังการเจริญของส่วนที่ใช้สืบพันธุ์เนื่องจากครบวงจรชีวิตแล้ว แต่พืชบางชนิดหลังจากออกดอกแล้วยังกลับมีการเจริญของ ลำต้น กิ่ง ใบ ได้อีก เพราะการชราเกิดเฉพาะบางโครงสร้างเท่านั้น ได้แก่ไม้ผลยืนต้นทั้งหลาย เช่น ลำไย เป็นต้น (Bernier *et al.*, 1981)

กระบวนการในการเกิดดอกนั้นมี 5 ขั้นตอน คือ ระยะชักนำ ระยะที่เซลล์มีความพร้อม ระยะที่เริ่มกำเนิดดอก ระยะที่มีการสร้างอวัยวะต่าง ๆ ของดอก และระยะที่ดอกมีการพัฒนา โดยผลที่เกิดขึ้นในระยะชักนำนั้นจะทำให้เซลล์เนื้อเยื่อเจริญที่ปลายยอดมีความพร้อมในการตอบสนองเพื่อการพัฒนาเข้าสู่ระยะการกำเนิดดอก ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์เนื้อเยื่อเจริญเริ่มขยายตัว ต่อมาก็จะมีการสร้างอวัยวะต่าง ๆ ของช่อดอก โดยจะมีชั้นของกลีบเลี้ยงเจริญขึ้นมาก่อน ตามด้วยชั้นของกลีบดอก ชั้นเกสรตัวผู้ และชั้นเกสรตัวเมีย ซึ่งเป็นชั้นที่ถูกสร้างอยู่บนจุดสูงสุดของเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด ส่วนประกอบเหล่านี้จะเจริญเติบโตไปจนถึงระยะดอกบาน (anthesis) ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของโครงสร้างต่างๆ จนปรากฏให้สังเกตได้ เมื่อดอกถูกสร้างสมบูรณ์แล้วจะพบว่า ไม่มีเซลล์ที่ยังคงมีลักษณะในระยะที่มีการเจริญ (vegetative) เหลืออยู่เลย (McDaniel, 1994)

พืชทั่วไปจะออกดอกได้เมื่อมีความพร้อม นั่นคือ อายุ อาหารสะสม ฮอร์โมนภายในพืช และสภาพแวดล้อมที่พอเหมาะทั้งในเรื่องของ แสง อุณหภูมิ ความชื้นในดิน ทั้งหมดนี้เป็นปัจจัยร่วมกันจะขาดสิ่งใดสิ่งหนึ่งไม่ได้ อย่างไรก็ตาม ในพืชบางชนิดอาจมีข้อยกเว้นแตกต่างกันไป เช่น ลำไย และลิ้นจี่ ที่มีอายุหลายปีก็ไม่สามารถออกดอกได้ในบางปี ทั้งๆ ที่มีสภาพอากาศพอเหมาะ กรณีนี้อาจเกิดจากมีอาหารสะสมภายในต้นไม่เพียงพอ หรืออายุของกิ่งและใบยังไม่พร้อม เช่น ใบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ยังไม่แก่จัดขณะได้รับอากาศเย็น และที่น่าสังเกตคือ ไม้ผลพวกนี้ถ้ามีการออกดอกติดผลมากในปีหนึ่ง จะทำให้เกิดการออกดอกน้อยในปีถัดไป ซึ่งน่าจะเป็นข้อพิสูจน์ได้ว่า อายุของกิ่งและอาหารสะสมภายในกิ่ง มีความสำคัญอย่างมากในการออกดอก (พีรเดช, 2537)

4. ผลของอุณหภูมิต่ำต่อการออกดอกของพืช

กระบวนการที่อุณหภูมิต่ำมีผลไปชักนำให้มีการออกดอกในพืช เรียกว่า เวอร์นาไลเซชัน (vernalization) โดยที่ vernalization แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ตามลักษณะการตอบสนองของพืช ได้แก่ Quantitative หรือ facultative cold requirement และ Absolute หรือ obligate cold requirement (Yaron and Dean, 1998) โดยที่ Quantitative หรือ facultative cold requirement หมายถึงการที่พืชสามารถออกดอกได้เร็วขึ้นเมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำ พืชที่มีการตอบสนองแบบนี้มักเป็นพืชฤดูหนาวที่มีอายุภายในปีเดียว เช่น ป่วยเล้ง ผักกาดหอม และธัญพืชเมืองหนาว เป็นต้น ส่น Absolute หรือ obligate cold requirement หมายถึง การที่พืชสามารถออกดอกได้เมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งถ้าพืชไม่ได้รับอุณหภูมิต่ำเพียงพอตามระยะเวลาดังกล่าวก็จะไม่มีการออกดอก พืชที่มีการตอบสนองแบบนี้ ได้แก่ พืชสองปี และพืชที่มีอายุหลายปี เช่น ลำไย เป็นต้น

กระบวนการเวอร์นาไลเซชัน เกิดขึ้นหลังเมล็ดเริ่มงอก (Lang, 1965) โดยพืชจะมีแหล่งตอบสนองต่อความหนาวเย็นอยู่ที่เนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายยอดของพืช หรือส่วนยอดอ่อนของเอมบริโอ (plumule) ซึ่งโดยปกติแหล่งที่ตอบสนองต่อกระบวนการเวอร์นาไลเซชันจะเกิดขึ้นในบริเวณเซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์อยู่ตลอดเวลา (Wellensiek, 1964) อย่างไรก็ตาม การที่พืชได้รับอุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลายาวนานเกินไป อาจมีผลกระทบต่อการออกดอกได้เช่นกัน คือมีการออกดอกน้อยลงหรือไม่ออกดอกเลย นอกจากนี้การเก็บเมล็ดพืชที่ผ่านกระบวนการเวอร์นาไลเซชันแล้วไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิสูงก็จะส่งผลให้พืชไม่มีการออกดอกได้ด้วย

มีการทดลองเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่ำต่อการออกดอกของพืชหลายชนิด เช่น Burn *et al.* (1993) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่ำต่อการออกดอกของ *Thlaspi arvense* พบว่าการให้อุณหภูมิต่ำที่ 6 องศาเซลเซียส แก่ *Thlaspi* เป็นเวลา 4 สัปดาห์จะมีผลทำให้มีการออกดอกเร็วขึ้น คือมีระยะเวลาที่ใช้ในการออกดอกเพียง 90 วัน ในขณะที่ต้นที่ไม่ได้รับอุณหภูมิต่ำจะมีระยะเวลาที่ใช้ในการออกดอกถึง 170 วัน การทดลองของ กมล (2532) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่ำต่อการออกดอกของผักกาดขาวปลี พบว่า ผักกาดขาวปลีเมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำที่ 5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 วัน หลังออกปลูก จะมีผลทำให้ผักกาดขาวปลีมีการแทงช่อดอกเร็วขึ้น โดยจะออกดอกภายใน 35 วัน ในขณะที่กลุ่มควบคุมซึ่งปลูกในสภาพธรรมชาติจะใช้เวลาในการออกดอกถึง 45 วันหลังออกปลูก ต่อมา โกษิต (2539) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่ำที่ 5 องศาเซลเซียส ต่อการออกดอกของผักกาดขาว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ปลี พบว่าการได้รับอุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลา 15 20 และ 25 วันหลังออกปลูก มีผลทำให้ผักกาดขาวปลีมีลำต้นยืดยาว (bolting) และมีการแทงช่อดอกเกิดขึ้นโดยไม่มีการเข้าปลี นอกจากนี้ยังมีการทดลองของ นพมณีและคณะ (2543) ซึ่งได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่ำต่อการออกดอกของปวยเล้ง พบว่า ปวยเล้งเมื่อได้รับอุณหภูมิต่ำที่ 10 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 และ 20 วัน จะมีผลทำให้ปวยเล้งออกดอกเร็วขึ้น โดยจะออกดอกภายใน 25 วัน ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ปลูกที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาในการออกดอกถึง 36 วัน และการทดลองของ Horvath *et al.* (2003) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่ำต่อการออกดอกของ wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Martonvasar 15) พบว่าการให้อุณหภูมิต่ำที่ 2 องศาเซลเซียส แก่ wheat เป็นเวลา 3 สัปดาห์จะมีผลทำให้มีการออกดอกภายใน 56 วัน และมีเปอร์เซ็นต์การออกดอก 100% ในขณะที่ต้นที่ไม่ได้รับอุณหภูมิต่ำหรือต้นที่ได้รับอุณหภูมิต่ำน้อยกว่า 3 สัปดาห์ จะไม่มีการออกดอกเลย

5. ผลของโพแทสเซียมคลอเรทต่อการออกดอกของพืช

ที่ผ่านมาได้มีการพยายามที่จะหาสารเคมีต่างๆ เพื่อนำมาใช้ชักนำการออกดอกของลำไย เช่น การใช้สารพาโคลบิวทราโซล (ประหยัด, 2529) การใช้เอทธิฟอน และ SADH (succinic acid 2, 2-dimethylhydrazide)(สมศักดิ์, 2527) แต่ก็ไม่ประสบความสำเร็จ จนกระทั่งได้มีการค้นพบโดยบังเอิญ จากการที่ช่างทำดอกไม้ไฟสมัครเล่นชื่อจ่าตำรวจบุญธรรม ที่บ้านศรีโพธาราม ตำบลยางเนิ้ง อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ ได้ล้างถังบรรจุสารที่ใช้เป็นส่วนประกอบของดอกไม้ไฟที่ใต้ต้นลำไย ทำให้ต้นลำไยต้นนั้นออกดอกได้หลังจากนั้นประมาณ 1 เดือน และในเวลาต่อมาจึงทราบกันว่าสารนั้นคือสารโพแทสเซียมคลอเรท (ธวัช, 2542)

เชื่อกันว่าตัวที่กระตุ้นให้ลำไยออกดอกได้นั้นน่าจะเกิดจากส่วนของอนุมูลคลอเรท (ClO_3^-) ไม่ใช่ส่วนของโพแทสเซียม ดังนั้นสารประกอบคลอเรทชนิดอื่นจึงน่าจะให้ผลเช่นเดียวกัน เช่น สารโซเดียมคลอเรท ซึ่งนักวิจัยของกรมวิชาการเกษตร ได้ทดลองใช้สารนี้กับต้นลำไยแล้วพบว่าสามารถกระตุ้นให้ต้นลำไยออกดอกได้ด้วย (พาวิน, 2543) สารโพแทสเซียมคลอเรท (Potassium Chlorate ; $KClO_3$) มีคุณสมบัติเป็นของแข็ง ถ้าอยู่ในรูปผลึกใสจะไม่มีสี เมื่อนำมาบดเป็นผงจะมีสีขาว ละลายน้ำได้ดี โดยสาร 1 กรัม สามารถละลายน้ำได้หมดในน้ำปริมาตร 16.5 มิลลิลิตร และละลายหมดในน้ำเดือดในปริมาตรเพียง 1.8 มิลลิลิตร สารนี้มีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์อย่างแรง คือเป็นสารที่ให้ออกซิเจนในปฏิกิริยาออกซิเดชั่น จึงมีการนำสารมาใช้ในการทำดอกไม้ไฟ ทำไม้ขีดไฟ ชนวนจุดระเบิด สีย้อม การฟอกหนังตลอดจนการฆ่าเชื้อโรค (Hawley, 1981) สารนี้มีค่าจุดเดือด 400 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว 368 องศาเซลเซียส น้ำหนักโมเลกุล 122.55 และมีค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 2.32

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การให้สารโพแทสเซียมคลอเรทแก่ต้นลำไยทำได้หลายวิธี เช่น การให้สารทางดินซึ่งมีทั้งการผสมน้ำราด หรือการโรยสารใต้ทรงพุ่ม จากการศึกษาของ พาวิน และคณะ (2542) ซึ่งได้รายงานการให้สารโพแทสเซียมคลอเรทแก่ต้นลำไยพันธุ์ดออายุ 10 ปี โดยการโรยสารรอบทรงพุ่มแล้วให้น้ำตามในอัตรา 40 กรัมต่อตารางเมตร พบว่าสามารถทำให้ลำไยแทงช่อดอกออกมามากที่สุดหลังจากการให้สารไปแล้ว 25 วัน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของโพแทสเซียมคลอเรทต่อการออกดอกของลำไยอายุ 4 ปี พบว่าการให้สารในอัตรา 8 และ 12 กรัมต่อตารางเมตร สามารถกระตุ้นการแทงช่อดอกได้ 90-100 % ภายในเวลา 21 วัน ในขณะที่ต้นที่ไม่ได้รับสารจะไม่มีการแทงช่อดอก แม้จะถึงฤดูกาลออกดอกตามปกติแล้วก็ตาม แต่จะมีการผลิใบอ่อนออกมาแทน นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาหาระยะการพัฒนาของใบกับการกระตุ้นการออกดอกของลำไย โดยการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรท พบว่าระยะใบที่เหมาะสมที่สุดในการให้สารเพื่อกระตุ้นให้ลำไยออกดอก คือ ระยะใบแก่อายุประมาณ 40-45 วัน หรืออย่างน้อยที่สุดควรอยู่ในระยะเพสลาด อายุใบประมาณ 20-25 วัน

ต่อมาชิติ และคณะ (2542) ได้ศึกษาการให้สารโพแทสเซียมคลอเรทแก่ต้นลำไยโดยการราดสารบริเวณใต้ทรงพุ่ม และการพ่นสารทางใบ ซึ่งได้ทดลองให้สารดังกล่าวแก่ต้นลำไยพันธุ์ดออายุ 10 ปี โดยการราดสารบริเวณใต้ทรงพุ่ม ในอัตรา 2.5, 5.0 และ 10.0 กรัมต่อตารางเมตรละลายในน้ำ 20 ลิตร พบว่ามีการออกดอกขึ้นโดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อตารางเมตร ที่พบว่าทำให้เกิดการออกดอกมากที่สุด นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของโพแทสเซียมคลอเรทโดยการพ่นทางใบในอัตราความเข้มข้น 1000, 2000 และ 3000 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ายิ่งความเข้มข้นสูงยิ่งทำให้มีการออกดอกมาก แต่อย่างไรก็ตามการให้สารในความเข้มข้นสูงๆ ก็มีผลทำให้เกิดอัตราการไหม้ของใบเพิ่มขึ้นด้วย

นอกจากการให้สารโพแทสเซียมคลอเรทโดยการโรย การราด และการพ่นทางใบแล้ว วินัย และคณะ (2542) ได้ศึกษาการให้สารโดยการฉีดเข้าทางกิ่งลำไย โดยได้ทดลองกับลำไยพันธุ์สีชมพูอายุ 10 ปีในอัตราความเข้มข้น 0.025 , 0.05 และ 0.25 กรัม ต่อเส้นผ่าศูนย์กลางกิ่ง 1 เซนติเมตร พบว่าที่ความเข้มข้น 0.025 และ 0.25 กรัมสามารถกระตุ้นให้ลำไยออกดอกได้ ซึ่งถ้าเปรียบเทียบกับการให้สารทางดินแล้วจะใช้ในอัตราต่ำกว่ามาก ซึ่งอัตราที่เหมาะสมในการให้ทางดินคือ 1 กรัมต่อตารางเมตร

นอกจากการใช้สารโพแทสเซียมคลอเรทในการชักนำการออกดอกของลำไยแล้ว ปัจจุบันพบว่าสารนี้สามารถชักนำให้เกิดการออกดอกของพืชบางชนิด โดยเฉพาะพืชที่ต้องการอุณหภูมิต่ำในการชักนำการออกดอก เช่น ในงานทดลองของ นพมณี และคณะ (2543) ได้ทดลองให้สารโพแทสเซียมคลอเรท ความเข้มข้น 25 125 250 และ 500 μM ให้แก่ ป่วยเล้ง พบว่า สารดังกล่าว

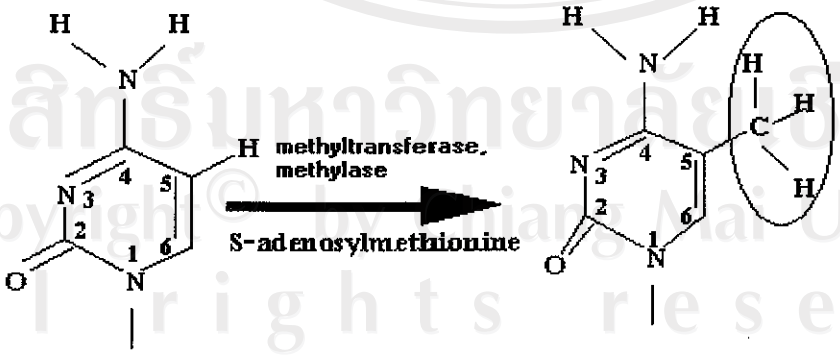
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สามารถเร่งการออกดอกของปวยเล้งได้เร็วขึ้น และเพิ่มเปอร์เซ็นต์ต้นที่ออกดอกได้สูงขึ้น ในขณะที่ต้นที่ไม่ได้รับสารจะออกดอกช้าและมีเปอร์เซ็นต์ต้นที่ออกดอกต่ำ ต่อมาในปี 2544 นพมณี และคณะ ก็ได้ทดลองใช้สารโพแทสเซียมคลอเรทที่ความเข้มข้นเดียวกัน ในการชักนำการออกดอกของผักกาดขาวปลี ซึ่งพบว่าสารดังกล่าวมีผลทำให้ต้นผักกาดขาวปลีมีการเข้าปลีหลวมและมีเปอร์เซ็นต์ต้นที่แทงช่อดอกสูง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งจะมีการเข้าปลีแน่น ออกดอกช้า และมีเปอร์เซ็นต์ต้นที่แทงช่อดอกต่ำ

แม้ว่าสารโพแทสเซียมคลอเรทจะสามารถเร่งการออกดอกของพืชบางชนิดได้ แต่กลไกในการที่สารดังกล่าวไปมีผลทำให้พืชออกดอกได้โดยไม่ต้องผ่านความหนาวเย็นนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่สันนิษฐานว่าอาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA methylation ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนในระดับทรานสคริปชัน (transcription)

6. DNA methylation

DNA methylation เป็นกระบวนการที่เอนไซม์เมทิลทรานสเฟอเรส (methyltransferase) หรือเมทิลเลส (methylase) ทำการเคลื่อนย้ายหมู่อนุมูลเมทิลไปต่อยังเบสของนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่าง ๆ โดยมี S-adenosylmethionine เป็นตัวให้หมู่อนุมูลเมทิล ซึ่งส่วนมากมักเกิดที่เบส cytosine ทำให้ได้เป็น 5 – methylcytosine (ภาพ 1) เมื่อดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลงเบสจาก cytosine เป็น 5-methylcytosine จะส่งผลทำให้ดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงโครงสร้างไปจาก B – form กลายเป็น Z – form ซึ่งส่งผลต่อการจับกันระหว่างดีเอ็นเอและโปรตีนที่จับกับดีเอ็นเอ การเปลี่ยนแปลงนี้จะส่งผลกระทบโดยตรงต่อการแสดงออกของยีน (Adams and Burdon, 1985)



Cytosine **5-methylcytosine**

ภาพ 1 การเติมหมู่เมทิลบนเบส cytosine ในกระบวนการ DNA methylation

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ในพืชชั้นสูง จะพบ 5-methylcytosine มากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ของ cytosine ทั้งหมด ซึ่งจะมีการกระจายตัวแบบสุ่มโดยจะพบทั้งที่บริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะที่เป็น CpG dinucleotides และในบริเวณที่เป็น CpNpG trinucleotides (เมื่อ N คือเบส A G C หรือ T) (Gruenbaum *et al.*, 1982) และพบว่า ปริมาณของ 5-methylcytosine ในพืชจะมีมากน้อยแตกต่างกันไปตามชนิดพืช และชนิดของเนื้อเยื่อพืชด้วย ซึ่งปริมาณของ 5-methylcytosine ในดีเอ็นเอพืชนี้จะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน (Adams and Burdon, 1985) ส่วนในสัตว์ จะพบ 5-methylcytosine เพียง 8 เปอร์เซ็นต์ของ cytosine ทั้งหมด โดยที่ 90 เปอร์เซ็นต์ 5-methylcytosine จะเกิดในลำดับนิวคลีโอไทด์จำเพาะคือ CpG dinucleotides ซึ่งรูปแบบของ DNA methylation จะมีลักษณะจำเพาะต่อเนื้อเยื่อ (Razin and Cedar, 1991) นอกจากนี้ยังพบว่ารูปแบบการเกิด DNA methylation ในสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตนั้น สามารถถูกถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ด้วย (Holliday, 1987)

ได้มีรายงานการใช้สารเคมีที่มีชื่อว่า 5-azacytidine (5-AzaC) ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเกิด DNA methylation ได้ สารดังกล่าวมีลักษณะเป็น nucleoside analog ที่มีเบสเป็น 5-methylcytosine ซึ่งเป็น analog ของ cytosine ต่างกันที่ตำแหน่งที่ 5 ของ pyrimidine ring โดยจะเป็นคาร์บอนใน cytosine และเป็นไนโตรเจน ใน 5-azacytosine (Santi *et al.*, 1983) เมื่อ nucleoside analog นี้เข้าไปรวมเป็นส่วนหนึ่งของสายดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นใหม่แทน cytosine จะมีผลทำให้ไม่สามารถถูกเติมอนุมูลเมทิลเป็น 5-methylcytosine ทำให้เซลล์ที่ได้รับ 5-azacytidine มีระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทิลที่ genomic DNA ลดลง เรียกว่าเกิด demethylation (Santi *et al.*, 1983) อย่างไรก็ตาม การใช้สาร 5-azacytidine ในการยับยั้งกระบวนการ DNA methylation นี้ ก็มีข้อพึงระวังเช่นกัน เนื่องจากสารดังกล่าวจัดเป็นสารเคมีที่มีพิษต่อเซลล์ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัณฐานของโครโมโซมได้ (Shafer and Priest, 1984)

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวกับการใช้สาร 5-azacytidine ในการลดระดับการเติมหมู่เมทิลในสายดีเอ็นเอ เช่น งานวิจัยของ Sano *et al.* (1990) ซึ่งได้ทดลองให้สาร 5-azacytidine แก่เมล็ดข้าวที่กำลังงอก ความเข้มข้น 0.3 mM พบว่า สารดังกล่าวมีผลทำให้ความสูงของต้นข้าวลดลง 15 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติที่ไม่ได้รับสาร นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณของ 5-methylcytosine ของกลุ่มที่ได้รับสารมีค่าลดลง 16 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับต้นปกติที่ไม่ได้รับสาร จากการทดลองจึงสรุปได้ว่า สาร 5-azacytidine สามารถลดระดับการเติมหมู่เมทิลของ genomic DNA ได้ ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของยีน ซึ่งมีผลลดระดับความสูงของต้นข้าว นอกจากนี้ยังพบว่าการเกิดลักษณะต้นเตี้ย และการลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทิลนี้สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลานได้ด้วย ต่อมา Sano and Youssefian (1991) ได้ศึกษาเพิ่มเติมในข้าวที่ได้รับสาร 5-azacytidine โดยทำการตรวจสอบยีนที่ได้รับผลกระทบจากการได้รับสาร พบว่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ในข้าวที่เกิดลักษณะต้นเตี้ย มีการแสดงออกของยีน *rgp*1 ต่ำกว่าในข้าวปกติที่ไม่ได้รับสาร แสดงว่าการเติมหมู่อนุมูลเมทธิลในสายดีเอ็นเอ อาจมีผลกระทบโดยตรงหรือโดยอ้อมต่อการแสดงออกของยีน *rgp*1 และโปรตีนที่สร้างจากยีน *rgp*1 นี้อาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการและการเจริญเติบโตของพืชชนิดนี้ ต่อมา Cherdshewasart *et al.* (1998) ได้ทดลองให้สาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 25 μM แก่เมล็ดข้าว (*Indica* rice) 3 cultivars ได้แก่ RD23 LPT123 และ KDML105 พบว่าต้นข้าวที่ได้รับสารเกิดลักษณะต้นเตี้ย และมีจำนวนกอมาก ทั้งยังมีปริมาณของ 5-methylcytosine ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งลักษณะเหล่านี้มีการถ่ายทอดไปยังรุ่น M_1 และ M_2 ด้วย

Prakash and Kumar (1997) ได้ทดลองเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ (leaf disks) ของพิทูเนีย ในสภาพปลอดเชื้อ ในอาหารสูตร SI medium ที่มีการผสมสาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 5 10 20 และ 50 μM พบว่าสาร 5-azacytidine โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นสูง มีผลไปลดการเกิด shoot bud ของ leaf disk ลดความยาวของ internode และยังมีผลทำให้น้ำหนักสดของ leaf disk ลดลงซึ่งมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสาร 60 – 80 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มที่ได้รับสารมีการลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทิลในสายดีเอ็นเอ หรือเกิด DNA hypomethylation ขึ้นด้วย ต่อมาในปี 2542 แก้วกาญจน์ และ วิชัย ได้ทดลองเพาะเมล็ดพิทูเนียในสภาพปลอดเชื้อ ในอาหารสูตร MS medium ที่มีการผสมสาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 50 100 200 และ 400 μM เป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วย้ายออกปลูกในแปลงทดลอง พบว่า สีกลีบดอกผิดปกติ และความสูงของต้นลดลง และมีการลดระดับการเติมหมู่อนุมูลเมทิลในสายดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร

7. ผลของ 5-azacytidine ต่อการออกดอกของพืช

Burn *et al.* (1993) ได้ทดลองเปรียบเทียบ การให้อุณหภูมิต่ำ (cold treatment) และการให้สาร 5-azacytidine เพื่อชักนำให้เกิดการออกดอกในพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Arabidopsis thaliana* และ *Thlaspi arvense* ซึ่งเป็นพืชที่ต้องอาศัยอุณหภูมิต่ำในการชักนำการออกดอก พบว่าทั้ง cold treatment และ 5-azacytidine มีผลไปลดระดับ 5-methylcytosine ใน DNA หรือมีผลไปยับยั้งกระบวนการ DNA methylation ส่งผลให้ออกดอกเร็วขึ้น เนื่องจาก DNA methylation มีผลต่อยีนที่ควบคุมการออกดอกในระดับ transcription ต่อมา Finnegan *et al.* (1998) ได้ทำการส่งถ่าย methyltransferase (METI) antisense gene เข้าไปใน genome ของ *Arabidopsis* ซึ่งเป็นการลดระดับการเกิด DNA methylation ลง มีผลทำให้เกิดการออกดอกเร็วขึ้นโดยไม่ต้องผ่านความหนาวเย็น และเมื่อนำ transgenic plants ที่ได้รับ antisense gene ดังกล่าวมาปลูกในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำ ก็พบว่าพืชสามารถตอบสนองต่ออุณหภูมิต่ำได้ดีกว่า คือออกดอกเร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติ แสดงว่าทั้ง cold treatment และ demethylation จะมีกลไกการทำงานที่เสริมกันซึ่งมีผลทำให้เกิดการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ออกดอกเร็วยิ่งขึ้น ต่อมาในปี ค.ศ. 1999 Demeulemeester *et al.* ได้ทดลองเลี้ยงชิ้นส่วนเนื้อเยื่อพืชบริเวณราก (root explants) ของต้น chicory (*Chicorium intybus* L. var *foliosum* cv Flash) ในสภาพปลอดเชื้อ ใน standard medium ที่มีการผสมสาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 100 μM โดยที่ชิ้นส่วนของรากที่จะนำมาเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อนี้ ได้ผ่านการได้รับและไม่ได้รับอุณหภูมิต่ำที่ 5 องศาเซลเซียสมาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนที่จะทำการตัดเอาชิ้นส่วนดังกล่าวมาใช้เป็นชิ้นส่วนตั้งต้น ผลการทดลองพบว่า การให้สาร 5-azacytidine มีผลไปเพิ่มเปอร์เซ็นต์การออกดอกชิ้นส่วนตั้งต้นที่ผ่านการได้รับอุณหภูมิต่ำมาก่อน แต่มีผลไปเพิ่มเปอร์เซ็นต์การออกดอกเพียงเล็กน้อยชิ้นส่วนตั้งต้นที่ไม่ผ่านการได้รับอุณหภูมิต่ำมาก่อน สอดคล้องกับงานทดลองก่อนหน้านี้ที่ว่าผลของอุณหภูมิต่ำและ demethylation มีผลส่งเสริมกัน เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Horvath *et al.* (2003) ซึ่งได้ศึกษาผลของ 5-azacytidine (50 μM) และอุณหภูมิต่ำ (2 °C) ต่อระดับ 5-methylcytosine และการออกดอกของ Wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Martonvasar 15) พบว่า การให้สาร 5-azacytidine ประกอบกับการให้อุณหภูมิต่ำ จะมีผลไปลดระดับของ 5-methylcytosine ใน wheat ซึ่งจะส่งผลให้มีการออกดอกเร็วขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการให้สาร 5-azacytidine เพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการให้อุณหภูมิต่ำด้วย จะไม่สามารถชักนำให้ wheat ออกดอกเร็วขึ้นได้ แม้ว่าจะมีผลไปลดระดับของ 5-methylcytosine ก็ตาม

ต่อมาในปี พ.ศ. 2543 นพมณี และคณะได้ศึกษาผลของสาร 5-azacytidine ในการชักนำการออกดอกของปวยเล้ง และผักกาดขาวปลี พบว่าสารดังกล่าวสามารถเร่งการออกดอกของปวยเล้งและผักกาดขาวปลีได้เร็วขึ้น และมีเปอร์เซ็นต์ต้นที่ออกดอกสูงขึ้นเช่นเดียวกับต้นที่ได้รับอุณหภูมิต่ำและการได้รับสารโพแทสเซียมคลอเรท ดังได้กล่าวไปแล้วข้างต้น จากงานวิจัยที่ผ่านมาของนพมณีและคณะ ทำให้ทราบว่า การใช้อุณหภูมิต่ำ การใช้สารโพแทสเซียมคลอเรท และการใช้สาร 5-azacytidine ให้ผลคล้ายคลึงกันคือส่งผลให้เกิดการออกดอกเร็วขึ้นใน ปวยเล้ง และผักกาดขาวปลี ได้ ดังนั้นจึงเป็นที่มาของสมมุติฐานที่ว่ากลไกการทำงานของสารโพแทสเซียมคลอเรทในการชักนำการออกดอก อาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA methylation

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. การตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation ในพืช

8.1 Reverse-phase high-performance liquid chromatography

จัดเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงระดับ cytosine methylation ทั้ง genome โดยการ hydrolyse DNA ด้วย DNase I และ nuclease PI (Kuo *et al.*, 1980) หรือ hydrolyse ด้วย snake venom phosphodiesterase (Gomes and Chang, 1983) ตามด้วย alkaline phosphatase treatment แล้วแยกองค์ประกอบของ deoxyribonucleosides โดยใช้ standard reverse-phase HPLC หลังจากนั้นจึงวิเคราะห์ชนิดของเบส ด้วย UV absorbance detector ที่ค่าการดูดกลืนแสง 254 และ 280 นาโนเมตร ซึ่ง detector ดังกล่าวจะทำการตรวจจับนิวคลีโอไทด์ที่วิ่งผ่าน แล้วแปลออกมาเป็นสัญญาณไฟฟ้า ก่อนที่จะบันทึกลงบน chart recorder หรืออาจเชื่อมต่อเข้ากับระบบคอมพิวเตอร์โดยตรง เพื่อวิเคราะห์และประมวณผลต่อไป นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ reverse-phase HPLC ร่วมกับ mass spectrometry เพื่อความถูกต้องแม่นยำมากขึ้นด้วย (Del Gaudio *et al.*, 1997) การตรวจสอบ DNA methylation โดยวิธี reverse-phase HPLC เป็นวิธีที่ใช้ปริมาณ DNA ค่อนข้างน้อย คือประมาณ $< 1\ \mu g$ จึงสะดวกในการวิเคราะห์ตัวอย่างทั่วๆไป แต่อย่างไรก็ตามก็อาจเกิดปัญหาได้ในกรณีที่มีจำนวนเซลล์น้อยๆ เช่น ในกรณีของ paraffin-embedded histological samples เป็นต้น

การทดลองที่นำ HPLC ไปใช้ในการตรวจสอบ DNA methylation เช่น การทดลองของ Burn *et al.* (1993) ซึ่งได้ตรวจสอบการเกิด DNA methylation ใน *Arabidopsis* และ *Thlaspi* หลังการได้รับอุณหภูมิต่ำ (4 °C) และสาร 5-azacytidine (50 μM) ซึ่งส่งผลให้มีการออกดอกเร็วขึ้น ผลที่ได้จากการทำ HPLC พบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิด DNA methylation ลดลง 37% และ 55% หลังการได้รับสาร 5-azacytidine เป็นเวลา 4 วัน และ 9 วัน ตามลำดับ ส่วนการได้รับอุณหภูมิต่ำมีผลไปลดเปอร์เซ็นต์การเกิด DNA methylation ลง 22% การทดลองของ Jaligot *et al.* (2000) ได้ใช้ HPLC ในการศึกษาการเกิด somaclonal variation ใน oil palm (*Elaeis guineesis* Jacq.) ที่คาดว่าเป็นผลมาจากกระบวนการ DNA methylation อันส่งผลให้เกิดต้นที่มีลักษณะผิดปกติขึ้น จากผลการทดลองพบว่า global methylation ใน DNA จากส่วนใบของต้นที่ผิดปกติ มีเปอร์เซ็นต์การเกิด methylation ต่ำกว่าต้นปกติ 0.5-2.5% นอกจากนี้ยังมีการทดลองของ Horvath *et al.* (2003) ซึ่งใช้ HPLC ในการศึกษา DNA methylation ใน wheat (*Triticum aestivum* L., cv.Martonvasar 15) เปรียบเทียบกัน ก่อนและหลังการได้รับ อุณหภูมิต่ำ (2 °C) และการได้รับสาร 5-azacytidine (50 μM) พบว่า ทั้งอุณหภูมิต่ำ และสาร 5-azacytidine มีผลไปลดเปอร์เซ็นต์การเกิด DNA methylation ได้พอๆ กัน คือมีเปอร์เซ็นต์ methylation ลดลง 13.5% เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนได้รับอุณหภูมิต่ำ และสาร 5-azacytidine

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

8.2 Thin-layer chromatography

วิธีการนี้ได้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) คือ *Msp*I ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ (recognition site) CCGG โดย *Msp*I จะตัดได้ไม่ว่า internal C จะถูก methylated หรือไม่ หลักการในการตรวจสอบคือ ทำการ lebel 5'phosphate ของ internal C ด้วย [γ^{-32}P]ATP และ polynucleotide kinase (Bestor *et al.*, 1984 ; Schmitt *et al.*, 1997) แล้ว hydrolyse DNA ให้เป็น mononucleotide โดยใช้ nuclease PI จากนั้นจึงแยกองค์ประกอบบน cellulose thin-layer chromatography plates (Kuchino *et al.*, 1987 ; schmitt *et al.*, 1997) โดยใช้ isobutyric acid : ammonia : water (66 :1 : 33 v/v/v) เป็น first dimension solution และใช้ isopropanol : 37% HCL : water (70 : 15 : 15 v/v/v) เป็น second dimension solution แล้วทำการวิเคราะห์ความเข้มของจุด (spots) ที่เกิดขึ้นโดยใช้ Molecular Dynamics PhophorImager แต่ละ spot ที่เกิดขึ้นสามารถยืนยันได้โดยทำ control plates ซึ่งมี deoxycytosine monophosphate (dCMP) หรือ deoxy-5-methyl cytosine monophosphate (d^mCMP) marker สำหรับใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความเข้มของ C spots และ m5C spots ก็จะทราบถึงสัดส่วนของ *Msp*I sites ที่ถูก methylated ใน genome ได้ ตามทฤษฎีแล้วจะต้องเกิด spot เฉพาะตำแหน่ง C และ m5C เท่านั้น แต่ในการทดลองจริงอาจพบ spot ของ A G และ T ได้ด้วย เนื่องจากการเกิด random nicks ใน DNA ซึ่งเบสเหล่านี้อาศัยแรงชนิดเดียวกัน จึงอาจทำให้ถูก lebel ได้ด้วย การ digest DNA ให้กลายเป็น deoxynucleosides ก่อนทำการ lebel นั้นไม่ควรทำอย่างยิ่ง เนื่องจากจะทำให้ C spot มีความแรงมากกว่า ซึ่งจะไปขัดขวางการเกิด m5C spot ได้ ในขณะเดียวกันควรจะ run control plate ควบคู่ไปด้วย โดยที่ใน control plate นี้จะไม่ digest DNA ด้วย *Msp*I ในที่นี้ก็เพื่อง่ายแก่การวิเคราะห์หา nonspecific C และ m5C signals การคำนวณหาปริมาณ m5C ทำได้โดยการแทนค่าจากสูตร $d^mCMP / (d^mCMP + dCMP)$

การทดลองที่ใช้หลักการของ TLC ไปใช้ในการตรวจสอบ DNA methylation เช่น การทดลองของ Finnegan *et al.* (1996) ได้ใช้วิธี TLC ในการวัดระดับของ cytosine methylation ใน DNA ของ *Arabidopsis* ที่ผ่านการส่งถ่าย antisense construct ของ *Arabidopsis* methyltransferase cDNA (METI) เปรียบเทียบกับ *Arabidopsis* ที่ไม่ได้ผ่านการส่งถ่าย (wild type) พบว่าลูกที่เกิดจากต้นที่ผ่านการส่งถ่าย 5 ต้น มีระดับของ cytosine methylation ลดลง โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 10-100% ของ wild type

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8.3 *Sss*I methyltransferase

เอนไซม์ *Sss*I methyltransferase สามารถเร่งปฏิกิริยา *de novo* methylation ของ CpG sites ได้ (Shapiro *et al.*, 1970b) ซึ่งหลักการของการตรวจสอบ DNA methylation โดยวิธี *Sss*I methyltransferase คือ เอนไซม์ดังกล่าวจะถูกใช้ในการเคลื่อนย้าย tritium-lebelled methyl group จาก SAM ซึ่งเป็นตัวให้อนุมูลเมทิล ไปยังเบส cytosine ใน CpG sites ของ genomic DNA (Wu *et al.*, 1993 ; Schmitt *et al.*, 1997) จากนั้นจึงแยกเอาส่วนของ unincorporated SAM ออกจาก DNA โดยใช้ DEAE paper เนื่องจาก DNA จะไม่สามารถเคลื่อนที่บน DEAE paper ได้ จึงทำให้สามารถแยกเอาส่วนของ SAM ออกไปได้ สำหรับปริมาณของ incorporation (cytosine + tritium-lebelled methyl group) จะสามารถวัดได้โดยใช้ scintillation counter เพื่อคำนวณหาค่า normalised methylation index (NMI) โดยคำนวณได้จากสูตร NMI = (Q_{METH}sample/[DNA]sample)/ (Q_{METH}standard/[DNA]standard) เมื่อ Q_{METH} คือ ปริมาณของ incorporation ระหว่าง cytosine กับ trituim-lebelled methyl group และ [DNA] คือความเข้มข้นของ DNA ของ sample ที่ต้องการตรวจสอบ และของ standard ที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ถ้าค่า NMI มีค่าน้อยกว่า 1 แสดงว่า sample ที่นำมาตรวจสอบเกิด methylation ขึ้นมากกว่า standard วิธีการนี้สามารถใช้ในการหาปริมาณการเกิด methylation แม้มีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยได้ แต่อย่างไรก็ตามค่าที่วัดได้จากการทดลองแต่ละครั้งอาจคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากทั้ง SAM และ *Sss*I มีสถานะไม่คงที่ ซึ่งพบว่าค่าที่ได้จากการวัดค่าของแต่ละซ้ำของการทดลองมีความคาดเคลื่อนเกิดขึ้น 5% และพบว่าถ้าทำการทดลองต่างวันกัน ความคาดเคลื่อนอาจเกิดขึ้นสูงถึง 50% ข้อเสียอีกประการหนึ่งของวิธี *Sss*I คือในระหว่างขั้นตอนการวัดปริมาณของ DNA ในกรณีบางตัวอย่างที่ DNA ละลายได้ยาก ซึ่งจะส่งผลให้ค่าที่ได้จากการวัด OD_{260} มีค่าไม่ถูกต้อง ซึ่งมีวิธีแก้ไขคือ การ digest DNA ด้วย restriction enzyme ที่ไม่มี CpG sequence อยู่ในตำแหน่งจดจำของมัน จากนั้นทำ phenol-chloroform extraction อีกครั้งก่อนนำไปวัดปริมาณ DNA เนื่องจากการ digest จะมีผลไปลดความหนืดของ DNA และทำให้เกิดการละลายได้มากขึ้น

มีการนำหลักการของ *Sss*I methyltransferase มาใช้ในการตรวจสอบ DNA methylation เช่น การทดลองของ Jaligot *et al.* (2000) ซึ่งได้ศึกษาการเกิด somaclonal variation ใน oil palm (*Elaeis guineesis* Jacq.) ที่คาดว่าเป็นผลมาจากกระบวนการ DNA methylation อันส่งผลให้เกิดต้นที่มีลักษณะผิดปกติขึ้น โดยในการทดลองนี้ได้ใช้วิธี *Sss*I methylase accepting assay ซึ่งใช้เอนไซม์ *Sss*I methylase แทน *Sss*I methylatransferase เนื่องจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดต่างก็ทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายหมู่เมทิลเหมือนกัน จากผลการทดลองพบว่า ต้นที่เกิดลักษณะผิดปกติมีค่า NMI เท่ากับ 1.08 ในขณะที่ต้นปกติมีค่า NMI เท่ากับ 0.67 ซึ่งจะเห็นว่าในต้นที่มีลักษณะผิดปกติ มีค่า NMI

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มากกว่า 1 แสดงว่ามีระดับการเกิด methylation ต่ำ และเมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติก็พบว่ามีระดับ methylation ต่ำกว่าต้นปกติถึง 60%

8.4 The chloroacetaldehyde reaction

จัดเป็น fluorescent assay ในการวัดระดับของ DNA methylation (Oakley *et al.*, 1999) ซึ่ง DNA จะถูก depurinated โดยการ treat ด้วย sulphuric acid จากนั้นส่วนของ purines จะถูกแยกออกมาโดยการตกตะกอนด้วย silver หรืออาจใช้ column chromatography ในส่วนของ depurinated DNA ที่ได้อาจนำมาทำปฏิกิริยากับ sodium bisulphite ซึ่งจะเปลี่ยน dC ไปเป็น dU แต่จะไม่มีผลไปเปลี่ยน dm5C (Frommer *et al.*, 1992) หลังจากนั้นจึงนำเอา sample ที่ได้ไปบ่มกับ chloroacetaldehyde เพื่อให้มีการสร้าง ethenocytosine ที่เป็นอนุพันธ์ (derivative) ของ m5C ซึ่งจะมีการเรืองแสงให้แสงเป็นสีม่วงเมื่อส่องดูภายใต้เครื่อง fluorimeter และสามารถบอกสัดส่วนของระดับ m5C ใน genome ได้ วิธีการนี้สามารถใช้ในการวัดปริมาณ m5C ได้ในทุกๆ sequence context เนื่องจากทั้ง chloroacetaldehyde และ DNA sample จะไม่มีการเรืองแสง แต่อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการแยกเอาส่วนของ purines ออก เนื่องจาก dA สามารถทำปฏิกิริยากับ chloroacetaldehyde แล้วทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้นได้เช่นกัน ข้อเสียของวิธีการนี้คือ เป็นวิธีที่ค่อนข้างใช้เวลานานในการ incubation คือใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง หรือ overnight ข้อเสียอีกประการหนึ่งคือ chloroacetaldehyde มีความเป็นพิษสูง ดังนั้นจึงต้องใช้ความระมัดระวังอย่างมาก และควรทำการทดลองในตู้ควัน

8.5 Ligation-mediated polymerase chain reaction / hydrazine reaction / permanganate reaction

มีวิธีการคือ treat DNA ด้วย hydrazine ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยา hydrazinolysis ที่เบส C และ T แต่จะไม่เกิดที่ m5C ทำให้สามารถ identify m5C ได้จากการไม่ปรากฏ band เมื่อตรวจสอบจาก sequencing ladder (Pfeifer *et al.*, 1989) อีกวิธีหนึ่งอาจ treat DNA ด้วย permanganate ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation ขึ้นในสภาพที่เป็นกรด (pH 4.1) ซึ่งในปฏิกริยานี้ m5C และ T จะ sensitive ต่อ permanganate oxidation ทำให้ตำแหน่งดังกล่าวถูกตัดได้เมื่อเกิดปฏิกิริยา pyridinilysis ขึ้นในเวลาต่อมา ซึ่งจะปรากฏ band ของ m5C ขึ้น (Fritzsche *et al.*, 1987) ในหลักการแล้ว ทั้งวิธี hydrazine reaction และ permanganate reaction มีประสิทธิภาพเท่าเทียมกัน แต่ในทางปฏิบัติพบว่าควรหลีกเลี่ยงวิธี permanganate reaction เนื่องจากปฏิกิริยาระหว่าง permanganate และ m5C จะเกิดได้ต้องอาศัย sequence context ที่จำเพาะเจาะจง และจะเกิดได้ดีในสภาพที่สามารถแยก C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ออกจาก m5C ได้อย่างชัดเจนเท่านั้น (Rubin and Schmid, 1980 ; Fritzsche *et al.*, 1987) ในขณะที่ hydrazine reaction จะให้ผลที่ค่อนข้างชัดเจนกว่า เมื่อได้ product จากปฏิกิริยาดังกล่าวแล้ว ก็จะนำ product ที่ได้ไปใช้ในการทำ ligation-mediated-PCR โดยใช้ gene-specific primer และ linker primer ซึ่งจะ anneal เข้ากับ linker ที่ lagate เข้าไปที่ปลายสาย DNA ตรงตำแหน่งที่ถูกตัด ส่วนการวิเคราะห์ผลก็ทำได้โดยการนำ product ที่ได้ไปทำ sequencing ต่อไป

การทดลองที่นำ hydrazine reaction และ permanganate reaction ไปใช้ในการตรวจสอบ DNA methylation เช่น การทดลองของ Rein *et al.* (1997) ได้ศึกษาการเกิด densely methylated island (DMI) ที่ตำแหน่ง *ori-β* locus ซึ่งมีระยะห่าง 17 kilobases downstream จากยีน *dhfr* ในโครโมโซมของเซลล์รังไข่ของ Chinese hamster DMI เป็นบริเวณที่มีการเกิด cytosine methylation สูงมาก ซึ่งมีรายงานว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะเกิด DMI ขึ้นที่บริเวณจุดเริ่มต้นของการเกิด DNA replication (origins of DNA replication) แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของกระบวนการ DNA methylation ที่มีผลควบคุมการเกิดกระบวนการ DNA replication ภายในเซลล์ อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้จากการทดลองนี้ กลับพบว่า มีเซลล์ที่เกิด cytosine methylation ขึ้น 2% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด และสามารถตรวจพบ cytosine ที่ถูก methylated ในตำแหน่ง DMI เพียงหนึ่งตำแหน่งเท่านั้น

8.6 The sodium bisulphite reaction

เป็นวิธีที่สามารถใช้ identify m5C ได้ไม่ว่าจะมี sequence context แบบใด วิธีการนี้ได้ถูกอธิบายขึ้นในปี 1970 (Hayatsu *et al.*, 1970 ; Shapiro *et al.*, 1970a, 1970b) โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่าง sodium bisulphite และ pyrimidine ทำให้เกิดปฏิกิริยา sulphonation ขึ้นที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของ pyrimidine ring (Shapiro *et al.*, 1970b) ซึ่งพบว่า m5C สามารถถูก sulphonated ได้เช่นเดียวกัน (Hayatsu *et al.*, 1970 ; Hayatsu and shiragami, 1979 ; Wang *et al.*, 1980) amino group ณ ตำแหน่งที่ 4 ของ C และ m5C จะถูก destabilised โดยปฏิกิริยา sulphonation ดังกล่าว ซึ่งจะทำให้ C ถูก deaminated กลายเป็น U ในขณะที่ m5C จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง ค่า pH ที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาคือ 5.8 (Hayatsu *et al.*, 1970 ; Shapiro *et al.*, 1970b) การวิเคราะห์ผลทำได้โดยการทำ DNA sequencing ซึ่งอาจทำได้ 2 วิธี วิธีแรกคือการ cloning แล้วนำ clone ที่ได้ไปทำ sequencing ต่อไป อีกวิธีหนึ่งคือการทำ sequencing จาก PCR product โดยตรง ปัญหาที่เกิดขึ้นจากการ cloning แล้วจึงทำ sequencing คือ เป็นวิธีที่ค่อนข้างเสียเวลา เนื่องจากมักจะมีจำนวน clones จำนวนมาก (>20 clones) ซึ่งต้องทำการ sequence ทั้งหมดตามลำดับเพื่อให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือ ปัญหาอีกประการหนึ่ง คือในกรณีที่เกิด incomplete conversion จะให้ผลเหมือนกับการเกิด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

nonsymmetrical CpX methylation ซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการแปลผลได้ ส่วนวิธีทำ sequencing จาก PCR product โดยตรงนั้นเป็นวิธีที่เลี่ยงปัญหาที่เกิดจาก incomplete conversion แต่มีวิธีการที่ยุ่งยากกว่าวิธีแรก และต้องใช้ความละเอียดถี่ถ้วนอย่างมากในการแปลผลจากความเข้มของ bands ที่ได้ ในการวิเคราะห์ผลที่ได้จากการทำ sequencing จะดูจากการปรากฏของ bands ใน C-track ซึ่งจะแสดงถึงการเกิด m5C ใน genome แต่ถ้าเกิด bands ใน T-track ด้วย แสดงว่าเกิด partial methylation หรืออาจเกิด incomplete conversion ขึ้น (Tabor and Richardson, 1987, 1989, 1995)

8.7 Combined bisulphite reaction analysis (COBRA)

เป็นวิธีที่อาศัยหลักการของวิธี bisulphite treatment ร่วมกับการใช้ restriction enzyme ที่มีเฉพาะเบส cytosine ภายใน CG sites ในตำแหน่งจดจำของมัน เช่น *Bst*UI (CGCG) หรือ *Taq*I (TCGA) ซึ่งถ้า cytosine ถูก methylated เอนไซม์ดังกล่าวจะสามารถตัดได้ แต่ถ้า cytosine ไม่ถูก methylated เอนไซม์ก็ตัดไม่ได้ (Xiong and Laird, 1997) นอกจากนี้จะมีการใช้เอนไซม์อีกตัวหนึ่งเพื่อใช้เป็นตัวควบคุม ในการยืนยันว่าเกิด complete conversion หรือไม่ ซึ่งเอนไซม์ตัวที่ 2 นี้จะต้องไม่มี CG sites ในตำแหน่งจดจำของมัน เช่น *Hsp*92II (CATG) ซึ่งถ้าเอนไซม์ตัดได้ แสดงว่าอาจเกิด incomplete conversion หรืออาจเกิด nonsymmetrical methylation ขึ้น ข้อจำกัดของวิธีการนี้คือ สามารถใช้วิเคราะห์การเกิด methylation ได้ภายในตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะเท่านั้น ไม่สามารถใช้ในการ probe m5C ทั้งหมดใน genome ได้

8.8 Immunology

วิธีนี้จะอาศัยปฏิกิริยาจำเพาะระหว่าง monoclonal antibodies และ m5C ซึ่งมีวิธีการคือ ทำการ immobilized ตัวอย่าง denatured DNA ที่ต้องการศึกษา บน DEAE membranes แล้วนำไปบ่มกับ mouse monoclonal antibody ที่จำเพาะเจาะจงต่อ m5C โดยตรง (Oakley *et al.*, 1997) จากนั้นจึง detect antibody โดยนำ membrane ที่ได้ไปบ่มกับ fluorescein isothiocyanate (FITC) - linked goat anti-mouse IgG (Sigma) ซึ่งใช้เป็น secondary antibody แล้วจึงวิเคราะห์จากการติดสีย้อมหลังจาก scan ด้วย Molecular Dynamics PhosphorImager ซึ่งความเข้มของสีที่เกิดขึ้นจะแสดงสัดส่วนของระดับ DNA methylation ในสายดีเอ็นเอ สำหรับ internal control อาจทำได้โดยการย้อม membrane ด้วย ethidium bromide หลังจากที่ทราบปริมาณของ antibody signal แล้ว ซึ่ง ethidium bromide fluorescence จะทำให้ทราบถึงสัดส่วนของปริมาณ DNA ที่ loaded บน membrane ซึ่งค่านี้สามารถนำไปใช้ในการ normalize data ในตัวอย่างดีเอ็นเออื่นๆ ได้ ข้อเสียของวิธีการนี้คือ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

membrane บางชนิดจะเกิด autofluorescence เมื่อนำไป scan ใน PhosphorImage ดังนั้นจึงต้องทำการ scan blank membrane เสียก่อน ซึ่งก็พบว่า membrane ที่ใช้ได้ดีที่สุดคือ DEAE paper (Schleicher&Schuell NA 45, Dassel, Germany) DNA จะถูกดูดซับลงบน membrane โดยใช้ slot-blot apparatus (BioRad, Hemel Hempstead, Hertfordshire, UK) วิธี Immunological นี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษา chromosomal patterns ของ DNA methylation ใน individual cells โดยใช้ fluorescence microscopy ได้ด้วย (Oakeley *et al.*, 1997 ; Buzek *et al.*, 1998 ; Rougier *et al.*, 1998) แต่ข้อจำกัดของวิธีการนี้ คือ สามารถใช้วิเคราะห์ได้ในกรณีที่ m5C ไม่ได้รวมเป็นส่วนหนึ่งของ base-paired เท่านั้น เนื่องจากปฏิกิริยาจำเพาะระหว่าง monoclonal antibodies และ m5C จะเกิดขึ้นได้ยากในสภาพดังกล่าว จึงจำเป็นต้องมีการ depurinated DNA ด้วย sulphuric acid เสียก่อน (Maxam and Gillbert, 1980)

การนำหลักการของวิธี Immunology ไปใช้ในการตรวจสอบ DNA methylation เช่น การทดลองของ Zluvova *et al.* (2001) ซึ่งได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ DNA methylation ในระหว่างการเจริญเติบโตของ *Silene latifolia* โดยทำการตรวจสอบ 2 ระยะการเจริญเติบโต คือ ขณะที่เมล็ดกำลังงอก และ ขณะที่มีการพัฒนาของ shoot apical meristem จากการทดลองพบว่าในระหว่างที่เมล็ดกำลังงอกจะมี global DNA methylation ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยที่การลดลงนี้จะเกิดในส่วนของ endosperm ก่อน ตามด้วยในส่วนของ hypocotyl และ cotyledon ตามลำดับ ซึ่งเมื่อสังเกตจากการติดสีย้อม ก็จะทำให้ทราบว่า การลดลงของ methylation นี้เกิดขึ้นก่อนที่จะมีการแบ่งเซลล์ ส่วนในระหว่างที่มีการพัฒนา ของ shoot apical meristem นั้นพบว่ามี global DNA methylation สูงตลอดช่วงระยะเวลาที่มีการเจริญเติบโตทางกิ่งใบ (vegetative growth) ซึ่งในช่วงเวลานี้จะมีการแบ่งเซลล์ค่อนข้างต่ำ แต่ในเวลาต่อมาเมื่อส่วนของ shoot apical meristem มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น floral bud ก็พบว่ามี global DNA methylation ลดลง และเริ่มมีการแบ่งเซลล์มากขึ้น

8.9 Restriction endonucleases

เอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นกลุ่มของเอนไซม์ซึ่งตัด phosphodiester bond ในโครงสร้างเกลียวคู่ของ DNA ตรงลำดับที่มีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์อย่างจำเพาะ เอนไซม์จะจับที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 4-6 หน่วย แล้วจะตัดพันธะซึ่งอยู่ใกล้เคียงหรืออยู่ในลำดับนิวคลีโอไทด์นั้นเอง เอนไซม์ดังกล่าวจะพบในแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียจะใช้เอนไซม์เหล่านี้ในการกำจัด DNA ที่แปลกปลอมเข้ามา เสมือนเป็นการป้องกันตัวเองจากการถูกบุกรุก การที่เอนไซม์สามารถตัด DNA ในตำหน่งที่จำเพาะ จึงเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้ตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation โดยมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลักการคือ การเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น isochizomers กันคือจดจำลำดับเบสเหมือนกัน แต่ sensitive ต่อ methylation ต่างกัน ทำให้สามารถนำมาใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลง DNA methylation ในตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของมันได้

Waalwijk and Flavell (1978) ได้รายงานการตรวจสอบ cytosine methylation โดยใช้เอนไซม์ตัดจำพาะ 2 ชนิด ได้แก่ *Hpa*II และ *Msp*I ซึ่งมีตำแหน่งจดจำเป็น CCGG เหมือนกัน แต่ sensitive ต่อ methylation ต่างกัน นั่นคือ *Hpa*II จะสามารถตัดได้ในกรณีที่ C ไม่ถูก methylated พร้อมกันทั้งสองสาย หรือที่เรียกว่า hemimethylation แต่จะตัดไม่ได้ถ้าเกิด full methylation ส่วน *Msp*I จะสามารถตัดได้ไม่ว่า internal C จะถูก methylated หรือไม่ แต่จะตัดไม่ได้ ถ้า external C ถูก methyated เมื่อตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้ว จึงใช้เทคนิคทางอิเล็กโทร-โฟรีซิสในการตรวจสอบการเกิด cytosine methylation โดยพิจารณาจากการปรากฏหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ เปรียบเทียบกันระหว่างตัวอย่างที่ต้องการศึกษา นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เอนไซม์คู่อื่นที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบ DNA methylation ได้ เช่น เอนไซม์ *Sau3A*I และ *Nde*II ซึ่งมีตำแหน่งจดจำคือ GATC (Cai *et al*., 1996) และเอนไซม์ *Mva*I และ *Eco*RII ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ คือ CC(A/T)GG (Simkova, 1998) เป็นต้น

8.10 Southern blot analysis

เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นโดย E. M. Southern (1975) สำหรับการย้ายชิ้น DNA หลังจากแยกขนาดโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสใน agarose gel ไปยัง membrane filter หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจโดยนำไป hybridize กับ probe ที่มีเบสคู่สมกันที่ติดฉลากไว้แล้ว ปัจจุบันได้นำเทคนิค Southern blot มาใช้ร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ในการตรวจสอบ DNA methylation ซึ่งวิธีการนี้ค่อนข้างเป็นที่นิยม เนื่องจากสามารถนำไปใช้เมื่อมีตัวอย่างจำนวนมากๆ เพราะเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ประหยัด และง่ายแก่การแปลผล การทำ Southern blot จะใช้ปริมาณ DNA ค่อนข้างมาก คือประมาณมากกว่า 5 μg DNA ที่ได้จะถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ตัว คือ *Hpa*II และ *Msp*I แล้วทำการวิเคราะห์โดยใช้ electrophoresis จากนั้นจึงนำไปทำ Soutern blot โดยใช้ยีนที่เราสนใจมาใช้เป็น probe ถ้า band ที่ได้จากการ hybridization หลังจากที่ตัดด้วย *Hpa*II และ *Msp*I มีขนาดเท่ากัน แสดงว่าเบส ณ ตำแหน่งดังกล่าวไม่ถูก methylated แต่ถ้า band ที่ได้จากการตัดด้วย *Hpa*II มีขนาดใหญ่กว่า band ที่ได้จากการตัดด้วย *Msp*I แสดงว่าเกิด methylation ในตำแหน่งดังกล่าว แต่ในกรณีของ partial digestion จะเกิดทั้ง band ขนาดเล็กและขนาดใหญ่ โดยที่ relative intensity ของ bands จะเป็นสัดส่วนกับระดับ DNA methylation ที่เกิดขึ้นในตำแหน่งนั้น วิธีการนี้จะได้ผลดี ในกรณีที่ probe ที่นำมาใช้ มี methylation site จำนวนจำกัดเท่านั้น ดังนั้นข้อมูลที่ได้ค่อน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้างจะจำกัด อย่างไรก็ตามสามารถใช้วิธีนี้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่าง methylation status ของ CCGG site กับ transcriptional activity ได้ ซึ่งถ้าตรวจพบว่าผลที่ได้ไม่สัมพันธ์กัน ก็ไม่ได้หมายความว่ากระบวนการ DNA methylation ไม่ได้มีส่วนสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนดังกล่าว แต่อาจเป็นได้ว่า CCGG site ที่เกิด methylation อาจเป็นตำแหน่งที่ไม่สำคัญ ปัญหาที่เกิดขึ้นในการวิเคราะห์ DNA พืช คือ external cytosine อาจถูก methylated ได้โดย CXG methylatransferases ได้เช่นกัน ทำให้ตำแหน่งดังกล่าวถูกตัดได้ด้วย *Hpa*II แต่ไม่สามารถถูกตัดได้ด้วย *Msp*I ยิ่งไปกว่านั้นถ้า cytosine ทั้ง 2 ตัวถูก methylated ทั้งคู่ ก็จะทำให้ไม่มีเอนไซม์ตัวใดตัดได้เลย ทำให้ดูเหมือนว่าไม่เกิด methylation ซึ่งจะทำให้เกิดความผิดพลาดในการแปลผลได้ เทคนิคนี้สามารถทำให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นได้โดยนำไปใช้ประกอบกับ polymerase chain reaction (PCR) ในการเพิ่มปริมาณ digested DNA ซึ่งจะมีการเพิ่มปริมาณของ PCR product ได้ก็ต่อเมื่อตำแหน่งดังกล่าวไม่ถูก methylated เท่านั้น อย่างไรก็ตาม ก็อาจเกิดปัญหาในกรณีที่เกิด partial digestion เพราะผลที่ได้จะเหมือนกับการเกิด cytosine methylation

การทดลองที่นำเทคนิค Southern blot และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ sensitive ต่อการเกิด methylation ไปใช้ในการตรวจสอบ DNA methylation เช่น การทดลองของ Simkova (1998) ซึ่งได้ทำการศึกษา methylation status ใน mitochondrial DNA (mtDNA) ของแครอท (*Daucus carota* L.) โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น isochizomer กันรวม 2 คู่ คือ *Hpa*II/ *Msp*I ซึ่งมีตำแหน่งจดจำคือ CCGG และ *Mva*I/*Eco*RII ซึ่งมีตำแหน่งจดจำคือ CC(A/T)GG มาใช้ในการวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิค Southern bot โดยได้นำ mitochondrial genes *cox*II และ *atp*A มาใช้เป็น probe จากผลการทดลองพบว่า mtDNA ที่ถูกตัดด้วย *Mva*I/*Eco*RII เกิด restriction patterns ที่แตกต่างกันทั้งคุณภาพและปริมาณ ในขณะที่ mtDNA ที่ถูกตัดด้วย *Hpa*II/ *Msp*I ให้ผลไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า mtDNA ของแครอท ถูก methylated ใน CNG trinucleotides แต่ไม่ถูก methylated ใน CG dinucleotides

8.11 Amplification Fragment Length Polymorphism (AFLP)

AFLP เป็นเทคนิคที่ใช้การตัดด้วยเอนไซม์ แล้วนำชิ้นส่วนที่ถูกตัดมาทำปฏิกิริยา PCR โดยทั่วไปเทคนิค AFLP จะใช้ในการบอกความแตกต่างของชนิดและพันธุ์พืช ซึ่งใช้เอนไซม์ 2 ชนิด ในการตัด genomic DNA ได้แก่ *Eco*RI ซึ่งมีตำแหน่งจดจำคือ GAATTC และ *Mse*I ซึ่งมีตำแหน่งจดจำคือ TTAA แต่สำหรับการตรวจสอบ DNA methylation จะมีการใช้เอนไซม์ที่ sensitive ต่อ methylation นั่นคือ *Hpa*II และ *Msp*I มาใช้ร่วมกับเอนไซม์ 2 ชนิดดังกล่าวด้วย โดยใช้ *Hpa*II ตัดคู่กับ *Eco*RI และใช้ *Msp*I ตัดคู่กับ *Mse*I เมื่อได้ชิ้นส่วนที่ถูกตัดสมบูรณ์แล้ว จึงนำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

มาเชื่อมต่อกับ adapter แล้วทำปฏิกิริยา PCR 2 ครั้ง โดยใช้ primer ที่ถูกออกแบบให้มีลำดับเบสจำเพาะเจาะจงกับชิ้นส่วนที่ถูกเชื่อมต่อกับ adapter ที่อยู่เฉพาะด้านของแต่ละเอนไซม์ การทำปฏิกิริยาครั้งแรก เรียกว่า preamplified selective PCR เป็นการคัดเลือกโดยใช้คู่ primer ที่มีจำนวนเบสจำเพาะเจาะจงเพียงตำแหน่งเดียวในแต่ละปลายของ fragment ที่ถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก และมี adapter มาเชื่อมต่อแล้ว ซึ่งลำดับเบสหนึ่งตำแหน่งนี้จะเป็นตัวกำหนดการเพิ่มลำดับเบสตำแหน่งต่อไปในการทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2 ผลที่ได้จากการทำปฏิกิริยาครั้งแรกยังไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis ได้ เนื่องจากมีแถบ DNA เกิดขึ้นจำนวนมาก ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้อย่างละเอียด ดังนั้นในการทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2 ซึ่งเรียกว่า amplified selective PCR จึงมีการเพิ่มจำนวนเบสอีก 2-4 ตำแหน่ง เพื่อเพิ่มการคัดเลือกให้มากยิ่งขึ้นเพื่อง่ายแก่การวิเคราะห์ผล

การทดลองที่นำวิธี AFLP และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ sensitive ต่อการเกิด methylation ไปใช้ในการตรวจสอบ DNA methylation เช่น การทดลองของ Xiong *et al.* (1999) ได้ศึกษารูปแบบการเกิด cytosine methylation ใน genome ของข้าว เปรียบเทียบกันในเนื้อเยื่อที่ได้จาก 2 ระยะของการเจริญเติบโต คือ ระยะที่เป็นต้นกล้า (seedling) และระยะที่เกิดใบธง (flag leaf) ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) ซึ่งเป็นการประยุกต์ใช้เทคนิค AFLP ร่วมกับการใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ sensitive ต่อ methylation นั่นเอง จากผลการทดลองพบว่า 5'-CCGG sequences ใน genome ของข้าว เกิด cytosine methylation ประมาณ 16.3% ซึ่งส่วนมากจะเกิด methylation ขึ้นทั้งสองสายของ DNA (full methylation) มากกว่าที่จะเกิด methylation ที่สายใดสายหนึ่งของ DNA (hemimethylation) และพบว่าเกิด cytosine methylation ในระยะ seedling มากกว่าในระยะ flag leaf นอกจากนี้ยังมีการทดลองของ Chakrabarty *et al.* (2003) ซึ่งได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ DNA methylation ในโสมไซบีเรีย (*Eleuterococcus senticosus*) เปรียบเทียบกันระหว่าง non-embryogenic calli และ embryogenic calli พบว่า non-embryogenic calli เกิด methylation สูงกว่า embryogenic calli สนับสนุนสมมติฐานที่ว่า กลไกที่ควบคุมการเกิด cell differentiation ในระหว่าง somatic embryogenesis อาจเป็นผลมาจากกระบวนการ DNA methylation

8.12 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD เป็นเทคนิคที่ใช้ปฏิกิริยา PCR โดยอาศัยการสุ่มจับของ primer เพื่อเพิ่มปริมาณของ DNA อาศัยหลักการที่ว่า DNA ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันในการเรียงลำดับเบสอันได้แก่ adenosine(A), thymine(T), guanine(G) และ cytosine(C) ที่มีการสุ่มเอาตัวแทนบริเวณใด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บริเวณหนึ่งบนสาย DNA มาเพิ่มปริมาณ เช่นเดียวกับขบวนการ DNA replication ภายในเซลล์ (วัชรี และมนตรี, 2536) สำหรับการตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation นั้นจะใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ sensitive ต่อการเกิด methylation นั่นคือ *Hpa*II และ *Msp*I มาใช้ร่วมกับเทคนิค RAPD ด้วย หลังจากตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR แล้ว ก็สามารถนำมาแยกโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วนำแผ่นเจลไปตรวจสอบความแตกต่างของลายพิมพ์ DNA ต่อไป ซึ่งในเทคนิค RAPD ทั่วไปจะใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ประมาณ 35-42 องศาเซลเซียส แต่ต่อมามีผู้เสนอให้มีการเพิ่มอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ขึ้นเป็น 46-62 องศาเซลเซียส ซึ่งจะมีผลไปเพิ่มความคมชัดของ bands (high resolution) เกิด polymorphism มากขึ้น และผลที่ได้ออกมาทุกครั้งสามารถทำซ้ำได้ (reproducibility) เรียกเทคนิคนี้ว่า High Annealing Temperature – Random Amplified Polymorphic DNA (HAT-RAPD) (Anuntalabhochai *et al.*, 2000)

การทดลองที่นำเทคนิค RAPD ร่วมกับการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ sensitive ต่อการเกิด methylation ไปใช้ในการทดลอง เช่น การทดลองของ Cai *et al.* (1996) ซึ่งได้ตรวจสอบการเกิด DNA methylation ในจีโนมของ *Citrus grandis* (L.) Osb. และ *Poncitrus trifoliata* (L.) Raf. รวมทั้งลูกผสม F1 ที่ได้จากการผสมข้ามระหว่างทั้งสองสปีชี่ส์ ในการทดลองนี้ได้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 คู่ ได้แก่ *Hpa*II/ *Msp*I และ *Sau3AI*/*Nde*II โดยทำการตัด genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด ก่อนนำไปเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR แล้วตัดซ้ำอีกครั้งด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดิมที่ตัดในครั้งแรก จากผลการทดลองพบว่า จากการใช้ 7 ไพร์เมอร์ทำให้เกิด 28 methylation events และเกิด methylation polymorphisms ขึ้นจำนวน 23 แถบ นอกจากนี้ยังมีการทดลองของ Prakash and Kumar (1997) ซึ่งได้ตรวจสอบการเกิด DNA methylation ในพิทูเนียที่ได้รับสาร 5-azacytidine และ 5-aza-2'-deoxycytidine ซึ่งส่งผลไปยับยั้งการเจริญของยอดต้นพิทูเนีย หลังจากการตัด genomic DNA ด้วย *Hpa*II และ *Msp*I และตรวจสอบด้วยเทคนิค RAPD แล้วพบว่าต้นพิทูเนียที่ได้รับสาร มีรูปแบบของลายพิมพ์ DNA แตกต่างไปจากต้นที่ไม่ได้รับสาร คือมีจำนวนแถบ DNA น้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับสารจำนวน 5 แถบ แสดงให้เห็นว่าเกิด hypomethylation หรือ demethylation ขึ้นในต้นที่ได้รับสารทั้งสองชนิดดังกล่าว

วิธีการในการตรวจสอบ DNA methylation ในปัจจุบันมีหลายวิธี แต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป ซึ่งการจะเลือกวิธีการใดมาใช้ในการทดลองนั้น ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดลองด้วย การหลีกเลี่ยงข้อผิดพลาดที่อาจเกิดจากข้อจำกัดของแต่ละวิธี อาจทำได้โดยการใช้เทคนิคมากหนึ่งวิธีมาใช้ในการตรวจสอบ เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองซึ่งกันและกัน ทั้งนี้ก็เพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความถูกต้องแม่นยำมากที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved