

การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลิน ในช่วงก่อนการออกดอกของยอดลินจีพันธุ์ฮวงฮวย

Changes in Gibberellin-like Substance in Stem Apex prior to Flowering of Lychee cv. Hong Huay

วรรณวรรค์ พัทธนะโพธิ์^๑ และ ธนัท ชาญญาภา^๒
Wanwarang Patthnapo^๑ and Thanart Thanyapa^๒

Abstract : Changes in gibberellin-like substances prior to flowering in stem apexes of 20 years old lychee tree cv. Hong Huay were studied from December 1997 to October 1998. Stem apexes were taken from Suan Song Sand , Doi Pui, Chiang Mai , Thailand. Completely Randomized Design with 10 replications was employed , while the treatment was the number of weeks prior to flowering i.e. 0 , 1 , 2 , 3 and 4. It was found that activities of gibberellin-like substances were high in the 4th and the 3rd week prior to flowering .The activities decreased in the 2nd week by which flower initiation was found by microtome section. It decreased from the 1st week to minimum level at the week of flowering.

บทคัดย่อ : การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในยอดลินจีพันธุ์ฮวงฮวยก่อนการออกดอก ใช้ต้นลินจีอายุ 20 ปี ณ สวนสองแสน คอยบุย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ เก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2540 ถึงเดือน ตุลาคม พ.ศ. 2541 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ มี 5 วิธีการ โดยใช้จำนวนสัปดาห์ก่อนการออกดอกเป็นวิธีการ ได้แก่ 0 , 1 , 2 , 3 และ 4 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า สารคล้ายจิบเบอเรลลินจะมีปริมาณสูงในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ก่อนการออกดอก และมีปริมาณลดลงในสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งเป็นสัปดาห์ที่เริ่มเกิด flower initiation เมื่อตรวจสอบด้วย microtome section หลังจากนั้นจะมีปริมาณลดลงจากสัปดาห์ที่ 1 จนลดลงต่ำสุดเมื่อสัปดาห์ที่ออกดอก

^๑ ภาควิชาพืชสวน, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่ 50200

^๒ Department of Horticulture , Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chaing Mai 50200, Thailand.

บทนำ

ลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) มีแหล่งกำเนิดในประเทศจีน เป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย (Subhadrabandhu, 1990) ลิ้นจี่ปลูกมากในภาคเหนือของประเทศไทยและเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของจังหวัดเชียงใหม่ อำเภอที่ปลูกลิ้นจี่มากได้แก่ อำเภอฝาง ไชยปราการ แม่ฮาย เชียงดาว พัวัว แม่แตง สะเมิง พันธุ์ที่นิยมปลูกคือ สงฮวย โอวเฮียะ กิมเจ็ง และจักรพรรดิ การส่งออกลิ้นจี่สดในปี 2538 มีปริมาณ 3,257 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 118.5 ล้านบาท(สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2539)

ปัญหาสำคัญในการผลิตลิ้นจี่คือ การออกดอกไม่สม่ำเสมอ บางปีไม่ออกดอก หรือออกดอกน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในช่วงก่อนการออกดอกในบางปีมีอากาศหนาวเย็นไม่พอ หรือมีช่วงอากาศหนาวสั้น (Chaitrakulsup, 1981) ลิ้นจี่ต้องการอุณหภูมิต่ำเพื่อทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนภายในพืชและทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโตทางกิ่งใบ มีผลกระตุ้นการออกดอกได้ (พีรเดช, 2537)

แต่เดิมเคยมีความเชื่อว่าการออกดอกของพืชถูกควบคุมด้วยสารชนิดหนึ่งซึ่งเรียกว่า ฟลอริเจน(Florigen) แต่จนกระทั่งทุกวันนี้ยังไม่มีผู้ใดสกัดสารฟลอริเจนได้เลย อย่างไรก็ตามฮอร์โมนที่พืชสร้างขึ้นมีส่วนอย่างมากในการออกดอก นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ในสาขานี้เชื่อว่าความสมดุลของฮอร์โมนเป็นปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดการออกดอก และฮอร์โมนที่น่าจะเกี่ยวข้องได้แก่ จิบเบอเรลลิน เอทิลีน และไซโตไคนิน แต่

ก็ยังไม่มีการทราบว่ามีสมดุลของฮอร์โมนนั้นเป็นอย่างไร

การทดลองนี้มุ่งหวังที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลิน ซึ่งจะเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาสมดุลของฮอร์โมนก่อนการออกดอกของลิ้นจี่ในประเทศไทย หากทราบว่าสมดุลของฮอร์โมนเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการออกดอกของลิ้นจี่จริง ก็จะสามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาการใช้ฮอร์โมนและการดูแลต้นลิ้นจี่เพื่อให้ออกดอกได้สม่ำเสมอต่อไป

วิธีการวิจัย

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ทำ 10 ซ้ำ มี 5 วิธีการ คือ จำนวนสัปดาห์ก่อนการออกดอก (Flower initiation) ตรวจสอบด้วยวิธี Microtome section ได้แก่ 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ก่อนการออกดอก โดยมี 1 หน่วยการทดลอง คือ ต้นกล้าข้าว 7 ต้น

โดยทำการวิจัยเป็นขั้นตอน ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่าง (Sample preparation) เก็บตัวอย่างโดยตัดยอดลิ้นจี่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 0.5 ซม (วัดที่โคนกิ่ง) ยาว 10 ซม จำนวน 30 ยอดต่อ 1 หน่วยการทดลอง ตัดใบทิ้งแล้วใส่ถุงพลาสติกมัดปากถุงแล้วแช่น้ำแข็ง จากนั้นเดินทางประมาณครึ่งชั่วโมงเพื่อนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาสกัด
2. การสกัด (Extraction) นำยอดลิ้นจี่ 30 ยอดมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น แล้วนำมา ชั่งน้ำหนัก โดยใช้เครื่องชั่ง

- ละเอียดให้ได้ น้ำหนัก ประมาณ 20 กรัม แล้วนำมาใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล เติม Methanol 95% (lab. grade) 40 มล ปิดปาก Flask โดยใช้ถุงพลาสติกแล้วรัดด้วยหนังยาง เขย่าให้ผสมกัน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำกากไปสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่กรองได้มารวมกันจะได้สารละลาย ประมาณ 90 มล แล้วนำไปประเหยให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำ (Vacuum rotary evaporator) ในสภาพสุญญากาศที่ 600 mmHg แล้วจึงละลายส่วนที่แห้ง ด้วย 0.5 M Sodium phosphate buffer pH 8.0 ปริมาตร 15 มล แล้วนำแยกส่วนต่อไป
3. การแยกส่วน (Partition) นำสารละลายในข้อ 2 มาแยกส่วนด้วยกรวยแยก (Separatory funnel) โดยใช้ Ethyl acetate 100% (AR grade) ปริมาตร 20 มล เขย่าสารละลายให้เข้ากัน ประมาณ 10 ครั้ง แล้วตั้งทิ้งไว้จนสารละลายแยกชั้น แยกเอาส่วนบน (Ethyl acetate) เก็บไว้ นำชั้นล่าง (ซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์) มาปรับ pH ให้เท่ากับ 2.0 – 2.5 ด้วย HCl เข้มข้น 6 N แล้วนำไปแยกส่วน ด้วย Ethyl acetate ปริมาตร 20 มล ซ้ำอีก 4 ครั้ง จากนั้นนำสารละลาย Ethyl acetate ที่ได้ทั้ง 5 ครั้ง มารวมกัน แล้วนำไปประเหยให้แห้งด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำในสภาพสุญญากาศที่ 600 mmHg ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนแห้งติดกันขวดแล้วละลายส่วนที่แห้งด้วย Methanol 95% (lab grade) ปริมาตร 1 มล โดยใช้ Volumetric pipete นำสารละลายที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ ต่อไป
4. การทำให้บริสุทธิ์ (Purification)
- 4.1 ใช้วิธีเปเปอร์โครมาโตกราฟี เตรียมแผ่นโครมาโตแกรม โดยใช้กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ขนาด 9 x 28 ซม มาขีดเส้นกำหนดจุดเริ่มต้นที่จะ Strip สารละลาย โดยขีดด้วยดินสอดำ ห่างจากขอบล่าง 2 ซม และจุดสุดท้ายที่สารละลายเคลื่อนที่ไปถึง (16.5 ซม วัดจากจุดที่ Strip) แล้วใช้หลอดแก้ว Capillary ดูดสารละลายจากข้อ 3 มา Strip เป็นแนวยาวลงบนแผ่นโครมาโตแกรมโดยใช้ตัวอย่างแผ่นละ 100 ml (ซึ่งเทียบเท่ากับตัวอย่าง 2.0 กรัมสด) แล้วทิ้งไว้ให้แถบสารแห้ง
- 4.2 นำแผ่นโครมาโตแกรมแช่ในตัวทำละลายที่มีส่วนผสมของ Isopropanol 99.7% (AR grade) : NH_4OH 25% (AR grade) : น้ำกลั่น (10:1:1 โดยปริมาตร) ใน Developing chamber ขนาด 20 x 60 x 40 ซม โดยให้แถบสารอยู่เหนือสารละลาย ทิ้งไว้จนสารละลายเคลื่อนที่ไปจนถึงระยะ 16.5 ซม (ใช้เวลาประมาณ 6 – 7 ชั่วโมง) ให้นำออกจาก Developing chamber แล้วผึ่งให้แห้ง
- 4.3 แบ่งแผ่นโครมาโตแกรม เป็น R_f 0.1 – 1.0 โดยแบ่งเป็น 10 ส่วนเท่าๆกัน เอาเฉพาะ R_f 0.3-0.8 ซึ่งเป็น R_f ที่พบ Activity ของจิตเบอเรลลินในยอดลิ้นจี่มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในขวดแก้วขนาด 20 มล ที่มีอะซิโตน 50% (v/v) ปริมาตร 10 มล เพื่อละลายสารที่อยู่ในกระดาษโครมาโตแกรม นำไปใช้ในขั้นตอนการทำ Rice Micro-drop Bioassay (RMB) ต่อไป

5. การทำ Rice Micro-drop Bioassay (RMB) ใช้ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 2 มาแช่ในสารละลายผสมระหว่าง Uniconazole (lab grade) กับ Prohexadione calcium (lab grade) ความเข้มข้น 2.33×10^{-5} สตล และ 1×10^{-2} สตล (ในอัตราส่วน 1:1) ตามลำดับ เก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเมล็ดข้าวมาแช่ในสารละลาย Chlorox 5% เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ Autoclave แล้ว 5 ครั้ง (ทำในสภาพปลอดเชื้อ) แล้วนำเมล็ดมาเพาะในน้ำกลั่นที่ Autoclave แล้วภายใต้สภาพเดิมเป็นเวลา 2 วัน (ให้ Coleoptile ยาวประมาณ 2 มม) นำไปเพาะในอาหารวุ้น 0.8%(w/v) ในหลอดทดลอง หลอดละ 7 ต้น แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม (Growth chamber) อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ภายใต้แสงจากหลอด Fluorescent ความเข้มแสง 5,000 lux เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จึงนำมาหยดสารละลายที่ได้จากข้อ 4.3 บริเวณระหว่าง Coleoptile กับ First leaf ของต้นกล้า ปริมาตร 1 ml โดยใช้ Microsyringe แล้วนำไปไว้ในตู้ควบคุมสภาพแวดล้อม สภาพแวดล้อมเหมือนเดิมเป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาวัดผล

การบันทึกผลการทดลอง

1. วัดความยาว Secondary leaf sheath นับจากวันเริ่มหยดสารละลายตัวอย่าง ที่สกัดได้จากข้อ 4.3
2. เทียบหาปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินจากกราฟมาตรฐาน มีหน่วยเป็น mg GA₃ (Kyowa) equi. /g f.wt.
3. วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้โปรแกรม Statistix Version 3.5 ของ NH analytical software - โดยการวิเคราะห์ Test of AOV assumption , AOV , Polynomial contrast , LSD
4. ตรวจสอบ Flower initiation โดยการทำ Microtome section

ผลการทดลอง

พบว่าจะมีปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินสูงในสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งจะเท่ากับสัปดาห์ที่ 3 ก่อนการออกดอก และมีปริมาณลดลงในสัปดาห์ที่ 2 ก่อนการออกดอก จากนั้นจะลดลงในสัปดาห์ที่ 1 ก่อนการออกดอกจนถึงสัปดาห์ที่ออกดอก และผลการทำ Microtome section พบว่า สัปดาห์ที่ 4 ก่อนการออกดอกบริเวณ Apical meristem (ap) จะไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 3 ก่อนการออกดอกบริเวณ Apical meristem จะเริ่มขยายออก และในสัปดาห์ที่ 2 ก่อนการออกดอกซึ่งเป็นช่วงที่พบ Flower initiation โดยตรวจพบ 10% ส่วนในสัปดาห์ที่ 1 และสัปดาห์ที่ออกดอกนั้น จะตรวจพบ Flower initiation 20% และ 40% ตามลำดับ (ภาพที่ 1)

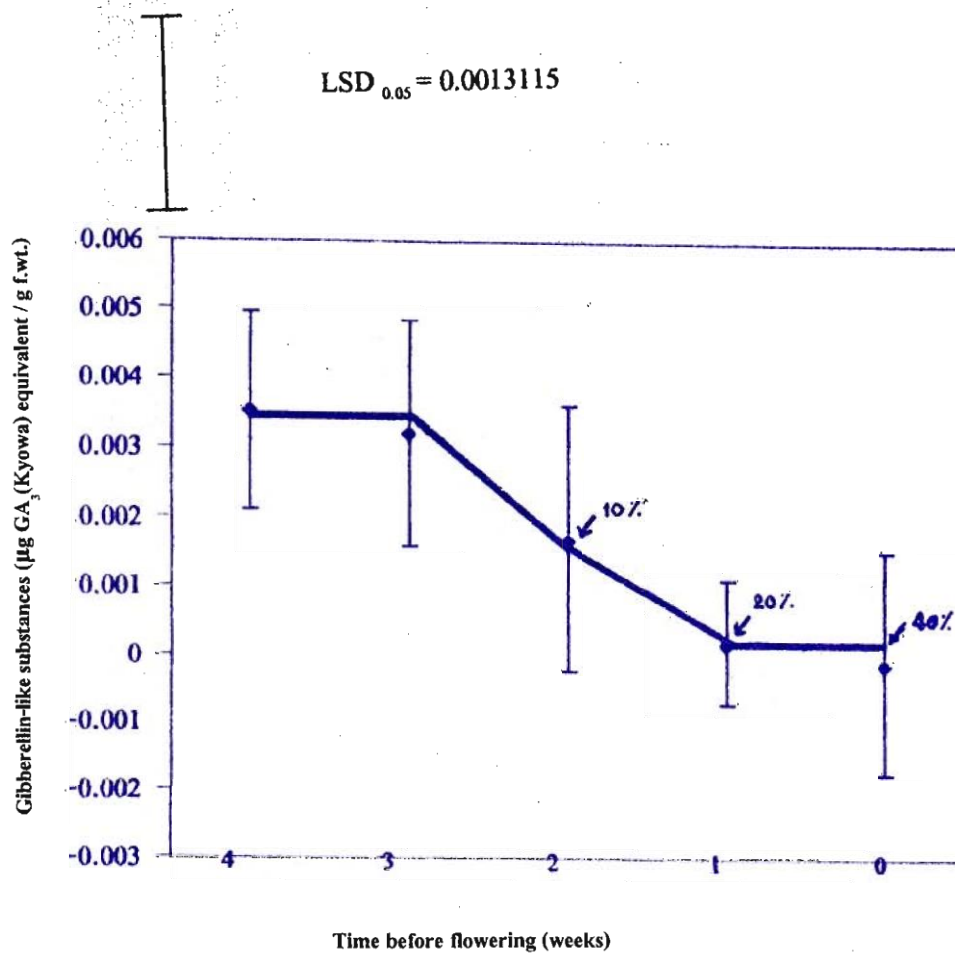


Figure 1 Amount of gibberellin-like substances of Rychee cv. Hong Huay.

Remarks : Means different separated by LSD at $P < 0.05$, C.V. = 90.47% (untransformed)
and C.V. = 3.75% (transformed by $\log(s+1) \times 10$), 10 replications, treatment mean
difference = 4% of overall mean, = flower initiation

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินในยอดลิ้นจี่พันธุ์ฮวงฮวยก่อนการออกดอก พบว่า สารคล้ายจิบเบอเรลลินจะมีปริมาณสูงในสัปดาห์ที่ 4 และ 3 ก่อนการออกดอก และมีปริมาณลดลงในสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งเป็นสัปดาห์ที่เริ่มเกิด Flower initiation เมื่อตรวจสอบด้วย

Microtome section หลังจากนั้นปริมาณจะลดลงต่อไปอีกในสัปดาห์ที่ 1 ก่อนการออกดอก จนถึงสัปดาห์ที่ออกดอก (เมื่อมองเห็นด้วยตาเปล่า) ผลการทดลองครั้งนี้คล้ายกับการทดลองของสุวดี (2540) พบว่ามีปริมาณสารคล้ายจิบเบอเรลลินมากในสัปดาห์ที่ 4 ก่อนการแทงช่อดอก แล้วปริมาณจะลดลงในสัปดาห์ที่ 3 และคงที่ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 2 ในขณะที่ปริมาณจะลดลงอีกครั้งจนไม่

สามารถวัดได้ในสัปดาห์ที่ 1 และ 0 ก่อนแทงช่อดอก นอกจากนี้ นพพร (2539) ได้รายงานว่ ปริมาณสารคล้ำยจิบเบอเรลลินมีปริมาณสูงในสัปดาห์ที่ 6 ก่อนการออกดอก และจะคงที่ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 3 ก่อนการออกดอก จากนั้นปริมาณจะลดลงต่ำสุดในสัปดาห์ที่มีการออกดอก ส่วนการศึกษาของ Chen (1990) พบว่าปริมาณสารคล้ำยจิบเบอเรลลินจะเริ่มลดลงตามลำดับตั้งแต่ช่วงการพักตัวของตา ช่วง 30 วันก่อนการสร้างตาดอก ช่วงการสร้างตาดอก และช่วงดอกบาน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในยอดมะม่วงที่ Chen (1987) ได้ศึกษาไว้ พบว่า ปริมาณสารคล้ำยจิบเบอเรลลินในระยะที่เกิดตาดอก และช่วงที่ดอกบานเต็มที่ จะอยู่ในระดับต่ำ

เอกสารอ้างอิง

- คณพล จุฑามณี. 2532. การเปลี่ยนแปลงระดับของสารคล้ำยจิบเบอเรลลินในช่วงการเจริญทางกิ่งใบ และการออกดอกของมะม่วงพันธุ์เขียวเสวย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 64 น.
- นพพร บุญปลอด. 2539. การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ำยจิบเบอเรลลินในยอดลำไยพันธุ์คอก่อนการออกดอก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 62 น.
- พีรเดช ทองอำไพ. 2537. สอร์โม่พืชและสารสังเคราะห์แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. วิทยุการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 196 น.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2539. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2539/40. ศูนย์สถิติการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพมหานคร. 272 น.
- สุวลี แสงอรุณรัตน์. 2540. การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารคล้ำยจิบเบอเรลลินในยอดลำไยพันธุ์ฮงฮวยก่อนการออกดอก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 81 น.
- Chaitrakulsup.T. 1981. Seasonal Changes in Total Nitrogen and Total Nonstructural Content in Leaves and Terminal Shoot of *Litchi chinensis* Sonn. var. Hong Huay. M.S. Thesis , Kasetsart University, Bangkok. 72 p.
- Subhadrabandhu, S. 1990. Lychee and Langan Cultivation in Thailand. Rumthai Publication, Bangkok. 40 p.